مکانیسم‌های افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست گیاهان

Mechanisms to Increase the Production of Recombinant Proteins in Plant Chloroplasts

مختار جلالی‌جوران[۱*]، مژگان سلیمانی‌زاده[۲]، بابک لطیف[۳]، شهلا رزمی[۴] و ملینا یاربخت[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۸/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۰۹

چکیده

تولید پروتئین‌های ارزشمند داروئی و مهم کاربردی در حجم انبوه و ارزان از طریق گیاهان، زراعت مولکولی نام دارد. زراعت مولکولی و تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت کلروپلاستی در ایران با موفقیت‌های ارزشمندی همراه بوده است که تولید پروتئین‌های داروئی انسولین، اینترفرون گاما، فعال کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی و ... نمونه‌هایی از این موفقیت‌ها می‌باشند. به‌دلیل نیاز روز افزون به پروتئین‌های نوترکیب، انتخاب یک سیستم بیانی مناسب برای تولید آن‌ها حائز اهمیت است. مهندسی ژنوم کلروپلاست به دلیل داشتن مزایای بسیار، یکی از روش‌های مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. به منظور دستیابی به سطوح بالای پروتئین‌های نوترکیب در اندامک کلروپلاست بایستی با توجه به سیستم رونویسی، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه در این اندامک به نحوی کارآمد از پتانسیل‌های بیانی آن بهره گرفت. از جمله راه‌کارهای افزایش میزان پروتئین خارجی در کلروپلاست می‌توان به درج ژن در محل مناسب در ژنوم کلروپلاست، استفاده از راه‌انداز قوی، استفاده از توالی‌های تنظیمی مناسب در انتهای ′۵ و ′۳ ژن‌های ورودی، بهینه‌سازی کدونی و استفاده از عوامل افزایش‌دهنده پایداری پروتئین نظیر چاپرون‌ها و پروتئین‌های فیوژن اشاره کرد. بر اساس یافته‌های اخیر در زمینه تولید پروتئین‌های نوترکیب و زراعت مولکولی، در این مقاله تلاش گردیده تا ضمن معرفی مختصر کلروپلاست و ژنوم آن، مکانیسم‌های افزایش میزان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت کلروپلاستی مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پایداری پروتئین، زراعت مولکولی، مکانیسم افزایش بیان پروتئین نوترکیب، مهندسی ژنوم کلروپلاست

---

۱. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳ و ۴. دانشجویان دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۵. دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: نویسنده مسوول Email: jalali.mokhtar@gmail.com

مقدمه

استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب در گیاهان، در اواخر دهه‌ی ۸۰ میلادی، منجر به ابداع سیستم‌های بیان گیاهی شد که ظرفیت تولید ارزان‌تر و ایمن‌تر پروتئین‌های دارویی را نسبت به سایر سیستم‌های بیانی دارا می‌باشد *شیلبرگ* و همکاران (Schillberg *et al.*, 1999). زراعت مولکولی به معنای استفاده از گیاهان جهت تولید پروتئین‌های ارزشمند است که دارای پتانسیل بالایی در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب شامل آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های دارویی می‌باشد *جلالی جواران* و همکاران (Jalali Javaran *et al.*, 2010). از روش‌های دیگر تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بیان آن‌ها در کلروپلاست می‌باشد *دانیل* و همکاران (Daniell *et al.*, 2001). گیاهان با ژنوم پلاستیدی تراریخت، ترانس پلاستومیک نامیده می‌شوند *مالیگا* (Maliga, 1993). مهندسی ژنوم کلروپلاستی یک استراتژی برای ورود ژن‌های خارجی به داخل ژنوم کلروپلاست، به‌جای ورود به ژنوم هسته می‌باشد *ریکوا* (Řepková, 2010). انتقال ژن به کلروپلاست دارای مزایای متعددی است. تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده به گیاهان تراریخت کلروپلاستی می‌تواند زیاد باشد، چون در هر کلروپلاست تعداد زیادی نسخه از ژنوم و در هر سلول تعداد زیادی کلروپلاست ($۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۸}$ کلروپلاست در هر سلول فتوسنتزکننده) وجود دارد. هیچ‌گونه خاموشی ژن در این سیستم وجود ندارد و چندین ژن را می‌توان به صورت همزمان در یک اپرون بیان کرد. علاوه‌بر این پروتئین‌های نوترکیب در داخل کلروپلاست می‌توانند تجمع پیدا کنند و تجمع بالای آن‌ها در گیاه میزبان سمیت ایجاد نمی‌کند. عدم حضور DNA کلروپلاستی در دانه گرده در اکثر گیاهان باعث جلوگیری از جریان افقی ژن و فرار ژن می‌شود *دانیل* (2002). کلروپلاست‌ها می‌توانند پروتئین‌های یوکاریوتی را پردازش کنند. پروتئین‌های چاپرونی موجود در کلروپلاست نقش فعالی در سرهم کردن پروتئین‌های خارجی بیان شده در کلروپلاست دارند. بدین ترتیب بسته‌بندی و تاخوردن صحیح پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست باعث حذف شدن مرحله پردازش خارج سلولی پروتئین‌های دارویی می‌شود که بخش بزرگی از هزینه تولید را به خود اختصاص می‌دهد دانیل و همکاران (۲۰۰۱). تراریختی کلروپلاست برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ در جلبک تک‌سلولی (*Chlamydomonas reinhardtii*) انجام شد و به دنبال آن در سال ۱۹۹۰ تراریختی ژنوم پلاستیدی در توتون در آزمایشگاه *اسواب* و همکاران (Svab *et al.*, 1990) انجام گرفت .

تراریختی کلروپلاست پس از توتون در مورد سایر گیاهان خانواده *Solanaceae* نظیر سیب‌زمینی و گوجه فرنگی نیز انجام شد *اسواب* و همکاران (1990). تراریختی پلاستیدی در *Arabidopsis thaliana* چندان موفقیت آمیز نبوده و به نظر می‌رسد احتمالاً ناشی از حجم کم DNA وارد شده به این گیاه باشد *سیکدار* و همکاران (Sikdar *et al.*, 1998). این نوع تراریختی در مورد گیاه تجاری کلزا که از بستگان نزدیک آرابیدوپسیس می‌باشد، بارها انجام شده است *هو* و همکاران (Hou *et al.*, 2003). موفقیت‌های بسیاری نیز جهت تراریختی کلروپلاست برنج در سلول‌های جنین‌زا به‌دست آمده است *خان و مالیگا* (Khan and Maliga, 1999). تراریختی پلاستید در سویا نیز موفقیت‌آمیز بوده است *دفورمنتل* و همکاران (Dufourmantel *et al.*, 2007). در جدول ۱، به تعدادی از گونه‌های تراریخت کلروپلاستی اشاره شده است.

در سال‌های اخیر بیش از ۵۰ پروتئین نوترکیب مختلف (دارویی، آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها، پلیمرهای زیستی، آمینواسیدها، آنزیم‌های صنعتی و ...) در کلروپلاست گیاهان بیان شده است *اسکوتی* و همکاران (Scotti *et al.*, 2011). پروتئین‌های دارویی نوترکیب تولید شده در کلروپلاست شامل انسولین *یاربخت* و همکاران (Yarbakht *et al.*, 2012)، اینترفرون گامای انسانی *رزمی* و همکاران (Razmi *et al.*, 2013)، فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی *عبدلی نسب* و همکاران (Abdoli-Nasab *et al.*, 2013) و ... می‌باشند. در جدول ۲ به تعدادی از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در کلروپلاست در طی سال‌های اخیر اشاره شده است.

سطوح بیان پروتئین در کلروپلاست‌ها بستگی شدید به توانایی نوع راه‌انداز و پایداری mRNA دارد. افزایش سطح رونویسی الزاماً منجر به تجمع بالای پروتئین نمی‌گردد *ورما و دانیل* (Verma and Daniell, 2007). پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئازهای کلروپلاستی حساس بوده و نیاز به محافظت در برابر پروتئازهای کلروپلاست دارند. استراتژی‌های اتخاذ شده برای افزایش میزان پروتئین در کلروپلاست بر روی فرآیندهای پس از رونویسی نیز تمرکز دارند و دلیل آن عدم همبستگی بین افزایش سطح رونویسی و افزایش سطح تجمع پروتئین نوترکیب است *اوبمب* و همکاران (Obembe *et al.*, 2010). با توجه به مزیت‌های مهندسی ژنوم کلروپلاستی، در این مقاله ضمن معرفی مختصر ژنوم کلروپلاست و نحوه‌ی بیان ژن‌ها در این اندامک، مکانیسم‌های افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت کلروپلاستی نیز مورد بحث و بررسی قرار خواهد گرفت.

جدول ۱: گیاهان تراریخت کلروپلاستی (ترانس‌پلاستومیک)
Table 1: Chloroplast transgenice plants (transplastomic)

گونه Species	ناحیه‌ی درج ژن Gene insertion region	روش انتقال ژن Gene transfer method	منبع Reference
آرابیدوپسیس (Arabidopsis thaliana)	*trn*V/3´*rps*12/	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Sikdar *et al.*, 1998
سیب‌زمینی (Potato)	*trn*V/3´*rps*12/7	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Sidorov *et al.*, 1999
گوجه‌فرنگی (Tomato)	*trn*fM/*trn*G	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Ruf *et al.*, 2001
کلزا (Oilseed rape)	*rps*7/*ndh*B	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Hou *et al.*, 2003
هویج (Carrot)	*trn*I/*trn*A	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Kumar *et al.*, 2004
اطلسی (Petunia)	*trn*I/*trn*A	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Zubkot *et al.*, 2004
سویا (Soybean)	*accD/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Dufourmantel *et al.*, 2005
سیب‌زمینی (Potato)	*trnV/3´rps12/7*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Nguyen *et al.*, 2005
کاهو (Lettuce)	*accD/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Kanamoto *et al.*, 2006
گل‌کلم (Cauliflower)	*accD/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Nugent *et al.*, 2006
برنج (Rice)	*accD/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Lee *et al.*, 2006
سپیدار (Poplar)	*trnI/trnA*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Okumura *et al.*, 2006
سویا (Soybean)	*accD/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Dufourmantel *et al.*, 2007
کلم (Cabbage)	*trnV/3´rps12/7*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Liu *et al.*, 2007
چغندرقند (Sugar beet)	*trnV/rrn23S*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	De Marchis *et al.*, 2009
کاهو (Lettuce)	*rrn16/rps12*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Ruhlman *et al.*, 2010
گندم (Wheat)	*trnI/trnA*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	Cui *et al.*, 2011
توتون (Tobacco)	*atpB/rbcL*	بمباران ذره‌ای (Particle bombardment)	AbdoliNasab *et al.*, 2011

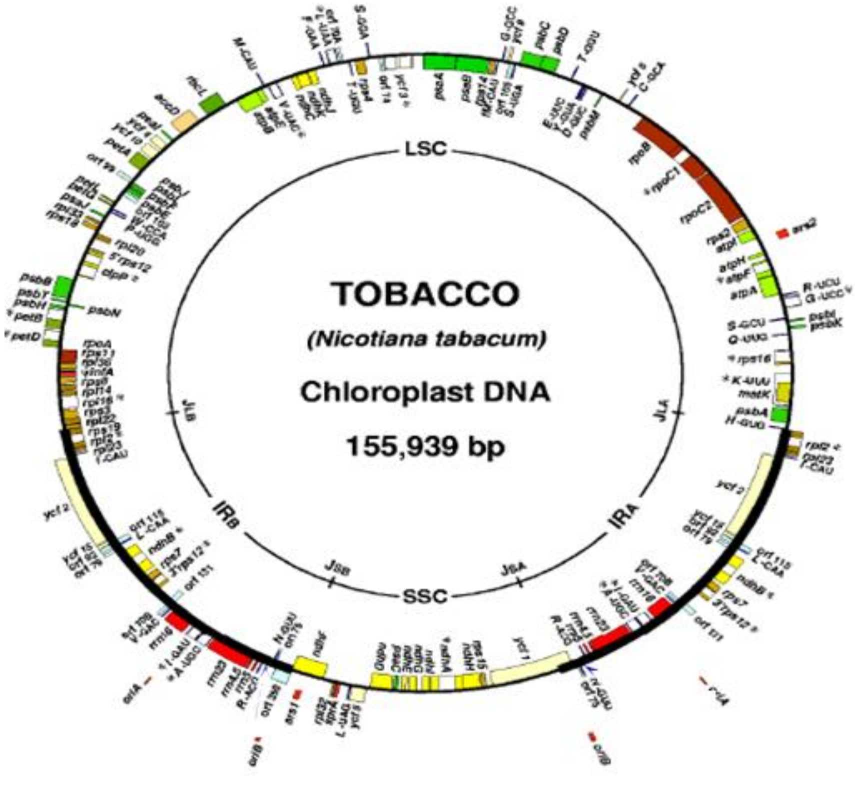
جدول ۲: پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در کلروپلاست
Table 2: Recombinant proteins expressed in chloroplasts

پروتئین Protein	گونه Species	درصد بیان (TSP) Expression percent	منبع Reference
آپروتینین (Aprotinin)	توتون (Tobacco)	0.5%	Tissot *et al.*, 2008
کاردیوتروپین-۱ (Cardiotrophin-1)	توتون (Tobacco)	4.8%	Farran *et al.*, 2008
فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin like growth factor-1)	توتون (Tobacco)	32.7%	Daniell *et al.*, 2009
اندولیزین (Endolysin PlyGBS)	توتون (Tobacco)	70%	Oey *et al.*, 2009a
اندولیزین (Endolysin Pal)	توتون (Tobacco)	30%	Oey *et al.*, 2009b
پروتگرین- ۱-پروتئین فلورسنت سبز (Protegrin-1-GFP)	توتون (Tobacco)	26%	Lee *et al.*, 2011
رتروسایکلین (Retrocyclin-101-GFP)	توتون (Tobacco)	38%	Lee *et al.*, 2012
اندولیزین (Endolysin Cpl-1)	توتون (Tobacco)	10%	Oey *et al.*, 2009b
تیرودوکسین ۱ (Thioredoxin 1)	کاهو (Lettuce)	1%	Lim *et al.*, 2011
اینترفرون گامای انسانی (Hu-IFN-γ)	توتون (Tobacco)	0.2%	Razmi *et al.*, 2013
انسولین (Insulin)	توتون (Tobacco)	0.2%	Yarbakht *et al.*, 2012

ساختار ژنوم کلروپلاستی و انواع ژن‌های آن

در گیاهان عالی ژنوم کلروپلاستی (پلاستوم یا ptDNA) متشکل از یک مولکول DNA دو رشته‌ای حلقوی است. اگرچه به‌دلیل روش‌های همانندسازی پلاستوم، ازجمله روش حلقه غلتان، مولکول‌های خطی الیگومری متشکل از واحدهای یکسان پایه ژنوم پلاستیدی نیز در این اندامک‌ها مشاهده می‌گردد بوک (Bock, 2007b). اندازه ژنوم کلروپلاستی به‌طور متوسط بین ۱۲۰-۱۶۰ kb می‌باشد، اگرچه استثنائاتی نیز

وجود دارد. به‌طور مثال در گونه‌ی گیاهی *Pelargonium*، اندازه ژنوم کلروپلاستی ۲۱۷ kb می‌باشد *چاملی* و همکاران (Chumley *et al.*, 2006). در هر گونه، نسخه‌های یکسانی از این ژنوم در همه‌ی انواع پلاستیدها وجود دارد *بوک* (2007). با وجود اندازه کوچک ژنوم کلروپلاستی، به‌علت حضور تعداد زیاد نسخه‌ها، DNA کلروپلاستی می‌تواند درصد زیادی از DNA کل سلولی را تشکیل دهد *تواری و وایلدمن* (Tewari and Wildman, 1966). در مقایسه با هسته‌ی یک گیاه دیپلوئید که برای هر ژن دو نسخه دارد، در ژنوم کلروپلاست سطح پلوئیدی بالایی برای هر ژن وجود دارد. بسته به گونه، بافت، مرحله‌ی رشدی و شرایط محیطی تا بیش از ۱۰۰۰۰ نسخه مشخص از ژنوم کلروپلاستی در هر سلول می‌تواند وجود داشته باشد *بندیش* (Bendich, 1987). یک خصوصیت بارز در اکثر گونه‌های گیاهان عالی، وجود یک ناحیه‌ی مضاعف شده‌ی بزرگ (حدود ۲۵ kb) در ژنوم کلروپلاستی است که در خلاف جهت یکدیگر قرار گرفته‌اند. به این نواحی، توالی‌های تکراری معکوس (IR) اطلاق می‌شود *مالیگا* (Maliga, 2004). نواحی تکراری معکوس دارای ژن‌های رمزکننده‌ی متعددی ازجمله ژن‌های rRNA می‌باشند و توسط دو ناحیه تک نسخه‌ای به نام SSC وLSC جدا شده‌اند *زو* (Zou, 2003). ژن‌های رمزشده‌ی پلاستیدی را می‌توان به سه دسته اصلی (ژن‌های سیستم ژنتیکی، ژن‌های وابسته به فتوسنتز و سایر ژن‌ها) تقسیم‌بندی نمود. ژن‌های سیستم ژنتیکی بزرگ‌ترین گروه (۶۲ ژن) از ژن‌های واقع در پلاستوم‌های گیاهان عالی می‌باشند. فرآورده‌ی این ژن‌ها در بیان ژن‌های پلاستیدی (رونویسی، پردازش RNA، ترجمه و تجزیه‌ی پروتئین) نقش دارند. تعدادی از ژن‌های رمز شده پلاستوم (۴۷ ژن در گیاهان نهاندانه) به دستگاه فتوسنتزی اختصاص یافته است *بوک* (2007). در شکل ۱ ژنوم حلقوی کلروپلاست توتون همراه با نواحی تک نسخه‌ای کوچک و بزرگ، توالی‌های تکراری معکوس و انواع ژن‌های آن به تصویر کشیده شده است (*زو* ، 2003).



شکل ۱: ژنوم حلقوی کلروپلاست توتون: SSC (ناحیه تک نسخه‌ای کوچک)، LSC (ناحیه تک نسخه‌ای بزرگ)، IRA و IRB (نواحی تکراری معکوس) *زو* (۲۰۰۳)

Fig. 1: Circular genome of tobacco chloroplast: SSC (Small Single Copy), LSC (Large Single Copy), IR (Inverted Repeat) (Zou, 2003)

رونویسی و ترجمه‌ی ژن‌های کلروپلاستی

کلروپلاست همانند میتوکندری، از باکتری‌های آزادزی اولیه منشأ گرفته است. اجداد پروکاریوتی این اندامک‌های امروزی توسط یک سلول پیش-یوکاریوتی و طی یک رابطه همزیستی بلعیده شده‌اند (نظریه درون همزیستی). با ورود سلول‌های پروکاریوتی به درون میزبان و ایجاد رابطه همزیستی با آن،

متابولیسم هر دو ارگانیسم تغییر یافته و اندازه ژنوم اندامک کاهش قابل‌توجهی را نشان می‌دهد. این کاهش اندازه هم به‌دلیل از دست رفتن مقادیر زیادی از اطلاعات ژنتیکی و هم انتقال بخشی از ژن‌ها به هسته اتفاق افتاده است. به همین دلیل اندامک‌های امروزی دارای ژنوم کوچک و اطلاعات اندک می‌باشند. بنابراین کلروپلاست‌ها به دلیل آن‌که دارای ژنوم اختصاصی هستند، واجد سیستم‌های همانندسازی، رونویسی و ترجمه اختصاصی نیز می‌باشند *بوک* (Bock, 2001) . رونویسی از ژن‌های کلروپلاستی توسط دو نوع RNA پلیمراز صورت می‌گیرد. نوع اول RNA پلیمراز PEP که توسط خود ژنوم کلروپلاستی رمز می‌شود و زیرواحدهای تشکیل‌دهنده‌ی آن مشابه با زیرواحدهای تشکیل‌دهنده‌ی RNA پلیمرازهای باکتریایی می‌باشد. بنابراین راه‌اندازهایی که توسط این RNA پلیمراز شناسایی می‌شوند، مشابه با راه‌اندازهای سیگمای باکتریایی بوده و حاوی نواحی شناسایی ۱۰- و ۳۵- می باشد *ایگلوی و کاسل* (Lgloi and Kössel, 1992). اگرچه شناسایی راه‌انداز توسط RNA پلیمراز PEP، به وجود فاکتورهای شبه‌سیگمایی که از طریق هسته رمز می‌شوند، بستگی دارد *آلیسون* (Allison, 2000). به‌عنوان مثال رونویسی ژن *psbA* (رمزکننده پلی‌پپتید D1 فتوسیستم II) توسط PEP صورت می‌گیرد *بویر و مولت* (Boyer and Mullet, 1986). نوع دیگر RNA پلیمراز کلروپلاستی، RNA پلیمراز NEP می‌باشد که توسط ژن‌های *RpoT* هسته‌ای رمز می‌شود و زیرواحدهای تشکیل‌دهنده‌ی آن مشابه با زیرواحدهای تشکیل‌دهنده‌ی RNA پلیمرازهای فاژی است *لربز-ماچی* (Lerbs-Mache, 1993). کنترل بیان ژن‌های پلاستیدی علاوه‌بر مراحل رونویسی و پردازش RNA، به‌طور معنی‌داری در مرحله ترجمه نیز کنترل می‌شود *مانیول* و همکاران (Manuell *et al.*, 2004). مکانیسم ترجمه در کلروپلاست منشاء پروکاریوتی دارد. ماشین ترجمه در کلروپلاست‌ها دارای چندین خصوصیت باکتریایی، از قبیل ریبوزوم‌های 70S و tRNAهای آغازگر فرمیل‌دار می‌باشد. همچنین، در برخی از ژن‌های پلاستید، توالی معروف به شاین-دالگارنو که برای ترجمه ژن‌های باکتریایی ضروری می‌باشد، گزارش شده است *سوگیورا* و همکاران (Sugiura *et al.*, 1998). آزمایشات نشان می‌دهند که پس از پایان عمل ترجمه، کلروپلاست‌ها قادر به ایجاد ساختار نهایی مطلوب برای فعالیت پروتئین‌های نوترکیب ازجمله تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی می‌باشند *ووزکا* (Warzecha, 2008).

ثبات و پایداری پروتئین در کلروپلاست

در کلروپلاست‌ها بیش از ۲۰۰۰ پروتئین مختلف وجود دارد که یا توسط ژنوم کلروپلاست و یا ژنوم هسته رمزشده و پس از ساخته شدن در سیتوپلاسم، به این اندامک منتقل شده‌اند. پایداری این پروتئین‌ها به تعادل بین سرعت ساخت (یا انتقال) و تجزیه‌ی آن‌ها بستگی دارد. بنابراین فرایند تجزیه‌ی پروتئین در کلروپلاست‌ها اهمیت به سزایی دارد. فعالیت‌های پروتئولیتیکی توسط پروتئازها و پپتیدازها صورت می‌گیرند. محصولات چنین فعالیت‌هایی می‌توانند به شکل آمینواسیدهای آزاد یا پپتیدهایی با طول مختلف باشند. پروتئازهای کلروپلاستی شامل سرین پروتئازها، متالوپروتئازها و آسپارتیک پروتئازها می‌باشند *آدام* (Adam, 2007).

مکانیسم‌های افزایش میزان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست‌ها

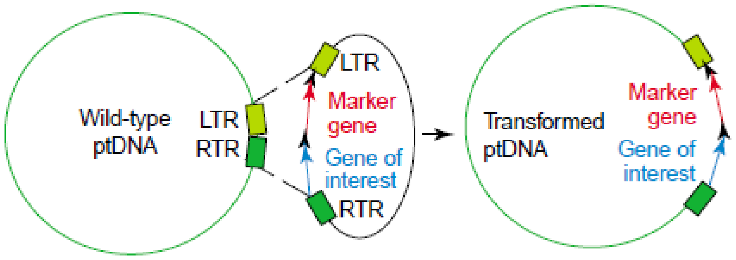
برای افزایش میزان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت کلروپلاستی می‌توان به روش‌های زیر اشاره کرد.

۱- بهینه‌سازی کدون

تاکنون پروتئین‌های مختلفی از منشاء باکتریایی، انسانی، گیاهی و ... در کلروپلاست گیاهان بیان شده است (جلالی‌جواران و همکاران، ۱۳۸۸). ژن‌های جدا شده از منابع گوناگون دارای درصد متفاوتی از نوکلئوتیدهای GC و AT در توالی خود می‌باشند. همچنین موجودات مختلف معمولاً به‌طور ترجیحی از برخی رمزهای بیان‌کننده یک اسیدآمینه بیشتر استفاده می‌نمایند (ترجیح کدونی). در مورد اکثر میزبان‌هایی که به‌منظور بیان ژن خارجی استفاده می‌شوند، لازم است به تفاوت درصد GC و ترجیح کدونی دو ارگانیسم‌دهنده و پذیرنده ژن توجه شود تا بیان پروتئین هدف در حد مطلوب انجام گیرد. گاهی این تفاوت به حدی است که ساخت ژن‌های مصنوعی متناسب با سیستم ژنتیکی میزبان ضروری است *مالیگا* (2003). برخلاف سیستم‌های بیانی دیگر بهینه‌سازی کدون نقش اندکی را در سیستم بیان پلاستیدی توتون ایفا می‌کند که دلیل احتمالی آن تعادل نسبی فراوانی کدون می‌باشد (*مالیگا*، 2003). در آزمایشات مختلف هنگامی که بهینه‌سازی کدون با ژنوم پلاستیدی غنی از AT توتون تنظیم شد، بیان ژن خارجی حدوداً ۲/۵ برابر افزایش یافت *یی* و همکاران، *ترگونینگ* و همکاران (Ye *et al.*, 2001; Tregoning *et al.*, 2003). ژنوم پلاستیدی دارای درصد AT بالا و کدون‌های بهینه اختصاصی می‌باشد *لطیف* و همکاران (Latif *et al.*, 2012).

۲- طراحی ناقل‌های کلروپلاستی مناسب

درج ژن خارجی درون ژنوم کلروپلاست توسط فرایند نوترکیبی همولوگ بین توالی‌های مشابه موجود در دو طرف ژن خارجی بر روی ناقل و توالی‌های موجود در ژنوم کلروپلاست انجام می‌شود. اولین قدم در ساخت ناقل‌های کلروپلاستی، شناسایی توالی‌های بین ژنی برای درج ژن خارجی و توالی‌های تنظیمی ژن‌های داخلی به‌منظور کنترل ژن هدف می‌باشد *ورما و دانیل* (2007). سیستم نوترکیبی اندامکی برای انجام نوترکیبی همولوگ به همولوژی کافی بین توالی‌های ناقل کلروپلاستی با پلاستوم هدف نیاز دارد. طول این توالی‌های همولوگ تقریبا ۲-۱ هزار جفت باز می‌باشد. توالی‌های کوتاه‌تر احتمالاً کارآیی تراریختی را کاهش می‌دهند. درحالی‌که توالی‌های بلندتر باعث مشکلات تکنیکی در ساختار ناقل می‌شوند. مطابق شکل ۲ در دو طرف ژن‌های هدف و نشانگر انتخابی، دو توالی به‌نام TR و RTR وجود دارد که به طور دقیق مشابه ناحیه‌ای از ژنوم پلاستیدی است که برای درج ژن هدف انتخاب شده است. باید توجه نمود که وارد شدن ژن خارجی و ژن نشانگر در بیان ژن‌های کلروپلاستی اطراف آن‌ها تداخل ایجاد نکند (*مالیگا*، 2003).



شکل ۲: تراریختی ژنوم پلاستیدی از طریق نوترکیبی همولوگ. بخش‌هایی از ژنوم پلاستیدی که در ناقل حضور دارند، به‌صورت LTR و RTR نام‌گذاری شده‌اند *مالیگا* (2003)

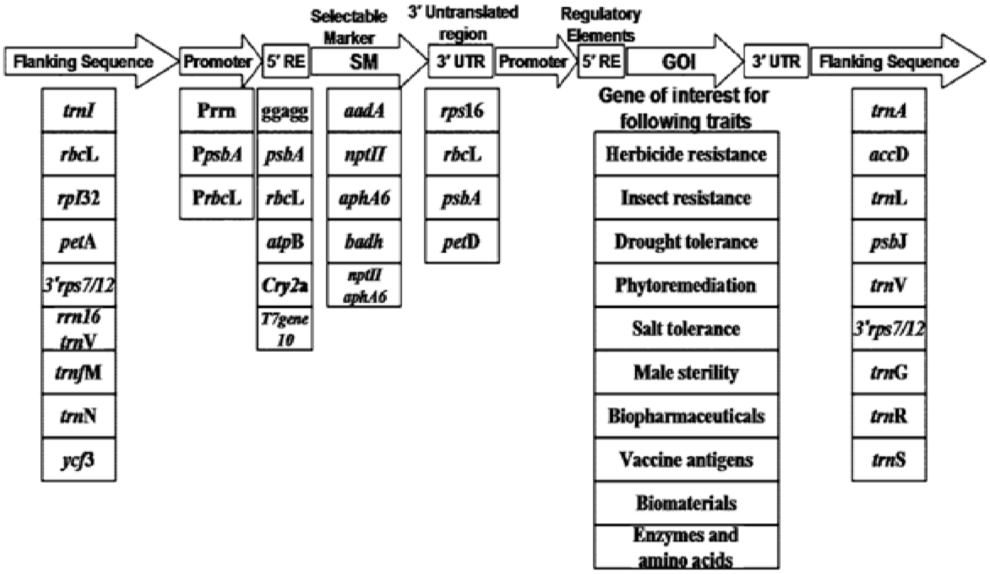
Fig. 2: Chloroplast genome transformation through homologous recombination. Plastid genome segments included in vector are named as LTR and RTR (Maliga, 2003)

۲-۱- نواحی مناسب برای درج ژن درون ژنوم پلاستید: تا به امروز رایج‌ترین ناحیه برای درج ژن خارجی در پلاستوم، ناحیه‌ی بین ژن‌های *trnI-trnA* درون اپرون rRNA واقع در ناحیه‌ی IR ژنوم کلروپلاست می‌باشد که از نظر رونویسی بسیار فعال است. در جدول ۳، چهارده ناحیه بین ژنی مناسب که تاکنون در گونه‌های مختلف به‌عنوان جایگاه ورود ژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند، ارائه شده است *مالیگا* (2004). به‌نظر می‌رسد برخی از این محل‌های درج، منحصر به فرد بوده و باعث افزایش کارآیی الحاق ژن هدف و بیان آن می‌گردد. همچنین ممکن است برخی از ناقل‌های کلروپلاستی دارای یک مبدا همانندسازی کلروپلاستی برای تکثیر پلاسمید پس از ورود به اندامک باشند. بنابراین تعداد نسخه‌های پلاسمید برای نوترکیبی همولوگ افزایش یافته و در نتیجه احتمال الحاق ژن هدف افزایش می‌یابد. مبدأ همانندسازی کلروپلاستی (*OriA*) در مجاورت ژن رمزکننده *trnI* قرار دارد و از این‌رو انتخاب این ناحیه برای درج ژن، همانندسازی ناقل‌های کلروپلاستی را در پی داشته و احتمال الحاق ژن هدف را افزایش می‌دهد و موجب دستیابی به هموپلاسمی (مرحله پایداری ژن هدف) در اولین مراحل باززایی و انتخاب گیاهان تراریخت کلروپلاستی می‌شود. مکان‌های الحاقی دیگر درون ژنوم کلروپلاست به طور جزئی موفق بوده است (*ورما و دانیل*، 2007).

۲-۲- عناصر تنظیمی مناسب: سطح بیان پروتئین در کلروپلاست‌ها به فراوانی mRNA که توسط توان راه‌انداز و میزان پایداری mRNA تعیین می‌شود، بستگی دارد؛ هرچند که سطوح بالای mRNA الزاماً منجر به تجمع سطوح بالای پروتئین نمی‌شود و فرایندهای پس از رونویسی و ترجمه نیز دخیل می‌باشند. بنابراین بایستی سازه‌های بیانی ژن هدف به گونه‌ای طراحی شوند که سطوح بهینه تجمع پروتئین در برگ‌ها به‌دست آید. سازه‌ی بیانی کلروپلاست از توالی‌های احاطه‌کننده برای درج در پلاستوم، راه‌انداز، توالی‌های تنظیمی ′۵ و ′۳، ژن گزینشگر و ژن(های) هدف تشکیل شده است (شکل ۳). به دلیل مشابهت بالای سیستم‌های ترجمه و رونویسی باکتری *Escherichia coli* و کلروپلاست‌ها، ناقل‌های بیانی کلروپلاست قبل از عمل تراریختی گیاه، ابتدا در این باکتری آزمایش می‌شوند (*ورما و دانیل*، 2007).

جدول ۳: نواحی مناسب جهت واردسازی ژن هدف به ژنوم کلروپلاستی در تعدادی از گیاهان
Table 3: Suitable sites for insertion of the target gene into the chloroplast genome

منبع Reference	گونه Species	ناحیه‌ی درج ژن Gene insertion region
Carrer and Maliga, 1995	توتون (*N. tabacum*)	*trn H/pbA*
Hang *et al.*, 2002	توتون (*N. tabacum*)	*ycf3/trnS*
Svab and Maliga, 1993	توتون (*N. tabacum*)	*rbcL/accD*
Klaus *et al.*, 2003	توتون (*N. tabacum*)	*petA/psbJ*
Klaus *et al.*, 2003	توتون (*N. tabacum*)	*petD/rpoA*
Hou *et al.*, 2003	کلزا(*Brasica napus*)	*ndhB/rps7*
Staub and Maliga, 1993	توتون (*N. tabacum*)	*trnV/rrn16*
Staub and Maliga, 1992	توتون (*N. tabacum*)	*rrn16/trnI*
Hang *et al.*, 2002	توتون (*N. tabacum*)	*trnN/trnR*
Staub and Maliga, 1992	توتون (*N. tabacum*)	*trnI/trnR*
Koop *et al.*, 1996	توتون (*N. tabacum*)	*rpl32/trnL*


Selectable Marker
3′ Untranslated region
Regulatory Elements
Flanking Sequence
Promoter
5′ RE
SM
3′ UTR
Promoter
5′ RE
GOI
3′ UTR
Flanking Sequence
trnI
rbcL
rpl32
petA
3′rps7/12
rrn16 trnV
trnfM
trnN
ycf3
Prrn
PpsbA
PrbcL
ggagg
psbA
rbcL
atpB
Cry2a
T7gene 10
aadA
nptII
aphA6
badh
nptII aphA6
rps16
rbcL
psbA
petD
Gene of interest for following traits
Herbicide resistance
Insect resistance
Drought tolerance
Phytoremediation
Salt tolerance
Male sterility
Biopharmaceuticals
Vaccine antigens
Biomaterials
Enzymes and amino acids
trnA
accD
trnL
psbJ
trnV
3′rps7/12
trnG
trnR
trnS

شکل ۳: سازه‌ی بیانی کلروپلاستی از نواحی احاطه‌کننده، راه‌انداز، توالی‌های تنظیمی ′۳ و ′۵، ژن گزینشگر و ژن(های) هدف تشکیل شده است *ورما و دانیل* (2007)

Fig. 3: Chloroplast expression cassette is composed of integration sites, promoters, 5′/3′ regulatory elements, selectable marker gene and genes of interest (Verma and Daniell, 2007)

تعدادی از عناصر تنظیمی مختلف برای بیان ژن خارجی در کلروپلاست‌های گیاهان عالی به کار رفته است. عناصر تنظیمی مهم در گیاهان عالی به شرح زیر می‌باشند *کوپ* و همکاران (Koop *et al.*, 2007).

۲-۲-۱- راه‌اندازها: ژنوم پلاستیدی دارای راه‌اندازهای فراوانی است اما به‌منظور کاربردهای بیوتکنولوژی عموماً از راه‌انداز دسته σ^{70} و به‌ویژه از راه‌انداز ژن‌های RNA ریبوزومی (P*rrn*) استفاده می‌شود (*مالیگا*، 2004). این راه‌انداز معمولاً دارای جایگاه شناسایی RNA پلیمرازهای NEP و PEP می‌باشد و به‌نظر می‌رسد که این راه‌انداز در هر دو نوع پلاستید سبز (کلروپلاست) و غیرسبز فعال باشد *دانیل* و همکاران (Daniell *et al.*, 2005). راه‌انداز قوی اپرون RNA ریبوزومی کلروپلاست در ترکیب با 5′UTR ژن ۱۰ فاژ T7(T7G10) یا به‌طور متناوب با یک جایگاه اتصال ریبوزومی ساختگی در انتهای 5′UTR ژن *rbcL* به‌طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است اسواب و همکاران (1990)، استواب و همکاران

(Staub *et al.*, 1990). از دیگر راه‌اندازهای قوی که برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست استفاده می‌شود، راه‌انداز ژن فتوسنتزی *psbA* می‌باشد. این راه‌انداز وابسته به نور است *هرز* و همکاران (Herz *et al.*, 2005). طبق نتایج تحقیقات انجام شده کاربرد این راه‌اندازها منجر به افزایش بیان پروتئین‌های خارجی شده است. تاکنون از راه‌اندازهای مختلف برای تنظیم بیان ژن‌های هدف در کلروپلاست استفاده شده است که برخی از آن‌ها در جدول ۴ اشاره شده‌اند (*کوپ و* همکاران، 2007).

جدول ۴: راه‌اندازهای مورداستفاده در گیاهان ترانس‌پلاستومیک
Table 4: Promoters used in transplastomic plants

منبع Reference	راه‌انداز Promoter
Svab and Maliga, 1993	*16 S rRNA*
Staub and Maliga, 1993	*psbA*
Sriraman *et al.*, 1998	*clpP*
Newell *et al.*, 2003	*trc*
Herz *et al.*, 2005	*rbcL*
Wurbs *et al.*, 2007	*atpI*

۲-۲-۲- نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۵: نواحی غیرقابل ترجمه ′۵ (5'UTR) مربوط به mRNAهای کلروپلاست نقش مهمی در تنظیم بیان ژن کلروپلاستی ایفا می‌کنند (*زو*، 2003). اهمیت این توالی تنظیمی به اندازه‌ای است که می‌تواند تجمع پروتئین را از یک راه‌انداز واحد مانند *Prrn*، تا ۱۰۰۰۰ برابر افزایش دهد (*مالیگا*، 2003). نیمه‌عمر RNA کلروپلاستی در محدوده چندین ساعت تا بیش از ۴۰ ساعت است. از آن جایی که تجزیه‌ی mRNA کلروپلاست با شکافت اندونوکلئوتیک شروع می‌شود، دسترسی مکان‌های شکافت برای اندونوکلئازها، نیمه عمر mRNA را به‌طور معنی‌داری تعیین می‌کند. در کلروپلاست گیاهان عالی بسیاری از عوامل پایداری mRNA درون نواحی غیرترجمه شونده ′۵ قرار گرفته‌اند. در بعضی موارد 5′UTR ژن ورودی به‌عنوان یک جایگاه اتصال ریبوزومی عمل می‌کند *دکوزا* و همکاران (De Cosa *et al.*, 2001). عناصر *Cis* موجود در 5′UTR ژن*psbA* (جعبه AU و RBS) در کلروپلاست‌های توتون برای ترجمه mRNA ژن*psbA* موردنیاز می‌باشد *هیروس و سوگیورا* (Hirose and Sugiura, 1996). بعضی عناصر خاص در نواحی غیرقابل ترجمه ′۵ به‌عنوان عوامل کاهنده پایداری mRNA کلروپلاست، در پاسخ به فاکتورهای محیطی عمل می‌کنند. برای مثال اخیراً در ناحیه 5′UTR رونوشت‌های *psbA2* سیانوباکتریایی توالی تنظیمی جعبه AU (UAAAUAAA) شناسایی شده است که یک عامل تعیین‌کننده عدم‌پایداری mRNA در تاریکی می‌باشد. حذف جعبه AU می‌تواند به‌طور مشخصی سطح رونوشت‌های *psbA2* را در تاریکی افزایش دهد *آگراوال* و همکاران (Agrawal *et al.*, 2001). در توتون معرفی یک توالی شاین دالگارنو استاندارد (GGAGG)در یک قطعه مصنوعی کوتاه به عنوان توالی راهنمای انتهای ′۵ ژن‌های *uidA* و *aadA*، که تحت کنترل راه‌انداز قوی RNA ریبوزومی 16S قرار داشتند، می‌تواند کارآیی ترجمه این دو mRNA را در کلروپلاست‌های تراریخت افزایش دهد کوپ و همکاران؛ *ایبل* و همکاران (Koop *et al.*, 1996; Eibl *et al.*, 1999). در توتون تراریخت کلروپلاستی، حذف ۱۷ نوکلئوتید در 5′UTR ژن *psbA* منجر به کاهش چهار برابری در کارآیی ترجمه و افت دو برابری در تجمع mRNAی ژن *uidA* شد. معلوم شده است که یک عنصر مفروض درون این ناحیه وجود دارد که سبب پایداری mRNA و افزایش ترجمه می‌شود (*ایبل*، 1999). همچنین فرآورده‌های ژن‌های هسته‌ای با میان‌کنش‌های مستقیم یا غیرمستقیم با نواحی غیرقابل ترجمه ′۵ mRNAهای خاص کلروپلاستی، برای ترجمه مورد نیاز می‌باشند. در ذرت دو ژن هسته‌ای (*atp1* و*crp1*) شناخته شده‌اند که برای ترجمه ژن‌های کلروپلاست موردنیاز می‌باشند. فرآورده ژن *atp1* ممکن است در شروع ترجمه یا طویل شدن سریع دخیل باشد *مک کورمک و بارکان* (McCormac and Barkan, 1999). به‌طور کلی میان‌کنش‌های بین عناصر *cis*-acting در نواحی غیرقابل ترجمه ′۵ mRNA کلروپلاست و عناصر *trans*-acting برای بیان ژن کلروپلاست ضروری می‌باشد *زو* (2003). از آن جایی‌که بیان در پلاستیدها به‌طور عمده در سطح پس از رونویسی کنترل می‌شود، 5′UTR یک عامل

تعیین‌کننده مهم سطح بیان می‌باشد (*ایبل*، 1999). نشان داده شده است که این عناصر کنترلی می‌توانند در بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب مؤثر باشند. هنگامی‌که توالی رمزکننده آلبومین سرم انسانی توسط نواحی غیرقابل ترجمه ′۳ و ′۵ ژن *psbA* کلروپلاستی در نور تنظیم شد، بیان پروتئین به میزان ۵۰۰ برابر و در نتیجه تشکیل اینکلوژن بادی‌های محافظتی افزایش یافت *فرناندز-سان میلان* و همکاران (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). ناحیه 5'UTR ژن *psbA* نیز تجمع پروتئین شیرین مونلین را در کلروپلاست‌های توتون افزایش داد *رو* و همکاران (Roh *et al.*, 2006). همچنین بیان بالایی از HPPD نوترکیب تحت کنترل راه‌انداز و 5′UTR ژن *psbA* در برگ‌های توتون تراریخت گزارش شده است (*دفورمنتل* و همکاران، 2007). در جدول ۵ تعدادی از نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۵ مورد استفاده در تراریختی کلروپلاستی گیاهان عالی مشاهده می‌شود.

جدول ۵: نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۵ مورد استفاده در گیاهان ترانس‌پلاستومیک
Table 5: 5' Untranslated regions used in transplastomic plants

منبع Reference	نواحی غیرقابل ترجمه‌ی انتهای ′۵ 5' Untranslated regions
Svab and Maliga, 1993	*rbcL*
Staub and Maliga, 1993	*psbA*
Staub *et al.*, 2000	*T7G10*
Kuroda and Maliga, 2002	*atpB*
Kuroda and Maliga, 2002	*clpP*
Herz *et al.*, 2005	*rpl22*
Herz *et al.*, 2005	*psbC*
Herz *et al.*, 2005	*psaB*
Wurbs *et al.*, 2007	*atpI*

۲-۲-۳- نواحی غیر قابل ترجمه در انتهای ′۳: بیشتر 3′UTRهای ژن‌های کلروپلاستی حاوی توالی‌های تکراری معکوس می‌باشند که می‌توانند ساختارهای ساقه-حلقه تشکیل دهند. توالی‌های تکراری معکوس 3′UTR علاوه‌بر نقش به عنوان خاتمه‌دهنده برای رونویسی ژن‌های کلروپلاست، نقش مهمی را در پایداری RNA و پردازش انتهای ′۳ ایفا می‌کنند *رات* و همکاران (Rott *et al.*, 1996). نشان داده شده است که ساختار ساقه-حلقه درون 3′UTR برای جلوگیری از پردازش اگزوریبونوکلئازی ′۳ به ′۵ ضروری می‌باشد. همچنین نشان داده شده است که تکرارهای معکوس انتهای ′۳ ژن *petD* در اسفناج برای پایداری mRNA لازم می‌باشد *استرن و گروایسم* (Stern and Gruissem, 1989). در کلروپلاست‌های تراریخت توتون، عدم حضور ساختار ثانویه پایدار (تکرارهای معکوس *petD*) در ناحیه 3′UTR، منجر به کاهش فراوانی mRNAی *uidA* شد *موند* و همکاران (Monde *et al.*, 2000). در آزمایشی نشان داده شد که استفاده از 3′UTRهای مختلف بر روی میزان فراوانی و تجمع mRNAی ژن *uidA* تأثیرگذار بوده است *ایبل* (1999). در جدول ۶ تعدادی از نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۳ مورد استفاده در گیاهان تراریخت کلروپلاستی نشان داده شده است.

جدول ۶: نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۳ مورد استفاده درگیاهان ترانس‌پلاستومیک
Table 6: 3′ Untranslated regions used in transplastomic plants

منبع Referenc	نواحی غیر قابل ترجمه‌ی انتهای ′۳ 3′ Untranslated regions
Staub and Maliga, 1993	*psbA*
Zoubenko *et al.*, 1994	*rps16*
Eibl *et al.*, 1999	*rbcL*
Eibl *et al.*, 1999	*rpl32*
Herz *et al.*, 2005	*rrnB*
Newell *et al.*, 2003	*psbC*
Buhot *et al.*, 2006	*Ta*

۳- پایداری پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست

پروتئین‌های ساخته شده در کلروپلاست نسبت به پروتئازها بسیار حساس می‌باشند و نیاز به محافظت در برابر پروتئازهای کلروپلاست دارند. با کمک چاپرون‌ها و پروتئین‌های فیوژن می‌توان این پروتئین‌های نوترکیب را از دسترس پروتئازها محافظت کرد (*ورما و دانیل*، 2007). به‌عنوان مثال، استفاده از چاپرون CRY (رمزشده توسط ژن *orf2*)، تجمع پروتئین CRY2Aa2 را به میزان ۱۲۸ برابر (از ۰/۳۶ به ۴۶/۱ درصد پروتئین محلول کل) افزایش داد (دکوزا، 2001). این چاپرون برای سرهم کردن پروتئین حشره‌کش Cry2Aa2 درون کریستال‌های مستطیلی شکل مورد استفاده قرار گرفته است. این ساختار کریستالی پروتئین‌های خارجی را از تجزیه توسط پروتئازها محافظت می‌کند. انسولین انسانی در کلروپلاست‌های تراریخته ناپایدار بوده و به سرعت تجزیه می‌شود. اتصال زیر واحد β سم وبا به آن منجر به بیان بیش از ۱۶ درصد پروتئین محلول کل شد *رولمن* و همکاران (Ruhlman *et al.*, 2007). میزان بیان پروتئین اینترفرون گاما پس از اتصال به پروتئین GUS از ۰/۱٪ به ۶٪ پروتئین محلول کل و نیمه عمر پروتئین آن از ۶ به ۴۸ ساعت افزایش یافت؛ اگرچه در هر دو حالت از عناصر تنظیمی یکسانی استفاده شده بود *لی لواتی و ردی* (Leelavathi and Reddy, 2003). نتایج مشابهی نیز برای فاکتور رشد اپیدرمی نوترکیب به‌دست آمد *ورث* و همکاران (Wirth *et al.*, 2006). همچنین توالی‌های آمینواسیدی پایین دست کدون شروع احتمالاً نقش مهمی در ثبات پروتئین‌های جدید ساخته شده و یا افزایش کارآیی ترجمه ایفا می‌کنند *کورودا و مالیگا* (Kuroda and Maliga, 2001).

بحث

امروزه علی‌رغم رشد روز افزون تقاضا برای پروتئین‌های دارویی، ظرفیت کافی برای پاسخ به این تقاضا به‌ویژه در کشورهای فقیر و در حال توسعه وجود ندارد. به‌گونه‌ای که بسیاری از داروهای مهم و ضروری با هزینه‌های زیاد وارد شده و تنها اقشار ثروتمند قادر به تهیه و استفاده از آن‌ها می‌باشند جلالی‌جواران و همکاران (۱۳۸۸).

مهندسی ژنوم کلروپلاست یک استراتژی قدرتمند و امیدبخش برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد که به دلیل دارا بودن مزایای زیاد نسبت به تراریختی هسته‌ای، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است و از این دیدگاه که کلروپلاست دارای ظرفیت بالایی جهت بیان و تجمع پروتئین‌های خارجی می‌باشد، به نظر می‌رسد که استفاده از آن به‌ویژه به‌منظور تولید پروتئین‌های دارویی، نظیر آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و مواد ضدمیکروبی جالب توجه می‌باشد *بوک* (Bock, 2007a). تاکنون بسیاری از پروتئین‌های ارزشمند دارویی و صنعتی از قبیل انسولین، اینترفرون‌ها، سوماتوتروپین، واکسن‌های مختلف، پلیمرهای زیستی، آمینواسیدها و آنزیم‌های صنعتی با موفقیت در کلروپلاست بیان شده‌اند *ورما و* (*دانیل*، 2007). میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست از حدود ۰/۰۰۱٪ تا بیش از ۷۰٪ پروتئین محلول کل گزارش شده است (کوپ و همکاران، 2007). دستیابی به سطوح بالای پروتئین نوترکیب بستگی به طراحی مناسب سازه‌های بیانی، انتخاب راه‌انداز مناسب، حضور عناصر 5′UTR، پایداری مولکول mRNA، که توسط 5′UTR و 3′UTR تضمین می‌شود، و انتخاب مکان درج ژن در ژنوم کلروپلاست دارد. برای مثال درج ژن خارجی در نواحی تکراری ژنوم کلروپلاست (IR) تعداد نسخه‌های آن ژن در هر نسخه از ژنوم را دو برابر خواهد کرد. عناصری که به عنوان 5′UTR برای تنظیم ژن‌های خارجی به‌کار گرفته می‌شود بایستی علاوه‌بر افزایش پایداری mRNA، موجب شروع ترجمه به‌طور مؤثری شوند و در صورت لزوم با ایجاد بر هم‌کنش مناسب با فرآورده‌های ژن‌های هسته‌ای، کارآیی ترجمه را افزایش دهند. در این زمینه مطالعه و تحقیق برای یافتن 5′UTRهای متناسب با ژن‌های خارجی ضروری می‌باشد. همچنین به کارگیری توالی 3′UTR مناسب می‌تواند موجب افزایش پایداری mRNA و در نتیجه افزایش ترجمه شود *مالیگا و اسواب* (Maliga and Svab, 2011).

با افزایش تعداد نسخه‌های ژن خارجی، نسخه‌های ژن گزینشگر نیز افزایش می‌یابد. تجمع بیش از حد (بیش از پنج تا ده درصد از کل پروتئین محلول سلول) محصول ژن‌های گزینشگر که عمدتاً شامل عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند، بار متابولیکی زیادی را به سلول تحمیل می‌کند. ژن‌های گزینشگر برای تکثیر انتخابی نسخه‌های تراریخت ژنوم پلاستیدی ضروری هستند؛ هرچند که پس از دستیابی به نسخه‌های ژنوم پلاستیدی تراریخت به حالت یکنواخت و تولید گیاهان تراریخت پایدار (هوموپلاسمی)، وجود ژن‌های گزینشگر ضرورتی ندارد. لذا ناقل‌های جدید به گونه‌ای طراحی می‌شوند که پس از انتقال ژن و دستیابی به حالت هوموپلاسمی، امکان حذف ژن گزینشگر از ژنوم کلروپلاست وجود داشته باشد. در این راستا، تکنولوژی مهندسی ژنوم کلروپلاستی پیشرفت‌های چشمگیری داشته است که از آن جمله می‌توان به روش‌های نوترکیبی هومولوگ براساس توالی‌های تکراری هم‌جهت، انتقال و تفرق همزمان ژن‌های اصلی و گزینشگر و همچنین استفاده از عوامل نوترکیب‌کننده مختص توالی هدف به‌منظور حذف ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اشاره نمود *دی و لوتز* و همکاران، *دی*

و *گلدشمیت-لوتز* (Day and Lutz *et al.*, Day and Goldschmidt- Lutz *et al.*,). احتمال بسیار پایین انتقال افقی ژن از طریق دانه گرده و همچنین امکان حذف ژن گزینشگر در گیاهان تراریخت کلروپلاستی، پذیرش عمومی از آنها را نسبت به انواع تراریخت هسته‌ای، افزایش خواهد داد *لوتز و مالیگا* (Lutz and Maliga, 2007).

انتظار می‌رود که تکنولوژی مهندسی ژنوم کلروپلاستی، آینده امیدبخشی را برای بیوتکنولوژی گیاهی به ارمغان آورد؛ با این وجود، چالش‌هایی پیش روی بهره‌مندی از ظرفیت کامل این تکنولوژی وجود دارند که می‌بایست برطرف شوند. مهم‌ترین این چالش‌ها، لزوم گسترش دامنه گیاهانی است که امکان تراریختی پلاستیدی آسان و پایدار در آنها وجود داشته شد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه توسعه تراریختی پلاستیدی در گیاهان زراعی مهم *راف* و همکاران؛ *دفورمنتل* و همکاران؛ *کومار* و همکاران (Dufourmantel *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2004)، هنوز دستورالعمل‌های کاربردی به‌منظور دستورزی ژنوم پلاستیدی انواع غلات، که دربرگیرنده قسمت عمده غذای جهان می‌باشند، وجود ندارد. پیش از آن‌که تراریختی پلاستیدی پایدار در تک‌لپه‌ای‌ها امکان‌پذیر گردد، لزوم پیشرفت‌های قابل توجه در امر بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت، باززایی و انتخاب دستورالعمل‌های صحیح تراریختی پلاستیدی در این گیاهان اجتناب‌ناپذیر است (*بوک*، 2007). از سوی دیگر، نیاز به توسعه سیستم‌های بیان قابل کنترل ژن هدف در ژنوم کلروپلاستی (در مرحله رشدی و یا بافت به‌خصوصی از گیاه) ضروری به‌نظر می‌رسد. اگرچه در حال حاضر چنین سیستم‌هایی به‌خوبی برای گیاهان تراریخت هسته‌ای توسعه یافته‌اند، اما استفاده مؤثر از این سیستم‌ها در گیاهان تراریخت پلاستیدی همچنان در آغاز راه می‌باشد *بوک* (2007)، *پادیدام* (Padidam, 2003).

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۱-۲۵ متن انگلیسی مراجعه شود.