تولید پروتئین‌های فعال بیولوژیکی توسط گیاهان

محمدرضا وردیان‌ریزی[۱]، عباس حاجی‌آخوندی[۲]*، مرتضی پیرعلی‌همدانی[۳]

۱- دستیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳ – دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی
تلفن: ٦٦٩٥٩٠٩٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٤٨١١٧٨ (٠٢١)
پست الکترونیک: abbhadji@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/۲/۲٦ **تاریخ تصویب: ۱۳۸٤/۱۲/۱۷**

چکیده

گیاهان به عنوان راکتورهای بیولوژیکی قادر به تولید موادی از جمله پروتئین‌ها می‌باشند. به منظور تولید یک پروتئین خاص ژن مربوط توسط دو سیستم شامل انتقال ژنتیکی پایدار و استفاده از حامل‌های ویروسی، وارد سلول گیاهی شده و در آنجا پروتئین مربوط را تولید خواهد کرد. از گیاهان مورد استفاده می‌توان تنباکو، یونجه و لاستیک را نام برد. پپتیدها مثل انکفالین‌ها، پروتئین‌های خونی مثل آلبومین، هورمون‌ها و سیتوکین‌ها مثل اینترفرون‌ها، ایمونوژن‌ها مثل آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B ،آنتی‌بادی‌ها مثل IgA ترشحی و آنزیم‌ها مثل گلوکاناز، فیتاز، گزیلاناز و آمیلاز از جمله پروتئین‌هایی هستند که تاکنون با این روش تولید شده‌اند.

گل‌واژگان: پروتئین، بیان ژن، گیاهان، راکتورهای بیولوژیک

www.SID.ir

مقدمه

با پیشرفت شناخت در مورد سیستم‌های بیان ژن‌های ناهمگون در گیاهان، علاقه فزاینده‌ای در استفاده از گیاهان به عنوان رآکتورهای بیولوژیکی، ایجاد شده است. گیاهان نسبت به سایر سیستم‌های بیان ژن از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و سلول‌های حشرات مزایایی دارند مثلاً می‌توانند به اصطلاح از خود مواظبت کنند، احتیاج به آب و خاک مناسب و نور بیشتری دارند و به همین خاطر نیازمند محیط‌های تخمیری با فناوری بالا و شرایط محیط استریل نیستند. حجم عظیمی از محصولات با پرورش ساده گیاهان در مزارع قابل تولید است و بنابراین گیاهان می‌توانند به عنوان منابع ارزان و قابل تجدید پروتئین‌های مورد استفاده در صنایع داروسازی، مورد استفاده قرار گیرند [۱،۲]. این مقاله شرایطی را که در آن پروتئین یا پپتیدهای بیان شده برای استفاده در محیط *ex Situ*، سودمند خواهد بود را مورد بحث قرار می‌دهد.

روش‌های بیان پروتئین‌های خارجی در گیاهان

به منظور وارد کردن ژن‌های خارجی به داخل گیاهان دو سیستم ابداع شده است: انتقال ژنتیکی پایدار و استفاده از حامل‌های ویروسی.

انتقال ژنتیکی پایدار شامل وارد کردن ژن‌های ناهمگون به داخل کروموزوم‌های تک تک سلول‌های گیاهی با استفاده از انتقال به کمک آگروباکتریوم یا به وسیله بمباران ذرات است. سلول‌های حاوی سکانس وارد شده معمولاً براساس مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتخاب شده و از این سلول‌ها، گیاه تولید می‌گردد. در روش دوم از حامل‌های ویروسی برای انتقال ژن‌ها به داخل سلول‌های گیاهی استفاده می‌گردد. بیان ژن خارجی در گیاه هدف، توسط تزریق ویروس دستکاری شده به داخل جوانه‌ها امکان‌پذیر است. این روش می‌تواند به سادگی مالیدن محلول تزریق ویروس بر روی برگ‌ها در حضور یک سمباده باشد [۳،٤].

انتخاب گیاه

در بسیاری از مطالعات اولیه بر روی بیان ژن‌های ناهمگون، انتخاب گیاه تا حد زیادی تحت تاثیر راحتی انتقال و احیای دوباره قرار دارد. مثل گیاه تنباکو[1] که برای بعضی مقاصد، گونه مناسبی است. از گیاهان دیگر می‌توان گیاه یونجه را نام برد که برای تولید زیاد آنزیم‌هایی که مصارف صنعتی دارند، مورد استفاده قرار گرفته است. مزیت این گیاه این است که در طی یک سال، ۳ بار قابل کشت است و احتیاج به کودهای نیتروژنی و آبیاری ندارد. گیاه دیگر، گیاه لاستیک[2] است که لاتکس مترشح شده از آن حاوی ۱۰ mg/ml پروتئین محلول است [۵].

مثال‌هایی از تولید پروتئین‌های ناهمگون درگیاهان

۱- پپتیدها

اولین تلاش برای تولید یک پپتید فعال از نظر فارماکولوژیکی در گیاهان شامل بیان یک پنتا پپتید به نام Leu-enkephalin است که به داخل آلبومین ادغام شده است. آلبومین پروتئین عمده موجود در دانه‌ها در بسیاری از گونه‌ها می‌باشد و خالص‌سازی آن با توجه به اندازه کوچک و حلالیت مخصوص در محلول‌هایی با غلظت پایین نمک، امکان‌پذیر است. بعد از جداسازی آلبومین‌ها، پپتید موردنظر توسط تریپسین و کربوکسی پپتیداز B آزاد شده و توسط HPLC خالص می‌گردد [٦].

۲- پروتئین‌های خونی

یکی از این پروتئین‌ها، آلبومین سرم انسانی (HSA) می‌باشد که ژن کددهنده آن وارد گیاه سیب‌زمینی شده است. حداکثر سطح بیان ژن ۰/۰۲ درصد پروتئین محلول در عصاره‌های برگ می‌باشد. بعد از خالص‌سازی، پروتئین بیان شده توسط گیاه، ویژگی‌های یکسانی با HSA طبیعی دارا است [۷،۸].

مثال دیگر، زنجیره‌های α و β گلوبین انسانی است که ژن آن به گیاه تنباکو وارد شده است. میزان بیان هموگلوبین انسانی ۰/۰۵ درصد کل پروتئین استخراجی در دانه‌های گیاه می‌باشد. زنجیره‌های گلوبین بیان شده توسط گیاه از نظر اندازه برابر هموگلوبین انسانی می‌باشند [۹].

۳- هورمون‌ها و سیتوکین‌ها

اثبات شده است که گیاه تنباکو می‌تواند اینترفرون‌های α و β انسانی را در مقادیر قابل شناسایی، تولید کند. هنگامی که

[1] *Nicotiana tabacum* [2] *Hevea brasiliensis*

Archive of SID

www.SID.ir

گیاه برنج، توسط سکانس کدکننده اینترفرون α انسانی نوترکیب گردد، فعالیت اینترفرونی در عصاره‌های حاصل از برگ آن، قابل شناسایی است [۱۰].

اریتروپویتین یک سیتوکین می‌باشد که تنظیم‌کننده تولید اریترویسیت‌ها در پستانداران می‌باشد و در درمان کم‌خونی هم کاربرد دارد. این پروتئین توسط محیط کشت سلولی تنباکو تولید شده است. اریتروپویتین حاصل توسط immunoaffinity chromatography از عصاره سلولی قابل استخراج است و میزان تولید آن ۱۳۱ میلی‌گرم از ۶۳ کیلوگرم سلول تنباکو می‌باشد [۱۱].

٤- ایمونوژن‌ها

اولین تلاش برای تولید مواد ایمونوژنتیک در گیاهان شامل انتقال ژن کددهنده آنتی ژن سطحی هپاتیت B، به داخل گیاه تنباکو می‌باشد. مقدار بیان ژن برابر ۰/۰۱ درصد پروتئین محلول می‌باشد. ذرات پروتئینی چگالی برابری با ذرات پروتئینی بیان شده توسط مخمر داشته و هنگامی که فرآورده نسبتاً خالص آن به موش تزریق شود، مقدار تولید آنتی‌بادی ضدهپاتیت B، برابر مقدار به دست آمده از آنتی‌ژن سطحی بیان شده توسط مخمر، می‌باشد [۱۲،۱۳]. برای ارزیابی امکان استفاده از گیاهان برای تولید واکسن‌های خوراکی، گیاهان سیب زمینی و تنباکو توسط انتروتوکسین حساس به گرمای *E. coli* نوترکیب شده‌اند. هنگامی که عصاره خام انتروتوکسین‌های تولید شده توسط تنباکو از طریق لوله‌گذاری معدی به موش خورانده شد، پاسخ ایمنی در سطح معادل آنچه که به وسیله مصرف خوراکی انتروتوکسین باکتریایی تحریک می‌گردد، تحریک شد [١٤].

٥- آنتی‌بادی‌ها

اولین تلاش برای تولید یک آنتی‌بادی در گیاهان، بیان یک IgG موشی سالم در گیاهان تنباکوی نوترکیب می‌باشد. میزان تولید پروتئین برابر ۱ درصد پروتئین محلول می‌باشد. آنتی‌بادی‌های تولید شده در گیاهان گلیکوزیله بوده اگر چه تفاوت‌هایی در استخلاف قندی بین آنتی‌بادی‌های موش و گیاهی وجود دارد [١٥،١٦]. مثال دیگر، بیان IgA ترشحی در تنباکو می‌باشد. برای تولید یک آنتی‌بادی سالم، ژن‌های کدکننده یک آنتی‌بادی مونوکلونال موشی معروف به Guy's 13 به داخل تنباکو وارد شده است. کاربرد سطحی این آنتی‌بادی موشی بر روی دندان، دندان را در برابر رشد استرپتوکوس موتانس[1] که یکی از عوامل فساد دندان است، محافظت می‌کند و امید می‌رود مواد گیاهی بیان‌کننده IgA ترشحی در مبارزه علیه فساد دندان مفید باشند [۱۷].

٦- آنزیم‌ها

٦-١- آلفا آمیلاز

آلفا آمیلاز اولین آنزیم مهم از نظر صنعتی است که در گیاهان نو ترکیب تولید شده است. این آنزیم به خاطر پایداری در برابر گرما و فعالیت در طیف وسیعی از pH، رایج‌ترین ماده‌ای است که در روان‌سازی نشاسته مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بررسی بیان این آنزیم در گیاهان، ژن آنزیم از باکتری *Bacillus licheniformis* به داخل سلول‌های گیاه تنباکو انتقال داده شده است. حداکثر بیان ژن در برگ‌های گیاهان نوترکیب تقریباً ۰/۳ درصد کل پروتئین محلول می‌باشد. فعالیت آنزیم نسبت به پروتئین محلول در مایع خارج سلولی تقریباً ۳۰ برابر بیشتر از عصاره تام برگ‌ها می‌باشد [۱۸].

٦-٢- بتا گلوکاناز

تجزیه بتا گلوکان‌ها (جز اصلی تشکیل‌دهنده دیواره سلولی آندوسپرم جو) یک مرحله حیاتی در پروسه تولید مالت می‌باشد. این تجزیه در اثر فعالیت بتا گلوکاناز اتفاق می‌افتد. این آنزیم به گرما حساس می‌باشد و بنابراین علاقه فزاینده‌ای در بیان آنزیم‌های مقاوم به گرما در جو ایجاد شده است [۱۹]. اولین تلاش‌ها شامل بیان ژن بتا - گلوکاناز مقاوم به گرما از قارچ *Trichoderma reesei* می‌باشد که در محیط کشت سلولی جو انجام گرفته است. سکانس کددهنده توسط بمباران ذرات وارد سلول‌ها گردیده و آنزیم تولید شده در محیط کشت تا سطح mg/l ۰/۵ قابل شناسایی است. این آنزیم در ۵۰ درجه سانتی‌گراد پایدار بوده و قادر به تجزیه بتا گلوکان‌ها در طی پروسه مالت‌سازی است [۲۰].

[1] *Streptococcus mutans*

Archive of SID
www.SID.ir

٦-٣- گزیلاناز

گزیلانازها باعث تبدیل گزیلان‌ها (که در فراکسیون همی سلولزی دیواره سلولی گیاهان قرار دارند) به گزیلوز می‌شوند. این فعالیت در تولید غذای حیوانات از پسماندهای کاغذسازی، خارج کردن گزیلان از سلولز و خارج کردن انتخابی گزیلان‌ها از فیبرهای گیاهی، مهم می‌باشد.

در یکی از موارد بیان ژن کدکننده گزیلاناز، گیاه تنباکو توسط یک ژن مشتق شده از باکتری کلستریدیوم ترموسلوم[1] نوترکیب شده است. مقادیر قابل توجهی آنزیم در عصاره تام برگ‌های گیاهان نوترکیب قابل شناسایی بوده و هنگامی که مایع داخل سلولی مورد آزمایش قرار گرفت، آنزیم تولیدی ٥٠ درصد پروتئین تام را تشکیل می‌داد [٢١].

٦-٤- فیتاز

فیتات (میواینوزیتول هگزافسفات) شکل اصلی ذخیره‌ای فسفات در دانه‌های گیاهی است که در غذای حیوانات مصرف می‌گردد. در گیاهان فسفات ذخیره شده توسط فعالیت فیتازها قابل آزادسازی می‌باشد. بعضی حیوانات چنین آنزیم‌هایی را ندارند و از فیتات‌ها نمی‌توانند استفاده کنند. در نتیجه فسفات غیرآلی به عنوان مکمل غذایی به غذای آنها اضافه می‌گردد. یک روش دیگر اضافه کردن یک فیتاز از آسپرژیلوس نیجر به غذای خوک‌ها و ماکیان می‌باشد. به منظور تولید این آنزیم، گیاه تنباکو توسط ژن کددهنده فیتاز نوترکیب شده است. بعد از بیان ژن، فیتاز تولید شده در گیاهان نوترکیب قابل شناسایی بوده و سطح آن ١٤/٤ درصد کل پروتئین محلول برگ‌ها می‌باشد. این سطح از پروتئین برابر با ٠/٣ درصد کل وزن خشک برگ‌ها بوده و توانایی پروتئین برای تغلیظ تا این حد، نشان‌دهنده پایداری آن می‌باشد [٢٢،٢٣].

خالص‌سازی پروتئین‌های و پپتیدهای بیان شده توسط گیاه

در موارد خاص، مثل ایجاد واکسن‌های خوراکی یا وارد کردن یک فعالیت آنزیمی در دانه، خالص‌سازی پروتئین بیان شده مورد نیاز نیست ولی در موارد دیگر مثل مصارف دارویی تا حدودی استخراج، غنی‌سازی یا خالص‌سازی برای استفاده بعدی مورد نیاز می‌باشد.

یکی از روش‌های خالص‌سازی، انتقال پروتئین یا پپتید به داخل یک ناقل که به آسانی قابل خالص‌سازی است، می‌باشد. مثالی برای این روش وارد کردن پروتئین ناهمگون به داخل اولئوزین[1] می‌باشد. اولئوزین‌ها، پروتئین‌های شدیداً لیپوفیلی هستند که در سطح اجسام روغنی قرار دارند و در دانه‌های روغنی فراوان هستند. هنگامی که دانه‌ها با بافرهای مایی استخراج گردند، اجسام روغنی که حاوی اولئوزین هستند. سالم باقی‌مانده و به آسانی از سایر اجزای سلولی با توجه به تمایل آنها برای شناور شدن در محلول سانتریفوژ، قابل جداسازی هستند [٢٤].

نگاهی به آینده

در حال حاضر، اولین گیاهان اصلاح شده از نظر ژنتیکی (به عنوان مثال گوجه فرنگی‌های Flavrsarr ^{Tm} و ذرت مقاوم به حشره) وارد بازار شده‌اند. اگر چه هدف این مثال ها ارایه یک ویژگی دلخواه بر روی گیاه به جای استفاده از آن به عنوان یک رآکتور بیولوژیکی است، ولی همین مثال‌ها پیشنهاد می‌کند که تجارتی شدن گیاهان بیان کننده سکانس‌های ناهمگون برای کاربردهای *ex Situ*، زیاد دور نمی‌باشد. اخیراً اثبات شده است که ذرات ویروسی گیاهی اصلاح شده می‌توانند حیوان‌های هدف را در برابر یک بیماری مهم، محافظت کنند [٢٥] و چنین اثباتی دورنمای استفاده از گیاهان برای تولید مواد دارویی را نزدیک‌تر کرده است. به شرطی که به مشکلات مرتبط با استفاده از آنها توجه کافی مبذول گردد، استفاده از گیاهان به عنوان رآکتورهای بیولوژیکی برای تولید پروتئین‌های فعال بیولوژیکی درآینده بسیار سودمند خواهد بود.

[1] *Clostridium thermocellum* [2] *Aspergillus niger*

[1] Oleosins

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Goddijn O J M. and Pen J. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol.* 1995; 13: 379-384.

2. Duvick D N. Utilization of biotechnology in US plant breeding, *Bitechnol. and Develop. Monitor*. 1995; 27: 15-17.

3. Porta C and Lomonossoff G P. Use of viral replicons for the expression of genes in plants. *Molecular Biotechnology*. 1996; 5: 209-221.

4. Scholtof H B. Scholtof G and Jackson A O. Plant viruses gene vectors for transient expression of poreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol*. 1996; 34: 229-232.

5. Austin S. Bingham E T. Koegel R G. Maththews E E. Shahan M N. Straub R J and Burgess R R. Feedstocks: new supplies and processing. *Ann. NY Acad. Sci*. 1994; 721: 234-243.

6. Vandekerckhove J. van Damme J. van Lijsebettens M. Botterman J. de Block M. Vanhewiele M. De Clercp A. Leemans J. van Montagu M. and Krebbers E. Enkephalins production in transgenic plants using modified 2S seeds storage proteins. *BioTechnology*. 1989; 7: 929-936.

7. Sijmons P C. Dekker B M M. Schrammeijer B. Verwoerd T C. van den Elzen P J M and Hoekema A. Production of recombinant proteins in transgenic plants. *Bio/Technology*. 1987; 8: 622-627.

8. Jobling S A and Gehrke L. Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature*. 1987; 325: 622-625.

9. Direyck W. Pagnier J. Poyart C. Marden M C. Gruber V. Bournat P. Baudino S. and Merot B., Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*. 1997; 386: 29-34.

10. Edelbaum O. Stein D. Holland N. Gafni Y. Livneh O. Novick D. Rubinsterin M. and Sela I. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants *J. Interferon Res.* 1992; 12: 449-453.

11. Matsumoto S. Ishii A. Ikura K. Ueda M. and Sasaki R. Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1993; 57: 1249-1252.

12. Mason H S. Lam D MK. and Amtzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 11745-11749.

13. Thanavala Y. Yang YF. Lyons P. Mason H S. and Amtzen C. Immunogenicity of transgenic plant-drived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 3358-3361.

14. Haq T A. Mason H S. Clements J D. and Arntzen C J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*. 1995; 268: 714-716.

15. Hiatt A. Cafferkey R. and Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 1989; 342: 76-78.

16. Hiatt A. and Mostov K. In Transgenic Plants: Fundamentals and Applications ed. A. Hiatt (Marcel Dekker, New York. 1993) 221-234.

17. Hein M B. Tang Y. Mcleod D A. Janda K D. and Hiatt A C. Evaluation of immunoglobulins from plant cells, *Biotechnol. Prog.* 1991; 7: 455-461.

18. Pen J. Molendijk L. Quax WJ. Sijmons PC. van Ooyen AJJ. van den Elzen PJM. Rietveld K. and Hoekema A. Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. Bio/Technology 1992; 10: 292-296.

19. McElroy D. and Jacobson J. What is brewing in barley biotechnology. *Bio/Technology*. 1995; 13: 245-249.

20. Aspegren K. Mannonen L. Ritala A. Puupponen-Pimiä R. Kurtén U. Salmenkallio-Marttila M. Kauppinen V. and Teeri TH. Secretion of a heat-stable fungal -glucanase from transgenic, suspension-cultured barley cells. *Mol. Breeding*. 1995; 1: 91-99.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Herbers K. Wilke I. and Sonnewald U. A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/Technology*. 1995; 13: 63-66.

22. Pen J. Verwoerd TC. van Paridon PA. Beudeker RF. van den Elzen PJM. Geerse K. van der Kils JD. Versteegh HAJ. van Ooyen AJJ. and Hokema A. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology*. 1993; 11: 811-814.

23. Verwoerd TC. van Paridon PA. van Ooyen AJ. van Lent JW. Hoekema A. and Pen J. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol*. 1995; 109: 1199-1205.

24. Van Rooijen G J H. and Moloney M M. Plant seed oils bodies as carriers for foreign proteins, *Bio/Technology* 1995; 13: 72-77.

25. Dalsgaard K. Uttenthal A. Jones T. D. Xu F. Merryweather A. Hamilton W D O. Langebeld P J M. Boshuizen R S. Kamstrup S. Lomomossoff G P. Porta C. Vela C. Casa J I. Meloen R H. and Rodgers P B. Plant-drived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology*. 1997; 15: 248-252.

Archive of SID

www.SID.ir