Archiv

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Molecular Farming and Strategies to Increase the Production of Recombinant Proteins in Plants

Mojgan Soleimanizadeh

* Corresponding Author. Ph.D. Student of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +989150738202, Email: m.soleimani380@gmail.com

Mokhtar Jalali Javaran

Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: jalali.mokhtar@gmail.com

Abdolreza Bagheri

Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: bagheriyazd@gmail.com

Abstract

Objective

The demand for recombinant proteins with therapeutic use is dramatically increasing; so that the traditional pharmaceutical industry will not be alone to answer the demand for now and upcoming generations. During the past two decades, plant bioreactors has gained more popularity over other conventional methods for several reasons. Among these reasons are scalability, high production rates, low production costs, ability to perform post-translational modifications, and biosafety of the bioreactor. So far, many important pharmaceutical proteins have been produced using molecular farming technology. In this paper, it has been tried besides a brief description of molecular farming history, types of plant-based systems and molecular farming challenges, appropriate strategies and methods to solve the challenges in this field were being discussed and reviewed.

Results

Despite the very promising advances in the field of molecular farming, we still face two serious challenges which needs to be taken seriously; insufficient accumulation levels of recombinant proteins and lack of efficient purification methods. To achieve the high levels of production, several factors should be taken into consideration, such as choice of a

www.SID.ir

suitable promoter or enhancer elements, codon optimization, appropriate subcellular localization, the use of fusion tags and etc. Chromatography methods are routinely used in the pharmaceutical industry for protein purification. Application of these methods has a lot of restrictions duo to scalability, cost and column pollution problems for purification of plant-derived pharmaceutical proteins.

Conclusions

Various fusion protein strategies have been developed not only to increase the yield of plant-derived recombinant proteins, but also to facilitate purification steps.

Keywords: Molecular farming, Plant bioreactors, Protein fusion tags, Recombinant protein purification

Citation: Soleimanizadeh M, Jalali Javaran M, Bagheri A (2019) Molecular Farming and Strategies to Increase the Production of Recombinant Proteins in Plants. Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 101-126.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 101-126.
DOI: 10.22103/jab.2019.13483.1110
Received: February 25, 2019; Accepted: May 9, 2019
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

زراعت مولکولی و راهکارهای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان

مژگان سلیمانی زاده

* نویسنده مسئول، دانش آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۹۱۵۰۷۳۸۲۰۲، ایمیل: m.soleimani380@gmail.com

مختار جلالی جواران

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ایمیل: jalali.mokhtar@gmail.com

عبدالرضا باقری

استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: bagheriyazd@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹

چکیده

هدف: تقا ضا برای پروتئین‌های نوترکیب دارای م صارف دارویی به‌طور چ شمگیری در حال افزایش می‌با شد؛ تا حدی که صنعت داروسازی سنتی به‌تنهایی جوابگوی این تقاضا برای نسل‌های حال و آینده نخواهد بود. طی دو دهه گذشته بیوراکتورهای گیاهی به دلایل متعدد محبوبیت بیشتری نسبت به سایر روش‌های سنتی به‌دست آورده‌اند، از جمله این دلایل می‌توان به مقیاس‌پذیری، سرعت بالای تولید، قیمت پایین تولید، توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه و ایمنی زیستی آن‌ها اشاره کرد. تاکنون تعداد زیادی از پروتئین‌های دارویی مهم با استفاده از فناوری زراعت مولکولی تولید شده‌اند. در این مقاله سعی شده است که ضمن معرفی مختصری از تاریخچه زراعت مولکولی، انواع سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان و چالش‌های زراعت مولکولی، راهکارها و راهبردهای مناسب برای حل چالش‌های این حوزه مورد بحث و بررسی دقیق کارشناسی قرار گیرد.

نتایج: علی‌رغم پی شرفت‌های ب سیار امیدوار کننده در حوزه زراعت مولکولی هنوز با دو چالش جدی مواجه ه ستیم؛ سطوح تجمع ناکافی پروتئین‌های نوترکیب و فقدان روش‌های تخلیص کارآمد، که لازم است مورد توجه جدی قرار گیرند. برای دستیابی به سطوح بالای تولید، فاکتورهای متعددی از قبیل: انتخاب پیشبرنده یا عناصر افزایش دهنده مناسب، بهینه‌سازی کدونی، هدف‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

منا سب درون سلولی، ا ستفاده از رویکرد پروتئین الحاق شونده و غیره بای ستی در نظر گرفته شوند. در صنعت دارو سازی به‌طور معمول، از روش‌های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. کاربرد این روش‌ها به‌دلیل مقیاس پذیری، هزینه و م شکلات آلودگی ستون برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب م شتق شده از گیاه، دارای محدودیت‌های زیادی می‌با شند. **نتیجه گیری:** رویکردهای پروتئین الحاق شـــونده نه تنها برای افزایش عملکرد پروتئین‌های نوترکیب مشـــتق از گیاه بلکه برای تسهیل مراحل خالص‌سازی توسعه یافته‌اند.

کلمات کلیدی: بیوراکتورهای گیاهی، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، دنباله‌های الحاق شونده به پروتئین، زراعت مولکولی

مقدمه

در دهه‌های اخیر پیشرفت چشمگیر در زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک، فرصت‌هایی را برای گسترش استفاده از گیاهان به‌منظور تولید طیف وسیعی از فرآورده‌های مهم دارویی ایجاد کرده است. در واقع زراعت مولکولی[۱] به‌عنوان یک رویکرد امیدوار کننده برای تولید فرآورده‌های دارویی زیستی از قبیل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها و غیره ظهور کرده است (Ma & Wang 2012). از زمانی که اولین داروی نوترکیب (انسولین انسانی) توسط FDA [۲] تایید شد، افزایش چشمگیری در تعداد و استفاده از پروتئین‌های دارویی بوجود آمده است (Ma & Wang 2012). پیش‌بینی شده که فروش پروتئین‌های دارویی نوترکیب تا سال ۲۰۲۰ به ۲۷۸/۲ میلیارد دلار برسد (Xu et al. 2016). تاکنون بیشتر پروتئین‌های موجود کلینیکال و دارویی به‌طور عمده از سلول‌های پستانداران، باکتری و به میزان کمتری از مخمر و سلول‌های حشرات استخراج می‌شدند. استفاده از این سیستم‌های بیانی مبتنی بر کشت سلولی مرسوم به‌طور معمول به‌دلیل قیمت بالای تولید، کارایی و عملکرد پایین محدود است. نیاز به مقادیر زیاد پروتئین‌های دارویی ایمن و اقتصادی باعث افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در بیوراکتورهای گیاهی شده است (Ma & Wang 2012; Ganapathy 2016). گیاهان به‌دلیل داشتن مزایای متعدد، یک سیستم بیانی جایگزین ارزشمند برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب دارویی پیشنهاد می‌شوند. گیاهان علاوه بر تولید انبوه می‌توانند مسیری ایمن و ارزان را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب فراهم نمایند (Jalali javaran et al. 2010). هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی (۲ تا ۱۰ درصد سیستم تخمیری و ۰/۱ درصد سلول جانوری) بسیار مقرون به‌صرفه می‌باشد. تامین نیازهای رشدی گیاه در مقایسه با سیستم‌های کشت سلولی مرسوم آسان و ارزان می‌باشد. به‌علاوه، گیاهان به‌دلیل داشتن سیستم یوکاریوتی توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه از قبیل گلیکوزیلاسیون و تشکیل پل‌های دی سولفیدی را دارند. عدم

۱. Molecular farming

۲. Food and Drug Administration

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی با عوامل بیماری‌زای انسانی که یک نگرانی در استفاده از کشت‌های سلولی پستانداران می‌باشد، نیز مزیت دیگر سیستم‌های گیاهی محسوب می‌گردد (Jalali javaran et al. 2010).

علی‌رغم مزایای متعدد گیاهان به‌عنوان سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هنوز دو چالش عمده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد. یکی از این چالش‌ها، سطوح تجمع ناکافی پروتئین نوترکیب است (Conley et al. 2011). ناپایداری پروتئین‌های بیان شده در محیط هترولوگوس[3] و حساسیت زیاد آن‌ها به فرآیندهای تجزیه درون سلولی، احتمالاً مهم‌ترین عامل دخیل در تجمع پایین پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان است (Benchabane et al. 2008). رویکردهای مولکولی مختلفی از جمله: استفاده از پیشبرنده مناسب، بهینه‌سازی کدونی، هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به اندامک‌های درون سلولی مناسب (مانند شبکه آندوپلاسمی، واکوئل، کلروپلاست و غیره) و استفاده از پروتئین‌های الحاق شونده[4] برای افزایش تجمع پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان وجود دارند (Streatfield 2007; Soleimanizadeh et al. 2018). یکی دیگر از چالش‌های موجود برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، فقدان روش‌های تخلیص کارآمد و ارزان می‌باشد. پروتئوم پیچیده گیاهان و عملکرد پایین تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته فرآیند تخلیص را سخت می‌کند. در هنگام استخراج پروتئین نوترکیب، مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌های طبیعی گیاه و دیگر ناخالصی‌ها (آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی، پلی‌ساکاریدها، پروتئازها و غیره) آزاد می‌شوند. حضور این ناخالصی‌ها، فرآیندهای پایین‌دستی را مشکل ساز می‌نماید. این ناخالصی‌ها می‌توانند منجر به تجزیه پروتئین نوترکیب شده و عملکرد و کیفیت نهایی آن را کاهش دهند. همچنین به‌دلیل آسیب به رزین‌های کروماتوگرافی و غشاها می‌توانند کارایی فرآیند را کاهش دهند. حذف این ترکیبات، تغلیظ و تخلیص پروتئین نوترکیب نیاز به فرآیندهای پایین‌دستی دارد که بسته به کاربرد نهایی (مصارف دارویی، غذایی و صنعتی) می‌تواند بیش از ۸۰ درصد قیمت فرآورده تولیدی را تشکیل دهد (Conley et al. 2011; Dirisala et al. 2017). معمول‌ترین روش مورد استفاده برای تخلیص پروتئین نوترکیب، استفاده از دنباله‌های تمایلی[5] و روش‌های کروماتوگرافی می‌باشد. این روش هزینه‌بر بوده و به‌طور معمول تنها برای تخلیص در مقیاس کوچک استفاده می‌شود. همچنین اکثر دنباله‌های تمایلی به‌دلیل داشتن اندازه‌ی کوچک، نمی‌تواند بیان پروتئین نوترکیب الحاق شده به خود و یا حلالیت آن را افزایش دهند (Ma & Wang 2012). اخیرا فناوری دنباله الحاق شونده‌ی غیر تمایلی برای تخلیص پروتئین‌های تولیدی در گیاه مورد استفاده قرار گرفته است. این فناوری امکان تخلیص پروتئین نوترکیب را با استفاده از روش‌های ارزان غیر کروماتوگرافی ممکن می‌سازد و به‌طور همزمان به افزایش بیان آن نیز کمک می‌کند. این دنباله‌های الحاق شونده غیر تمایلی شامل هیدروفوبین I (HFBI)، دنباله Zera و پلی‌پپتیدهای شبه الاستین (ELP) می‌باشند (Conley et al. 2011; Menassa et al. 2012). با توجه به مزایای ذکر شده در خصوص بهره‌برداری از گیاهان به‌عنوان مناسب ترین سیستم تولید پروتئین‌های دارویی ارزشمند و اهمیت زراعت

[3]. Heterologous environment
[4]. Fusion proteins
[5]. Affinity tags

www.SID.ir

Archive of SID

مولکولی، در این مقاله ضمن معرفی مختصر تاریخچه زراعت مولکولی، انواع سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاه و چالش‌های زراعت مولکولی، راهبردهای ممکن و موجود برای حل این چالش‌ها نیز مورد بحث و بررسی قرار خواهد گرفت.

زراعت مولکولی

زراعت مولکولی یک سیستم ارزان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب (شامل پروتئین‌های صنعتی، دارویی و غیره) از طریق گیاهان می‌باشد (Obembe et al. 2011). توانایی گیاهان برای بیان ژن‌های انسانی در سال ۱۹۸۶ به اثبات رسید و اولین پروتئین دارویی تولید شده در گیاهان، هورمون رشد انسانی بود (Barta et al. 1986). چند سال بعد پروتئین نوترکیب آلبومین سرم انسانی در گیاهان ترایخته تولید شد (Sijmons et al. 1990). به‌علاوه، پیشرفت مهم دیگری با بیان موفق آنتی‌بادی فعال در گیاهان در سال ۱۹۸۹ حاصل شد (Hiatt et al. 1989). با این حال، نخستین پروتئین نوترکیب با هدف تجاری (آویدین) در سال ۱۹۹۷ در ذرت تراریخته تولید گردید (Hood et al. 1997). این دستاوردها نشان داد که گیاهان می‌توانند به بیوراکتورهای ارزشمندی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بالا تبدیل شوند. این مهم منجر به مطالعات گسترده‌ای در زمینه استفاده از گیاهان برای تولید آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های ساختاری شد (Obembe et al. 2011; Sabalza et al. 2014). در حال حاضر، تعداد زیادی از پروتئین‌های نوترکیب تولیدی در گیاهان به مرحله تجاری رسیده‌اند و یا تحت آزمایشات بالینی قرار دارند که بخشی از آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است (Obembe et al. 2011; Sack et al. 2015; Park & Wi 2016).

سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاه

چهار سیستم بیانی عمده مبتنی بر گیاه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد که هر سیستم ویژگی‌های خاص خودش را دارد. در دسترس بودن سیستم‌های بیانی مختلف مبتنی بر گیاه به محققان اجازه می‌دهد تا یک سیستم موثر برای تولید یک پروتئین هدف ویژه را به‌راحتی انتخاب کنند (Ma & Wang 2012). این چهار سیستم عبارتند از:

۱. **گیاهان تراریخته هسته‌ای**[۶]: این گروه، گیاهانی هستند که به‌طور ژنتیکی با انتقال ژن‌های خارجی به ژنوم هسته آن‌ها از طریق فناوری DNA نوترکیب دستورزی شده‌اند. تاکنون گیاهان تراریخته هسته‌ای رایج‌ترین سیستم بیانی برای تولید پروتئین‌های با اهمیت دارویی بوده‌اند. یکی از مزایای اصلی استفاده از این گیاهان به‌عنوان بیوراکتور، انعطاف‌پذیری و کارایی در افزایش مقیاس تولید پروتئین‌های نوترکیب است؛ چرا که می‌تواند به آسانی با کاشت چندین هکتار از محصولات بیوتکنولوژی حاصل گردد.

[۶]. Nuclear transgenic plants

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. برخی از پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاه (Obembe et al. 2011; Sack et al. 2015; Park & Wi 2016).

Table 1. Some of plant-produced recombinant proteins

پروتئین نوترکیب Recombinant protein	کاربرد Application	گیاه میزبان Host plant	مرحله تولیدی Production stage	شرکت تولید کننده Producer company
واکسن H5N1	واکسن آنفلوانزا H5N1	توتون	فاز I	Medicago, USA
واکسن طیور	واکسن کوکسیدیوز طیور	کلزا	فاز II	Guardian Biosciences
آنتی‌بادی CaroRX	درمان پوسیدگی دندان	توتون	تایید در اتحادیه اروپا	Planet Biotechnology
آنتی‌بادی DoxoRX	عوارض جانبی درمان سرطان	توتون	تکمیل فاز I	Planet Biotechnology
آنتی‌بادی RhinoRX	جلوگیری از سرماخوردگی	توتون	تکمیل فاز I	Planet Biotechnology
آنتی‌بادی‌های Fv	درمان لنفوم غیر هوچکین	توتون	فاز I	Large Scale Biology
آنتی‌بادی علیه هپاتیت B	تخلیص واکسن	توتون	تجاری شده	CIGB
آنتی‌بادی HIV	واکسن HIV	توتون	فاز I	Fraunhofer
آنتی‌بادی Hu-E16	واکسن ویروس نیل غربی	توتون	فاز II	MacroGenics
آنتی‌بادی ZMapp	درمان بیماری ویروس ابولا	توتون	فاز I	MAPP
Elelyso	درمان بیماری گوچر	هویج	تجاری شده	Protalix
آلفا گالاکتوزیداز	درمان بیماری فابری	توتون	فاز II و III	Protalix
مریسپاز	درمان سیستیک فیبروز	ذرت	تجاری شده	Meristem
اینترفرون آلفا	درمان هپاتیت B و C	عدس آبی	فاز II	Biolex
داروی فیبرینولیتیک	درمان لخته خون	عدس آبی	فاز I	Biolex
آپولیپوپروتئین	درمان بیماری قلبی–عروقی	گلرنگ	فاز I	SemBioSys
انسولین	درمان دیابت	گلرنگ	تکمیل فاز III	SemBioSys
فاکتورهای رشد	مکمل محیط کشت سلولی	جو	تجاری شده	ORF
آپروتینین	آنزیم تحقیقاتی	توتون	تجاری شده	KRP
تریپسین و آویدین	آنزیم صنعتی	ذرت	تجاری شده	ProdiGene
سلوبیوهیدرولاز I	آنزیم صنعتی	ذرت	تجاری شده	Infinite enzymes
آلفا آمیلاز	آنزیم صنعتی	ذرت	تجاری شده	Syngenta
لاکتوفرین و لیزوزیم	ضد عفونت و ضد التهاب	برنج	تجاری شده	Ventria
کلاژن	معرف تحقیقاتی	توتون	تجاری شده	CollPlant
فیتاز	افزودنی غذایی	ذرت	تجاری شده	Origin Agritech

مزیت اصلی دیگر این گیاهان، تولید طولانی مدت پروتئین نوترکیب است؛ به این دلیل که ژن‌های خارجی به‌طور پایدار درون ژنوم هسته گیاه میزبان درج می‌شوند و در نسل‌های بعد قابل توارث بوده و در نتیجه بیان پایدار ژن خارجی در نسل‌های متوالی ادامه خواهد داشت (Tremblay et al. 2010). به‌علاوه، ساخت پروتئین‌های نوترکیب در این گیاهان می‌تواند به‌راحتی به اندام‌های خوراکی گیاه از قبیل برگ‌ها، بذرها، ریشه و یا میوه‌ها هدف‌گیری شود و در نتیجه نیازی به فرآیندهای پرهزینه و زمان‌بر برای استخراج آن‌ها نخواهد بود. چرا که پروتئین دارویی نوترکیب بیان شده در اندام‌های خوراکی می‌تواند به‌طور مستقیم به‌صورت ماده

www.SID.ir

Archive of SID

خام مصرف شود. بنابراین، نه تنها فرآیندهای پایین‌دستی پرهزینه (استخراج و تخلیص که برای تجویز تزریقی دارو لازم است)، بلکه همچنین هزینه‌های نگهداری، حمل و نقل و نیاز به تجهیزات سرمایشی را حذف می‌کند. صرفه‌جویی در هزینه تولید موجب کاهش قیمت هزینه هر دوز شده و در نتیجه دارو را برای اکثر مردم قابل دسترس می‌سازد. تجویز خوارکی دارو همچنین پروتئین‌های دارویی حساس (مانند انسولین) را از دسترس آنزیم‌های تجزیه کننده و اسیدی معده محافظت نموده و دوره فعالیت آن‌ها را طولانی می‌کند، در نتیجه به دوز کمتری از دارو نیاز می‌باشد. از طرف دیگر، عیب گیاهان تراریخته‌ی هسته‌ای، دوره زمانی طولانی (۹-۶ ماه) برای تولید گیاهان بیان کننده پروتئین هدف می‌باشد. همچنین برخی نگرانی‌ها و مسائل زیست محیطی برای استفاده از این گیاهان مطرح می‌باشد (Ma & Wang 2012). دو نوع تکنیک اصلی و مهم برای تولید این گیاهان وجود دارد. یکی، استفاده از روش مبتنی بر باکتری اگروباکتریوم تومفاسینس[۷] که توانایی آلوده‌کردن گیاهان را با استفاده از پلاسمید Ti داشته و بخشی از این پلاسمید به نام T-DNA حامل ژن موردنظر در درون کروموزوم‌های گیاه هدف درج می‌شود (Gelvin 2003). دوم، استفاده از تفنگ ژنی[۸] که در این روش ذرات طلا یا تنگستن قطعات DNA ژن هدف را روی سطح خودشان حمل و به درون هسته سلول‌های گیاهی منتقل می‌کنند. این روش به‌طور موفقیت آمیزی برای تعدادی از محصولات تک لپه‌ای از قبیل گندم یا ذرت به‌کار گرفته شده است (Ma & Wang 2012).

۲. گیاهان تراریخته‌ی کلروپلاستی: تراریختی کلروپلاست یک سیستم بیانی پایدار و جایگزینی مفید برای تراریختی هسته‌ای جهت تولید پروتئین‌های دارویی در گیاهان است (Jalali Javaran et al. 2014). مزیت کلیدی تراریختی کلروپلاست در مقایسه با تراریختی هسته‌ای تجمع فرآورده‌های پروتئین در سطوح بالا داخل کلروپلاست می‌باشد. ژنوم پلاستیدی بسیار پلی‌پلوئید است و یک سلول برگ توتون حاوی ۱۰۰ کلروپلاست و هر کلروپلاست حاوی بیش از ۱۰۰ نسخه ژنوم پلاستید می‌باشد. بنابراین ژن خارجی معرفی شده به سلول هدف می‌تواند تا بیشتر از ۱۰۳ نسخه در هر سلول تکثیر شده و منجر به سطوح بالای فرآورده‌های پروتئین نوترکیب شود. به هرحال سطح تجمع پروتئین بسته به نوع سازه بیانی مورد استفاده و نوع پروتئین متغیر است (Jalali Javaran et al. 2014; Tremblay et al. 2010). از آن‌جایی که ژنوم کلروپلاست در بسیاری از گیاهان توارث مادری دارد، شانس کمتری برای انتقال و فرار ژن به گونه‌های نزدیک یا وحشی از طریق گرده‌افشانی وجود دارد. مزیت دیگر تراریختی کلروپلاست، درج دقیق ژن خارجی در جایگاه مناسب با کمک نوترکیبی همولوگ بین توالی‌های مشابه موجود در دو طرف ژن خارجی در ناقل کلروپلاستی و توالی‌های موجود در ژنوم کلروپلاست است. بنابراین نگرانی‌های مربوط به اثرات مکانی ژن هدف در تراریختی کلروپلاست وجود ندارد. برخلاف تراریختی هسته‌ای که با درج تصادفی ژن در موقعیت‌های غیر قابل پیش‌بینی اتفاق می‌افتد و منجر به سطوح متغیر بیان و در برخی مواقع خاموشی ژن انتقال یافته و گاهی ژن‌های موجود در گیاه می‌شود. توانایی بیان ژن‌های متعدد

۷. *Agrobacterium tumefaciens*

۸. Gene gun

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

در یک اپرون و همچنین توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه‌ی پیچیده از قبیل تشکیل پیوندهای دی سولفیدی، لیپیدی شدن پروتئین[۹]، پیچش و سرهم کردن[۱۰] پروتئین از دیگر مزایای تراریختی کلروپلاست می‌باشند (Verma & Daniell 2007; Jalali Javaran et al. 2014). تاکنون تعداد زیادی از پروتئین‌های دارویی با موفقیت در این سیستم تولید شده‌اند (Jalali Javaran et al. 2014). از محدودیت‌های تراریختی کلروپلاست می‌توان به عدم گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب (به‌دلیل پروکاریوتی بودن سیستم کلروپلاست و نداشتن مسیر لازم برای انجام این عمل)، دامنه‌ی محدود گیاهان قابل دستورزی، ایجاد تغییرات فنوتیپی (نرعقیمی، زردی برگ‌ها و کاهش رشد) و تاخیر در نمو گیاه در نتیجه بیان بالای ژن خارجی، بیان پایین پروتئین نوترکیب در پلاستیدهای غیرسبز و عدم کارایی مناسب بیان القایی ژن اشاره نمود (Verma & Daniell 2007; Rigano et al. 2012).

۳. بیان موقت ژن هدف: سیستم بیان موقت سریع‌ترین و راحت‌ترین سیستم در تولید پروتئین‌های نوترکیب بوده و می‌تواند مقادیر قابل توجهی از پروتئین نوترکیب را در مدت زمان اندک تولید نماید. به‌طور کلی می‌توان گفت که بیان موقت در مقایسه با سیستم بیان دائم مزایایی دارد از جمله: بیان موقت وابسته به درج کروموزومی ژن‌های خارجی نیست و بنابراین بیان آن تحت تاثیر اثرات مکانی که اغلب در گیاهان تراریخته هسته‌ای رخ می‌دهد قرار نمی‌گیرد (Pogue et al. 2010). تولید پروتئین نوترکیب آسان‌تر و ارزان‌تر از سایر سیستم‌های تولیدی می‌باشد، مقادیر مفیدی از پروتئین‌های هدف می‌تواند در عرض چند روز یا هفته تولید شود و بنابراین تولید انبوه پروتئین هدف سریع است و باعث صرفه‌جویی در وقت می‌شود. یکی دیگر از مهم‌ترین کاربردهای بیان موقت این است که می‌توان بدون نگرانی از مسائل فرار ژن از آن استفاده کرد (Pogue et al. 2010; Ma and Wang 2012). تا به امروز، انتقال پایدار ژن به‌عنوان معمول‌ترین روش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بوده است. در چند سال گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه‌ی بیان موقت با استفاده از ناقل‌های ویروسی صورت گرفته است (Gleba et al. 2007; Kopertekh & Schiemann 2017). اولین گروه از ناقل‌های ویروسی، ویروس‌های وحشی با تغییراتی برای حمل و بیان یک توالی خارجی بودند که با وجود حمل و بیان توالی‌های بیگانه، پایدار بوده و توانایی آلودگی سیستمیک در میزبان خود را دارند. گروه دوم، ناقل‌های ویروسی بازسازی شده[۱۱] می‌باشند که سعی در رفع محدودیت‌های ناقل‌های کامل مانند محدودیت در اندازه و ناپایداری آن‌ها را دارند. این ناقل‌ها توسط روش‌های جایگزین از قبیل نفوذ اگروباکتریوم به روش خلاء به گیاه میزبان منتقل می‌شوند (Hefferon 2017). سیستم بیان موقت بر اساس روش اگروواینفیلتراسیون که حدود ۲۰ سال قبل توسعه داده شد (Kapila et al. 1997)، درحال حاضر برای تولید تجاری پروتئین‌های دارویی بهینه‌سازی شده است. یکی از معروف‌ترین ناقل‌های مبتنی بر ویروس، ناقل‌های TMV بازسازی شده می‌باشند که به‌عنوان سیستم magnICON شناخته شده است. مخترع این سیستم، شرکت

---

۹. Protein lipidation

۱۰. Assembly

۱۱. Deconstructed viral vectors

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

آلمانی Icon Genetics می‌باشد که سطح بیان پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از این سیستم می‌تواند به ۵ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ برسد (Kopertekh & Schiemann 2017). سیستم magnICON دارای مزایای تحویل بواسطه اگروباکتریوم همراه با سرعت و عملکرد بالای بیان ویروس می‌باشد. در این سیستم، ژن پروتئین پوششی TMV حذف شده و در نتیجه قادر به پخش از طریق گیاه و آلودگی محیط نخواهد بود. همچنین تمام منابع متابولیکی سلول به سمت ساخت پروتئین هدف هدایت می‌شود و برای ساخت مقادیر زیادی از پروتئین پوششی هدر نمی‌رود. در نتیجه سطح بالایی از پروتئین نوترکیب تولید می‌شود. بعلاوه، در این سیستم محدودیت اندازه وجود ندارد و تحت تاثیر اندازه ژن خارجی قرار نمی‌گیرد (Ma & Wang 2012; Kopertekh & Schiemann 2017). در سال‌های اخیر تعدادی از پروتئین‌های دارویی با استفاده از فناوری بیان موقت با موفقیت در گیاهان تولید شده‌اند (جدول ۲).

جدول ۲. داروهای زیستی تولید شده به‌روش بیان موقت (Kopertekh & Schiemann 2017)

Table 2. Biopharmaceutical produced by transient expression

پروتئین نوترکیب Recombinant protein	کاربرد Application	ناقل بیانی Expression vector	مرحله تولیدی Production stage
واکسن ایدیوتایپ NHL	درمان لنفوم غیر هوچکین	سیستم بیانی Geneware	فاز I
واکسن ایدیوتایپ NHL	درمان لنفوم غیر هوچکین	سیستم بیانی magnICON	فاز I
آنتی‌بادی MB-003	درمان بیماری ویروس ابولا	سیستم بیانی magnICON	آزمایش حیوانی
آنتی‌بادی ZMapp	درمان بیماری ویروس ابولا	سیستم بیانی magnICON	آزمایش حیوانی
واکسن آنفلوانزا H5N1	درمان آنفلوانزای مرغی	سیستم بیانی Proficia	فاز I و II
واکسن چندگانه آنفلوانزا	درمان آنفلوانزای H1N1، H3N2 و B	سیستم بیانی Proficia	فاز I و II
واکسن HAI1	درمان آنفلوانزای مرغی	ناقل بیانی مشتق از ویروس TMV	فاز I
واکسن HAC1	درمان آنفلوانزای خوکی	ناقل بیانی مشتق از ویروس TMV	فاز I

٤. کشت سوسپانسیون سلولی گیاه: کشت سوسپانسیون سلولی گیاه یکی دیگر از سیستم‌های تولید پروتئین‌های دارویی است. این سیستم تولیدی علاوه بر مزیت‌های سیستم گیاه کامل از قبیل: ایمنی تولید، مقیاس‌پذیری آسان، تغییرات پس از ترجمه و توانایی ساخت پروتئین‌های با بسته‌بندی صحیح، حائز برخی از مزایای کشت‌های سلول حیوانی و میکروبی نیز می‌باشد. سلول‌های گیاهی می‌توانند مشابه با باکتری‌ها در محیطهای مصنوعی ساده با استفاده از بیوراکتورهای سنتی رشد کنند. بعلاوه سلول‌های گیاهی

www.SID.ir

Archive of SID

توانایی ترشح پروتئین‌های بیان شده را به درون محیط کشت داشته و در نتیجه امکان بازیافت و تخلیص آسانتر و ارزانتر فرآورده هدف را نسبت به استخراج از وزن تازه گیاه مهیا می‌کنند (Ma & Wang 2012). بهرحال، عملکرد پایین پروتئین نوترکیب و ناپایداری ژنتیکی از محدودیت‌های اصلی این سیستم به شمار می‌روند. تاکنون تعدادی از پروتئین‌های دارویی با موفقیت با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تولید شده‌اند که در جدول ۳ ذکر شده است (Hellwig et al. 2004; Xu et al. 2011; Santos et al. 2016; Zagorskaya & Deineko 2017).

جدول ۳. پروتئین‌های دارویی تولید شده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاه (Hellwig et al. 2004; Xu et al. 2011; Santos et al. 2016; Zagorskaya & Deineko 2017).

Table 3. Pharmaceutical proteins produced in plant cell suspension cultures

پروتئین نوترکیب Recombinant protein	کاربرد Application	سلول میزبان Host cell
آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B	واکسن هپاتیت B	سلول‌های توتون و سویا
آلفا گالاکتوزیداز	بیماری فابری	سلول‌های توتون
فاکتور تحریک کننده کلنی‌زایی گرانولوسیت- ماکروفاژ	تولید سلول‌های سفید	سلول‌های توتون و برنج
اینترلوکین ۴	تنظیم ایمنی	سلول‌های توتون
آنتی‌بادی 2G12	آنتی‌بادی علیه ویروس HIV	سلول‌های توتون
هورمون رشد انسانی	هورمون رشد	سلول‌های توتون و برنج
اینترفرون آلفای انسانی	تنظیم ایمنی و ضد ویروس	سلول‌های توتون
اریتروپویتین	محافظت بافت	سلول‌های توتون و یونجه
آلبومین سرم انسانی	درمان هیپوآلبومینی	سلول‌های برنج
گلوکوسربروزیداز	درمان بیماری گوچر	سلول‌های هویج
لاکتوفرین انسانی	تنظیم کننده ایمنی	سلول‌های سیب زمینی
آنتی‌تریپسین	درمان بیماری مزمن ریوی	سلول‌های هویج و برنج
پروتئین پوششی ویروس نوراک	واکسن گاستروآنتریت حاد	سلول‌های توتون
اینترلوکین ۱۲	تنظیم ایمنی	سلول‌های برنج

راه‌کارهای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان مزایای متعددی نسبت به سیستم‌های تولیدی مرسوم دارند. با اینحال قبل از اینکه گیاهان بتوانند پذیرش عمومی را به‌عنوان روش اصلی تولید پروتئین‌های نوترکیب داشته باشند تعدادی چالش وجود دارد که بایستی حل شود. عملکرد پایین تولید پروتئین هدف یکی از چالش‌های اصلی در گیاهان است. در چند سال اخیر رویکردهای مولکولی مختلفی برای حل این چالش در سیستم‌های بیانی گیاه توسعه یافته و بسیاری از این رویکردها نتایج امیدوارکننده‌ای داشته است (Desai et al. 2010; Ma & Wang 2012). به‌منظور افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب هدف، عوامل متعددی از قبیل پیشبرنده ژن، تقویت رونویسی و ترجمه ژن هدف، ذخیره‌سازی پروتئین تولیدی و سازوکار استخراج آن هدف‌گذاری شده که در ادامه به بخشی از مهمترین عوامل تاثیرگذار بر افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان پرداخته می‌شود.

۱. تقویت رونویسی ژن هدف: بیان ژن خارجی در گیاهان در سطوح مختلف تنظیم می‌گردد. در سطح رونویسی، عناصر پیشبرنده می‌توانند اثر چشمگیری روی سطح mRNA تولیدی داشته و سطوح تجمع فرآورده پروتئین را تحت تاثیر قرار دهند. بنابراین، بالا بردن سرعت شروع رونویسی با استفاده از یک پیشبرنده قوی می‌تواند باعث افزایش عملکرد پروتئین نوترکیب شود (Gerasimova et al. 2016). در این رابطه پیشبرنده 35S ویروس موزائیک کلم گل[۱۲] (CaMV35S) اغلب برای بیان ژن خارجی در گیاهان تراریخته و همچنین سیستم‌های بیان موقت استفاده می‌شود. زیرا یک پیشبرنده قوی است که در همه یا اکثر سلول‌های گونه‌های گیاهی بویژه دولپه‌ها فعال می‌باشد. با استفاده از پیشبرنده 35S تعدادی از پروتئین‌های دارویی از قبیل آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و فاکتورهای رشد در سطوح نسبتا بالا در گیاهان تولید شده‌اند (Tremblay et al. 2010). این پیشبرنده فعالیت ضعیف‌تری در تک لپه‌ای‌ها دارد و به‌همین دلیل اغلب در تک لپه‌ای‌ها، پیشبرنده‌های ژن اکتین (برنج) و ژن یوبی‌کوئیتین (ذرت) ترجیح داده می‌شوند. در مواردی که پروتئین خارجی بیان شده برای سلول‌های میزبان سمی باشد، بیان القایی یا خاص در اندام یا اندامک ویژه ضروری به‌نظر می‌رسد (Streatfield 2007; Gerasimova et al. 2016). پیشبرنده‌های تنظیم‌کننده از قبیل پیشبرنده‌های اختصاصی مرحله نمو ی، بافت یا اندام و پیشبرنده‌های القاپذیر شیمیایی[۱۳] یا فیزیکی برای بیان پروتئین‌های دارویی به‌کار گرفته شده است (Ma & Wang 2012). روش دیگر برای افزایش قدرت رونویسی، طراحی پیشبرنده‌های مصنوعی جدید با ترکیب توالی‌های فعال چندین پیشبرنده طبیعی شناخته شده است. در واقع پیشبرنده‌های هیبرید مصنوعی شامل ترکیبی از عناصر پیشبرنده 35S و پیشبرنده مانوپین سنتاز[۱۴] پلاسمید Ti اگروباکتریوم، فعالیت چند برابری نسبت به هر دو پیشبرنده به‌طور جداگانه نشان داده‌اند (Streatfield 2007; Ma & Wang 2012). انتخاب سیگنال پلی A نیز برای بیان بهینه ژن خارجی در گیاهان مهم می‌باشد چرا که پایداری mRNA و کارایی ترجمه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سیگنال پلی A مربوط به ژن nos اگروباکتریوم تومفاسینس و سیگنال پلی A پروتئین شوک حرارتی (HSP) آرابیدوپسیس تالیانا موجب افزایش سطوح mRNA

---

۱۲. Cauliflower mosaic virus (CaMV)

۱۳. Chemically-inducible promoters

۱۴. Mannopine synthase

www.SID.ir

Archive of SID

ژن‌های خارجی بیان شده در گیاهان شده و اغلب به سازه‌ی بیانی اضافه می‌شوند (Streatfield 2007; Nagaya et al. 2009). در گیاهان تعداد زیادی از اینترون‌ها نیز بیان ژن را از طریق افزایش سطح mRNA افزایش می‌دهند. به‌طور مثال گنجاندن یک اینترون در سازه ژنی حاوی توالی رمز کننده ژن لوسیفراز به‌طور معنی‌داری بیان این ژن را در گیاهان تراریخته افزایش داد (Bartlett et al. 2009). راهکارهای دیگر برای افزایش بیان ژن خارجی شامل حذف عناصر ناپایدار کننده‌ی mRNA و استفاده از بازدارنده‌های خاموشی ویروسی است (Desai et al. 2010).

۲. تقویت ترجمه ژن هدف: علاوه بر افزایش رونویسی، حداکثر مقدار پروتئین ترجمه شده در هر واحد mRNA وابسته به میزان و سرعت ترجمه ژن هدف است، که بسیار مهم می‌باشد چرا که فراوانی mRNA لزوما نمی‌تواند باعث افزایش سطوح بالای پروتئین گردد. تخمین زده شده است که تنها ۴۰-۲۰ درصد فراوانی پروتئین بستگی به غلظت mRNA متناظر آن دارد (Nie et al. 2006). غلظت پروتئین نه تنها بستگی به تعداد mRNA دارد بلکه همچنین به سرعت ترجمه از روی mRNA و سرعت تجزیه آن هم بستگی دارد. در گیاهان، کارایی ترجمه mRNA مهم‌ترین عامل تعیین کننده میزان پروتئین تولیدی است. راهکارهای مختلفی برای تقویت بیشتر کارایی ترجمه mRNA ژن خارجی به‌کار گرفته شده است (Ma & Wang 2012). یکی از این راهکارها افزودن توالی 5′-UTR ویروسی به سازه ژنی برای افزایش سرعت شروع ترجمه است. برای مثال اثبات شده که توالی راهنمای 5′-UTR مربوط به RNA ویروس موزائیک توتون، RNA ویروس X سیب زمینی و ژن‌های پروتئین ذخیره‌ای بذور برنج در تقویت بیان پروتئین خارجی موثر است (Liu et al. 2010). بهینه‌سازی کدونی[۱۵] ژن‌های خارجی مطابق با ترجیح کدونی گیاه میزبان راهکار دیگری برای افزایش بیان پروتئین خارجی در گیاهان است. مشخص گردیده که کدون‌های هم‌معنی می‌توانند به‌طور چشمگیری بیان پروتئین هدف را با کنترل کارایی ترجمه تغییر دهند. لذا برای بیان موثر، ژن هدف بایستی مطابق با الگوی ژنوم میزبان طراحی شود (Webster et al. 2017). راهکارهای دیگر برای افزایش تجمع پروتئین نوترکیب شامل اتصال ژن خارجی به نواحی اتصال به ماتریکس هسته[۱۶] و بیان همزمان با بازدارنده‌های پروتئازی می‌باشند (Desai et al. 2010).

۳. هدف‌گیری پروتئین‌های نوترکیب در بخش‌های مناسب سلولی: هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به اندامک‌های درون سلولی می‌تواند برای دستیابی به سطوح تجمع بالا موثر باشد چرا که ساختار و پایداری پروتئین نوترکیب به‌شدت تحت تاثیر مقصد نهایی آن در سلول قرار می‌گیرد (Ma & Wang 2012). هر اندامک ویژگی‌های متابولیکی، سطح فعالیت پروتئازی و محیط‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی مخصوص خودش را دارد. به‌علاوه، ماهیت پروتئین نوترکیب اغلب تغییرات ویژه‌ای را نیاز دارد که برای فعالیت عملکردی آن ضروری است. پروتئین‌ها دستخوش انواع تغییرات در اجزای سلولی مختلف می‌شوند. بنابراین ممکن است پروتئین هدف برای پردازش و پیرایش صحیح نیازمند هدایت به درون بخش ویژه‌ای از سلول باشد. عامل مهم دیگری که بایستی

[۱۵]. Codon optimization

[۱۶]. Nuclear matrix attachment regions

www.SID.ir

Archive of SID

در نظر گرفته شود، پتانسیل سمیت پروتئین نوترکیب برای سلول میزبان است. هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به اندامک خاص می‌تواند اثرات سمی پروتئین نوترکیب را کاهش داده و حتی حذف کند (Gerasimova et al. 2016). شبکه آندوپلاسمی[۱۷] (ER) یکی از عمومی‌ترین مکان‌ها برای هدف‌گیری پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. این اندامک مکانی است غنی از چاپرون‌ها که منجر به بسته‌بندی صحیح پلی‌پپتیدهای تازه ساخته شده می‌شود. پتانسیل ردوکس محیط آن برای تشکیل باندهای دی سولفیدی مناسب بوده و در آن فعالیت پروتئازی کمتر است (Pillay et al. 2014). تمامی این ویژگی‌ها باعث شده تا اندامک ER یک هدف عالی برای نگهداری و در نتیجه بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب باشد. برای نگهداری پروتئین خارجی ترشحی در این اندامک، سیگنال KDEL یا HDEL در انتهای C پروتئین هدف موردنیاز است. مشخص شده که این راهکار به‌طور معنی‌داری عملکرد تولید آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، سیتوکین‌ها و تعدادی از پروتئین‌های تنظیم کننده ایمنی را در گیاهان تراریخته افزایش داده است (Ma & Wang 2012). هدف‌گیری پروتئین تولیدی به سایر اندامک‌های درون سلولی نیز راهکاری موثر برای تقویت تجمع پروتئین‌های هدف در گیاهان می‌باشد. مشخص گردید که هدایت پروتئین hEGF[۱۸] به درون سیتوپلاسم سلول‌های برگ توتون منجر به تجمع پروتئین تا ۰/۰۰۱ درصد پروتئین محلول کل (TSP) شده است؛ این در حالی است که سطح بیان آن پس از هدف‌گیری به اندامک آپوپلاست به ۰/۱۱ درصد TSP رسیده است (Wirth et al. 2004). هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به کلروپلاست‌های گیاه نیز منجر به افزایش تجمع آن شده است (Van Molle et al. 2007).

٤. اضافه کردن دنباله‌های الحاق شونده به‌منظور پایداری بیشتر و سهولت در استخراج پروتئین هدف: یکی دیگر از ابزارهای موثر برای تقویت تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان رویکردی مبتنی بر افزودن دنباله الحاق شونده می‌باشد. اثبات شده است که دنباله‌های الحاق شونده با جلوگیری از تجزیه، افزایش حلالیت و پایداری، عملکرد پروتئین هدف را بهبود می‌بخشند. همچنین جداسازی و تخلیص پروتئین هدف را نیز امکان‌پذیر می‌کنند (Menassa et al. 2012). چندین دنباله الحاق شونده شناسایی شده است که برای افزایش عملکرد پروتئین‌های خارجی در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند؛ تعدادی از مهمترین آن‌ها عبارتند از:

٤-١. دنباله الحاق شونده Zera**:** این دنباله الحاق شونده، ناحیه غنی از پرولین انتهای N پروتئین ذخیره‌ای گاما زئین ذرت می‌باشد. توالی این دنباله ۱۱۲ اسید آمینه دارد که شامل سیگنال پپتید گاما زئین، موتیف C-G-C و ناحیه تکراری غنی از پرولین می‌باشد. پروتئین‌های الحاق شده به دنباله Zera بدون حضور سیگنال پپتید نگهدارنده در ER می‌توانند در این اندامک تجمع یابند. این ناحیه محدود به بذور طبیعی ذرت نمی‌باشد؛ بلکه می‌توان آن را به بافت‌های غیر بذری گیاهان و همین‌طور میزبان‌های یوکاریوتی غیر گیاهی مانند قارچ‌ها، سلول‌های حشرات و پستانداران نیز گسترش داد (Torrent et al. 2009). اثبات شده است که الحاق

[۱۷]. Endoplasmic reticulum

[۱۸]. Human epidermal growth factor

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

Zera به پروتئین هدف، منجر به تحریک تشکیل اجسام پروتئینی شده و تجمع پایدار پروتئین‌های نوترکیب را در سطوح خیلی بالا تسهیل کرده است. به‌طور مثال الحاق دنباله Zera به واکسن F1-V منجر به بیان ۳ برابری آن نسبت به پروتئین شاهد (بدون Zera) در گیاهان یونجه و توتون شده است (Alvarez et al. 2010).

٤-۲. دنباله الحاق شونده ELP**:** استفاده از این دنباله برای افزایش تجمع پروتئین نوترکیب در گیاهان توجه بیشتری به‌خود جلب نموده است (Conley et al. 2011). این دنباله‌های الحاق شونده پلیمرهای زیستی مصنوعی حاوی تکرارهایی از توالی پنتاپپتیدی V-P-G-X-G می‌باشند که X می‌تواند هر اسیدآمینه‌ای به استثنای پرولین باشد. تعداد تکرارهای پنتاپپتیدی این دنباله می‌تواند متغیر باشد. تکرارهای کمتر برای تجمع پروتئین نوترکیب و تکرارهای بزرگتر برای تخلیص راحت‌تر به‌کار برده می‌شوند (Menassa et al. 2012).

٤-۳. هیدروفوبین‌ها: هیدروفوبین‌ها نیز به‌عنوان یک دنباله الحاق شونده برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان به‌کار گرفته شده‌اند (Jacquet et al. 2014; Kurppa et al. 2018). هیدروفوبین‌ها گروهی از پروتئین‌های فعال سطحی و کوچک می‌باشند که توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. این پروتئین‌های کوچک حاوی یک پیش پروتئین بزرگ از آمینواسیدهای هیدروفوبیک می‌باشند که دارای هشت اسید آمینه سیستئین محافظت شده هستند. این سیستئین‌ها چهار باند دی سولفیدی تشکیل می‌دهند که پایدار کننده ساختار پروتئین می‌باشند. هیدروفوبین‌ها دارای خاصیت خود تجمعی بوده و می‌توانند این ویژگی را به پروتئین‌های الحاق شده به‌خود منتقل کنند (Hakanpää et al. 2006). دیگر پروتئین‌های الحاق شونده که اثرات مفیدی روی تجمع پروتئین نوترکیب در گیاهان نشان داده‌اند شامل یوبی‌کوئیتین، بتا گلوکورونیداز، زیر واحد B سم وبا[۱۹]، پروتئین‌های پوششی ویروسی و ایمونوگلوبین انسانی A می‌باشند (Ma & Wang 2012).

۵. استفاده از الیسیتورها (محرک‌ها) برای افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب: استفاده از الیسیتورها در جهت افزایش میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب نیز مورد توجه قرار گرفته است (Robert et al. 2015; Karimzadegan et al. 2018). الیسیتورها به دو دسته مهم: الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی تقسیم‌بندی می‌شوند. الیسیتورهای زیستی که منشاء زیستی داشته و از موجودات زنده مثل باکتری، قارچ و ویروس به‌دست می‌آیند. الیستورهای غیر زیستی که منشاء غیر زیستی داشته و شامل الیسیتورهای فیزیکی، شیمیایی و هورمونی می‌باشند. جاسمونات‌ها، هورمون‌های گیاهی هستند که نقش مهمی در دفاع گیاه علیه عوامل بیماری‌زا و حشرات بازی می‌کنند. این هورمون‌ها به‌عنوان الیسیتورهای موثر بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی گیاهان داروئی عمل می‌کنند (Naik & Al-Khayri 2016). گزارشات مختلف تاثیر متیل جاسمونات را بر کاهش رونویسی ژن‌های فتوسنتزی گزارش کرده‌اند. چنین تأثیرات سرکوب‌گری عموماً با تجمع پروتئین‌های مرتبط با تنش همراه بوده که به‌طورکلی منجر به تخلیه شدید مخزن روبیسکو و افزایش تولید پروتئین نوترکیب می‌گردد (Robert et al. 2015). بررسی‌های متعدد تاثیر

[۱۹]. Cholera toxin B subunit

www.SID.ir

Archive of SID

الیسیتورهای مختلف را در افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب نشان داده است (Robert et al. 2015; Jung & McDonald 2016; Karimzadegan et al. 2018).

استخراج پروتئین‌های نوترکیب از گیاهان

یکی دیگر از چالش‌های موجود در تجاری‌سازی پروتئین‌های نوترکیب گیاهی، بازیافت و تخلیص پروتئین است که هزینه قابل‌توجهی در بر دارد. بسته به نوع محصول و کاربرد، فرآیندهای پایین‌دستی بخش قابل‌توجهی از هزینه‌های عملیاتی برای تولید پروتئین را شامل می‌شوند (Buyel et al. 2015). برای مثال بررسی هزینه تولید آنزیم بتا گلوکورونیداز از ذرت تراریخته نشان داده که فرآیندهای تخلیص پروتئین تقریبا ۹۴ درصد هزینه کل تولید را تشکیل می‌دهد (Evangelista et al. 1998). احتمالا هزینه فرآیندهای پایین‌دستی برای استخراج در گیاهان، گران‌ترین بخش تولید پروتئین نوترکیب (حدود ۸۰ درصد قیمت کل فرآورده) را به خود اختصاص می‌دهد و این اهمیت فرآیندهای پایین‌دستی را در تعیین قابلیت اقتصادی تولید پروتئین‌های تولید شده توسط گیاه نشان می‌دهد (Łojewska et al. 2016). در مقایسه با سیستم‌های باکتریایی و مخمر، تخلیص و جداسازی پروتئین از گیاهان برگی به‌دلیل پیچیدگی سیستم گیاهی مشکل‌تر و هزینه‌بر تر بوده و به‌عنوان یک چالش عمده در زراعت مولکولی محسوب می‌گردد. بنابراین توسعه روش‌های آسان، کم هزینه و قابل اعتماد برای تخلیص پروتئین‌های هدف از گیاه بسیار مهم است. بدین منظور، چندین روش توسعه داده شده است که عبارتند از: (Ma & Wang 2012; Buyel et al. 2015; Łojewska et al. 2016).

الف- خالص‌سازی پروتئین هدف بر اساس دنباله‌های تمایلی: افزودن توالی دنباله تمایلی[۲۰] به ژن‌های هدف معمول‌ترین روش مورد استفاده برای کمک به تخلیص پروتئین می‌باشد. ویژگی‌های یک دنباله تمایلی ایده‌آل این است که بایستی کوچک باشد تا اجازه تخلیص سریع از مخلوط پیچیده را بدهد و منجر به خلوص با عملکرد بالا شود (Ma & Wang 2012). دنباله پلی هیستیدین (شامل ۶ هیستیدین) معمول‌ترین دنباله تمایلی برای تخلیص پروتئین نوترکیب از سیستم‌های بیانی مختلف است. این دنباله، تخلیص پروتئین نوترکیب را بر اساس استفاده از یون فلزی کلاته شده نیکل به‌عنوان لیگاند تمایلی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی مهیا می‌کند (Łojewska et al. 2016). در حالی‌که این روش می‌تواند منجر به سطوح بالای تخلیص پروتئین‌های دنباله‌دار در سیستم‌های باکتریایی شود؛ در گیاهان استخراج با خلوص بالا مقدور نمی‌باشد (Sharma & Sharma 2009). یکی دیگر از فراوان‌ترین دنباله‌های تمایلی برای تخلیص، دنباله StrepII می‌باشد که شامل ۸ اسیدآمینه است و به یکی از مشتقات استرپتاویدین[۲۱] متصل می‌گردد. این دنباله می‌تواند با استفاده از بیوتین از ستون شسته شود. دنباله‌های تمایلی مورد استفاده دیگر برای بازیافت پروتئین‌های نوترکیب شامل Flag، c-myc، GST[۲۲] و غیره می‌باشند (Ma & Wang 2012). هر چند که روش‌های

۲۰. Affinity tag

۲۱. Streptavidin

۲۲. Glutathione S-transferase

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

کروماتوگرافی مبتنی بر دنباله‌های تمایلی، تخلیص یک مرحله‌ای آسان و سریع فرآورده‌های نوترکیب را ممکن می‌سازد اما این روش جداسازی پروتئین هدف، به‌طور معمول تنها برای تخلیص در مقیاس نسبتا کوچک استفاده می‌شوند. برای تخلیص پروتئین در مقیاس بزرگ این روش‌ها هزینه‌بر است. همچنین به‌دلیل اندازه کوچک دنباله‌های تمایلی، اکثر آن‌ها نمی‌توانند به‌طور معمول بیان پروتئین الحاق شده و یا حلالیت آن را افزایش دهند (Ma & Wang 2012; Łojewska et al. 2016).

ب- خالص‌سازی پروتئین هدف بر اساس روش‌های غیر تمایلی: چندین روش تخلیص غیر تمایلی برای جداسازی پروتئین‌های تولید شده در گیاهان توسعه یافته است. این روش‌ها در مقایسه با روش‌های کروماتوگرافی آسان‌تر، مقیاس‌پذیرتر و ارزان تر می‌باشند (Conley et al. 2011; Moustafa et al. 2016). این روش‌ها بر اساس استفاده از دنباله‌های الحاق شونده غیر تمایلی (ELP، HFBI، Zera و اولئوسین) پایه‌گذاری شده‌اند (Menassa et al. 2012). در حالی‌که ELP یک دنباله الحاق شونده برای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد، با اینحال توسعه یک روش غیر تمایلی برای تخلیص پروتئین را ممکن می‌سازد (Conley et al. 2011). این دنباله پنتاپپتیدی یک گذار دمایی معکوس برگشت‌پذیر[۲۳] (T_t) را متحمل می‌گردد. هنگامی که دما بالاتر از دمای T_t می‌رسد، پلی‌پپتیدهای الحاق شده به ELP تجمع‌های نامحلولی[۲۴] تشکیل می‌دهند که می‌توانند به‌راحتی با سانتریفیوژ جدا شوند. سپس تجمع‌های نامحلول می‌توانند به آسانی در دمای پایین‌تر از دمای T_t مجددا به حالت محلول در آیند. این روش تخلیص غیر کروماتوگرافی اصطلاحا روش چرخه گذار معکوس[۲۵] نامیده می‌شود و برای تخلیص سیتوکین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و واکسن‌ها از بافت‌های گیاهان تراریخته استفاده شده است (Ma & Wang 2012; Moustafa et al. 2016). مشابه با ELP، HFBI نیز نه تنها می‌تواند تولید پروتئین را در گیاهان افزایش دهد، بلکه همچنین می‌تواند منجر به تخلیص آن با استفاده از یک روش غیر تمایلی شود (Conley et al. 2011). این دنباله قادر به تغییر آب‌گریزی[۲۶] پروتئین الحاق شده به خود بوده که از این طریق امکان تخلیص کارآمد آن را با استفاده از سیستم ATPS[۲۷] مهیا می‌کند (Menassa et al. 2012). دنباله الحاق شونده Zera نیز به‌عنوان یک دنباله غیر تمایلی برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از رویکرد سانتریفیوژ مبتنی بر چگالی استفاده می‌شود (Llop-Tous et al. 2011). الحاق پروتئین به اولئوسین روشی دیگر برای بازیافت پروتئین‌های تولید شده گیاهی است که به‌واسطه روش‌های غیر تمایلی مهیا می‌شود. اولئوسین‌ها پروتئین‌های آب‌گریزی هستند که در اجسام روغنی بذور قرار دارند (Ma & Wang 2012; Bagheri et al. 2013). پروتئین اینترفرون گاما الحاق شده به اولئوسین قادر به ادغام درون اجسام روغنی طبیعی بذور گیاه کلزای تراریخته شد و اجسام روغنی به آسانی از باقیمانده عصاره سلولی توسط سانتریفیوژ جداسازی شدند

[۲۳]. Reversible inverse temperature transition

[۲۴]. Insoluble aggregates

[۲۵]. Inverse transition cycling

[۲۶]. Hydrophobicity

[۲۷]. Surfactant-based aqueous two-phase system

www.SID.ir

Archive of SID

(Bagheri et al. 2013). همچنین پروتئین hFGF[۲۸] در بذور گیاه گلرنگ با استفاده از فناوری اولئوسین بیان و به‌طور موفقیت آمیز تخلیص شد (Huang et al. 2015).

بحث

زراعت مولکولی پتانسیل تبدیل شدن به یک روش جایگزین جدید برای تولید ارزان، ایمن و انبوه پروتئین‌های دارویی را دارد (Ma & Wang 2012). این فناوری در طول دو دهه گذشته پیشرفت چشمگیری داشته و تعداد زیادی از پروتئین‌های دارویی با استفاده از این فناوری تولید شده که در حال آزمایشات بالینی بوده و نزدیک به مرحله تجاری‌سازی می‌باشند و برخی نیز به مرحله تجاری رسیده‌اند (Sack et al. 2015; Park & Wi 2016). زراعت مولکولی و تولید پروتئین‌های نوترکیب در ایران نیز به موفقیت‌های ارزشمندی نائل شده است. تولید پروتئین‌های داروئی مهم از قبیل اینترفرون گاما (Bagheri et al. 2013)، انسولین (Yarbakht et al. 2015)، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (Abdoli-Nasab et al. 2013; Jalali Javaran et al. 2017)، نانوبادی Anti-VEGFR (Mirzaee et al. 2018)، نانوبادی Anti-VEGF (Soleimanizadeh et al. 2018) و غیره توسط تیم تحقیقاتی دکتر جلالی جواران در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس نمونه‌هایی از این موفقیت‌ها می‌باشند.

برای گیاهان تراریخته نسل سوم با هدف تولید پروتئین‌های مورد استفاده داروئی و صنعتی، چالش اصلی دسترسی به سطح بالای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد. رویکردهای مختلفی از قبیل: انتخاب پیشبرنده و عناصر افزایش دهنده مناسب، بهینه‌سازی کدونی، هدف‌گیری درون سلولی پروتئین نوترکیب، پایداری پروتئین هدف و غیره برای افزایش سطح تولید پروتئین هدف در گیاهان تراریخته پیشنهاد می‌شود (Streatfield 2007; Gerasimova et al. 2016). به‌منظور افزایش سطح تولید پروتئین نوترکیب پیشبرنده‌های دائمی و اختصاصی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پرکاربردترین پیشبرنده دائمی، پیشبرنده ویروسی قوی 35S می‌باشد که بیان ژن پایین دستی خود را در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی افزایش داده است (Ma & Wang 2012). پیشبرنده‌های ترکیبی از پیشبرنده‌های ویروسی نیز به‌منظور افزایش سطح بیان پروتئین نوترکیب ایجاد شده است. به‌طور مثال عناصر ویروس موزائیک زرد کاملینا[۲۹] و عناصر فعال کننده پیشبرنده ویروسی 35S به‌منظور افزایش بیان ژن پایین‌دستی با هم ترکیب شده‌اند. پیشبرنده‌های اختصاصی بافت (بذر، میوه، ریشه و غیره) نیز برای تجمع پروتئین نوترکیب استفاده شده‌اند. این پیشبرنده‌ها همچنین پایداری پروتئین و فرآیندهای پایین دستی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Ma & Wang 2012; Gerasimova et al. 2016). به‌منظور دسترسی به سطوح بالای بیان پروتئین نوترکیب چندین عنصر افزایش دهنده می‌تواند در بالادست ژن هدف قرار گیرد که

[۲۸]. Human fibroblast growth factor

[۲۹]. Commelina Yellow Mosaic Virus

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

سرعت رونویسی را افزایش خواهد داد. عناصر افزایش دهنده متعددی در گونه‌های گیاهی مختلف شناسایی شده است (Gerasimova et al. 2016). مشخص شده که یکی از عوامل موثر و مهم در افزایش سطح بیان پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی کدونی آن است (Webster et al. 2017). به‌طور مثال هنگامی که توالی نوکلئوتیدی ژن CTB مطابق با ترجیح کدونی گیاه توتون تغییر داده شد بیان ژن بهینه شده در مقایسه با ژن بهینه نشده، ۱۵ برابر افزایش یافت (Kang et al. 2004). همچنین ژن *cry6A* با تغییر کدون‌های نادر با کدون‌های هم‌معنی خود در گیاه گوجه فرنگی بهینه گردید. بیان پروتئین در شکل تغییر نیافته آن قابل تشخیص نبود، در حالی‌که ژن تغییر یافته توسط آزمون لکه‌گذاری وسترن شناسایی گردید (Li et al. 2007). به‌علاوه، بهینه کردن توالی ژن رمز کننده فاکتور رشد اپیدرمی مطابق با ترجیح کدونی گیاه توتون منجر به افزایش بیان این پروتئین شد (Thomas & Walmsley 2014). همچنین پس از بهینه‌سازی توالی ژن رمز کننده نانوبادی Anti-VEGF بر اساس ترجیح کدونی گیاه کدو، بیان شکل بهینه شده نانوبادی تقریبا ۳/۵ برابر شکل بهینه نشده آن بود. این افزایش بیان نشان داد که بهینه‌سازی کدونی می‌تواند به‌عنوان یک عامل موثر بر افزایش بیان پروتئین هدف در نظر گرفته شود (Soleimanizadeh et al. 2018). هدف‌گیری پروتئین نوترکیب در سلول یکی دیگر از کلیدی‌ترین عوامل است که پایداری و کیفیت عملکرد فرآورده نهایی را تعیین می‌کند (Gerasimova et al. 2016). انتخاب صحیح اندامک جهت بیان پروتئین نوترکیب نقش مهمی در سطوح تولید پروتئین‌های خارجی دارد. تحقیقات مختلف اثبات نموده است که ER مناسب‌ترین محیط را برای بیان پروتئین‌های نوترکیب فراهم می‌کند. به‌طور مثال گزارش شده که پس از هدف‌گیری آنتی‌بادی نوترکیب به اندامک‌های درون سلولی آپوپلاست و ER میزان تجمع این پروتئین نوترکیب در ER ۱۰ برابر میزان تجمع آن در آپوپلاست بود (Benchabane et al. 2008). در سال ۲۰۱۲ نیز پروتئین نوترکیب اینترلوکین به اندامک‌های آپوپلاست و ER هدف‌گیری شد و نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان پروتئین نوترکیب هدف در ER حدود ۱۰ برابر بیان این پروتئین در آپوپلاست می‌باشد (Nausch et al. 2012). همچنین مشخص شد که پس از هدف‌گیری نانوبادی Anti-VEGF به ER و آپوپلاست، بیان پروتئین نوترکیب هدف‌گیری شده به ER حدود ۶ برابر بالاتر از بیان پروتئین نوترکیب هدف‌گیری شده به آپوپلاست بود (Soleimanizadeh et al. 2018). بیان پایین در آپوپلاست احتمالا به‌دلیل حضور یکسری از پروتئازها از جمله آسپارتیک، سرین و سیستئین پروتئازها می‌باشد (Pillay et al. 2014). برای به حداقل رساندن اثر پروتئازها بر پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاه روش‌هایی نظیر حذف و یا تغییر نواحی فعالیت پروتئازها در پروتئین نوترکیب، خاموش کردن ژن‌های رمز کننده پروتئازهای اساسی گیاه و ممانعت از فعالیت پروتئازها با بیان همزمان مهارکننده‌های آن‌ها در سلول پیشنهاد شده است (Benchabane et al. 2008). باید توجه داشت که عملیات تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط آزمایشگاهی که با استفاده از بافرها و افزودنی‌های گرانقیمت صورت می‌گیرد، ممکن است که در مقیاس آزمایشگاهی توجیه پذیر باشد اما در مقیاس وسیع نیاز به تحقیق و کار بیشتر در زمینه تخلیص پروتئین نوترکیب دارد. برای حل این مشکلات، باید ضمن بکارگیری روش‌های جدید برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب، روش‌های تخلیص جدید که علاوه بر ارزان بودن، مقیاس‌پذیری داشته باشند نیز مورد ارزیابی و اصلاح قرار گیرد (Jalali Javaran et al. 2014). برای فائق آمدن بر این مشکلات، در سال‌های

www.SID.ir

Archive of SID

اخیر چندین رویکرد پروتئین الحاق شونده به‌کار گرفته شده است. تشکیل اجسام پروتئینی توسط دنباله‌های الحاق شونده Zera، HFBI و ELP نه تنها منجر به افزایش سطح پایین تجمع پروتئین نوترکیب می‌شود؛ بلکه به‌طور همزمان به تخلیص آسان و ارزان آن نیز کمک می‌کند (Conley et al. 2011). به‌طور مثال الحاق دنباله Zera به پروتئین‌های نوترکیب هورمون رشد انسانی[30]، فاکتور رشد اپیدرمی[31] و زایلاناز نه تنها منجر به افزایش سطوح بیان و تجمع این پروتئین‌ها شده بلکه همچنین تخلیص این پروتئین‌های نوترکیب را با استفاده از روش‌های ارزان غیر کروماتوگرافی امکان پذیر نموده است (Torrent et al. 2009; Llompart et al. 2010; Llop-Tous et al. 2011). به‌طور مشابه نشان داده شد که انواع مختلفی از دنباله‌های ELP برای افزایش تجمع و تخلیص همزمان تعدادی از پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان استفاده شده است. برای مثال نشان داده شده که این دنباله الحاق شونده تجمع قطعات آنتی‌بادی نوترکیب، پروتئین اینترلوکین، آنتی‌بادی علیه ویروس HIV و پروتئین GFP را در گیاهان به‌طور معنی داری افزایش داده و به‌طور همزمان منجر به تخلیص غیر کروماتوگرافی این پروتئین‌های نوترکیب شده است (Patel et al. 2007; Floss et al. 2008; Joensuu et al. 2010). توانایی دنباله ELP برای افزایش تجمع پروتئین نوترکیب ممکن است با مقاومت طبیعی آن علیه تجزیه توسط آنزیم‌های پروتئولیکی مرتبط باشد و بنابراین سطح تجزیه پروتئین را کاهش دهد. به‌علاوه نشان داده شده است که پروتئین‌های الحاق شده به ELP در اجسام پروتئینی تجمع یافته و در نتیجه آن‌ها را از فرآیندهای تجزیه سلولی محافظت نموده و عملکرد کلی پروتئین را افزایش داده است (Conley et al. 2011). جهت افزایش تجمع و تخلیص همزمان برخی از پروتئین‌های نوترکیب نیز از فناوری الحاق به دنباله HFBI استفاده شده است. معلوم گردیده است که الحاق HFBI به پروتئین هدف، می‌تواند به‌طور معنی‌داری بیان پروتئین‌های نوترکیب GFP، آنزیم گلوکز اکسیداز (Joensuu et al. 2010)، هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا (Jacquet et al. 2014) و آنتی‌بادی IgG1 (Kurppa et al. 2018) را در گیاهان توتون افزایش دهد و همچنین امکان تخلیص این پروتئین‌های نوترکیب را از طریق روش غیرکروماتوگرافی ارزان ATPS فراهم کند. این فناوری همچنین برای افزایش تجمع و تخلیص نانوبادی Anti-VEGF در گیاه کدو به‌طور موفقیت آمیز به‌کار گرفته شده است (Soleimanizadeh et al. 2018). از آنجایی که این دنباله‌های الحاق شونده ممکن است در نهایت ایجاد ایمنی‌زایی کنند، به‌منظور جداسازی پروتئین نوترکیب از دنباله الحاق شونده، یک محل برش پروتئازی می‌توان بین پروتئین نوترکیب و دنباله الحاق شونده قرار داد. هر چند که گزارشات نشان داده است که برخی از این دنباله‌ها (HFBI) طبیعت غیر سمی دارد و ایجاد ایمنی‌زایی نمی‌کند؛ اما لازم است آزمایشات بیشتری برای ارزیابی ایجاد ایمنی‌زایی این دنباله‌های الحاق شونده انجام پذیرد (Jacquet et al. 2014; Soleimanizadeh et al. 2018).

منابع

[30]. Human growth hormone
[31]. Epidermal growth factor

www.SID.ir

Archive of SID

جلالی جواران مختار، سلیمانی زاده مژگان، لطیف بابک همکاران (۱۳۹۳) مکانیسم‌های افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست. فن‌آوری زیستی در کشاورزی ۵، ۹۷-۸۷.

جلالی جواران مختار، محب الدینی مهدی، معصومی اصل اسد (۱۳۸۸) موفقیت‌های کشاورزی مولکولی (molecular farming) در ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱، ۴۸-۱۹.

سلیمانی زاده مژگان، جلالی جواران مختار، عبدالرضا باقری همکاران (۱۳۹۷) بررسی اثر بهینه‌سازی کدونی بر میزان بیان نانوبادی Anti-VEGF. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۹، ۱۰۰-۸۱.

References

Abdoli-Nasab M, Jalali-Javaran M, Cusidó RM et al. (2013) Expression of the truncated tissue plasminogen activator (K2S) gene in tobacco chloroplast. Mol Biol Rep 40, 5749-5758.

Alvarez ML, Topal E, Martin F, Cardineau GA (2010) Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation. Plant Mol Biol 72, 75-89.

Bagheri K, Javaran MJ, Mahboudi F et al. (2013) Expression of human interferon gamma in *Brassica napu*s seeds. Afr J Biotechnol 9, 5066-5072.

Barta A, Sommergruber K, Thompson D et al. (1986) The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. Plant Mol Biol 6, 347-357.

Bartlett JG, Snape JW, Harwood WA (2009) Intron-mediated enhancement as a method for increasing transgene expression levels in barley. Plant Biotechnol J 7, 856-866.

Benchabane M, Goulet C, Rivard D et al. (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. Plant Biotechnol J 6, 633-648.

Buyel J, Twyman R, Fischer R (2015) Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. Biotechnol Adv 33, 902-913.

Conley AJ, Joensuu JJ, Richman A, Menassa R (2011) Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of proteins in plants. Plant Biotechnol J 9, 419-433.

Desai P N, Shrivastava N, Padh H (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. Biotechnol Adv 28, 427-435.

Dirisala V R, Nair R R, Srirama K et al. (2017) Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. Acta Physiol Plant, 39, 18.

Evangelista R L, Kusnadi A R, Nikolov ZL (1998) Process and economic evaluation of the purification of β-glucuronidase from transgenic corn. Biotechnol Prog 14, 607-614.

www.SID.ir

Archive of SID

Floss DM, Sack M, Stadlmann J et al. (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol J 6, 379-391.

Ganapathy M (2016) Plants as bioreactors-a review. Adv Tech Biol Med 4, 2379-1764.

Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiol Mol Biol Rev 67, 16-37.

Gerasimova S, Smirnova O, Kochetov A, Shumnyi V (2016) Production of recombinant proteins in plant cells. Russ J Plant Physiol 63, 26-37.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. Curr Opin Biotechnol. 18, 134-141.

Hakanpää J. Paananen A, Askolin S et al. (2004) Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. J Biol Chem 279, 534-539.

Hefferon K (2017) Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. Biomed 5,44.

Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nat Biotechnol 22, 1415.

Hiatt A, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. Nat 342, 76-78.

Hood E, Witcher DR, Maddock S et al. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Mol Breed 3, 291-306.

Huang J, Yang J, Guan L et al. (2015). Expression of bioactive recombinant human fibroblast growth factor 10 in *Carthamus tinctorius* L. seeds. Protein Expr Purif 138, 7-12.

Jacquet N, Navarre C, Desmecht D, Boutry M (2014) Hydrophobin fusion of an influenza virus hemagglutinin allows high transient expression in *Nicotiana benthamiana*, easy purification and immune response with neutralizing activity. PloS one 9, e115944.

Jalali Javaran M, Mohebodini M, Masoumi Asl A (2010) The success of molecular farming in Iran. Agric Biotechnol J 1, 19-48 (in Persian).

Jalali Javaran M, Soleimanizadeh M, Latif B et al. (2014) Mechanisms to increase the production of recombinant proteins in plant chloroplasts. Agric Biotechnol 5, 87-97 (in Persian).

Jalali Javaran V, Shafeinia A, Javaran MJ et al. (2017) Transient expression of recombinant rt-PA gene in cucurbit plants using viral vector. Biotechnol Lett 39, 607-612.

Joensuu JJ, Conley AJ, Linder MB, Menassa R (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana.* Plant Physiol 152, 622-633.

Jung SK, McDonald KA (2016) Improved transient production of a cellulase enzyme in detached sunflower leaves using plant hormones. Biotechnol Bioprocess Eng 21,726-732.

www.SID.ir

Kang T J, Loc NH, Jang MO, Yang MS (2004) Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants. Mol Breed 13, 143-153.

Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci 122, 101-108.

Karimzadegan V, Javaran VJ, Shams Bakhsh M, Javaran MJ (2018) The Effect of MeJA and temperature on the transient expression of recombinant proteins in *Cucurbita pepo* L. Mol Biotechnol 61, 84-92.

Kopertekh L, Schiemann J (2017) Transient production of recombinant pharmaceutical proteins in plants: evolution and perspectives. Curr Med Chem 24, 1-16.

Kurppa K, Reuter LJ, Ritala A et al. (2018) In-solution antibody harvesting with a plant-produced hydrophobin-Protein A fusion. Plant Biotechnol J 16, 404-414.

Li X Q, Wei JZ, Aroian RV (2007) Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Plant Biotechnol J 5, 455-464.

Liu WX, Song YR, Qu LQ (2010) Evaluation of seed storage-protein gene 5′ untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed. Theor App Genet 121, 1267-1274.

Llompart B, Llop-Tous I, Marzabal P et al (2010) Protein production from recombinant protein bodies. Process Biochem 45, 1816-1820.

Llop-Tous I, Ortiz M, Torrent M, Ludevid MD (2011) The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants. PloS one 6, e19474.

Lojewska E, Kowalczyk T, Sakowicz T (2016) Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. Protein Expr Purif 120, 110-117.

Ma S, Wang A (2012) Molecular farming in plants: an overview, Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. pp. 1-20.

Menassa R, Ahmad A, Joensuu JJ (2012) Transient expression using agroinfiltration and its applications in molecular farming. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. pp. 183-198.

Mirzaee M, Jalali-Javaran M, Moieni A et al. (2018) Expression of VGRNb-PE immunotoxin in transplastomic lettuce (*Lactuca sativa* L.). Plant Mol Biol 97, 103-112.

Moustafa K, Makhzoum A, Trémouillaux-Guiller J (2016) Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. Crit Rev Biotechnol 36, 840-850

Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A, Kato K (2009) The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. Plant Cell Physiol 51, 328-332.

www.SID.ir

Archive of SID

Naik PM, Al-Khayri JM (2016) Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In: Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent. Advances and Future Perspectives, InTech. pp. 248-277.

Nausch H, Mikschofsky H, Koslowski R et al. (2012) High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. PloS one 7, e48938.

Nie L, Wu G, Zhang W (2006) Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. Biochem and Biophys Res Commun 339, 603-610.

Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. Biotechnol Adv 29, 210-222.

Park K Y, Wi SJ (2016) Potential of plants to produce recombinant protein products. J Plant Biol 59, 559-568.

Patel J, Zhu H, Menassa R et al. (2007) Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. Transgenic Res 16, 239-249.

Pillay P, Schlüter U, van Wyk S et al. (2014) Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells. Bioengineered 5, 15-20.

Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE et al. (2010) Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. Plant Biotechnol J 8, 638-654.

Rigano MM, Scotti N, Cardi T (2012) Unsolved problems in plastid transformation. Bioeng 3, 329-342.

Robert S, Sainsbury F, Michaud D (2015) Leaf proteome rebalancing in tobacco for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein. Plant Biotechnol J 13, 1169-1179.

Sabalza M, Christou P, Capell T (2014) Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. Biotechnol Lett 36, 2367-2379.

Sack M, Hofbauer A, Fischer R, Stoger E (2015) The increasing value of plant-made proteins. Curr Opin Biotechnol 32, 163-170.

Santos RB, Abranches R, Fischer R et al. (2016) Putting the spotlight back on plant suspension cultures. Front Plant Sci 7, 297.

Sharma AK, Sharma MK (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. Biotechnol Adv 27, 811-832.

Sijmons PC, Dekker B, Verwoerd TC et al. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Nat Biotechnol 8, 217-221.

www.SID.ir

Soleimanizadeh M, Bagheri A, Jalali javaran M et al. (2018) Enhanced expression and purification of anti-VEGF nanobody in cucurbit plants. J Plant Biochem Biot 1-8.

Soleimanizadeh M, Bagheri A, Jalali javaran M et al. (2018) Study of the effect of codon optimization on Anti-VEGF nanobody expression. Agric Biotechnol J 9, 81-100 (in Persian).

Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. Plant Biotechnol J 5, 2-15.

Thomas DR, Walmsley AM (2014) Improved expression of recombinant plant-made hEGF. Plant Cell Rep 33, 1801-1814.

Torrent M, Llompart B, Llop-Tous I et al. (2009) Eukaryotic protein production in designed storage organelles. BMC Biol 7, 5.

Tremblay R, Wang D, Jevnikar A M, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. Biotechnol Adv 28, 214-221.

Van Molle I, Joensuu JJ, Buts L et al. (2007) Chloroplasts assemble the major subunit FaeG of *E. coli* F4 (K88) fimbriae to strand-swapped dimers. J Mol Biol 368, 791-799.

Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. Plant Physiol 145, 1129-1143.

Webster GR, Ma JK C (2017) Synthetic gene design-The rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants. Biotechnol Bioeng 114, 492-502.

Wirth S, Calamante G, Mentaberry A et al. (2004) Expression of active human epidermal growth factor in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. Mol Breed 13, 23-35.

Xu J, Ge X, Dolan MC (2011) Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. Biotechnol Adv 29, 278-299.

Xu J, Towler M, Weathers PJ (2016) Platforms for Plant-Based Protein Production. Bioprocess Plant in Vitro Sys 1, 1-40.

Yarbakht M, Jalali-Javaran M, Nikkhah M, Mohebodini M (2015) Dicistronic expression of human proinsulin-protein A fusion in tobacco chloroplast. Biotechnol Appl Biochem 62, 55-63.

Zagorskaya A, Deineko EV (2017) Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins. Russ J Plant Physiol 64, 795-807.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir