دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری گروه اصلاح نباتات

گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک

همسانه سازی و انتقال ژن tPA به گیاه توتون و آنالیز گیاهان تراریخت

تحقیق و نگارش:

اسد معصومی اصل

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

اساتید مشاور:

دکتر فریدون مهبودی و دکتر هوشنگ علیزاده

بهار 1388

TMU

Cloning and transformation of tissue Plasminogen Activator (tPA) gene to tobacco (*Nicotiana tabacum* L. Xanti)

A thesis presented for the Degree of Ph.D in Plant Breeding
(Molecular genetics and Genetic Engineering)

Faculty of Agriculture
Tarbiat Modares University

By:
Asad Masoumi Asl

Supervisor:
Mokhtar Jalali-Javaran (Ph.D)

Advisors:
Fereidoun Mahboudi and Houshang Alizadeh

Apr. 2009

تقدیم به:

حضرت مهدی(عج)

شهدای گلگون کفن انقلاب اسلامی

پدر و مادر مهربان و فداکار

و

همسر، خواهران و برادران گرامیم

تشکر و قدردانی:

سپاس خدای را که ما را به شرف علم مفتخر ساخت و در این مسیر راهنمایانی شایسته فرا راهمان قرار داد.

با عنایت به فرموده مولای متقیان (من علمنی حرفا فقد صیرنی عبدا) بر بنده فرض است که از تمامی کسانی که بنده را از مرحله حرف آموزی تا مرحله مفهوم سازی یاری کردند نهایت تشکر و قدردانی را بعمل آورم.

از باب من لم یشکر المخلوق من لم یشکر الخالق، لازم است از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران که همواره از حمایت ها و راهنمایی های ارزنده شان بهره مند بوده ام، نهایت تشکر و قدردانی را بعمل آورم. از استاد مشاور گرانقدرم جناب آقای دکتر فریدون مهبودی که نمونه شایسته ای از علم و تبدیل علم به فن آوری هستند، نهایت تشکر را دارم. از جناب آقای دکنر هوشنگ علیزاده، استاد مشاور دوم بنده که همواره مورد لطف ایشان بوده و از راهنمایی های ارزنده شان بهره مند شده ام، بی نهایت متشکرم. از تمامی دوستان و همکارانم در انستیتو پاستور ایران، آقایان دوستی، صرامی، امینی، عباچی و علی الخصوص خانم دکتر نوشین داودی و خانم برخورداری نهایت تشکر و امتنان را دارم. از تمامی همکلاسی ها و دوستانم در دانشگاه تربیت مدرس آقایان میرزایی اصل، میرزاقادری، اسماعیلی، معماری، عبداللهی، محب الدینی، لطیف، اژدری، رزمی و خانم باقری کمال تشکر را دارم. از مسئولین محترم آزمایشگاه ها آقای مهندس ایری و خانم آزموده نیز کمال تشکر و امتنان را دارم.

خلاصه :

بکارگیری زیست مولکولی و زیست فناوری گیاهی نشان داده است که می توان بسیاری از داروها را در حجم انبوه و به قیمت بسیار ارزان در گیاهان تولید نمود. جذابیت سیستم های گیاهی به دلیل مزایایی همچون ایمنی بالا، هزینه پائین، تغییرات پس از ترجمه و حجم بالای تولید است که نسبت به سیستم های کلاسیک (مثل باکتری ها، مخمرها و سلولهای جانوری) دارند. پروتئین داروئی tPA (tissue Plasminogen Activator) بطور اختصاصی و نسبتا قوی به لخته های خونی متصل شده و ترجیحا پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته ها را فعال و لخته خونی را از بین می برد. از پروتئین نوترکیب tPA به منظور درمان سکته های قلبی و مغزی استفاده می شود. در این تحقیق، به منظور بررسی امکان و نحوه بیان این پروتئین در سیستم بیانی گیاهی، cDNA ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی(tPA) با کمک آغازگرهای اختصاصی در ناقل T/A همسانه سازی و سپس در ناقل بیانی گیاهی pBI121 در مجاورت ژن *gus* همسانه سازی شد. این ژن تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت. توالی افزایش دهنده Kozak و ترادف رمز کننده پپتید نشانه KDEL، به ترتیب به انتهاهای آمینی و کربوکسیلی ژن tPA افزوده شدند. سازه pBI-tPA ابتدا به آگروباکتریوم سوش LBA4404 و سپس به ژنوم گیاهان توتون انتقال داده شد. گیاهان تراریخته روی محیط کشت انتخابگر (حاوی کانامایسین $mg.L^{-1}$ 100) انتخاب شدند و جوانه های تراریخت ریشه دار شده ابتدا به پرلیت و سپس به خاک منتقل شدند به منظور جلوگیری از دگرگرده افشانی غنچه قبل از باز شدن پاکت گذاری و ایزوله شدند و بذور نسل اول (T_0) از آنها جمع آوری و ارزیابی پایداری ژن در نسل بعد انجام شد. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) و RT-PCR، SDS-PAGE، وسترن بلات و زیموگرافی انجام شد. واکنشPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی حضور ژن tPA در نسل های اول و دوم گیاهان تراریخته را نشان داد. واکنش RT-PCR نیز انجام رونویسی و تولید mRNA مربوطه را اثبات کرد. ژل SDS-PAGE نیز علائم اولیه و احتمالی حضور پروتئین مورد نظر(tPA) را نشان داد و از آزمون وسترن بلات جهت اطمینان از بیان پروتئین tPA استفاده شد. آزمون زیموگرافی برای بررسی فعال بودن پروتئین تولید شده انجام شد که این آزمون هم حضور و هم فعال بودن پروتئین نوترکیب tPA را اثبات کرد. اکنون اگر بتوان این پروتئین نوترکیب را تخلیص کرد، این پروتئین داروئی توانایی حل لخته های خونی را خواهد داشت. بدیهی است با استحصال و استخراج این پروتئین نوترکیب ارزشمند علاوه بر تولید انبوه و ارزان آن، گام موثر دیگری در جهت پیشرفت داروهای نوترکیب در کشور برداشته خواهد شد.

کلمات کلیدی: پروتئین نوترکیب، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، زیموگرافی، وسترن بلات، انتقال ژن، توتون

Cloning and transformation of tissue Plasminogen Activator (tPA) gene to tobacco (*Nicotiana tabacum* L. Xanti)

ABSTRACT

Applying molecular biology and plant biotechnology showed that plants can produce many medicins in high volume and very inexpensive. Plant system is advantagous for safe, low cost, post-translation modifications and high volume production in compare to classic systems (such as bacteria, yeast & animal cells). tPA (tissue Plasminogen Activator) drug protein especially & strongly bounds to blood clots and preferly activates plasminogen trapped in blood clots and then dissolve blood clots. Recombinant tPA protein has been used for thrombolytic therapy of heart and brain stroke diseases. In this report, to evaluate the ability and expression of this protein in plant expression system, the tPA gene cDNA was cloned in T/A vector and then subcloned into a plant expression binary vector pBI121 next to *gus* gene.This gene was expressed under the control of CaMV35S promoter and NOS terminator. Kozak sequence and KDEL signal were linked at amino and carboxy-termini of tPA gene, respectively. First, the constructed cassette pBI-tPA was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* (strain LBA4404) and then the tPA gene was inserted into the plant genome by Agrobacterium-mediated transformation. Transgenic plants were selected on medium containing kanamycin, and then transferred into perlite and soil. To prevent cross pollination, the buds were covered by envelope before opening and then seeds of subsequent generation (T_0) were gathered and evaluated for inheritance of transferred gene in subsequent generation. The transgenic plants were evaluated by polymerase chain reaction (PCR), RT-PCR, SDS-PAGE, Zymography and Western blot techniques. PCR analysis by special primers, was showed the presence of tPA gene in first and second generations of transgenic plants. RT-PCR analysis affirmed the transcription of this gene. SDS-PAGE gel showed tPA protein band and was used in western blot analysis for affirming the expression of tPA protein. Zymography analysis was used for evaluating the activity of this protein. This analysis affirmed the presence and the activity of this protein. If we can extracted this recombinant protein, this medication protein can dissolve clot bloods. In addition to mass and inexpensive production, it is obvious that production and purification of this valuable recombinant protein will be an effective step in recombinant protein production technology.

Key words: Recombinant protein, tissue Plasminogen Activator, Zymography, Western blot, Gene transfer, Tobacco.

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه

1-1- مقدمه.....1

فصل دوم- بررسی منابع

2-1- بررسی منابع.....7
1-2-1- سیستم فیبرینولیتیک.....9
2-2-1- فعال کننده پلاسمینوژن بافتی 10
3-2-1- تجزیه لخته خونی.....12
4-2-1- میل ترکیبی برای فیبرین.....13
5-2-1- غلظت، فعالیت و نیمه عمرtPA 13
6-2-1- مهارکننده هایtPA. 14
1-6-2-1- مهارکننده PAI-1 14
2-6-2-1- مهارکننده PAI-2 15
7-2-1- بیماری های مرتبط.....15
2-1- 7-1 استرپتوکاییناز.....15
2-7-2-1- یوروکایناز.....16
3-7-2-1- دارویtPA.....16
8-2-1- tPA تجارتی.....17
9-2-1 – خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین tPA.....18
1-9-2-1- نواحی عملکردیtPA 19
2 9-2-1- گلیکوزیلاسیون.....20
10-2-1- ژن tPA.....21
3-1- تولید tPA 21
1-3-1- تولید کننده های غیر نوترکیب 22

1-3-1-1- سلول های ملانوما.....23
1-3-1-2- سلول های اپی تلیال.....23
1-3-1-3-سلولهای اندوتلیال.....23
1- 3-1-4- فیبروبلاست ها.....24
1-3-2-سلولهای تولید کننده tPA نوترکیب.....24
1-3-2 -1- سلول های پستانداران.....24
1-3-2-2- تولید tPA در باکتری ها.....25
1-3-2-2-1- مزایا و معایب استفاده از E.coli.برای تولید tPA 25
1-3- 2-3- استفاده از مخمرها و قارچ های رشته ای بمنظور تولید tPA 27
1-3-2- 4- سلول های حشرات.... 27
1-3-2-5- بیان tPA در حیوانات تراریخته.....28
1-3- 2-6- تولید tPA در گیاهان تراریخته.....28
1-3-2-7- تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان.....29
1-3-2-7- تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان.....30
1-4- میزبان های مهم برای زراعت مولکولی.....30
1-4-1- محصولات برگی 31
1-4-1-1- استفاده از توتون زراعی(*Nicotiana tabacum*).جهت تولید پروتئین های نوترکیب31
1-4- 1- 2- استفاده از یونجه زراعی (*Medicago sativa*) بمنظور تولید پروتئین های نوترکیب.....33
1-4-2- استفاده از محصولات دارای بذر خشک بمنظور تولید پروتئین های نوترکیب.....34
1-4-3- استفاده از محصولات میوه ای و سبزیجات بمنظور تولید پروتئین های نوترکیب.....34
1-4- 4- گیاهان مدل برای تولید پروتئین های نوترکیب..... 36
1- 4- 5- سیستم های بیان گیاهی.....36
1-4-5- 1- انتقال ژن به هسته گیاهان.....36
1-4- 5- 2- گیاهان تراریخته کلروپلاستی.....37

1-5-5-3- کشت های سوسپانسیون سلولی جهت تولید پروتئین های نوترکیب.....38
1- 5-1- راهبرد بیان ژن های تولید کننده پروتئین نوترکیب.....38
1- 5- 2- بهینه سازی سیستم تولید و ذخیره سازی پروتئین نوترکیب.....40
1- 5- 3- اصلاحات پس از ترجمه در پروتئین های نوترکیب.....40
1- 5-3-1- تاخوردن و تشکیل باندهای دی سولفیدی در پروتئین های نوترکیب.....44
1- 5-3-2- مطالعه پیوندهای دی سولفیدی.....45
1- 6- بهبود خواص tPA 46
1- 6- 1- tPA های نوترکیب جدید.....47
1-7- روش های سنجش tPA 47
1- 8- انتقال ژن به گیاهان.....48
1- 8- 1- سیستم انتقال زیستی.....49
1- 8- 1-1- زیست شناسی اگروباکتریوم.....49
1- 8- 1-2- ناقل های مبتنی بر اگروباکتریوم.....49
1- 8- 1- 3- تراریختی گیاهان با استفاده از اگروباکتریوم.....51
1- 8- 1- 4- مزایا و معایب استفاده از روش اگروباکتریوم.....52
1- 8- 2- سیستم انتقال فیزیکی.....53
1- 9- گیاه شناسی و زراعت توتون.....54

فصل سوم- مواد و روش ها

2-1- مواد شیمیایی و آنزیم ها.....57
2-2- باکتریها.....57
2-3- آغازگرها 57
2-4- ناقل‌ها.....57
2-5-گیاهان توتون.....59
2-5-1- کاشت بذور ضدعفونی شده توتون.....59
2-6- هضم آنزیمی.....60
2-6-1- هضم آنزیمی ناقل بیانی pBI121.....60

2- 6- 2- هضم آنزیمی ناقل pCR2.1.....61
2- 6- 3- همسانه سازی قطعه DNA (tPA) در ناقلpBI121.....62
2- 6- 4- انتقال ناقل حامل ژن tPA به باکتری *E. coli*.....64
2- 6-5- تعیین توالی(Sequencing) ژن tPA همسانه سازی شده.....64
2- 6-6- هضم آنزیمی ناقل حاوی ژن tPA.....65
2-7- انتقال ناقل pBI121 حامل ژن tPA به آگروباکتریوم 66
2- 8- اثبات و تایید ناقل حاوی ژن tPA در اگروباکتریوم.....66
2- 9- تراریخت نمودن توتون با استفاده از آگروباکتریوم 67
2-10- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA.....68
2-11- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح RNA.....69
2- 12- آزمون زیموگرافی.....69
2-13- آزمون وسترن بلات.....69
2-14- تعیین تعداد کپی ژن منتقل شده..... 70
2-15- تعیین درصد tPA در کل پروتئین محلول گیاهان(TSP).....71

فصل چهارم- نتایج و بحث

3-1- طراحی آغازگرها.....73
3-2- آزمون DNA ژنومی 74
3-3- نتایج همسانه سازی.....75
3-3-1- تکثیر ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی.....75
3-3-2- تخلیص ناقل بیانی گیاهی (pBI121) 76
3-3-3- همسانه سازی قطعه DNA (tPA) در ناقلpTZ57R.....77
3-3-4- همسانه سازیtPA در ناقل بیانی pBI121 78
3-3- 5- تعیین جهت ژنtPA در ناقلpTZ57R.....78
3-5- توالی یابی ژن همسانه سازی شده.....82
3-4- انتقال سازواره pBI-tPA به اگروباکتریوم.....83

3-6- انتقال ژن tPA به گیاه توتون 84
3-6-1- آلوده سازی برگهای توتون با آگروباکتریوم نوترکیب.....85
3-6-2- رشد جوانه های تراریخت در محیط گزینشگر 86
3-6-3- انتقال جوانه های تراریخت (با ژن tPA) به محیط کشت جدید.....86
3-6-4- انتقال گیاهان تراریخت به گلدان 88
3- 7- تکثیر نسل دوم گیاهان تراریخت (T1).....89
3-8- بررسی گیاهان تراریخت.....91
3-8-1- بررسی گیاهان تراریخت با استفاده از تکنیک PCR.....91
3-8-2- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح RNA.با استفاده از تکنیک RT-PCR.....94
3-8-3- بررسی گیاهان تراریخت در سطح پروتئین..... 94
3-8-4- آزمون زیموگرافی گیاهان تراریخت.....96
3-8-5- آنالیز وسترن بلات گیاهان تراریخت.....98
3-8-5- تعیین تعداد کپی ژن انتقال یافته به گیاهان تراریخت..... 99
3-8 – 6- تعیین درصد tPA در کل پروتیین محلول گیاهان(TSP).....100
3-9- بحث.....101
3-10- پیشنهادات.....111

فصل پنجم - منابع.....114
پیوست
چکیده انگلیسی

فهرست پیوست

1- ژن tPA با منشاء انسانی 2
2- محیط کشت باکتریائی LB (Lauria & Bertani)..... 4
3- تهیه ذخیره (Stock) باکتری برای نگهداری طولانی مدت..... 4
4- محیط کشت گیاهی MS (Murashige & Skoog) 4
5- محلول مادری ویتامین با غلظت 100 X..... 5
6- محلول مادری آهن با غلظت 10 X..... 5
7- محلول مادری مواد غذایی کم مصرف با غلظت 100 X..... 6
8- محلول مادری مواد غذایی پر مصرف با غلظت 10 X..... 6
9- محلول مادری یدید پتاسیم (ماده غذایی کم مصرف) با غلظت 1000 X..... 7
10- تهیه محلول مادری MS با غلظت 10 X..... 7
11- تهیه محیط MS (1X) به منظور کاشت گیاه توتون استریل..... 8
12- تهیه محیط MS کامل..... 8
13- محیط گزینشگر MS (Selection Media) 9
14- استخراج DNA ی ژنومی از گیاه توتون..... 10
15- الکتروفورز ژل آگارز(Agarose gel electrophoresis) 12
16- تهیه بافر TBE (10X) 13
17- تهیه ژل آگارز1%..... 13
18- تهیه بافر بارگذاری (Loading dye)..... 13
19- تهیه محلول اتیدیوم بروماید..... 14
20- اندازه گیری کمیت و کیفیت DNA استخراج شده..... 14
21- الکتروفورز DNA ی ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگارز..... 15
22- تکثیر به روش PCR 15
23- تهیه سلول های مستعد (Competent cells) 16
24- تخلیص ناقل به روش Mini-preparation..... 17
25- آزمون سریع کلونی ها (Quick check) 20

26- روش استخراج RNA کل.....21
27- بررسی کیفی و کمی RNA.....22
28- ساخت cDNA 23
29- واکنش RT-PCR برای تکثیر محصولcDNA 24
30- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد.....24
31- تهیه نمودار استاندارد پروتئین.....25
32- استخراج پروتئین و الکتروفورز.....25
33- آماده سازی نمونه های پروتئین جهت الکتروفورز.....26
34- تهیه محلول های لازم 26
35- طرز تهیه ژل.....28
36- مواد مورد نیاز برای آزمون زیموگرافی.....31

فصل اول

مقدمه

1-1- مقدمه

محصولات تراریخت از سال 1995 که برای اولین بار در چین به عرصه تولید انبوه ومصرف تجاری رسیدند با استقبال گسترده کشاورزان و مصرف کنندگان مواجه بود و با وجود ادعاهای مخالفین داخلی و خارجی تا امروز بیش از 50 برابر به سطح زیر کشت آنها افزوده شده و در مساحتی بیش از 90 میلیون هکتار کشت می شوند (قره یاضی، 1385).

گیاهان تراریخت در طی قریب به ربع قرن گذشته توسعه زیادی داشته و از گیاهان ساده ای که تنها ژنهای گزارشگر یا ژنهای نشانگر قابل انتخاب را در خود تظاهر می دادند، به گیاهانی که چندین صفت مطلوب را در خود تظاهر می دهند و گیاهانی که تکامل یافته اند می توانند برای تولید واکسن و آنتی بادی و سایر داروهای نوترکیب مورد نیاز پزشکی انسانی مورد استفاده قرار گیرند. رویکرد جدید پژوهشگران و شرکتهای بزرگ و چند ملیتی داروسازی جهان به سمت داروهای تولید شده در گیاهان (Plant Made Pharmaceuticals) یا PMP می باشد (قره یاضی، 1385).

به دنبال اولین انتقال موفق ژن به گیاهان در سال 1983 نسل اول گیاهان تراریخت با انتقال ژنهای نشانگر قابل انتخاب نظیر ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک و ژنهای گزارشگر نظیر *gus* پا به عرصه تحقیق و توسعه گذاشت. تنها هدف در این مرحله، بهینه سازی روشهای انتقال ژن و در مراحل بعدی انجام مطالعات پایه در مورد بیان ژن و بررسی اثر عوامل محیطی بر میزان و مکان بیان ژنهای تحت کنترل پیشبرهای مختلف (Promoters) بود.

از اوایل دهه 1990 میلادی به تدریج نسل دوم گیاهان تراریخت پا به عرصه وجود گذاشت. این گروه

از گیاهان علاوه بر دارا بودن ژنهای نشانگر قابل انتخاب نظیر *hpt, npt* وگاهی ژنهای گزارشگر نظیر *gfp, gus* دارای حداقل یک ژن با ارزش زراعی نظیر ژنهای *Cry1ab* ، کیتیناز و ... بودند.

گیاهان تراریختی که بیش از یک ژن با ارزش اقتصادی و زراعی را بیان می کنند به عنوان نسل سوم گیاهان تراریخت شناخته می شوند. از ابتدای هزاره سوم میلادی این قبیل گیاهان که به تظاهر همزمان ژنهای مقاومت به آفات و تحمل به علفکش ها محدود می شود به زیر کشت رفت.

غنی سازی گیاهان خوراکی از طریق افزایش تولید روی، آهن، پروتئین های شیر انسان و ویتامین ها در زمره گیاهان تراریخت نسل سوم و چهارم قرار دارند و با تولید و بازار رسانی آنها توسط شرکت های مختلف در کشورهای زیادی با جدیت در دست تعقیب است.

گیاهان تراریخت نسل چهارم، گیاهانی هستند که با اهداف استفاده های پزشکی و بهداشتی تولید می شوند. رویکرد جدید پژوهشگران و شرکت های بزرگ و چند ملیتی به سمت PMP (Plant Made Pharmaceuticals) به تولید انواعی از پروتئین های داروئی منجر شد که از طریق انتقال پایدار یا گذرای DNA نوترکیب در سلولهای گیاهی یا درون اندامهای گیاهی (تمام گیاه، برگ، میوه یا بذر) تولید می شوند. به طوری که در حال حاضر بیش از 25 درصد از داروهای موجود در بازار دارای منشاء گیاهی هستند (قره یاضی، 1385).

تولید زیست داروها و پروتئین های مهم کاربردی از طریق گیاهان را به اصطلاح زراعت مولکولی(Molecular Farming) گویند. زراعت مولکولی پتانسیل بالائی در تولید نامحدود آنتی بادی های نوترکیب، واکسن ها، جایگزین های خونی، فاکتورهای رشد و آنزیمها می باشد. در حال حاضر در جهان یک پذیرش عمومی برای تولید پروتئین های نوترکیب بوجود آمده است

.(Scillberg and Fischer, 1999)

وقایع اساسی زراعت مولکولی بصورت خلاصه عبارتند از:

در سال 1986، Barta تولید اولین پروتئین نوترکیب داروئی(هورمون رشد انسانی) در توتون و آفتابگردان را انجام دادند.

در سال 1990، Sijmons و همکاران اولین پروتئین با منشاء انسانی (آلبومین سرم انسانی) در توتون و سیب زمینی را تولید نمودند.

در سال 1998، Tacket و همکاران اولین آزمایش کلینیکی با استفاده از آنتی ژن باکتریائی نوترکیب تولید شده در توتون را انجام دادند.

در سال 1999، Cabanes و همکاران اولین آنالیز گلیکانی گیاهان تولید کننده گلیکوپروتئین نوترکیب را انجام دادند.

در سال 2000، Staub و همکاران هورمون رشد انسانی در کلروپلاست های گیاه توتون را تولید نمودند.

در سال 2000، Ruggiero و همکاران سرهم بندی مارپیچ سه گانه و تولید کلاژن انسانی در توتون را انجام دادند.

در سال 2001، De Cosa و همکاران بالاترین سطح تجمع پروتئین نوترکیب در گیاهان توتون (46/1 درصد کل پروتئین قابل حل برای پروتئین Cry2Aa2) را بدست آوردند.

در سال2001، Bakker و همکاران تغییر گلیکانی یک پروتئین بیگانه در گیاه میزبان را با استفاده از گلیکوترانسفراز انسانی انجام دادند.

در سال 2004، Strasser and Altmann تغییر ژنتیکی مسیر N-گلیکوزیلاسیون در گیاه

آرابیدوپسیس را انجام دادند.

در سال 2005، Stephan و همکاران توسعه روشهای جدید انتقال ناقل های مناسب به پلاستیدها و ارزیابی عوامل کنترل کننده بیان را انجام دادند.

در سال 2006، Nakamoto و همکاران انتقال پایدار ژن GFP به پلاستید کاهو را انجام دادند.

در سال 2007، Stephan و همکاران ارائه راهکارهائی برای تولید زیادتر پروتئین در گیاهان به روش انتقال به کلروپلاست صورت پذیرفت.

پتانسیل بالای تولید پروتئین های داروئی در گیاهان فقط در صورتی محقق می شود که تولیدات حاصل استاندارد های کیفی لازم و همچنین درجه کیفی داروئی را داشته باشد تا بتواند از فیلترهای نظارتی رد شده و مورد تایید قرار گرفته و استفاده از آنها در آزمایش های بالینی و درمان معمول گردد. برای رسیدن به این هدف باید فناوری مرتبط با بهبود عملکرد از نظر کمی را توسعه داد، از کیفیت و پایداری محصولات مطمئن گردید و همچنین مراحل تخلیص و پردازش فراورده بخوبی انجام گیرد (Strasser and Altman, 2004).

از چالشهای مهم دیگر عبارتند از: نگرانی در مورد مسائل محیطی، موضوعات ایمنی زیستی و خطرات احتمالی ناشی از موفقیت زراعت مولکولی. این موضوعات بخوبی نشان می دهد که اهمیت ایمن سازی و رهاسازی گیاهان تراریخت کمتر از اهمیت ایمنی خود محصولات نوترکیب تولید شده نیست(Staub *et al.*, 2000).

از آنجائیکه کشور ما درحال توسعه می باشد و از طرفی نیل به خودکفایی در محصولات داروئی(به خصوص در زمینه تولید پروتئین های نوترکیب داروئی) یک امر اجتناب ناپذیر است، ضروری است

که به فناوری فوق جهت تولید سریع، ارزان و ایمن پروتئینهای نوترکیب موردنیاز جهت مصارف پزشکی دست یابیم.

فرضیه های این تحقیق عبارتند از:

1- ژن انسانی tPA را می توان در یک ناقل بیانی گیاهی مناسب مانند pBI121 همسانه سازی کرد.

2- بیان پروتئین نوترکیب tPA در گیاه توتون تراریخت امکان پذیر است.

3- درگیاه توتون تراریخت، پروتئین نوترکیب tPA از نظر میزان پایداری و مقدار بیان ژن منتقل شده در نسلهای متوالی می تواند ثابت بماند.

4- پروتئین نوترکیب tPA تولید شده در گیاه توتون احتمالا دارای خواص مشابه با پروتئین مزبور از منشا سلول های انسانی خواهد بود.

با توجه به این فرضیات و اینکه این ژن در لیشمانیای غیربیماریزا (*Leshmania torentoli*) که یک تک سلولی یوکاریوتی است، به درستی و همراه با فعالیت بیولوژیک بیان شده است احتمال بیان صحیح این پروتئین در سیستم بیان گیاهی وجود دارد. از این رو تحقیق حاضر با اهداف زیر طراحی گردید:

1- آیا پروتئین نوترکیب tPA در سیستم بیانی گیاهی به خوبی سیستم بیانی انسانی تولید میشود؟

2- اگر به درستی و همراه با فعالیت زیستی بیان شد، فعالیت و میزان بیان بررسی شود.

3- اگر به درستی و همراه با فعالیت زیستی بیان نشد، مشکلات احتمالی بررسی شود.

4- آیا گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب tPA می تواند باشد

فصل دوم

بررسی منابع