مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 1، شماره 1، پاییز 1388)

موفقیت های کشاورزی مولکولی (Molecular farming) در ایران

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

[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 ملکولی (Molecular farming) توانسته‌ایم گیاهان را به بیوراکتور، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ارزان قیمت، با ارزش افزوده بالا تبدیل کنیم. این تکنولوژی موفقیت‌هایی در زمینه تجاری‌سازی چند محصول اولیه بدست آورده و محصولات نوترکیب متعدد دیگری فازهای نهایی تولید را می‌گذرانند. طی ده سال گذشته بیش از 100 پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت تولید شده و یا در حال تولید می‌باشد. گیاهان دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سیستم‌های بیانی، بویژه از

* نویسنده مسئول: مختار جلالی جواران تلفن: ۰۹۱۲۳۰۹۱۹۱۷ Email: m_jalali@modares.ac.ir

نظر اقتصادی، ایمنی، عملیات اجرایی و تولید می‌باشند. اما به هر حال مشکلاتی هم در پیش رو جهت استفاده از گیاهان به عنوان رآکتورهای زیستی وجود دارد که باید بر طرف شوند. از جمله این عوامل مهم: کیفیت محصول نهایی، تخلیص و فرآوری ماکرومولکول های دارویی مشتق شده از گیاهان و همچنین ایمنی زیستی می‌باشد. در این بررسی سعی شده علاوه بر مرور زراعت 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 ملکولی در ایران به ویژه در دانشگاه تربیت مدرس، می توان به بخشی از این موفقیت ها اشاره نمود که عبارتند از: 1- تولید آنتی بادی تک دومینی V_{HH} در گیاهان توتون و کلزا 2- تولید پروتئین نوترکیب 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 گیاهانی مانند توتون و کاهو در حال اجرا است که بحمدا... به موفقیتهای اولیه خوبی رسیده اند. 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 اسپکتینومایسین باززایی و گیاه کامل بدست آمد. گیاهان حاصله با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش PCR بررسی شدند که اکثر گیاهان باززایی شده تراریخت بودند.

کلمات کلیدی: *کشاورزی مولکولی، گیاهان تراریخت، پروتئین های نوترکیب، بیوراکتور.*

مقدمه

هزاران سال است که بشر از گیاهان به عنوان یک منبع مواد خام و انواع داروهای گیاهی استفاده می‌کند. همزمان با شکل گیری اولین تمدن ها بشر از عصاره های گیاهی جهت درمان بیماری ها و تسکین دردها استفاده کرده است. از اواخر قرن هفدهم تعداد زیادی پروتئین های دارویی ارزشمند از طریق تحقیقات زیست شناسی مولکولی و پزشکی مولکولی کشف شدند. اما تاکنون تولید این مولکول ها 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 نوترکیب در گیاهان، باعث کشف سیستم های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین های دارویی ارزان تر و ایمن‌تر بودند. تولید زیست داروها و پروتئین های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت

مولکـــولی " Molecular farming" گوینـــد. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود آنتی بادی های نوترکیب، واکسن ها، جایگزین های خوبی، فاکتورهای رشد و آنزیم ها می‌باشد (Schillberg & Fischer, 1999). هم اکنون با رشد شدید تقاضا برای پروتئین های دارویی و تشخیصی مواجه هستیم اما ظرفیت و امکانات موجود جوابگوی نیازهای مورد نظر نیست. به نظر می رسد که در سال های آینده جایگزینی بیوراکتورهای گیاهی به جای سایر سیستم ها تولید پروتئینهای نوترکیب ضروری گردد.

گیاهان تراریخت به عنوان بیورآکتورهای مفید و جالب برای تولید ارزان و فراوان یک درشت مولکول[1] نوترکیب و فعال مثل ترکیبات خونی، واکسن ها، فاکتور های رشد، آنتی بادی ها و آنزیم ها مطرح می باشند (Fischer *et al.*, 2004). چندین پروتئین دارویی مختلف تا بحال از طریق گیاهان تراریخت تولید و تجاری شده است (Fischer & Emans, 2000; Giddings, 2001). با این وجود باید توجه کرد که پتانسیل بالای تولید پروتئین های دارویی در گیاهان فقط در صورتی محقق می‌شود 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 فراورده را نیز به خوبی انجام داد (Strasser *et al.*, 2004).

مختصری از تاریخچه کشاورزی مولکولی

رزاعت مولکولی از زمانی مطرح گردید که اولین بار گیاهان عالی با موفقیت تراریخت شدند (Fraley *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 مونوکلونال در گیاهان توتون گزارش گردید (During 1988) که بعداً هیات و همکاران این آنتی بادی را به صورت ترشحی 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

[3] Macro molecule

تراریخت بیان و توسط شرکت سیگما به فروش می رسد (A8706:sigma). پروتئین β-گلوکورونیداز (Gus) در ذرت تراریخت تولید شده G 2035: sigma و (Witcher *et al.*, 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 رزاعت 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 javan, 2008; Rahimi Far, 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 کارخانه‌های تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده‌اند (Julian *et al.*, 2003). در ایالت ویرجینیا، ذرت برای معالجه بیماری Cystic Fibrosis برداشت می‌شود و در نبراسکا محققین امیدوارند که در مزارع، محصولاتی جهت درمان بیماری ایدز تولید کنند (Fischer & Stoger, 2004). این فعالیت ها بیش از یک دهه است که انجام می‌شود، اما محصولات ذکر شده مراحل نهایی فرآوری خود را به پشت سر گذاشته و وارد آزمایشات کلینیکی و فرایند تجاری شدن گردیده‌اند. در حال حاضر، تعدادی از بیماران مقادیری از این گیاهان را به عنوان دارو استفاده می‌کنند (Gidding *et al.*, 2000). امروزه آنتی بادی‌های نوترکیب حدود 30% از تولید پروتئین‌های بیولوژیک را به خود اختصاص داده‌اند (Joosten *et al.*, 2003). فروش جهانی پروتئین‌های داروئی نوترکیب 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 نوترکیب در بازار وجود دارد که 60% فروش آنها مربوط به شش پروتئین داروئی است (Ma &

Hiatt, 1996). این شش پروتئین نوترکیب داروئی عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، واکسن هپاتیت B، هورمون رشد انسانی، انسولین و اینترفرون آلفا.

بیوراکتورهای گیاهی می‌توانند تا 10 کیلوگرم آنتی‌بادی در هکتار تولید کنند. قیمت تمام شده آنتی‌بادی در گیاهان در مقایسه با تولید آن در بیوراکتورهای دیگر حدود یک دهم تا یک هزارم است (Gidding *et al*., 2000; Daniel, 2003).

مزایا و معایب تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان تراریخت

هزینه های تولید: مزیت عمده گیاهان تراریخت جهت تولید پروتئین های نوترکیب با هزینه پایین، تولید در حجم بالا در مقایسه 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 میکروارگانیسم ها و کشت سلول های حیوانی می باشد، زیرا در سیستم های بیانی گیاهی به فرمانتور و اشخاص با تخصص و مهارت بالا برای کار با این فرمانتورها نیازی نیست (Twyman *et al*., 2003). تخمین زده می شود که هزینه تولید پروتئین های نوترکیب 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 نوترکیب مورد نظر می‌باشد (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 برگی را t-PA نوترکیب 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 گیاهان را می تواند 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، مثلا برای افزایش 10 برابری مقیاس تولید در گله های گوسفند تراریخت (با استفاده از چرخه های اصلاحی مرسوم) زمان زیادی لازم است، در حالیکه سطح زیر کشت گیاهان تراریخت را می‌توان در یک

فصل زراعی تا بیشتر از 1000برابر افزایش داد (Schillberg *et al.*, 2002).

هزینه های تولید پروتئین های نوترکیب با میزان درجه خلوص آن پروتئین در زمان مصرف ارتباط معنی داری دارد، زیرا بیش از 85٪ هزینه های تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان به تخلیص و فعالیت های پایین دستی آن اختصاص دارد (Twyman *et al.*, 2003). البته برای پروتئین های دارویی که نیاز به درجه خلوص بالایی دارند، برای کاهش هزینه های پایین دستی می‌توان راهکارهای زیادی اعمال کرد. از جمله این روش ها می توان به هدف گیری یا بیان پروتئین نوترکیب در یک بافت خاص مانند بذر اشاره کرد (Bagheri, 2009). هزینه های 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 داخل غشایی گیرنده سلول T انسانی، در گیاه بیان شود، پروتئین نوترکیب در غشاء پلاسمایی تجمع یافته و می‌تواند در یک حجم کوچک و با استفاده از بافرها و شوینده های مناسب استخراج شود (Twyman *et al.*, 2003). راهکار دیگر شامل به کارگیری قابلیت برخی از بافت ها 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 پروتئین های دارویی نسبت به سیستم های میکروبی و حیوانی ایمن تر می‌باشد (Jalali Javaran *et al.*, 2008). زیرا معمولاً گیاهان فاقد عوامل بیماریزای انسانی، توالی های DNA انکوژن و اندوتوکسین ها می باشند (Commandeur *et al.*, 2003). به هر حال لازم است که ایمنی ذاتی پروتئین های انسانی تولید شده از طریق گیاهان مورد توجه قرار گیرد، زیرا صحت ساختاری این پروتئین ها برای فعالیت های درون سلولی (*in vivo*) بسیار مهم می باشد (Strasser *et al.*, 2004). مسیر سنتز پروتئین در گیاهان و حیوانات مشابه می باشد طوری که گیاهان قابلیت بسته بندی[1] و سرهم کردن[2] پروتئین های نوترکیب انسانی را دارا می باشند (Twyman *et al.*, 2003)، اما در باکتری ها این فعالیت ها به خوبی صورت نگرفته و موجب تشکیل انکلوژن بادی های غیر محلول می شود. این قابلیت گیاهان زمانی مشخص شد که گیاهان

[1] Follding
[2] Assembling

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[1] می باشد. پروتئین های نوترکیب تولید شده از طریق گیاهان معمولاً دارای گروه های کربوهیدرات β(1-2)Xylase و α(1-3)-Fucose می باشند که این نوع زنجیره های قندی در پستانداران وجود ندارد (Twyman *et al.*, 2003). بعلاوه پروتئین های نوترکیب 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 نوترکیبی 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 نوترکیب مشابه با انواع انسانی در گیاهان وجود دارد (Warner, 2000). مهمترین این روش ها عبارتند از: 1- استفاده از آنزیم های تخلیص شده β(1-4) گالاکتوزیل ترانسفراز[2] و سیالیل ترانسفراز[3] برای ایجاد تغییرات درون شیشه (*in vitro*) در پروتئین های نوترکیب حاصله از گیاهان تراریخت (Blixt *et al.*, 2002). 2- بیان همزمان β(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

[1] Glycan

[2] Galactosyltransferase
[3] Sialyltransferase

آنـــزیم هـــای فکوزیـــل ترانـــسفراز[1] و زایلیـــل ترانسفراز[2] را حل کرد (Twyman *et al.*, 2003). راهکارهای مناسب دیگر بـرای دسـتکاری مـسیر گلیکوزیلاسیون و جلوگیری از اضافه شـدن N - گلیکان های ایمنی زا بـه پـروتئین هـای داروئـی تولید شده در گیاه، ذخیره پروتئین داروئـی درون شبکه آندوپلاسمی است. کـارائی ایـن اسـتراتژی اخیـرا اثبـات شـده اسـت کـه از طریـق افـزودن سـیگنال KDEL بـه انتهـای کربوکـسی ژن بـوده است (Masoumi Asl *et al.*, 2009).

افزایش میزان بیان پـروتئین هـای نوترکیـب در گیاهان

از مهمترین فاکتورهایی که تجاری بـودن کشاورزی مولکولی را تعیین می کنند، رسیدن بـه یک عملکرد مناسب جهت تولیـد پـروتئین هـای نوترکیب می‌باشد (Jalali Javaran *et al.*, 2008; Jalali Javaran *et al.*, 2009)، بـرای بـالا بـردن عملکرد تولید پروتئین های نوترکیـب در گیاهـان می‌توان از روشهای زیر استفاده کرد:

الف-بالا بردن بیان ژن منتقل شده برای رسیدن به این هدف معمـولاً سـعی مـی شـود از پیشبرنده های قوی استفاده شود. برای گیاهان دو لپه ی اغلب از پیش برنده 35S ویروس موزاییک گـل کلـم (*CaMv* 35s) اسـتفاده مـی شـود (Christensen & Quail, 1996). در غـلات پیشبرنده CaMv 35S فعالیت کمتری دارد، بنـابر این از پیـشبرنده یـوبی کـویتین-1[3](ubi-1) ذرت اسـتفاده مـی شـود (Christensen & Quail, 1996). همچنین میـزان رونویـسی در غـلات بـا افزودن یک اینترون بـه ژن منتقـل شـده افـزایش می یابـد. ایـن پدیـده، افـزایش بیـان بواسـطه – اینتـرون نامیـده مـی شـود (Vain *et al.*, 1996). پیشبرنده های تنظیمی نسبت به انـواع پیوسـته از لحاظ عملکـردی و ایمنـی ارجحیـت دارنـد. بـه عنوان مثال اگر چه پیشبرنده های بـا بیـان مـداوم موجب ذخیره پروتئین های نوترکیـب زیـادی در بذر می شود، با این حال پروتئین در همـه بخـش های گیاهی شامل برگ، ریـشه و گـرده نیـز بیـان می شود. در این حالت ممکن است گیاهخواران، حشرات گرده افشان و میکروارگانیسم های تحت تاثیر ایـن پـروتئین هـای نوترکیـب قـرار گیرنـد. محدود کـردن ایـن پـروتئین هـا در بـذر از ایـن خطرات می کاهد (Commandeur *et al.*, 2003; Bagheri, 2009; Stoger *et al.*, 2002). همچنین می توان پیشبرنده های القایی را به کار گرفت تـا بیـان پـروتئین فقـط بعـد از برداشـت محـصول

[1] Fucosyltransferase
[2] Xylyltransferase
[3] Ubiquitin-1

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 به ذخیره سیتوزولی برای بسته بندی پروتئین ها مناسب تر بوده و برای ذخیره پروتئین در سطح بالا مزایای بیشتری دارد (Zimmermann *et al.*, 1998; Schillberg *et al.*, 1999). بسیاری از پروتئین های نوترکیب 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 نوترکیب 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 پروتئازها 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 اسیدآمینه ای H/KDEL به انتهای C پروتئین نوترکیب افزوده می شود تا پروتئین با داشتن این سیگنال پپتیدی در شبکه اندوپلاسمی باقی بماند. این روش موجب انباشت 10-2 برابری پروتئین در مقایسه با زمانی که این سیگنال استفاده نشده است، گردید (Conrad & Fiedler, 1998). از مزایای دیگر سیگنال پپتیدی و انباشت پروتئین ها در شبکه اندوپلاسمی ER این است که پروتئین نوترکیب در اجسام گلژی تغییری پیدا نمی کند (Conrad & Fiedler, 1998).

ج- بیان ژن پروتئین های نوترکیب در کلروپلاست گیاهان

یکی از اهداف انتقال ژِن به کلروپلاست افزایش بیان پروتئین های نوترکیب 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 پلاستیدی برای کشاورزی مولکولی محدودیت هایی دارد، ازجمله 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 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 folwe) 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

شـود و یـا ژن هـای انتخـابی مقاومـت بـه آنتـی بیوتیک ها وارد پـاتوژن هـای انـسانی و حیـوانی شـوند (Commanderur *et al.*, 2003). بـرای کاهش این مشکلات یکی از راه های پیـشنهادی؛ استفاده از نوترکیبی اختصاصی- جایگـاه [1] بـرای حذف ژن های نشانگر انتخابی می باشد تا بعد از انجام تراریختی این ژن ها حذف شوند. مکانیسم ساده آن هم بدین صـورت اسـت کـه از سیـستم Cre-loxP استفاده مـی شـود. در ایـن روش Cre یک آنـزیم نوترکیـب مـی باشـد کـه یـک تـوالی نوکلئوتیـدی کوتـاه بـه نـام *loxP* را تـشخیص می دهد. اگر دو جایگاه *loxP* یک جهـت داشـته باشند، آنزیم Cre هر نوع توالی بین آنها را خارج می سازد. بنابراین اگر هنگام انتقـال ژن، سـاختار ژنی[2] 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 هـای 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 ارگانیـسم هـا مثـل حـشرات، حیوانـات و میکروارگانیـسم هـا داشـته باشـند. ایـن اثـرات می توانـد سـمیت مـستقیم باشـد یـا اینکـه ایـن پـروتئین هـا در زنجیـره غـذایی انباشـته شـده و موجوداتی را هم که تماس غیر مستقیم با گیاهـان تراریخت دارند را آلوده سـازد (Commanderur *et al.*, 2003). راه کارهای غلبه بـر ایـن مـشکل عبارتنـد از: 1- کنتـرل بیـان ژن: بـرای مثـال از پیشبرندهای اختصاصی بذر یا میوه اسـتفاده شـود تا از مـصرف پـروتئین توسـط موجـوداتی کـه از بافت های سبز استفاده می کنند جلوگیری کنـد و یا استفاده از تراریختها القایی به گونه ی که فقـط وقتی تراریخت تحت یک مـاده شـیمیایی خـاص قرار گرفت بیان شود (Zuo & Chua, 2000). 2- کنترل فعالیت پروتئین نوترکیب: بـه ایـن منظـور پیشنهاد می شود که پـروتئین هـای نوترکیـب بـه صورت پیش سازهای غیر فعال تولیـد شـوند. در این روش بعد از تخلیص، پروتئین های نوترکیب تولید شده با تغییراتـی مثـل هـضم پروتئولیتیـک می توانند فعال شوند.

ب- ایمنی محصول نوترکیب

مطالب قبـل بیـشتر بـر اثـرات مخـرب پروتئین های نوترکیب بر میزبان های غیـر هـدف آنها اشاره داشت. اما زمانی که ایـن پـروتئین هـا (بویژه انواع دارویی آنها) مصرف می شوند ممکن است بر خود انسان اثرات سوئی داشته باشند. بـه عنوان مثال پروتئین تخلیص شـده دارای آلـودگی هایی مثـل توکـسین هـا و مـواد حـساسیت زای گیاهی باشـد. همچنـین خـود پـروتئین بـه دلیـل

[1] Site -specific recombination
[2] Construct

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. گرچه همه پروتئین های نوترکیب تولید شده در گیاهان تراریخت به تخلیص نیاز ندارند، اما آنهایی هم 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[1] 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 Nabi Abad, 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 اسیدآمینه هیستیدینی[2] 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).

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

[1] Affinity chromatography
[2] His-tag

تولید آنتی بادی و یا قطعات آنتی بـادی از طریق گیاهان تراریخت توسط آزمایشگاه هـای متعـددی گـزارش شـده اسـت (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 تشخیـصی و درمـانی آنتی بادیهـای مونوکلونـال، تولیـد آنهـا از منـابع دائمی، ایمن و ارزان حائز اهمیـت مـی باشـد. از جمله، می توان به آنتـی بـادی مونوکلونـال تـک دومنی(V_{HH}) با منشاء شتری اشاره نمـود کـه بـه دلیل دارا بودن ویژگی هایی از جمله: تشابه بسیار بـالا بـا زنجیـره سـنگین آنتـی بادیهـای انـسانی، حلالیت، تمایل و اتصال اختصاصی بـه آنتـی ژن، بر دیگر انواع آنتی بادیها تـرجیح داده مـی شـود. آنتی بادی مونوکلونال علیـه آنتـی ژن MUC1 در سال 2004 از منشأ شـتر یـک و دو کوهانـه تهیـه گردیـد (Rahbarizadeh *et al.*, 2004). ایـن آنتی‌بادی تـک دومنـی دارای خـواص حلالیـت، اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن و تمایـل (Affinity) خوبی می باشد. با توجه به اهمیت آنتی بادی تک دومنـی V_{HH} در تـشخیص و درمـان بـسیاری از بیماری های سرطانی و هزینه بسیار بـالای تولیـد آن با استفاده از سایر روشها (از جملـه حیوانـات تراریخته، سلولهای هیبریدوما و ...)، تولیـد آن در گیاهان مورد توجه قرار گرفت و در گیـاه توتـون با موفقیت انجـام شـد (Rajabi-Memari *et al.*, 2006; Ismaili *et al.*, 2006).

در این مطالعه، آنتی بـادی تـک دومنـی V_{HH} بـر علیه آنتی ژن MUC1 در گیاهان توتون به عنـوان یک سیستم بیانی مناسب و اقتصادی تولیـد شـد. ایـن ژن تحـت کنتـرل پیـشبرنده *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* قـرار گرفـت. تـوالی افـزایش دهنده (Kozak) برای بالا بردن بیان به انتهای 5' ژن V_{HH} با منشاء شـتر یـک کوهانـه (*Camelus dromdarius*) اضافه شـد. سـازه سـاخته شـده ($pBIV_{HH}$) بـه اگروبـاکتریوم منتقـل و سـپس ژن V_{HH} بواسـطه اگروبـاکتریوم وارد ژنـوم توتـون گردید. آنالیز گیاهان تراریخت بـا PCR، الایـزا و وسترن بلات صورت پذیرفت و مشخص گردیـد که ژنV_{HH} در گیاهان تراریخت توتـون در حـال بیـان اسـت. میـزان بیـان ٪1/12-1/63 از کـل پروتئین های محلـول را تـشکیل مـی دهـد. ایـن مطالعه، اولین گزارش از تولید این آنتی بـادی در توتون بود (Rajabi-Memari *et al.*, 2006).

همچنـین ژن V_{HH} بـا منـشاء شـتر دو کوهانه (*Camelus bactrianus*) به گیاهان توتون منتقل شد. آنالیز گیاهان تراریخت با PCR ، الایزا و وسـترن بـلات نـشان مـی داد کـه ژنV_{HH} در گیاهان در حال بیان است. بعلاوه نتایج الایـزا بـا 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 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 آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین بازرایی 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 آنتی‌بادی نوترکیب به کلزا و فراهم نمودن زمینه مناسب در جهت تولید سایر پروتئینهای نوترکیب در این گیاه می باشد (Dymyad, 2007).

ج- بیان ژن اینترفرون گامای انسانی(IFNγ) در بذر کلزای تراریخت

پروتئین IFNγ برای درمان بیماران با نقص مادرزادی و همچنین عوامل عفونی درون سلولی مانند لیشمانیا (Assreury *et al.*, 1994) و سالمونلا تیفوموریوم (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. در همین راستا انتقال ژن IFNγ به اجسام روغنی بذر گیاهان کلزا صورت گرفت (Bagheri, 2009). زیرا با توجه به مقدار بالای تری اسیل گلیسروئید (TAGs) در اجسام روغنی، این بخش به راحتی با استفاده از سانتریفوژ از دیگر پروتئین های بذر و اجزای سلولی جدا می‌شود (Murphy, 1990). در ارزیابی کارآیی این روش مشخص شده که بیش از 90% از پروتئین های بذری حذف می‌شوند. به این ترتیب خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با هزینه کمتر و سهولت بیشتری صورت می‌گیرد (Boothe, 1997). به منظور تولید پروتئین نوترکیب اینترفرون گاما در کلزا و ذخیره آن در بذر سه نوع سازه ساخته شد(Bagheri, 2009):

الف- طراحی و ساخت سازه ترکیبی اولئوسین - اینترفرون 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 اینترفرون گاما- اولئوسین برای تولید پروتئین اینترفرون 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 اینترفرون گاما در 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 اگروباکتریوم سویه LBA_{4404} برای تراریختی گیاه کلزا با بهره گیری از ریزنمونه های کوتیلدون استفاده شد. گزینش نوساقه های باززایی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین انجام شد. آنالیز بذور تراریخته نسل اول (T_0) با PCR بیانگر انتقال ژن IFN γ و آزمون RT-PCR نشان دهنده رونویسی ژن IFN γ 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®-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 ساب کلون گردید. ناقل نوترکیب pBI IFNγ با روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم سویه LBA_{4404} 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

آمیـز ژن IFNγ و بیـان پـروتئین نوترکیـب بـود. همچنین حضور پروتئین اینترفرون تولید شده در گیاهان با تـست ELISA تائیـد شـد (Bagheri, 2009).

ج- بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاه کلزا: در این سازه ژن اینترفرون گامـا بـدون اولئوسـین و فقـط تحـت پیـشبرنده Napin بـه گیاهان کلزا منتقل شد. ژن اینترفرون گاما ابتدا در ناقـل pGEM®-T Easy کلـون و پـس از تاییـد صـحت آن بـا اسـتفاده از روش PCR، هـضم آنزیمی و تـوالی یـابی، قطعـه مـوردنظر در ناقـل بیانی گیاهی pBI121 ساب کلـون گردیـد. ناقـل نوترکیب pBI IFNγ با روش انجمـاد و ذوب بـه اگروباکتریوم سویه LBA_{4404} انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه کلزا از طریق ریزنمونـه هـای کوتیلدونی مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. گـزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA بـا اسـتفاده از PCR و در سـطح پـروتئین بـا اسـتفاده از SDS-PAGE بیـانگر انتقـال موفقیـت آمیـز ژن IFNγ و بیـان پروتئین نوترکیب بود (Taheri Javan, 2008).

د- انتقال ژن اینترفرون گامـای انـسانی (به همراه Kozak)در گیاه کلزا: در ایـن سـازه ژن اینترفرون گاما بدون اولئوسین و فقـط تحـت پیشبرنده Napin به همراه توالی Kozak بـه گیـاه کلزا منتقل شد. در این تحقیق برای افـزایش بیـان اینترفـرون گامـای انـسانی در گیـاه کلـزا تـوالی Kozak در مجاورت ژن اینترفرون گامای انـسانی قرار داده شد. ژن اینترفـرون گامـا ابتـدا در ناقـل pGEM®-T Easy کلون و پس از تاییـد صـحت آن بـا اسـتفاده از روش PCR، هـضم آنزیمـی و توالی یابی، قطعه موردنظر در ناقل بیـانی گیـاهی pBI121 ساب کلون گردید. ناقل نوترکیـب pBI IFNγ با روش انجماد و ذوب بـه اگروبـاکتریوم سـویه LBA_{4404} انتقـال و ایـن بـاکتری بـرای تراریختـی گیـاه کلـزا از طریـق ریزنمونـه هـای کوتیلدونی مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. گـزینش نوساقه های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخـت در سـطح DNA بـا اسـتفاده از PCR بیـانگر انتقـال موفقیـت آمیـز ژن IFNγ بـود (Rahimi Far, 2008).

ر- انتقال ژن اینترفرون گامـای انـسانی به گیاه توتون: در این سـازه ژن اینترفـرون گامـا بدون اولئوسین و فقط تحـت پیـشبرنده *CaMV 35S* به همراه توالی افزایش دهنده بیـانی Kozak و توالی HisTag به گیاه توتون منتقل شد. در این تحقیق برای افـزایش بیـان ژن اینترفـرون گامـای انسانی در گیاه توتـون از تـوالی Kozak و بـرای

راحتی تخلیص از توالیHisTag استفاده شد. سازه فوق 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 نوترکیب pCAMBIA1304 IFNγ با روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم سویه LBA_{4404} انتقال و این باکتری برای تراریختی گیاه توتون از طریق ریزنمونه های برگی 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 IFNγ بود (Azhdari, 2009).

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

بیماری های قلبی- عروقی مثل سکته، حمله میوکاردیال حاد و ترومبوامبولیسم وریدی احتمالا 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 ترومبوز، 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 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 اگروباکتریوم 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_0، در مطالعه دیگری گیاهان تراریخت نسل T_1 هم آنالیز شدند. در نهایت بعد از مطالعات 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 tPAتخلیص 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).

تظاهر ژن PA از *Bacillus antracis* در کاهوی ایرانی

سیاه زخم بیماری مهلک مشترک بین دام و انسان بوده و ژن PA (Protective Antigene) از Bacillus antracis 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 اگروباکتریوم 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 PA و *nptII* در گیاهان نسل های اول و دوم با استفاده از PCR و RT-PCR بررسی و نشان داده شد که حداقل یک نسخه از ژن های *Gus* و PA به ژنوم گیاه کاهو منتقل شده است. بیان ژن PAبا استفاده از تکنیک الایزا (ELISA) مورد تایید قرار گرفت (Honari, 2008).

با اطمینان از تراریختی در گیاه کاهو از قطعات همولوگ (rbcL-accD) و پیش برنده Prrn و خاتمه دهنده psbA برای ژن G*us* همراه قطعه ژنی aadA مقاومت به اسپکتینومایسین به همراه پیشبرنده 16Srrn و خاتمه دهنده 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 پلاستیدی بومی pcL96-39 دو تا از چهار ژن PA همراه با قطعه ژنی aadA به همراه پیش برنده 16Srrn و خاتمه دهنده psbA بوسیله تفنگ ژنی به گیاه کاهو منتقل گردید. میزان پروتئین محلول PA از کل موجود (TSP) در برگ های 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 واکسن ها به صورت تزریقی معمولاً پاسخ ایمنی مناسبی در بافت های مخاطی (Mucosal) دریافت کننده واکسن ایجاد نمی کند. سطوح مخاطی از جمله دهان و مجاری تناسلی ورودی های اصلی ارگانیسم های بیماریزا به بدن می باشند. به همین علت به تولید واکسن های خوراکی روی آوردند که نشان داده شد پاسخ ایمنی این بافت ها را به خوبی تحریک می کنند.(Carter & Langridge, 2002; Streatfield & Howard, 2003). واکسن های خوراکی مزایای خیلی زیادی از نظر تولید دارند که به عنوان مثال از آنجایی که دیگر نیازی به تخلیص وجود ندارد بنابراین هزینه های تولید خیلی کاهش می یابد و فرد با مصرف روزانه مقداری میوه یا سبزیجات داروی مورد نیاز را دریافت می کند. از جمله این گزارش ها تولید واکسن علیه ویروس ایدز(HIV) در ذرت بود(Horn *et al*., 2004).

در قالب پروژه دیگری دانشگاه تربیت مدرس تولید پروانسولین در گیاهان به عنوان واکسن تزریقی و همچنین به عنوان واکسن خوراکی مد نظر می باشد. انسولین یک پلی پپتید 51 اسید آمینه ای است که دارای دو زنجیره مجزا (α , β) می باشد. اما در سلول های بتای پانکراس انسان، انسولین به صورت یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد ساخته می شود که به این زنجیره پلی پپتیدی پروانسولین گفته می شود. پیشساز پروانسولین، پری پروانسولین می باشد که به عنوان ماده اولیه تولید پروانسولین در این سلول ها ساخته می شود(Farinas *et al*., 2007). استفاده اصلی پروانسولین جهت درمان بیماری دیابت می باشد که شیوع بسیار بالایی دارد. دو پروژه جداگانه در همین راستا در حال انجام می باشد:

الف- همسانه‌سازی و انتقال ژن پروانسولین انسانی به ژنوم هسته‌ای کاهو

(*Lactuca sativa* L.) و توتون (*Nicotiana tabacum*) و همسانه‌سازی آن در ناقل کلرپلاستی *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) همسانه سازی ژن پروانسولین انسانی در ناقل *pCAMBIA1304* تایید شد. در مرحله بعد با استفاده از بافتهای کوتیلدونی گیاه کاهو و ریز نمونه های برگی گیاه توتون، ژن پروانسولین با استفاده از اگروباکتریوم 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 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 کلرپلاستی، 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 *Nco*I 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 *Nco*I (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 آغازگرهای اختصاصی نایید شد.

ب- همسانه سازی ژن اینترفرون گاما در ناقل کلروپلاستی *pKCZ*: ژن اینترفرون گاما داخل پلاسمید *pRset* دریافت شد. سپس ژن اینترفرون گاما با استفاده از یک پیشبرنده اختصاصی که حاوی سایت برشی آنزیم *Nco*I و His Tag بود تکثیر و سپس این ژن در ناقل TA همسانه سازی شد. با استفاده از آنزیم برشی *Nco*I 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 *Nco*I (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 پروتئین های نوترکیب در حجم انبوه و قیمت ارزان دارند، اما هنوز هم چالش ها 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 پتانسیل های بیوتکنولوژی، این میزان ناچیز بوده و باید تلاش های بیشتری صورت پذیرد.

امروزه با رشد روز افزون تقاضای برای پروتئین های دارویی مواجه می باشیم، اما ظرفیت کافی برای پاسخ به این تقاضا بویژه در کشورهای فقیر و در حال توسعه وجود ندارد. به گونه ی که برخی از داروهای مهم یا در این کشورها اصلاً وجود ندارد و یا با هزینه های گزاف وارد می شود که فقط اقشار ثروتمند قادر به تهیه و استفاده از آنها می باشند. سیستم های تولید سنتی پروتئین های نوترکیب داروئی که از فرمنتاسیون های میکروبی، کشت سلول های حشرات و پستانداران و حیوانات تراریخت استفاده می کنند، از لحاظ هزینه، سطح تولید، ایمنی تولید و درستی محصول اشکالاتی دارند(Ma & Jevnikar, 1999). پژوهش هایی 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 سال های آتی جهت تولید این داروها با کیفیت و کمیت مناسب ضروری می باشد تا با بالا بردن حجم تولید موجب کاهش قیمت این پروتئین ها شود. البته مطالعات آتی علاوه بر بیان پروتئین های مختلف و آزمون

سیستم های میزبانی و بیانی مختلف، باید مطالعات بیشتر روی مسائل تخلیص و فرآوری محصولات نوترکیب تمرکز یابد. همچنین باید با استفاده از تکنیک های مهندسی پروتئین (مثل جهش زایی مستقیم جایگاه ها) با دستکاری توالی های اسید آمینه ای پروتئین های نوترکیب، خصوصیاتی از قبیل پایداری، فعالیت و اختصاصیت که در کاربرد این پروتئین های دارویی بسیار مهم می باشد بهینه شود. چالش 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 گرانقیمت 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 عمدتا در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس حاصل شده است عبارتند از: تولید آنتی بادی تک دمنی V_{HH} در توتون و کلزا، پروتئین نوترکیب tPA در توتون، بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در کلزا و پروانسولین در کاهو و توتون. در زمینه انتقال ژنهای انسانی (مانند: پروانسولین، tPA، اینترفرون گاما) به کلروپلاست، سازه های آنها تهیه شده، مراحل انتقال به کلروپلاست و بررسی بیان آنها در حال انجام است.

سپاسگزاری

نظر به این که 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.

منابع

1. 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-γ gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. Cancer, 80: 401-12.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Brown M, Tyrell A (1985). Isolation of human t-PA genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. Gene. 33:279-284.
7. Carter JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. Critical Review in Plant Scince 21:93–109.
8. 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.
9. 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.
10. Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Blood.12:3114-3124.
11. Commanderur U, Twyman R M, Ficher R, (2003) The biosafety of molecular farming in plants. AgBiotechNet 5: 1-9.
12. 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 Molcular Biology 38: 101–109.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. Daniell H, Khan MS, Allison, L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends in Plant Science. 7: 84–91.
17. During K (1988) Wound-inducible expression and secretion of T4 lysozyme and monoclonal antibodies in Nicotiana tabacum. Ph.D Thesis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultat der Universitat zu Koln.
18. 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.
19. 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.
20. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. Plant Biology 7:152–158.
21. Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. Transgenic Research 9:279–299
22. 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 USA80:4803–4807.
23. Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. Current Opinion in Biotechnology. 12: 450–454.
24. 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.
25. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342:76–78.
26. Honari H (2008) Expression of PA gene from Bacillus antracis in Iranian lettuce (Lactuca sativa). Ph.D. thesis, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University. Tehran - Iran.
27. Hood EE (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities. Current Opinion in Biotechnology. 13: 630–635.
28. 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.
29. Ismaili A, Jalali Javaran M, Rasaee 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.
30. Ismaili A, Jalali Javaran M, Rasaee 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.

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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
36. Julian KC, Drake PMW, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. J. Nature Reviews Genetics, 4: 794-805.
37. Kay E, Drake PMW, Christou P (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Applied and Enviromental Microbiology 68: 3345–3351.
38. 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 alafalfa plants. Journal of Biotechnology and Bioengineering, 64:135-143
39. Komarnytsky S, Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2000) Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid. Plant Physiology. 124: 927–933.
40. 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.
41. Ma JKC Hiatt A (1996) Expressing antibodies in plants for immunotherapy. In: Owen MRL, Pen J (eds) Transgenic plants: A production of pharmaceutical proteins. John Wiley & Sons, Chichester, U.K. pp 229-243
42. 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
43. 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
44. 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.

45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Mosher DF (1990) Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. Clinical Cardiology, 13(6): 5-11.
50. Murphy DJ (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. Progress in Lipid Research, 29(4): 299-324.
51. 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.
52. Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L, Ma JKC (2002) ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. Europian Journal of Biochemistry. 269, 6042–6051.
53. Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, 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.
54. Rahimifar P (2009) Human IFN Gene transfer to canola. M.Sc. thesis. Department of Biotechnology,Aborayhan campus of Tehran University. Tehran - Iran.
55. Rajabi Memari H (2006) Gene transfer of single-domain antibody against Muc1 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.
56. Rajabi Memari H, Esmaeili A, Jalali javaran M, Rasai MJ, Rahbarizadeh F (2006) Production of single-domain antibody against Muc1 with transfer of VHH gene to tobacco. Journal of agricultural science. chamran Univesity of Ahvaz 3: 17-25.
57. 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
58. 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

59. Schillberg S, Emans N, Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemistry Review 1: 45–54.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. Current Opinion in Biotechnology 13:161–166.
64. Stoger E (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. Plant Molecular Biology, 42: 583–590.
65. Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H (2004) Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking β1,2-linked xylose and core α1,3-linked fucose. FEBS Letter 561: 132–136.
66. Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccines. International Journal of Parasitology 33:479–493.
67. 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.
68. Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H (2003) Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. Nucleic Acids Research 31: 1174–1179.
69. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Ficher R, (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends in Biotechnology 21: 570-578.
70. 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.
71. 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.
72. Witcher DR, Hood EE, Petersen D, Bailey M, Bond D, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehigh R, Kappel W, Register J, Howard JA (1998) Commercial production of bglucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. Molecular Breedding, 4:301–312.
73. 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.

74. 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.
75. 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.
76. 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.[*1], Mohebodini M[1]., Masoumi Asl A[1]., Saifi Nabi Abad H[1]., Alizadeh H[4]., Mahbodi F[3]., Ismail A[1]., Rajabi Memari H[1]., Moini A[1]., Honari H[4]., Bagheri Kh[1]., Yaghobi M.M[5]., Zebarjadi A.R[9]., Rasai M.J[2]., Shakib A.M[6]., Rahbarizadeh F[2]., Masoumi H[7]., Forozandeh Moghadam M[2]., Sharifi-Sirchi G.R[7]., Dymyad S[1]., Sadat Noori S.A[8]., Vishlaghi N[1]., Hosseini Pour A[7]., Taheri Javan N[1]., Razmi Sh[1]., Rahimi Far P[8]., Latif B[1]., Abdolinasab M[1]., Azhdari H[1]., Poorkhaleghi M[7]., Razmi A[1]., Khosravi H[1]., Kazemi H[1].

[1] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
[2] Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University
[3] Department of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran
[4] Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University.
[5] International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman
[6] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran
[7] Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman
[8] College of Abu Reyhan, Tehran University
[9] 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 Modarres 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.*

---

[*] **Corresponding author:** Mokhtar Jalali Javaran tel: 09123091917 Email:M_jalali@modares.ac.ir