دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

موضوع:

ساخت سازه های پلاسمیدی مناسب جهت بیان اختصاصی بافت و بررسی بیان موقت ژن با استفاده از سیستم اگروایانفیلتریشن

استادان راهنما:

دکتر سید کمال کاظمی تبار

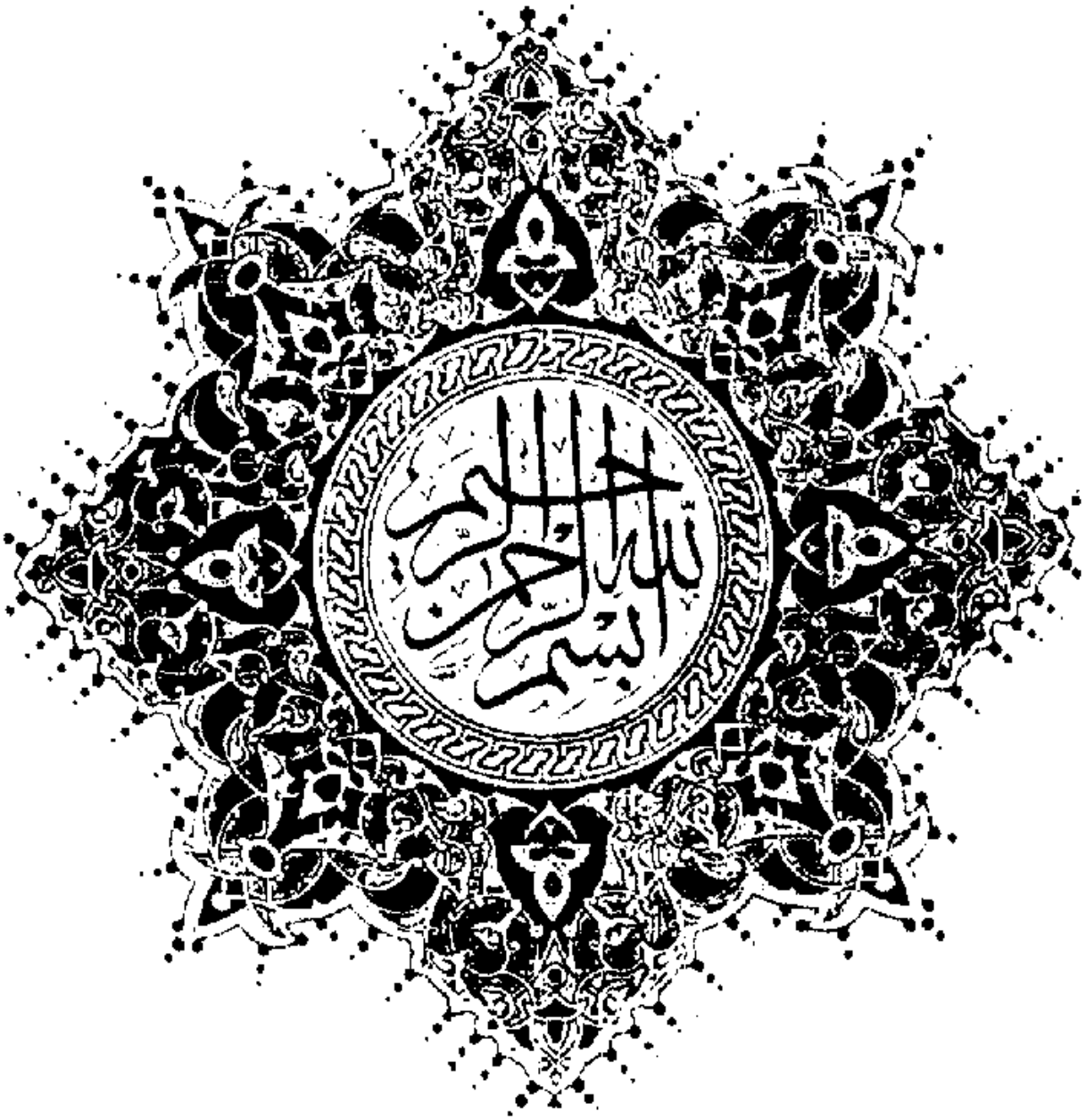
دکتر حسن رهنما

نگارش:

ناهید احمدی

بهمن ۱۳۹۰

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی


بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

بیماران عفونی

سپاسگزاری

پس از گذشت سالیان دراز، از نخستین روزهایی که قدم در عرصه فراخ تحصیل نهاده‌ام، امروز با خضوع و افتادگی تمام نظاره‌گر ستارگان پر فروغی هستم که در آسمان زندگیم نور افشانی می‌کنند. این ستارگان اساتیدی هستند که هریک در مقطعی روشنگر راهم بودند. بدین وسیله از زحمات و راهنمایی‌های ارزنده استادان فرزانه **جناب آقای دکتر سید کمال کاظمی تبار** و **جناب آقای دکتر حسن رهنما** تقدیر و تشکر نموده، بهترین‌ها را برایشان آرزومندم و همواره تلاش و عشق ایشان به علم و پژوهش را سرمشق خود قرار خواهم داد و به حق به من آموختند که: زنده بودن را به بیداری بگذرانم که سال‌ها به اجبار خواهم خفت. هم چنین خود را قدردان و سپاسگزار استادان گرامی، جناب آقای دکتر حبشی و جناب آقای دکتر توحیدفر می‌دانم و از استادان محترم گروه بیوتکنولوژی بخاطر راهنمایی‌های علمی در طی دوران تحصیل تشکر نموده و نیز از داوران محترم پایان نامه **جناب آقای دکتر رنجبر** و **جناب آقای دکتر باقری** که بنده را راهنمایی نمودند کمال تشکر را دارم و لازم می‌دانم از آقایان نوذری و اکبری سپاسگزاری کنم. و از دوست عزیزم **خانم دکتر محسن پور** که همواره از نظرهای ایشان استفاده می‌کردم سپاسگزارم. از همراهی دوستان عزیزم **خانم‌ها**، دیوسالار، دشتی، مدیرروستا، احمدراجی، افتخاری، عظیمی، حسینی، زهرابی و **آقایان** نجفی، رضایی، مرسلی، مخدومی، کریمی، خسروی، فتحی، رستمی و سهیلی‌وند کمال تشکر را دارم. و برای **خانواده عزیزم** به ویژه **پدر مهربانم**، **مادر** و **برادرانم** که همواره مشوق من بودند آرزوی سعادت و موفقیت دارم. از خانواده محترم همسرم که همواره با تشویق‌ها و دلداری‌هایشان پیمودن این راه را برای من آسان نمودند، تقدیر و تشکر می‌کنم. از **همسر عزیز و مهربانم**، **آقای مهندس حسین حاتم** که در تمامی دوران تحصیل با من همراه بوده و در مراحل انجام پایان نامه از کمک‌ها و تشویق‌های ایشان بهره‌مند شدم تقدیر و تشکر می‌نمایم.

ناهید احمدی

بهمن ۱۳۹۰

ساخت سازه‌های پلاسمیدی مناسب جهت بیان اختصاصی بافت و بررسی بیان موقت ژن با استفاده از سیستم اگروباکتریوم

ناهید احمدی[۱]، سید کمال کاظمی تبار[۲]، حسن رهنما[۳]

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی مهندسی ژنتیک برای بیان هدفمند ژن‌ها محسوب می‌شوند. پیشبرهای E8 و 2A11 پیشبرهای ویژه بافت میوه گیاه گوجه‌فرنگی می‌باشند. E8 یک ژن مرتبط با بیوسنتز اتیلن است. پروتیین E8 عضوی از خانواده دی‌اکسیژنازها و مربوط به ۱-آمینو سیکلوپروپان۱-کربوکسیلیک اکسیداز است که مرحله آخر مسیر بیوسنتز اتیلن را کاتالیز می‌کند. ژن 2A11 نیز در میوه بیان می‌شود. mRNA، 2A11 ابتدا در تخمدان و در مرحله شکفتگی کامل گل کشف شد که تا ۱ درصد از کل جمعیت mRNA تجمع یافته در طی رسیدگی میوه را تشکیل می‌دهند. به منظور بیان اختصاصی ژن در غده‌های سیب‌زمینی عمومی‌ترین پیشبر مورد استفاده پیشبر Patatin است. پاتاتین‌ها گروهی از گلیکوپروتیین‌ها هستند که به وسیله یک خانواده چند ژنی رمزسازی می‌شوند. این پروتیین‌ها بیش از ۴۰ درصد پروتیین‌های محلول در غده سیب‌زمینی را به خود اختصاص می‌دهند. پیشبر کلاس I بطور عمده مسئول بیان پاتاتین‌های غده بوده و بنابراین الگوی بیان اختصاصی برای غده را داشته و در بخش بافت پارانشیمی غده به مقدار زیاد وجود دارند. هدف از این تحقیق همسانه‌سازی پیشبرهای اختصاصی میوه (E8 و 2A11) و پیشبر اختصاصی غده (پاتاتین کلاس I یا Pat1)، و بررسی بیان اختصاصی آن می‌باشد. پس از استخراج DNAی ژنومی از گیاهان گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی پیشبرهای E8، 2A11 و Pat1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر یک از پیشبرها، در ناقل همسانه‌ساز PTZ57R/T همسانه‌سازی شدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب در باکتری *E. coli* سویه XL1blue تراریخت گردیدند و سلول‌های *LacZ´* غربال شدند. قطعه‌های مورد نظر با دو آنزیم برشی *Hin*dIII و *Bam*HI جدا و خالص‌سازی شدند سپس جایگزین پیشبر دایمی CaMV 35S در ناقل دوگانه pBI121 گردیدند. ناقل دوگانه pBI121 با دارا بودن ناحیه T-DNA، حاوی ژن گزارش‌گر گاس و پیشبر CaMV 35S واجد مشخصات لازم جهت استفاده برای انتقال ژن از طریق اگروباکتریوم به گیاه بود و به همین دلیل به عنوان ناقل هدف جهت کلون‌سازی پیشبرهای E8 2A11 و Pat1 و ژن *HBsAg* انتخاب شد. پلاسمیدهای نوترکیب به روش شوک حرارتی به سویه LBA 4404 *Agrobacterium tumefaciens* منتقل گردیدند. با استفاده از روش اگروباکتریوم بیان اختصاصی ژن گاس در بافت‌های گیاهان گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در مقایسه با پیشبر CaMV 35S، پیشبرهای E8، 2A11 و Pat1 نیز با کارایی بالایی باعث بیان ژن گاس در میوه‌ها و غده‌ها می‌شوند. پس از تایید پلاسمیدهای نوترکیب، ژن *HBsAg* با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I از ناقل pMA-T جدا شد و تحت کنترل پیشبر عمومی CaMV 35S و پیشبرهای E8، 2A11 و Pat1 جایگزین ژن گاس در ناقل دوگانه pBI121 گردید. سپس پلاسمیدهای نوترکیب در سویه XL1blue باکتری *E. coli* تراریخت شدند. با هضم آنزیمی حضور ژن *HBsAg* تایید شد.

کلمات کلیدی: پیشبر E8، پیشبر 2A11، پیشبر Pat1، ژن *HBsAg*، بیان موقت، اگروباکتریوم، همسانه‌سازی.

[۱] Nadia.ahmadi50@Gmail.com
[۲] دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۳] پژوهشگر-عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

فهرست مطالب صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱- مقدمه ۱

۱-۱- اهداف پژوهش ۳

۱-۲- کلیات ۴

۱-۲-۱- مزایای سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان ۵

۱-۲-۲- گیاهان به عنوان بیوراکتور ۷

۱-۲-۳- انتخاب گیاه ۸

۱-۳- مبانی همسانه‌سازی DNA ۹

۱-۳-۱- ناقل‌های همسانه‌سازی ۹

۱-۴- مشخصات کلی ناقل‌های همسانه‌سازی DNA ۱۰

۱-۴-۱- شیوه همانندسازی ۱۰

۱-۴-۲- نشانگرهای انتخابی ۱۰

۱-۴-۳- نشانگرهای ژنتیکی ۱۱

۱-۴-۴- جایگاه همسانه‌سازی متعدد ۱۱

۱-۴-۵- جایگاه‌های پیشبر ۱۲

۱-۵- مراحل اصلی در همسانه‌سازی ژن ۱۲

۱-۶- ابزار و روش‌های مورد نیاز برای همسانه‌سازی ژن ۱۳

۱-۶-۱- وسایل انتقال ۱۳

۱-۶-۲- روش‌های بکار بردن DNA ۱۳

۱-۶-۳- تنوع ناقلین برای همسانه‌سازی ۱۴

۱-۷- هپاتیت B ۱۴

۱-۷-۱- اجزا تشکیل دهنده HBV ۱۶

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- بهینه‌سازی سطح بیان ۱۷

۲-۱-۱- پیشبرهای ساختاری ۱۷

۲-۱-۲- پیشبرهای ویژه بافتی ۱۹

۲-۱-۳- پیشبرهای القاپذیر ۲۱

۲-۱-۴- پیشبرهای مصنوعی ۲۲
۲-۲- گیاه گوجه‌فرنگی ۲۳
۲-۲-۱- پیشبرهای ویژه میوه گوجه‌فرنگی ۲۳
۲-۳- گیاه سیب‌زمینی ۲۷
۲-۳-۱- پیشبر ویژه غده سیب‌زمینی ۳۰
۲-۴- تولید پروتیین‌های آنتی‌ژن در گیاه ۳۲
۲-۵- سیستم‌های بیانی ۳۸
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- سویه‌های باکتری ۴۳
۳-۲- پلاسمیدهای مورد استفاده ۴۳
۳-۳- استخراج DNAی ژنومی ۴۳
۳-۳-۱- استخراج DNAی ژنومی به روش دلاپورتا (تغییر یافته) ۴۳
۳-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۵
۳-۵- قطعه‌های PCR با انتهای صاف ۴۷
۳-۶- خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل آگاروز ۴۷
۳-۷- واکنش اتصال ۴۸
۳-۸- همسانه‌سازی ۴۹
۳-۸-۱- تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۴۹
۳-۸-۱-۱- روش تهیه سلول‌های مستعد ۵۰
۳-۸-۲- تهیه محلول‌های IPTG و X-gal ۵۱
۳-۹- هضم آنزیمی DNAی پلاسمیدی با آنزیم‌های محدود کننده داخلی نوع II ۵۱
۳-۱۰- محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها ۵۲
۳-۱۰-۱- ذخیره‌سازی و نگه‌داری باکتری‌ها ۵۲
۳-۱۰-۲- اندازه‌گیری OD (دانسیته نوری) باکتری ۵۳
۳-۱۱- استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی از *E.coli* ۵۳
۳-۱۲- تراریختی اگروباکتریوم به روش ذوب–انجماد ۵۳
۳-۱۳- بیان موقت پیشبرها ۵۴

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- استخراج DNAی ژنومی از گیاه ۵۶

۴-۱-۱- خالص‌سازی DNAی ژنومی استخراج شده ۵۷

۴-۲- انجام واکنش PCR ۵۸

۴-۳- خالص‌سازی قطعه‌های حاصل از PCR از روی ژل آگاروز ۶۲

۴-۴- همسانه‌سازی پیشبرها در ناقل همسانه‌ساز pTZ57R/T ۶۳

۴-۵- ساخت پلاسمیدهای نوترکیب pBI-*E8Gus*، pBI-*2A11Gus* و pBI-*Pat1Gus* ۷۴

۴-۶- انتقال ناقل pBI121 نوترکیب و غیرنوترکیب به درون اگروباکتریوم ۸۱

۴-۷- اگروواینفیلتریشن برای بررسی بیان موقت ژن بتا-گلوکورونیداز (گاس) ۸۶

۴-۸- ساخت پلاسمیدهای نوترکیب pBI-*E8HBT*، pBI-*2A11HBT*، pBI-*Pat1HBP*، pBI-*35SHBP* و pBI-*35SHBT* ۹۰

۴-۹- بحث و نتیجه‌گیری کلی ۱۰۱

۴-۱۰- پیشنهادات ۱۰۵

منابع ۱۰۶

فهرست شکل‌ها	صفحه

شکل ۴-۱: الکتروفورز DNAی ژنومی گیاه گوجه‌فرنگی	۵۶
شکل ۴-۲: الکتروفورز DNAی ژنومی گیاه سیب‌زمینی	۵۶
شکل ۴-۳: الکتروفورز DNAی ژنومی خالص‌شده گوجه‌فرنگی	۵۷
شکل ۴-۴: الکتروفورز DNAی ژنومی خالص‌شده سیب‌زمینی	۵۷
شکل ۴-۵: محصول PCR، DNAی گوجه‌فرنگی با پرایمر E8	۵۹
شکل ۴-۶: محصول PCR، DNAی گوجه‌فرنگی با پرایمر 2A11	۶۰
شکل ۴-۷: محصول PCR، DNAی سیب‌زمینی با پرایمر Pat1	۶۱
شکل ۴-۸: الکتروفورز قطعه پیشبر 2A11 بازیافت شده	۶۲
شکل ۴-۹: الکتروفورز قطعه پیشبر Pat1 بازیافت شده	۶۲
شکل ۴-۱۰: نقشه پلاسمید pTZ57R/T	۶۳
شکل ۴-۱۱: اتصال قطعه مورد نظر درون ناقل pTZ57R/T	۶۴
شکل ۴-۱۲: غربالگری بر اساس کلنی‌های سفید و آبی . . .	۶۵
شکل ۴-۱۳: PCR پلاسمیدهای استخراج شده . . . پیشبر E8 و مشاهده باند ۱۱۰۰ bp	۶۶
شکل ۴-۱۴: هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده . . . پیشبر E8 . . . مشاهده باند ۱۱۰۰ bp	۶۷
شکل ۴-۱۵: هضم آنزیمی و PCR پلاسمیدهای استخراج شده . . . پیشبر 2A11 و مشاهده باند ۱۳۰۰ bp	۶۸
شکل ۴-۱۶: PCR پلاسمیدهای استخراج شده . . . پیشبر pat1 و مشاهده باند ۹۷۰ bp	۶۹
شکل ۴-۱۷: هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده . . . پیشبر pat1 . . .مشاهده باند ۹۷۰ bp	۷۰
شکل ۴-۱۸: Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده E8	۷۱
شکل ۴-۱۹: Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده 2A11	۷۲
شکل ۴-۲۰: Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده Pat1	۷۳
شکل ۴-۲۱: نقشه پلاسمیدی pBI121	۷۴
شکل ۴-۲۲: نقشه پلاسمیدی pBI121 و پیشبر CaMV 35S	۷۵
شکل ۴-۲۳: pBI-35S*Gus*	۷۶
شکل ۴-۲۴: هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده . . . ۸۰۰ bp	۷۷
شکل ۴-۲۵: هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده . . . به منظور بررسی ورود پیشبر	۷۸
شکل ۴-۲۶: سازه نوترکیب pBI-*E8Gus*	۷۹
شکل ۴-۲۷: سازه نوترکیب pBI-*2A11Gus*	۷۹

شکل ۴-۲۸: هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده . . . مشاهده باند ۹۷۰ bp	۸۰
شکل ۴-۲۹: سازه نوترکیب pBI-*Pat1Gus*	۸۰
شکل ۴-۳۰: پتریدیش حاوی کلنی‌های اگروباکتریوم	۸۱
شکل ۴-۳۱: الکتروفورز محصول واکنش PCR . . . pBI-*E8Gus*	۸۲
شکل ۴-۳۲: الکتروفورز محصول واکنش PCR . . . pBI-*2A11Gus*	۸۳
شکل ۴-۳۳: الکتروفورز محصول واکنش PCR . . . pBI-*Pat1Gus*	۸۴
شکل ۴-۳۴: الکتروفورز محصول واکنش PCR . . . pBI-35S*Gus*	۸۵
شکل ۴-۳۵: بیان موقت . . . pBI-*E8Gus* و pBI-*35SGus* . . . گوجه‌فرنگی	۸۷
شکل ۴-۳۶: بیان موقت . . . pBI-*2A11Gus* و pBI-*35SGus* . . . گوجه‌فرنگی	۸۸
شکل ۴-۳۷: بیان موقت . . . pBI-*Pat1Gus* و pBI-*35SGus* . . . سیب‌زمینی	۸۹
شکل ۴-۳۸: الکتروفورز . . . *HBsAg* گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی	۹۱
شکل ۴-۳۹: هضم آنزیمی . . . *HBsAg* گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی	۹۲
شکل ۴-۴۰: نقشه پلاسمیدی pBI-*35SGus* و ژن گاس	۹۳
شکل ۴-۴۱: هضم آنزیمی پلاسمیدهای . . . از سازه *pBI-E8HBT*	۹۵
شکل ۴-۴۲: هضم آنزیمی پلاسمیدهای . . . از سازه pBI-*2A11HBT*	۹۶
شکل ۴-۴۳: هضم آنزیمی پلاسمیدهای . . . از سازه pBI-*pat1HBP*	۹۷
شکل ۴-۴۴: هضم آنزیمی پلاسمیدهای . . . از سازه pBI-*35SHBT*	۹۸
شکل ۴-۴۵: هضم آنزیمی پلاسمیدهای . . . از سازه pBI-*35SHBP*	۹۹
شکل ۴-۴۶: طراحی سازه‌ها با Vector NTI	۱۰۰

فهرست جداول	صفحه
جدول ۲-۱- برخی آنتی‌ژن‌های تولید شده در گیاهان	۳۶
جدول ۳-۱- بافر استخراج	۴۵
جدول ۳-۲- محلول مادری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	۴۵
جدول ۳-۳- آغازگرهای اختصاصی پیشبرها	۴۶
جدول ۳-۴- چرخه حرارتی	۴۶
جدول ۳-۵- محلول مادری برای افزودن دنباله A	۴۷
جدول ۳-۶- محلول رنگ‌آمیزی برای بررسی تظاهر ژن گاس	۵۵

۱- مقدمه

یکی از مزایای گیاهان تراریخته در کشاورزی ملکولی، هزینه پایین در تولید انبوه پروتیین‌های نوترکیب می‌باشد. گیاهان به علت فتواتوتروف بودن، می‌توانند با استفاده از مواد معدنی، نور خورشید آب و با حداقل انرژی تولید بیوماس نمایند (بیملت و سان‌واد[۱]، ۲۰۰۴). در سیستم گیاهی برآورد شده است که بدون استفاده از فرمانتور و یا افراد متخصص می‌شود به تولید پروتیین‌های نوترکیب با ۲-۱۰ درصد هزینه سیستم‌های تخمیر میکروبی (فرمانتور میکروبی) و ۰/۱ درصد هزینه کشت سلول‌های حیوانی دست‌یافت. البته این امر به نوع محصول تولید شده هم بستگی دارد، مثلاً یک پیمانه ذرت در حدود ۲۰ درصد پروتیین کل محلول خود، آویدین نوترکیب تولید می‌کند که معادل آویدینی است که یک تن تخم‌مرغ (منبع اصلی آویدین) تولید می‌نماید. با این وجود، هزینه تولید آن ۰/۵ درصد روش اخیر است. البته بسیاری از پروتیین‌ها در این سطح تولید نمی‌شوند، اما عملکرد ۰/۱ تا ۱۰ درصد کل پروتیین محلول، یعنی مقداری که معمولاً در تولید پروتیین‌های دارویی (از جمله آنتی‌بادی‌های نوترکیب) مشاهده می‌شود، آنقدر اقتصادی هستند که قابل رقابت با سایر سیستم‌های تولید باشند (تویمن[۲] و همکاران، ۲۰۰۳). از طرف دیگر، پروتیین‌های تولید شده توسط گیاهان به دلایل زیر ایمنی بالایی دارند: فاقد عوامل بیماری‌زای انسانی مانند ویروس‌ها (هپاتیت و ایدز)، عوامل سرطان‌زا و سایر عوامل بیماری‌زا (پاتوژن‌ها و اندوتوکسین‌ها) می‌باشند، همان‌گونه که در سیستم‌های پستانداران و باکتری‌ها رخ می‌دهد، هم‌چنین فاقد سموم مختلف هستند. از مشکلات اخلاقی که در ارتباط با حیوانات و مواد حیوانی تراریخته وجود دارد نیز، اجتناب می‌شود.

هپاتیت B یکی از بیماری‌های ویروسی خطرناک در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. برآورد شده است که حدود ۳۵۰ میلیون ناقل مزمن هپاتیت B در دنیا وجود داشته و سالانه هم حدود ۲۰ میلیون نفر به آن اضافه می‌شود (جوشی و کومار[۳]، ۲۰۰۱). با استفاده از روش‌های پیشگیری مانند

[۱] Biemelt and Sonnewald
[۲] Twyman
[۳] Joshi and kumar

واکسن، می‌توان از گسترش این بیماری جلوگیری نمود. واکسن‌های نوترکیب مشتق از مخمر، گران بوده و استفاده از آن در برنامه‌های ایمن‌سازی انبوه کشورهای در حال توسعه را با مشکل مواجه می‌سازد (کومار و همکاران، ۲۰۰۳). تولید واکسن هپاتیت B در گیاهان و در میوه‌های خوراکی می‌تواند از نظر اقتصادی یک جایگزین مناسب باشد (هو[۱]، ۲۰۰۸).

پیشبر عمومی ویروس موزاییک گل‌کلم (CaMV35S) پیشبری قدرتمند جهت بیان ژن‌ها در سلول‌های گیاهی است. این پیشبر هیچ نوع ویژگی خاصی در بیان ژن (بیان زمانی یا مکانی ژن) ندارد بنابراین میزان بیان ژن در زمان یا مکان خاص پایین است. در مورد تولید واکسن در گیاهان تراریخته بیان پایین ژن منجر به کاهش ایمنی‌زایی واکسن شده و در نتیجه منجر به ناکارایی سیستم حفاظتی یا تحمل ایمونولوژیکی بدن انسان می‌شود.

[۱] WHO (World Health Organization)

۱-۱- اهداف پژوهش:

۱. ساخت کاست ژنی با پیشبر E8 و ژن *HBsAg* در ناقل دوگانه pBI121 و ایجاد پلاسمید نوترکیب pBI-*E8HBT*.

۲. ساخت کاست ژنی با پیشبر 2A11 و ژن *HBsAg* در ناقل دوگانه pBI121 و ایجاد پلاسمید نوترکیب pBI-*2A11HBT*.

۳. ساخت کاست ژنی با پیشبر Pat1 و ژن *HBsAg* در ناقل دوگانه pBI121 و ایجاد پلاسمید نوترکیب pBI-*Pat1HBP*.

۴. ساخت کاست ژنی با پیشبر CaMV35S و ژن *HBsAg* در ناقل دوگانه pBI121 و ایجاد پلاسمید نوترکیب pBI-*35SHBP* و pBI-*35SHBT*.

۵. بررسی بیان موقت هر یک از پلاسمیدهای نوترکیب pBI-*E8Gus*، pBI-*2A11Gus* pBI-*Pat1Gus* و pBI-*35SGus*، با روش اگروواینفیلتریشن.

۱-۲- کلیات

با توجه به افزایش تقاضای تولید فرآورده‌های دارویی با هزینه پایین، تولید کنندگان همواره به دنبال فناوری‌های جدید برای این اهداف بوده‌اند. موجودات مختلفی به عنوان میزبان مناسب برای تولید پروتیین‌های دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما در صنایع بیشتر روی میکروب‌ها (باکتری‌ها و مخمرها)، سلول‌های پستانداران (بیشتر سلول‌های جانوری) و تا حدی هم سلول‌های حشرات و حیوانات تراریخته متمرکز شده است. تمامی این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند مانند: عدم توانایی در تولید پروتیین‌های کمپلکس و پیچیده، هزینه بالای تاسیس و راه‌اندازی، یا زمان طولانی برای رسیدن به مرحله تولید. اصرار در استفاده از این روش‌ها، هزینه بالایی برای صنایع داشته است (ما[۱] و همکاران، ۲۰۰۵ آ، ب). اخیراً کشاورزی ملکولی به عنوان یک جایگزین برای پاسخ به تقاضای حال و آینده پروتیین‌های دارویی نوترکیب مطرح شده است. کشاورزی ملکولی به معنی تولید پروتیین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته، در مقیاس کشاورزی می‌باشد. این فناوری جدید با ادغام کشاورزی و پزشکی ملکولی توانسته است، ضمن ایجاد منبع درآمد جدید برای کشاورزان، با ارایه یک منبع اقتصادی‌تر برای تولید دارو عمل نموده و چالش‌های مالی مربوط به بهداشت را کاهش دهد.

در طی ۲۰ سال گذشته سیستم‌های مبتنی بر گیاهان متعددی ارایه شده‌اند که از آن جمله می‌توان به سیستم‌های مبتنی بر سلول‌ها یا بافت‌های گیاهی کشت شده در ظروف خاص (هل‌ویگ[۲] و همکاران، ۲۰۰۴) و سیستم‌های مبتنی بر گیاهانی که با ویروس‌های نوترکیب آلوده شده‌اند (یوسیبو[۳] و همکاران، ۲۰۰۶) اشاره نمود. اما کشت گیاهان تراریخته از نظر حجم تولید و در نتیجه صرفه اقتصادی برای تولید پروتیین‌ها و ترکیبات دارویی نوترکیب بسیار ارزشمندتر هستند (رامسار[۴] و همکاران، ۲۰۰۸).

[۱] Ma
[۲] Hellwig
[۳] Yusibov
[۴] Ramessar

گیاهان همانند میکروب‌ها از نظر کشت و پرورش ارزان هستند. با این وجود، مانند سلول‌های پستانداران می‌توانند کمپلکس‌های پروتیینی را سرهم بندی نموده و هم‌چنین قادرند بیشتر تغییرات پس از ترجمه‌ای لازم برای تولید یک پروتیین فعال در انسان را انجام دهند. بیشتر از هر سیستم دیگری، گیاهان زراعی تراریخته اصل اقتصادی بودن تولید را دارا هستند، چون می‌توانند با حداقل نیازها (نور خورشید، خاک، آب و کودهای ارزان) و با افزایش سطح زیر کشت، پروتیین‌های دارویی را در مقیاس چند تن تولید نمایند. کشاورزی ملکولی در گیاهان به علت خطر پایین آلودگی با عوامل بیماری‌زای انسان و دام، نسبت به سایر روش‌ها ایمن‌تر هستند (فیشر و شیلبرگ[۱]، ۲۰۰۴). بنابراین کارایی گیاهان تراریخته، به عنوان یک سیستم بیانی مستعد برای انواع پروتیین‌های دارویی از جمله واکسن‌ها، آنتی‌بادی‌ها، هورمون‌ها، پروتیین‌های تشخیصی، فرآورده‌های خونی، آنزیم‌ها، پلیمرهای پروتیینی و پروتیین‌های ساختاری، آنزیم‌های صنعتی و مواد مغذی به اثبات رسیده است (تویمن و همکاران، ۲۰۰۷; استریتفیلد[۲]، ۲۰۰۷; استوگر[۳] و همکاران، ۲۰۰۵; فیشر و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۲-۱- مزایای سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان

پروتیین‌ها با اهداف مختلفی در پزشکی، صنایع و تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما استخراج آن‌ها از منابع طبیعی اغلب مشکل و پرهزینه است. پیش‌بینی می‌شود که در چند سال آینده تقاضا برای ترکیبات دارویی زیستی به سرعت افزایش یابد. روش معمول در تولید پروتیین‌های دارویی در مقیاس صنعتی مبتنی بر روش‌های فرمانتاسیون میکروبی یا سیستم‌های کشت سلول‌های جانوری است. اما در طی دهه گذشته، گیاهان به عنوان یک سیستم بیانی جایگزین، برای تولید پروتیین‌های نوترکیب معرفی شده‌اند. در مقایسه با سایر سیستم‌های تولید، گیاهان دارای مزایای فراوانی از نظر اقتصادی، کمی، ایمنی و ... هستند (بیملت و سان‌واد، ۲۰۰۴).

[۱] Fischer and Schillberg
[۲] Streatfield
[۳] Stoger

برای به حداکثر رساندن میزان بیان پروتیین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته عوامل مختلفی دخالت دارند که از آن جمله می‌توان به کدون یوزیج، بیان پایدار و کارای ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این‌حال، روش، زمان و محل بیان ژن به وسیله مجموعه‌ای از مکانیسم‌های کنترلی تنظیم می‌شود. پیشبرها به عنوان یکی از عوامل تنظیمی اصلی نقش مهمی در بیان ژن دارند. انتخاب پیشبر اهمیت زیادی در انتقال ژن و بیان تراژن در گیاهان دارد (دال[۱] و همکاران، ۲۰۰۲). تنظیم در مراحل مختلف بیان ژن انجام می‌شود، بخصوص در طول رونویسی اهمیت بیشتری می‌یابد و پیشبرها این کنترل را تضمین می‌کنند. پیشبرها در ناحیه بالادست DNA واقع هستند و با توالی ویژه که به وسیله پروتیین‌هایی که در شروع رونویسی درگیر هستند، شناسایی می‌شوند (بوچانان[۲] و همکاران، ۲۰۰۰). دسترسی به تعداد زیادی از پیشبرها و توانایی آن‌ها برای تنظیم زمانی و مکانی بیان تراژن بطور چشم‌گیری موفقیت تکنولوژی تراریختی را افزایش می‌دهد. در طی سال‌ها پیشبرهای متعددی از موجودات مختلف جدا و در مهندسی ژنتیک گیاهی بکار رفته است. از آن‌جا که پیشبرها هم از نظر کیفی و هم کمی رونویسی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، موفقیت تکنولوژی انتقال ژن در تحقیقات پایه‌ای اصلاح محصولات کشاورزی، بستگی به انتخاب درست و موثر پیشبر دارد. در بیان تراژن باید پیشبر مناسب در گیاه و نوع تراژن تطابق داشته باشد (پوتنزا[۳] و همکاران، ۲۰۰۳).

یکی از مزایای اصلی هدفمندسازی بیان پروتیین، در میوه گیاهان این است، که بخش‌های خوراکی گیاه را می‌توان بدون پختن یا فرآوری مصرف کرد. این موضوع چنین بافت‌هایی را برای تولید واکسن مناسب می‌سازد. در گوجه‌فرنگی پیشبرهای مختلفی مانند E4، E8، PG و 2A11 که اختصاصی میوه هستند، شناسایی شده است. این پیشبرها اغلب برای بررسی نقش اتیلن در رسیدگی میوه‌ها، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پیشبر E8 یکی از شناخته شده‌ترین پیشبر اختصاصی گیاه گوجه‌فرنگی است. در تحقیقات متعددی از این پیشبر برای بیان اختصاصی ژن در میوه‌های

[۱] Dale
[۲] Buchanan
[۳] Potenza

گوجه‌فرنگی استفاده شده است (هی[۱] و همکاران، ۲۰۰۸; یاکوبی[۲] و همکاران، ۲۰۰۶; مهتا[۳] و همکاران، ۲۰۰۲; کراسنیانسکی[۴] و همکاران، ۲۰۰۱; سان‌هو[۵] و همکاران، ۲۰۰۰). پیشبر 2A11 هم توسط برخی محققان جهت بیان هدفمند ژن در میوه گوجه‌فرنگی استفاده شده است (وان‌هارن[۶] و همکاران، ۱۹۹۱). به منظور بیان اختصاصی ژن در غده‌های سیب‌زمینی، عمومی‌ترین پیشبر مورد استفاده پیشبر Patatin است، که توسط پژوهش‌گران مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (میگنری[۷] و همکاران، ۱۹۸۸; تول و اومس[۸]، ۱۹۸۸).

۱-۲-۲- گیاهان به عنوان بیوراکتور

گیاهان منبع با ارزش برای درمان و معالجه هستند. هزاران گونه گیاهی به عنوان دارو مصرف می‌شوند، و اکثر انسان‌ها در سراسر جهان از گیاهان برای درمان بیماری‌های حاد و مزمن استفاده می‌کنند. بعد از اهلی کردن گیاهان وحشی، پیشرفت‌های زیست‌فناوری گیاهی برای اصلاح مستقیم و تغییر ترکیبات ویژه مانند: کربوهیدرات‌ها، پروتیین‌ها، روغن‌ها، چربی‌ها و ویتامین‌ها مدت‌ها است که مورد هدف قرار گرفته‌اند. اما استفاده از گیاهان تراریخته به عنوان "بیوراکتورها" علم زیستی جدید و قدرتمند می‌باشد. پیشرفت‌های مهمی در حوزه بیوراکتورهای گیاهی حاصل شده است که تغییر ژنتیکی گیاه میزبان، از طریق جایگزینی و بیان ژن جدید می‌باشد. محصولاتی که در حال حاضر در گیاهان تولید می‌شوند شامل: پپتیدهای فعال زیستی، آنتی‌ژن‌های واکسنی، آنتی‌بادی‌ها، پروتیین‌های تشخیصی، مکمل‌های غذایی، آنزیم‌ها و پلاستیک‌های زیست تخریب پذیر می‌باشند. علت رشد این صنعت از نظر اقتصادی، توانایی سنتز پروتیین حیوانی، هزینه، ایمنی (عدم وجود آلودگی پاتوژنی) و

[۱] He
[۲] Yakoby
[۳] Mehta
[۴] Krasnyanski
[۵] Sandhu
[۶] VanHaaren
[۷] Mignery
[۸] Twell and Ooms

افزایش تولید می‌باشد (ریبیکی[۱]، ۲۰۰۹; لل[۲] و همکاران، ۲۰۰۷; اسپوک[۳]، ۲۰۰۷; فیشر و همکاران ۲۰۰۴; شارما[۴] و همکاران، ۲۰۰۴; تویمن و همکاران، ۲۰۰۳; استوگر و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۲-۳- انتخاب گیاه

موفقیت در توسعه آنتی‌ژن‌های واکسن، علیه پاتوژن‌های انسانی و حیوانی نیاز به انتخاب یک یا چند آنتی‌ژن حفاظتی، پیشبرها و طراحی ژن دارد که سطح بالایی از آنتی‌ژن را در بافت گیاه بیان کند. گیاه مناسب برای تولید واکسن خوراکی باید ویژگی‌های زیر را داشته باشد:

۱) با تراریختی سازگار باشد.

۲) در بافت‌های خوراکی که به صورت خام مصرف می‌شوند، بیان شوند (بخصوص واکسن‌هایی که به حرارت حساس هستند).

۳) بافت هدف غنی از پروتیین باشد زیرا پروتیین واکسن درصد کمی از کل پروتیین را به خود اختصاص می‌دهد.

۴) بافت‌های هدف نباید مواد سمی تولید کنند.

۵) پروتیین آنتی‌ژن، با تاخوردگی درست و تغییرات پس از ترجمه مطلوب تولید شوند.

مطالعاتی در مورد توتون (*Nicotiana tabacum*) به عنوان گیاه مدل، برای تولید آنتی‌ژن انجام شده است که نشان می‌دهد، فاقد بعضی از ویژگی‌های فوق می‌باشد. اما در حال حاضر گیاهانی با ارزش غذایی بالا، به عنوان سیستم بیانی استفاده می‌شوند، بعضی از آن‌ها را می‌توان به صورت خام مصرف کرد که نیاز به پردازش و تخلیص را حذف می‌کند. بیان آنتی‌ژن‌های واکسن در گیاهانی مثل سیب، موز، گوجه‌فرنگی، آووکادو، بادام‌زمینی، ذرت، سویا و نخود (دانه) گزارش شده است (فلاس[۵] و همکاران، ۲۰۰۷; کومار و همکاران، ۲۰۰۷; استوگر و همکاران، ۲۰۰۵).

---

[۱] Rybicki
[۲] Lal
[۳] Spok
[۴] Sharma
[۵] Floss

۱-۳- مبانی همسانه‌سازی DNA

برای مطالعه یک ژن یا یک ژنوم و تعیین خصوصیات ملکولی فرآورده‌های به دست آمده، تعیین توالی DNA (چه قسمت کوچکی از یک ژن و یا توالی کامل یک ژن یا ژنوم)، تکثیر یک ژن و یا قطعه‌ای از DNA به منظور انتقال به یک ژنوم جدید و ایجاد گیاهان یا موجودات تراریخته و اهداف متعدد دیگر، لازم است که DNAی مورد نظر ابتدا تکثیر گردد. در بعضی شرایط محدود، PCR امکاناتی را فراهم می‌آورد تا قطعه معلوم و محدود DNA به سهولت و سرعت تکثیر شود. ولی این روش همیشه راه حل مناسبی نیست. روش دیگر تکثیر DNA از طریق کلون کردن یا همسانه‌سازی است که مراحل متعدد و گاهی دشواری را ایجاب می‌نماید (محمدپور، ۱۳۸۱).

سال‌های ۱۹۷۱ تا ۱۹۷۳ را به عنوان یک دگرگونی در بیولوژی مدرن نام می‌برند. در این سال‌ها یک متدولوژی کاملاً جدید توسعه یافت و امکان داد تا آزمایش‌هایی که قبلاً عملی نبودند، با موفقیت طرح‌ریزی و انجام شوند. این روش‌ها تحت عنوان تکنولوژی نوترکیبی DNA یا مهندسی ژنتیک نامیده شده‌اند و فرآیند همسانه‌سازی ژن‌ها را در بر می‌گیرند (بران[۱]، ۱۹۹۵).

۱-۳-۱- ناقل‌های همسانه‌سازی

برای انتقال یک DNAی خارجی به داخل یک سلول میزبان در اکثر موارد نیاز به استفاده از یک ناقل وجود دارد. ناقل‌ها ملکول‌های DNA هستند که ژن را به سلول میزبان (میکروب، گیاه و جانور) انتقال می‌دهند و عناصر کلیدی برای کنترل نسخه‌برداری و بیان ژن را دارا می‌باشند. انتخاب ناقل مورد نظر بر اساس نوع سلول میزبان و هدف آزمایش صورت می‌گیرد. ناقلین مورد استفاده برای سلول‌های باکتریایی شامل پلاسمیدها، باکتریوفاژ λ، M13 و فاژمیدها می‌باشند.

[۱] Brown