



(ارزیابی سیستمیک وکتورهای ویروسی، مبتنی بر تداخلات ناقص RNA
ویروس TBSV بمنظور بیان پروتئین و القای خاموشی)

در

آزمایشات تولید پروتئین‌های نو ترکیب

نوشته:

گریستین نامر

ترجمه:

دکتر شادی حاج رسولی‌ها (عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد واحد رودهن)

احسان صیامی (دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی)

نغمه علیپور (کارشناس ارشد بیوتکنولوژی)

۷	پیش‌گفتار مترجمین
۹	مقدمه محقق
۱۱	بخش اول: معرفی
۱۳	کشاورزی مولکولی
۱۶	وکتورهای ویروسی در کشاورزی مولکولی
۱۹	خاموشی پس از رونویسی ژن (PTGS)
۲۲	القای خاموشی ژن بواسطه ویروس (VIGS)
۲۵	تاثیر توالی‌های DI در خاموشی ژن
۲۷	ویروس کوتولگی گوجه فرنگی TBSV
۲۹	رونویسی از TBSV
۳۰	ذرات مداخله‌کننده ناقص
۳۲	اهداف انجام آزمایشات و تالیف کتاب
۳۵	بخش دوم: مواد و روش‌های استفاده شده در آزمایشات
۶۵	بخش سوم: نتایج
۱۲۵	بخش چهارم: تفسیر نتایج آزمایشی
۱۳۷	منابع

امروزه آزمایشات متعددی در زمینه مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین‌های نو ترکیب در موجودات مختلف صورت می‌گیرد. هزینه‌های فراوان تولید تجاری و صنعتی پروتئین‌های انسانی دانشمندان را به سمت آزمایشات متعدد در تولید این پروتئین‌ها با هزینه‌هایی بسیار پایین‌تر سوق داده است. یکی از راه‌های کاهش هزینه‌ها سنتز این ترکیبات در موجودی ارگانیک و زنده است. پستانداران، باکتری‌ها، مخمر و گیاهان از میزبانانی هستند که قابلیت سنتز این مواد را در خود دارند. انتخاب میزبان مناسب نیز عاملی است که می‌تواند در افزایش راندمان تولید کمک بسزایی کند. با توجه به رشد سریع، مراحل تخلیص ساده، آلودگی کمتر و بازده فراوان گیاهان دانشمندان حساب ویژه‌ای بر روی این میزبانان باز کرده‌اند.

کتاب حاضر که ثمره تلاش و تحقیقات دانشمند آلمانی در راه رساله دکتری خود بود از خانم دکتر افقی اخذ و با تلاش فراوان دکتر حاج رسولی‌ها و خانم مهندس علی‌پور برگردان شد. بخش مربوط به مواد و روش‌های آزمایشگاهی بمنظور درک دانشجویان از مباحث مربوط به آزمایشگاه درج گردیده است. امید است که مطالب تئوریک و عملی این کتاب مورد استقبال دانشجویان و علاقه مندان به مباحث مولکولی قرار گیرد.

احسان صیامی

در این کتاب سیستم وکتور ویروسی مبتنی بر DI-RNA مورد مطالعه قرار گرفته که از ذره ویروسی TBSV-BS3-static مشتق شده است. این وکتور مهندسی شده جدید قابلیت سنتز پروتئین و القای خاموشی ژن را داشته و برای انجام این توانایی آزمایش شده است. در این آزمایش دو استراتژی مورد بررسی قرار گرفته شده است. استراتژی اول همانندسازی (تکثیر) DI-RNA توسط ریپلیکاز ترانسژنیک ویروس TBSV که بصورت ترانسژنیک بیان می شود و استراتژی بعدی همانندسازی (تکثیر) یا یک ویروس به اصطلاح کمکی است.

ریپلیکاز ویروسی که در گیاه *N.benthamiana* لاین TR4 یا ویروس کمکی که قادر به تکرار DI-RNA معرفی شده به سلول گیاه است بیان شد می تواند با آلاین نورتن بلات نشان داده شود. بمنظور ارزیابی سیستم وکتور برای بیان پروتئین های نو ترکیب، ژن های متفاوت در سازه ژنی DI قرار داده شدند. بدون در نظر گرفتن اینکه چگونه ریپلیکاز ساخته می شود، سنتز پروتئین در گیاهان فراوان نبود. از دلایل احتمالی عدم سنتز پروتئین می توان به فقدان جنبش سیستمیک DI-RNA در گیاهان TR4 ترانسژنیک و حذف ژن های وارد شده در هر دو سیستم اشاره کرد. در نتیجه هر دو استراتژی برای بیان پروتئین بصورت نامناسب در نظر گرفته شده بود. سیستم وکتور DI-RNA قادر به القای خاموشی¹ ژن ها مانند ژن های اندوژنوز¹ است.

¹ Silencing

در آزمایشاتی که در دانشکده بیوتکنولوژی صورت گرفت، برخی از سازه‌های ژنی معیوب ویروس کمکی^۲ ساخته شد تا برای ارزیابی راندمان خاموشی در ترکیب با سازه‌های DI-RNA پردازد. علاوه بر ویروس کمکی با روش‌های متفاوت تلقیح^۳ به گیاهان برای رسیدن به بازده حداکثر بررسی شد. با این حال واضح است که این وکتور نمی‌تواند در این زمینه با دیگر سیستم‌های VIGS (القای خاموشی توسط ویروس) رقابت کند. در خاتمه، تاثیر توالی‌های DI در پایداری mRNA بر بیان موقت GFP و آزمایشات بیانی GUS در گیاهان خاموش GUS/GFP مورد بررسی قرار گرفت (GUS و GFP ژنهای گزارشگر هستند که در مهندسی ژنتیک بکار می‌روند).

با توجه به اینکه اینفیلتریشن^۴ A.tumefaciens (انتقال این باکتری به گیاهان) به گیاهان با وکتورهای دوتایی که حاوی ژن GFP بودند منجر به بیان نپ وحشی گیاهان N.benthamiuna نشد لذا آزمایشات بیشتری با ژن خاموش شده GFP گیاهان صورت نگرفت.

سیستم ژن گزارشگر GUS که برای تشخیص میزان بیان پروتئین در گیاهان وحشی و در گیاهان ترانسژنیک خاموش شده با GUS آزمایش شده بود مفید نبود. با این وجود نتایج تاثیر مثبت توالی‌های DI در میزان بیان پروتئین را نشان می‌دهد.

¹ Endogenous gene

² Helper virus

³ Inoculation

⁴ Infiltration