

موفقیت های کشاورزی مولکولی (Molecular farming) در ایران

مختار جلالی جواران<sup>1\*</sup>، مهدی محب‌الدینی<sup>1</sup>، اسد معصومی اصل<sup>1</sup>، حیدر سیفی نبی آباد<sup>1</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>4</sup>، فریدون مهبودی<sup>3</sup>، احمد اسماعیلی<sup>1</sup>، حمید رجبی معماری<sup>1</sup>، احمد معینی<sup>1</sup>، حسین هنری<sup>4</sup>، خدیجه باقری<sup>1</sup>، محمد مهدی یعقوبی<sup>5</sup>، علیرضا زبرجدی<sup>9</sup>، محمد جواد رسایی<sup>2</sup>، علی محمد شکیب<sup>6</sup>، فاطمه رهبری زاده<sup>2</sup>، حسین معصومی<sup>7</sup>، مهدی فروزنده مقدم<sup>2</sup>، رضا شریفی سیرچی<sup>7</sup>، سبا دیمیاد<sup>1</sup>، سید احمد سادات نوری<sup>8</sup>، ندا ویشلقی<sup>1</sup>، اکبر حسینی پور<sup>7</sup>، نازنین طاهری جوان<sup>1</sup>، شهلا رزمی<sup>1</sup>، پویا رحیمی فر<sup>8</sup>، بابک لطیف<sup>1</sup>، مریم عبدلی نسب<sup>1</sup>، حامد اژدری<sup>1</sup>، مسلم پورخالقی<sup>7</sup>، آرش رزمی<sup>1</sup>، حسین خسروی<sup>1</sup>، هادی کاظمی<sup>1</sup>

1 گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

2 گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

3 گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران

4 گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

5 مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان

6 پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

7 دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

8 پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

9 دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

چکیده

با بهره گیری از تکنولوژی زراعت مولکولی (Molecular farming) توانسته‌ایم گیاهان را به عنوان بیوراکتور، برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب ارزان، با ارزش افزوده بالا تبدیل کنیم. این تکنولوژی موفقیت‌هایی در زمینه تجاری‌سازی چند محصول اولیه بدست آورده و محصولات نو ترکیب متعدد دیگری فازهای نهایی تولید را می‌گذرانند. طی ده سال گذشته بیش از 100 پروتئین نو ترکیب در گیاهان تراریخت تولید شده و یا در حال تولید می‌باشد. گیاهان دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سیستم‌های بیانی، بویژه از نظر اقتصادی، ایمنی، عملیات اجرایی و تولید می‌باشند. اما به هر حال مشکلاتی هم در پیش رو جهت استفاده از گیاهان به عنوان راکتورهای زیستی وجود دارد که باید بر طرف شوند. از جمله این عوامل مهم: کیفیت محصول نهایی، تخلیص و فرآوری ماکرومولکول‌های دارویی مشتق شده از گیاهان و همچنین ایمنی زیستی می‌باشد. در این مطالعه سعی خواهد شد علاوه بر مرور کشاورزی مولکولی در جهان، به مواردی از موفقیت‌های حاصل شده در این زمینه در ایران اشاره گردد. طی بیش از 8 سال تحقیق در زمینه کشاورزی مولکولی در ایران به ویژه در دانشگاه تربیت مدرس، می‌توان به بخشی از این موفقیت‌ها اشاره نمود: 1- تولید آنتی بادی تک دومینی V<sub>HH</sub> در گیاهان توتون و کلزا 2- تولید پروتئین نو ترکیب tPA در

توتون 3- بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در کلزا و توتون 4- انتقال ژن لوسیفراز کرم شبتاب به کلزا، توتون، بنفشه آفریقایی و ... مواردی از موفقیت‌های حاصل است. پروژه‌های ارزشمند دیگری در زمینه انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان مانند توتون و کاهو در حال اجرا است که بحمد... به موفقیت‌های اولیه خوبی رسیده است. در پروژه انتقال ژن پروانسولین به کلروپلاست، پس از تهیه سازه کلروپلاستی حاوی ژن پروانسولین، با استفاده از روش بیولستیک ژن هدف به کلروپلاست گیاه توتون منتقل گردید. سلولهای تراریخت روی محیط اسپکتینومايسين باززایی و گیاه کامل بدست آمد. گیاهان حاصله با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش PCR بررسی شدند که اکثر گیاهان تراریخت بودند.

**کلمات کلیدی:** کشاورزی مولکولی، گیاهان تراریخت، پروتئین‌های نو ترکیب، بیوراکتور.

#### مقدمه

نامحدود آنتی بادی‌های نو ترکیب، واکسن‌ها، جایگزین‌های خوبی، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها می‌باشد (Schillberg & Fischer, 1999). هم‌اکنون با رشد شدید تقاضا برای پروتئین‌های دارویی و تشخیصی مواجه هستیم اما ظرفیت و امکانات موجود جوابگوی نیازهای مورد نظر نیست. به نظر می‌رسد که در سال‌های آینده جایگزینی بیوراکتورهای گیاهی به جای سایر سیستم‌ها تولید پروتئین‌های نو ترکیب ضروری گردد.

گیاهان تراریخت به عنوان بیوراکتورهای مفید و جالب برای تولید ارزان و فراوان یک درشت مولکول<sup>1</sup> نو ترکیب و فعال مثل ترکیبات خونی، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد، آنتی بادی‌ها و آنزیم‌ها مطرح می‌باشند (Fischer et al., 2004). تا بحال چندین پروتئین دارویی مختلف از طریق گیاهان تراریخت تولید و تجاری شده اند (Fischer & Emans, 2000; Giddings, 2001). با این وجود باید توجه کرد که پتانسیل

هزاران سال است که بشر از گیاهان به عنوان یک منبع مواد خام و انواع داروهای گیاهی استفاده می‌کند. همزمان با شکل‌گیری اولین تمدن‌ها بشر از عصاره‌های گیاهی جهت درمان بیماری‌ها و تسکین دردها استفاده کرده است. از اواخر قرن هفدهم تعداد زیادی پروتئین‌های دارویی ارزشمند از طریق تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی و پزشکی مولکولی کشف شدند. اما تاکنون تولید این مولکول‌ها به علت عوامل متعددی مانند عملکرد پایین تولید، کیفیت نامناسب تولید، ظرفیت پایین تولید و... گسترش نیافته است. در اواخر دهه 80 میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نو ترکیب در گیاهان، باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان‌تر و ایمن‌تر بودند. تولید زیست‌داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی "Molecular farming" گویند. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید

<sup>3</sup> -Macro molecule

می رسد (A8706: sigma). پروتئین  $\beta$ -گلوکوروئیداز (Gus) در ذرت تراریخت تولید شده (Witcher *et al.*, 2035: sigma) و (1998) و تریپسین نیز در بذر ذرت تولید شده و هم اکنون به فروش می رسند (Woodard *et al.*, 2005).

از مهمترین فعالیتهای انجام گرفته در زمینه کشاورزی مولکولی در ایران می توان به بیان آنتی بادی منوکلونال VHH در توتون و کلزا (Rajabi-Memari *et al.*, 2006; Ismaili *et al.*, 2006; Dymyad, 2007)، بیان اینترفرون گامای انسانی در برگ و بذر کلزا (Bagheri, 2009; Taheri, 2008; Rahimi Far, 2008; Javan, 2008)، بیان پروتئین نوترکیب t-PA انسانی در توتون (Masoumi Asl, 2009) استخراج و تخلیص t-PA نوترکیب انسانی از گیاهان تراریخت توتون (Seifi Nabi Abad, 2009) اشاره کرد.

#### اهمیت کشاورزی مولکولی

کشاورزی مولکولی پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین های نوترکیب (آنتی بادی ها، واکسن ها، جایگزین های خونی، فاکتورهای رشد و آنزیم ها) دارد. در حال حاضر در جهان یک پذیرش عمومی برای تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان بوجود آمده است (Julian *et al.*, 2003). هم اکنون در ایالت کنتاکی آمریکا، گیاهان توتون به کارخانه های تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده اند (Julian *et al.*, 2003). در ایالت ویرجینیا، ذرت برای معالجه بیماری Cystic Fibrosis برداشت

بالای تولید پروتئین های دارویی در گیاهان فقط در صورتی محقق می شود که محصولات بدست آمده، استانداردهای کیفی لازم را داشته باشند تا بتواند از مراجع نظارتی مجوز های لازم را کسب و در آزمایش های بالینی و درمان مورد استفاده قرار گیرند. برای رسیدن به این اهداف باید فناوری های مربوط به بهبود عملکرد را از نظر کمی توسعه داده، از کیفیت و پایداری محصولات مطمئن گردیده و مراحل تخلیص و پردازش فرآورده را نیز به خوبی انجام داد (Strasser *et al.*, 2004).

#### مختصری از تاریخچه کشاورزی مولکولی

کشاورزی مولکولی از زمانی مطرح گردید که اولین بار گیاهان عالی با موفقیت تراریخت شدند (Fraleley *et al.*, 1983). اولین گزارش از تولید آنتی بادی های انسانی در گیاه در سال 1988 و توسط دورینگ با عنوان بیان لیزوزیم T4 و آنتی بادی منوکلونال در گیاهان توتون گزارش گردید (During 1988) که بعداً هیات و همکاران این آنتی بادی را به صورت ترشحي بیان کردند (Hiatt *et al.*, 1989). اولین پروتئین دارویی نوترکیب نیز سرم آلبومین انسانی در گیاه تراریخت توتون بود (Stoger *et al.*, 2002). البته امروزه تعداد بسیاری از آنتی بادی ها و پروتئین های نوترکیب دارویی در گیاهان بیان شده اند که برخی به مرحله تجاری سازی رسیده و برخی دیگر در مراحل اولیه (یک و دو) تولید می باشند. از جمله آویدین که در ذرت های تراریخت بیان و توسط شرکت سیگما به فروش

مزایا و معایب تولید پروتئین های نو ترکیب در گیاهان تراریخت

هزینه های تولید: مزیت عمده گیاهان تراریخت جهت تولید پروتئین های نو ترکیب با هزینه پایین، تولید در حجم بالا در مقیاسه با سایر سیستمهای تولیدی می باشد. هزینه های ثابت و متغیر تولید در گیاهان به صورت معنی داری پایین تر از سیستم های تولید محصول از طریق میکروارگانیزم ها و کشت سلول های حیوانی می باشد، زیرا در سیستم های بیانی گیاهی به فرماتور و اشخاص با تخصص و مهارت بالا برای کار با این فرماتورها نیازی نیست (Twyman *et al.*, 2003). تخمین زده می شود که هزینه تولید پروتئین های نو ترکیب در گیاهان 10-2 درصد هزینه سیستم های میکروبی و 0/1 درصد کشت های سلولی پستانداران باشد (Giddings 2001). به طور متوسط حدود 1-0/1 درصد از پروتئین های محلول کل گیاهی مربوط به پروتئین نو ترکیب مورد نظر می باشد (Hood, 2002). برای تولید و تخلیص فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی (t-PA) از گیاهان تراریخت توتون، نتایج تحقیقات ما در دانشگاه تربیت مدرس نشان داد که حدود 0/16 درصد از پروتئین های کل برگگی را t-PA نو ترکیب تشکیل می دهد (Seifi Nabi Abad, 2009). در هر سیستم بیانی، مقیاس پذیری یک مزیت تجاری مهم محسوب می شود. سیستم های فرمنتاسیون و حیوانات تراریخت از این نظر پتانسیل محدودی دارند، در حالی که میزان تولید از طریق

می شود و در نبراسکا محققین امیدوارند که در مزارع، محصولات جهت درمان بیماری ایدز تولید کنند (Fischer & Stoger, 2004). این فعالیت ها بیش از یک دهه است که انجام می شود، اما محصولات ذکر شده مراحل نهایی فرآوری خود را به تازگی پشت سر گذاشته و وارد آزمایشات کلینیکی و فرایند تجاری شدن گردیده اند. در حال حاضر، تعدادی از بیماران مقادیری از این گیاهان را به عنوان دارو استفاده می کنند (Gidding *et al.*, 2000). امروزه آنتی بادی های نو ترکیب حدود 30٪ از تولید پروتئین های بیولوژیک را به خود اختصاص داده اند (Joosten *et al.*, 2003). فروش جهانی پروتئین های دارویی نو ترکیب در سال 1995 بالغ بر 10 میلیارد دلار و در سال 2005 این رقم 16 میلیارد دلار بوده است (Fischer & Stoger, 2004). در حال حاضر حدود 20 پروتئین نو ترکیب در بازار وجود دارد که 60٪ فروش آنها مربوط به شش پروتئین دارویی است (Ma & Hiatt, 1996). این شش پروتئین نو ترکیب دارویی عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، واکسن هپاتیت B، هورمون رشد انسانی، انسولین و ایتترفرون آلفا. بیوراکتورهای گیاهی می توانند تا 10 کیلوگرم آنتی بادی در هکتار تولید کنند. قیمت تمام شده آنتی بادی در گیاهان در مقایسه با تولید آن در بیوراکتورهای دیگر حدود یک دهم تا یک هزارم است (Gidding *et al.*, 2000; Daniel, 2003).

پلاسمایی تجمع یافته و می‌تواند در یک حجم کوچک و با استفاده از بافرها و شوینده‌های مناسب استخراج شود (Twyman *et al.*, 2003). راهکار دیگر شامل به کارگیری قابلیت برخی از بافت‌ها مثل ریشه و برگ برای ترشح پروتئین نوترکیب در ترشحات آنها می‌باشد (Borisjuk *et al.*, 1999; Komarnytsky, 2000; Drake *et al.*, 2003).

#### کیفیت پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاهان

استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌های دارویی نسبت به سیستم‌های میکروبی و حیوانی ایمن‌تر می‌باشد (Jalali Javaran *et al.*, 2008). زیرا معمولاً گیاهان فاقد عوامل بیماری‌زای انسانی، توالی‌های DNA انکوژن و اندوتوکسین‌ها می‌باشند (Commandeur *et al.*, 2003). به هر حال لازم است که ایمنی ذاتی پروتئین‌های انسانی تولید شده از طریق گیاهان مورد توجه قرار گیرد، زیرا صحت ساختاری این پروتئین‌ها برای فعالیت‌های درون سلولی (*in vivo*) بسیار مهم می‌باشد (Strasser *et al.*, 2004). مسیر سنتز پروتئین در گیاهان و حیوانات مشابه می‌باشد طوری که گیاهان قابلیت بسته بندی<sup>1</sup> و سرهم کردن<sup>2</sup> پروتئین‌های نوترکیب انسانی را دارا می‌باشند (Twyman *et al.*, 2003)، اما در باکتری‌ها این فعالیت‌ها به خوبی صورت نگرفته و موجب تشکیل انکلوژن بادی‌های غیر محلول می‌شود. این قابلیت گیاهان زمانی مشخص شد

گیاهان را می‌تواند به راحتی و با توجه به تقاضای بازار، با کم و زیاد کردن سطح زیر کشت محصولات تراریخت به سادگی تنظیم نمود (Twyman *et al.*, 2003). سرعت بالا بردن مقیاس تولید نیز مهم است، مثلاً برای افزایش 10 برابری مقیاس تولید در گله‌های گوسفند تراریخت (با استفاده از چرخه‌های اصلاحی مرسوم) زمان زیادی لازم است، در حالیکه سطح زیر کشت گیاهان تراریخت را می‌توان در یک فصل زراعی تا بیشتر از 1000 برابر افزایش داد (Schillberg *et al.*, 2002).

هزینه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب با میزان درجه خلوص آن پروتئین در زمان مصرف ارتباط معنی‌داری دارد، زیرا بیش از 85٪ هزینه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان به تخلیص و فعالیت‌های پایین دستی آن اختصاص دارد (Twyman *et al.*, 2003). البته برای پروتئین‌های دارویی که نیاز به درجه خلوص بالایی دارند، برای کاهش هزینه‌های پایین دستی می‌توان راهکارهای زیادی اعمال کرد. از جمله این روش‌ها می‌توان به هدف‌گیری یا بیان پروتئین نوترکیب در یک بافت خاص مانند بذر اشاره کرد (Bagheri, 2009). هزینه‌های تخلیص با غلظت پروتئین نوترکیب در مواد خام رابطه معکوس دارد (Ziegelhoffer *et al.*, 2001; Stoger *et al.*, 2000). به عنوان مثال اگر پروتئین نوترکیب به عنوان یک ساختار همجوش دارای دامین داخل‌غشایی گیرنده سلول T انسانی، در گیاه بیان شود، پروتئین نوترکیب در غشاء

<sup>1</sup> Folding

<sup>2</sup> -Assembling

عبارتند از: 1- استفاده از آنزیم های تخلیص شده  $\beta(1-4)$  گالاکتوزیل ترانسفراز<sup>2</sup> و سیالیل ترانسفراز<sup>3</sup> برای ایجاد تغییرات درون شیشه ( *in vitro*) در پروتئین های نو ترکیب حاصله از گیاهان تراریخت (Blix et al., 2002). 2- بیان همزمان  $\beta(1-4)$  گالاکتوزیل ترانسفراز انسانی با تراریختی مورد نظر در گیاهان تراریخت (Twyman et al., 2003). افزودن برخی گروه های کربوهیدراتی دارای اسید سیالیک (سیالیلاسیون) در شرایط درون سلولی برای گیاهان سخت تر می باشد، زیرا گیاهان پیش سازهای متابولیکی که قادر به تولید این گروه های کربوهیدراتی باشند، را ندارند. برای حل این مشکل معمولاً گروه های کربوهیدراتی را مستقیم اضافه می کنند. البته مشکل برداشتن کربوهیدرات های ویژه گیاهی همچنان وجود دارد. با استفاده از آنتی بادی ها، ریبوزیم ها و یا RNAi (مداخله گر) می توان مشکل بازدارندگی آنزیم های فکوزیل ترانسفراز<sup>4</sup> و زایلیل ترانسفراز<sup>5</sup> را حل کرد (Twyman et al., 2003).

راهکارهای مناسب دیگر برای دستکاری مسیر گلیکوزیلاسیون و جلوگیری از اضافه شدن N - گلیکان های ایمنی زا به پروتئین های دارویی تولید شده در گیاه، ذخیره پروتئین دارویی درون شبکه آندوپلاسمی است. کارایی این استراتژی اخیراً اثبات شده است که از طریق افزودن

که گیاهان تراریخت قادر به تولید آنتی بادی های سرم فعال (شامل چهار زنجیر پلی پپتیدی که به صورت پیوند کوالانسی دی سولفیدی به هم وصل شده اند) گردیدند (Stoger et al., 2002; Schillberg et al., 2005). گرچه مسیر سنتز پروتئین ها در حیوانات و گیاهان یکسان است اما تغییرات پس از ترجمه مقداری متفاوت می باشد، که عمده این تفاوت ها در ساختار زنجیره گلیکان<sup>1</sup> می باشد. پروتئین های نو ترکیب تولید شده از طریق گیاهان معمولاً دارای گروه های کربوهیدرات  $\beta(1-2)$ Xylase و  $\alpha(1-3)$ -Fucose می باشند که این نوع زنجیره های قندی در پستانداران وجود ندارد (Twyman et al., 2003). بعلاوه پروتئین های نو ترکیب تولید شده از طریق گیاهان فاقد گالاکتوز و اسید سیالیک انتهایی (که در گلیکوپروتئین های انسانی به صورت طبیعی) می باشند. تفاوت های خیلی کوچک در ساختارهای گلیکان می تواند در فعالیت و پایداری پروتئین اثر گذاشته و حتی اگر پروتئین نو ترکیبی که در گیاه تولید می شود به صورت صحیح (شکل انسانی) آن گلیکوزیله نشود، بعد از مصرف می تواند به صورت ایمونوژنیک عمل کرده و اثرات مخربی داشته باشد.

راهکارهای مناسب برای دستکاری مسیر گلیکوزیلاسیون به منظور تولید پروتئین های نو ترکیب مشابه با انواع انسانی در گیاهان وجود دارد (Warner, 2000). مهمترین این روش ها

<sup>2</sup> - Galactosyltransferase

<sup>3</sup> - Sialyltransferase

<sup>4</sup> -Fucosyltransferase

<sup>5</sup> -Xylyltransferase

<sup>1</sup> -Glycan

عنوان مثال اگر چه پیش برنده های با بیان مداوم موجب ذخیره پروتئین های نوترکیب زیادی در بذر می شود، با اینحال پروتئین در همه بخش های گیاهی شامل برگ، ریشه و گرده نیز بیان می شود. در این حالت ممکن است گیاهخواران، حشرات گرده افشان و میکروارگانسیم های تحت تاثیر این پروتئین های نوترکیب قرار گیرند. محدود کردن این پروتئین ها در بذر از این خطرات می کاهد (Commandeur *et al.*, 2003; همچنین Bagheri, 2009; Stoger *et al.*, 2002). می توان پیش برنده های القایی را به کار گرفت تا بیان پروتئین فقط بعد از برداشت محصول صورت گیرد (Zuo & Chua, 2000; Cramer *et al.*, 1999).

**ب-هدف گیری پروتئین نوترکیب به بافت مشخص:** گر چه از هدف گیری پروتئین بیشتر به عنوان تسهیل کننده تخلیص پروتئین های نوترکیب یاد می شود، اما تکنیک هدف گیری پروتئین نوترکیب می تواند برای افزایش عملکرد پروتئین های نوترکیب هم استفاده شود. در این روش با ذخیره شدن پروتئین نوترکیب در اجزای سلولی فرایند های بسته بندی، سرهم شدن و تغییرات پس از ترجمه آنها هم تحت تاثیر قرار می گیرد که در نهایت همه این فاکتورها پایداری پروتئین و در نتیجه عملکرد را تحت تاثیر قرار می دهد (Schillberg *et al.*, Bagheri, 2009; 2002). آزمایشات هدفگیری به صورت مقایسه ایمونوگلوبولین های با اندازه کامل و قطعات Fv تک زنجیره ای نشان داد که مسیر ترشحی نسبت

سیگنال KDEL به انتهای کربوکسی ژن بوده است (Masoumi Asl *et al.*, 2009).

## افزایش میزان بیان پروتئین های نوترکیب در گیاهان

از مهمترین فاکتورهایی که تجاری بودن کشاورزی مولکولی را تعیین می کنند، رسیدن به یک عملکرد مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب می باشد (Jalali Javaran *et al.*, 2008; Jalali Javaran *et al.*, 2009). برای بالا بردن عملکرد تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان می توان از روشهای زیر استفاده کرد:

**الف-بالا بردن بیان ژن منتقل شده:** برای رسیدن به این هدف معمولاً سعی می شود از پیش برنده های قوی استفاده شود. برای گیاهان دو لپه ی اغلب از پیش برنده 35S ویروس موزاییک گل کلم (*CaMv 35s*) استفاده می شود (Christensen & Quail, 1996). در غلات پیش برنده *CaMv 35S* فعالیت کمتری دارد، بنابراین از پیش برنده یوبی کویتین-1 (*ubi-1*) ذرت استفاده می شود (Christensen & Quail, 1996). همچنین میزان رونویسی در غلات با افزودن یک اینترون به ژن منتقل شده افزایش می یابد. این پدیده، افزایش بیان بواسطه - اینترون نامیده می شود (Vain *et al.*, 1996).

پیش برنده های تنظیمی نسبت به انواع پیوسته از لحاظ عملکردی و ایمنی ارجحیت دارند. به

کلروپلاست افزایش بیان پروتئین های نو ترکیب می باشد (Daniell *et al.*, 2002). انتقال ژن به کلروپلاست در مقایسه با انتقال ژن به هسته توتون مشاهده گردید که میزان تولید بسیار بالاتر می باشد. به منظور تولید هورمون رشد انسانی، مشاهده گردید که با انتقال ژن به کلروپلاست، هورمون رشد تا 8٪ پروتئین های محلول کل را تشکیل می دهد. در گزارش دیگری، توکسین Tetanus بیشتر از 25٪ پروتئین های محلول را تشکیل می داد (Daniell *et al.*, 2001; Tregoning *et al.*, 2003). اما باید توجه کرد که استفاده از کلروپلاست و یا در کل اندامک های پلاستییدی برای کشاورزی مولکولی محدودیت هایی دارد، از جمله اینکه کلروپلاست قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه نیست (Daniell *et al.*, 2002). همچنین نگرانی های ایمنی زیستی مثل انتقال افقی ژن از کلروپلاست به باکتریها نیز در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد (Kay *et al.*, 2002). به همین علت راهکاری که می توان اعمال کرد این است که انتقال ژن به هسته صورت گیرد اما از یک توالی سیگنالی جهت هدف گیری پروتئین به کلروپلاست استفاده شود (Jobling *et al.*, 2003).

ایمنی زیستی کشاورزی مولکولی در مقایسه با سیستم های سنتی  
خطری که معمولاً هنگام تولید محصول در سایر سیستم ها از قبیل باکتری و حیوانات تراریخت

به ذخیره سیتوزولی برای بسته بندی پروتئین ها مناسب تر بوده و برای ذخیره پروتئین در سطح بالا مزایای بیشتری دارد (Zimmermann *et al.*, 1999; Schillberg *et al.*, 1998). چون بسیاری از پروتئین های نو ترکیب تولیدی از طریق گیاهان تراریخت از نوع پروتئین های انسانی می باشند و این پروتئین ها در بدن خود انسان معمولاً از سیستم غشاء داخلی عبور می کنند، از این اصل برای تولید پروتئین های نو ترکیب از طریق گیاهان هم استفاده می شود. شبکه اندوپلاسمی (ER) محیطی اکسید کننده (Oxidizing) با مقدار زیادی از پروتئین های چاپرونی می باشد که میزان پروتئینها در آن پایین می باشد. آنتی بادی هایی که از سیستم ترشحی گیاهان تراریخت عبور می کنند با چاپرون های مثل انواع Bip عکس العمل نشان می دهند (Nuttall *et al.*, 2002). بنابراین توالی اسید آمینه ای H/KDEL به انتهای C پروتئین نو ترکیب افزوده می شود تا پروتئین با داشتن این سیگنال پتیدی در شبکه اندوپلاسمی باقی بماند. این روش موجب انباشت 2-10 برابری پروتئین در مقایسه با زمانی که این سیگنال استفاده نشده است، گردید (Conrad & Fiedler, 1998). از مزایای دیگر سیگنال پتیدی و انباشت پروتئین ها در شبکه اندوپلاسمی ER این است که پروتئین نو ترکیب در اجسام گلژی تغییری پیدا نمی کند (Conrad & Fiedler, 1998).

ج- بیان ژن پروتئین های نو ترکیب در کلروپلاست گیاهان: یکی از اهداف انتقال ژن به



انجام ترانسفورماسیون این ژن ها حذف شوند. مکانیسم ساده آن هم بدین صورت است که از سیستم Cre-loxP استفاده می شود. در این روش Cre یک آنزیم نوترکیب می باشد که یک توالی نوکلئوتیدی کوتاه به نام loxP را تشخیص می دهد. اگر دو جایگاه loxP یک جهت داشته باشند، آنزیم Cre هر نوع توالی بین آنها را خارج می سازد. بنابراین اگر هنگام انتقال ژن، ساختار ژنی<sup>۲</sup> به گونه ای طراحی شود که ژنهای انتخابگر بین دو جایگاه loxP همسو قرار گیرند و نیز خود ژن Cre را نیز وارد گیاه کنیم، می تواند ژن های انتخابگر را حذف کند (gleave et al., 1999).

پروتئین های انسانی نوترکیب که از طریق گیاهان تولید می شوند، می توانند اثرات منفی روی سایر ارگانیسم ها مثل حشرات، حیوانات و میکروارگانیسم ها داشته باشند. این اثرات می تواند سمیت مستقیم باشد یا اینکه این پروتئین ها در زنجیره غذایی انباشته شده و موجوداتی را هم که تماس غیر مستقیم با گیاهان تراریخت دارند را آلوده سازد (Commanderur et al., 2003). راه کارهای غلبه بر این مشکل عبارتند از: 1- کنترل بیان ژن: برای مثال از پیشبرندهای اختصاصی بذر یا میوه استفاده شود تا از مصرف پروتئین توسط موجوداتی که از بافت های سبز استفاده می کنند جلوگیری کند و یا استفاده از تراریختها القایی به گونه ای که فقط وقتی تراریخت تحت یک ماده شیمیایی خاص قرار گرفت بیان شود (zuo & chua, 2000). 2-

وجود دارد، عوامل بیماریزای مشترک بین انسان و گیاه وجود ندارد.

معمولاً خطرات گیاهان تراریخت را به دو دسته تقسیم می کنند (Commanderur et al., 2003). اول خطراتی که متوجه محیط زیست و سایر ارگانیسم ها می باشد. دوم خطراتی است که خود انسان را بطور مستقیم تحت تاثیر قرار می دهند.

**الف- مشکلات آلودگی تراریخت ها: آلودگی تراریختی به معنی گسترش تراریخت ها به خارج از میزبان های بواسطه مکانیسم های طبیعی است که به آن، جریان ژن (Gene flow) اطلاق می شود این جریان می تواند به اعضاء غیر تراریخت همان گونه و یا حتی گونه های وابسته وحشی صورت گیرد. این پدیده خیلی مهم می باشد چون از طرفی با ورود تراریختی به سایر موجودات می تواند اثرات مخربی روی محیط زیست داشته باشد و از طرف دیگر باعث به هم خوردن ژنوم گونه های آلوده (بویژه بهم زدن ژنوم گونه های وحشی) شود. همچنین احتمال گسترش ژن های نشانگر انتخابی وجود دارد. مثلاً ژن های انتخابگر مقاومت به علف کش از گیاهان تراریخت به گونه های علف هرز وارد شود و یا ژن های انتخابی مقاومت به آنتی بیوتیک ها وارد پاتوژن های انسانی و حیوانی شوند (Commanderur et al., 2003). برای کاهش این مشکلات یکی از راه های پیشنهادی؛ استفاده از نوترکیبی اختصاصی - جایگاه<sup>۱</sup> برای حذف ژن های نشانگر انتخابی می باشد تا بعد از**

<sup>2</sup> -Construct

<sup>1</sup> - Site-specific recombination

که باید تخلیص شوند بسته به نوع کاربرد، حداقل درصد متفاوتی از خلوص را باید داشته باشند (Schillberg *et al.*, 2005). در مورد پروتئین هایی که به صورت تزریق داخل رگی مصرف می شوند (مثل t-PA) این خلوص حتی تا 100 درصد هم ضروری است. گرچه بیان پروتئین در سطح بالا برای عملکرد مناسب سیستم های بیانی گیاهی ضروری است، اما تخلیص پروتئین های نوترکیب نیز بایستی بهینه شود (Ficher *et al.*, 2004). روش های مختلفی برای تخلیص وجود دارد که عمدتاً بر پایه تکنیک های کروماتوگرافی می باشند. در این میان استفاده از کروماتوگرافی تمایلی<sup>1</sup> اختصاصیت بیشتری دارد. به همین علت باید با مطالعه دقیق بیوشیمیایی پروتئین مورد نظر لیگاندهای تمایلی مناسب را طراحی کرد. به عنوان مثال برای تخلیص t-PA نوترکیب از توتون (با توجه به خاصیت تمایلی t-PA به اسید آمینه لیزین) از ستون های کروماتوگرافی لیزین سفارز استفاده کردیم که کارایی خیلی خوبی را نشان داد (Seifi *et al.*, 2009). البته امروزه برای راحتی کار از روش های همجوشی بهره می گیرند (Schillberg *et al.*, 2005). عمده این روش ها، استفاده از همجوشی 6 اسید آمینه هیستیدینی<sup>2</sup> با پروتئین مورد نظر هنگام انتقال ژن می باشد که در نهایت از کروماتوگرافی نیکل سفارز برای تخلیص استفاده می شود (Schillberg *et al.*, 2005).

<sup>1</sup> -affinity chromatography

<sup>2</sup> -His-tag

کنترل فعالیت پروتئین نوترکیب: به این منظور پیشنهاد می شود که پروتئین های نوترکیب به صورت پیش سازهای غیر فعال تولید شوند. در این روش بعد از تخلیص، پروتئین های نوترکیب تولید شده با تغییراتی مثل هضم پروتئولیتیک می توانند فعال شوند.

ب- ایمنی محصول نوترکیب: مطالب بالا بیشتر بر اثرات مخرب پروتئین های نوترکیب بر میزبان های غیر هدف آنها اشاره داشت. اما زمانی که این پروتئین ها (بویژه انواع دارویی آنها) مصرف می شوند ممکن است بر خود انسان اثرات سوئی داشته باشند. به عنوان مثال پروتئین تخلیص شده دارای آلودگی هایی مثل توکسین ها و مواد حساسیت زای گیاهی باشد. همچنین خود پروتئین به دلیل ویژگی های ذاتی آن می تواند مضر باشد. زیرا پروتئینی که از طریق گیاه تولید شده چون شرایط تولید آن مقداری با بدن انسان فرق می کند، پروتئین ممکن است ویژگی های اصلی خودش را نداشته باشد. مثلاً اگر پروتئین به درستی گلیکوزیله نشود می تواند سیستم ایمنی فرد را تحریک کند (chargelegue *et al.*, 2000).

### فرایندهای استخراج و استحصال پروتئین های نوترکیب

این فرایندها عمدتاً شامل تخلیص و فرآوری پروتئین نوترکیب تولید شده می باشد. اگر چه همه پروتئین های نوترکیب تولید شده در گیاهان تراریخت به تخلیص نیاز ندارند، اما آنهایی هم

گیاهان مورد توجه قرار گرفت و در گیاه توتون با موفقیت انجام شد (Rajabi-Memari et al., 2006; Ismaili et al., 2006).

در این مطالعه، آنتی بادی تک دومنی  $V_{HH}$  بر علیه آنتی ژن MUC1 در گیاهان توتون به عنوان یک سیستم بیانی مناسب و اقتصادی تولید شد. این ژن تحت کنترل پیشبرنده *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* قرار گرفت. توالی افزایش دهنده (Kozak) برای بالا بردن بیان به انتهای 5' ژن  $V_{HH}$  با منشاء شتر یک کوهانه (*Camelus dromedarius*) اضافه شد. سازه ساخته شده ( $pBIV_{HH}$ ) به آگروباکتریوم منتقل و سپس ژن  $V_{HH}$  بواسطه آگروباکتریوم وارد ژنوم توتون گردید. آنالیز گیاهان تراریخت با PCR، الایزا و وسترن بلات صورت پذیرفت و مشخص گردید که ژن  $V_{HH}$  در گیاهان تراریخت توتون در حال بیان است. میزان بیان  $1/12-1/63\%$  از کل پروتئین های محلول را تشکیل می دهد. این مطالعه، اولین گزارش از تولید این آنتی بادی در توتون بود (Rajabi-Memari et al., 2006).

همچنین ژن  $V_{HH}$  با منشاء شتر دو کوهانه (*Camelus bactrianus*) به گیاهان توتون منتقل شد. آنالیز گیاهان تراریخت با PCR، الایزا و وسترن بلات نشان می داد که ژن  $V_{HH}$  در گیاهان در حال بیان است. بعلاوه نتایج الایزا با آنتی ژن های MUC1 و ایمونوسیتوشیمی با لاین های سلولی سرطانی فعالیت آنتی بادی تولید شده را تایید کرد. نتایج همچنین نشان داد که فعالیت و تمایل آنتی بادی  $V_{HH}$  بیان شده در گیاهان نسبت

برخی از مهمترین فعالیت های انجام شده در زمینه کشاورزی مولکولی در ایران

الف- بیان آنتی بادی مونوکلونال  $V_{HH}$  علیه آنتی ژن MUC1 در گیاهان توتون: تولید آنتی بادی و یا قطعات آنتی بادی از طریق گیاهان تراریخت توسط آزمایشگاه های متعددی گزارش شده است (Larich et al., 2001; Hood et al., 2002; Schilberg et al., 2002; Srogert et al., 2002b; Rajabi-Memari et al., 2006; Ismaili et al., 2006). با توجه به کاربردهای گسترده تشخیصی و درمانی آنتی بادهای مونوکلونال، تولید آنها از منابع دائمی، ایمن و ارزان حائز اهمیت می باشد. از جمله، می توان به آنتی بادی مونوکلونال تک دومنی ( $V_{HH}$ ) با منشاء شتری اشاره نمود که به دلیل دارا بودن ویژگی هایی از جمله: تشابه بسیار بالا با زنجیره سنگین آنتی بادهای انسانی، حلالیت، تمایل و اتصال اختصاصی به آنتی ژن، بر دیگر انواع آنتی بادهای ترجیح داده می شود. آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژن MUC1 در سال 2004 از منشأ شتر یک و دو کوهانه تهیه گردید (Rahbarizadeh et al., 2004). این آنتی بادی تک دومنی دارای خواص حلالیت، اتصال اختصاصی به آنتی ژن و تمایل (Affinity) خوبی می باشد. با توجه به اهمیت آنتی بادی تک دومنی  $V_{HH}$  در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری های سرطانی و هزینه بسیار بالای تولید آن با استفاده از سایر روشها (از جمله حیوانات تراریخته، سلولهای هیبریدوما و ...)، تولید آن در

در همین راستا انتقال ژن  $IFN\gamma$  به اجسام روغنی بذر گیاهان کلزا صورت گرفت (Bagheri, 2009). زیرا با توجه به مقدار بالای تری اسیل گلیسرئید (TAGs) در اجسام روغنی، این بخش به راحتی با استفاده از سانتریفوژ از دیگر پروتئین های بذر و اجزای سلولی جدا می شود (Murphy, 1990). در ارزیابی کارآیی این روش مشخص شده که بیش از 90٪ از پروتئین های بذری حذف می شوند. به این ترتیب خالص سازی پروتئین نوترکیب با هزینه کمتر و سهولت بیشتری صورت می گیرد (Boothe, 1997). به منظور تولید پروتئین نوترکیب ایتترفرون گاما در کلزا و ذخیره آن در بذر سه نوع سازه ساخته شد (Bagheri, 2009):

**الف-** طراحی و ساخت سازه ترکیبی اولئوسین - ایتترفرون گاما و انتقال آن به بذر گیاه کلزا: استفاده از ژن اولئوسین گیاهی یک روش مطلوب به منظور استخراج راحت تر تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد و ارزان تر می باشد. اتصال اولئوسین به ژن مورد نظر و استفاده از پیشبرنده اختصاصی بذر Napin، موجب هدف گیری پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی در بذر می شود. در این تحقیق، سازه ترکیبی ایتترفرون گاما- اولئوسین برای تولید پروتئین ایتترفرون گامای انسانی در بذر گیاه کلزا طراحی و ساخته شد. برای این منظور ابتدا ژن اولئوسین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از ژنوم گیاه کلزا جداسازی شده و در ناقل بیانی گیاهی pBI121 همسانه سازی شد. سپس ژن ایتترفرون گاما در

به آنتی بادی تولید شده در باکتری و مخمر بالاتر می باشد (Ismaili et al., 2006).

**ب-** بیان آنتی بادی مونوکلونال  $V_{HH}$  علیه آنتی ژن MUC1 در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.): در این پژوهش، سازه حاوی ژن  $V_{HH}$  با استفاده از آگروباکتریوم نژاد LBA4404 به گیاهان کلزا منتقل گردید و گیاهان تراریخت بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک های کانامایسین باززایی شدند. آنالیز ملکولی بر روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن  $V_{HH}$  و تکنیک PCR صورت گرفت. این پژوهش اولین گزارش از انتقال ژن آنتی بادی نوترکیب به کلزا و فراهم نمودن زمینه مناسب در جهت تولید سایر پروتئین های نوترکیب در این گیاه می باشد (Dymyad, 2007).

**ج-** بیان ژن ایتترفرون گامای انسانی ( $IFN\gamma$ ) در بذر گیاهان کلزای تراریخت: پروتئین  $IFN\gamma$  برای درمان بیماران با نقص مادرزادی و همچنین عوامل عفونی درون سلولی مانند لیشمانیا (Assreury et al., 1994) و سالمونلا تیفو موریوم (Nauciel & Espinasse-Maes, 1992) کاربرد دارد. از آن در درمان سرطان های مختلف از جمله نوروبلاستوما استفاده گردید (Seeger et al., 1998) و ملانوما (Abdel-Wahab et al., 1997) نیز کاربرد گسترده ای پیدا کرده است. همان طور که قبلاً اشاره شد هدف گیری پروتئین به بافت یا اندامک خاص در بهبود عملکرد و افزایش کارایی تخلیص راهکار مهمی می باشد.

انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه کلزا از طریق ریزنمونه های کوتیلدونی مورد استفاده قرار گرفت. گزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با استفاده از PCR و در سطح پروتئین با استفاده از SDS-PAGE، دات بلات و وسترن بلات بیانگر انتقال موفقیت آمیز ژن IFN $\gamma$  و بیان پروتئین نوترکیب بود. همچنین حضور پروتئین اینترفرون تولید شده در گیاهان با تست ELISA تأیید شد (Bagheri, 2009).

**ج- بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاه کلزا:** در این سازه ژن اینترفرون گاما بدون اولئوسین و فقط تحت پیشبرنده Napin به گیاهان کلزا منتقل شد. ژن اینترفرون گاما ابتدا در ناقل pGEM<sup>®</sup>-T Easy کلون و پس از تایید صحت آن با استفاده از روش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی، قطعه موردنظر در ناقل بیانی گیاهی pBI121 سب کلون گردید. ناقل نوترکیب pBI IFN $\gamma$  با روش انجماد و ذوب به آگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه کلزا از طریق ریزنمونه های کوتیلدونی مورد استفاده قرار گرفت. گزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با استفاده از PCR و در سطح پروتئین با استفاده از SDS-PAGE بیانگر انتقال موفقیت آمیز ژن IFN $\gamma$  و بیان پروتئین نوترکیب بود (Taheri Javan, 2008).

پائین دست ژن اولئوسین قرار داده شد و بین این دو ژن توالی برشی پروتئولایتیکی جهت جداسازی دو پروتئین بعد از مراحل تخلیص تعبیه گردید. مجموعه این دو ژن تحت کنترل پیشبرنده بذری Napin قرار گرفت. ناقل pBI121 حاوی سازه مورد نظر با استفاده از آگروباکتریوم سویه LBA4404 برای تراریختی گیاه کلزا با بهره گیری از ریزنمونه های کوتیلدون استفاده شد. گزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین انجام شد. آنالیز بذور تراریخته نسل اول (T<sub>0</sub>) با PCR بیانگر انتقال ژن IFN $\gamma$  و آزمون RT-PCR نشان دهنده رونویسی ژن IFN $\gamma$  بود (Bagheri, 2009).

**ب- طراحی و تهیه سازه حاوی ژن اینترفرون گاما و توالی KDEL و بیان آن در بذر گیاه کلزا:** در این سازه ژن اینترفرون گاما بدون اولئوسین و فقط تحت پیشبرنده Napin به گیاهان کلزا منتقل شد. در این تحقیق برای بیان اینترفرون گامای انسانی در بذر گیاه کلزا و قرار گرفتن آن در شبکه آندوپلاسمی از پیشبرنده اختصاصی بذر (Napin) و توالی KDEL در انتهای کربوکسیلی ژن اینترفرون گامای انسانی استفاده شد. ژن اینترفرون گاما ابتدا در ناقل pGEM<sup>®</sup>-T Easy کلون و پس از تایید صحت آن با استفاده از روش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی، قطعه مورد نظر در ناقل بیانی گیاهی pBI121 سب کلون گردید. ناقل نوترکیب pBI IFN $\gamma$  با روش انجماد و ذوب به آگروباکتریوم سویه LBA4404

در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 همسانه سازی شده و سپس صحت آن با استفاده از روش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی قطعه موردنظر تایید گردید. ناقل نو ترکیب pCAMBIA1304 با  $IFN\gamma$  با روش انجماد و ذوب به آگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه توتون از طریق ریزنمونه های برگری مورد استفاده قرار گرفت. گزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (هیگرومایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با استفاده از PCR بیانگر انتقال موفقیت آمیز ژن  $IFN\gamma$  بود (Azhdari, 2009).

#### بیان ژن انسانی فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) در گیاه توتون

بیماری های قلبی- عروقی مثل سکته، حمله میوکاردیال حاد و ترومبومبولیسم وریدی احتمالاً اصلی ترین عامل مرگ و میر در جمعیت انسانی می باشند. مهمترین عامل موثر در این شرایط، اغلب انسداد لخته ای در رگ های خونی مهم می باشد که موجب نرسیدن خون به اندام های حیاتی مانند قلب و مغز می گردد. یک دیدگاه درمانی ترومبولوز، تزریق داخل وریدی فعال کننده های پلاسمینوژن به عنوان داروی حل کننده لخته خون می باشد (Collen & Lijnen, 1991). مشخص شده است که فعال کننده های پلاسمینوژن نقش مهمی در سیستم فیبرینولیتیک دارند. این آنزیم ها قادر به تبدیل پلاسمینوژن به

د- انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی (به همراه Kozak) در گیاه کلزا: در این سازه ژن اینترفرون گاما بدون اولئوسین و فقط تحت پیشبرنده Napin به همراه توالی Kozak به گیاه کلزا منتقل شد. در این تحقیق برای افزایش بیان اینترفرون گامای انسانی در گیاه کلزا توالی Kozak در مجاورت ژن اینترفرون گامای انسانی قرار داده شد. ژن اینترفرون گاما ابتدا در ناقل pGEM®-T Easy کلون و پس از تایید صحت آن با استفاده از روش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی، قطعه موردنظر در ناقل بیانی گیاهی pBI121 ساب کلون گردید. ناقل نو ترکیب pBI121 با روش انجماد و ذوب به آگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه کلزا از طریق ریزنمونه های کوتیلدونی مورد استفاده قرار گرفت. گزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با استفاده از PCR بیانگر انتقال موفقیت آمیز ژن  $IFN\gamma$  بود (Rahimi Far, 2008).

ر- انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی به گیاه توتون: در این سازه ژن اینترفرون گاما بدون اولئوسین و فقط تحت پیشبرنده *CamV 35S* به همراه توالی افزایش دهنده بیانی Kozak و توالی HisTag به گیاه توتون منتقل شد. در این تحقیق برای افزایش بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاه توتون از توالی Kozak و برای راحتی تخلیص از توالی HisTag استفاده شد. سازه فوق

خصوصیات بیوشیمیایی t-PA، اقدام به تخلیص پروتئین نوترکیب tPA از گیاهان توتون تراریخت گردید. فرایند تخلیص با طراحی ستون های کروماتوگرافی تمایلی لیزین سفارز و در ادامه با استفاده از کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی صورت گرفت. با استفاده از ژل SDS-PAGE بیان اولیه ژن و با استفاده از آزمون زیموگرافی فعالیت tPA تخلیص شده از گیاهان تراریخت توتون تعیین گردید. نتایج بیانگر تخلیص مناسب tPA فعال از گیاهان توتون تراریخت بود که اولین گزارش از تولید و تخلیص tPA از طریق گیاهان تراریخت می باشد (Seifi Nabi Abad, 2009).

#### نظـاهـر ژـن PA از *Bacillus anthracis* در کاهوی ایرانی

سیاه زخم بیماری مهلک مشترک بین دام و انسان بوده و ژن (Protective Antigene) PA از *Bacillus anthracis* دارای بیشترین پتانسیل برای تهیه واکسن علیه سیاه زخم می باشد. گیاه کاهو با توجه به نوع مصرف و وزن تازه آن دارای پتانسیل مطلوب برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین های نوترکیب و واکسن های خوراکی است. هدف از این تحقیق ایجاد بستر لازم برای تولید واکسن در گیاه کاهو بود که ابتدا شرایط بهینه کشت بافت و باززایی این گیاه را بدست آورده و سپس با استفاده از آگروباکتريوم و تفنگ ژنی ژن های گزارشگر و سازه های هسته ای و کلروپلاستی به این گیاه انتقال داده شد. بیان ژن گزارشگر *gus* و ژن های

فرم فعال کاتالیتیک آن (پلاسمین) می باشند که شبکه فیبرینی همراه با لخته های خونی را تخریب می کند (Brown & Tyrell, 1985; Mosher, 1990). پروتئین tPA، فعال کننده اصلی پلاسمینوژن در خون می باشد که موجب باز شدن لخته های خونی داخل رگها می شود و به همین علت یکی از داروهای مهمی می باشد. بدلیل قیمت بسیار بالا و کمبود این دارو در ایران، تصمیم گرفته شد تا امکان تولید آن در گیاهان با همکاری دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران بررسی شود. در یک پروژه تحقیقاتی cDNA ژن t-PA انسانی تحت کنترل پیشبرنده *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* قرار گرفت. توالی افزایش دهنده Kozak و ترادف رمز کننده پپتید نشانه (KDEL)، به ترتیب به دو انتهای آمینی و کربوکسیلی ژن tPA اضافه شدند. سازه تهیه شده (pBI(tPA)) به روش انتقال ژن مبتنی بر آگروباکتريوم به ژنوم گیاه توتون منتقل و گیاهان تراریخت روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب شدند. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از روش های RT-PCR، SDS-PAGE، زیموگرافی و وسترن بلات انجام شده و کلیه این آزمایش ها نشان داد که نه تنها ژن هدف (tPA) به گیاهان توتون منتقل شده، بلکه به نحو مطلوب و فعالی در گیاهان تراریخت بیان می شود (Masoumi Asl et al., 2007). پس از اطمینان از بیان t-PA در گیاهان تراریخت نسل T<sub>0</sub>، در مطالعه دیگری گیاهان تراریخت نسل T<sub>1</sub> هم آنالیز شدند. در نهایت بعد از مطالعات

نمی‌کند. سطوح مخاطی از جمله دهان و مجاری تناسلی ورودی‌های اصلی ارگانیزم‌های بیماریزا به بدن می‌باشند. به همین علت به تولید واکنش‌های خوراکی روی آوردند که نشان‌دهنده پاسخ ایمنی این بافت‌ها را به خوبی تحریک می‌کنند. (Carter & Langridge, 2002; Streatfield & Howard, 2003). واکنش‌های خوراکی مزایای خیلی زیادی از نظر تولید دارند که به عنوان مثال از آنجایی که دیگر نیازی به تخلیص وجود ندارد بنابراین هزینه‌های تولید خیلی کاهش می‌یابد و فرد با مصرف روزانه مقداری میوه یا سبزیجات داروی مورد نیاز را دریافت می‌کند. از جمله این گزارش‌ها تولید واکنش علیه ویروس ایدز (HIV) در ذرت بود (Horn et al., 2004).

در قالب پروژه دیگری دانشگاه تربیت مدرس تولید پروانسولین در گیاهان چه به عنوان واکنش تزریقی و چه به عنوان واکنش خوراکی مد نظر می‌باشد. انسولین یک پلی‌پپتید 51 اسید آمینه ای است که دارای دو زنجیره مجزا ( $\alpha$  ,  $\beta$ ) می‌باشد. اما در سلول‌های بتای پانکراس انسان، انسولین به صورت یک زنجیره پلی‌پپتیدی منفرد ساخته می‌شود که به این زنجیره پلی‌پپتیدی پروانسولین گفته می‌شود. پیشساز پروانسولین، پری پروانسولین می‌باشد که به عنوان ماده اولیه تولید پروانسولین در این سلول‌ها ساخته می‌شود (Farinas et al., 2007). استفاده اصلی پروانسولین جهت درمان بیماری دیابت می‌باشد

PA و *nptII* در گیاهان نسل‌های اول و دوم با استفاده از PCR و RT-PCR بررسی و نشان‌دهنده شد که حداقل یک نسخه از ژن‌های *Gus* و PA به ژنوم گیاه کاهو منتقل شده است. بیان ژن PA با استفاده از تکنیک الایزا (ELISA) مورد تایید قرار گرفت (Honari, 2008).

با اطمینان از تراریختی در گیاه کاهو از قطعات همولوگ (*rbcL-accD*) و پیش‌برنده *Prrn* و خاتمه‌دهنده *psbA* برای ژن *Gus* همراه قطعه ژنی *aadA* مقاومت به اسپکتینومایسین به همراه پیش‌برنده *16Srrn* و خاتمه‌دهنده *psbA* گیاه توتون برای ساخت ناقل *pcL96-39* (پلاسمید کلروپلاستی رقم TN-96-39 کاهوی ایرانی) استفاده گردید. ژن هدف با استفاده تفنگ ژنی به گیاه کاهو منتقل و به وسیله آزمون هیستوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. با توجه به طراحی و ساخت ناقل پلاستییدی بومی *pcL96-39* دو تا از چهار ژن PA همراه با قطعه ژنی *aadA* به همراه پیش‌برنده *16Srrn* و خاتمه‌دهنده *psbA* بوسیله تفنگ ژنی به گیاه کاهو منتقل گردید. میزان پروتئین محلول PA از کل موجود (TSP) در برگ‌های تازه 7٪ بدست آمد و با استفاده از تکنیک وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت (Honari, 2008).

#### تولید پروانسولین انسانی در گیاه کاهو

استفاده از واکنش‌ها به صورت تزریقی معمولاً پاسخ ایمنی مناسبی در بافت‌های مخاطی (Mucosal) دریافت‌کننده واکنش ایجاد



مطالعه برای همسانه‌سازی ژن پروانسولین، *pKCZ* (به طول تقریبی 6/5 kb) بود که دارای ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین برای ایجاد مقاومت در باکتری و اسپکتینومایسین جهت ایجاد مقاومت در گیاه می‌باشد. با توجه به اینکه در حالت معمولی mRNAهای هسته‌ای گیاه تک سیسترونی می‌باشند و در مقابل اکثر ژنهای کلروپلاستی بصورت RNAهای پلی‌سیسترونی نسخه‌برداری می‌شوند و بعداً برای تشکیل نسخه‌های قابل ترجمه پردازش می‌شوند. در پروژه کلروپلاستی، ژن پروانسولین انسانی برای بیان به صورت دی سیسترونی با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین در ابتدای این ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک همسانه‌سازی شد. برای این منظور با استفاده از آنزیم برشی *NcoI* قطعه ژن پروانسولین که در دو انتهای خود دارای سایت برشی برای این آنزیم بود برش داده شد و در ناقل *pKCZ* در محل برش آنزیم *NcoI* (مابین پیشبرنده و ژن مقاومت به اسپکتینومایسین) همسانه‌سازی شد. ناقل ساخته شده (*pKCZINS*) با استفاده از هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. (Mohebodini et al., 2010) در حال حاضر انتقال این ژن با استفاده از روش بیولستیک به کلروپلاست انجام شده و وجود ژن پروانسولین در ژنوم کلروپلاستی در سطح PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تایید شده است.

ب- همسانه سازی ژن اینترفرون گاما در ناقل کلروپلاستی *pKCZ* ژن اینترفرون گاما داخل

که شیوع بسیار بالایی دارد. دو پروژه جداگانه در همین راستا در حال انجام می‌باشد:

الف- همسانه‌سازی و انتقال ژن پروانسولین انسانی به ژنوم هسته‌ای کاهو (*Lactuca sativa*) و *L. tabacum* و توتون (*Nicotiana tabacum*) و همسانه‌سازی آن در ناقل کلروپلاستی *pKCZ* و انتقال به کلروپلاست توتون (*Nicotiana tabacum*) در این تحقیق ژن پروانسولین انسانی توسط آغازگرهای مناسب که در دو انتهای خود دارای محل برشی مناسب برای آنزیمهای برشی بود با استفاده از تکنیک PCR از روی ناقل جداسازی شد. قطعه جداسازی شده در معرض آنزیمهای برشی قرار داده شد. قطعه برش یافته بوسیله آنزیم لیگاز به ناقل بیانی گیاهی *pCambia1304* متصل و سازواره *pCAMINS* ساخته شد. با استفاده از تکنیکهای مختلف (کلونی PCR، PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی) همسانه‌سازی ژن پروانسولین انسانی در ناقل *pCambia1304* تایید شد. در مرحله بعد با استفاده از بافتهای کوتیلدونی گیاه کاهو و ریز نمونه های برگ گیاه توتون، ژن پروانسولین با استفاده از آگروباکتریوم به گیاهان توتون و کاهو منتقل شد و گیاهان تراریخت حاصل از کشت بافت با استفاده از PCR تایید شد (Mohebodini et al., 2009).

به منظور انتقال ژن پروانسولین به کلروپلاست توتون، همسانه‌سازی این ژن در ناقل کلروپلاستی *pKCZ* انجام شد. ناقل مورد استفاده در این

برای پاسخ به این تقاضا بویژه در کشورهای فقیر و در حال توسعه وجود ندارد. به گونه‌ی که برخی از داروهای مهم یا در این کشورها اصلاً وجود ندارد و یا با هزینه‌های گزاف وارد می‌شود که فقط اقشار ثروتمند قادر به تهیه و استفاده از آنها می‌باشند. سیستم‌های تولید سنتی پروتئین‌های نو ترکیب دارویی که از فرمنتاسیون‌های میکروبی، کشت سلول‌های حشرات و پستانداران و حیوانات تراریخت استفاده می‌کنند، از لحاظ هزینه، سطح تولید، ایمنی تولید و درستی محصول اشکالاتی دارند (Ma & Jevnikar, 1999). پژوهش‌هایی در دست انجام است تا امکان جایگزینی سیستم گیاهی بجای سایر سیستمها را مورد بررسی قرار می‌دهند. بنابراین استفاده از بیورآکتورهای گیاهی در طی چند سال خیر بویژه سال‌های آتی جهت تولید این داروها با کیفیت و کمیت مناسب ضروری می‌باشد تا با بالا بردن حجم تولید موجب کاهش قیمت این پروتئین‌ها شود. البته مطالعات آتی علاوه بر بیان پروتئین‌های مختلف و آزمون سیستم‌های میزبانی و بیانی مختلف، باید مطالعات بیشتر روی مسائل تخلیص و فرآوری محصولات نو ترکیب تمرکز یابد. همچنین باید با استفاده از تکنیک‌های مهندسی پروتئین (مثل جهش‌زایی مستقیم جایگاه‌ها) با دستکاری توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین‌های نو ترکیب، خصوصیات از قبیل پایداری، فعالیت و اختصاصیت که در کاربرد این پروتئین‌های دارویی بسیار مهم می‌باشد بهینه شود. چالش

پلاسمید *pRset* دریافت شد. سپس ژن اینترفرون گاما با استفاده از یک پیش‌برنده اختصاصی که حاوی سایت برشی آنزیم *NcoI* و *His Tag* بود تکثیر و سپس این ژن در ناقل TA همسانه سازی شد. با استفاده از آنزیم برشی *NcoI* قطعه ژن پروانسولین که در دو انتهای خود دارای سایت برشی برای این آنزیم بود بریده شده و در ناقل *pKCZ* در محل برش آنزیم *NcoI* (بین پیش‌برنده و ژن مقاومت) همسانه‌سازی شد. ناقل ساخته شده (*pKCZINF*) با استفاده از روشهای هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد (Razmi et al., 2009). در حال حاضر مراحل انتقال این ژن با استفاده از روش بیولستیک به کلروپلاست گیاه در حال انجام است.

#### بحث

گیاهان مزایای زیادی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در حجم انبوه و قیمت ارزان دارند، اما هنوز هم چالش‌ها و مشکلات زیادی پیش روی کشاورزی مولکولی (*Molecular farming*) وجود دارد که باید برای تولید بهینه و با کیفیت بالا از میان برداشته شوند. تعداد معدودی از مواد بیولوژیک تولید شده در گیاهان تراریخت به صورت تجاری در آمده اند (Ficher et al., 2004) که با توجه به پتانسیل‌های بیوتکنولوژی، این میزان ناچیز بوده و باید تلاش‌های بیشتری صورت پذیرد.

امروزه با رشد روز افزون تقاضای برای پروتئین‌های دارویی مواجه می‌باشیم، اما ظرفیت کافی

بادی تک دمنی VHH در توتون و کلزا، پروتئین نوترکیب tPA در توتون، بیان ژن ایتترفرون گامای انسانی در کلزا و پروانسولین در کاهو و توتون. در زمینه انتقال ژنهای انسانی (مانند: پروانسولین، tPA، ایتترفرون گاما) به کلروپلاست، سازه های آنها تهیه شده، مراحل انتقال به کلروپلاست و بررسی بیان آنها در حال انجام است.

### سپاسگزاری

نظر به اینکه بیشتر پروژه های انجام گرفته در زمینه کشاورزی مولکولی (Molecular farming) در ایران به صورت همکاری مشترک بین دانشگاه تربیت مدرس و سایر مراکز پژوهشی (مانند: انستیتو پاستور ایران، سازمان صنایع نوین، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و ...) صورت گرفته است لذا از کلیه عزیزانی که در انجام پروژه های تحقیقاتی به هر نحوی ما را یاری نموده اند تشکر و قدر دانی بعمل می آید.

اصلی و جدید کشاورزی مولکولی در زمینه تولید زیست داروها، ترکیب روشهای مهندسی ژنتیک جهت افزایش بیان با روشهای تخلیص اقتصادی و در نهایت رسیدن به یک روش تولیدی مناسب می باشد. باید توجه داشت که عملیات تخلیص پروتئین های نوترکیب تحت شرایط آزمایشگاهی که با استفاده از بافرها و افزودنی های گرانیقیمت صورت می گیرد، 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 روش های جدید برای افزایش بیان پروتئین های نوترکیب، روش های تخلیص جدید که علاوه بر ارزان بودن، مقیاس پذیری داشته باشند نیز مورد ارزیابی و اصلاح قرار گیرد. با کمال خوشبختی طی یک دهه گذشته اقدامات مطلوبی در زمینه کشاورزی ملکولی در ایران شده است. مهمترین دستاوردهای کشاورزی ملکولی در ایران که عمدتاً در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس حاصل شده است عبارتند از: تولید آنتی

### منابع

- Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF (1997) A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon- $\gamma$  gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer*, 80: 401-12.
- Azhdari H (2009) Cloning and transformation of human IFN gene to tobacco plants. M.Sc. thesis. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Bagheri KH (2009). Gamma-Oleosin interferon gene transfer to Canola and study of transgenic plants. Ph.D. Thesis. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.

- Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA (1997) "Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Development Research*, 42(3-4): 172-181.
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I (1999) Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology*. 17: 466–469.
- Brown M, Tyrell A (1985). Isolation of human t-PA genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene*. 33:279-284.
- Carter JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Critical Review in Plant Science* 21:93–109.
- Chargelegue D, Vine N, van Dolleweerd C Drake PM Ma J (2000) A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research* 9: 187–194.
- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*. 5: 213–218.
- Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*.12:3114-3124.
- Commander U, Twyman R M, Ficher R, (2003) The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet* 5: 1-9.
- Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* 38: 101–109.
- Cramer CL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 240:95–118.
- Daniell, H. (2003). *Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome* (Vasil, I.K. ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 371-376.
- Daniell H, Grabau EA, Allison L (2001) Expression of the native cholera B toxin subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* 311: 1001–1009.
- Daniell H, Khan MS and Allison, L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*. 7: 84–91.
- During K (1988) Wound-inducible expression and secretion of T4 lysozyme and monoclonal antibodies in *Nicotiana tabacum*. Ph.D Thesis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Dymyad S (2007). VHH antibody gene transfer to canola and regeneration of transgenic plants. M.Sc. thesis. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Esmaeili A (2006) Gene transfer of single-domain antibody against Muc1 from the origin of the camel to tobacco and analysis of transgenic plants. Ph.D. thesis, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, and Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Plant Biology* 7:152–158.
- Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9:279–299
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffman NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*80:4803–4807.

- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 450–454.
- Gleave AP, Mitra DS, Mudge S.R, Morris BA (1999) Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of Cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Molecular Biology* 40: 223–235.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76–78.
- Honari H (2008) Expression of PA gene from *Bacillus anthracis* in Iranian lettuce (*Lactuca sativa*). Ph.D. thesis, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University. Tehran - Iran.
- Hood EE (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 630–635.
- Horn ME, Pappu KM, Bailey MR, Clough RC, Barker M, Jilka JM, Howard JA, Streatfield SJ (2004) Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines. *J Drug Targeting* 21:93–109.
- Ismaili A, Jalali Javaran M, Rasaei M.J, Rahbarizadeh F, Rajabi Memari H, (2006) Cloning and expression of recombinant camelid single-domain antibody in Tobacco. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4 (3):162-168.
- Ismaili A, Jalali Javaran M, Rasaei M.J, Rahbarizadeh F, Rajabi Memari H, (2007) Production and characterization of anti-( Mucin MUC1) single- domain antibody in Tobacco (*Nicotiana Tabacum* cultivar Xanthi). *Biotechnology and applied Biochemistry* 47:11-19.
- Jalali Javaran M, Azhdari H, Latif B, Rajabi Memari H, Masoumi Asl A, Mahmoudi Nodazh H, Salimi M (2008) Plastid genome engineering. 2nd National Congress of Cellular & Molecular Biology, Jan. 2008. Kerman, Iran.
- Jalali javaran M, Masoumi Asl A, Mahbodi F, Alizadeh H, Rajabi Memari H, Ismaili A, Zebarjadi AR, Bagheri Kh, Rahbarizadeh F, Dymyad S, Foruzandeh Moghadam M (2008) Plants as bioreactors for production of recombinant proteins. 2nd National Congress of Cellular & Molecular Biology, Jan. 2008 Kerman, Iran.
- Jalali Javaran M, Rasai M J, Rajabi Memari H, Esmaeili A, Rahbarizadeh F, Masoumi Asl A, Bagheri Kh, Zebarjdi A, Mahbodi F, Alizadeh H, Dymyad S, Foruzandeh Moghadam M (2009) Molecular Farming. The Fifth National Biotechnology Congress of Iran, February 1-3, 2009. Tehran.
- Jobling SA, Cees AM, Van Der Honde P, Punt J, (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single domain antibody fragments. *Nature Biotechnology*. 21: 77–80.
- Joosten V, Lokman C, Cees A M, Van Der Honde P, Punt J (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. *Microb Cell Fact*, 2(1):10-15
- Julian KC, Drake PMW, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *J. Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.
- Kay E, Drake PMW, Christou P (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3345–3351.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemiex R, Vezina L-P (1999). Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 64:135-143
- Komarnytsky S, Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2000) Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid. *Plant Physiology*. 124: 927–933.
- Ma S, Jevnikar AM (1999) Autoantigens produced in plants for oral tolerance therapy of autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 464: 179-194.

- Ma JKC Hiatt A (1996) Expressing antibodies in plants for immunotherapy. In: Owen, M.R.L. and Pen, J. (eds) Transgenic plants: A production of pharmaceutical proteins. John Wiley & Sons, Chichester, U.K. pp 229-243
- Masoumi Asl A (2009) Cloning and transformation of human tPA gene to tobacco plants and analysis of transgenic plants. Ph.D. Thesis. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran – Iran
- Masoumi Asl A, Jalali Javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H (2009) Transformation of cDNA of tissue plasminogen activator (tPA) gene to tobacco plants. The Fifth National Biotechnology Congress of Iran February 1-3, 2009, Tehran
- Masoumi Asl A, Jalali javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H (2007) Cloning and Transformation of Tissue Plasminogen Activator cDNA in Tobacco Plants. The 9th Iranian congress of Biochemistry and the 2nd International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Oct.29-Nov, 1, Shiraz- Iran.
- Masoumi Asl A, Jalali javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H (2009). Human tissue plasminogen activator (tPA) gene expression in transgenic tobacco plants. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. 13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Islamic Republic of Iran, Tehran.
- Masoumi Asl M, Jalali Javaran F, Mahbodi F Alizadeh H (2009) Cloning and transfer of cDNA of tPA gene with human origin to tobacco plants. Iranian Journal of Biology Number 22.
- Mohebodini M, Jalali Javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H, Azhdari H (2009) Human Proinsulin Gene Cloning in Plant Expression Vector *pCAMBIA1304*. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. 13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Islamic Republic of Iran, Tehran.
- Mohebodini M, Jalali Javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H, Khosravi H (2010) Human Proinsulin Gene Cloning in chloroplast Expression Vector *PkcZ*. 11th Iranian Genetic Congress, May 22-24, 2010 Tehran, Iran.
- Mosher DF (1990) Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. *Clinical Cardiology*, 13(6): 5-11.
- Murphy DJ (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in Lipid Research*, 29(4): 299-324.
- Nauciel C, Espinasse-Maes F(1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infection and Immunity* 60(2): 450–454.
- Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L, Ma JKC (2002) ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry*. 269, 6042–6051.
- Rahbarizadeh F, Rasaei M J, Forouzandeh Moghadam M, Allameh A, Sadroddiny E (2004) Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. *Hybridoma and Hybridomics*, 23:151-159.
- Rahimifar P (2009) Human IFN Gene transfer to canola. M.Sc. thesis. Department of Biotechnology, Aborayhan campus of Tehran University. Tehran - Iran.
- Rajabi Memari H (2006) Gene transfer of single-domain antibody against Mucl to tobacco plants and analysis and determination of characters of transgenic plants. Ph.D. thesis, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Rajabi Memari H, Esmaeili A, Jalali javaran M, Rasai MJ, Rahbarizadeh F (2006) Production of single-domain antibody against Mucl with transfer of VHH gene to tobacco. *Journal of agricultural science. chamran Univesity of Ahvaz* 3: 17-25.

- Rajabi-Memari H, Jalali-Javaran M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh Moghadam M, Esmaili A (2006) Expression and Characterization of Recombinant Single-Domain Monoclonal Antibody against MUC1 Mucin in Tobacco Plants. *Hybridoma and Hybridomics*, 25:209-215
- Schillberg S, Twyman R M, Ficher R (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Journal of Vaccine* 23: 1764–1769
- Schillberg S, Emans N, Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemistry Review* 1: 45–54.
- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fisher R (1999) Apoplastic and cytosolic expression of fullsize antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research* 8: 255–263.
- Seeger RC, Rosenblatt JD, Duerst RE, Reynolds CP, Villablanca JG, Hasenauer B, Feig SA (1998) A Phase I Study of Human Gamma Interferon Gene-Transduced Tumor Cells in Patients with Neuroblastoma. *Human Gene Therapy*, 9(3): 379-390.
- Seifi Nabi Abad H (2009) Extraction and purification of human tissue plasminogen activator from transgenic tobacco plants. MS Thesis. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* 13:161–166.
- Stoger E (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, 42: 583–590.
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking  $\beta$ 1,2-linked xylose and core  $\alpha$ 1,3-linked fucose. *FEBS Letter* 561: 132–136.
- Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccines. *International Journal of Parasitology* 33:479–493.
- Taheri javan N (2008) Human IFN gene transfer to canola and regeneration of the transgenic plants. M. Sc. thesis. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H (2003) Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 31: 1174–1179.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, and Ficher R, (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21: 570-578.
- Vain P, Finer KR, Engler DE, Pratt RC, Finer JJ (1996) Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L.) and bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Report* 15: 489–494.
- Warner TG (2000) Metabolic engineering glycosylation: biotechnology's challenge to the glycobiologist in the new millennium. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (Ernst, B. et al., eds), pp. 1043–1064, Wiley-VCH.
- Witcher DR, Hood EE, Petersen D, Bailey M, Bond D, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehig R, Kappel W, Register J, Howard JA (1998) Commercial production of *bg*lucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding*, 4:301–312.
- Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, Delaney DE, McComas-Wagner JM, Mallubhotla HD, Hood EE, Dangott LJ, Tichy SE, Howard JA (2003) Maizederived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 38:123–130.

- Ziegelhoffer T, Cone RA, Whaley KJ (2001) Dramatic effects of truncation and sub-cellular targeting on the accumulation of recombinant microbial cellulase in tobacco. *Molecular Breeding* 8:147–158.
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao YC, Fischer R (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding* 4: 369–379.
- Zuo J, Chua NH (2000) Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 146–151.



## The success of molecular farming in Iran

Jalali Javaran M.\*<sup>1</sup>, Mohebodini M<sup>1</sup>, Masoumi Asl A<sup>1</sup>, Saifi Nabi Abad H<sup>1</sup>, Alizadeh H<sup>4</sup>, Mahbodi F<sup>3</sup>, Ismail A<sup>1</sup>, Rajabi Memari H<sup>1</sup>, Moini A<sup>1</sup>, Honari H<sup>4</sup>, Bagheri Kh<sup>1</sup>, Yaghobi M. M<sup>5</sup>, Zebarjadi A. R<sup>9</sup>, Rasai M. J<sup>2</sup>, Shakib A. M<sup>6</sup>, Rahbarizadeh F<sup>2</sup>, Masoumi H<sup>7</sup>, Forozandeh Moghadam M<sup>2</sup>, Sharifi Syrchy R<sup>7</sup>, Dymyad S<sup>1</sup>, Sadat Noori S. A<sup>8</sup>, Vishlaghi N<sup>1</sup>, Hosseini Pour A<sup>7</sup>, Taheri Javan N<sup>1</sup>, Razmi Sh<sup>1</sup>, Rahimi Far P<sup>8</sup>, Latif B<sup>1</sup>, Abdolinasab M<sup>1</sup>, Azhdari H<sup>1</sup>, Poorkhaleghi M<sup>7</sup>, Razmi A<sup>1</sup>, Khosravi H<sup>1</sup>, Kazemi H<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University

<sup>3</sup> Department of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran

<sup>4</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University.

<sup>5</sup> International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman

<sup>6</sup> Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

<sup>7</sup> Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman

<sup>8</sup> College of Abu Reyhan, Tehran University

<sup>9</sup> Faculty of Agriculture, Razi University of Kermanshah

### Abstract

By using molecular farming, plants are used as a bio-reactor for producing low cost recombinant proteins. This technology had been successful in the production of primary products in the commercial field. Other recombinant products are in final steps of production. In the last 10 years, up to 100 different recombinant proteins are produced in transgenic plants. Plants have many advantages in comparison with other expression systems, especially in economic, safety, operations and production aspects. However, there are some problems for using plants as a bio-reactor with the goal of recombinant proteins production that should be considered. Some of these problems are: the quality of final product, extraction and the processing of plant derived pharmaceutical macromolecules and bio-safety. In this study, we will review the global view of molecular farming and some successful cases in Iran. During 8 years of research in the field of molecular farming in Iran, especially in Tarbiat Modares University, different kinds of recombinant proteins such as VHH single domain antibody in tobacco and canola and tPA protein in tobacco were expressed. The human gamma interferon in canola and tobacco and also the luciferase enzyme in tobacco, African violet and canola were produced. Also, useful projects are executed in the field of transplastomic plants in order to express the mentioned genes in the chloroplast. In transferring the human pro-insulin gene to chloroplast genome, this gene was bombarded onto tobacco leaf ex-plants using a particle delivery system. Leaf ex-plants produced adventitious shoots when cultured on shoot-inducing medium containing spectinomycin. The results of PCR confirmed that the pro-insulin gene was present in the chloroplast genome.

**Keyword:** *Molecular farming, transgenic plant, recombinant protein, bioreactor.*