بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرّس

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی ارگانوژنز نابجا در گیاه سیب زمینی و امکان سنجی انتقال ژن پروانسولین انسانی به آن

تحقیق و تدوین:

کیمیا کاشانی

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

استاد مشاور:

دکتر احمد معینی

تابستان ۱۳۹۰

بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به این که چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعّالیّت‌های علمی- پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهّد می‌شوند.

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر **نشر آثار علمی** دانشگاه اطّلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوّم کتاب پس از برگ شناسنامه عبارت ذیل را چاپ کند:

"کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و مشاوره جناب آقای دکتر احمد معینی از آن دفاع شده است."

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه تعداد یک در صد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به دفتر **نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهّد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند. به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب کیمیا کاشانی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهّد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: کیمیا کاشانی

تاریخ و امضا:

بسمه تعالی

آیین‌نامه حق مالکیّت مادّی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرّس

مقدّمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فنّاوری دانشگاه در راستای تحقّق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمه شکوفایی علمی و فنّی است و رعایت حقوق مادّی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقّ نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آن‌ها متعلّق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تأیید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیّت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به صورت ترکیبی از اطّلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (هنری مانند فیلم، عکس، نقّاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی کلیّه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فنّاوری و دیگر واحدها باید با مجوّز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوّب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنّی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملّی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله است و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ در شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

"اینجانب کیمیا کاشانی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی متعهّد می‌شوم کلیّه نکات مندرج در آیین نامه حقّ مالکیّت مادّی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیّت مدرّس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه/ رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلّف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع و یا هر گونه امتیاز دیگر به نام بنده و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدین وسیله حقّ هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم."

امضا:

تاریخ:

دوست دارم در خور جبران گوشه ای از محبّت هایشان باشد...

این پایان نامه پیش کشی است به

پدر بزرگوار

مادر مهربان و فداکار

و برادر خوبم

که نفس های گرمشان در فراز و نشیب زندگی، یار و پشتیبان همیشگی ام بوده است.

سپاسگزاری

حمد و سپاس بیکران پروردگار یکتا را سزاست که چون همیشه منّت نهاد و توفیق اتمام مرحله دیگری از زندگی‌ام را عطا فرمود. به ثمر رسیدن این پایان نامه را مرهون زحمات عزیزانی هستم که از یاری من فرو گذار نکرده‌اند.

وظیفه خود می‌دانم از زحمات بی دریغ استاد فرزانه جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران که بزرگوارانه و با مناعت طبع بر من منّت نهاده، علاوه بر قبول زحمت راهنمایی این پایان نامه، با صبر و حوصله فراوان و بذل اوقات گرانقدر خویش، رهنمودهای ارزشمند، حمایت‌های دلسوزانه و الطاف بی شائبه خود را از من دریغ نفرموده‌اند، صمیمانه سپاسگزاری نمایم.

هم چنین از استاد ارجمند و بزرگوار جناب آقای دکتر احمد معینی، که در طول اجرای این پژوهش همواره از مساعدت‌های خالصانه، حمایت‌های بی دریغ و راهنمایی های رهگشای ایشان بهره مند بوده‌ام، کمال تشکّر را دارم.

از زحمات بی شائبه سایر اعضای هیأت علمی گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی که افتخار شاگردی ایشان را داشته‌ام، جناب آقایان دکتر حمید دهقانی، دکتر قاسم کریم زاده و مدیر محترم گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی جناب آقای دکتر سیّد رضا قلی میر فخرایی صمیمانه سپاسگزارم.

هم چنین از استادان ارجمند جناب آقایان دکتر حمید دهقانی و دکتر حسین هنری که اوقات گرانبهای خویش را برای مطالعه پایان نامه اینجانب صرف نموده‌اند، تشکّر و قدردانی می‌نمایم.

از زحمات بی دریغ سر کار خانم مهندس زهرا موحّدی خاضعانه سپاسگزارم.

از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه سر کار خانم مهندس آزموده، جناب آقایان مهندس ایری و یادگاری و هم چنین تمامی دوستان و هم کلاسی‌های خوبم در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرّس سپاسگزارم.

از جناب آقای مهندس شهاب حاج منصور که زحمات بی دریغ و حمایت‌های دلسوزانه‌شان در طول تحصیل و انجام این پژوهش به یادماندنی و ستودنی است خاضعانه قدردانی می‌کنم.

از دوستان خوب و عزیزم سر کار خانم مهندس بهین امیدی، جناب آقای مهندس یحیی استادی و سر کار خانم مهندس ماندانا خوشنویس که صمیمانه، صادقانه و خالصانه در فراز و نشیب انجام این پژوهش به من یاری رساندند، کمال تشکّر و امتنان را دارم.

در نهایت از خانواده عزیزم به ویژه مادر خوب و پدر مهربانم که همواره و در تمام مراحل زندگی، حامی، مشوّق و مایه دلگرمی‌ام بوده‌اند، صمیمانه سپاسگزارم.

چکیده

تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی ارزشمند از طریق مهندسی ژنتیک در گیاهان را زراعت مولکولی (Molecular Farming) می‌گویند. تقریباً ۰/۷٪ از جمعیّت جهان از بیماری دیابت وابسته به انسولین رنج می‌برند. انتظار می‌رود شیوع رو به افزایش بیماری دیابت، همراه با معرّفی شیوه‌های جایگزین روش‌های کنونی مصرف انسولین به افزایش میزان تقاضا برای این دارو در آینده منجر شود. انسولین نوترکیب انسانی تاکنون در موجودات مختلفی تولید شده است. اگر چه سیستم‌های تجاری طی دو دهه گذشته به میزان قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته و به تولید حدود پنج تن هورمون انسولین در سال رسیده‌اند، ولی در آینده با مشکلات جدّی در زمینه میزان ظرفیّت تولید و مقدار تقاضا برای این دارو مواجه خواهیم بود. سیستم‌های گیاهی دارای پتانسیل‌های بالایی در تولید ایمن، اقتصادی و در مقیاس زیاد زیست داروها هستند. سیب زمینی یکی از مهم ترین بیورآکتورهاست. این گیاه هم چنین، گزینه بسیار مناسبی برای دستورزی های ژنتیکی است. باززایی سریع و موثّر اوّلین و مهم ترین نیاز پس از تراریخت سازی ریز نمونه هاست. با توجّه به وابستگی شدید میزان باززایی گیاه سیب زمینی به ژنوتیپ آن، بسیاری از شیوه های باززایی، برای تمامی ارقام مناسب نیست. لذا برای بررسی ارگانوژنز نابجا در گیاه سیب زمینی از محیط‌های کشت یک و دو مرحله‌ای استفاده شد و میان گره گیاهچه های سه تا چهار هفته ای ارقام دزیره، اگریا و مارفونا به عنوان ریز نمونه مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه ژن پروانسولین انسانی به کمک روش *Agrobacterium tumefaciens* به ژنوم هسته‌ای گیاه سیب زمینی (رقم دزیره) منتقل شد. گیاهچه‌های تراریخت، در محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم تفکیک و پس از ریشه زایی به خاک منتقل شدند. در نهایت گیاهان تراریخت به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک آغازگرهای اختصاصی تأیید شدند. هم چنین رونویسی و ترجمه ژن پروانسولین انسانی در این گیاهان به وسیله آزمون‌های RT-PCR، SDS-PAGE، ELISA و Dot-Blot مورد تأیید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: دیابت، پروانسولین انسانی، بیورآکتور، گیاه سیب زمینی و زراعت مولکولی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول‌ها ..... د
فهرست شکل‌ها ..... ه

فصل ۱- مقدّمه ۱
۱-۱- پیشگفتار ۱
۱-۲- اهمیّت و ضرورت تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان ۳
۱-۳- برخی از مزایای گیاه سیب زمینی به عنوان بیورآکتور برای تولید پروتئین های نوترکیب ۴
۱-۴- اهمّیّت و ضرورت تولید هورمون انسولین نوترکیب انسانی در گیاه سیب زمینی ۶

فصل ۲- بررسی منابع ۹
۲-۱- روش های مختلف تولید پروتئین های نو ترکیب ۹
۲-۱-۱- باکتری ها ۹
۲-۱-۲- قارچ ها ۱۰
۲-۱-۳- سلّول های حشرات ۱۱
۲-۱-۴- کشت سلّول های پستانداران ۱۱
۲-۱-۵- حیوانات تراریخت ۱۲
۲-۲- کشاورزی مولکولی ۱۳
۲-۳- هورمون انسولین ۱۵
۲-۴- بیماری دیابت (Diabetes Mellitus) ۱۶
۲-۵- گیاه سیب زمینی ۱۷
۲-۵-۱- سطح زیر کشت ۱۸
۲-۵-۲- میزان تولید ۱۸
۲-۵-۳- عملکرد در هکتار ۱۹
۲-۵-۴- گیاه شناسی ۱۹
۲-۵-۵- تاریخچه کشت سیب زمینی و گسترش آن ۲۲
۲-۶- اندام زایی (ارگانوژنز نابجا) ۲۲
۲-۶-۱- بهینه سازی ارگانوژنز نابجا در گیاه سیب زمینی به منظور انتقال ژن ۲۳
۲-۷- انتقال ژن ۲۵
۲-۷-۱- انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم ۲۶
۲-۷-۲- اساس مولکولی انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم ۲۹

۲-۷-۳- مزایا و معایب انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم ۳۳
۲-۷-۴- روشهای تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم ۳۴
۲-۸- ناقلین جفتی یا دوتایی ۳۵
۲-۸-۱- ناقلین pCAMBIA ۳۶
۲-۹- پیشینه باززایی نوساقه در گیاه سیب زمینی ۳۸
۲-۱۰- انتقال ژن به گیاه سیب زمینی ۳۹
۲-۱۰-۱- پیشینه انتقال ژن به گیاه سیب زمینی ۳۹
۲-۱۰-۲- پیشینه انتقال ژن انسولین نوترکیب انسانی به گیاه سیب زمینی و سایر گیاهان ۴۰

فصل ۳- مواد و روشها ۴۱

۳-۱- بخش کشت بافت ۴۱
۳-۱-۱- محیط کشت گیاهی MS ۴۱
- نحوه تهیّه محلول های ذخیره اکسین و سیتوکینین ۴۳

۳-۲- بخش مولکولی ۴۹
۳-۲-۱- باکتری ها ۵۰
۳-۲-۲- آنتی بیوتیک های مورد استفاده و آزمون تعیین آستانه تحمّل آنتی بیوتیک هیگرومایسین توسّط گیاه سیب زمینی ۵۲
۳-۲-۳- آغازگرها و توالی ژن ۵۳
۳-۲-۴- اثبات وجود سازه در آگروباکتریوم با استفاده از روش Colony PCR ۵۵
۳-۲-۵- مراحل کار انتقال ژن ۵۶
۳-۲-۶- استخراج DNAی ژنومی گیاه سیب زمینی ۵۸
۳-۲-۷- تکثیر قطعه DNA به روش PCR ۶۴
۳-۲-۸- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA ۶۴
۳-۲-۹- بررسی در سطح RNA ۶۶
۳-۲-۱۰- بررسی در سطح پروتئین ۷۲

فصل ۴- نتایج و بحث ۸۴

۴-۱- نتایج بخش کشت بافت ۸۴
۴-۱-۱- تولید انبوه گیاهچه های استریل سیب زمینی ۸۴
۴-۱-۲- تعیین بهترین رقم و بهترین غلظت هورمون های مورد استفاده جهت باززایی نوساقه از میان گره ارقام دزیره، اگریا و مارفونا در محیط کشت دو مرحله ای ۸۴
۴-۱-۳- تعیین بهترین رقم و بهترین غلظت هورمون زآتین ریبوزاید جهت باززایی نوساقه از میان گره های ارقام دزیره، اگریا و مارفونا در محیط کشت یک مرحله ای ۹۰
۴-۱-۴- تعیین آستانه تحمّل ارقام سیب زمینی مورد آزمایش نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین ۹۴
۴-۲- نتایج آنالیزهای مولکولی گیاهان باززایی شده پس از انتقال ژن ۹۵
۴-۲-۱- آزمون DNAی ژنومی ۹۵

۴-۲-۲- تأیید حضور ژن هدف در باکتری با استفاده از شیوه Colony PCR ۹۶
۴-۲-۳- انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه سیب زمینی با استفاده از آگروباکتریوم ۹۷
۴-۲-۴- انتقال جوانه های باززایی شده به محیط نو ساقه زایی ۹۸
۴-۲-۵- انتقال گیاهچه های باززایی شده به محیط ریشه زایی ۹۹
۴-۲-۶- انتقال گیاهان باززایی شده (احتمالاً تراریخت) به خاک ۱۰۰
۴-۲-۷- بررسی گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش PCR ۱۰۰
۴-۲-۸- بررسی گیاهان تراریخت در سطح RNA ۱۰۱
۴-۲-۹- آنالیز در سطح پروتئین ۱۰۳
۴-۳- بحث ۱۱۰
پیشنهادات ۱۱۹
فصل ۵- فهرست مراجع ۱۲۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مختصری از پیشینه باززایی نو ساقه در گیاه سیب زمینی ۳۸
جدول۳-۱- ترکیبات محیط کشت MS..... ۴۲
جدول ۳-۲- ترکیبات و غلظت های هورمونی محیط مرحله اوّل باززایی نوساقه ۴۵
جدول ۳-۳- ترکیبات و غلظت های هورمونی محیط مرحله دوّم باززایی نوساقه ۴۶
جدول ۳-۴- ترکیبات هورمونی محیط یک مرحله ای باززایی نوساقه..... ۴۷
جدول ۳-۵- ترکیبات محیط هم کشتی ۴۸
جدول ۳-۶- ترکیبات محیط باززایی ۴۸
جدول ۳-۷- ترکیبات محیط طویل سازی و ریشه زایی..... ۴۹
جدول ۳-۸- غلظت آنتی بیوتیک های مورد نیاز در محیط های کشت ۵۳
جدول ۳-۹- مواد و غلظت های مورد استفاده برای انجام Colony PCR ۵۵
جدول ۳-۱۰- مواد و مقادیر لازم برای تهیّه بافر استخراج CTAB در حجم های ۱ و ۵۰ میلی لیتر۵۸
جدول ۳-۱۱- ترکیبات بافر TBE (۱۰X) و مقادیر آنها برای تهیّه ۱۰۰۰ میلی لیتر.....۶۲
جدول ۳-۱۲- مواد تشکیل دهنده بافر نمونه گذاری و غلظت آن ها.....۶۳
جدول ۳-۱۳- مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام فرآیند PCR.....۶۵
جدول ۳-۱۴- برنامه PCR.....۶۶
جدول ۳-۱۵- مواد لازم جهت تیمار RNAی استخراجی با آنزیم DNase.....۶۸
جدول ۳-۱۶- مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام مرحله اوّل cDNA سازی.....۶۹
جدول ۳-۱۷- مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام مرحله دوم cDNA سازی ۶۹
جدول ۳-۱۸- مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام فرآیند RT-PCR..... ۷۱
جدول ۳-۱۹- برنامه RT-PCR..... ۷۱
جدول ۳-۲۰- شیوه تهیّه استاندارد برای تعیین مقادیر جذب نور مرئی قرائت شده در طول موج ۵۹۵ نانومتر ۸۱
جدول ۴-۱- جدول تجزیه واریانس آزمایش باززایی نوساقه دو مرحله ای.....۸۶
جدول ۴-۲- مقایسه میانگین آزمایش باززایی نوساقه دو مرحله ای به روش LSD..... ۸۸
جدول ۴-۳- تجزیه واریانس صفت میانگین درصد باززایی نوساقه از میان گره های ارقام دزیره، اگریا و مارفونا در محیط یک مرحله ای ۹۰
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین آزمایش باززایی نوساقه یک مرحله ای به روش LSD..... ۹۲
جدول ۴-۵- مقادیر جذب نور مرئی قرائت شده در طول موج ۵۹۵ نانومتر در لوله های استاندارد شماره ۱ تا ۸ .....۱۰۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- ساختار عمومی ناقل های خانواده pCAMBIA..... ۳۷
شکل ۳-۱- نقشه ناقل بیانی pCAMBIA1304 ..... ۵۰
شکل ۳-۲- کاست ژنی حاوی ژن پروانسولین انسانی که در ناقل بیانی گیاهیpCAMBIA1304 در محل ژن های گزاشگر جای گرفته است..... ۵۱
شکل ۴-۱- الف: رشد گیاهان سیب زمینی از غدّه های بذری این گیاه ب: گیاهچه های استریل سیب زمینی ۸۴
شکل ۴-۲- باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی رقم مارفونا (الف) در قیاس با باززایی نوساقه از ریز نمونه های میان گرهی رقم اگریا (ب) پس از گذشت ۶۰ روز..... ۸۵
شکل ۴-۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه در آزمایش باززایی نوساقه دو مرحله ای... ۸۷
شکل ۴-۴- نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل دو جانبه در آزمایش باززایی نوساقه یک مرحله ای ۹۱
شکل ۴-۵- باززایی ریز نمونه های میان گرهی رقم دزیره در محیط یک مرحله ای تیمار ۳ (۳- دزیره) ۹۳
شکل ۴-۶- تعیین آستانه تحمّل نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین در گیاه سیب زمینی (رقم دزیره) ۹۴
شکل ۴-۷- الکتروفورز DNAی ژنومی گیاه (احتمالاً تراریخت) سیب زمینی بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ ۹۶
شکل ۴-۸- تأیید حضور ژن هدف در باکتری با استفاده از Colony PCR..... ۹۷
شکل ۴-۹- باززایی ریز نمونه های میان گرهی احتمالاً تراریخت گیاه سیب زمینی پس از گذشت ۴ هفته..... ۹۸
شکل ۴-۱۰- باززایی ریز نمونه های میان گرهی غیر تراریخت گیاه سیب زمینی (رقم دزیره) در محیط کشت فاقد آنتی بیوتیک هیگرومایسین پس از ۴ هفته (الف) و باززایی نشدن ریز نمونه های میان گرهی غیر تراریخت گیاه سیب زمینی (رقم دزیره) در محیط کشت حاوی ۷/۵ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک هیگرومایسین پس از گذشت ۴ هفته (ب)..... ۹۸
شکل ۴-۱۱- انتقال جوانه های باززایی شده به محیط نوساقه زایی..... ۹۹
شکل ۴-۱۲- انتقال جوانه های رشد یافته به محیط کشت MS برای ریشه زایی..... ۹۹
شکل ۴-۱۳- انتقال گیاهان باززایی شده به خاک..... ۱۰۰

شکل ۴-۱۴- بررسی و آزمایش DNAی ژنومی استخراج شده از گیاهچه های باززایی شده بعد از انتقال ژن و گیاهان شاهد پس از استفاده از روش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین انسانی ۱۰۱
شکل ۴-۱۵- کیفیّت RNAی استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ ۱۰۲
شکل ۴-۱۶- بررسی در سطح RNA با استفاده از روش RT-PCR ۱۰۳
شکل ۴-۱۷- معادله و منحنی استاندارد جهت بررسی کمیّت پروتئینهای استخراجی از گیاهان ۱۰۵
شکل ۴-۱۸- بررسی پروتئینهای استخراجی گیاهان تراریخت با استفاده از روش SDS-PAGE ۱۰۶
شکل ۴-۱۹- معادله و منحنی استاندارد انسولین جهت بررسی کمیّت پروتئین نوترکیب پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخت ۱۰۸
شکل ۴-۲۰- آنالیز پروتئین گیاهان تراریخت با استفاده از آزمون دات بلات ۱۰۹

فصل ۱- مقدّمه

۱-۱- پیشگفتار

در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی، روز به روز در حال افزایش است و چون هزینه تولید این داروها، فراوانی آن‌ها را محدود می کند، لازم است سیستم هایی توسعه یابند که داروهای مذکور را با قیمتی مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند. از آن جا که یک ژن می تواند در سیستم های مختلفی بیان شود، تعیین سیستمی با بیشترین بازده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب امری ضروری است. سیستم‌های بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب باید قادر به تولید مواد زیستی با بیشترین فعّالیّت بیولوژیکی و ایمنی[۱] و کمترین هزینه باشند. در حال حاضر برخی شرکت های معروف برای تولید پروتئین های نوترکیب از سیستم هایی هم چون فرمانتاسیون[۲] باکتریایی و یا کشت سلّول‌های پستانداران (مانند سلّول های تخمدان همستر چینی[۳]) بهره می‌جویند. امّا این سیستم ها نیز محدودیّت‌های خاص خود را دارند. سیستم های بیانی که جهت تولید پروتئین های نوترکیب از سلّول های پستانداران استفاده می‌کنند، فرآورده هایی را به وجود می آورند که کاملاً مشابه آن‌هایی است که در بدن انسان ساخته می‌شوند امّا چون کشت این سلّول ها گران تمام می شود، در مقیاسی محدود قابل اجرا هستند. میکروارگانیسم هایی هم چون باکتری ها، پروتئین های نوترکیب را در مقیاس وسیع تولید می‌کنند، امّا مهمّ‌ترین مشکل این سیستم ها در تفاوت محسوس فرآورده های حاصل با انواع طبیعی انسانی آن‌هاست. به عنوان مثال، باکتری‌ها نمی‌توانند پروتئین هایی را که معمولاً در انسان گلیکوزیله می شوند، گلیکوزیله کنند (Daniell *et al.*, 2001b). زیرا این پروکاریوت‌ها امکانات سلّول های یوکاریوتی را جهت انجام تغییرات پس از ترجمه[۴] ندارند و این در حالی است که تغییرات پس از ترجمه برای فعّالیّت زیستی تعداد زیادی از پروتئین های انسانی از جمله آنتی بادی ها لازم است (Cramer *et al.*, 1996).

[1] Safety
[2] Fermantation
[3] Chinese hamster ovary cells
[4] Post-translational modification

گیاهان تراریخت[1]، جایگزین مناسبی برای سیستم های رایج بیان کننده پروتئین های نوترکیب مانند کشت سلّول های پستانداران و سیستم‌های پروکاریوتی هستند. این گیاهان ژن یا ژن هایی دارند که به صورت مصنوعی به آن‌ها الحاق شده است. این ژن‌ها ممکن است از یک گیاه خویشاوند و یا یک گونه کاملاً متفاوت به دست آمده باشند. تولید گیاهان تراریخت با اهداف مختلفی، مانند به دست آوردن عملکرد بیشتر، بهبود کیفیّت، ایجاد مقاومت نسبت به آفات و بیماری ها و..... صورت می‌گیرد. می توان در مسیر مشابهی گیاهان تراریختی به وجود آورد که قادر به تولید پروتئین های صنعتی و دارویی مورد نیاز انسان باشند. تعداد زیادی از پروتئین های انسانی از قبیل پروتئین های سرم خون، سایتوکاین ها، آنزیم های لیزوزومی، آنتی بادی ها، واکسن ها و سایر پروتئین های دارای خواصّ دارویی را می توان در گیاهان تراریخت تولید کرد. آزمایش های پزشکی نشان می دهد که پروتئین های تولید شده در گیاهان از نظر فعّالیّت های زیست شناختی و ساختمانی با پروتئین های مشابه که از سیستم های کشت سلّول های انسانی و حیوانی به دست آمده اند، قابل مقایسه هستند (Cramer *et al.*, 1996).

در اواخر دهه هشتاد میلادی، تکنولوژی DNA نوترکیب و تولید پروتئین‌ها در گیاهان مورد استفاده قرار گرفت و سیستم‌های بیان گیاهی قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان‌تر و ایمن‌تر شدند. تولید زیست داروها و پروتئین‌های مهمّ و کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت مولکولی (Molecular Farming) می‌گویند. زراعت مولکولی دارای توانایی بالایی در تولید انبوه و ارزان آنتی‌بادی‌های نوترکیب، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد و آنزیم‌هاست. بیورآکتورهای گیاهی می توانند تا ۱۰ کیلوگرم آنتی بادی در هکتار تولید کنند. در مقایسه آن‌ها با سایر سیستم‌های تولیدی (مانند دام و فرمانتور) قیمت تمام شده آنتی بادی تولیدی در گیاهان حدود ۰/۱ است (Schillberg *et al.*, 2002).

[1] Transgenic plants

۱-۲- اهمیّت و ضرورت تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان

۱) با توجّه به این که گیاهان برای تولید مواد زیستی فقط به دی اکسید کربن، انرژی خورشید و ترکیبات غیرآلی نیاز دارند و فرمانتورها برای تولید مواد زیستی به تجهیزات، مواد اوّلیه و انرژی الکتریکی محتاجند، از این روگیاهان تراریخت جایگزین اقتصادی مناسبی برای سیستم‌های تولید بر پایه فرمانتورها هستند (Yoshida *et al.*, 2004).

۲) هزینه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می تواند حدود ۲ تا ۱۰٪ سیستم تخمیری و ۰/۱٪ سلّول جانوری باشد (Twyman *et al.*, 2003). سایر گزارش‌ها حاکی از آن است که هزینه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت، ۱۰ تا ۵۰ بار کمتر از هزینه‌های تولید آن‌ها در باکتری *Escherichia coli* است (Giddings, 2001).

۳) پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان را نیز می‌توان در مقیاس صنعتی و انبوه تولید نمود.

۴) با استفاده از این روش خطرات ناشی از آلودگی پروتئین های تولیدی با عوامل بیماری‌زای انسانی به خصوص بیماری‌های مشترک انسان و دام که در تولید زیست داروها در دام‌ها به چشم می‌خورد، هم چون ویروس هپاتیت، ویروس HIV و... به حدّاقل می‌رسد (Daniell *et al.*, 2001b; Ferrante and Simpson, 2001).

۵) سیستم های گیاهی دارای امکانات سلّول های یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه پروتئین ها و قادر به تا کردن و سر هم کردن درست آنتی بادی ها و پروتئین های چند زنجیره ای هستند (Ferrante and Simpson, 2001).

۶) در گیاهان می‌توان آنتی بادی‌های فعّال چند زنجیره‌ای تولید کرد (Hiatt *et al.*, 1989).

۱-۳- برخی از مزایای گیاه سیب زمینی به عنوان بیورآکتور برای تولید پروتئین های نوترکیب

گیاهان مختلفی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب و به عنوان بیورآکتور مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این میان، سیب زمینی به دلایل مختلفی که در زیر به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود، دارای مزایای نسبی است.

- تولید زیست توده[1] (ریز غدّه‌های تراریخت) در شرایط کاملاً کنترل شده (اتاق‌های رشد[2]) صورت می‌گیرد و بر خلاف بسیاری از گیاهان، نیازی به کاشت در سطح مزرعه وجود ندارد. این موضوع احتمال خورده شدن گیاهان تراریخت توسّط حیوانات، امکان فرار ژن و احتمال دگرگشنی با دیگر گیاهان هم خانواده را کاهش می‌دهد و به فراخور آن ایمنی تولید این گیاه تراریخت افزایش می‌یابد (During, 2005).
- کنترل عوامل محیطی موثّر در کشت به دلیل کاشت سیب زمینی در اتاق‌های کاملاً در بسته امکان پذیر است. در حالی که این عوامل در مزرعه و گلخانه کاملاً قابل کنترل نیستند (During, 2005).
- تولید در اتاق‌های رشد وابسته به فصل نیست و در تمام ایّام سال امکان پذیر است (During, 2005).
- غدّه‌های سیب زمینی نسبت به برگ‌های سبز این گیاه، دارای ترکیبات فنلی کمتر و کمپلکس‌های لیپیدی و پروتئینی ساده تری هستند. این مسئله باعث می‌شود که خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده آسان‌تر صورت گیرد (During, 2005).
- مزیّت دیگر غدّه‌ها، خاصیّت انبارداری بالای آن‌ها ست. استفاده از بافت های گیاهی دارای عمر انبارداری طولانی به عنوان بافت بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب این مزیّت را نیز دارد که نیازی به نزدیک بودن کارخانه فرآوری محصولات به محل تولید آن‌ها نیست (Daniell *et al.*, 2001b).

[1] Biomass
[2] Growth Rooms

- به طور کلّی غدّه‌های سیب زمینی، GRAS grade[1] یعنی فاقد متابولیت‌های ثانویّه‌ای هستند، که از نظر فارماکولوژی فعال می‌باشند (During, 2005).
- دستورزی ژنتیکی این گیاه نسبتاً آسان است (During, 2005).
- تولید مستمر غدّه می‌تواند به فرآیند پایین دست وابسته باشد (During, 2005).
- تکثیر رویشی سیب زمینی فرآهم کننده یک زمینه ژنتیکی پایدار، حتّی برای تک کپی‌های انتقال یافته است (During, 2005).
- حاصل تکثیر رویشی، ایجاد جمعیّتی یکنواخت با حدّاقل ریسک برای تنوّع است (During, 2005).
- تکثیر گیاهچه‌های استریل این گیاه به وسیله جوانه‌های جانبی به راحتی مقدور است (During, 2005).
- ژرم پلاسم[2] این گیاه به صورت گیاهچه‌های استریل[3] به راحتی قابل نگهداری است و این گونه نگهداری با نگهداری ژرم پلاسم در بانک سلّول قابل قیاس است (During, 2005).
- امکان القای بیان پروتئین نوترکیب در گیاه سیب زمینی، در انبار و پس از برداشت نیز وجود دارد، که این تکنولوژی جدای از قابلیّت اجرا دارای حداکثر کارآیی و ایمنی است چرا که چرخه رشدی ارگانیسم تحت تأثیر بیان پروتئین بیگانه قرار نمی‌گیرد (During, 2005).
- تولید گیاهچه‌های تراریخت سیب زمینی در شرایط استریل، در مقیاس تجاری امکان پذیر است (During, 2005).

[1] Generally Regarded As Safe Grade
[2] Germplasm
[3] Sterile culture plantlet

۱-۴- اهمّیّت و ضرورت تولید هورمون انسولین نوترکیب انسانی در گیاه سیب زمینی

در کشورهای صنعتی بیماری دیابت نوع یک، پس از بیماری‌های قلبی – عروقی و سرطان، سوّمین عامل مرگ و میر است (Barfoed, 1987). حدود ۰/۷٪ از جمعیّت جهان از بیماری دیابت نوع یک یا بیماری دیابت وابسته به انسولین(IDDM[1]) رنج می‌برند (Winter *et al.*, 2000). این بیماری در قرن بیست ویکم، به صورت فزاینده‌ای در حال افزایش است و تخمین زده می‌شود که در بیست و پنج سال آینده شیوع این بیماری به دو برابر میزان کنونی خود برسد و حدود سیصد میلیون نفر از مردم جهان را گرفتار کند (Kjeldsen *et al.*, 2001).

تا به حال، درمان با استفاده از تزریق انسولین، تنها روش موثّر برای بیماران مبتلا به دیابت وابسته به انسولین (دیابت نوع یک) بوده است. درمان این بیماران نیازمند تنظیم دقیق میزان قند خون، با تزریق متناوب انسولین است. سخت بودن تزریق به بدن توسّط شخص بیمار، منجر به ابداع روش‌هایی برای فائق آمدن بر این مشکل شده است که مصرف ریوی انسولین و مصرف از طریق بینی از آن جمله‌اند (Goldberg and Gomez-Orellana, 2003; Cefalu, 2004). استفاده از این شیوه‌های غیرتهاجمی انسولین رسانی به فرد بیمار، اگر چه ممکن است مقبول واقع شوند، ولی احتمال دارد برای جبران کاهش میزان جذب، دوز مصرف بیشتری بطلبند. این شواهد حاکی از افزایش تقاضای این هورمون در آینده‌ای نه چندان دور خواهد بود. به طوری که برای این افزایش تقاضا رشدی معادل ۳ تا ۴ درصد در سال پیش‌بینی می‌شود. روبه‌رو شدن با این میزان تقاضا، لزوم توسعه روش‌های نوین، ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیّت تولید بالا را در آینده‌ای نه چندان دور نشان می‌دهد (Nykiforuk *et al.*, 2006).

هم اکنون تولید تجاری انسولین در *Escherichia coli* (Chan *et al.*, 1981) و یا در *Saccharomyces cerevisiae* (Thim *et al.*, 1986) صورت می‌گیرد.

[1] Insulin Dependent Diabetes Mellitus