بسم الله الرحمن الرحيم

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم اطهر یقطین تحت عنوان : انتقال ژن های اینترفرون انسانی – اولئوسین به گیاه گلرنگ (Carthamus tinctorius L.) را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد مشاور	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر رضا قلی میرفخرایی	استادیار	
۴- اساتید ناظر: ۱- داخلی	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۲- خارجی	دکتر شکیب	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی 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- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق 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 تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

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

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، 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 به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

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

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و مشاورهٔ جناب آقای دکتر قاسم کریم زاده از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

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

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب اطهر یقطین دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: اطهر یقطین

تاریخ و امضاء: ۹۱/۴/۴

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

انتقال ژن‌های اینترفرون گامای انسانی- اولئوسین به گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

تحقیق و تدوین: **اطهر یقطین**

استاد راهنما: **دکتر مختار جلالی جواران**

استاد مشاور: **دکتر قاسم کریم‌زاده**

خرداد ۹۰

تقدیم به عزیز ترین عزیزانم،

روشنی ضمیرم و معنی بودنم،

آنانکه نور چشمم و نهفته اند در قلبم

کلمات قاصرند از بیان اندیشه های فکرم

پدرم، مادرم و همسر مهربانم

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف و یاری خداوند متعال و یاری امام عصر، نگارش این پایان نامه به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم تشکر و قدردانی از زحمات بی دریغ اساتید و بزرگواران:

- ✓ جناب آقایان دکتر **مختار جلالی جواران** و دکتر **قاسم کریم زاده** که در طول این تحقیق از راهنمایی های ارزنده ایشان بهره مند بوده ام.
- ✓ جناب آقایان دکتر **علی محمد شکیب** و دکتر **حمید دهقانی** که زحمت داوری این پایان نامه را داشته اند.
- ✓ جناب آقایان دکتر **رضا قلی میرفخرایی و احمد معینی** به دلیل زحمات فراوان ایشان برای اینجانب.

و **پدر** و **مادر** و **همسر** عزیزم که مشوق و پشتیبان بنده در طول زندگی بوده اند.

از خداوند متعال آرزوی توفیق و پیروزی همگی آنها را خواهانم.

اطهر یقطین

تابستان ۹۰

چکیده:

استفاده از گیاهان به عنوان منبع تولید دارو از قدیم مورد توجه بشر بوده است. بیوتکنولوژی مدرن این امکان را فراهم نموده است که پروتئین‌های با ارزش دارویی در گیاهان تولید گردد. بیان ژن در بافت‌های مختلف گیاهی امکان پذیر است، اما بیان پروتئین در بذر موجب تجمع پایدار آن در غلظت نسبتاً بالا و حجم کم و فشرده می‌شود که برای ذخیره سازی و استخراج مناسب است. استفاده از بذور روغنی و بیان پروتئین نوترکیب در ترکیب با اولئوسین تمام مزایای بیان در بذر از جمله ظرفیت بالای تولید، افزایش پایداری و از همه مهم‌تر سهولت در تخلیص را دارد. اولئوسین سبب هدف‌گیری صحیح پروتئین به اندام‌های روغنی بذر شده و سبب استخراج راحت‌تر و ارزان‌تر از آن می‌گردد. گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) یک گیاه دارای بذر روغنی است که امروزه با هدف استخراج روغن از آن کشت می‌شود. خودگشنی، خوراکی نبودن بخش‌های رویشی گیاه، پایداری در آب و هوای گرم و خشک و سطح زیر کشت پایین گلرنگ سبب شد تا به عنوان گیاه میزبان جهت انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی در ترکیب با اولئوسین انتخاب شود. تولید اینترفرون گاما در بدن در واکنش به فعالیت میکروب‌ها و محصولات آنها رخ می‌دهد و به عنوان عامل مختل کننده همانندسازی و رشد ویروس‌ها شناخته می‌شود. در این تحقیق ژن‌های اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین که تحت پیشبرنده بذری Napin در پلاسمید pBI121 کلون شده و به اگروباکتریوم سویه LBA_{4404} انتقال یافته بود، با استفاده از تکنیک Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی تأیید شد. تیمارهای هورمونی متفاوتی به منظور باززایی گلرنگ طراحی شده و محیط حاوی نمک‌های MS و ویتامین B5 و بدون هورمون به عنوان تنها محیط القای ریشه به همراه نوساقه شناخته شد. در این راستا ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای رقم پدیده گلرنگ برای تلقیح توسط اگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب pBI121 حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی به کمک اگروباکتریوم به گیاه گلرنگ منتقل گردید و تعدادی گیاه تراریخت به دست آمد. گیاهان تراریخت بر روی محیط MS (ویتامین B5) حاوی ۴۰ $mg\ l^{-1}$ آنتی بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت وجود ژن اینترفرون گامای انسانی را در ترکیب با اولئوسین تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، ژن‌های اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین، گلرنگ، اگروباکتریوم، کشت بافت، کشاورزی مولکولی، پروتئین نوترکیب

فهرست مطالب

فصل ۱- مقدمه ۲

فصل ۲- مروری بر منابع ۵

۲-۱- سیستم‌های تولید پروتئین های دارویی ۵

۲-۲- تولید پروتئین نوترکیب در گیاه ۶

۲-۳- تولید پروتئین نوترکیب در بذر گیاه ۹

۲-۳-۱- اجسام روغنی و پروتئین اولئوسین ۱۰

۲-۳-۲- استفاده از پروتئین اولئوسین به منظور تخلیص راحت‌تر پروتئین نوترکیب ۱۱

۲-۳-۳- تاریخچه تولید پروتئین نوترکیب فیوژن با اولئوسین ۱۳

۲-۴- انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم ۱۴

۲-۴-۱- مزایا و معایب انتقال ژن توسط اگروباکتریوم ۱۶

۲-۴-۲- عوامل مؤثر بر انتقال ژن توسط اگروباکتریوم ۱۷

۲-۵- اینترفرون ۱۷

۲-۵-۱- عوامل مؤثر بر تولید اینترفرون ۱۸

۲-۵-۲- اینترفرون گامای انسانی ۱۹

۲-۵-۳- تاریخچه تولید اینترفرون نوترکیب در گیاه ۲۳

۲-۶- اهمیت دانه‌های روغنی ۲۵

۲-۶-۱- گلرنگ به عنوان یک دانه روغنی ۲۶

۲-۶-۲- کاربردها و موارد مصرف گلرنگ ۲۷

۲-۶-۳- تاریخچه تراریختی در گلرنگ ۲۸
۲-۷- اهداف انجام این پروژه ۲۹
فصل ۳- مواد و روش‌ها ۳۲
۳-۱- تهیه مواد ۳۲
۳-۱-۱- باکتری ۳۲
۳-۱-۲- محیط‌های کشت، هورمون‌ها و آنتی بیوتیک‌ها ۳۴
۳-۱-۲-۱- محیط کشت باکتریایی LB ۳۴
۳-۱-۲-۲- محیط کشت گیاهی MS ۳۵
۳-۱-۳- طرز تهیه محلول‌های ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی ۳۷
۳-۱-۴- آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده ۳۸
۳-۱-۵- تهیه ذخیره مادری از باکتری ۳۹
۳-۱-۶- بررسی حضور ژن در باکتری ۴۰
۳-۱-۷- کشت اگروباکتریوم ۴۱
۳-۲- کشت بافت گیاه گلرنگ و انتقال ژن به آن ۴۲
۳-۲-۱- مواد گیاهی و آماده سازی بذرها ۴۲
۳-۲-۲- ضدعفونی سطحی بذور ۴۲
۳-۲-۳- انتقال ژن هدف به گیاه گلرنگ ۴۲
۳-۳- استخراج DNA ژنومی از گیاه ۴۳
۳-۳-۱- بررسی کمیت و کیفیت DNA ۴۵

۳-۴- الکتروفورز DNA با ژل آگارز ۴۶
۳-۴-۱- مواد و وسایل لازم برای الکتروفورز با ژل آگارز ۴۶
۳-۴-۱-۱- تهیه ژل آگارز ۴۶
۳-۴-۲- الکتروفورز DNA ژنومی ۴۷
۳-۵- آنالیز گیاهان تراریخت ۴۷
۳-۶- تأیید حضور ژن اینترفرون گامای انسانی با استفاده از آزمون PCR ۴۸
فصل ۴- نتایج و بحث ۵۰
۴-۱- تأیید حضور ژن در باکتری ۵۰
۴-۲- ضدعفونی بذر ۵۰
۴-۳- باززایی گلرنگ ۵۸
۴-۴- استخراج DNA ژنومی گلرنگ و بررسی کمیت و کیفیت آن ۷۲
۴-۵- تأیید حضور ژن‌های اینترفرون گاما-اولئوسین در گیاهان تراریخت گلرنگ ۷۳
۴-۶- بحث ۷۴
فصل ۵- فهرست منابع ۸۳

فهرست اشکال

شکل ۲-۱- ساختار اجسام روغنی و محل قرارگیری پروتئین اولئوسین ۱۱
شکل ۲-۲- اتصال پروتئین نوترکیب به اولئوسین ۱۲
شکل ۲-۳- تخلیص پروتئین نوترکیب از اولئوسین ۱۳
شکل ۲-۴- نمودار نحوه انتقال T-DNA اگروباکتریوم به ژنوم گیاه..... ۱۶
شکل ۲-۵- ساختار مولکولی اینترفرون گاما..... ۲۰
شکل ۳-۱- شکل شماتیک سازه pBI121-IFN-γ-Oleosin..... ۳۲
شکل ۴-۱- تأیید حضور سازه ژنی اینترفرون گاما-اولئوسین در اگروباکتریوم ۵۰
شکل ۴-۲- مقایسه میانگین میزان باززایی در کشت بافت گلرنگ بین تیمارهای مختلف سری اول..... ۶۱
شکل ۴-۳- مقایسه میانگین میزان باززایی در کشت بافت گلرنگ بین تیمارهای مختلف سری دوم ۶۳
شکل ۴-۴- مقایسه میانگین میزان باززایی ارقام مختلف گ بین تیمارهای مختلف سری سوم ۶۵
شکل ۴-۵- مقایسه میانگین ترکیبات هورمونی سری سوم در ارقام گلرنگ ۶۵
شکل ۴-۶- گیاهان باززایی شده گلرنگ در صورت عدم ریشه‌زایی از بین رفتند. ۶۷
شکل ۴-۷- تولید نوساقه باززایی شده گلرنگ در محیط بدون هورمون به همراه تولید ریشه..... ۶۷
شکل ۴-۸- مقایسه میانگین بین تأثیر محل‌های برش ریزنمونه‌ها بر میزان باززایی ۶۸
شکل ۴-۹- باززایی ریزنمونه‌های رقم پدیده گلرنگ در محیط کشت بدون هورمون..... ۶۹
شکل ۴-۱۰- عدم باززایی ریزنمونه‌های غیر تراریخت در محیط حاوی ۴۰ mg l-1 کانامایسین ۷۰
شکل ۴-۱۱- الف) سفید شدن و از بین رفتن جوانه‌های غیر تراریخت بر روی محیط گزینشگر ۷۱
شکل ۴-۱۲- انتقال ریزنمونه‌های باززایی شده گلرنگ به محیط طویل سازی..... ۷۱
شکل ۴-۱۳- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گلرنگ به خاک ۷۱
شکل ۴-۱۴- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از گلرنگ..... ۷۲
شکل ۴-۱۵- آنالیز DNA ژنومی با استفاده از تکنیک PCR..... ۷۳
شکل ۴-۱۶- نمونه‌هایی از گیاهچه‌های شیشه‌ای شده گلرنگ ۷۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مقایسه انواع سیستم‌های بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب ۶
جدول ۲-۲- تعداد هسته‌های گلیکوزیلاسیون در مولکول اینترفرون گاما..... ۲۲
جدول ۳-۱- اجزا و ترکیبات محیط کشت MS..... ۳۶
جدول ۳-۲- اجزا و ترکیبات محیط B5 ..... ۳۷
جدول ۳-۳- غلظت محلول‌های مادری و مورد استفاده آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت‌های مختلف ... ۳۹
جدول ۳-۴- مواد و مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR ۴۱
جدول ۳-۵- اجزای بافر استخراج CTAB..... ۴۴
جدول ۴-۱- تیمارهای مورد استفاده جهت ضدعفونی بذور گلرنگ (رقم گلدشت) ۵۲
جدول ۴-۲- بررسی اختلاف میانگین رتبه‌های مربوط به میزان آلودگی بذر ۵۴
جدول ۴-۳- مقایسه دو به دوی رتبه‌های مربوط به میزان آلودگی تیمارهای مختلف ضدعفونی بذر ۵۵
جدول ۴-۴- تجزیه واریانس میزان جوانه‌زنی بذور رقم گلدشت ۵۶
جدول ۴-۵- مقایسه میانگین تیمارهای جوانه‌زنی بذور رقم گلدشت گلرنگ ۵۷
جدول ۴-۶- تیمارهای هورمونی سری اول مورد استفاده جهت باززایی گلرنگ ۶۰
جدول ۴-۷- تجزیه واریانس تیمارهای هورمونی سری اول کشت بافت ارقام مختلف گلرنگ ۶۰
جدول ۴-۸- تیمارهای هورمونی سری دوم مورد استفاده جهت باززایی گلرنگ..... ۶۲
جدول ۴-۹- تجزیه واریانس تیمارهای هورمونی سری دوم کشت بافت ارقام مختلف گلرنگ..... ۶۲
جدول ۴-۱۰- تیمارهای هورمونی سری سوم مورد استفاده جهت باززایی گلرنگ ۶۴
جدول ۴-۱۱- تجزیه واریانس تیمارهای هورمونی سری سوم کشت بافت ارقام مختلف گلرنگ ۶۴
جدول ۴-۱۲- تیمارهای محل برش ریزنمونه‌های گلرنگ (رقم پدیده)..... ۶۸
جدول ۴-۱۳- تجزیه واریانس تیمارهای محل برش ریزنمونه‌های گلرنگ (رقم پدیده)..... ۶۸

فصل اول

مقدمه

فصل ۱- مقدمه

استفاده از گیاهان به عنوان منبع تولید دارو از زمان‌های بسیار قدیم مورد توجه بوده است و امروزه نیز منشأ بسیاری از داروها را گیاهان تشکیل می دهند. بیوتکنولوژی مدرن این امکان را می‌دهد که تولید مواد دارویی در گیاهان افزایش یافته و حتی گیاهان داروهایی را تولید کنند که پیش از این قادر به تولید آنها نبوده‌اند. بر این اساس کشاورزی مولکولی[1] عبارت است از تولید پروتئین‌های با ارزش از قبیل پروتئین‌های دارویی در گیاه. به عبارت دیگر کشاورزی مولکولی فرایندی است که در آن پروتئین دارویی خاصی با میزان فعالیت شناخته شده و قابل قبول در میزبان جدیدی تولید می‌شود. به عنوان مثال بیان یک نوع آنتی بادی در گیاه توتون هنگامی به عنوان کشاورزی مولکولی در نظر گرفته می‌شود که تخلیص آن از منبع طبیعی و معمول امکان پذیر نباشد (Fischer and Emans, 2000).

در مورد کشاورزی مولکولی، توانایی تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان در مقیاس تجاری از اهمیت زیادی برخوردار است. تولید یک پروتئین از این روش در مقایسه با سایر روش‌ها از قبیل تولید پروتئین در حیوانات، لاین‌های سلول حیوانی و سلول‌های میکروبی از نظر اقتصادی قابل توجیه است. در بهترین حالت ۱۲- ۸ هفته زمان لازم است تا فرایند بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان کامل شده و گیاه تراریخت به دست آید و این مدت زمان برای گیاهان گونه‌های مختلف متفاوت است.

کاربرد رایج استفاده از گیاهان به عنوان سیستم‌های بیانی در بیوتکنولوژی شامل تولید آنتی بادی‌های نوترکیب، آنزیم‌ها، هورمون‌ها، اینترلوکین‌ها، پروتئین‌های خونی و واکسن‌ها می‌باشد (Fischer and Emans, 2000).

1 Molecular Farming

اولین کارخانه تولید داروهای نوترکیب بیوتکنولوژیکی در سال ۱۹۷۶ تأسیس شد و اولین داروهای حاصل از پروتئین‌های دارویی شامل انسولین و هورمون‌های رشد انسانی به ترتیب در سال‌های ۱۹۸۲ و ۱۹۸۵ توسط این کارخانه تولید شد. امروزه داروهای نوترکیب بین ۱۵-۱۰٪ بازار دارو را در اختیار دارند و درآمد ایالت متحده امریکا در سال ۲۰۰۸ در این زمینه در حدود ۳۰ میلیارد دلار بوده است (Pisani and Bonduelle, 2008). میزان فروش محصولات حاصل از کشاورزی مولکولی، مقیاس خوبی جهت برآورد میزان مقبولیت این محصولات در بین مردم است (Horn *et al.*, 2004).

اقبال عمومی نسبت به استفاده از داروهای نوترکیب به دو دلیل اصلی زیر است:

- اول این که این داروها توانایی تحت پوشش قرار دادن بخش وسیع‌تری از بیماری‌ها (شامل بسیاری از سرطان‌ها و بیماری‌های ژنتیکی) را دارند که داروهای معمول توانایی پاسخگویی به آنها را ندارند.

- دلیل دوم این است که هزینه تولید این داروها نسبت به سایر روش‌ها بسیار کمتر است (Pisani and Bonduelle, 2008).

فصل دوم

مروری بر منابع

فصل ۲- مروری بر منابع

۲-۱- سیستم‌های تولید پروتئین های دارویی

پروتئین های نوترکیب به عنوان ابزاری جهت انجام تحقیقات و تولید مواد دارویی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این مسیر به مقادیر زیادی از پروتئین‌های نوترکیب و عاری از عوامل بیماری‌زا نیاز است. بنابراین سیستم‌های بیان متنوعی به طور تجاری پایه گذاری شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. کشت‌های باکتریایی به طور نمونه مقادیر بالایی از محصولات نوترکیب را در زمان کوتاه و قیمت پایین تولید می‌کنند، مانند انسولین انسانی که در درمان دیابت کاربرد دارد. اما این سیستم‌ها فاقد تغییرات بعد از رونویسی پروتئین‌های بیان شده مثل گلیکوزیلاسیون و ساختارهای دی سولفید هستند و پروتئین‌های نوترکیب ممکن است غیرفعال باشند (Fischer and Schillberg, 2004). کشت سلول‌های حشره و پستانداران برای مثال جهت تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال می‌توانند بر این مشکلات غالب آیند، اما هر دو روش گران هستند. . علاوه بر این کشت سلول‌های پستانداران ممکن است حاوی عوامل بیماری‌زای ویروسی یا پریون‌ها باشند. در مقابل یک گیاه تراریخت برای تولید پروتئین نوترکیب فقط به آب، مواد غذایی و نور خورشید احتیاج دارد و می‌توان آن را در مقیاس زمین زیاد زراعی کاشت. سیستم‌های گیاهی از نظر ایمنی و حجم تولید نسبت به سیستم‌های باکتریایی قابل اعتمادترند، زیرا قادر به کامل کردن تغییرات پس از ترجمه پروتئین بوده و شرایط را جهت فعال شدن آن فراهم می‌آورند (Fischer and Emans, 2000).

جدول ۲-۱- مقایسه انواع سیستم‌های بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب (Pavlou and Reichert, 2004)

سیستم تولید	قیمت تمام شده	مدت زمان صنعتی شدن	ظرفیت تولید	کیفیت تولید	خطر آلودگی
باکتری	پایین	کوتاه	بالا	پایین	توکسین‌ها
مخمر	متوسط	متوسط	بالا	متوسط	پایین
سلول CHO	بالا	متوسط/طولانی	خیلی پایین	خیلی بالا	پریون‌های ویروسی
کشت سلولی گیاه	متوسط	متوسط	متوسط	بالا	پایین
حیوان	بالا	خیلی طولانی	پایین	خیلی بالا	پریون‌های ویروسی
گیاه	پایین	کوتاه/طولانی	خیلی بالا	بالا	پایین

۲-۲- تولید پروتئین نوترکیب در گیاه

استفاده از گیاهان به عنوان سیستم‌های تولید داروهای نوترکیب به سال‌های بین ۱۹۸۶ و ۱۹۹۰ برمی‌گردد، زمانی که بیان پروتئین‌هایی نظیر هورمون رشد انسانی، نوعی اینترفرون و نیز آلبومین خونی انسانی به صورت موفقیت آمیزی انجام گرفت (Barta *et al.*, 1986; De Zoeten *et al.*, 1989; Sijmons *et al.*, 1990). بیان آنتی بادی‌های فعال در گیاهان (Hiatt *et al.*, 1989; Düring *et al.*, 1990) سبب تثبیت جایگاه کشاورزی مولکولی در تولید دارو شد (Fischer and Emans, 2000).

تاکنون پروتئین‌های نوترکیب متعددی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تولید شده است که از این میان می‌توان به تولید پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (t-pa) در گیاه توتون اشاره کرد (Masoumiasl *et al.*, 2010).

استفاده از گیاهان به عنوان سیستم‌های تولید پروتئین، در مقایسه با سایر سیستم‌ها دارای مزایای زیر می‌باشد:

- صرف هزینه کمتر در این سیستم نسبت به سایر سیستم‌های تولید پروتئین حیوانات، فرمانتورها و بیورآکتورها.
- نیاز به ساختار ساده و تخصص کمتر جهت کاشت، داشت و برداشت، و در مجموع کار با گیاهان.
- عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان از قبیل پریون، ویریون و... در گیاهان و احتمال آلوده سازی محصول نهایی.
- توانایی گیاهان عالی در تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با تاخوردگی و گلیکوزیلاسیون صحیح و فعالیت قابل قبول (Horn *et al.*, 2004).

فرایند گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها، در گیاهان و جانوران با هم متفاوت است و به همین سبب پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سیستم‌های گیاهی ممکن است موجب ایجاد واکنش‌های ایمنی در بدن شوند. به همین علت آنالیز پروتئین‌های تولید شده باید به صورت دقیق و جزئی انجام شود (Bardor *et al.*, 1999). تاکنون تلاش‌های زیادی در جهت تغییر در الگوی N-گلیکوزیلاسیون گیاه به منظور تولید پروتئین‌های دارویی انجام شده است. (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007).

میزان فرایندهای جداسازی و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب از گیاهان تراریخت بسته به نوع گیاه مورد استفاده و نوع مصرف پروتئین متفاوت است و از صفر در گیاهانی که به مصرف خوراکی می‌رسند تا ایجاد خلوص بالا در گیاهانی که تولید دارو می‌کنند، متغیر است (Nikolov and Woodard, 2004).

با توجه به فواید و برتری‌های سیستم‌های گیاهی نسبت به سایر سیستم‌ها، تعداد زیادی از گونه‌های زراعی و غیرزراعی جهت کشاورزی مولکولی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تاکنون بیش از ۳۰ گونه گیاهی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در هر صورت انتخاب یک سیستم گیاهی به عنوان میزبانی مناسب برای تولید یک پروتئین ویژه بسیار مشکل است. علاوه بر این موضوع در هر گونه