ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳
صفحه ۱۷۲ - ۱۶۱

«مقاله مروری»

کشاورزی مولکولی: عوامل مؤثر در افزایش میزان سطح بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان

Molecular Farming: Factors Affecting in Increasing the Expression Level of Recombinant Protein in Plants

مصطفی ولیزاده*[۱]، رضا حیدری جاپلقی[۲]، رحیم حداد[۳]، ابراهیم دورانی علیایی[۱]، مختار جلالی جواران[٤]

۱- به‌ترتیب استاد، دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری تخصصی بیوتکنولوژی گیاهی از دانشگاه تبریز و کارشناس گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

٤- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Valizadeh M*[1], Heidari-Japelaghi R[2], Haddad R[3], Dorani-Uliaie E[1], Jalali-Javaran M[4]

1- Professor, Associate Professor,Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Former Ph.D. Student in Plant Biotechnology from University of Tabriz. Expert, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:mvalizadeh@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰٤ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲٤)

چکیده

سیستم‌های بیانی موجود برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب شامل باکتری‌ها، مخمرها، حشرات و کشت سلول‌های جانوری هستند. هر کدام از این سیستم‌ها دارای مزایای خاص خود می‌باشند اما در مجموع کاربردشان به دلایلی همچون مقیاس‌پذیری پایین، هزینه تولید بالا و ایمنی پایین محدود شده است. در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان به‌عنوان بیورآکتورها، زمینه تحقیقاتی جالبی را بوجود آورده و پیشرفت‌های به‌دست آمده، فرصت‌های مناسبی را فراهم نموده است. دلایل توجه چشمگیر نسبت به سیستم‌های بیانی گیاهی شامل هزینه تولید پایین، ایمنی بالای محصول و مقیاس‌پذیری بالا است. تاکنون، انواع مختلفی از محصولات نوترکیب در گیاهان تولید شده‌اند که عبارتند از واکسن‌ها، پروتئین‌های دارویی، آنزیم‌های صنعتی، مکمل‌های غذایی و پلیمرهای زیستی. تعداد زیادی از پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان به مرحله کارآزمایی بالینی رسیده و تعداد اندکی از این محصولات اخیراً وارد بازارهای تجاری شده‌اند. با تمام این تفاسیر، استفاده کارآمد از گیاهان به‌عنوان بیورآکتورها به امکان حصول سطوح بالایی از تولید پروتئین نوترکیب بستگی دارد به‌طوری که در طی چرخه زندگی گیاه تراریخته پایدار بوده و به نسل‌های بعد نیز انتقال یابد. چندین رویکرد جهت افزایش بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته توسعه یافته‌اند که عبارتند از افزایش رونویسی ویژه بافت، افزایش پایداری رونوشت، هدف‌گیری ویژه بافت، بهینه‌سازی ترجمه و افزایش پایداری و تجمع پروتئین نوترکیب درون اندامک‌های سلولی. این مقاله مروری، عوامل مؤثر در افزایش میزان سطح بیان پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی مورد بررسی قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

بیورآکتور
پایداری mRNA
پروتئین نوترکیب
راه‌انداز
کاربرد کدونی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

هر دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیستم‌های پروکاریوتی در مقایسه با سیستم‌های جانوری از نظر فناوری و تجهیزات مورد نیاز، ارزان قیمت بوده و دست‌ورزی آن‌ها آسان‌تر است. به هر حال بسیاری از پروتئین‌های پستانداران نیازمند تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون جهت فعالیت زیستی می‌باشند که در سیستم‌های پروکاریوتی قابل انجام نیست. به‌همین دلیل، استفاده از سیستم‌های بیانی پروکاریوتی جهت تولید پروتئین‌های جانوری با محدودیت مواجه هستند. از طرف دیگر، هزینه بالای تولید از نظر کشت در مقیاس وسیع و امکان آلودگی با ویروس‌های جانوری استفاده از سلول‌های جانوری را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب محدود نموده است (Sahu et al. 2014).

کشاورزی مولکولی[1] به‌عنوان تولید پروتئین‌های نوترکیب و سایر متابولیت‌های با ارزش از نظر پزشکی یا صنعتی در گیاهان تعریف می‌شود. هدف آن، فراهم نمودن یک ابزار ایمن و ارزان قیمت جهت تولید پروتئین‌های مهم در مقیاس وسیع بوده و دامنه تولیدات آن از محصولات پزشکی همچون داروها، واکسن‌ها و پادتن‌ها تا محصولات صنعتی از قبیل آنزیم‌های صنعتی و پلاستیک‌های زیست تجزیه‌پذیر را در برمی‌گیرد (Long et al. 2022). پتانسیل استفاده از گیاهان به‌عنوان یک سیستم بیانی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، اولین بار در سال ۱۹۸۶ با بیان موفقیت‌آمیز هورمون رشد انسان در توتون پایه‌گذاری شد (Barta et al. 1986). پیشرفت اساسی با بیان موفقیت‌آمیز پادتن ایمینوگلوبولین گاما در گیاهان تراریخته در سال ۱۹۸۹ به‌دست آمد (Hiatt et al. 1989). این موفقیت‌ها نشان دادند که گیاهان دارای پتانسیل لازم جهت تولید پروتئین‌های پیچیده پستانداران با کارایی درمانی می‌باشند.

در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی از قبیل باکتری، مخمر و سلول جانوری، سیستم‌های بیانی گیاهی اشکال متنوعی دارند، مانند کل گیاه، سوسپانسیون سلولی، ریشه مویین، خزه، عدسک آبی، ریزجلبک[2]ها و غیره. هر یک از این میزبان‌ها یا بستر[3]ها ضعف و قوت‌هایی داشته و اغلب با توجه به نوع پروتئین نوترکیب، هزینه تولید و فرآیندهای بالادستی و پایین‌دستی، بهترین میزبان انتخاب می‌شود. تنوع سیستم‌های بیانی گیاهی به‌عنوان میزبان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، دامنه‌ای از کشت سلول و بافت گیاهی در محیط درون‌شیشه‌ای[4] تا کل گیاه رشد یافته درون‌شیشه یا در مزرعه را در برمی‌گیرد. وجود چنین بسترهای متنوع، امکان بیان سریع پروتئین‌های نوترکیب مهم از نظر تجاری در سطح وسیع با هزینه اندک را فراهم می‌آورد (Hosseinzadeh Gharajeh et al. 2020; Schillberg and Finnern 2021).

از جمله مزیت‌های استفاده از گیاهان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب عبارتند از: امکان دست‌ورزی گیاهان از نظر ژنتیکی، کشت سریع و آسان در مقیاس وسیع، هزینه تولید پایین (یک سی‌ام میزبان جانوری و یک سوم میزبان پروکاریوتی)، وجود فناوری برداشت و فرآوری در مقیاس وسیع، عدم آلودگی پروتئین نوترکیب با عوامل بیماری‌زا و ویروس‌های جانوری و نیز اندوتوکسین‌های باکتریایی، تولید پروتئین‌های جانوری همراه با تغییرات پس از ترجمه و تاخوردگی صحیح، ذخیره‌سازی طولانی مدت پروتئین‌های نوترکیب درون بذور بدون نیاز به دمای پایین، هدف‌گیری و تجمع پروتئین نوترکیب درون اندامک‌ها جهت جلوگیری از تخریب و افزایش پایداری و حذف فعالیت‌های پایین‌دستی به‌ویژه برای واکسن‌های خوراکی (Chung et al. 2022). در این مقاله مروری، به منظور حصول سطوح بالایی از میزان محصولات نوترکیب، عوامل مؤثر در افزایش میزان سطح بیان پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی گیاهی از قبیل نوع گیاه میزبان و شاخصه‌های تأثیرگذار در میزان رونویسی و ترجمه تراژن و همچنین شرایط پس از ترجمه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۱- عوامل موثر در میزان سطح بیان پروتئین نوترکیب

۱-۱- نوع گیاه میزبان

از نظر تئوری، هر نوع گیاهی می‌تواند تراریخت شود، اما استفاده از گیاهانی که از نظر فیزیولوژیکی و ژنتیکی به‌خوبی مطالعه شده‌اند، می‌تواند بسیار سودمند باشد. انتخاب نوع گیاه جهت

[1] Molecular farming
[2] Microalgae
[3] Platform
[4] *in vitro*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

تولید پروتئین نوترکیب از اهمیت بالایی برخوردار بوده و به عواملی همچون نوع پروتئین نوترکیب، چرخه زندگی گیاه میزبان، میزان تولید زیست‌توده گیاهی، هزینه‌های تولید و نوع گرده‌افشانی گیاه میزبان بستگی دارد. استفاده از گیاهان خودگرده‌افشان می‌تواند شانس انتقال تراژن را به سایر گیاهان کاهش دهد (Long et al. 2022). گیاهانی از قبیل توتون، اسفناج، کاهو، یونجه و شبدر حاوی بافت‌های رویشی، می‌توانند جهت بیان پروتئین نوترکیب در بافت برگ مورد استفاده قرار بگیرند. استفاده از گیاه یونجه به‌عنوان یک گیاه میزبان چند ساله، مزیت‌های دیگری از قبیل تثبیت نیتروژن و N-گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب را نیز دارد. همچنین با استفاده از راه‌انداز[1]های ویژه دانه می‌توان از بذور غلات مانند گندم، جو، برنج و ذرت و گیاهان روغنی همچون کلزا و گلرنگ جهت تولید و تجمع پروتئین نوترکیب استفاده نمود. لگوم‌ها مانند نخود و سویا جهت بیان پروتئین نوترکیب و سیب‌زمینی جهت تولید واکسن‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. سایر گیاهانی که به‌عنوان میزبان استفاده می‌شوند عبارتند از: گوجه فرنگی، هویج، موز و پاپایا (Egelkrout et al. 2012).

۱-۲- نوع بافت گیاهی

برگ: علاوه بر توتون، بسیاری از محصولات برگی مانند اسفناج، کاهو، یونجه و شبدر جهت بیان پایدار پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند. جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب در بافت برگی می‌توان از هر دو روش تراریختی هسته‌ای و کلروپلاستی استفاده نمود. انتخاب نوع روش تراریختی به نوع پروتئین نوترکیب و نیاز به تغییرات پس از ترجمه بستگی دارد. به‌عنوان مثال، جهت گلیکوزیلاسیون، تراریختی هسته‌ای و درج تراژن به درون ژنوم هسته مورد نیاز است. در حالی‌که کلروپلاست‌ها بسیاری از تغییرات پس از ترجمه‌ای مهم را جهت بیان پروتئین‌های پیچیده تأمین ننموده و اصولاً به تولید محصولات غیرگلیکوزیله محدود می‌شوند (Xu et al. 2012). یکی از محدودیت‌های بیان پروتئین نوترکیب در بافت برگ، عمر محدود آن، آسیب‌پذیری بیشتر نسبت به سایر بافت‌ها و نیاز به فرآوری سریع پس از برداشت به‌منظور اطمینان از پایداری و کیفیت محصول پروتئینی است. پروتئین‌های بیان شده در بافت برگ به‌علت تداخل با سایر پروتئین‌ها، ممکن است ناپایدار شوند. همچنین ترکیبات فنولیک رها شده در طی فرآیند استخراج می‌تواند اثرات زیان‌باری را روی فرآیندهای پایین‌دستی داشته باشند (Liu and Timko 2022).

بذر: بیان پروتئین نوترکیب درون بذور می‌تواند به محدودیت‌های ناپایداری محصول پروتئینی و مدت زمان کوتاه ذخیره‌سازی درون بافت برگ خاتمه دهد. بذور، بافت‌های ذخیره‌سازی تخصصی گیاهان بوده و موجب کاهش تخریب و محافظت پروتئین نوترکیب در برابر ترکیبات فنولیک شده و به این ترتیب سبب افزایش پایداری و بهبود فرآیند خالص‌سازی پروتئین نوترکیب می‌شوند. از مزایای دیگر سیستم تولید بر پایه بذر می‌توان به ذخیره‌سازی آسان پروتئین، توانایی کاربرد محصول به‌طور مستقیم در فرآیندهای صنعتی و انجام حداقل دست‌کاری یا دست‌ورزی پروتئین یا آنزیم نوترکیب اشاره نمود. پروتئین‌های بیان شده در بذور معمولاً از تخریب پروتئولیز محافظت شده و می‌توان آن‌ها را بیش از سه سال در دمای اتاق بدون کاهش معنی‌دار در فعالیت عملکردی، ذخیره‌سازی نمود. دانه‌های غلات شامل گندم، جو، برنج و ذرت معمولاً به عنوان میزبان‌های بیانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sharma and Sharma 2009). امروزه دانه‌های روغنی به دلایلی همچون فعالیت پایین پروتئولیز و تسهیل در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب از طریق جداسازی اجسام روغنی به‌عنوان یک میزبان مناسب جهت تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند. با استفاده از فناوری اُلئوسین ممزوج[2]، پروتئین نوترکیب می‌تواند به صورت متصل با اُلئوسین به درون اجسام روغنی هدف‌گیری شده و ضمن ذخیره‌سازی، به بازیابی پروتئین نوترکیب کمک کند. هم اکنون با استفاده از این فناوری، انسولین انسانی با هزینه کمتری نسبت به گذشته تولید شده و بنابراین امکان دسترسی راحت‌تر و سریع‌تر به انسولین برای مقابله با بیماری دیابت در سراسر جهان مقدور شده است (Mirzaee et al. 2022).

۱-۳- هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به درون اندامک‌های سلولی

[1] Promoter

[2] Oleosin fusion

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

موقعیت نهایی پروتئین نوترکیب درون سلول، پیامدهای مهمی روی عملکرد، میزان پایداری، تغییرات پس از ترجمه و بازیافت آن داشته و متابولیسم سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اکثر پروتئین‌ها درون سیتوزول و تعدادی نیز درون میتوکندری و کلروپلاست‌ها ساخته می‌شوند. شبکه آندوپلاسمی، واکوئل‌ها و اجسام روغنی، اهداف مناسب جهت تجمع پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته به شمار می‌آیند (Sharma and Sharma 2009).

سیتوزول: سیتوزول یک مکان پیش‌فرض برای تجمع پروتئین‌های فاقد پپتید راهنما بوده و ممکن است به دلایل مختلف، مکان مناسبی جهت تجمع پروتئین نوترکیب نباشد. سطوح بالای پروتئازها و فعالیت یوبی‌کوئیتین[1]، فقدان تغییرات پس از ترجمه و پتانسیل اکسیداسیون- احیاء[2] منفی سیتوزول و به دنبال آن ممانعت از تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی عواملی هستند که تاخوردگی و ساختار سه‌بعدی پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Benchabane et al. 2008). همچنین، Heidari-Japelaghi و همکاران (2020a,b) به دنبال بیان پروتئین نوترکیب hIFN-γ در توتون، مقادیر کمتر پروتئین نوترکیب را در سیتوپلاسم نسبت به فضای آپوپلاستی و شبکه آندوپلاسمی گزارش کردند. بیان هم‌زمان مهارکننده‌های پروتئازی یک روش موثر جهت بیان پروتئین نوترکیب درون سیتوزول می‌باشد. روش دیگر، هدف‌گیری پروتئین‌های نوترکیب به درون اندامک‌هایی با فعالیت پروتئازی پایین مانند کلروپلاست‌ها یا ذخیره‌سازی درون بافت‌هایی از قبیل بذور می‌باشد (Egelkrout et al. 2012).

شبکه آندوپلاسمی: شبکه آندوپلاسمی یک جایگاه مهم برای فرآوری، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، تشکیل ساختار سه‌بعدی صحیح، سرهم‌بندی و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی معمولاً می‌تواند تجمع بالای پروتئین را بدون آنکه رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، تحمل کند. این ویژگی شبکه آندوپلاسمی موجب شده است که این اندامک جهت تولید و انباشت پروتئین‌های نوترکیب به‌طور وسیع مورد استفاده قرار بگیرد. پروتئین‌های موجود در شبکه آندوپلاسمی یک پپتید راهنما (SEK/H/K)DEL در انتهای کربوکسیل خود دارند که با اتصال به یک گیرنده اختصاصی مجدداً وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شوند. افزودن پپتید راهنمای ویژه شبکه آندوپلاسمی منجر به افزایش تجمع پروتئین نوترکیب درون شبکه آندوپلاسمی می‌شود که نشان‌دهنده فعالیت هیدرولازی پایین و انعطاف‌پذیری بالای این اندامک است. گیاهان می‌توانند پروتئین‌های زیادی را بدون پپتید راهنما درون شبکه آندوپلاسمی ذخیره کنند، مانند پرولامین‌ها[3]. پرولامین‌ها، توده‌های بزرگی تحت عنوان اجسام پروتئینی را درون لومن شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌دهند (Liu and Timko 2022). اخیراً یک پپتید راهنما از پروتئین گاما-زئین[4] (یک پرولامین ویژه ذرت) شناسایی شده است که نسبت به KDEL بسیار کاراتر بوده و موجب تجمع بیشتر پروتئین نوترکیب درون شبکه آندوپلاسمی می‌شود. تجمع بیشتر توسط پپتید راهنمای گاما-زئین ممکن است به‌دلیل تشکیل اجسام پروتئینی به کمک این پروتئین باشد که با استفاده از پپتید راهنمای KDEL رخ نمی‌دهد (Vitale and Pedrazzini 2005). پپتید راهنمای گاما-زئین با موفقیت جهت بیان پروتئین‌های اینترفرون گامای انسانی (hIFN-γ) در توتون (Heidari-Japelaghi et al. 2020a)، آلبومین سرم انسانی (HSA) در توتون (Sedaghati et al. 2022) و پروتئین فلئورسنت سبز[5] (GFP) در سویا (Yang et al. 2021) استفاده شده است.

واکوئل‌ها: واکوئل‌های گیاهی نه تنها فشار اسمزی سلول را حفظ می‌کنند، بلکه محل ذخیره پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه نیز می‌باشند. واکوئل‌های ذخیره‌کننده پروتئین بذر در اکثر گیاهان یک مکان مناسب جهت انباشت پروتئین‌های نوترکیب محسوب می‌شوند. یکی از ویژگی‌های مهم این نوع واکوئل‌ها، عدم پروتئولیز پروتئین نوترکیب است، ولی توانایی گلیکوزیلاسیون ندارند. در مقایسه با واکوئل‌های ذخیره‌کننده پروتئین، واکوئل‌های بافت‌های رویشی مانند برگ، فعالیت هیدرولازی بالایی داشته و بنابراین در صورت هدف‌گیری درون آن‌ها، پروتئین نوترکیب تخریب خواهد شد. چندین توالی راهنما مسئول هدف‌گیری پروتئین‌ها به درون واکوئل‌ها شناسایی شده‌اند، اما تاکنون توالی راهنمای مورد توافقی تعیین نشده است. نتایج نشان داده‌اند که

[1] Ubiquitin
[2] Redox
[3] Prolamin
[4] γ-zein
[5] Green fluorescent protein (GFP)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

پروتئین‌های ذخیره‌ای به میزان زیادی درون شبکه آندوپلاسمی و واکوئل‌های دانه برنج وجود دارند که می‌تواند مکان‌یابی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در مسیرهای ترشحی را تحت تاثیر قرار دهد (Vianna et al. 2023). به‌عنوان مثال، آلبومین سرم انسانی و فیتاز[1] آسپرژیلوس همراه با پروتئین‌های ذخیره‌ای درون واکوئل‌های ذخیره‌کننده پروتئین در اندوسپرم گندم تراریخته انباشته شدند (Arcalis et al. 2004).

اجسام روغنی: اجسام روغنی از شبکه آندوپلاسمی منشأ گرفته و چربی‌های موجود درون بذور گیاهی را در خود ذخیره می‌کنند. این اجسام توسط یک لایه فسفولیپیدی احاطه می‌شوند که در تماس مستقیم با محتویات لیپیدی است. در غشاء اجسام روغنی، پروتئین اُلئوسین به فراوانی یافت می‌شود. بنابراین، پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند به شکل ممزوج با اُلئوسین به درون بذور گیاهان تراریخته هدف‌گیری شوند. پروتئین‌های ممزوج به طور صحیح به اجسام روغنی هدف‌گیری شده و به‌طور محکم به آن‌ها متصل می‌شوند. اجسام روغنی و پروتئین‌های متصل به آن‌ها می‌توانند به آسانی از سایر بخش‌های سلول توسط سانتریفیوژ افتراقی تفکیک شوند. جهت تسهیل در بازیابی، یک جایگاه برش پروتئازی ویژه بین پروتئین نوترکیب و اُلئوسین طراحی می‌شود. بیان پروتئین نوترکیب متصل به اُلئوسین، پروتئین نوترکیب را وارد سیتوزول نموده و از آن در برابر تخریب سیتوزولی محافظت می‌کند. از آنجا که پروتئین ممزوج وارد لومن شبکه آندوپلاسمی نمی‌شود، بنابراین تغییرات پس از ترجمه روی آن انجام نمی‌گیرد (Mirzaee et al. 2022).

انتقال به فضای آپوپلاستی: هدف‌گیری پروتئین‌ها به فضای آپوپلاستی با استفاده از توالی پپتید راهنما از پروتئین اکستنسین[2] هویج می‌تواند منجر به افزایش تجمع و سهولت در انجام فعالیت‌های پایین‌دستی از قبیل استخراج و خالص‌سازی شود. با این وجود، میزان تجمع پروتئین نوترکیب ممکن است در اثر فعالیت پروتئازهای موجود در فضای آپوپلاستی کاهش یابد. گزارش شده است که در گونه‌های مختلف گیاهی، سطوح متفاوتی از پروتئازها در فضای آپوپلاستی وجود دارند (Liu and Timko 2022). با این وجود، مطالعه هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به درون مکان‌های مختلف سلولی با استفاده از توالی پپتید راهنمای اکستنسین هویج نشان داد که میزان تجمع hIFN-γ درون فضای آپوپلاستی نسبت به بیان درون سیتوپلاسم به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Heidari-Japelaghi et al. 2020a,b).

ترشح پروتئین نوترکیب به خارج از سلول: خروج پروتئین‌های نوترکیب از سلول‌ها می‌تواند خالص‌سازی آن‌ها را تسهیل نماید. ترشح می‌تواند از طریق تراوش مایع، کشت سوسپانسیون سلولی یا ریشه‌های مویین حاصل شود. با اینکه جمع‌آوری تراوش مایع از بافت‌های گیاهی یک کار پرزحمت و مشکل می‌باشد، اما استفاده از این فناوری در توتون موجب تولید پروتئین نوترکیب به میزان بیش از ۱/۱ میکروگرم به ازای هر گرم برگ خشک در هر روز (معادل ۳ درصد از پروتئین کل محلول[3]) شد. اگر چه توتون یک گیاه مناسب جهت تولید تراوش مایعات محسوب نمی‌شود، اما سایر گیاهان، مانند گوجه‌فرنگی و بعضی از علوفه‌ها می‌توانند میزبان‌های جایگزین مطلوبی جهت تراوش مایع محسوب شوند. به هر حال، این روش برای کاربردهای صنعتی در مقیاس وسیع قابل استفاده نیست (Egelkrout et al. 2012).

٤-١- رونویسی

فرآیند رونویسی سطح اولیه کنترل بیان ژن است. عوامل مؤثر در میزان رونویسی تراژن که قابل دست‌ورزی هستند عبارتند از: انتخاب راه‌انداز، بهینه‌سازی توالی‌های تنظیمی، افزایش رونویسی عوامل اتصالی، استفاده از عناصر تقویت‌گر موجود در اینترون‌ها، کاهش خاموشی ژن در مرحله رونویسی، افزایش پایداری تراژن‌ها و تعداد نسخه‌های تراژن.

انتخاب راه‌انداز: به‌منظور حصول میزان بالای بیان ژن در سطح رونویسی، نوع راه‌انداز مورد استفاده نقش مهمی را ایفا می‌کند. راه‌اندازها بر اساس نوع فعالیت‌شان به انواع ساختاری، ویژه بافتی، القاءپذیر، مصنوعی و دوجهته طبقه‌بندی می‌شوند. راه‌اندازهای ساختاری، بیان ژن‌ها را بدون در نظر گرفتن شرایط محیطی و مرحله رشدی در تمام بافت‌های گیاهی تحریک می‌کنند. به‌عنوان مثال، راه‌انداز CaMV35S از ویروس موزائیک گل کلم[4] به‌طور

[1] Phytase
[2] Extensin
[3] Total soluble protein (TSP)
[4] Cauliflower mosaic virus

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

گسترده جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب با سطح بیان بالا در گیاهان دولپه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. راه‌انداز یوبی‌کوئیتین[1] یکی دیگر از راه‌اندازهای ساختاری است که به‌طور اختصاصی در گیاهان تک‌لپه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از معایب استفاده از راه‌اندازهای ساختاری این است که تولید مداوم پروتئین نوترکیب ممکن است موجب اختلال در متابولیسم سلولی شده و اثر سوء روی رشد و نمو گیاه میزبان داشته باشد. همچنین تحت کنترل راه‌اندازهای ساختاری، سطوح بیان تراژن‌ها در بافت‌های مختلف بسیار متغیر خواهد بود. به‌عنوان مثال، استفاده از راه‌انداز CaMV35S موجب بیان بالای تراژن در بافت برگ و بیان نسبتاً پایین در بافت بذر می‌شود، اما میزان بیان تراژن تحت راه‌انداز یوبی‌کوئیتین در هر دو بافت برگ و بذر بالا می‌باشد (Wani and Aftab 2022).

راه‌اندازهای ویژه بافتی، بیان ژن را در بافت خاص یا مرحله رشدی ویژه در گیاهان کنترل می‌کنند، بنابراین تراژن تحریک شده توسط آن‌ها تنها در همان بافت مدنظر بیان شده و سایر بافت‌ها را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. این راه‌اندازها جهت متمرکز کردن تولید پروتئین نوترکیب در بافت خاص، کاهش اثرات منفی احتمالی پروتئین نوترکیب روی رشد و نمو سایر بافت‌ها و بهبود کارایی برداشت، بسیار مفید می‌باشند که عبارتند از: راه‌انداز پاتاتین[2] ویژه غده از سیب‌زمینی، راه‌انداز E8 ویژه میوه از گوجه‌فرنگی، راه‌انداز ژن رمزگردان آنزیم روبیسکو[3] ویژه برگ و راه‌اندازهای ویژه بذر از دولپه‌ای‌ها از قبیل راه‌انداز آرسلین[4] از لوبیای فرانسوی و ناپین[5] از کلزا و تک‌لپه‌ای‌ها شامل راه‌انداز گاما-زئین از ذرت و راه‌انداز گلوتلین[6] از برنج (Sharma and Sharma 2009).

بیان پروتئین نوترکیب تحت کنترل راه‌اندازهای ساختاری و حتی ویژه بافتی ممکن است در رشد و نمو گیاه تداخل ایجاد نموده و از باززایی آن جلوگیری کند. جهت غلبه بر این مشکل می‌توان از راه‌اندازهای القایی استفاده نمود که القاءپذیری و اختصاصیت بالایی را جهت بیان تراژن در گیاه تراریخته نشان داده و از اثرات سوء پروتئین نوترکیب روی بافت‌های رویشی یا خاموشی تراژن جلوگیری می‌کنند. از راه‌اندازهای القایی شیمیایی می‌توان به راه‌انداز ژن α-آمیلاز از برنج تحت کمبود ساکارز اشاره نمود. مثال‌هایی از راه‌اندازهای القایی فیزیکی عبارتند از: راه‌انداز هیدروکسی ۳-متیل‌گلوتاریل CoA ردوکتاز II[7] تحت تنش مکانیکی هم‌زدن، راه‌انداز دیفنزین[8] گندم و برنج پاسخ‌دهنده به زخم‌شدگی، راه‌انداز زیرواحد کوچک آنزیم روبیسکو از گوجه‌فرنگی و راه‌انداز Rab17 ذرت پاسخ‌دهنده به تنش خشکی. سایر راه‌اندازهای مورد استفاده در تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، راه‌اندازهای مصنوعی و دوجهته هستند. راه‌انداز CaMV35S با دو ناحیه تقویت‌گر، راه‌انداز دورگ mac (حاصل اتصال راه‌انداز مانوپین سینتاز[9] و بخش تقویت‌گر راه‌انداز CaMV35S) و راه‌انداز دورگ AmasPmas 3(Aocs) (حاصل اتصال راه‌انداز ژن‌های اکتوپین سینتاز[10] و مانوپین سینتاز) نمونه‌هایی از راه‌اندازهای مصنوعی می‌باشند (Sharma and Sharma 2009). راه‌اندازهای دوجهته، نواحی از DNA ژنومی هستند که بیان دو ژن روی رشته‌های مختلف DNA را کنترل می‌کنند. استفاده از چنین راه‌اندازهایی جهت کنترل بیان دو تراژن مختلف می‌تواند از خاموشی ژن نیز جلوگیری نماید مانند راه‌انداز ژن RHA3B از آرابیدوپسیس (Rao et al. 2021). امروزه راه‌اندازهای دوجهته با توانایی رونویسی ژن‌های بالادست و پایین‌دست به‌طور مصنوعی ساخته شده و در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، به‌عنوان مثال بیان موفقیت‌آمیز ژن‌های گزارشگر بتا-گلوکورونیداز[11] (*gus*A) و GFP تحت کنترل یک راه‌انداز دوجهته در آرابیدوپسیس گزارش شده است (Yang et al. 2018).

استفاده از توالی‌های تنظیمی: ناحیه ۵′-UTR برای آغاز ترجمه بسیار مهم بوده و نقش حیاتی در تنظیم آغاز ترجمه و تعیین کارایی آن ایفا می‌کند. تنظیم آغاز ترجمه توسط اکثر توالی‌های رهبر و ۵′-UTR یوکاریوتی به‌خوبی درک شده و چندین عامل دخیل در این فرآیند شناخته شده‌اند. به‌عنوان مثال، حذف نواحی

[1] Ubiquitin
[2] Patatin
[3] Rubisco
[4] Arcelin
[5] Napin
[6] Glutelin
[7] Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 2 promoter
[8] Defensin
[9] Mannopine synthase
[10] Octopine synthase
[11] β-glucuronidase (*gus*A)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

UTR-′۳، ′۵ از تراژن‌ها و افزودن توالی UTR-′۵ از ژن یوبی‌کوئیتین برنج (RUB13) موجب افزایش سطح بیان تراژن‌ها می‌شود (Lu et al. 2008). علاوه بر این، استفاده از توالی‌های UTR–′۳، ′۵ از توالی RNA-2 ویروس موزائیک گاودانه[1] (CMV) میزان تولید پروتئین نوترکیب hIFN-γ را به میزان زیادی در توتون افزایش داد. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از این توالی‌ها بدون هر گونه افزایش در میزان رونوشت تراژن، تنها موجب افزایش بیان پروتئین نوترکیب در توتون می‌شوند (Heidari-Japelaghi et al. 2020a,b). همچنین ناحیه UTR-′۳ نقش مهمی در بیان ژن ایفا می‌کند، چرا که حاوی توالی پلی‌آدنیلاسیون می‌باشد که به‌طور مستقیم پایداری mRNA را از طریق محافظت در برابر تخریب آنزیمی، تحت تأثیر قرار می‌دهد. توالی‌های غنی از AU که موجب ناپایداری mRNA می‌شوند نیز در ناحیه UTR-′۳ شناسایی شده‌اند. این توالی‌ها به‌عنوان جایگاه پیرایش، سبب تخریب سریع مولکول‌های mRNA می‌شوند. توالی AAUAAA در ناحیه رمزکننده ژن‌ها موجب پلی‌آدنیلاسیون زود هنگام و بیان ضعیف تراژن‌ها در گیاهان تراریخته می‌شود. بنابراین، این توالی‌ها و توالی‌های غنی از AU باید از توالی نوکلئوتیدی تراژن حذف شوند (Haffani et al. 2000).

بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی تراژن: کاربرد کدونی اشاره دارد به فراوانی استفاده از یک رمز خاص برای اسیدآمینه‌هایی که توسط چندین کدون رمز می‌شوند که این ویژگی در بین موجودات زنده مختلف، متفاوت می‌باشد. به عبارت دیگر، بعضی از اسیدآمینه‌ها دارای چندین رمز می‌باشند که به‌عنوان مثال، در گیاهان تنها یکی از آن‌ها ترجیح داده می‌شود. بنابراین، هنگامی که از ژن‌هایی با منبع غیرگیاهی استفاده می‌شود، باید رمز مربوطه را به رمز ترجیحی گیاه تغییر داد. بین فراوانی کاربرد کدونی و وجود tRNAهای مربوط به رمز مورد تمایل یک همبستگی وجود دارد، بنابراین رمزهای کمیاب ممکن است فرآیند ترجمه را به‌طور کامل متوقف ساخته و بیان ژن را کاهش دهند. بهینه‌سازی کاربرد کدونی تراژن با توجه به میزبان، یکی از نکات ضروری جهت تولید پروتئین نوترکیب به شمار می‌رود. این فرآیند شامل جهش‌زایی درون‌شیشه یا ساخت مصنوعی ژن مورد نظر می‌باشد.

[1] Cowpea mosaic virus (CMV)

از آنجایی که بهینه‌سازی کدونی کل توالی تراژن بسیار پرهزینه و وقت‌گیر است، به همین دلیل این تغییر تنها به چند اسیدآمینه ابتدایی توالی پروتئین حاصل از تراژن محدود می‌شود. به هر حال، بهینه‌سازی کل توالی موجب حذف جایگاه‌های پیرایش و توالی‌های ناپایدارکننده mRNA می‌شود. ذکر این نکته ضروری است که رمزهای تغییر یافته ممکن است در تغییرات پس از ترجمه‌ای شرکت نموده و پیامدهای ناخواسته‌ای را به وجود آورند. بنابراین، هر گونه تغییری باید هم از نظر پیامدهای تنظیمی غیرقابل پیش‌بینی و هم از نظر تاخوردگی و پایداری پروتئین‌ها به دقت مورد بررسی قرار گیرد (Zhu et al. 2022).

افزایش پایداری بیان تراژن: معمولاً بیان تراژن در گیاهان تراریخته با سازه بیانی یکسان و حتی شرایط محیطی مشابه به‌دلیل تنوع تراریختی، متفاوت می‌باشد که می‌تواند به دلایلی همچون اثر جایگاه، تعداد نسخه‌های تراژن یا خاموشی ژن پس از رونویسی[2] (PTGS) باشد. روش‌های مختلفی جهت پایدار نمودن بیان تراژن در گیاهان اتخاذ شده است که شامل استفاده از روش درج ویژه جایگاه به کمک آنزیم ریکامبیناز[3] (نوترکیبی همتا) و نوکلئازهای متصل به انگشت روی یا اندونوکلئازهای ویژه جهت ایجاد برش‌هایی در جایگاه‌های هدف می‌باشد. نوکلئاز انگشت روی حاوی یک دامنه متصل‌شونده به DNA جهت ایجاد شکست‌های کروموزومی در جایگاه‌های ویژه بوده و موجب افزایش فراوانی نوترکیبی‌های همتای موضعی می‌شود. این روش موجب کنترل دقیق مکان تراژن‌ها و درج آن‌ها به نواحی فعال از نظر رونویسی می‌شود (Egelkrout et al. 2012).

روش دیگر، تولید گیاهان تراریخته حاوی یک نسخه تراژن منفرد می‌باشد. به همین منظور از عناصر ویژه همراه با تراژن تحت عنوان عناصر پاسخ‌دهنده به cAMP[4] (CRE) استفاده می‌شود، به‌طوری که ۷۰ درصد از گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته حاوی CRE با یک نسخه منفرد از تراژن دارای بیان پایدار و یک‌شکل بودند. ساخت کروموزوم‌های مصنوعی گیاهی و مینی‌کروموزوم‌ها روش دیگری است که می‌تواند به‌عنوان یک بستر پایدار برای بیان یک‌شکل تراژن مورد استفاده قرار بگیرند. رهاسازی ژن به کمک

[2] Post-transcriptional gene silencing (PTGS)
[3] Recombinase
[4] cAMP responsive element (CRE)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

کروموزوم مصنوعی با ژن‌های میزبان تداخل نداشته و ورود احتمالی تراژن به درون نواحی غیرفعال ژنوم را برطرف می‌سازد. این فناوری، مسیرهای بیوشیمیایی جدیدی را برای سلول گیاهی معرفی نموده و به این ترتیب ویژگی‌های جدیدی را به گیاهان عرضه می‌کند. پایداری تراژن‌ها همچنین می‌تواند از طریق استفاده از موتانت‌های فاقد خاموشی ژن، عدم استفاده از توالی‌های تکراری یا مشابه و استفاده از یک سرکوب‌کننده خاموشی mRNA مانند مهارکننده‌های RNA مداخله‌گر[1] (RNAi) ویروسی به‌دست آید (Sharma and Sharma 2009).

نواحی متصل‌شونده به ماتریکس هسته[2] (S/MAR) یا توالی‌های تنظیمی عمومی می‌توانند جهت افزایش بیان پایدار تراژن مورد استفاده قرار بگیرند. توالی‌های MAR، توالی‌های نوکلئوتیدی غنی از AT هستند که به طور اختصاصی به اسکلت هسته‌ای یا شبکه پروتئینی درون هسته متصل بوده و به‌عنوان یک دامنه مرزی بین هتروکروماتین فشرده و یوکروماتین عمل می‌کند. تراژن‌های احاطه شده توسط توالی MAR یک ساختار سه‌بعدی مستعد رونویسی را تشکیل داده و با القاء یک ساختار کروماتینی باز موجب بیان پایدار تراژن‌ها و کاهش تنوع بیان آن‌ها در طی چند نسل می‌شوند. همچنین توالی‌های MAR می‌توانند با جلوگیری از هتروکروماتینی شدن تراژن و خاموشی ژن به کمک dsRNA، بیان ژن را افزایش دهند (Petersen et al. 2002). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از توالی‌های MAR موجب افزایش بیان و تجمع پادتن PHB-01 در توتون شده است (Ruiz et al. 2020).

۱-۵- ترجمه

ترجمه mRNA به پروتئین یک نیاز اساسی جهت تولید پروتئین نوترکیب است. سطوح mRNA ممکن است به دلایلی همچون وجود کاربرد کدونی، خاموشی ژن پس از رونویسی، ناپایدری mRNA، اندازه مخزن اسیدآمینه و tRNA، حضور ریبوزوم‌ها و وجود ریبوسوئیچ[3]های حساس به متابولیت که تولید پروتئین را در طی تنش متابولیک خاموش می‌کنند، همبستگی ضعیفی با میزان پروتئین مربوطه داشته باشد (Egelkrout et al. 2012).

پایداری mRNA: نیمه عمر mRNA بسته به وجود موتیف‌های ویژه درون توالی mRNA از چند دقیقه تا چند روز متغیر می‌باشد. وجود کلاهک ′۵-متیل گوانین (m^7GpppN) و دنباله ′۳ پلی A موجب پایداری رونوشت‌ها شده و عوامل درگیر در فرآیند ترجمه را القاء می‌کنند. تغییر توالی‌های احاطه‌کننده رمز آغاز، نوکلئوتیدهای چارچوب باز خواندنی (ORF) و توالی ′۵-UTR که ساختار ثانویه mRNA را تنظیم می‌کند، به‌طور آشکارا در پایداری mRNA و کارایی ترجمه نقش دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که وارد کردن ساختارهای ثانویه در ناحیه ′۵-UTR مولکول mRNA موجب تخریب و عدم ترجمه آن می‌شود، در حالی‌که افزودن ′۵-UTR درون‌زاد یا سایر موتیف‌های حفظ شده مانند توالی ′۵ رهبر از ویروس موزائیک توتون (TMV) و توالی Kozak (ACCAAUGG) پایداری mRNA و کارایی ترجمه را افزایش می‌دهد (Joshi et al. 1997).

پایداری مولکول‌های mRNA توسط miRNAها نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. miRNAها به طول ۲۱ نوکلئوتید از طریق اتصال غیرمکمل به ناحیه ′۵-UTR، میزان ترجمه را تنظیم می‌کنند، بنابراین اثر آن‌ها سرکوب فرآیند ترجمه است نه تخریب mRNA. در حالی که، siRNAها با توالی‌های مکمل روی mRNA به‌طور کامل متصل شده و موجب تخریب مولکول mRNA از طریق القاء کمپلکس القاءکننده خاموشی توسط RNA[4] (RISC) می‌شوند. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که میزان رابطه مکملی بین توالی mRNA و توالی‌های متصل‌شونده، تعیین‌کننده تخریب mRNA توسط siRNA یا سرکوبی ترجمه به‌وسیله miRNA است (Iwakawa and Tomari 2012).

ریبوسوئیچ‌ها، جزء دیگری از ماشین ترجمه سلولی هستند که در طی تکامل حفظ شده و علاوه بر واکنش نسبت به سطوح متابولیت‌ها، موجب افزایش یا کاهش میزان رونویسی یا ترجمه mRNA می‌شوند. یک ریبوسوئیچ حاوی دو بخش است: ۱) یک دامنه حسگر[5] که به متابولیت‌ها متصل می‌شود و ۲) بستر بیانی که ساختار فضایی مولکول mRNA را تغییر داده و منجر به واکنش می‌شود (Tucker and Breaker 2005). ریبوسوئیچ‌ها را می‌توان

[1] RNA interference (RNAi)
[2] Scaffold/Matrix attachment regions (S/MAR)
[3] Riboswitch
[4] RNA-induced silencing complex (RISC)
[5] Aptamer

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

به‌منظور ارزیابی سطوح متابولیت‌ها با ژن‌های گزارشگر، نشانه‌گذاری نمود، اما در حال حاضر نمی‌توان آن‌ها را جهت کنترل بیان ژن به‌طور معمول به کار برد. هر دو نوع ریبوسوئیچ فعال‌کننده و خاموش‌کننده به‌طور مصنوعی ساخته شده و قادر به فعالیت در کلروپلاست‌ها می‌باشند، اما تاکنون جهت القاء یا خاموشی ژن‌های هسته‌ای مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. اخیراً از ریبوسوئیچ‌ها جهت بیوسنتز مقادیر زیادی کاروتنوئید آستاگزانتین[1] با استفاه از مهندسی کلروپلاست در توتون استفاده شده است (Agrawal et al. 2022).

اندازه مخزن اسیدآمینه‌ای: سطوح اسیدآمینه‌های آزاد با توجه به بیوسنتز و کاربردشان متفاوت بوده و ممکن است فرآیند ترجمه را تحت تأثیر قرار بدهند. برای مثال، پروتئین زئین به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین ذخیره‌ای در اندوسپرم ذرت، اسیدآمینه لیزین کمی در ساختار خود دارد، بنابراین بذور ذرت دارای اسیدآمینه لیزین آزاد کم می‌باشند. اگر مسیر بیوسنتز لیزین در بذور ذرت مهار شود، میزان پروتئین زئین کاهش یافته و سطوح اسیدآمینه‌های آسپارتات، آسپاراژین و گلوتامات افزایش خواهد یافت. این مشاهده نشان می‌دهد که محدودیت اسیدآمینه‌های آزاد می‌تواند فرآیند ترجمه را محدود نماید. یکی از روش‌های افزایش اندازه مخزن اسیدآمینه، مهندسی متابولیک است. مهندسی متابولیک با افزایش بیان آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اسیدآمینه‌ها، به‌ویژه یک اسیدآمینه خاص با مقادیر محدود، می‌تواند سبب افزایش اندازه مخزن اسیدآمینه و نهایتاً افزایش بیان پروتئین نوترکیب شود (Vallarino et al. 2020).

خاموشی ژن پس از رونویسی: خاموشی ژن پس از رونویسی یک سازوکار کنترلی موجود در یوکاریوت‌ها جهت محافظت در برابر آلودگی ویروسی و درج ترنسپوزون‌ها است. در این سازوکار که تحت عنوان RNAi نامیده می‌شود، مولکول‌های کوچک siRNA به طول تقریباً ۲۱ نوکلئوتید به توالی‌های مکمل mRNA متصل شده و کمپلکس RISC را القاء نموده و نهایتاً مولکول‌های mRNA توسط اندونوکلئاز دایسر[2] تخریب می‌شوند (Jones-Rhoades et al. 2006). مکانیسم PTGS در اثر تشکیل RNA دورشته‌ای توسط تراژن‌هایی با جهت وارونه (مکانیسم RNA آنتی‌سنس) یا یک تراژن تحت کنترل دو راه‌انداز قوی هم‌گرا در دو طرف فعال می‌شود. این مکانیسم همچنین می‌تواند توسط سطوح اضافی رونوشت القاء شود. استفاده از راه‌اندازهای ویروسی قوی به‌دلیل تولید سطوح بالای رونوشت، می‌تواند مکانیسم RNAi را تحریک نموده و موجب کاهش بیان ژن شود. بنابراین، حفظ تعداد نسخه‌های رونوشت در سطح پایین جهت پایداری در بیان پروتئین نوترکیب مؤثر است. بعضی از ویروس‌ها از طریق تولید مهارکننده‌های RNAi، بر مکانیسم خاموشی ژن پس از رونویسی غلبه می‌کنند (Norkunas et al. 2018). از آنجایی که ناقل‌های ویروسی اغلب به روشی مشابه با ویروس‌ها موجب آلودگی گیاهان می‌شوند، بنابراین می‌توان با استفاده از مهارکننده‌های ویروسی از خاموشی تراژن جلوگیری نموده و سطح بیان آن را افزایش داد.

۱-٦- پس از ترجمه

عملکرد محصول پروتئینی نه تنها به مقدار تولید آن، بلکه به میزان تخریب آن نیز بستگی دارد. میزان رونویسی و سطوح mRNA ضرورتاً با مقدار محصول پروتئینی همبستگی ندارد. این عدم‌همبستگی عمدتاً به‌دلیل تخریب پروتئین توسط پروتئازهای درون سلولی، آپوپلاستی یا به‌وسیله مسیرهای پروتئولیتیک به‌واسطه یوبی‌کوئیتین می‌باشد (Martínez-Férriz et al. 2022).

پایداری پروتئین نوترکیب: پس از ترجمه، پروتئین‌ها به کمک چپرون‌هایی مانند پروتئین‌های شوک گرمایی، پروتئین‌های اتصالی و آنزیم دی‌سولفید ایزومراز موجود در شبکه آندوپلاسمی به شکل صحیح تاخورده و به مکان‌های مختلف سلولی منتقل می‌شوند. چپرون‌ها موجب پایداری پروتئین شده و از تخریب آن جلوگیری می‌کنند. پروتئین‌های سیتوپلاسمی توسط مسیر پروتئولیتیک به کمک یوبی‌کوئیتین یا توسط پروتئازهای سیتوزولی تخریب می‌شوند. به‌منظور کاهش تجزیه پروتئولیتیک پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود: ۱) بیان هم‌زمان تراژن با یک مهارکننده پپتیداز نوع ترشحی مانند سرین پپتیداز، ۲) افزودن ژلاتین به‌عنوان یک پیش‌ماده جایگزین برای پپتیدازها، ۳) بیان تراژن در بافت‌های ویژه، مانند غده و بذر، ٤) هدف‌گیری به درون اندامک‌های ویژه سلولی، ٥) اتصال

[1] Astaxanthin
[2] Dicer

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

پروتئین‌های نوترکیب به یک توالی پایدارکننده، مانند پلی‌پپتید شبه الاستین[1] (ELP)، ٦) بیان هم‌زمان تراژن با مهارکننده‌های خاموشی و ۷) استفاده از لاین‌های موتانت فاقد ژن‌های رمزگردان پپتیدازهای گیاهی به شرطی که پپتیدازهای هدف برای رشد گیاه ضروری نباشند (Sharma and Sharma 2009; Heidari-Japelaghi et al. 2019b). Heidari-Japelaghi و همکاران (2019a) نشان دادند که استفاده از توالی ELP میزان عملکرد پروتئین نوترکیب hIFN-γ را حدود ۱۰ برابر در میزبان باکتریایی *Escherichia coli* افزایش داده و به میزان ٤٦/٨٥ درصد از TSP رسید. مشابه با سیستم بیانی باکتریایی، اتصال توالی ELP به hIFN-γ، میزان انباشت پروتئین نوترکیب را به میزان ۲/٦ برابر (۲۲/٤٨ درصد از TSP) در توتون افزایش داد و با استفاده از روش ITC، موجب بازیابی کارآمد پروتئین نوترکیب hIFN-γ با خلوص ۱ ± ۹۸ درصد شد (Heidari-Japelaghi et al. 2020a,b).

تغییرات پس از ترجمه: هنگامی که پروتئین تولید می‌شود، قبل از انتقال به محل فعالیت خود، دستخوش تغییرات پس از ترجمه می‌شود. تغییرات پس از ترجمه در تاخوردگی صحیح، فعالیت و پایداری پروتئین‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند. یکی از مهم‌ترین تغییرات پس از ترجمه که روی اغلب پروتئین‌ها اعمال می‌شود، گلیکوزیلاسیون است. گلیکوزیلاسیون عبارتند از اتصال کووالانت گروه‌های قندی به پروتئین‌ها به منظور افزایش پایداری، حلالیت، فعالیت زیستی و تاخوردگی صحیح. گلیکوزیلاسیون در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی اتفاق می‌افتد. مکانیسم گلیکوزیلاسیون در شبکه آندوپلاسمی در اکثر یوکاریوت‌ها در طی تکامل حفظ شده و شامل افزودن گلیکان‌های مشابه (اولیگومانوز) به باقی‌مانده آسپاراژین است. سپس N-گلیکان تولیدی توسط آنزیم‌های موجود در دستگاه گلژی فرآوری می‌شود که این آنزیم‌ها در مخمر، حشرات، پستانداران و گیاهان اختصاصی بوده و منجر به اولیگوساکاریدهای مختلفی می‌شود (Ramazi and Zahiri 2021). گیاهان به روشی تقریباً مشابه با سیستم‌های جانوری قادر به انجام این تغییرات هستند. به هر حال اختلافاتی بین گیاهان و پستانداران از نظر گلیکوزیلاسیون وجود دارد: گیاهان گروه‌های α-(۱ و ۳) فوکوز و β-(۱ و ٦) گزیلوز را به پروتئین‌ها اضافه می‌کنند، در حالی‌که پستانداران، گروه‌های α-(۱ و ٦) فوکوز و β-(۱ و ٤) گالاکتوز، گلوکز و اسید سیالیک را به N-گلیکان‌ها می‌افزایند. این مسأله نگرانی‌هایی را به وجود می‌آورد مبنی بر اینکه پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان ممکن است در بدن انسان حساسیت‌زا بوده و سیستم ایمنی را تحریک نمایند و یا ممکن است به اندازه کافی فعال نبوده و به سرعت از بدن دفع شوند. روش‌های مختلفی برای تغییر الگوی N-گلیکوزیلاسیون در گیاهان وجود دارد که عبارتند از: اتصال پپتید راهنمای (SEK/K/H)DEL ویژه شبکه آندوپلاسمی به پروتئین نوترکیب به ویژه پادتن‌ها و شبیه‌سازی مسیر بیوسنتزی اسید سیالیک در گیاهان (Peters and Stoger 2011).

تداخل در متابولیسم و سمیت پروتئین نوترکیب: بیان بالای پروتئین نوترکیب می‌تواند در فعالیت زیستی سلول گیاهی تداخل ایجاد کند. مثال‌های متعددی از اثرات سوء پروتئین نوترکیب تولیدی بر سلامت گیاه وجود دارد. به‌عنوان مثال، بیان پروتئین آویدین[2] در سیتوپلاسم منجر به تولید تعداد محدودی گیاه تراریخته با سطوح بیان ناچیز از پروتئین نوترکیب شده است، به این دلیل که سطوح بالای پروتئین آویدین برای سلول‌های گیاهی مضر است. بیان پروتئین آویدین درون آپوپلاست منجر به تولید مقادیر بالایی از پروتئین نوترکیب شد، اما در این مورد، گیاهان تراریخته نرعقیم شدند (Albertsen et al. 1999). پروتئین لاکاز[3]، رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که باعث تداخل در متابولیسم سلولی می‌شود. با استفاده از روش‌هایی همچون بیان ویژه بافتی به‌ویژه بیان در دیواره سلولی می‌توان میزان بیان این پروتئین را افزایش داد (Hood et al. 2011). به طور مشابه، آنزیم تریپسین[4] به‌عنوان یک پروتئاز تهاجمی با موفقیت از طریق بیان تریپسینوژن[5] درون بذور ذرت بدون اثرات سوء روی سلول گیاهی تولید شد (Woodard et al. 2003).

نتیجه‌گیری کلی

[1] Elastin-like polypeptide (ELP)

[2] Avidin
[3] Laccase
[4] Trypsin
[5] Trypsinogen

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

خطر احتمالی آلودگی با توکسین‌های باکتریایی و ویروس‌های جانوری، استفاده از سیستم‌های میکروبی و جانوری را جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌ویژه از منابع انسانی محدود کرده است. علاوه بر این، نیاز روزافزون به پروتئین‌های دارویی با توجه به افزایش چشمگیر جمعیت جهانی، تولید آن‌ها را با استفاده از کشت سلول‌های جانوری هزینه‌بر نموده است. با توجه به مشکلات و خطرات احتمالی استفاده از سیستم‌های بیانی میکروبی و جانوری، سیستم‌های بیانی بر پایه گیاهی یک بستر ایمن، کارآمد و ارزان‌قیمت را برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب با اهداف صنعتی و پزشکی فراهم نموده است. به‌عنوان مثال، برخی از پروتئین‌های نوترکیب با ارزش از قبیل آویدین، β-گلوکورونیداز، تریپسین، لیزوزیم انسانی، فاکتور رشد انسانی و غیره در گیاهان تولید شده و هم‌اکنون وارد بازارهای تجاری شده‌اند. با این وجود، تولید پایدار و کارآمد در سطوح بالا در گیاهان و همچنین در نسل‌های بعدی نیازمند بهینه‌سازی عوامل مؤثر در میزان تولید پروتئین نوترکیب در سطوح مختلف شامل نوع گیاه میزبان، طراحی سازه بیانی کارآمد و مراحل رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه است.

منابع

Agrawal S, Karcher D, Ruf S, et al. (2022) Riboswitch-mediated inducible expression of an astaxanthin biosynthetic operon in plastids. Plant Physiology 188:637-652.

Albertsen MC, Howard JA, Maddock S (1999) Induction of male sterility in plants by expression of high levels of avidin. US Patent 5:962-976.

Arcalis E, Marcel S, Altmann F, et al. (2004) Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm. Plant Physiology 136:3457-3466.

Barta A, Sommengruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM (1986) The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. Plant Molecular Biology 6:347-357.

Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. Plant Biotechnology Journal 6:633-648.

Chung YH, Church D, Koellhoffer EC, Osota E, Shukla S, Rybicki EP, et al. (2022) Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines. National Review Materials 7:372-388.

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

Haffani YZ, Overney S, Yelle S, Bellemare G, Belzile FJ (2000) Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the *Bacillus thuringiensis* cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. Molecular Genetics and Genomics 264:82-88.

Heidari-Japelaghi R, Haddad R, Valizadeh M, Dorani-Uliaie E, Jalali-Javaran M (2019a) Elastin-like polypeptide fusions for high-level expression and purification of human IFN-γ in *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry 585:113401.

Heidari-Japelaghi R, Valizadeh M, Haddad R, Dorani-Uliaie E, Jalali-Javaran M (2020a) Fusion to elastin-like polypeptide increases production of bioactive human IFN-γ in tobacco. Transgenic Research 29:381-394

Heidari-Japelaghi R, Valizadeh M, Haddad R, Dorani-Uliaie E, Jalali-Javaran M (2020b) Production of bioactive human IFN-γ protein by agroinfiltration in tobacco. Protein Expression and Purification 173:105616.

Heidari-Japelaghi R, Valizadeh M, Haddad R, Dorani-Uliaie E, Jalali-Javaran M (2019b) Elastin-like polypeptide fusions enhance transient expression of human IFN-γ in tobacco leaves. South African Journal of Botany 125:321-328.

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342:76-78.

Hood EE, Devaiah SP, Fake G, et al. (2011) Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. Plant Biotechnology Journal 10:20-30.

Hosseinzadeh Gharajeh N, Valizadeh M, Dorani E, Hejazi MA (2020) *Dunaliella* sp. ABRIINW-I1 as a cell factory of nutraceutical fatty acid pattern: an optimization approach to improved production of docosahexaenoic acid (DHA). Chemical Engineering & Processing: Process Intensification 155:108073.

Iwakawa H-O, Tomari Y (2022) Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. Molecular Cell 82:30-43.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annal Review of Plant Biology 57:19-53.

Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. Plant Molecular Biology 35:993-1001.

Liu H, Timko MP (2022) Improving protein quantity and quality-the next level of plant molecular farming. International Journal of Molecular Science 23:1326.

Long Y, Wei X, Wu S, et al. (2022) Plant molecular farming, a tool for functional food production. Journal of Agriculture and Food Chemistry 70:2108-2116.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

Lu J, Sivamani E, Azhakanandam K, Samadder P, Li X, Qu R (2008) Gene expression enhancement mediated by the 5′-UTR intron of the rice *rubi*3 gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants. Molecular Genetics and Genomics 279:563-572.
Martínez-Férriz A, Ferrando A, Fathinajafabadi A, Farràs R (2022) Ubiquitin-mediated mechanisms of translational control. Seminars in Cell and Developmental Biology 132:146-154.
Mirzaee M, Osmani Z, Frébortová J, Frébort I (2022) Recent advances in molecular farming using monocot plants. Biotechnology Advances 58:107913.
Norkunas K, Harding R, Dale J, Dugdale B (2018) Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. Plant Methods 14:1-14.
Peters J, Stoger E (2011) Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies. Human Vaccin 7:367-374.
Petersen K, Leah R, Knudsen S, Cameron-Mills V (2002) Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequencies and reduce variance of transgene expression in barley. Plant Molecular Biology 49:45-58.
Ramazi S, Zahiri J (2021) Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database 2021: baab012.
Rao V, Virupapuram V (2021) Identification and characterization of a biphasic/bidirectional wound-inducible RHA3B gene promoter from Arabidopsis thaliana. SLAS Technology, https://doi.org/10.1101/2021.01.28.428589.
Ruiz Y, Ramos PL, Soto J, et al. (2020) The M4 insulator, the TM2 matrix attachment region, and the double copy of the heavy chain gene contribute to the enhanced accumulation of the PHB-01 antibody in tobacco plants. Transgenic Research 29:171-186.
Sahu PK, Patel TS, Sahu P, Singh S, Tirkey P, Sharma D (2014) Molecular farming: a biotechnological approach in agriculture for production of useful metabolites. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 4:23-30.
Schillberg S, Finnern R (2021) Plant molecular farming for the production of valuable proteins-critical evaluation of achievements and future challenges. Journal of Plant Physiology 258-259:153359.
Sedaghati B, Haddad R, Bandehpour M, Kazemi B (2022) Improving the accumulation of recombinant human serum albumin (HSA) in transgenic tobacco plants by fusion with the N-terminal proline-rich domain of γ-zein (Zera). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 58:921-930.
Sharma AK, Sharma MK (2009) Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances 27:811-832.
Tucker BJ, Breaker RR (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. Current Opinion in Structural Biology 15:342-348.
Vallarino JG, Kubiszewski-Jakubiak S, Ruf S, et al. (2020) Multi-gene metabolic engineering of tomato plants results in increased fruit yield up to 23%. Scientific Reports 10:17219.
Vianna GR, Cunha NB, Rech EL (2023) Soybean seed protein storage vacuoles for expression of recombinant molecules. Current Opinion in Plant Biology 71:102331.
Vitale A, Pedrazzini E (2005) Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. Molecular Interview 5(4): 216-225.
Wani KI, Aftab T (2022) Tools and Techniques Used in Plant Molecular Farming. In: Plant Molecular Farming. Springer Briefs in Plant Science. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12794-6-2.
Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, et al. (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. Biotechnology and Applied Biochemistry 38:123-130.
Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ (2012) Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. Biotechnology Advances 30:1171-1184.
Yang J, Wang X, Hasi A, Wang Z (2018) Structural and functional analysis of a bidirectional promoter from *Gossypium hirsutum* in *Arabidopsis*. International Journal of Molecular Science 19:3291.
Yang J, Xun H, Niu L, et al. (2021) Elastin-like polypeptide and γ-zein fusions significantly increase recombinant protein accumulation in soybean seeds. Transgenic Research 30:675-686.
Zhu Q, Tan J, Liu Y-G (2022) Molecular farming using transgenic rice endosperm. Trends in Biotechnology 40:1248-1260.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]