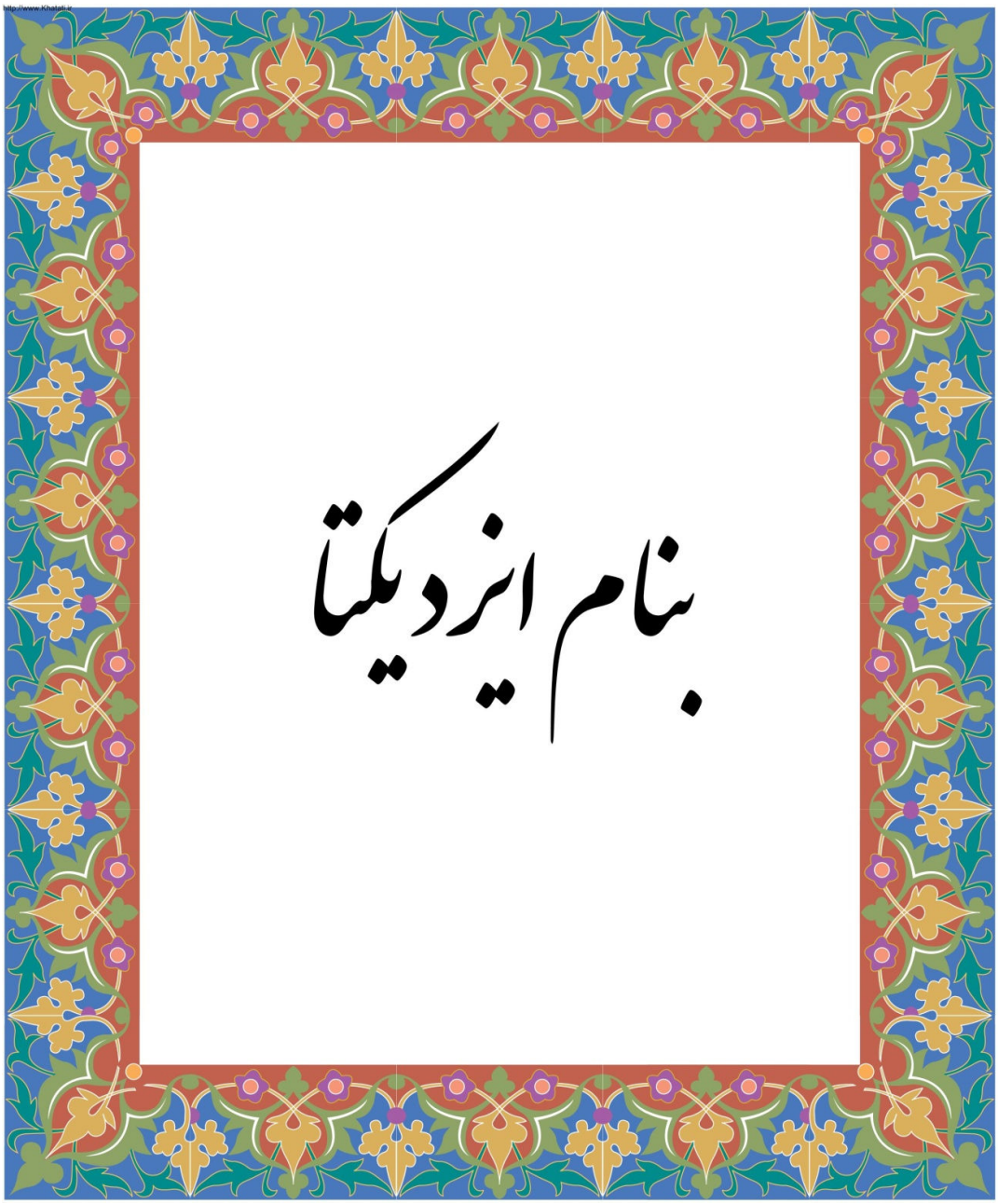

بنام ایزد یکتا

کلیه آزمایشها و تحقیقات مربوط به اجرای این پروژه در سازمان پژوهشهای علمی وصنعتی ایران ، پژوهشگاه فناوریهای نوین و در پژوهشکده بیوتکنولوژی این مرکز اجرا شد.

دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته: مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

بیان پپتیدهایی از ویروس هپاتیت C در گیاه تراریخته سیب زمینی

استاد راهنمای اول :

سرکارخانم دکترحمیده افقی

استاد راهنمای همکار:

جناب آقای دکتر فرزین روحوند

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

نگارش:

پانته آ قدسی نصیر آبادی

اسفند ماه هزار و سیصد و هشتاد و هشت

به مادرم

گرمی وجودم

پدرم

پشتیبان همیشگیم

و برادرم

صمیمی ترین دوستم

همواره قدردان استادم سرکار خانم دکتر حمیده افقی که افتخار شاگردی ایشان نصیبم شد، خواهم بود.

به این امید که در کنار بهره گیری از علم ایشان مهربانی، صبر، حوصله، و گذشت را نیز نزدشان تمرین کرده باشم.

بر خود می دانم که از زحمات بی دریغ، تلاشهای بی وقفه و راهنماییهای ارزشمند این استاد گرامی در طول انجام این پروژه تشکر و قدردانی نمایم.

و بسیار سپاسگذارم از پرسنل صمیمی پژوهشکده بیوتکنولوژی

سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران بویژه بخش گلگسون

که با گشاده رویی و صبر بسیار مرا در انجام این پروژه کمک و یاری کردند.

یاد و خاطره و دوستی همسفران عزیزم خانمها نیتا شیرینی، شادی آقاقزوینی و سعیده سنگ سفیدی جاودان.

فهرست مطالب:

فصل اول کلیات

۱-۱- مقدمه	۱
۱-۲- تعریف بیوتکنولوژی گیاهی	۳
۱-۲-۱- سابقه پیدایش	۳
۱-۳- زراعت ملکولی و گیاهان نوترکیب	۵
۱-۳-۱- تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان	۵
۱-۳-۲- مزایای استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان راکتورهای زیستی	۷
۱-۴- واکسنهای گیاهی	۹
۱-۴-۱- اهمیت تولید واکسنهای مشتق شده از گیاهان	۱۰
۱-۴-۲- گونه‌های گیاهی	۱۱
۱-۴-۳- مصرف خوراکی واکسن و پاسخهای آنتی بادیهای سیستمیک و مخاطی	۱۲
۱-۴-۴ - سلامتی و پذیرش عمومی واکسنهای خوراکی	۱۲
۱-۴-۵- نمونه هایی از واکسنهای گیاهی تولید شده	۱۳
۱-۵- واکسنهای ذرات شبه ویروسیVLP	۱۷
۱-۶- سیب زمینی	۱۹
۱-۶-۱- اهمیت سیب زمینی در بیوتکنولوژی	۲۰
۱-۷- هپاتیت C	۲۱
۱-۷-۱- شیوع هپاتیت C در جهان و ایران	۲۲
۱-۷-۲- پاتوژنیسیته هپاتیتC	۲۲
۱-۷-۳- مبارزه با هپاتیتC با درمان زود هنگام	۲۳
۱-۷-۴- واکسن هپاتیتC	۲۴
۱-۷-۵- ویروس هپاتیت C	۲۵

۱-۷-۶- ژنوم و پروتئینهای HCV ۲۶

۱-۷-۷- پروتئین های ساختمانی HCV ۲۸

۱-۷-۸- چرخه زندگی HCV ۲۹

۱-۸- همسانه سازی ژنی ۳۲

۱-۸-۱- مراحل اصلی فرایند همسانه سازی ۳۳

۱-۸-۲- ناقلین کلونینگ یا وکتورها ۳۳

۱-۸-۳- پلاسمید در مهندسی ژنتیک ۳۴

۱-۸-۴ - نقش E.coli ء در بیوتکنولوژی ۳۴

۱-۸-۵- روشهای وارد کردن حاملها به داخل میزبان ۳۵

۱-۹- انتقال ژن ۳۶

۱-۹-۱- انتقال ژن به گیاه ۳۶

۱-۹-۲- بیان موقت ۳۷

۱-۹-۳- آگروباکتریوم اینفیلتراسیون ۳۹

۱-۹-۴- بیان پایدار ۴۰

۱-۱۰- تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم ۴۱

۱-۱۰-۱- آگروباکتریوم ۴۱

۱-۱۰-۲- نقش آگروباکتریوم و پلاسمید Ti در ایجاد تومور تاجی ۴۲

۱-۱۰-۳- پلاسمید Ti در آگروباکتریوم ۴۳

۱-۱۰-۴- موتانهای پلاسمید Ti ۴۴

۱-۱۱- ناقلین مبتنی بر آگروباکتریوم ۴۶

۱-۱۱-۱- اجزای استاندارد یک ناقل دوتایی ۴۸

۱-۱۱-۲- مزیتهای استفاده از یک سیستم دوتایی در مقایسه با ناقل تلفیق شونده ۴۸

۱-۱۱-۳- انتقال ژن به سلول گیاه با واسطه اگروباکتریوم ۴۸

۱-۱۱-۴- مراحل انتقال ژن به سلول گیاه با واسطه اگروباکتریوم ۴۹
۱-۱۱-۵- مزیتهای ترانس فورماسیون برپایه اگروباکتریوم ۴۹
۱-۱۱-۶- معایب ترانس فورماسیون بر پایه اگروباکتریوم ۵۰
۱-۱۲- بررسی بیان ژن در گیاه تراریخته ۵۰
۱-۱۲-۱- ژنهای نشانگر ۵۰
۱-۱۱-۲- ژنهای گزارشگر ۵۱
۱-۱۲-۳- نشانگرهای گزینشگر ۵۲
۱-۱۲-۴- انواع نشانگرها ۵۳
۱-۱۳- میزان بیان ژن در گیاه تراریخته ۵۴
۱-۱۴- خاموشی ژن در گیاهان تراریخته ۵۵

فصل دوم مواد و روشها:

۲-۱- مواد مورد استفاده ۵۷
۲-۱-۱- مواد وآنزیمها ۵۷
۲-۱-۲- پلاسمیدها و باکتریها ۵۷
۲-۱-۳- محیطهای باکتریایی و آنتی بیوتیک ها ۶۰
۲-۱-۳-۱- محیط LB ۶۰
۱-۳-۲- تهیه استوک آنتی بیوتیک های مورد نظر ۶۰
۲-۱-۳-۳ - عملکرد آنتی بیوتیکها ۶۱
۲-۱-۴- محیطهای کشت گیاهی ۶۲
۲-۱-۴-۱- محیط کشت رشد رویشیMS ۶۲
۲-۱-۴-۱-۱- طرز تهیه استوک 10Xعناصر پر مصرف محیطMS ۶۳
۲-۱-۴-۱-۲ - طرز تهیه محلول مادری 100Xعناصر کم مصرف ۶۴
۲-۱-۴-۱-۳- طرز تهیه محلول مادری آهن Fe-Chalate،10X ۶۴

۲-۱-۴-۱-۴- طرز تهیه محلول مادری ویتامین ها و مواد آلی100X ۶۴
۲-۱-۴-۲ - محیط کشت غده زایی MSP ۶۵
۲-۱-۴- ۳ - محیط کشت جوانه زنیMLS ۶۵

۲-۲ - روشها
۲-۲-۱- تهیه سلول مستعد *E.coli* ۶۶
۲-۲-۱-۱- ساخت بافرFB ۶۷
۲-۲-۱-۲- ساختنmop ۶۷
۲-۲-۲- ترنسفورماسیون پلاسمید به سلولهای مستعد *E.coli* ۶۷
۲-۲-۳- استخراج پلاسمید از باکتری به روش Mini Prepration ۶۹
۲-۲-۴- استخراج پلاسمید از باکتری در مقیاس انبوه ۷۱
۲-۲-۵- محلولهای مربوط به تخلیص پلاسمید ۷۲
۲-۲-۵-۱-GET بافر ۷۲
۲-۲-۵-۲- Potassium Solution ۷۳
۲-۲-۵-۳- Lysis Buffer ۷۳
۲-۵-۴ - محلول فنل ،کلروفرم و ایزوآمیل الکل ۷۳
۲-۲-۶- واکنش زنجیر پلیمراز یا PCR ۷۴
۲-۲-۷ – الکتروفورز ۷۴
۲-۲-۷-۱- ساخت ژل آگارز ۷۵
۲-۲-۷-۲- بافر TBE ۷۶
۲-۲-۷-۳- بافرTE ۷۶
۲-۲-۷-۴- طرز تهیه استوک اتیدیوم بروماید ۷۷
۲-۲-۸- تعیین غلظت DNA ۷۷

۲-۲-۹- هضم آنزیمی ۷۸
۲-۲-۱۰- Ethanol Percipitation رسوب دهی با استفاده از اتانل ۷۹
۲-۲-۱۱- تخلیص DNA از ژلLow melting ۸۰
۲-۲-۱۲ - اتصال یاLigation ۸۲
۲-۲-۱۲-۱ - پرتوکل کیت فرمانتاس برای عملLigation ۸۳
۲-۲-۱۳- تهیه سلولهای مستعد و ترانسفورماسیون مستقیم اگروباکتریوم ۸۵
۲-۲-۱۴- القا و رشد ریز غده های سیب زمینی ۸۶
۲-۲-۱۵- تراریخت کردن صفحات ریز غده ۸۷
۲-۲-۱۶- استخراج DNA ژنومی با روش CTAB بافر ۸۹
۲-۲-۱۷ - ساخت بافر CTAB یا بافر استخراج DNA ژنومی از سلولهای گیاهی ۹۱
۲-۲-۱۸- استخراج پروتئین به روش Maison ۹۱
۲-۲-۱۹ساخت بافر استخراج پروتئینی ۹۲
۲-۲-۲۰- تست الیزا (ELISA) ۹۲
۲-۲- ۲۱- اندازه گیری مقدار پروتئین ۹۴
۲-۲-۲۲ - روش برادفورد ۹۵
۲-۲-۲۳-روش تهیه معرف برادفورد ۹۵

فصل سوم نتایج

۳-۱- طراحی پرایمر و تکثیر ژن پلی توپ ۹۸
۳-۱-۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این پروژه ۹۹
۳-۱-۲- توالی ژن HBs Ag-fused Polytope ۱۰۰
۳-۲ - انجام تست PCR جهت تکثیر ژن پلی توپ ۱۰۰
۳-۳- مرحله آماده سازی و تخلیص و هضم پلاسمید pBI121 ۱۰۱
۳-۳-۱- مرحله آماده سازی ۱۰۱

۳-۳-۲- مرحله استخراج ۱۰۲
۳-۳-۳- مرحله هضم ۱۰۲
۳-۳-۳-۱- تایید ملکولی انجام عمل هضم ۱۰۳
۳-۳-۳-۲ - جداسازی قطعات جدا شده توسط آنزیمهای برشی ۱۰۴
۳-۴- مرحله آماده سازی و تخلیص و هضم محصول PCR ژن پلی توپ ۱۰۵
۳-۴-۱- مرحله آماده سازی و تخلیص ژن ۱۰۵
۳-۴-۲- مرحله هضم آنزیمی ژن پلی توپ ۱۰۵
۳-۵- مرحله اتصال یا Ligation پلاسمید و محصول هضم شده به هم ۱۰۵
۳-۵-۱- تایید ملکولی حضور ژن پلی توپ در پلاسمیدpBI121 ۱۰۶
۳-۶- مرحله انتقال یا Transformation ۱۰۶
۳-۶-۱- تهیه سلولهای مستعد ۱۰۶
۳-۶-۲- شناسایی کلونیهای ترانسفورم شده در محیط گزینشگر ۱۰۷
۳-۶-۳- تایید ملکولی حضور ژن پلی توپ در کلونی های رشد یافته در محیط گزینشگر ۱۰۷
۳-۶-۳-۱- کلونی PCR با پرایمرهای ژن پلی توپ ۱۰۷
۳-۶-۳-۲- PCR پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمرهای پلی توپ ۱۰۸
۳-۶-۳-۳- تایید ملکولی کاست تولید شده در پلاسمید pBI121 نوترکیب ۱۰۸
۳-۷- مرحله آماده سازی و ترانسفورماسیون در آگروباکتریوم ۱۱۱
۳-۷-۱- تایید ملکولی حضور پلاسمید نوترکیب در کلونیهای رشد کرده در محیط گزینشگر ۱۱۲
۳-۷-۱-۱- کلونیPCR از کلونیهای رشد کرده در محیط گزینشگر ۱۱۲
۳-۷-۱-۲- تست PCR از پلاسمیدهای استخراج شده از آگروباکتریوم ۱۱۲
۳-۸- کشت گیاه میزبان ۱۱۳
۳-۹- تراریختی گیاه توسط آگروباکتریوم های حاوی پلاسمید نوترکیب ۱۱۶
۳-۱۰- تست PCR از DNA ی استخراج شده از گیاه تراریخت ۱۲۰

۳-۱۱- تست الیزا جهت بررسی بیان ژن پلی توپ در گیاه تراریخته ۱۲۰
۳-۱۲- اندازه گیری مقدار پروتئین به روش برادفورد ۱۲۱
۳-۱۳- توالی پروتئین تولید شده ۱۲۳
۳-۱۳-۱- توالی اسید آمینه پلی توپ ۲ ۱۲۳
۳-۱۳-۲- توالی اسید آمینه HBs-Polytope 2 ۱۲۳
۳-۱۳-۳-توالی اسید آمینه HBs-Polytope 2 **بصورت** three letter ۱۲۴

فصل چهارم بحث وپیشنهادات ۱۲۵

منابع ۱۳۷

شکلها و جداول:

جدول شماره ۱-۱- مهمترین کاربردهای گیاهان تراریخت ۶

جدول شماره ۱-۲ - مقایسه سیستمهای تولید پروتئینها و واکسنهای نوترکیب انسانی ۱۰

جدول شماره ۲-۱- مواد لازم برای تهیه LB ۶۰

جدول شماره ۲-۲ - غلظت محلولهای مادری و مورد استفاده در محیطهای کشت گیاهی و باکتریایی ۶۱

جدول شماره ۲-۳ - مقادیر لازم عناصر پر مصرف محیط MS ۶۳

جدول شماره ۲-۴- غلظت مواد استوک و مورد استفاده در واکنش PCR ۷۴

جدول شمار ۲-۵ - نسبتهای بکار رفته در سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد ۹۷

جدول ۳-۱- نتایج حاصل از اندازه گیری غلظتهای مختلف BSAجهت رسم منحنی استاندارد ۱۲۱

شکل ۱-۱- ژنوم و پروتئینهای HCV ۲۷

شکل ۱-۲- ورود به سلولهای هدف اولین قدم عفونت HCV ۳۲

شکل۱-۳- گال‌هایی که توسط آگروباکتریوم ایجاد شده اند ۴۱

شکل ۱-٤- نقشه شماتیک پلاسمید Ti ٤۲

شکل ۵-۱- تراریخته کردن گیاه تنباکو با استفاده از آگروباکتریوم ۴۵

شکل ۱-۶- اولین قدم در ترانسفورماسیون سلولهای گیاهی با استفاده از اگروباکتریوم تومفاسینس ۴۶

شکل ۲-۱: نقشه پلاسمیدpcDNA 3.1 ۵۸

شکل ۲-۲- پلاسمید pBI121، همراه سایتهای برشی آنزیمهای برشی محدودالاثر ۵۹

شکل ۳-۱- شمای شماتیکی ژن HBs Ag-fused Polytope با سایتهای برشی آن ۹۸

شکل ۳-۲ - شکل شماتیک پلاسمید گیاهیpBI121 با سایتهای برشی آن ۹۸

شکل ۳-۳- شکل شماتیک کلون شدن ژن پلی توپ در پلاسمیدpBI121 ۹۹

شکل۳-۴- تکثیر ژن پلی توپ با پرایمرهای اختصاصی آن ۱۰۱

شکل۳-۵ - پلاسمیدهای pBI121 استخراج شده ۱۰۲

شکل۳-٦ - هضم پلاسمید pBI121 با آنزیمهای برشی ۱۰۳

شکل ۳-۷- هضم پلاسمید pBI121 با آنزیمهای برشی ۱۰۴

شکل۳-۸- دیدن باند 750bp بعد از مرحله اتصال ژن پلی توپ و پلاسمید pBI121 جهت تایید عمل Ligation ۱۰۶

شکل ۳-۹- کلونی PCR از کلونیهای رشد کرده در محیط آنتی بیوتیک دار برای تایید حضور ژن پلی توپ در داخل کلونیهای DH5α ۱۰۷

شکل ۳-۱۰- پلاسمیدهای استخراج شده از کلونیهای ترانسفورم شده جهت تایید حضور ژن پلی توپ در داخل پلاسمید ۱۰۸

شکل۳-۱۱- شمای ملکولی پلاسمید pBI121 همراه سایتهای برشی آن ۱۱۰

شکل ۳-۱۲- انجام PCR تاییدی با پرایمرهای pCaMV و NOS جهت تایید کاست نوترکیب تولید شده در پلاسمید pBI121 ۱۱۱

شکل ۳-۱۳- کلونی PCR از کلونیهای رشد کرده در محیط آنتی بیوتیک دار برای تایید حضور ژن پلی توپ در داخل کلونیهای اگروباکتریوم ۱۱۲

شکل۳-۱۴- پلاسمیدهای استخراج شده از کلونیهای ترانسفورم شده اگروباکتریوم جهت تایید حضور ژن پلی توپ در داخل پلاسمید ۱۱۳

شکل ۳-۱۵- گیاهچه های سیب زمینی واریته های کاردال و مارفونا کشت شده در محیط مغذی MS ۱۱۴

شکل۳-۱۶- اضافه کردن محیط غده زایی به گیاهچه های حاوی شرایط ۱۱۵

شکل۳-۱۷- تولید ریز غدهای سیب زمینی در شرایط دمایی پایین و تاریکی بعد از حدود ۲ ماه ۱۱۵

شکل۳-۱۸- ریز غده های آلوده شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نو ترکیب ۱۱۶

شکل ۳-۱۹- اولین جوانه های تولید شده در محیط MLS حاوی آنتی بیوتیک ۱۱۷

شکل ۳-۲۰- جوانه های اولیه غیر تراریخت که در محیط گزینشگر حاوی آنتی بیوتیک نتوانستند به رشد خود ادامه دهند ۱۱۷
شکل ۳-۲۱- جوانه های ثانویه تولید شده از ریز غده های تراریخت ۱۱۸
شکل ۳-۲۲- انتقال جوانه های ثانویه تولید شده به ارلنهای حاوی MLS مایع حاوی آنتی بیوتیک و هورمون ۱۱۸
شکل ۳-۲۳ - گیاهچه های تراریخت در محیط گزینشگر حاوی آنتی بیوتیک ۱۱۹
شکل۳-۲۴ - گیاهچه های غیر تراریخت در محیط گزینشگر حاوی آنتی بیوتیک ۱۱۹
شکل ۳-۲۵- DNA استخراج شده از گیاه تراریخته ۱۲۰
شکل ۳-۲۶- منحنی استاندارد برادفورد جهت تعیین غلظت نمونه مجهول ۱۲۲

چکیده

در سالهای اخیر نسل تازه ای از واکسنها بنام واکسنهای چند اپی توپی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است.این نوع از اکسنها با در کنار هم قرار دادن اپی توپهای شناخته شده مربوط به یک یا چند میکروارگانیسم بصورت ژن یا پپتید درست می شوندو باعث تحریک سیستم ایمنی بصورت اختصاصی می گردندو مخصوصا در مورد ویروسهایی مثل HCV که جهش زایی بالایی دارند،بسیار مورد توجه قرار گرفته اند.استفاده از گیاهان تراریخته نیز برای تولید واکسنهای درمانی انسانی یا حیوانی بسیارمورد توجه می باشد.واکسنهای گیاهی ، مزیتهای زیادی ازجمله عدم نیاز به زنجیره سرد در طول حمل و نقل، هزینه پایین تهیه و تولید ، انبارداری آسان و مایه کوبی راحت، دارند. در این پروژه، ژن سنتتیک پلی توپ HBs-Polytope2 داخل پلاسمید نگهدارنده pcDNA 3.1(+) ، بعد از تکثیر با پرایمرهای اختصاصی، وارد جایگاه ژن GUS در پلاسمید pBI121 که یک ناقل دو تایی گیاهی است ، شد. بعد به باکتری *E.coli DH5α* ترانسفرم شد و بعد از بررسی صحت کاست نوترکیب حاصل و انجام عمل هضم با آنزیمهای برشی مربوطه ، بااستفاده از روش شوک حرارتی به *Agrobacterium tomefasiens* ، سویه *pGV 3850* ، منتقل شد. ازکلونیهای تولید شده در محیط گزینشگر حاوی کانامایسین برای انتقال به ریز غده های سیب زمینی واریته کاردال از راه زخمی کردن غده استریل و آلوده کردن آنها با این باکتری،استفاده شد.گیاهان تراریخت در محیط کشت اختصاصی حاوی آنتی بیوتیکهای کانامایسین و سفاتوکسیم ،باززایی شدند. درآنالیز ملکولی گیاهان تراریخت با روش PCR باندی با طول حدود ۷۵۰bp مربوط به ژن کلون شده دیده شد و آنالیز پروتئین نیز با روشELISA ، انجام گرفت .

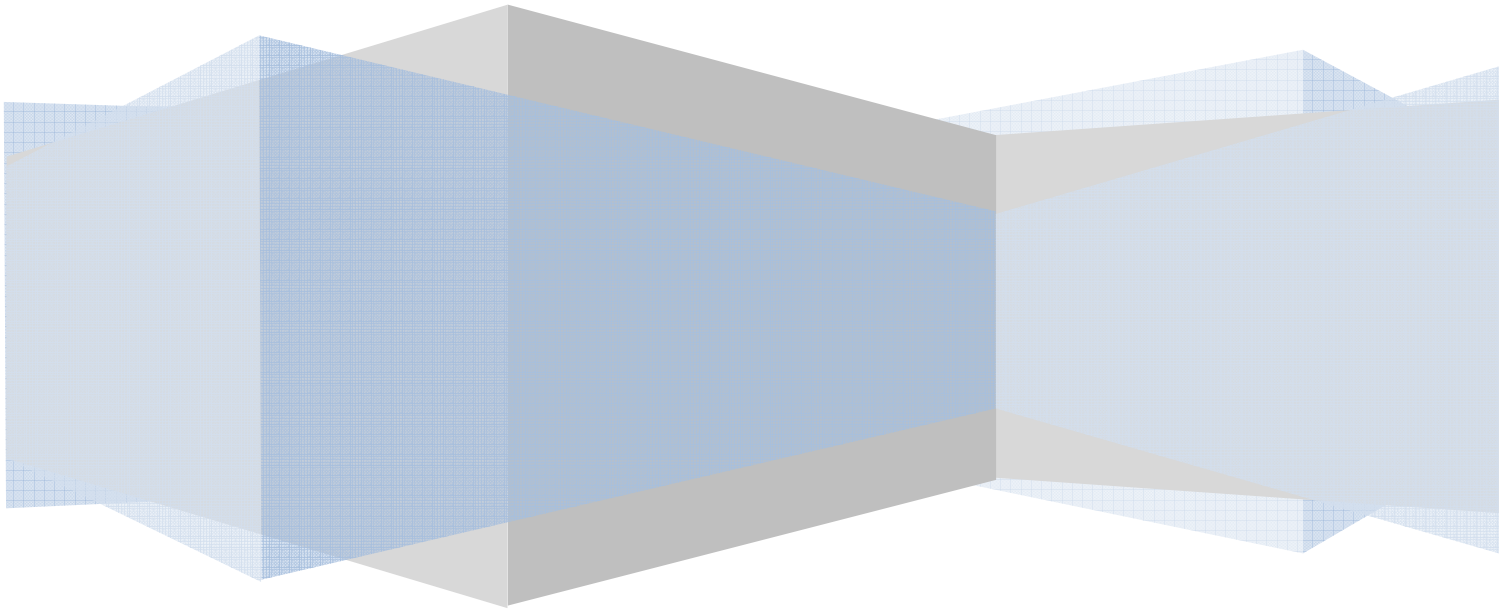
نتایج این مطالعه نشان می دهد که این پروتئین شیمریک نو ترکیب در گیاه سیب زمینی به خوبی بیان و پردازش شده و این گیاه احتمالا از کارایی اولیه لازم به منظور بررسی ایمنی زایی بعنوان کاندیدای واکسن در حیوان حساس آزمایشگاهی برخوردار می باشد.

واژگان کلیدی:

ویروس هپاتیت C، واکسن های پلی توپ ، گیاه تراریخته

فصل اول

کلیات



مقدمه :

در حال حاضر ویروس هپاتیتC اولین عامل سرطان کبد ،سیروز و هپاتیت مزمن درجهان می باشد و تلاش برای تحقیق در مورد امکان ساخت یک واکسن پروفیلاکتیک(پیشگیر) یا درمانی برای آن به شدت ادامه دارد. مطالعات انجام شده نشان می دهد که برخلاف ایمنی ذاتی و همورال سیستم ایمنی سلولی و به ویژه سلولهای T اختصاصی[۱] $CD4^+$و$CD8^+$ (که با اثر روی پروتئینهای ویروس مانند (NS5[۲]و CORE,E1,E2[۳],NS3,NS4) نقش بسیار مهمی را در کنترل ویروس دارا میباشد.سلولهای $CD8^+$ اولین و مهمترین سلولهای عمل کننده در بر قراری ایمنی هستند و سلولهای $CD4^+$ نیز در مهارموتاسیونهایی که منجر به فرار ویروس از دست سیستم ایمنی میشوند، کمک کننده اند. ازآنجاییکه حذف ویروس همراه با پاسخ قوی و چندگانه سلولهای $TCD8^+$ می باشد ، تحریک سیستم ایمنی سلولی و CTLs[۴]برای مبارزه با این ویروس به شدت تحت مطالعه قرار گرفته است و روشهای مختلفی در این راستا مد نظر است که از این میان می توان به استفاده از پروتئینهای نوترکیب و ذرات شبه HCV[۵] به اشکال مختلف اشاره کرد. [۴۸،۵۵،۶۷ ،۷۴]

در حال حاضر تنها راه مقابله با این ویروس و کنترل عوارض آن استفاده همزمان از -PEG IFNα و ریباویرین است که بسته به ژنوتیپ ویروس، باعث کنترل تکثیر ویروس می گردد. درمیان اجزاءمختلف HCV که تا کنون بعنوان واکسن استفاده شده است، پروتئین هسته ای بعلت ثبات توالی آن در ژنوتیپ های مختلف و دخالت در پاتوژنز ویروس و گلیکوپروتئین های پوششی بعلت شرکت در اتصال ویروس به گیرنده موجود بر سطح هپاتوسیتها از دیرباز مورد توجه بوده است. [۴۹،۵۳، ۷۱]

---

[۱] cluster of differentiation

[۲] Non structural protein

[۳] envelope

[۴] Cytotoxic T Lymphocyte

[۵] Hepatitis C Virus

محصول واکسنهای نو ترکیب در گیاهان می تواند بر بعضی از مشکلات بزرگ هنگام استفاده از واکسنهای سنتی یا ساب یونیت در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه ، فائق آید. مشکلاتی نظیر: امکان تهیه و تولید واکسن ، احتیاج به "زنجیره های سرد"از محل تولید تا محل استفاده از واکسن و وابستگی آنها به تزریق.

واکسنهای مشتق شده از گیاهان با این مشکلات روبرو نیست.در کشورهای توسعه یافته واکسنهای گیاهی با توجه به هزینه پایین ، برای برنامه های واکسیناسیون انبوه و استفاده وسیع از واکسیناسیون برای استفاده های دامپزشکی، سطح ایمنی را بالا برده است.تا امروز خیلی از گونه های گیاهی برای تولید واکسن مورد استفاده قرار گرفته اند. مطالعات اولیه روی تنباکو و سیب زمینی بود ولی امروزه گوجه فرنگی،موز،ذرت،کاهو،... نیزمورد استفاده قرار گرفته است.انتخاب گونه گیاهی مهم است و اگر واکسن بصورت خوراکی مطرح باشد ، گیاه خوراکی مد نظر قرار می گیرد.

محدودیتی در بیان انواع آنتی ژن ها در گیاه وجود ندارد. بیان پایدار در حال حاضر به دو صورت مطرح می شود: الحاق ژن بیگانه در داخل ژنوم هسته ای ویا داخل ژنوم کلروپلاست. واکسنهای مشتق شده از گیاهان از آلودگیها با پاتوژنهای حیوانی کاملا پاک می باشد، علاوه بر آن DNA گیاه با DNA حیوانی عمل متقابل ندارد و ویروسهای نوترکیب گیاهی به سلولهای پستانداران حمله نمی کنند.

اگرچه این دانش هنوز در مراحل اولیه پیشرفت می باشد ولی یافته های آزمایشگاهی و نتایج آن چشم انداز روشن و موفقی را برای واکسنهای خوراکی گیاهی در آینده رقم می زند.[۳۳]

۱-۲ - تعریف بیوتکنولوژی گیاهی:

فنونی که از موجودات زنده برای ساخت یا تغییر محصولات ، ارتقا کیفی گیاهان یا حیوانات و تغییر صفات میکروارگانیسمها برای کاربردهای ویژه استفاده می‌کند ، را زیست فناوری یا بیوتکنولوژی می گویند. زیست فناوری به لحاظ خصوصیات ذاتی خود دانشی بین رشته‌ای است ، در تعریف دیگر زیست فناوری یا بیوتکنولوژی به مفهوم استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک و کشت بافت در تولید گونه های جدید میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات است. در این روش، ژنهای خاصی از یک موجود زنده به دیگری انتقال می‌یابد و بدین ترتیب صفات خاصی در یک گونه جدید ظاهر می‌شود که نتیجه آن ایجاد یک موجود با خصوصیات ویژه یا ایجاد صفات برتر در همان موجود خاص است.

۱-۲-۱- سابقه پیدایش:

سابقه استفاده از میکروارگانیسمها برای تولید مواد خوراکی نظیر سرکه ، ماست و پنیر به بیش از ۸ هزار سال قبل برمی‌گردد. کاربردهای سنتی زیست فناوری شامل اصلاح نباتات و دام، تهیه نان، ماست و پنیر بوده است و پس از آن تولید پادزیست‌ها (آنتی بیوتیک ها)، انسولین انسانی و اینترفرون علوم آزمایشگاهی و امروزه مهندسی ژنتیک می باشد، در حال حاضر با توجه به افزایش بی رویه جمعیت و نیاز به تأمین مواد غذایی این جمعیت رو به تزاید، زیست‌فناوری کشاورزی مورد توجه خاص می‌باشد و محصولات تراریخته گوناگون پرمحصول و مقاوم کشاورزی مانند ذرت، برنج، سویا، گوجه فرنگی، گندم تولید و استفاده از تکنیک‌های نوین زیست‌فناوری در افزایش تولید شیر و گوشت دام موثر واقع شده اند.تامین سلامت از طریق تولید داروهای نوترکیب و واکسن ها، دستیابی به روش‌های درمان کم هزینه بیماری‌ها و یافتن درمان بیماری‌های لاعلاج و تشخیص سریع تر و مؤثرتر بیماری‌های گوناگون از جمله بیماری‌های ژنتیکی از وظایف زیست فناوری پزشکی است. حذف مؤثر آلاینده‌های محیطی خطرناک از محیط زیست با استفاده از میکروارگانیسم‌های پالایشگر آلودگی و استفاده از تکنیک‌های حفظ، نگهداری و حراست از ذخایر ژنتیکی کشور از جمله کاربردهای زیست‌فناوری در زمینه محیط زیست است. زیست‌فناوری همچنین تولید محصولاتی که