دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده کشاورزی

۹۲۳۶۷۱۲۸

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات

عنوان:

همسانه‌سازی آنتی ژن ویروس گامبورو در وکتور بیانی گیاهی جهت انتقال و بیان دائم آن به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv.Xanthi)

اساتید راهنما:

دکتر داریوش نباتی احمدی

دکتر حمید رجبی معماری

استاد مشاور:

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

نگارنده :

مرضیه خیراندیش

خرداد ماه سال ۱۳۹۲

فهرست مطالب

چکیده پایان نامه ۱

فصل اول ۳

مقدمه و هدف ۳

۱-۱ مقدمه ٤

۱-۱-۱ بیماری بورس عفونی ٤

۱-۲ اهداف تحقیق ۷

فصل دوم ۸

مروری بر منابع موجود ۸

۲-۱ پروتئین نوترکیب ۹

۲-۱-۱ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب ۹

۲-۲ کشاورزی مولکولی ۱۱

۲-۳ گیاهان به عنوان کارخانه زیستی برای تولید پروتئین نوترکیب ۱۲

۲-٤ واکسن‌های نوترکیب ۱۲

۲-٤-۱ مثال‌هایی از آنتی‌ژن‌های تولید شده در گیاهان ۱۳

۲-۵ بیماری بورس عفونی ۱۴

۲-۵-۱ تاریخچه بیماری بورس عفونی ۱٤

۲-۵-۲ خصوصیات ویروس بورس عفونی ۱۵

۲-۵-۲-۱ ساختار ژنومی و پروتئینی ویروس بورس عفونی ۱٦

۲-۵-۲-۲ بیماری‌زایی، میزبانان ویروس، علائم بیماری ۱۹

۲-٦ پیشگیری و درمان ۲۰

۲-٦-۱ واکسن‌های تولید شده علیه ویروس بورس عفونی ۲۲

۲-۷ واکسن‌های نوترکیب تولید شده علیه ویروس بورس عفونی ۲۵
۲-۷-۱ واکسن‌های نوترکیب تولید شده علیه بورس عفونی در ایران ۲۹
۲-۸ میزبان‌های مهم برای کشاورزی مولکولی ۳۱
۲-۸-۱ توتون (*Nicotiana tabacum*) ۳۲
۲-۹ سیستم‌های بیانی مختلف برای کشاورزی مولکولی ۳۳
۲-۹-۱ انتقال هسته‌ای پایدار ۳٤
۲-۱۰ انتقال ژن و مهندسی ژنتیک ۳۵
۲-۱۰-۱ مهندسی ژنتیک گیاهی و اهمیت آن در اصلاح نباتات ۳٦
۲-۱۰-۲ مزایای به‌نژادی گیاهان از طریق مولکولی نسبت به روشهای کلاسیک ۳٦
۲-۱۱ انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم ۳۷
۲-۱۱-۱ باکتری اگروباکتریوم ۳۸
۲-۱۱-۲ اساس انتقال ژن به وسیله اگروباکتریوم تومی فشنس ۳۹
۲-۱۱-۲-۱ پلاسمید Ti ۳۹
۲-۱۱-۲-۱-۱ T-DNA ٤۰
۲-۱۱-۲-۱-۲ ژن های القاء خاصیت بیماریزایی در باکتری اگروباکتریوم تومی فشنس ٤۱
۲-۱۲ ناقل‌های انتقال بر اساس پلاسمید Ti ۴۵
۲-۱۲-۱ ناقلین تلفیق مشترک ٤٦
۲-۱۲-۲ ناقلین جفتی یا ناقلین دوتایی ٤۷
۲-۱۳ روش‌های تراریختی با استفاده از اگروباکتریوم تومی فشنس ۴۹
۲-۱٤ مزایا و معایب انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم تومی فشنس ۵۱
۲-۱۵ ژن‌های گزینشگر ۵۲
۲-۱۵-۱ گزینشگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک ۵٤
۲-۱٦ کشت بافت گیاهی ۵۵

فصل سوم ۵۸
مواد و روش ۵۸
۳-۱ مواد و روش ۵۹
۳-۱-۱ سال و محل انجام تحقیق و دستگاه‌های مورد استفاده ۵۹
۳-۲ بخش مولکولی ۵۹
۳-۲-۱ مواد شیمیایی ۵۹
۳-۲-۲ باکتری‌ها ۶۰
۳-۲-۳ ناقل‌ها ۶۰
۳-۲-٤ ژن آنتی ژن VPX ۶۱
۳-۲-۵ آغازگرها ۶۲
۳-۲-۶ آنتی بیوتیک‌ها ۶۳
۳-۲-۶-۱ آمپی‌سیلین ۶۳
۳-۲-۶-۲ کانامایسین ۶۳
۳-۲-۶-۳ استرپتومایسین ۶٤
۳-۲-۶-٤ سفوتاکسیم ۶٤
۳-۲-۶-۵ هیگرومایسین ۶٤
۳-۲-۷ محیط کشت باکتریایی ۶۵
۳-۲-۸ الکتروفورز ژل آگارز ۶۶
۳-۲-۸-۱ تهیه بافر(۵ X)TBE ۶۶
۳-۲-۸-۲ تهیه ژل آگارز ۱٪ ۶۷
۳-۲-۸-۳ بافر نمونه‌گذاری ۶۷
۳-۲-۹ همسانه‌سازی قطعات DNA در ناقل بیانی pCAMBIA1304 ..... ۶۸
۳-۲-۹-۱ استخراج پلاسمید ۶۸

۳-۲-۹-۲ تخلیص ناقل به روش Mini- Preparation ٦٩
۳-۲-۹-۳ هضم ناقل بیانی pCAMBIA1304 ..... ۷۲
۳-۲-۹-٤ تکثیر ژن به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز ۷۳
۳-۲-۹-٤-۱ شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR ۷۳
۳-۲-۹-۵ خالص سازی قطعات DNA از ژل ۷٤
۳-۲-۹-٦آماده سازی محصول PCR با آنزیم *NcoI* و آنزیم *AflII* ۷۵
۳-۲-۹-۷ همسانه‌سازی قطعه بریده شده در ناقل ۷۵
۳-۲-۱۰ انتقال ناقل حامل ژن VPX به باکتری *E. coli* ۷٦
۳-۲-۱۰-۱ تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* ۷۷
۳-۲-۱۰-۲ روش انتقال ناقل به باکتری ۷۸
۳-۲-۱۱ اثبات وجود سازه ساخته شده در باکتری *E. coli* ۷۹
۳-۲-۱۱-۱ با استفاده از تکنیک Colony PCR ۷۹
۳-۲-۱۱-۲ اثبات وجود سازه در باکتری با استفاده از هضم آنزیمی ۷۹
۳-۲-۱۱-۳ تعیین توالی ژن VPX همسانه‌سازی شده در ناقل ۸۰
۳-۲-۱۲ انتقال ناقل pCAMBIA1304 حامل ژنVPX به اگروباکتریوم تومی فشنس ۸۰
۳-۳ بخش انتقال ژن به گیاه و کشت بافت گیاهی ۸۲
۳-۳-۱ مواد گیاهی و آماده سازی بذور ۸۲
۳-۳-۲ محیط کشت گیاهیMS ۸۲
۳-۳-۲-۱ تهیه محیط کشت MS ۸۳
۳-۳-۲-۲ محیط گزینشگر ۸٤
۳-۳-۳ هورمون‌های گیاهی ۸۵
۳-۳-۳-۱ هورمون BAP ۸۵
۳-۳-۳-۲ هورمون NAA ۸۵

۳-۳-٤ تراریخت نمودن قطعه‌های برگ توتون با استفاده از اگروباکتریوم تومی فشنس ۸۵
۳-۳-٤-۱ آماده سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم تومی فشنس ۸٦
۳-۳-٤-۲ آماده سازی نمونه‌ها ۸٦
۳-۳-۵ استخراج DNA از برگ‌های تراریخت و شاهد به روش CTAB ۸۸
۳-۳-٦ بررسی گیاه تراریخت در سطح DNA با استفاده از تکنیک PCR ۸۹
۳-۳-۷ استخراج پروتئین از برگهای تراریخت توتون ۸۹
۳-۳-۷-۱ طرز تهیه بافر استخراج ۹۰
۳-۳-۷-۲ مراحل استخراج پروتئین ۹۰
۳-۳-۸ بررسی تولید پروتئین VPX با استفاده از بلات نقطه ای ۹۰
۳-۳-۸-۱ مواد مورد نیاز برای انجام بلات نقطه ای ۹۱
۳-۳-۸-۲ تهیه TBS1x ۹۱
۳-۳-۸-۳ تهیه TBST1x ۹۲
۳-۳-۸-٤ تهیه محلول wetern blocking ۹۲
۳-۳-۸-۵ تهیه محلول Anti-His6Peroxidase ۹۲
۳-۳-۸-٦ روش اجرای بلات نقطه‌ای ۹۲
فصل چهارم ۹٤
نتایج و بحث ۹٤
٤-۱ نتایج بدست آمده ۹۵
٤-۱-۱ طراحی آغازگرها ۹۵
٤-۱-۲ تکثیر ژن VPX ۹٦
٤-۱-۳ تخلیص ناقل بیانی گیاهی ۹۷
٤-۱-٤ هضم آنزیمی VPX و ناقل بیانی ۹۸
٤-۲-٤ همسانه‌سازی ژن آنتی ژن سطحی هپاتیت بی در ناقل بیانی ۹۹

٤-١-٥ تأیید همسانه سازی ژن ٩٩
٤-١-٥-١ استفاده از تکنیک Colony PCR : ٩٩
٤-١-٥-٢ استفاده از واکنش هضم آنزیمی ١٠١
٤-١-٥-٣ تعیین توالی ١٠١
٤-١-٦ انتقال سازه حاوی ژن (VPX) به اگروباکتریوم تومی فشنس ١٠٣
٤-١-٧ تأیید حضور سازه حاوی ژن در اگروباکتریوم تومی فشنس ١٠٣
٤-١-٨ انتقال ژن به گیاه توتون ١٠٤
٤-١-٨-١ آلوده‌سازی برگ توتون با اگروباکتریوم تومی فشنس نوترکیب حاوی ژن ١٠٥
٤-١-٨-٢ رشد جوانه‌های تراریخت در محیط گزینشگر ١٠٥
٤-١-٨-٣ انتقال جوانه های تراریخت شده حاوی VPX به شیشه ١٠٦
٤-١-٩ بررسی جوانه‌های گیاهی تراریخت ١٠٦
٤-١-٩-١ استخراج DNA ١٠٦
٤-١-٩-٢ تایید حضور ژن VPX در جوانه‌های گیاهی تراریخت ١٠٧
٤-١-٩-٣ تأیید تولید پروتئین VPX در جوانه‌های گیاهی تراریخت ١٠٨
٤-٢ بحث ١٠٩
٤-٣ پیشنهادات ١١٢
فصل پنجم ١١٤
منابع ١١٤
چکیده انگلیسی ١٢٨

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱: ساختار ژنومی و پروتئینی ویروس بیماری بورس عفونی ۱۷

شکل ۲-۲: تصویر کلی پلاسمید Ti ٤۰

شکل۲-۳: انتقال T-DNA از اگروباکتریوم تومی فشنس به ژنوم سلول گیاهی ٤٥

شکل۲-٤: شمایی از ناقلین تلفیق مشترک ٤۷

شکل۲-٥: شمایی ازناقلین دوتایی ٤۸

شکل۳-۱: نقشه ناقل بیانی pCAMBIA1304 ..... ٦۱

شکل۳-۲: توالی ژن آنتی ژن سطحی VPX از بانک ژن ٦۲

شکل ٤-۱: تکثیر ژن و استخراج از ژل آن. ۹۷

شکل ٤-۲: تخلیص پلاسمید ناقل pCAMBIA 1304 ..... ۹۸

شکل ٤-۳: هضم آنزیمی ژن و ناقل. ۹۸

شکل ٤-٤: تأییدیه همسانه‌سازی با استفاده از گزینش سلول‌های تراریخت. ۱۰۰

شکل ٤-٥: تأیید همسانه‌سازی با استفاده از colony pcr. ۱۰۰

شکل ٤-٦: تأیید همسانه‌سازی با استفاده از واکنش هضم آنزیمی. ۱۰۱

شکل ٤-۸: تأیید حضور سازه‌ی حاوی ژن در اگروباکتریوم تومی فشنس. ۱۰٤

شکل ٤-۹: تأیید حضور سازه حاوی ژن در اگروباکتریوم تومی فشنس با استفاده از Colony PCR ۱۰٤

شکل ٤- ۱۰: تلقیح قطعات برگ توتون با اگروباکتریوم تومی فشنس و نگه‌داری آن در محیط MSII ۱۰٥

شکل ٤-۱۱:تأیید انتقال باکتری اگروباکتریوم تومی فشنس حاوی سازه نوترکیب به گیاه. ۱۰٦

شکل ٤- ۱۲: انتقال جوانه های تراریخت شده حاوی VPX به شیشه ۱۰۷

شکل ٤- ۱۳: DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت ۱۰۷

شکل ٤- ۱٤: تأیید حضور ژن VPX در گیاه با استفاده از PCR. ۱۰۸

شکل ٤- ۱٥: تأیید تولید پروتئین VPX در گیاه تراریخت. ۱۰۸

فهرست جداول

جدول۲-۱: چند نمونه از واکسن‌های دارویی مهم تولید شده در گیاه ۱۳

جدول۳-۱: ترکیبات محیط کشت LB در حجم ۱۰۰ ml ٦٥

جدول۳-۲: ترکیبات بافر (٥ X)TBE ٦٧

جدول۳-۳: هضم آنزیمی ناقل ۷۲

جدول۳-٤: اجزای مخلوط واکنش PCR ۷٤

جدول۳-٥: برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR ۷٤

جدول۳-٦: هضم آنزیمی قطعه حاوی ژن VPX ۷٥

جدول۳-۷: اجزای واکنش اتصال ۷٦

جدول۳-۸: غلظت‌های مورد استفاده آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های کشت ۸٤

جدول ۳-۹: مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج DNA به روش CTAB ۸۹

جدول ۳-۱۰: ترکیبات لازم برای ساخت محلول TBS1X ۹۱

چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: خیراندیش	نام: مرضیه	شماره دانشجویی: ۸۹۳۶۷۰۱
عنوان پایان نامه: همسانه‌سازی آنتی ژن ویروس گامبورو در وکتور بیانی گیاهی جهت انتقال و بیان دائم آن به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv.Xanthi)		
اساتید راهنما: دکتر داریوش نباتی احمدی، دکتر حمید رجبی معماری		
استاد مشاور: دکتر مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: مهندسی کشاورزی	گرایش: اصلاح نباتات
دانشگاه: شهید چمران اهواز	دانشکده: کشاورزی	گروه: زراعت و اصلاح نباتات
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۹۲/۰۳/۲۸		تعداد صفحات: ۱۲۸
کلید واژه‌ها: ویروس بیماری بورس عفونی، پروتئین VPX، پلاسمید pCAMBIA 1304 ، گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*)		

بیماری بورس عفونی، بیماری ویروسی مسری و به شدت عفونی، که در صنعت مرغداری شایع می‌باشد و جوجه‌های جوان را آلوده کرده و موجب سرکوب پاسخ های ایمنی در آن‌ها می‌گردد. انتشار گسترده این ویروس و قدرت آن در تضعیف سیستم ایمنی پرنده، باعث شده است که به طور وسیع به کنترل آن توجه شود. تا به امروز واکسیناسیون اصولی‌ترین روش کنترل بیماری به‌حساب می‌آید، ولی واکسن‌هایی که به طور معمول تولید می‌شوند، به‌ندرت دارای آلودگی‌های بیماری‌زا هستند در حالی که واکسن‌هایی که حاوی ماده فعال آنتی‌ژن‌های نوترکیب سیستم گیاهی هستند، عاری از آلودگی‌های بیماری‌زا می‌باشند. تولید واکسن از طریق گیاهان، علاوه بر قابلیت تحریک سیستم و صرفه اقتصادی، فوائد دیگری از جمله پایداری، ایمنی، درجه تأثیر بیشتر و سازگاری بهتری نسبت به واکسن‌های رایج دارند. ویروس بورس عفونی دارای پنج پروتئین است، که در بین آن‌ها VP2، مهم‌ترین پروتئین ساختاری کپسید ویروس است، که حداقل شامل سه اپی‌توپ مهم برای برانگیختگی آنتی‌بادی‌های خنثی کننده‌ی عامل ایجاد ایمنی می‌باشد. VPX به عنوان پیش‌ساز VP2، دارای همه دمین‌های خنثی کننده و احتمالاً پروتئین‌های حیاتی است که در ایجاد پاسخ ایمنی علیه بیماری بورس عفونی نقش مهمی دارد. در این پژوهش آغازگرهای مناسب با توجه به توالی افزایش دهنده بیان گیاهی، توالی‌های دو طرف ژن VPX و محل‌های برش مناسب طراحی و ژن موردنظر در ناقل pCAMBIA 1304 همسانه‌سازی شد. سازه‌ی بدست آمده به روش شوک حرارتی به باکتری اشرشیاکولای سویهٔ $DH_5\alpha$ منتقل شد و کلونی‌ها بر روی محیط گزینشگر کانامایسین ۵۰

میکروگرم در میلی‌لیتر رشد کردند. با استفاده از تکنیکهای مختلف colony PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی ، صحت همسانه‌سازی ژن VPX در ناقل pCAMBIA1304 تأیید شد. سپس سازه مورد نظر با روش استاندارد انجماد و ذوب به باکتری اگروباکتریوم تومی فشنس سویه LBA4404 منتقل شده و به منظور تراریختی از گیاه توتون رقم Xanthi، به روش دیسک برگی استفاده شد. پس از مایه زنی با اگروباکتریوم تومی فشنس، ریزنمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۸ درجه بر روی محیط هم‌کشت قرار گرفتند. در نهایت قطعه‌های برگی تلقیح شده به محیط کشت انتخابی که شامل محیط هم‌کشتی به همراه آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و هیگرومایسین ۱۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند و در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد قرار گرفتند. از گیاهان باززایی شده تراریخت و شاهد به منظور آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت و از آن به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. حضور ژن VPX در گیاه تراریخت و عدم حضور آن در گیاه شاهد مورد تأیید قرار گرفت. به منظور بررسی تولید پروتئین مورد نظر در گیاهان تراریخت، از نمونه‌های تراریخت و شاهد استخراج پروتئین صورت گرفت و با آزمون بلات نقطه‌ای تولید پروتئین مورد نظر در گیاهان تراریخت و عدم تولید آن در گیاه شاهد به اثبات رسید.

فصل اول:

مقدمه و هدف

۱-۱ مقدمه

۱-۱-۱ بیماری ویروسی بورس عفونی

بیماری بورس عفونی[1] (IBD) یا گامبورو[2] بیماری ویروسی به شدت عفونی و مسری در بین جوجه‌های جوان است (حسینی و همکاران، ۲۰۰۷)؛ که با شروع ناگهانی، کوتاه بودن دوره بیماری، تغییرات در بورس فابریسیوس، خون‌ریزی در عضلات و تضعیف سیستم ایمنی ظاهر می‌گردد (میاحی، ۱۳۸٦). سلول‌های هدف این ویروس، لنفوسیت‌های B تولید شده توسط بافت لنفاوی بورس فابریسیوس می‌باشند؛ و با از بین رفتن این سلول‌ها، سیستم ایمنی حیوان سرکوب می‌گردد (وایپ، ۲۰۰۵). ویروس‌های گامبورو در سراسر جهان به طور وسیعی گسترش دارند. ویروس بیماری بورس عفونی، که برای اولین بار در ایران در سال ۱۹۸۱ شناسایی شد، مرگ و میر وسیعی دربرنداشت (آقاخان، ۱۹۹٤)؛ اما بعد از آن، ویروس بورس عفونی جداسازی شده، به ترتیب موجب مرگ و میر ۲۵٪ و ۷۵٪ در بین جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار جوان، شد (آقاخان،۱۹۹٦). در گزارشات اخیر، حضور سویه‌های بسیار بیماری‌زای[3] این ویروس، در ایران نشان داده شده است (قریشی، ۲۰۰۳، حسینی، ۲۰۰٤، شمس‌آرا، ۲۰۰٦). ماکیان و بوقلمون میزبانان طبیعی ویروس هستند؛ ولی ماکیان تنها گونه‌ای است که از نظر ابتلا به عفونت طبیعی مورد توجه می‌باشند. همه نژادها مبتلا می‌شوند ولی بسیاری از محققان شدت بیماری و بالاترین تلفات را در نژاد لگهورن سفید گزارش کرده‌اند. حساس‌ترین سن ابتلا ۳ تا ٦ هفتگی است. این ویروس سیستم ایمنی پرنده را شدیداً تضعیف می‌کند؛ و به همین دلیل از نظر اقتصادی، اهمیت

1 - Infectious bursal disease
2 - Gumboro disease
3 - very virulent Infectious bursal disease (vvIBDV)

زیادی دارد. در بیماری گامبورو، زمان انعقاد خون در جوجه‌ها طولانی می‌شود و علت خون‌ریزی، در این بیماری، نقایص انعقادی است. بیماری گامبورو بسیار واگیر است و ویروس آن تا دو هفته بعد از عفونت، همراه مدفوع دفع می‌شود؛ و این، یکی از مهم‌ترین منابع انتشار ویروس می‌باشد (میاحی، ۱۳۸٦). ویروس بیماری بورس عفونی متعلق به جنس بیرناویروس[1] از خانواده‌ی بیرناویرده [2]است؛ ژنوم این خانواده شامل دو قطعه RNA دو رشته‌ای است؛ قطعه A حدود ۳/۲ kbp و قطعه B حدود ۲/۸ kbp است (آزاد و همکاران، ۱۹۸۵، مونت و مولر، ۱۹۹۵). قطعه A دارای یک قاب باز خواندن[3](ORF) بزرگ است که یک پلی پروتئین (NH2-VPX-VP4-VP3-COOH) را کد می‌کند. این قطعه همچنین دارای یک ORF کوچکتر است که در قابی متفاوت از قاب باز خواندن اصلی، پروتئین غیرساختاری VP5 را می‌سازد. قطعه B تنها دارای یک قاب باز خواندن است که پروتئین VP1 را کد می‌کند (هودسون و همکاران، ۱۹۸٦). در طی بلوغ ذرات ویروسی، VPXبه VP2 تبدیل می‌شود. VP2، مهم‌ترین پروتئین ساختاری کپسید ویروس است؛ که حداقل شامل سه اپی‌توپ مهم برای القای آنتی‌بادی‌های خنثی کننده‌ای است که، عامل ایجاد ایمنی می‌باشند (حسینی و همکاران، ۲۰۰۷). واکسیناسیون اصولی‌ترین روش کنترل بیماری است (میاحی، ۱۳۸٦). واکسن‌ها معمولا شامل میکروارگانیزم کشته شده، میکروارگانیزم غیربیماری‌زا، فرآورده‌های میکروبی (مثلاً سم‌ها)، یا اجزاء میکروبی خالص شده می‌باشد. درتمام این موارد واکسن دارای ترکیب (های) فعال آنتی‌ژنی می‌باشد. آنتی‌ژن‌ها موادی هستند که می‌توانند سیستم ایمنی را به منظور تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی، تحریک کنند. چنین

1 - Avibrinavirus
2 - Birnaviridae
3 - Open reading frame

تحریکی سبب می‌شود تا سیستم ایمنی برای تخریب باکتری‌ها و ویروس‌هایی که وارد بدن شده‌اند، آمادگی لازم را پیدا نماید. اگرچه واکسن‌هایی که به طور مرسوم تولید می‌شوند، معمولاً بی‌ضرر هستند، اما ممکن است برخی از آن‌ها به ندرت دارای آلودگی‌های بیماری‌زا باشند. واکسن‌هایی که ماده فعال آن‌ها آنتی‌ژن‌های نوترکیب هستند، این خطر ناچیز را هم ندارند (کدخدایی و همکاران، ۱۳۸۹). کشاورزی مولکولی، امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب (ایمنی زا، دارویی و غیره) را در مقیاس زیاد، و در موجودات و سلول‌های زنده‌ی اغلب گیاهان و حیوانات اهلی فراهم کرده است (دنیل[1]، ۲۰۰۶). آزاد و همکاران (۱۹۸۷)، ژن VP2 را در سیستم بیانی پروکاریوتی مثل *E. coli* بیان کردند و نشان دادند که با گستره وسیعی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال واکنش می‌دهند. اوپلینگ[2] و همکاران (۱۹۹۱) و کریسمن[3] و همکاران (۱۹۹۳) بیان داشتند، اپی‌توپ‌هایی روی VP2 قرار دارند که رفتار سازگارگونه‌ای نشان می‌دهند. VPX به عنوان پیش‌ساز VP2، شامل همه دمین‌های خنثی کننده و احتمالاً مهم در ایجاد پاسخ ایمنی علیه بیماری بورس عفونی می‌باشد (آزاد، ۱۹۹۰، بایلیس، ۱۹۹۱، فاهی، ۱۹۹۱). حسینی و همکاران (۲۰۰٤)، با بیان پروتئین‌های نوترکیب VP2 و VPX در سیستم پروکاریوتی *E. coli*، نتیجه گرفتند که این پروتئین‌های نوترکیب، از نظر اندازه و تولید آنتی‌بادی، به پروتئین‌های طبیعی شباهت دارند؛ و می‌توان به طور اقتصادی، از آن‌ها به منظور برانگیختن آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه ویروس بورس عفونی بهره برد. در این راستا، استفاده از گیاهان تراریخته به عنوان روشی برای تولید این پروتئین‌های نوترکیب، از پتانسیل خاصی برای بهبود مقیاس‌پذیری تولید و

1 - Daniell
2 - Oppeling
3 - Crisman

عملکرد و نهایتاً کاهش هزینه‌ها برخوردار است. توتون به عنوان یک گیاه مدل، مزایای کاربردی زیادی را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس انبوه فراهم می‌نماید؛ به علاوه روش انتقال ژن و باززایی و کاست‌های بیانی بسیار مناسب برای کنترل بیان تراژن در آن به صورت بهینه وجود دارد. از جمله مزایای این گیاه، زیست توده زیاد آن (تا ۱۰۰۰ تن زیست توده در هر هکتار در هر سال) و وجود سیستم‌های بیانی فراوان و مناسب می‌باشد. این موضوع که توتون نه یک گیاه غذایی و نه علوفه ای است، باعث کاهش احتمال آلودگی زنجیره‌های غذایی به مواد تراریخته می‌گردد (کدخدایی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۲ اهداف تحقیق

با توجه به مزیت‌های سیستم‌گیاهی نسبت به سایر سیستم‌های تولید واکسن بورس عفونی و اهمیت فراوان این واکسن در صنایع کشاورزی، دامپروری و طیور، تولید این واکسن نوترکیب، در منابع دائمی و ارزان ضروری است. توتون یک گیاهِ مدل در دستورزی ژنتیکی است. از آن‌جا که تاکنون گزارشی مبنی بر بیان دائم ژن VPX در گیاه توتون دریافت نشده است؛ لذا این تحقیق می‌تواند زمینه تولید آن را در گیاه فراهم آورد.

فصل دوم:

مروری بر منابع موجود

۲-۱ پروتئین نوترکیب

پروتئین‌ها به طور گسترده در داروسازی، صنعت و تحقیقات زیستی استفاده می‌شوند، اما با وجود کاربرد فراوان آن‌ها در زمینه‌های مختلف، جداسازی پروتیئن‌ها از منابع طبیعی گاهی سخت، گران و خطرآفرین است. نمونه‌ایی از آن، آلودگی تعدادی از انسان‌ها به عوامل بیماری‌زا، با دریافت محصولات خونی وهورمون‌های آلوده است؛ و از طرفی برخی از پروتئین‌ها همچون قطعات زنجیره‌ی تکی FV آنتی‌بادی، به طور طبیعی یافت نمی‌شوند. کشاورزی مولکولی به مفهوم تولید پروتئین‌های نوترکیب (دارویی، صنعتی وآنزیم‌ها و غیره) در مقیاس زیاد ودر موجودات وسلول‌های زنده شامل گیاهان وحیوانات اهلی است (کاسی‌ما[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

۲-۱-۱ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب

گذشته از نوع پروتئین نوترکیب، دسترسی به سیستم تولیدی ساده و ارزان، برای تولید این پروتئین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برخی از انواع این سیستم‌ها عبارتند از:

۱- رایج‌ترین سیستم بیانی برای پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از سیستم‌های پروکاریوتی است که در بین آن‌ها *E. coli*، سیستم غالب می‌باشد؛ و این به دلیل سهولت دستکاری، به صرفه بودن نسبی اقتصادی و سادگی ذاتی بیان پروتئین (فقدان فرایند Splicing) است. اما ممکن است تولیدات نوترکیب آن، با اندوتوکسین همراه باشد که استفاده از آن‌را در شرایط محیطی دشوار می‌سازد. ضمن آن‌که امکان تخریب پروتئولیتیک پروتئین بیگانه نیز وجود دارد. مهمترین اشکال سیستم‌های پروکاریوتی، ناتوانی آن‌ها در انجام تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین‌های تولید

1 - K-C. Ma

شده است (جوستن[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

۲- سیستم‌های ساده یوکاریوتی مانند مخمرها نیز می‌توانند در تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار گرفته شوند. عمده‌ترین اشکال این سیستم‌ها ناتوانی از انجام بعضی از تغییرات پس از ترجمه بخصوص گلیکوزیلاسیون است که بسیار مهم بوده و در مخمر می‌تواند متفاوت از یوکاریوت‌های عالی‌تر باشد. به علاوه مقادیر تولید پروتئین نوترکیب در مخمر محدود است و تولید آن در مقیاس وسیع مقرون به صرفه نیست.

۳- تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران نیز به خوبی انجام شده است اما تولید گسترده آن، گران و وقت‌گیر است. ضمن آن‌که استفاده از این روش خطر آلودگی به عوامل عفونی و ویروس‌های مختلف واگیردار و توالی‌های انکوژن را در پی داشته و از نظر قانونی و اخلاقی نیز محدودیت‌هایی برای آن مطرح می‌باشد. همچنین طی کشت سلول‌های جانوری، کنترل دقیق حالات کشت برای اطمینان از خلوص محصولات الزامی است، چرا که این سلول‌ها به ویژه وقتی در مقیاس صنعتی کشت می‌شوند، نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساسند (پیترز[2] و همکاران، ۲۰۰۱).

٤- گیاهان یکی دیگر از سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند که می‌توانند به آسانی رشد کرده و توده‌ی زنده قابل توجهی تولید کنند. پروتئین‌های حاصل از گیاهان، عاری از اندوتوکسین‌های مضر، عوامل بیماریزای جانوری، پاتوژن‌های بالقوه انسانی و DNAی انکوژن و ویروسی می‌باشند که در سیستم‌های بیانی رایج مانند کشت سلول‌های جانوری و پروکاریوتی

1 - joosten
2 - Peeters

احتمال حضورشان وجود دارد و از این جهت نیز به عنوان سیستمی ایده‌آل برای بیان پروتئین‌های درمانی و تشخیصی مطرح شده‌اند (استوگر[1] و همکاران، ۲۰۰۰). پروتئین‌های بیگانه‌ای که در گیاهان بیان می‌شوند ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند، به همین دلیل می‌توان از گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهای با ارزش دارویی استفاده کرد (دنیل[2]، ۲۰۰۳). پیشرفت‌های پی در پی در ناقل‌های مورد استفاده، روش‌های تخلیص و گیاهان مناسب‌تر (برای مثال ارزان‌تر) سبب شده است که برای دسترسی به تولید پروتئین‌های بیشتر، استفاده از گیاهان مورد نظر قرار گیرد. بنابراین با توجه به پایداری گیاه تراریخت و DNA الحاقی به آن و امکان افزایش تولید با روش‌های کشاورزی برای تولید نامحدود و ارزان قیمت، گیاهان، اقتصادی‌ترین سیستم برای تولید مقادیر فراوان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند.

۲-۲ کشاورزی مولکولی

کشاورزی مولکولی به مفهوم تولید پروتئین‌های نوترکیب (دارویی، صنعتی وآنزیم‌ها و غیره) در مقیاس زیاد ودر موجودات وسلول‌های زنده شامل گیاهان وحیوانات اهلی است(کاسی‌ما[3] و همکاران، ۲۰۰۳). در کشورهای پیشرفته‌ی دنیا تلاش پرشتابی جهت تولید زیست داروها از منابع گیاهی انجام می‌گیرد. هم‌اکنون در آمریکا گیاهان توتون به کارخانه‌های تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده‌اند. دانشمندان آمریکایی، از مزارع جو در ایالت واشنگتن تا مزارع نیشکر در هاوایی، محصولات کشاورزی پیشرفته‌ای را تولید می‌کنند که محصولات ارزان‌تر و راه‌های موثرتری را برای درمان بیماران، با این غذاها فراهم کنند و به مدت بیش از یک دهه است که این

1 - Stoger
2 - Daniell
3 - K-C. Ma