مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه۲۰۹-۱۹۷

کاربرد ناقل‌های ویروسی گیاهی در بیوتکنولوژی

Application of plant viral vectors in biotechnology

مسعود شمس بخش[۱]*، عبدالباسط عزیزی [۱ و ۲]

Masoud Shams-bakhsh [1]*, Abdulbaset Azizi [1, 2]

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- گروه گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

1. Department of plant pathology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of plant protection, University of Kurdestan, Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/٦ – تاریخ پذیرش:۹۵/۹/۱۱)

چکیده

از حدود ٤٠ سال پیش شاخه‌ای از ویروس‌شناسی با هدف استفاده از ویروس‌های گیاهی پایه-گذاری شد و از ویروس‌های گیاهی متعددی به عنوان ناقل‌های بیانی استفاده شده است. استفاده از ویروس‌های گیاهی برای بیان پروتئین نوترکیب، باعث افزایش سرعت تولید پروتئین، کاهش هزینه و هم‌چنین افزایش راندمان تولید برای مصارف صنعتی و پزشکی و در برخی موارد برای افزایش کارائی واکسن‌ها شده است. به این منظور لیگاندهای غیر پپتیدی ایمونوژنیک به سطح خارجی پوشش پروتئینی ویروس متصل می‌شود. از دیگر کاربردهای مهم ویروس‌های گیاهی در زیست‌شناسی کشف عملکرد ژن‌ها است. در این مقاله سعی شده است استفاده از ویروس‌های گیاهی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب مرور شود.

واژه‌های کلیدی

**ویروس‌های گیاهی،
عملکرد ژنها،
پروتئین های نوترکیب**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

مقدمه

با پیشرفت دانش ویروس شناسی، استفاده از ویروس‌ها به عنوان ناقل‌های بیانی در زیست فناوری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با اهداف درمانی و صنعتی افزایش یافته‌است. به‌کاربردن یک بیمارگر گیاهی در صنعت و درمان در واقع تبدیل کردن تهدید به فرصت است. شاخه-ای از علم ویروس شناسی به سمت استفاده از ویروس‌ها متمرکز شده‌است (Werner *et al.* 2006). این تغییر مسیر از حدود ٤٠ سال پیش به سبب تلفیق و همراه شدن ویروس‌شناسی با Biomimic chemistry و توسعه ابزارهای مطالعات زیست‌شناسی مولکولی شتاب فزاینده‌ای گرفته است (Young *et al.* 2008). این مقاله سیر تکاملی بکارگیری ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل بیانی (Expression vector) با تاکید بر ویروس‌های با ژنوم آر ان ا مثبت را بررسی می‌کند.

بیانی پروتئین نوترکیب

تولید پروتئین فعال به‌منظور انجام پژوهش‌های پزشکی و زیست شناسی ضروری است. در پزشکی مدرن از پروتئین های نوترکیب به عنوان واکسن و آنتی ژن در کارهای درمانی و تشخیصی استفاده می‌شود (Pogue *et al.* 2002). بعضی از این پروتئین‌ها مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، آنزیم یا هورمون‌های درمانی، سیتوکنین یا فاکتور رشد برای سامانه‌های درون شیشه‌ای، آنتی ژن برای تیمارهای ضد سرطانی و واکسن‌ها علیه بیماری‌های عفونی از این قبیل موارد محسوب می‌شوند (Klimyuk *et al.* 2005). به منظور حفظ فعالیت زیستی بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب، آنها را در سلول‌های یوکاریوتی تولید می‌کنند (Baneyx 1999). پروتئین نوترکیب یوکاریوتی ابتدا توسط تکنولوژی راکتور زیستی سلولی مانند Chinese hamster ovary (CHO) cells (Hesse & Wagner 2000)، سلول های حشرات (Condreay *et al.* 1999) و سامانه مخمر (Eckart & Bussineau 1996) تولید شد. تولید در این سامانه‌ها به دلیل استفاده از تجهیزات خاص پرهزینه است (Odum 2001).

هزینه تولید پروتئین نوترکیب در سیستم جانوری بالا و حجم پروتئین تولیدی پائین است (Pogue *et al.* 2002). برای تولید جمعیت بالایی از لاین سلولی تراریخته جانوری وقت و هزینه زیادی صرف می‌شود و سمیت بیان بعضی از پروتئین‌های نوترکیب برای خود سلول تراریخته در شرایط طبیعی، به عنوان مهمترین محدودیت این فرایند مطرح است. بنابراین تلاش برای جایگزینی یک سامانه مطلوب انجام شد (Pogue *et al.* 2002). در نتیجه گیاهان تراریخته به عنوان ابزاری برای حل این محدودیت‌ها مورد توجه قرار گرفته است، تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان نیازمند تجهیزات کمتر، هزینه‌های پائین‌تر، عملکرد بالا و سریع تر نسبت به سامانه استفاده از حیوان‌ها بوده و هزینه تولید را کاهش می دهد (Pogue *et al.* 2002)

گیاهان به عنوان راکتورهای زیستی برای تولید پروتئین های نوترکیب:

هرچند از دیرباز گیاهان به عنوان راه حل مشکل تولید پروتئین‌های نوترکیب و به عنوان راکتور زیستی به شمار می‌آمدند. اما در سال‌های گذشته استفاده از گیاهان به عنوان کارخانه تولید پروتئین‌ها برای استفاده‌های پزشکی و صنعتی رشد کرده است. در این راه‌کار کل اندام گیاه همانند سامانه کشت سلول گیاهی می‌تواند پروتئین ارزان، ایمن و با فراوانی بالا تولید کند (Karg & Kallio. 2009).

دو روش کلی برای تولید پروتئین در گیاهان وجود دارد؛ بیان دائمی از طریق انتقال ژن به هسته سلول یا انتقال ژن به پلاستیدها و بیان موقت در گیاهان با استفاده از اگروباکتریوم یا ناقل های بیانی ویروس‌های گیاهی (Pogue *et al.* 2002). هر چند تولید گیاهان تراریخته در حال تبدیل شدن به یک روش استاندارد در کشاورزی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

است، اما برای تولید لاین بذری پایدار زمان زیادی لازم است، بیان پروتئین توسط پدیده خاموشی ژن، هم‌چنین آلودگی‌های ژنتیکی و عدم پذیرش این گیاهان از طرف جامعه، از جمله مشکلاتی است که برای این روش مطرح می‌شود (Pogue *et al*. 2002). در روش انتقال ژن به پلاستیدها مشکل اینست که پلاستیدها مانند باکتری‌ها توانائی تغییرات بعد از ترجمه ازجمله گلیکوزیله شدن را ندارند. این روش هم مانند انتقال ژن به هسته زمان بر و کند است (Gleba *et al*. 2005). از طرف دیگر در بیان موقت توسط اگروباکتریوم، معمولا" سطح پائینی از بیان صورت گرفته و عقیده براین است که نمی‌توان از بیان موقت توسط اگروباکتریوم برای تولید پروتئین در سطح صنعتی استفاده کرد (Gleba *et al*. 2005). بنابراین استفاده از ویروس‌ها به عنوان ناقل بیانی جهت بیان پروتئین‌های هترولوگوس در گیاهان به عنوان راه حل جایگزین معرفی شده است (Egelkrout *et al*. 2012). ویروس مهندسی شده که حاوی ژن مورد نظر است، در بافت‌های گیاهی تکثیر شده و به همین سبب میزان بیان پروتئین در این روش به‌مراتب بیشتر است. با استفاده از ناقل ویروسی می‌توان در زمان محدودی میزان نسبتا" بالائی پروتئین تولید کرد. هم‌چنین به این سبب که ژن هدف به ژنوم گیاه ملحق نمی‌شود، درنتیجه به ارث نمی‌رسد و سبب نگرانی-های زیست محیطی کمتری می‌شود (Gleba *et al*. 2007). در مقایسه با سامانه بیانی باکتریایی، استفاده از سامانه‌های بیانی ویروسی برای بیان پروتئین‌های درمانی خطر آلودگی اندوتوکسین‌ها را کاهش می‌دهد و ظرفیت تولید پروتئین را در سطح وسیع افزایش می‌دهد (Yevtushenko & Misra 2012). هم‌چنین این سامانه‌ها مشکلاتی نظیر محدودیت‌های سامانه پروکاریوتی ازجمله تولید سموم اندوتوکسین، pyrogene ها، ناپایداری پلاسمیدی و عدم تشابه تغییرات پس از ترجمه با سامانه یوکاریوتی مانند باندهای دی سولفیدی و گلیکوزیله شدن را ندارند (Bagheri *et al*. 2010).

یکی دیگر از مزایای استفاده از ناقل‌های ویروسی گیاهی آلوده‌کردن گونه‌های گیاهی متفاوت توسط آنها است. با این کار ما می‌توانیم میزبان‌های مختلف برای بیان پروتئین با میزان، کیفیت و خلوص بالا را آزمایش کرده و از بین آنها بهترین را انتخاب کنیم (Verch *et al*. 1998). روش-های مختلفی برای آلوده سازی گیاهان با ناقل‌های ویروسی وجود دارد که بطور کلی می‌توان به صورت زیر دسته بندی کرد. روش مایه زنی توسط پلاسمید دارای سازه، روش مایه زنی توسط عصاره گیاه آلوده و به‌صورت پیکره کامل ویروسی (ویریون)، مایه زنی توسط اگروباکتریوم دارای سازه ویروسی و این روش خود شامل مایه زنی با تزریق اگروباکتریوم به زیر برگ گیاه میزبان و استفاده از مکش برای تزریق باکتری به کل گیاه (Magnifection) اشاره کرد.

نسل اول ناقل‌های ویروسی: ویروس کامل

توانائی ویروس‌های گیاهی در تغییر سلول آلوده برای تولید پروتئین‌هایی رمز شده توسط ژنوم ویروسی این فرضیه را تقویت کرد که ویروس‌های گیاهی می‌توانند بعنوان ناقل برای بیان پروتئین‌های خارجی در گیاهان استفاده شود. ویروس‌های آر ان ا دار مثبت در سیتوپلاسم سلول مشابه با آر ان ا پیامبر عمل کرده و ریبوزوم بر روی آن‌ها قرار گرفته و از روی توالی آن‌ها پروتئین می‌سازد. باتوجه به تکثیر بسیار بالای ویروس‌ها در سلول، استفاده ویروس‌های گیاهی از سیستم آر ان ا زیر ژنومی و بهره گرفتن از آر ان ا های پلی سیسترونیک، تعداد بالای رشته-های ویروسی (Bustamante and Hull, 1998) باعث می-شود که عملا" سلول به خدمت ویروس جهت بیان پروتئین‌های آن‌ها در آید. نسل اول ناقل‌های ویروسی گیاهی، ویروس‌های هستند که دارای تمام ژن‌های خود بوده و ژن خارجی یا مورد نظر را همراه با ژن‌های خود بیان می‌کنند. به این راهبرد "ویروس کامل" اطلاق می‌شود (Gleba *et al*. 2007). پروتئین مورد نظر تحت یک پیشبر (پروموتر) قوی ویروسی و در جایگاهی مابین ژن‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

ویروس و یا پس از آنها بیان می‌شود و یا بصورت متصل شده به پروتئین پوششی ویروس و تحت همان پیشبر بیان می‌شود (Gleba *et al*. 2007; Mirzaee *et al*, 2016). در این راهبرد ژن هدف از طریق ژنوم ناقل آلوده کننده و یا ترجیحا" از طریق پیکره کامل ویروسی به داخل سلول گیاهی وارد می‌شود. این فرایند در سطح وسیع با پاشیدن پیکره بالغ ویروس به گیاهان زراعی و با خراش توسط پودر کاربوراندوم انجام می‌شود. بسته به کارائی ناقل و توانائی سیستمیک شدن آن، طی دو تا سه هفته گیاه به‌طور کامل توسط ویروس آلوده شده و ژن مورد نظر را در سلول‌های آن بیان می‌کند. بیان موقت cDNAی ویروس با استفاده از اگروباکتریوم نیز روشی جایگزین برای مایه‌زنی ویروس حاوی ژن مورد نظر است (Gleba *et al*. 2007)، برای مثال از Amplicon-plus Targeting Technology برای مایه‌زنی ویروس ایکس سیب زمینی استفاده شده است (Azhakanandam *et al*. 2007). در این روش گیاهان میزبان را با عامل مهارکننده خاموشی تراریخته می‌کنند تا مقاومت گیاه مقابل ویروس کاهش یابد و تکثیر ویروس با سرعت بیشتری انجام گیرد و همچنین با اضافه کردن توالی chloroplast transit peptide (CTP) باعث هدایت پپتید پاپیلومای ویروس L1 به سمت کلروپلاست شدند و با این کار میزان بیان پروتئین نیز افزایش یافت. آلودگی توسط اگروباکتریوم بسیار سریع و ساده انجام می‌گیرد، اما محصول پروتئینی بدست آمده بسیار ناچیز است (۰/۳ تا ۰/۰٤ کل پروتئین محلول) از اینرو این روش نیاز به بهینه شدن دارد. همچنین به علت استفاده از اگروباکتریوم، این فرآیند در سطح صنعتی سبب آلودگی‌های زیستی به اگروباکتریوم تراریخت می‌شود (Gleba *et al*. 2007).

پژوهش‌های انجام شده روی ناقل‌های ویروسی نسل اول، نقاط قوت و ضعف این راهبرد را نمایان کرد. از جمله نقاط مثبت می‌توان به بیان پروتئین‌های فعال و عملکردی با استفاده از این ناقل‌ها اشاره کرد. همچنین در پژوهش‌های انجام شده با اتصال اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک به ژن پروتئین پوششی، علاوه بر ایمونوژن بودن این اپی‌توپ‌ها، میزان بالایی از آنتی بادی علیه این اپی توپ‌ها تولید شده و سطح بالائی از ایمنی در حیوان‌ها مدل گزارش شده است (Gleba *et al*, 2007). در مقابل گروه‌های مختلفی از جمله گروه Rybicki (2006) که روی بیان پوشش پروتئینی L1 ویروس پاپیلومای انسانی (Papillomavirus) در گیاهان مطالعه می‌کردند، نشان دادند که مونتاژ پیکره‌های شبه ویروسی در سلول‌های گیاهی دچار مشکل شده و مهمتر از آن، راندمان تولید با این روش کمتر از پروتئین تولید شده توسط گیاهان تراریخته است (Varsani *et al*. 2006). این پژوهشگران دلیل کاهش بیان پروتئین را حذف سریع تراریخته در ناقل بعلت اندازه بزرگ ژن L1 (1.5 kb) دانسته‌اند. محدودیت در اندازه ژن وارد شده به ناقل ویروس کامل در ناقل‌های ویروسی دیگر از جمله ویروس ایکس سیب‌زمینی و ویروس موزائیک توتون نیز بررسی شده است (Avesani *et al*. 2007) و مشاهده شد که بین اندازه توالی خارجی و پایداری ناقل ارتباط معکوس وجود دارد.

تا سال‌های گذشته فقط اپی‌توپ‌های کوچک (کمتر از ۲۵ آمینواسید) بطور موفقیت آمیز به‌صورت متصل با پروتئین پوششی ویروسی بیان شده است، اپی‌توپ‌های بزرگتر باعث جلوگیری از مونتاژ (assembly) ویروس می‌شوند. برای حل این مشکل از اتصال دهنده‌های قابل انعطاف پلی پپتید بزرگتر، مانند قطعه کامل و عملکردی پروتئین A (دارای ۱۳۳ آمینو اسید) در سطح توباموویروس‌ها (tobamoviruses) بدون تاثیر روی مونتاژ ویروس بصورت ناحیه اتصالی به انتهای کربوکسیل پروتئین پوششی ویروس استفاده شده‌است (Werner *et al*. 2006). این نتایج هم‌چنین نشان داده است که اندازه نهایی برای پروتئین‌های اتصالی به پروتئین پوششی دارای محدودیت اندازه ۲۵-۲۰ آمینواسیدی نبوده و با استفاده از این نوع پروتئین‌های متصل شده به پروتئین پوششی می‌توان این ظرفیت را افزایش داد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

راه‌اندازهای آران‌ای زیر ژنومی نیز برای بیان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفته اند. برای این منظور توالی متناظر آنها در ابتدای توالی ژن خارجی قرار داده شد (Chapman *et al.* 1992; Scholthof *et al.* 1996) در این سازه راه‌انداز ژن پروتئین پوششی ویروس که در ابتدای ژن GUS در ناقل بیانی PVX درج شده است سبب افزایش بیان GUS در برگ‌های مایه‌زنی شده و همچنین به صورت سیستمیک در برگ‌های بالایی گیاه توتون *Nicotiana clevelandii* شد. در بعضی موارد ژن مورد نظر در درون یک چارچوب خواندنی ویروسی همسانه سازی شده و یک توالی پپتیدی جهت تسهیل جداشدن پروتئین متصل شده به پروتئین ویروسی در آن درج می‌شود. این روش برای اعضای پوتی‌ویروس‌ها و کلسترووویروس‌ها که پروتئین بزرگ و مرکب از چند پروتئین عملکردی بهم چسبیده دارند انجام شده است. در این سیستم ویروسی چند پروتئین عملکردی را از طریق یک چارچوب خوانش بیان می‌کند و بعد از بیان توسط قسمت‌هایی از همین پروتئین که خاصیت پروتئازی دارد، پروتئین اولیه برش خورده و به چند پروتئین جداگانه فعال تبدیل می‌شود. حال در این راهبرد توالی مورد نظر مشابه ژن‌های ویروسی بصورت پلی پروتئینی بیان شده و مکان برشی مناسب برای برش توسط پروتئاز و جدا کردن پروتئین مورد نظر از پروتئین-های ویروسی اضافه می‌شود (Hagiwara *et al.* 1999). از ویروس موزائیک زرد کدو که یک پوتی ویروس است برای بیان پروتئین اینترفرون گامای انسانی INF-γ در گیاهان استفاده شده است و ژن مورد نظر بین چارچوب-های خواندنی P1 و HC-Pro قرار داده شد و در نتیجه INF-γ در گیاه سلمه تره به‌طور پایدار بیان شد (Nassaj Hosseini *et al.* 2012). هم‌چنین از همین سیستم برای بیان ژن کد کننده پروتئین حرکتی ویروس موزائیک خیار به‌طور موفقیت آمیزی استفاده شده است (Nassaj Hosseini *et al.* 2013).

نسل دوم ناقل‌های ویروسی: ناقل های تغییریافته و Magnifection

تولید انبوه پروتئین نیازمند انتقال ژن به سلول‌های زیادی از گیاه است. هر چند این هدف با استفاده از ناقل‌های ویروسی نسل اول که قادر به حرکت سیستمیک می‌باشند به دست می‌آید، اما محدودیت‌هایی نیز دارند: در حرکت سیستمیک کل گیاه و یا کل بافت قابل برداشت گیاه مانند برگ‌های تحتانی آلوده نمی‌شود، همچنین توالی‌های هترولوگوس بیش از یک کیلو جفت باز را نمی‌توان با استفاده از ناقل‌های ویروسی نسل اول بیان کرد، فقط اپی-توپ‌های کوتاه به‌طور موثر به پروتئین پوششی ویروسی متصل و بیان می‌شود. این محدودیت‌ها باعث شد که در مورد طراحی ناقل‌های کلاسیک تجدید نظر شود. بیشتر تلاش‌های انجام گرفته در جهت دستکاری ویروس و طراحی سامانه تلفیقی جدیدی بود که در آن فقط عناصر ویروسی لازم برای بیان توالی مورد نظر نگهداری شده و عملکردهای از دست رفته با استفاده از روش‌های غیر ویروسی تامین شود. توانائی تکثیر این سازه‌ها خیلی قوی بوده و بنظر می‌رسد که این راهبرد بسیار موفقیت آمیز است (Gleba *et al.* 2007).

دو عامل محدود کننده در ناقلین نسل اول ویروس‌های گیاهی، عدم توانایی ناقل در انتقال سیستمیک در گیاه میزبان و سطح پائین بیان پروتئین مورد نظر را می‌توان با حذف توالی رمزکننده پروتئین پوششی و قرار دادن توالی رمزکننده حرکت سیستمیک در گیاه توسط اگروباکتریوم حل کرد. پژوهش‌های انجام گرفته در سال ۱۹۹۳ نشان داد که انتقال ژن توسط اگروباکتریوم کارائی کافی را نداشته و تخمین زده می‌شود که یک آلودگی به ازاء 10^8 سلول اگروباکتریوم صورت می‌گیرد، هرچند که کارهای انجام گرفته با ناقل‌های ساخته شده از سویه‌های مختلف توباموویروس‌ها (tobamoviruses) تا حدی این مشکل را مرتفع کرد. بررسی‌ها نشان داده است که آلودگی زود هنگام گیاه به ناقل ویروسی توسط اگروباکتریوم، باعث

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

کاهش رونویسی و تکثیر ناقل در هسته می‌شود (Gleba *et al.* 2007).

از آنجائیکه ژنوم ویروس‌های آر ان ا دار مانند ویروس موزائیک توتون هیچ وقت وارد هسته نمی‌شوند، بنابراین تحت تاثیر ماشین تغییر دهنده آر ان ا هسته‌ای قرار نمی-گیرند. در حالتی که توالی بدون تغییر ویروس تیپ وحشی بصورت دی ان ا توسط اگروباکتریوم به هسته وارد می-شود، رونوشت‌های آنها قبل از رسیدن به سیتوزول تجزیه می‌شود. درنتیجه برای جلوگیری از تجزیه، تغییر ناقل‌ها به روش‌های مختلف بطور مثال، ایجاد جهش خاموش جهت جلوگیری از حذف اینترون، تغییر در کدون معمول و اضافه کردن چندین اینترون گیاهی صورت گرفته و در نهایت قالب T-DNA سنتزی بسیار فعال ساخته می‌شود. وقتی که این قالب‌ها از طریق اگروباکتریوم بصورت دی ان ا به داخل گیاه وارد می‌شوند، تبدیل اطلاعات دی ان ا به ریبلیکون‌های فعال و کارا، تقریبا" در همه سلول‌ها (۹۳٪ <)، انجام می‌شود (Marillonnet *et al.* 2005; Gleba *et al.* 2007).

در ناقل‌های تکمیل شده نسل دوم از هر ۲۰-۱۰ سلول اگروباکتریوم اسپری شده یک آلودگی موفق صورت می-گیرد. هم‌چنین فرایند آلوده سازی نشان داد که در چندین گونه گیاهی عمل کرده، هرچند که بهترین کارائی را در *Nicotiana benthamiana* داشته است (Marillonnet *et al.* 2005).

برپایه این یافته‌ها، دستورالعمل‌های ساده‌ای برای بالابردن بیان پروتئین‌های هترولوگوس در گیاهان طراحی شده است که بدون تغییر ژنتیکی پایدار در گیاه و با تکثیر گذرای ناقل ویروسی وارد شده به کل گیاه توسط اگروباکتریوم، صورت می‌گیرد. ماهیت این دستورالعمل برپایه اسپری گیاه توسط سوسپانسیون بسیار رقیق اگروباکتریوم حامل ریپلیکون پیش ویروسی در T-DNA، استوار است. در این مورد آلوده سازی بصورت آغشته کردن کل گیاه با اگروباکتریوم صورت می گیرد تا حرکت سیستمیک را جبران کند (Gleba *et al.* 2007). تکثیر در هر سلول و حرکت سلول به سلول توسط ریپلیکون‌ها انجام می‌گیرد. بسته به ناقل استفاده شده، میزبان و تراکم اولیه باکتری، این عمل ۱۰-٤ روز طول می‌کشد و بسته به ژن اختصاصی مورد نظر وارد شده، نتایج می‌تواند از پنج گرم پروتئین نوترکیب در هر کیلوگرم زیست توده برگ تازه و یا تا بیشتر از ۵۰ درصد کل پروتئین محلول است. بنابراین از آنجا که ناقل ویروسی فاقد ژن پروتئین پوششی است، می تواند ژن‌های بیشتر از ۲/۳ kb توالی هترولوگوس یا پروتئین با وزن بیش از ۸۰ KDa را بیان کند. آلوده سازی گیاهان با استفاده از آغشته کردن برگ‌ها به باکتری به روش‌های مختلفی انجام می‌شود، یکی از روش‌های متداول آلوده سازی استفاده از مکش(Vacuum infiltration) است. در این روش بعد از شناورکردن برگ-های گیاه در سوسپانسیون باکتری با مکش ضعیف آلودگی انجام می‌گیرد (Gleba *et al.* 2005). این راهبرد جدید بیانی Magnifection نامیده می‌شود. سرعت و سطح بالای بیان محصول ویروسی، کارائی بالای انتقال توسط اگروباکتریوم، توانائی تغییرات بعد از ترجمه و کم هزینه بودن تولید در گیاه از جمله مزایای این راهبرد است (Gleba *et al.* 2007) و تاکنون بیشتر از ۵۰ پروتئین مختلف و ترکیبات پیچیده از همه دسته‌های پروتئین‌های پزشکی ازجمله هورمون رشد انسانی، هم چنین دو آنتی ژن متفاوت Yersina pestis، F و V، و پروتئین متصل شده F1-V بطور موفقیت آمیز با استفاده از Magnifection بیان شده است (Gleba *et al.* 2007; Gleba *et al.* 2005; Santi *et al.* 2006).

از آن جایی‌که گیاهان میزبان دارای واکنش مقاومت به ویروس‌ها هستند، در پژوهشی سعی شد که گیاه میزبان حساس به ویروس تولید شود. به این منظور گیاهان تراریخته‌ای معرفی شد که قادر به تولید بالای برخی از پروتئین‌های ویروسی مثل پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی بوده و باعث گسترش دامنه حساسیت میزبان‌ها شدند (Sanz *et al.* 2000). بعلاوه با خاموش کردن ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

RdRp در گیاه توتون میزان حساسیت آن به تعدادی از ویروس‌ها افزایش یافت (Shams-bakhsh 2011). بعلاوه با تراریخته کردن گیاه توتون با ژن بازدارنده خاموشی HC-Pro نتایج مشابهی بدست آمد (Shams-bakhsh *et al.* 2007). ناقلین بیانی برپایه جیمنی ویروس‌ها که در آن ژن *rep* تحت کنترل یک راه‌انداز قرار گرفته، توانست بخوبی بر مشکل کاهش بیان و همچنین محدودیت اندازه پپتید خارجی فائق بیاید (Hefferon & Fan 2004). بطور کلی تابحال برای تولید تعداد زیادی از ویروس‌های جانوری و انسانی با استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل بیانی واکسن تهیه شده است، که تعدادی از آنها شامل ویروس هپاتیت B (Rybick & Martin 2014)، هپاتیت C (Mason *et al.* 2012; Nuzzaci *et al.* 2010) ، ویروس آنفلوانزا (Mallajosyula *et al*, 2013; Petukhov *et al.* 2013)، ویروس پاپیلوما (Cerovska *et al.* 2012) ویروس عامل بیماری ایدز (Kessans *et al.* 2013)، ویروس ابولا (Phoolcharoen *et al.* 2011) و دیگر ویروس‌های جانوری (Yusibov *et al.* 2002) است. اما درواقع تنها پروتئین درمانی تولیدی در گیاهان که تابحال از طرف سازمان غذا و دارو آمریکا مورد تائید قرار گرفته است آنزیم درمانی glucocerebrosidase است که در سال ۲۰۱۲ برای درمان Type 1 Gaucherdisease در آمریکا تولید و توسط FDA مورد تائید قرار گرفت. سپس این ترکیب توسط شرکت PROTALIX با نام asELELYSO™ و یک شرکت برزیلی نیز تولید شد (Rybicki 2014).

ناقل‌های غیر رقابتی نسل دوم برای بیان پروتئین‌های hetero-oligomeric :

اگرچه توانایی گیاهان در بیان آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کامل بیش از بیست سال است که شناخته شده، دستورالعمل‌های بیانی اولیه دارای نواقصی بودند. به‌ویژه، هرچندکه در ترانسفرم کردن پایدار گیاه، ایمونوگلوبین های کلاس A و G (IgA, IgG) به‌صورت صحیح تاخوردگی پیدا کرده و بصورت عملکردی بیان می‌شوند، میزان محصولات بسیار پائین (۱-۲۵ mg/kg از بافت گیاهی) است (Gleba *et al.* 2005). همچنین بیشتر از دو سال وقت لازم است تا به اولین میزان تولید آنتی بادی رسید. سامانه بیانی موقت باعث تولید محصول هدف بطور سریع در مقدار مورد نظر می‌شود. درحالی که میزان بیان در قالب‌های بیانی غیرتکثیری بسیار پائین است (Vaquero *et al.* 1999).

یک روش سریع برای تولید وسیع و به میزان نامحدود آنتی‌بادی مونوکلونال کلاس ایمونوگلوبین G (IgG) با طول کامل در گیاهان معرفی شده است (Giritch *et al.* 2006). این روش براساس آلودگی همزمان با دو ناقل ویروسی است که هرکدام یکی از زنجیره‌های آنتی‌بادی را بیان می‌کنند. سازه‌های ساخته شده از دو ناقل ویروسی جداگانه که با همدیگر رقابت ندارند ایجاد شده‌اند. این ناقل‌ها قادراند در یک سلول گیاهی با کارائی بالائی زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی را بیان کنند. این روش برای آنتی بادی‌های کلاس IgG1 و IgG2 استفاده شده است و آنتی بادی مونوکلونال کامل عملکردی را تولید کرده است. با این روش اولین مقدار آنتی‌بادی در ۲ هفته بعد از آلوده سازی قابل دسترسی است. این دستورالعمل یک روش بسیار مناسب برای تولید آنتی‌بادی-های جدید بوده و باعث شده که زمان صرف شده برای تولید آنتی بادی بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یابد (Gleba *et al.* 2007).

ناقل نوترکیب ویروس آر ان ا دار برای حمل واکسن

مصرف خوراکی واکسن از طریق مصرف بافت‌های گیاهی بطور موثری باعث تحریک واکنش تولید آنتی‌بادی و افزایش آن در مخاط بدن می‌شود (Warzecha *et al.* 2003). همچنین آنتی بادی نوترکیب تولید شده در گیاهان در شرایط نامساعد محیطی مخاط پایدار است.

استفاده از ویروس‌ها در تولید واکسن‌ها هنوز در مراحل ابتدائی خود است. یکی از مشکلات ایمنی‌زایی با دی ان ای‌های ژن تولید واکسن این است که امکان ورود دی ان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

ای پلاسمیدی به ژنوم میزبان وجود دارد. یک راه جایگزین برای حل این مشکل تولید واکسن توسط آر ان ای به جای دی ان ای است. ویروس شناسان گیاهی یک راه حل جالبی پیشنهاد کرده‌اند، با قرار دادن توالی ناحیه شروع مونتاژ ویروس موزائیک توتون در ژنوم Semliki forest virus (SFV) و درنتیجه مونتاژ SFV با پروتئین پوششی ویروس موزائیک توتون، ناقل بوجود آمده در ارزیابی سلولی ایمن بوده و تولید آن در شرایط درون شیشه‌ای آسان شد و تولید و ساماندهی ترکیب نوکلئیک اسید/پروتئین آنتی ژن آسان است (Smith *et al*. 2006).

در پژوهشی از ناقل ویروس ایکس سیب زمینی و ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی برای تولید ذره مرکزی ویروس هپاتیت B در گیاهان *N. benthamiana* و لوبیا چشم بلبلی استفاده شد. این پژوهشگران موفق به تولید آنتی‌ژن HB در این گیاهان شدند (Mechtcheriakova *et al*. 2005).

پروتئین‌های درمانی

نزدیک به یک چهارم جمعیت جهان نسبت به آنتی ژن‌های گیاهی آلرژی دارند. در شرایط همه‌گیری بیماری که افراد آلوده شده مجبور به استفاده از پروتئین‌های درمانی تولید شده در گیاه در حجم بالا هستند، در این شرایط باید اغلب افراد تحت تیمار تحمل قرار گرفته تا تحمل شرایط ایمونولوژیکی را پیدا کنند (Wardrop & Whitacre 1999). برای موفقیت آمیز بودن اینگونه درمان‌ها، آنتی ژن فقط باید در یک گونه گیاهی تولید شود و افراد نسبت به پروتئین تولیدی در آن گیاه تحت تیمار تحمل قرار گیرند.

توانایی بسیاری از ناقل‌های ویروسی برای تولید پروتئین آزاد این امکان را فراهم می‌کند که بتوان آنها را با قرار دادن سیگنال‌هایی به سمت بافت یا قسمت خاصی جهت تثبیت و قرارگیری در آنجا هدایت کرد. پروتئین‌هایی که بصورت طبیعی در اندام خاصی تجمع می‌یابند، اغلب در آن اندام پایداری بیشتری داشته و در بسیاری موارد تجمع بسیار بالاتر زمانی صورت می‌گیرد که پروتئین به سمت اندامک جایگزینی در سلول هدایت شود (Schouten *et al*. 1996). بنابراین در بعضی سامانه‌ها بیان به‌صورت اتصال پروتئین مورد نظر با دیگر پروتئین‌های ویروسی صورت می‌گیرد. یکی از مثال‌هایی که از سامانه بیانی ویروس گیاهی برای درمان استفاده کرده‌اند، بیان پروتئین ضد HIV به نام α-tricosanthin بود که غلظت این پروتئین تا ۵٪ پروتئین قابل حل رسید و در بیان این پروتئین از ویروس موزائیک توتون به عنوان ناقل استفاده شده است (Kumagai *et al*. 1993).

کشف عملکرد ژن‌های گیاهی

از ناقل‌های ویروسی برای کشف عملکرد ژن‌ها استفاده شده است. هرچند که از دیگر روش‌ها بطور موفقیت آمیزی برای شناسایی عملکرد ژن‌ها در گیاهان استفاده شده است، اما این روش‌ها به نوع لکه‌ها (Lessions) القاء شده در میزبان، تیپ میزبان مورد مطالعه (کوچک و آسان بودن برای ترانسفرم کردن)، و دامنه ژن‌هایی که می توان مطالعه کرد (ژن‌های عامل مرگ گیاهچه، بطور مثال، به علت عدم دستیابی به نتاج مطالعه محدود می‌شود) بستگی دارند (Pogue *et al*, 2002).

به علت توانایی ناقل بیانی ویروسی در آلوده کردن گیاهان جوان و بالغ در تمام مراحل رشدی، امکان بررسی واقعی تمام صفات گیاهان میسر می‌شود. صفات بذری یک استثناء است و درحال حاضر ناقل‌های ویروسی گیاهی نمی‌توانند برای بررسی رشد و نمو بذر بکار روند. یکی از کاربردهای ناقل‌های ویروسی استفاده از آن برای ساخت کتابخانه ژنومی است. این ویژگی باعث می‌شود که ویروس‌های گیاهی بعنوان ابزاری برای بررسی عملکرد ژنها ازجمله عملکرد ژنهای پروفایل متابولیکی، پروفایل آر ان ای یا پروتئین، و غیره، مورد استفاده قرار گیرند. سامانه ناقل‌های ویروسی می‌تواند غربال اولیه ژنومی را آسان‌تر و کامل‌تر کرده و یا به پالایش توالی‌هایی که در مطالعات دیگر شناخته شده‌اند سرعت دهد. ناقل بیانی ویروسی می‌تواند به‌عنوان ابزاری جهت القای خاموشی سیستمیک ژنها یا خانواده‌های ژنی خاص بکار رود (Pogue *et al*. 2002).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

هنگامی که گیاهان توسط ناقل ویروس حاوی بخشی از توالی یک ژن آلوده شوند، بصورت سیستمیک از بیان آن ژن در گیاه ممانعت شده و عملکرد و فنوتیپ آن ژن حذف می‌شود (Waterhouse *et al*. 2001). خاموشی ژن برپایه ویروس‌های گیاهی برای مطالعه نقش ژن‌های خاصی در مسیرهای متابولیکی استفاده شده است. همچنین مایه‌زنی گیاهان توسط ناقل ویروسی دارای cDNA یک ژن خاص باعث بیان سیستمیک ژن دربافت گیاه می‌شود. اثر چنین بیانی می‌تواند در فنوتیپ مشاهده شود و افزایش بیان این ژن نه تنها روی تجمع مواد متابولیکی اثر گذار است، بلکه بر مسیرهای بیوشیمیای تولید مواد دیگر هم می‌تواند موثر باشد (Pogue *et al*. 2002).

در سامانه ناقل‌های ویروسی جهت خاموشی ژن، این ناقل-ها می توانند برای شناسایی ژن‌هایی که مورد هدف علفکش‌ها هستند یا ژن‌هایی که باعث مقاومت به علفکش‌های اختصاصی می‌شوند، مورد استفاده قرار گیرند. در این حالت کتابخانه ژنومی گیاهان یا موجودات مختلف که متابولیزه کننده علفکش‌ها هستند را در ناقل بیانی قرار داده و ناقل بدست آمده را به گیاه مایه زنی می‌کنند و می-توان انتظار القای بیان این ژن با مقاومت به مواد شیمیایی در گیاه میزبان را داشت (Shiboleth *et al*. 2001).

بیان قطعاتی از ژن phytoene desaturase (*pds*) در ناقل-های ویروس جغ‌جغه توتون و ویروس موزائیک خطی جو باعث پریدگی رنگ و سفید شدن بافت‌های آلوده گیاهی می‌شود. در بافت آلوده شده با ناقل TMV-*pds*، به علت خاموشی ژن *pds* کاروتنوئید phytoene تجمع می-یابد (Pogue *et al*. 2002). از ویروس جغ‌جغه توتون (TRV) برای بررسی ژن‌های دخیل در بیماریزایی نماتد مولد گره استفاده شده است و کارائی این ناقل برای خاموشی یک سری از ژن‌های نماتد مولد گره مثبت ارزیابی شده است (Dubreuil *et al*. 2009).

ناقل‌های القا کننده خاموشی ژن (VIGS) بر پایه ویروس-های دی ان ای دار مانند ویروس موزائیک آفریقایی کاساوا و ویروس چروکیدگی برگ پنبه طراحی شده‌اند که برای مطالعات ژنومیکس عملکردی در گیاهان پنبه و کاساوا استفاده شده‌اند (Tuttle *et al*. 2008). با استفاده از VIGS می توان عملکرد چندین ژن را بطور همزمان با استفاده از دومین‌های حفاظت شده خاموش کرد. درحالی که برای خاموش کردن یک ژن خاص در میان یک خانواده ژنی از ناحیه اختصاصی آن ژن استفاده می‌شود و این امکان بررسی سریع عملکرد ژن‌های همولوگوس در میان گونه-های مختلف گیاهی به صورت همزمان و با دقت بالا را به ما می دهد (Becker *et al*. 2010). همچنین از ویروس‌های وابسته به ویروس‌های دی ان ا دار بطور موثری برای خاموشی ژن استفاده شده است (Huang *et al*. 2011).

ویژگی‌های ضروری ناقل‌های عملکردی (Functional):

در سامانه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب جهت مصارف پزشکی، محصول پروتئینی باید خالص و از نظر زیستی فعال، عاری از آلودگی، همچنین عاری از اندوتوکسین‌ها و عوامل آلوده کننده عفونی بوده و تولید آن هم مقرون به صرفه باشد. همچنین سامانه های ویروسی نباید توسط حشرات ناقل منتقل شده و موجب ملاحظات زیست محیطی شود. گاهی یکی از مشکلاتی که برای ناقل ها پیش می‌آید این است که تغییرات ناخواسته ژنتیکی در توالی غیرویروسی صورت می‌گیرد. جهت افزایش کارائی سامانه‌های ویروسی، ضروری است که ناقل بیانی ویروسی دارای ژن هدف، از نظر ژنتیکی پایدار بوده و در مقابل شرایط مختلف محیطی و واکنش‌های دفاعی میزبان پایدار بماند.

ناقل ویروسی مطلوب باید از توالی غیرهمولوگ (nonhomogenous) محصولی تولید کند که کمترین اثرات ایمونوژنیک یا آلرژی‌زایی را داشته باشد. باتوجه به نرخ بالای جهش در ویروس‌های آر ان ای دار و حفظ توالی ژنوم در این ویروس‌ها، نتیجه گیری می شود که ناقل‌های بیانی منشائ گرفته از این ویروس‌ها برای رویارویی با تغییرات ناخواسته آمادگی لازم را دارند (Van Vloten-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

Doting *et al*. 1985). بنابراین مطالعات زیادی روی بررسی میزان تغییرات ناخواسته ژنتیکی توالی ژن خارجی در ناقل بیانی ویروس‌های گیاهی صورت گرفته و نشان داده که تغییرات در توالی غیر ویروسی با پاساژ ناقل در گیاه به ندرت اتفاق می‌افتد (Kearney *et al*. 1999). نتایج پژوهش‌ها نشان داده که ناقل بیانی ویروس RNA دار گیاهی بصورت صحیح توالی غیر ویروسی را تکثیر کرده و جمعیت همگنی از پروتئین در گیاه تولید می‌کند. توانایی استفاده از سامانه ویروسی تحت شرایط نامساعد محیطی در مزرعه و گلخانه از دیگر فاکتورهای مهم است. ناقل ویروسی در شرایط مختلف اقلیمی پایدار بوده و قادر به تکثیر تحت هر شرایط اقلیمی است. رشد گیاه در مزرعه و گلخانه می‌تواند افزایش واکنش دفاعی گیاه را دربرداشته و این خود می‌تواند باعث تبدیل شدن حساسیت معمولی گیاه به مقاومت علیه ناقل ویروسی شود. این فشار انتخابی روی ناقل ویروسی می‌تواند روی پایداری ژنتیکی جمعیت ناقل و هدایت آن به سمت حذف یا کاهش تولید پروتئین هدف موثر باشد (Pogue *et al*. 2002). برای جلوگیری از ورود ناخواسته ناقل ویروسی ساخته شده به طبیعت از ناقل‌های نسل دوم استفاده شد و در این ناقل‌ها ژن‌های حرکتی ویروس توسط ناقل حذف شده و درنتیجه این ناقل‌ها قدرت انتقال توسط حشرات را از دست می دهند (Scholthof *et al*. 1996).

چالش‌ها و مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان

به‌رغم فوائد فراوان تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان هنوز استفاده از این تکنولوژی به خوبی توسعه نیافته است و پیشرفت آن بسیار کند است. در این قسمت از مقاله موانع توسعه تجاری سازی این فناوری را بررسی می‌کنیم.

یکی از چالش‌هایی که بر سر مسیر تجاری‌سازی این فناوری وجود دارد هزینه بالای تولید به مراحل و فرآیندهای پائین دستی تولید از جمله خالص سازی و افزایش کیفیت مربوط می‌شود. تلاش‌هایی برای ساده‌تر کردن و کاهش هزینه‌های خالص‌سازی و فرآیندهای استخراج انجام گرفته است. ازجمله با تعویض میزبان‌های تولید کننده پروتئین سبب کاهش مراحل خالص‌سازی و یا حتی حذف مواد سمی یا بازدارنده گیاهی شده‌است. به عنوان مثال یکی از موانع تولید پروتئین aprotinin در ذرت و استخراج آن از بذر وجود ترکیب بازدارنده ترپسین تولیدی در ذرت است که مراحل استخراج را پیچیده‌تر کرده و خلوص پروتئین استخراج شده از این گیاه تا ۷۵ درصد می‌رسد درحالی که تولید همین ترکیب در توتون و استخراج آن به دلیل عدم وجود این ترکیب بازدارنده تا خلوص ۹۹ درصد افزایش می‌یابد (Pogue *et al*. 2010).

شرکت Ventria Bioscience (FortCollins, USA) چندین واکسن و پروتئین مثل آلبومن انسانی ، transferrin, lactoferrin و lysozyme را در بذر برنج تولید کرده است. اما خالص سازی lysozyme به دلیل وجود phytic acid در بذر به دلیل بار منفی بالای این ترکیب و باند شدن آن با ترکیبات رزینی که بار مثبت دارند دچار مشکل شد و یک مرحله اختصاصی مثل هیدرولیز اسیدی و سپس رسوب آن برای خذف phytic acid لازم است و همین مرحله هزینه تولید را بالا برد (Wilken & Nikolov, 2010). بنابراین شرکت‌ها ترجیح می‌دهند فعلا" وارد مرحله تولید ترکیبات داروئی نشده و بیشتر به دنبال تصمیمات لازم و بهینه کردن روش‌هایی باشند تا تولید تجاری و به‌صرفه صورت گیرد. بطور مثال شرکت ORF Genetics هورمون رشد انسانی و cytokines را در بذر جو تولید می‌کند و این ترکیب درحال حاظر صرفا" برای کاربردهای تشخیصی و پژوهشی و هم‌چنین در مواد آرایشی استفاده می‌شود (Fischer *et al*. 2013).

یکی دیگر از فواید تولید دارو در گیاهان مصرف خوراکی اندامهای گیاه (برگها، بذور، و میوه ها) است که می‌توان واکسن‌های خوراکی و یا آنتی‌بادی‌های خوراکی را در این اندام‌ها تولید کرد. استفاده از واکسن‌های خوراکی می‌تواند سیستم ایمنی را از طریق بافت‌های لنفی همراه با دستگاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

گوارش که درگیر با بسیاری از بیماگرهای است را فعال کند (Yusibov *et al.* 2011). برای این منظور بذر یکی از مهمترین اندام‌ها است زیرا غیر از خوراکی بودن به دلیل دیر هضم بودن آن آنتی‌بادی یا واکسن به تدریج آزاد شده و همین دلیل خود باعث افزایش توانایی تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Fischer *et al.* 2013). هر چند می‌توان واکسن‌های خوراکی را برای آزاد شدن تدریجی کپسوله کرد اما با تولید و ذخیره این پروتئین‌ها در بذر این کار بصورت طبیعی انجام می‌شود، به‌ویژه در بذر گیاهانی مانند برنج که که بسیار دیر هضم هستند (Ogawa *et al.* 1987). همچنین یک فایده دیگر این سیستم کم هزینه بودن فرآیندهای استخراج پائین دستی آنها است به‌ویژه برای واکسن‌ها و آنتی بادی‌های تولیدی در بذر که بطور کلی برای آن هیچ فراوری لازم نیست (Fischer *et al.* 2013).

جمع بندی نهایی

استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای بیان پروتئین‌ها به‌سرعت در حال گسترش است و راه حل‌های تکنیکی فراوانی برای کاربرد صنعتی آنها ارائه شده است. توسعه این فرایند در سال‌های گذشته نشان می‌دهد که این ابزار جدید قابلیت تجاری سازی را دارند. استفاده از راهبرد ویروس کامل برای بیان ژن‌های غریبه محدودیت اندازه و نوع پروتئینی دارد که با این فناوری بیان می‌شود. مهمترین کاربرد امروزی آن در تولید واکسن است که می‌توان پپتید آنتی‌ژنی کوتاه، از طریق درج ژنتیکی یا اتصال شیمیایی پپتید ایمونوژنیک به پیکره ویروسی را برای تولید واکسن استفاده کرد. بنظر می‌رسد استفاده از روش Magnifection جایگزین مناسبی جهت کوتاه شدن زمان و بیان پروتئین در حجم وسیع است.

استفاده از ناقل‌های ویروسی یک راه حل مناسب برای تبدیل گیاهان به کارخانه تولید پروتئین برای مصارف صنعتی و پزشکی، به‌ویژه در حالتی که محدودیت زمانی وجود دارد، است. مهندسی گیاهان تراریخته به صورتی که آلودگی به ویروس با آزاد شدن ویروس از کرموزوم گیاه توسط مواد شیمیایی القاء می شود، نیز یک راهکار مناسب دیگر جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان است. به‌رغم تلاش‌هایی که در این زمینه انجام شده‌است، پژوهش‌های بیشتری لازم است تا این فناوری به پتانسیل نهایی خود برسد.

منابع

Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A. 2007. Stability of potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. Transgenic Research 16:587–597.

Azhakanandam K, Weissinger SM, Nicholson JS, QU R, Weissinger AK. 2007. Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. Plant Molecular Biology 63: 393-404.

Bagheri K, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A. Zebarjadi A. 2010. Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. African Journal of Biotechnology 9: 5066-5072.

Baneyx F.1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology 10:411–21.

Becker A, Lange M. 2010. VIGS-genomics goes functional. Trends in Plant Science 15:1–4.

Bustamante PI, Hull R. 1998. Plant virus gene expression strategies. Electronic Journal of Biotechnology 1(2): 65-82.

Cerovska N, Hoffmeisterova H, Moravec T, Plchova H, Folwarczna J, Synkova H, Ryslava H, Ludvikova V, Smahel M. 2012. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants. Journal of Biosciences 37: 125–133.

Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D. 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. The Plant Journal 2:549–57

Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

baculovirus vector. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:127–32.

Dudreuil G, Magliano M, Dubrana MP, Lozano J, Lecomte P, Favery B, Abad P, Rosso MN. 2009. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. Journal of Experimental Botany 60:4041-4050.

Eckart MR, Bussineau CM. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. Current Opinion in Biotechnology 7:525–30.

Egelkrout E, Rajan V, Howard JA. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Science 184:83-101.

Fischer R, Schillberg S, Buyel JF, and Twyman RM. 2013. Commercial Aspects of Pharmaceutical Protein Production in Plants. Current Pharmaceutical Design, 19, 5471-5477.

Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfected with noncompeting viral vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:14701-14706.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2005. Magnifection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine 23:2042-2048.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. Current Opinion in Biotechnology 18:134–141.

Hagiwara Y, Peremyslov VV, Dolja VV. 1999. Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. Journal of Virology 73:7988–7993.

Hefferon KL, Fan Y. 2004. Expression of a vaccine protein in a plant cell line using a geminivirus-based replicon system. Vaccine 23:404-410.

Hesse F, and Wagner R. 2000. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. Trends in Biotechnology 18:173–180.

Huang C J, Zhang T, Li FF, Zhang XY, Zhou XP. 2011. Development and application of an efficient virus-induced gene silencing system in *Nicotiana tabacum* using geminivirus alphasatellite. Journal of Zhejiang University Science B 12: 83-92.

Karg SR, Kallio PT. 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology Advances 27: 879-894.

Kearney CM, Thomson MJ, Roland KE. 1999. Genome evolution of tobacco mosaic virus populations during long-term passaging in a diverse range of hosts. Archives of Virology 144:1513–1526.

Kessans SA, Linhart MD, Matoba N, Mor T. 2013. Biological and biochemical characterization of HIV-1 Gag/dgp41 virus-like particles expressed *in Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnology Journal 11: 681–690.

Klimyuk V, Marillonnet S, Knaeblein J, McCaman M, Gleba Y. 2005. Production of recombinant proteins in plants. In Modern Biopharmaceuticals. In Knaeblein J (Ed.) WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA: 893-917.

Kumagai MH, Turpen TH, Weinzettl N, della-Cioppa G, Turpen AM. 1993. Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosan thin in transfected plants by an RNA viral vector. Proceedings of the National Academy of Sciences 90:427–430.

Mallajosyula JK, Hiatt E, Hume S, Johnson A, Jeevan T, Chikwamba R, Pogue GP, Bratcher B, Haydon H, Webby RJ, McCormick AA. 2013. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. Human Vaccin and Immunotherapeutics 10:586–595.

Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nature Biotechnology 23:718-723.

Mason HS, Hong F, Bjorklund G. 2012. Methods of protein production and compositions thereof. US Patent Office Application 20140127749.

Mechtcheriakova A, Eldarov MA, Nicholson L, Shanks M, Skryabin KG, Lomonossoff GP. 2005. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. Journal of Virological Methods 131: 10-15.

Mirzaee M, Jalali-Javaran M, Moieni A, Zeinali S, Behdani M, Shams-Bakhsh M, Modarresi M. 2016. Rapid Recombinant Protein Production using a TuMV-Based Vector in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). International Journal of Advanced Biotechnology and Research 7(1): 118-124.

Nassaj Hosseini SM, Shams-Bakhsh M, Salamanian AH, Yeh SD. 2012. Expression and purification of human interferon gamma using a plant viral vector. Progress in Biological Sciences. 2(2): 104-115.

Nassaj Hosseini SM, Shams-Bakhsh M, AH. Salmania, Yeh, SD. 2013. Expression and purification of movement protein of *Cucumber green mottle mosaic virus* using a plant-virus expression system. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(3): 143-161. (In Farsi with English abstract).

Nuzzaci M, Vitti A, Condelli V, Lanorte MT, Tortorella C, Boscia D, Piazzolla P, Piazzolla G. 2010. In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine. Journal of Virological Methods 165:211–215.

Odum JN. 2001. Biotech manufacturing: Is the crisis real? Pharmaceutical Engineering 21:22–33.

Petukhova NV, Gasanova TV, Stepanova LA, Rusova OA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Skurat EV, Tsybalova LM, Kiselev OI, Ivanov PA, Atabekov JG. 2013. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors. Current Pharmaceutical Design 19: 5587–5600.

Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura Tm Kasai Z, and Tanaka K. 1987. Purification of protein body-i of rice seed and its polypeptide composition. Plant Cell Physiology 28: 1517-1527.

Phoolcharoen W, Bhoo SH, Lai H, MA J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS. 2011. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]

benthamiana. Plant Biotechnology Journal 9: 807–816.

Pogue GP, Lindbo JA, Garger SJ, Fitzmaurice. 2002. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. Annual Review of Phytopathology 40:45–74.

Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE, Hiatt E, Hume S, Phelps J, Long L, Bohorova N, Kim D, Pauly M, Velasco J, Whaley K, Zeitlin L, Garger SJ, White E, Bai Y, Haydon H, Bratcher B. 2010. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. Plant Biotechnology 8: 638-654.

Rybicki EP, Martin DP. 2014. Virus-derived ssDNA vectors for the expression of foreign proteins in plants. Current Topics in Microbiology and Immunology 375: 19–45.

Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS. 2006. Protection conferred by recombinant Yersinia pestis antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:861-866.

Sanz AI, Serra MT, Garcia-Luque I. 2000. Altered local and systemic spread of movement deficient virus in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus 3a protein. Archives of Virology 145:2387-2401.

Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. Annual Review of Phytopathology 34:299– 323.

Schouten A, Roosien J, Vanengelen FA, Dejong GAM, Borstvrenssen AWM. 1996. The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology 30:781–93.

Shams-bakhsh M, Canto T, Palukaitis P. 2007. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing. Virus Research 130:103-109.

Shams-Bakhsh M. 2011. Silencing of RNA directed RNA polymerase 1 gene of tobacco leads to enhanced resistance to some plant viruses. Iranian journal of Plant Pathology. 47 (3): 85-87. (In Farsi with English abstract).

Shiboleth YM, Arazi T, Wang Y, Gal-On A. 2001. A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. Journal of Biotechnology 92:37–46.

Smith ML, Corbo TA, Bernales J, Lindbo JA, Pogue GP, Palmer KE, McCormick AA, 2006. Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from Tobacco mosaic virus and Semliki Forest virus and their evaluation as immunogens. Virology 358:321-333.

Tuttle JR, Idris AM, Brown JK, Haigler CH, Robertson D. 2008. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. Plant Physiology 148: 41–50.

Van Vloten-Doting L, Bol JF, Cornelissen B. 1985. Plant virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. Plant Molecular Biology 4:323–26.

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:11128-11133.

Varsani A, Williamson AL, Stewart D Rybicki EP. 2006. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in Nicotiana benthamiana using an infectious tobamovirus vector. Virus Research 120:91-96.

Verch T, Yusibov V, Koprowski H. 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. Journal of Immunological Methods 220:69-75.

Wardrop RM, Whitacre CC. 1999. Oral tolerance in the treatment of inflammatory autoimmune diseases. Inflammation Research 48:106–119.

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL. 2003. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. Journal of Virology 77(16): 8702–11.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411:834–42.

Werner S, Marillonnet S, Hause G, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:17678-17683.

Wilken LR, Nikolov ZL. 2010. Evaluation of alternatives for human lysozyme purification from transgenic rice: impact of phytic acid and buffer Biotechnology Progress 26: 1303-1311.

Yevtushenko DP, Misra S. 2012. Transgenic Expression of Antimicrobial Peptides in Plants: Strategies for Enhanced Disease Resistance, Improved Productivity, and Production of Therapeutics. Small Wonders: Peptides for Disease Control. pp. 445-458. American Chemical Society, Canada.

Young M, Willits D, Uchida M, Douglas T. 2008. Plant Viruses as Biotemplates for Materials and Their Use in Nanotechnology. Annual Review of Phytopathology 46: 361-384.

Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H. 2002. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. Vaccine 20:3155–3164.

Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N. 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. Vaccines, antibodies and beyond. Human Vaccines 7: 313-321.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.6.3]