

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

در حال حاضر بیش از ۴۵ درصد مرگ و میر افراد در کشورهای در حال توسعه، ناشی از بیماری‌های واگیردار است. مهمترین راهکارها جهت جلوگیری از این بیماری‌ها، واکسیناسیون افراد است. اما هنوز هم بیش از ۳۰ میلیون کودک در دنیا در برابر این بیماری‌های قابل پیشگیری و درمان، ایمن‌سازی نشده‌اند. زیرا روش‌های کنونی تولید واکسن از نظر فناوری پیچیده و در نتیجه گران هستند. چنین شرایطی موجب می‌شود که بخش بزرگی از کشورهای در حال توسعه و فقیر، به واکسیناسیون دسترسی نداشته باشند (۱). پیشرفت در روش‌های زیست‌شناسی مولکولی در دهه‌ی ۱۹۸۰، به توسعه راهکارهای جدید برای تولید زیرواحدهای واکسن کمک کرد. این روش‌ها شامل استفاده از سیستم‌های مختلف مانند، فرمانتاسیون باکتری‌ها و سلول‌های پستانداران برای بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد (۲). لازم به ذکر است که در حال حاضر، واکسن‌های در دسترس دارای محدودیت‌هایی می‌باشند از جمله هزینه‌های توسعه، حمل و نقل، سیستم‌های خنک‌سازی و خطر در ارتباط با شرایط تزریقی و پاسخ آلرژیک در افراد

می‌باشد که آن را غیرعملی می‌سازد. به نظر می‌رسد که در حال حاضر سنتز آنتی‌ژن اپی‌توپ‌های واکسنی نوترکیب در گیاهان، ایده‌ی نویدبخشی برای مشکلات در ارتباط با واکسیناسیون است. به این منظور، در این مطالعه واکسن‌های خوراکی مشتق شده از گیاهان، به‌عنوان دیدگاه جدید برای تولید واکسن بررسی می‌شود. همچنین برخی از جنبه‌های روش‌های کلاسیک و مدرن بررسی خواهد شد. علاوه بر این، ویروس‌های گیاهی به‌طور بالقوه، به‌عنوان وکتور برای انتقال ژن به سیستم گیاهی و بیان پروتئین به‌منظور تولید واکسن‌های خوراکی بحث خواهد شد.

روش‌های کلاسیک تولید واکسن

مهندسی ژنتیک در باکتری‌ها، مخمرها و سلول‌های پستانداران و حشرات، گزینه‌های خوبی برای تولید زیرواحدهای واکسن به‌صورت تجاری می‌باشند که تاکنون برای تولید انواع مختلف واکسن توسعه یافته‌اند (۳). سیستم‌های بیانی که جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب از سلول‌های پستانداران استفاده می‌کنند، فرآورده‌هایی را به‌وجود می‌آورند که به‌طور کامل، مشابه با آن‌هایی است که به‌طور طبیعی در بدن انسان تولید

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

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 با کلوویروس‌ها (*Baculovirus*) پیشنهاد شده که

در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی، دارای مزایایی مانند سهولت در کشت، ظرفیت بالا برای سطح بیانی هدف موردنظر 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

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	تحويل دهانی، خوراکی	جهت حفاظت واکسن در برابر تخریب شدن، تعدادی حامل جهت سالم رساندن آن‌ها به روده طراحی شده است مانند بسته‌های زیستی (لیپوزم‌ها)، میکروارگانیسم‌های 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	""

ویروس‌های گیاهی به عنوان وکتور برای

انتقال اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی

استفاده از ویروس‌های گیاهی اصلاح شده

به عنوان حامل، به طور بالقوه یک سیستم ایمن

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

شده باشد، می توان قطعات کوچک تری از دی.ان.ا کد کننده اپی توپ را به ژن کدکننده پروتئین پوششی (coat protein) ویروس گیاهی متصل کرد. سپس این ویروس نو ترکیب حامل، جهت آلوده سازی گیاهان به کار گرفته می شود. یکی از جنبه های مهم در هنگام طراحی یک وکتور ویروسی اصلاح شده، این است که ویروس توانایی سرهم کردن خود را داشته باشد و به طور کامل بتواند گیاه آلوده کند و امکان درج پپتید یا اپی توپ ژن خارجی را در پروتئین ویروسی دارا باشد (۱۶). اما این سیستم دارای برخی معایب نیز می باشد، ژن خارجی است و قابل توارث نمی باشد، محدودیت در اندازه توالی وجود دارد و امکان انتشار ویروس های گیاهی اصلاح شده در محیط وجود دارد (۱۷). یکی دیگر از دستیابی های موفقیت آمیز در این زمینه، استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* (Conn) می باشد که برای ایجاد آلودگی توسط ویروس کاربرد دارد و بیشتر برای ویروس هایی به کار می رود که در طبیعت به روش مکانیکی منتقل نمی شوند (۱۸). ویروس های گیاهی که ژنوم آنها شامل دی.ان.ا هستند، اولین وکتورهای ویروسی گیاهی می باشند که کاربرد پیدا کردند. ویروس

موزائیک گل کلم *Cauliflower mosaic virus* (CAMV)، با ژنوم دی.ان.ا دو رشته ای (dsDNA) می باشد که برای بیان دو ژن *Dihydrofolate Reductase* خارجی (DHFR) و *metallothionein II* کاربرد پیدا کرد. به دنبال آن ویروس های گیاهی دارای ژنوم آر.ان.ا تک رشته ای (ssRNA)، به عنوان حامل برای تحویل ژن خارجی به سلول های گیاهی نقش پیدا کردند (۱۹). در میان وکتورهای ویروسی، پرکاربردترین آنها: *Potato virus mosaic virus*، *Tobacco Alfafa mosaic virus*، *Cowpea mosaic virus* و *Plum Pox virus* می باشد (۲۰). علاوه بر این وکتورهای ویروسی دارای ژنوم دی.ان.ا تک رشته ای حلقوی *Circular ssDNA* از خانواده *Geminiviridae* نیز گسترش یافته اند (۲۱).

انواع وکتورهای بیانی

وکتورهای ویروسی کامل (complete viral vector)

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

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

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 ترانس ژن، وکتور می‌شود. محدودیتی که برای این وکتور مطرح شده، سایز پروتئین می‌باشد (بیشتر از ۳۰KDa ضعیف بیان می‌شود) (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 نو ترکیب استفاده می‌شود (۱۰). در جدول ۳ تعدادی از این محصولات گیاهی، آورده شده است.

وکتورهای واسازی شده (Deconstructed vectors)

در این روش، بخشی از ژنوم ویروس به عنوان حامل ترانس ژن 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 آلکالوئید و محتوای فنولی بالا	(۲۶)
۳	کاهو	فاقد متابولیت‌های ثانویه	سریع فاسد می‌شود.	(۲۷)
۵	سیب زمینی	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 Xylose β -(1-2)، α -(1-3) و 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 ترانس ژن می‌باشد، زیرا یک پروموتور قوی مانند پروموتور 35S 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 سستی 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 سیگنالی گه پروتئین هدف در بخش داخل سلولی تجمع پیدا کند،

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

۲- میوه های تراریخته یا بافت برگی ممکن است عمر کوتاهی داشته باشند، یا نیازمند استخراج و فرآیند خالص سازی آنتی ژن قرار بگیرند. در این صورت بیان در دانه، غلات و حبوبات، هم تاخوردگی صحیح پروتئین را به دلیل حضور چاپرون ها و دی سولفید ایزومرها سبب می شود و هم این اجازه را می دهد که برای مدت طولانی ذخیره شوند و باعث رهایی از وابستگی به ذخیره سازی در زنجیره سرمادهی می باشد.

۳- بیان پروتئین نو ترکیب باید طوری تنظیم شود که از ورود ناخواسته ژن تراریخته به سایر گونه های گیاهی یا زنجیره غذایی مصرف کننده ها جلوگیری کند. البته مهارکننده های فیزیکی در محصولات تراریخته مثل انتقال به ژن کلروپلاست، تکثیر رویشی، مهار گرده افشانی و استراتژی های ساده و طبیعی، در حبوبات و دانه غلات، از ورود ژن تراریخته جلوگیری می کند.

۴- مقاومت دهانی به آنتی ژن هایی که به صورت خوراکی مصرف می شوند، منجر به حساسیت های فوق العاده ای در سیستم حیوانات شده است که در نتیجه ی سرکوب سیستم ایمنی سیستمیک می باشد. مقاومت دهانی به غلظت و نوع آنتی ژن بستگی دارد. بنابراین لازم است مقدار آنتی ژنی که از طریق خوردن مواد گیاهی به بدن می رسد، کم تر از مقداری باشد که مقاومت دهانی را القا کند.

۵- سیگنال های شبکه آندوپلاسمی برای ترشح پروتئین های بیولوژیکی فعال در محیط کشت استفاده می شود که عاری از آلودگی عوامل بیماری زا است. همچنین ترشحات ریشه های موئی عاری از رنگ دانه ها و تانن ها می باشد.

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

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, Lomonossoff 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.