

کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه

زهرا زائر^۱، داود کولیوند^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

koolivand@znu.ac.ir

چکیده

در حال حاضر بیش از ۴۵ درصد مرگ و میر افراد در کشورهای در حال توسعه، ناشی از بیماری‌های واگیردار می‌باشد. مهمترین راهکار جهت جلوگیری از این بیماری‌ها، واکسیناسیون افراد است. اما روش‌های کنونی تولید واکسن، از نظر فناوری پیچیده و گران هستند. چنین شرایطی موجب می‌شود که بخش بزرگی از کشورهای در حال توسعه و فقیر به واکسیناسیون دسترسی نداشته باشند. راهکارهای جدید برای تولید زیر واحدهای واکسن شامل استفاده از سیستم‌های مختلف مانند، مانند فرماتاسیون باکتری‌ها و سلول‌های پستانداران می‌باشد، اما این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند، از جمله هزینه‌های توسعه، حمل نقل، سیستم‌های خنک‌سازی و .. که آن‌ها را غیر عملی می‌سازد. به این منظور واکسن‌های خوراکی مشتق شده از گیاهان، به عنوان دیدگاه جدید برای تولید واکسن بررسی شده است. در این روش، قطعات کوچک دی.ان.ا کدکننده اپی‌توپ یا آنتی‌ژن مورد نظر، به ژن کدکننده پروتئین پوششی ویروس گیاهی متصل می‌شود، سپس این ویروس نو ترکیب حامل، جهت آلوده‌سازی گیاهان به کار گرفته می‌شود. در این روش، طیف وسیعی از گیاهان برای تولید واکسن علیه بیماری‌ها استفاده شده است. در این مقاله به روش‌های تولید واکسن خوراکی با استفاده از گیاهان تراریخته و مزایا و معایب این فناوری اشاره می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایمن‌سازی دهانی، گیاهان تراریخته، واکسن‌های خوراکی، ویروس‌های گیاهی.

مقدمه

می باشد که آن را غیرعملی می سازد. به نظر می رسد که در حال حاضر سنتز آنتی ژن اپی توپ های واکسنی نو ترکیب در گیاهان، ایده ی نویدبخشی برای مشکلات در ارتباط با واکسیناسیون است. به این منظور، در این مطالعه واکسن های خوراکی مشتق شده از گیاهان، به عنوان دیدگاه جدید برای تولید واکسن بررسی می شود. همچنین برخی از جنبه های روش های کلاسیک و مدرن بررسی خواهد شد. علاوه بر این، ویروس های گیاهی به طور بالقوه، به عنوان وکتور برای انتقال ژن به سیستم گیاهی و بیان پروتئین به منظور تولید واکسن های خوراکی بحث خواهد شد.

روش های کلاسیک تولید واکسن

مهندسی ژنتیک در باکتری ها، مخمرها و سلول های پستانداران و حشرات، گزینه های خوبی برای تولید زیرواحدهای واکسن به صورت تجاری می باشند که تاکنون برای تولید انواع مختلف واکسن توسعه یافته اند (۳). سیستم های بیانی که جهت تولید پروتئین های نو ترکیب از سلول های پستانداران استفاده می کنند، فرآورده هایی را به وجود می آورند که به طور کامل، مشابه با آنهایی است که به طور طبیعی در بدن انسان تولید

در حال حاضر بیش از ۴۵ درصد مرگ و میر افراد در کشورهای در حال توسعه، ناشی از بیماری های واگیردار است. مهمترین راهکارها جهت جلوگیری از این بیماری ها، واکسیناسیون افراد است. اما هنوز هم بیش از ۳۰ میلیون کودک در دنیا در برابر این بیماری های قابل پیشگیری و درمان، ایمن سازی نشده اند. زیرا روش های کنونی تولید واکسن از نظر فناوری پیچیده و در نتیجه گران هستند. چنین شرایطی موجب می شود که بخش بزرگی از کشورهای در حال توسعه و فقیر، به واکسیناسیون دسترسی نداشته باشند (۱). پیشرفت در روش های زیست شناسی مولکولی در دهه ی ۱۹۸۰، به توسعه راهکارهای جدید برای تولید زیرواحدهای واکسن کمک کرد. این روش ها شامل استفاده از سیستم های مختلف مانند، فرماتناسیون باکتری ها و سلول های پستانداران برای بیان پروتئین های نو ترکیب می باشد (۲). لازم به ذکر است که در حال حاضر، واکسن های در دسترس دارای محدودیت هایی می باشند از جمله هزینه های توسعه، حمل و نقل، سیستم های خنک سازی و خطر در ارتباط با شرایط تزریقی و پاسخ آلرژیک در افراد

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی، دارای مزایایی مانند سهولت در کشت، ظرفیت بالا برای سطح بیانی هدف مورد نظر و در اختیار داشتن تغییرات پس از ترجمه برای پروتئین مورد نظر می‌باشند، اما این سیستم نیز دارای معایبی می‌باشد، از جمله این‌که، فرآیند گلیکوزیلاسیون به‌طور بالایی رخ می‌دهد و فاقد الیگوساکاریدهای پیچیده حاوی فوکوز، گالاکتوز و اسید سالیسیلیک انتهایی می‌باشند (۶). بنابراین استفاده از سیستم بیانی که ظرفیت بالا برای فراهم کردن پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را به درستی انجام بدهد، مدنظر می‌باشد (۷).

واکسن‌های گیاهی

در سال‌های اخیر پیشرفت مبتنی بر فناوری دی.ان.ا، چه در شرایط آزمایشگاهی، چه درون سلولی *in vivo*، فرصتی را برای طراحی و ساخت نوع جدیدی از واکسن‌ها ایجاد کرده است که یک تحول یا انقلاب در زمینه واکسینولوژی است. تولید گیاهان اصلاح شده ژنتیکی، به‌منظور تولید محصول بهتر، بهینه‌سازی و مقاومت در برابر آفات و عوامل بیماری‌زا، به‌صورت یک تئوری است که نقش گیاهان را به‌عنوان بیوراکتور برای تولید

می‌شوند، اما چون کشت این سلول‌ها گران تمام می‌شود، این سیستم در مقیاس محدود قابل اجرا است (۲). همچنین ممکن است سم‌ها، توکسین و عوامل آلوده‌کننده، وارد سلول‌های حیوانی شوند و فرآیندهای خالص‌سازی را مشکل‌تر کنند (۴). مخمرها یک میزبان یوکاریوتی عالی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با توجه به هزینه‌ی کم و مقیاس‌پذیری مناسب می‌باشند. اما این موجودات دارای یک سیستم ساده‌ای می‌باشند که قادر به پردازش و اصلاحات بعد از ترجمه برای پروتئین نمی‌باشند. کاربرد میکروارگانیسم‌هایی مانند سیستم‌های باکتریایی، در بیان پروتئین‌های نوترکیب، ارزان و موثرتر می‌باشد و باعث شده که پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع تولید شوند. از طرفی تولید پروتئین در سیستم‌های پروکاریوتی محدودیت‌های جدی نیز به‌همراه دارد. فرآورده‌های حاصل، به‌طور محسوسی با فرآورده‌های طبیعی انسانی اختلاف دارند. زیرا باکتری‌ها فاقد امکانات سلول‌های یوکاریوتی، جهت انجام اصطلاحات پس از ترجمه هستند (۵). سیستم بیان دیگری در میزبان سلولی حشرات آلوده باکلوویروس‌ها (*Baculovirus*) پیشنهاد شده که

مولکول‌های دارویی نشان می‌دهد. سیستم‌های بیان گیاهی، دارای برخی مزایا در برابر سلول‌های باکتریایی، میکروبی و سلول‌های حیوانی می‌باشند. این سیستم‌ها دارای یک مسیر سنتز پروتئین یوکاریوتی برتر که خیلی شبیه به سلول‌های حیوانی است، می‌باشند. اما تفاوت‌های جزئی در گلیکوزیلاسیون پروتئینی دارند. تجمع پروتئین در گیاهان، در سطح بالاتر می‌باشد. نگرانی‌هایی که در مورد آلودگی پروتئین‌های بیانی با پاتوژن‌های حیوانی - انسانی مثل Human Immunodeficiency Virus (HIV) و ویروس هپاتیت که از طریق خون انتقال می‌یابند، وجود دارد، با استفاده از گیاهان برطرف خواهند شد. محصولات سنتز شده در گیاهان، به سادگی قابل انباشت و ذخیره به میزان بالا در اندامک‌های هدف (واکوئل، شبکه آندوپلاسمی و پلاستیدها) و دور از دسترس پروتئازها می‌باشند (۸).

انواع سیستم‌های بیان گیاهی

به‌طور کلی برای بیان ژن خارجی در گیاهان، دو سیستم وجود دارد، انتقال ژن پایدار و استفاده از ویروس‌های گیاهی به‌عنوان وکتور. شایع‌ترین روش تا به امروز، انتقال

هسته‌ای پایدار به گونه‌های زراعی است (۹). با وجود مزایایی متعدد برای انتقال پایدار مثل هزینه پایین و ذخیره پروتئین در دانه در دراز مدت، برخی معایب نیز وجود دارد، مانند فرآیند باززایی و اصلاح گیاهان تراریخته که زمان‌گیر است و اغلب آثار نامطلوبی مانند خاموشی ژن رخ می‌دهد و سطح بیان ژن معمولاً کم است. در روش دوم، بخش اپی‌توپ یا پپتیدی ژن موردنظر در قسمت پروتئین پوششی ویروس گیاهی اصلاح شده قرار داده می‌شود و سپس آلوده سازی گیاه موردنظر صورت می‌گیرد و باعث تولید و تجمع اپی‌توپ در داخل سلول گیاهی می‌شود. توالی اپی‌توپ و همچنین ژنوم ویروسی، به داخل ژنوم گیاهی ادغام نشده و تنها بیان و تکثیر در سلول‌های آلوده رخ می‌دهد (۱۰). مزایایی برای بیان موقت، توسط ویروس‌های گیاهی برای انتقال ژن در گیاهان ارائه شده است. کلون‌سازی ژنوم خارجی به ژنوم ویروسی، دارای زمان کوتاه‌تری نسبت به بازه‌ی زمانی که برای انتقال ژن به گیاه لازم است، می‌باشد. همچنین مقیاس‌پذیری آنتی‌ژن تولیدی و دامنه گسترده میزبانی ویروس‌های گیاهی، این اجازه را می‌دهد که از آن‌ها به‌عنوان فاکتورهای زیستی استفاده شود (۱۱).

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

مزایای واکسن‌های گیاهی

مثال‌هایی از انواع واکسن‌های خوراکی بیان شده است.

برای واکسن‌های گیاهی مزایای در جدول ۱

تعریف شده است (۲، ۱۰، ۱۲). در جدول ۲

جدول ۱- مزایای واکسن‌های خوراکی

شماره	مزایا	ویژگی	منبع
۱	تحویل دهانی، خوراکی	جهت حفاظت واکسن در برابر تخریب شدن، تعدادی حامل جهت سالم رساندن آن‌ها به روده طراحی شده است مانند بسته‌های زیستی (لیپوزم‌ها)، میکروارگانسیم‌های غیرفعال یا دیواره سلولی بافت گیاهی که شامل قند و سلولز می‌باشد و نقش حفاظتی دارند. همه این موارد باعث می‌شوند که آنتی‌ژن به تدریج در روده رهاسازی و جذب شود.	(۲)
۲	پودر خشک یا مواد غذایی خام	به صورت خام یا خشک شده یا فرمولاسیون کپسوله ارائه شده	(۱۲)
۳	بدون نیاز به زنجیره سردسازی	مقاوم به گرما است و نیاز به زنجیره سرمایی برای حمل نقل ندارد و به راحتی می‌توان در نزدیکی محل کاربرد استفاده کرد.	(۱۲)
۴	ایجاد پاسخ ایمنی	مخاط و سرمی (سیستمیک)	(۱۰)
۵	ایمن تر نسبت به واکسن‌های سنتی	عاری از توکسین‌ها و عوامل بیماری‌زا	(۱۰)
۶	سهولت در تولید و مقیاس پذیری	ذخیره‌سازی آنتی‌ژن واکسنی در دانه برای مدت طولانی	(۱۰)

جدول ۲- برخی از گونه‌های گیاهی، مزایا و معایب آن‌ها

شماره	گیاه	مزایا	معایب	منبع
۱	توتون و گونه‌های آن	محصول غیرخوراکی - سهولت در انتقال ژن و بیان	تجمع آلکالوئید و محتوای فنولی بالا	(۲۶)
۳	کاهو	فاقد متابولیت‌های ثانویه	سریع فاسد می‌شود	(۲۷)
۵	سیب زمینی	ذخیره به مدت طولانی	واسرشت‌سازی پروتئین در اثر پخت و پز	""""

برای تهیه واکسن برای انسان‌ها و حیوانات می‌باشد. این سیستم گاهی اوقات سیستم ارائه دهنده پروتئین - پپتید نامیده می‌شود (۱۵). هنگامی که اپی‌توپ آنتی‌ژن موردنظر شناسایی

ویروس‌های گیاهی به عنوان وکتور برای

انتقال اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی

استفاده از ویروس‌های گیاهی اصلاح شده

به عنوان حامل، به طور بالقوه یک سیستم ایمن

موزائیک گل کلم *Cauliflower mosaic virus* (CAMV)، با ژنوم دی.ان.ا. دو رشته‌ای (dsDNA) می‌باشد که برای بیان دو ژن *Dihydrofolate Reductase* خارجی و *metallothionein II* کاربرد پیدا کرد. به دنبال آن ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم آر.ان.ا. تک رشته‌ای (ssRNA)، به‌عنوان حامل برای تحویل ژن خارجی به سلول‌های گیاهی نقش پیدا کردند (۱۹). در میان وکتورهای ویروسی، پرکاربردترین آن‌ها: *Potato virus mosaic virus*، *Tobacco Alfalfa mosaic virus*، *Cowpea mosaic virus* و *Plum Pox virus* می‌باشد (۲۰). علاوه بر این وکتورهای ویروسی دارای ژنوم دی.ان.ا. تک رشته‌ای حلقوی *Circular ssDNA* از خانواده *Geminiviridae* نیز گسترش یافته‌اند (۲۱).

انواع وکتورهای بیانی

وکتورهای ویروسی کامل (complete viral vector)

در این روش، ویروس به صورت یک ذره کامل ویروسی به سلول میزبان منتقل می‌شود (وکتور حاوی ترانسژن است). سلول به سنتز

شده باشد، می‌توان قطعات کوچک‌تری از دی.ان.ا. کد کننده اپی‌توپ را به ژن کدکننده پروتئین پوششی (coat protein) ویروس گیاهی متصل کرد. سپس این ویروس نو ترکیب حامل، جهت آلوده‌سازی گیاهان به کار گرفته می‌شود. یکی از جنبه‌های مهم در هنگام طراحی یک وکتور ویروسی اصلاح شده، این است که ویروس توانایی سرهم کردن خود را داشته باشد و به‌طور کامل بتواند گیاه آلوده کند و امکان درج پپتید یا اپی‌توپ ژن خارجی را در پروتئین ویروسی دارا باشد (۱۶). اما این سیستم دارای برخی معایب نیز می‌باشد، ژن خارجی است و قابل توارث نمی‌باشد، محدودیت در اندازه توالی وجود دارد و امکان انتشار ویروس‌های گیاهی اصلاح شده در محیط وجود دارد (۱۷). یکی دیگر از دست‌یابی‌های موفقیت‌آمیز در این زمینه، استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* (Conn) می‌باشد که برای ایجاد آلودگی توسط ویروس کاربرد دارد و بیشتر برای ویروس‌هایی به کار می‌رود که در طبیعت به روش مکانیکی منتقل نمی‌شوند (۱۸). ویروس‌های گیاهی که ژنوم آن‌ها شامل دی.ان.ا. هستند، اولین وکتورهای ویروسی گیاهی می‌باشند که کاربرد پیدا کردند. ویروس

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

از یک سلول به سلول دیگر را نخواهد نداشت. بنابراین پروتئین نوترکیب، تنها در بخشی از گیاه که وکتور در آن وارد شده بیان می‌شود. مزایایی که برای وکتور مطرح شده، بازده تولیدی بالاتر از وکتورهای نسل اول، حفظ سائز توالی هدف و عدم گسترش ناخواسته ویروس به محیط می‌باشد (۲۲).

انتخاب گونه گیاهی

برای دستیابی به موفقیت در برنامه کشاورزی مولکولی، انتخاب گیاه میزبان مهم می‌باشد. مطالعات اولیه با استفاده از گیاه توتون و سیب‌زمینی بود، اما در حال حاضر، طیف وسیعی از گیاهان شامل گوجه‌فرنگی، موز، ذرت، کاهو، سویا، برنج و گندم، برای تولید محصولات نوترکیب استفاده می‌شود (۱۰). در جدول ۳ تعدادی از این محصولات گیاهی، آورده شده است.

پروتئین‌های خود، وکتور و ترانسژن می‌پردازد. در این حین، پس از سنتز پروتئین، ویروس مجدداً خود را سرهم‌بندی می‌کند و وارد سلول بعدی می‌شود. این امر منجر به آلوده‌سازی تمام سلول‌های گیاهی با ترانس‌ژن، وکتور می‌شود. محدودیتی که برای این وکتور مطرح شده، سائز پروتئین می‌باشد (بیشتر از ۳۰ KDa ضعیف بیان می‌شود) (۲۲).

وکتورهای واسازی شده (vectors) (Deconstructed)

در این روش، بخشی از ژنوم ویروس به‌عنوان حامل ترانس‌ژن استفاده می‌شود. به این صورت که ترانسژن در ناحیه کد کننده کپسید ژنوم ویروسی قرار داده می‌شود. از این رو پس از ورود وکتور به سلول گیاهی و سنتز پروتئین، امکان سرهم‌بندی ویروس وجود ندارد. در نتیجه ویروس قابلیت انتقال

جدول ۳- برخی از گونه‌های گیاهی، مزایا و معایب آن‌ها

شماره گیاه	مزایا	معایب	منبع
۱	توتون و گونه‌های آن محصول غیر خوراکی - سهولت در انتقال ژن و بیان	تجمع آکالوئید و محتوای فنولی بالا	(۲۶)
۳	فاقد متابولیت‌های ثانویه	سریع فاسد می‌شود.	(۲۷)
۵	ذخیره به مدت طولانی	واسرشت سازی پروتئین در اثر پخت و پز	""""

کیفیت پروتئین‌های تولید شده در گیاهان

لازم است ایمنی ذاتی پروتئین‌های انسانی تولید شده از طریق گیاهان، مورد تایید قرار گیرد، زیرا صحت ساختاری این پروتئین‌ها برای فعالیت‌های درون سلولی بسیار مهم می‌باشد (۲۳). مسیر سنتز پروتئین در حیوانات و گیاهان مشابه می‌باشد، به طوری که گیاهان قابلیت سرهم کردن و بسته‌بندی پروتئین‌های نوترکیب انسانی را دارا هستند. اما تغییرات پس از ترجمه مقداری متفاوت می‌باشد که عمده این تفاوت‌ها در ساختار گلیکان می‌باشد. پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان، معمولاً دارای گروه‌های کربوهیدرات α -(1-3) Xylose، β -(1-2) Fucose می‌باشند که این نوع زنجیره‌های قندی در پستانداران وجود ندارد. همچنین پروتئین‌هایی گیاهی، فاقد گالاکتوز و اسید سالیسیلیک انتهایی می‌باشند که به طور طبیعی در پروتئین‌های انسانی موجود می‌باشند. تفاوت‌های خیلی کوچک در ساختارهای گلیکان می‌تواند بر فعالیت و پایداری پروتئین تاثیرگذار باشد که اگر به شکل صحیح گلیکوزیله نشود، بعد از مصرف می‌تواند به صورت ایمونوژنیک عمل کند و اثرات مخرب داشته باشد (۲۴). راهکار مناسب،

دستکاری مسیر گلیکوزیلاسیون و جلوگیری از اضافه شدن گلیکان به پروتئین‌های دارویی می‌باشد و ذخیره پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، که از طریق افزودن سیگنال KDEL به انتهای کربوکسی ژن و همچنین افزودن برخی گروه‌های کربوهیدراتی دارای اسید سالیسیلیک، که امکان افزودن آن در شرایط درون سلولی سخت می‌باشد (۲۵).

افزایش میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان

برای بالا بردن عملکرد پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان می‌توان از روش‌های زیر استفاده کرد:

۱- انتخاب پروموتور: انتخاب پروموتور یک فاکتور مهم در بهینه‌سازی میزان بیان ترانس ژن می‌باشد، زیرا یک پروموتور قوی مانند پروموتور 35S و ویروس موزائیک گل کلم، باعث افزایش بیان ژن می‌شود.

الف- پروموتور تنظیمی: محدودسازی پروتئین نوترکیب در بذر، از خطراتی مثل اینکه حشرات و میکروارگانیسم‌ها تحت تاثیر پروتئین‌های نوترکیب از سایر بخش‌های دیگر گیاه قرار بگیرند، می‌کاهد (۲۸).

ب- پروموتور القایی: بیان پروتئین فقط بعد از برداشت محصول توسط القای

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

شیمیایی، فیزیکی و محرک‌های خارجی مثل نور و دمای محیط انجام می‌گیرد (۲۸).

۲- هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به بافت مشخص

بعد از ترجمه، پروتئین ساخته شده جهت داشتن بهترین عملکرد، دچار تغییرات ساختمانی می‌شود. پروتئین‌های ترشح شده به سیتوزول معمولاً ناپایدارند، زیرا توسط پروتئازهای سیتوزولی تخریب می‌شوند. از سوی دیگر برای گلیکولیزاسیون و ایجاد پیوند دی‌سولفیدی که برای عملکردی شدن پروتئین سنتز شده ضروری هستند، باید به شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی وارد شوند. شبکه آندوپلاسمی یک محیط اکسید کننده و غنی از پروتئین‌های چاپرونی می‌باشد که میزان پروتئازها در آن پایین است. برای ورود پروتئین در این مسیر، پروتئین نیازمند داشتن سیگنال پپتیدی مانند KDEL/HDEL می‌باشد که این توالی به انتهای کربوکسی پروتئین نوترکیب افزوده شده، در نتیجه پروتئین وارد شبکه آندوپلاسمی شده و از سلول خارج نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

در حال حاضر، جهان با جمعیتی حدود بیش از ۴/۶ میلیارد، اکثریت افراد نیازمند

راه‌حل مقرون به‌صرفه برای بهداشت و سلامت می‌باشند. واکسن‌های خوراکی دارای پتانسیل بالقوه به‌خصوص در کشورهای جهان سوم می‌باشند که در آن‌ها هزینه‌های حمل و نقل و خنک‌کننده‌ها ضعیف می‌باشد و توزیع واکسن نیاز به پرنسل و شرایط تزریقی استریل دارد. در این صورت واکسن‌های خوراکی ممکن است بر مشکلات تولیدی، توزیع و تحویل که در ارتباط با واکسن‌های سنتی است، غلبه کنند (۱۲). پیشرفت در مهندسی ژنتیک در گیاهان، فرصت جدیدی در کاربرد گیاهان به عنوان بیوراکتور برای تولید آنتی‌ژن‌های واکسنی ایمن، موثر و مقرون به‌صرفه ایجاد کرده است (۱). از این‌رو جامعه پزشکی تمایل زیادی به تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی در گیاهان تراریخته نشان می‌دهد. برخی مشکلات قبل از اینکه واکسن‌های خوراکی به واقعیت تبدیل شود، باید برطرف شوند که به شرح زیر است:

۱- استراتژی‌هایی برای بهبود عملکرد پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ارائه شده که شامل انتخاب پروموتور اختصاصی بافت گیاهی هدف، توالی سیگنالی‌گه پروتئین هدف در بخش داخل سلولی تجمع پیدا کند،

۴- مقاومت دهانی به آنتی‌ژن‌هایی که به صورت خوراکی مصرف می‌شوند، منجر به حساسیت‌های فوق‌العاده‌ای در سیستم حیوانات شده است که در نتیجه‌ی سرکوب سیستم ایمنی سیستمیک می‌باشد. مقاومت دهانی به غلظت و نوع آنتی‌ژن بستگی دارد. بنابراین لازم است مقدار آنتی‌ژنی که از طریق خوردن مواد گیاهی به بدن می‌رسد، کم‌تر از مقداری باشد که مقاومت دهانی را القا کند.

۵- سیگنال‌های شبکه آندوپلاسمی برای ترشح پروتئین‌های بیولوژیکی فعال در محیط کشت استفاده می‌شود که عاری از آلودگی عوامل بیماری‌زا است. همچنین ترشحات ریشه‌های موئی عاری از رنگ‌دانه‌ها و تانن‌ها می‌باشد.

۶- مسائلی مربوط به ایمنی زیست محیطی، اخلاقی و اجتماعی که به طور مستقیم و غیرمستقیم بر محصولات تراریخته تاثیرگذار می‌باشند. بنابراین لازم است استانداردهای و عملیات نظارتی صورت بگیرد (۱).

تغییرات پس از ترجمه و ... که باعث افزایش تجمع پروتئین می‌شود، مورد توجه قرار گیرد.

۲- میوه‌های تراریخته یا بافت برگی ممکن است عمر کوتاهی داشته باشند، یا نیازمند استخراج و فرآیند خالص‌سازی آنتی‌ژن قرار بگیرند. در این صورت بیان در دانه، غلات و حبوبات، هم تا خوردگی صحیح پروتئین را به دلیل حضور چاپرون‌ها و دی‌سولفید ایزومرها سبب می‌شود و هم این اجازه را می‌دهد که برای مدت طولانی ذخیره شوند و باعث رهایی از وابستگی به ذخیره‌سازی در زنجیره سرمادهی می‌باشد.

۳- بیان پروتئین نو ترکیب باید طوری تنظیم شود که از ورود ناخواسته ژن تراریخته به سایر گونه‌های گیاهی یا زنجیره غذایی مصرف‌کننده‌ها جلوگیری کند. البته مهارکننده‌های فیزیکی در محصولات تراریخته مثل انتقال به ژن کلروپلاست، تکثیر رویشی، مهار گرده‌افشانی و استراتژی‌های ساده و طبیعی، در حبوبات و دانه غلات، از ورود ژن تراریخته جلوگیری می‌کند.

References

1. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, and Tuli R. 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances* 27(4):449-467.

فهرست منابع

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

2. Daniell H, Streatfield SJ, and Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* 6(5): 219-226.
3. Rogan D, and Babiuk L. 2005. Novel vaccines from biotechnology. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 24(1): 159.
4. Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 32(2):107-121.
5. Yusibov VM, and Mamedov TG. 2010. Plants as an alternative system for expression of vaccine antigens. *Proceedings of ANAS* (65):195-200.
6. Rai M, Padh H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science-Bangalore* 80(9):1121-1128.
7. Houdebine LM. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research* 9(4-5): 305-320.
8. Fischer R, and Emans N. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9(4-5):279-299.
9. Horn M, Woodard S, and Howard J. 2004. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports* 22(10):711-720.
10. Sala F, Rigano MM, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, and Castiglione S. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21(7):803-808.
11. Koprowski H, and Yusibov V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19(17):2735-2741.
12. Mishra N, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, and Vyas S. P.2008. Edible vaccines: A new approach to oral immunization. *Indian Journal of Biotechnology* 7:283-294.
13. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, and Arntzen CJ. 2000. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *Infection Diseases* 182(1):302-305.
14. Yusibov V, Hooper D, Spitsin S, Fleysh N, Kean R, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, and Randall J. 2002. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20(25): 3155-3164.
15. Canizares MC, Lomonsoff GP, and Nicholson L. 2005. Development of *Cowpea mosaic virus* based vectors for the production of vaccine in plants. *Expert Review of Vaccines* 4(5):687-697.
16. Yoshida K, Matsui T, and Shinmyo A. 2004. The plant vesicular transport engineering for production of useful recombinant proteins. *Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28(4): 167-171.
17. Mendoza S. 2014. *Genetically Engineered Plants as a Source of Vaccines against Wide Spread Diseases*. Springer.

18. Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, and Chen Q. 2013. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *Visualized Experiments* 77: 50521
19. Mortimer CL, Dugdale B, and Dale JL. 2015. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 85-92.
20. Hefferon KL. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* 433(1):1-6.
21. Hefferon K. 2014. Plant virus expression vector development: new perspectives. *BioMed Research International*. 1-6.
22. Gleba Y, Marillonnet S, and Klimyuk V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the full virus and the deconstructed virus strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 7(2): 182-188.
23. Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, and Steinkellner H. 2004. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking β 1, 2-linked xylose and core α 1, 3-linked fucose. *EBS letters* 561 (1-3): 132-136.
24. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, and Christpu P, Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21(12): 570-578.
25. Warner TG, Ernst B., Hart GW, and Sinay P. 2000. Metabolic engineering glycosylation: biotechnology's challenge to the glycobiologist in the next millennium. *Carbohydrates in Chemistry and Biology* 21(12):570-578.
26. Makhzoum A, Benyammi R, Moustafa K, and Tremouillaux-Guiller J. 2014. Recent advances on host plants and expression cassettes' structure and function in plant molecular pharming. *Bio Drugs* 28(2): 145-159.
27. Commandeur U, Twyman RM, and Fischer R. 2003. The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet* 5:1-9.
28. Zuo J, and Chua NH. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology* 11(2): 146-151.

"زائر و کولیوند، کاربرد ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل برای تولید واکسن‌های خوراکی در گیاه"

Application of Plant Viruses as Vectors for the Production of Edible Vaccines in Plants

Zahra Zaer¹ and Davoud Koolivand^{2*}

1- MSc Student of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

2- Assistant Professor of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

koolivand@znu.ac.ir

Abstract

Infectious diseases account for more than 45% of total deaths in developing countries. Vaccination is the most effective means to prevent infectious diseases but current vaccine production methods are complex and expensive in technology. Such conditions make it impossible for a large part of the developing and poor countries to have access to vaccination. New strategies for producing vaccine subunits include the use of different systems, such as fermentation, bacteria and mammalian cells. But these systems have limitations, including development costs, Transportation and cooling systems, making them impractical. For this purpose, plant - derived vaccines are considered as a new perspective on the production of vaccines. In this method, small fragments of DNA encoding the epitope or antigen to be linked to the coat protein gene of the plant viruses. Then the recombinant virus is used to infect the plants. In this way, a wide range of plants have been used to produce vaccines against diseases. In this article, we describe the methods of producing oral vaccine using transgenic plants and the advantages and disadvantages of this technology.

Keywords: Edible vaccines, Oral immunization, plant viruses, transgenic plants.