ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۶۶-۱۵۱

بیان آنتی‌بادی تک دودمانی ضد HER2/neu انسانی Trastuzumab در توتون تراریخته

Expression of the humanized anti-HER2/neu monoclonal antibody trastuzumab in transgenic tobacco plants

مریم احساسات وطن[۱]، مراد جعفری*[۱]، رضا درویش‌زاده[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشیار، دانشگاه ارومیه.

Ehsasat Vatan M[1], Jafari M[*1], Darvishzadeh R[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor, University of Urmia

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.jafari@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۰- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان است و سالانه بیش از نیم میلیون زن به این بیماری مبتلا می‌شوند. Trastuzumab (با نام تجاری ®Herceptin) یک آنتی‌بادی تک دودمانی انسانی شده مشتق از تکنولوژی DNA نوترکیب است که در درمان سرطان پستان متاستاتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، درمان با Trastuzumab هزینه بسیار زیادی داشته و یک دوره درمان یکساله برای بیمار نیاز به صرف هزینه بیش از ۲۰۰ میلیون تومان دارد. در این تحقیق امکان تولید آنتی‌بادی Trastuzumab در گیاه توتون با استفاده از تراریختی پایدار به واسطه *Agrobacterium tumefaciens* بررسی شد. ریزنمونه‌های برگ توتون رقم Gewone groene با آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی وکتورهای دوتایی pBIN19-NTopTras-LC و pBIN19-NTopTras-HC، دربردارنده به ترتیب ژن‌های رمز کننده زنجیره سبک (LC) و زنجیره سنگین (HC) آنتی-بادی Trastuzumab، تلقیح شدند. تجزیه لکه‌گذاری سادرن درج یک الی سه نسخه از ژن‌های *HC* و *LC* در ژنوم گیاهان تراریخته را تایید کرد. بیان تراژن‌ها در سطح RNA با تجزیه RT-PCR نیمه کمی مورد تایید قرار گرفت. تجمع پروتئین در گیاهان با تجزیه لکه‌گذاری وسترن مشخص شد و محتوی آنتی‌بادی در گیاهان تراریخته ۰/۱ درصد پروتئین محلول کل برآورد شد. تجزیه ایمونوبلات عصاره خام گیاهان نشان داد که Trastuzumab در گیاهان به شکل تترامر (H_2L_2) تجمع می‌یابد. تجزیه نتاج T_1 وراثت پایدار و تفکیک همزمان تراژن‌ها به صورت یک مکان ژنی منفرد مندلی را تایید کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهان می‌توانند به عنوان یک سامانه جایگزین برای تولید مقرون به صرفه پروتئین‌های دارویی با ارزش بالا مورد استفاده قرار گیرند. این مطالعه، برای اولین بار در کشور، گام نخست اساسی به سمت توسعه Trastuzumab گیاهی را پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پروتئین نوترکیب
توتون
Agrobacterium tumefaciens
Trastuzumab

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است به طوری که سالانه ۱۰ میلیون مورد جدید سرطان و ۷/۵ میلیون مرگ ناشی از سرطان (۱۳ درصد کل مرگ و میرها) گزارش می‌شود. در این میان سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان است و سالانه بیش از نیم میلیون زن به این بیماری مبتلا می‌شوند (Jemal et al. 2010). شیوع بالای سرطان پستان نشان می‌دهد که تشخیص و درمان این بیماری بار مالی قابل توجهی بر بیماران مبتلا اعمال می‌کند. داروهای جدید معرفی شده برای درمان سرطان معمولا هزینه‌های درمان را افزایش می‌دهند (Norum et al. 2005). یکی از داروهای تولید شده برای درمان سرطان پستان Trastuzumab (با نام تجاری هرسپتین[1])، یک آنتی‌بادی تک دودمانی[2] انسانی ضد p185HER2/neu می‌باشد. گیرنده دو فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER2/neu) یک انکوژن درگیر در رشد غیر عادی سلول در سرطان پستان است و مولکول هدف برای Trastuzumab می‌باشد (Norum et al. 2005; Komarova et al. 2011). تکثیر ژن *HER2/neu* در ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران با سرطان پستان متاستاتیک تشخیص داده شده است (Norum et al. 2005; Grohs et al. 2010). این آنتی‌بادی به وسیله تکنولوژی DNA نوترکیب در کشت سلول‌های پستانداران (سلول‌های تخمدان همستر چینی، CHO[3]) تولید شده است (Komarova et al. 2011). در داخل کشور سالانه ۸ تا ۱۰ هزار بیمار جدید به مبتلایان سرطان پستان در کشور اضافه می‌شود و به طور متوسط هر سال ۳ هزار نفر از این تعداد نیازمند داروی Trastuzumab هستند (Afsharfard et al. 2013) که با توجه به قیمت بالا و وارداتی بودن این دارو، هزینه‌های تامین آن فشار روحی و روانی مضاعفی بر بیماران مبتلا وارد می‌کند. طبق گزارش سازمان غذا و داروی ایران در مورد فهرست گران‌ترین داروهای ایران بر اساس آخرین آمار تا پایان سال ۱۳۹۱ که عمده آن‌ها را داروهای مربوط به بیماران سرطانی تشکیل می‌دهد، Trastuzumab (در ویال‌های ۴۴۰ mg) با قیمت واحد ۲۴۵۳۸ میلیون ریال و با احتساب فروش ۷۳۶۲ عددی و مجموع فروش ریالی ۵۶۵۲۸۱ میلیارد ریال بعد از Carbazitaxel در رتبه دوم قرار دارد. دریافت این دارو در یک رژیم درمانی شناخته شده در دنیا، برای هر بیمار (در سال ۱۳۹۱) حدود هفتصد میلیون ریال هزینه در پی داشت. در سال ۱۳۹۲ هزینه یک دوره درمان سرطان سینه با داروی هرسپتین ۲۰۰ میلیون تومان اعلام شد (http://www.mehrnews.com/news/2156882) و این هزینه می‌تواند هر سال روند افزایشی داشته باشد. لذا با توجه به نیاز بالا به این دارو و قیمت بالای آن، توسعه سیستم‌های تولیدی مناسب برای تولید انبوه و ارزان قیمت آن یک نیاز مبرم است. مروری بر منابع مختلف نشان می‌دهد که گیاهان توانایی تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی با فعالیت بیولوژیکی مورد انتظار مانند پروتئین‌های سرم انسانی و تنظیم کننده‌های رشد، آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها را دارند (Norum et al, 2005; Mayani et al. 2011; Obembe et al. 2011). سیستم گیاهی مزایای منحصر به فردی برای تولید داروهای نوترکیب دارد که از جمله مزایای اصلی این سیستم کاهش خطرات ناشی از آلودگی با پاتوژن‌های انسانی و حیوانی، عملکرد نسبتاً بالا و هزینه‌های بسیار پایین تولید و افزایش سریع مقیاس تولید است (Jafari and Norouzi 2011). بر اساس مطالعات مرتبط با تولید پروتئین‌های نوترکیب، هزینه تولید هر گرم آنتی‌بادی کاربردی در سیستم‌های پستانداری، گیاهی و جلبک به ترتیب برابر با ۱۵۰ دلار، ۰/۰۰۵ دلار و ۰/۰۰۲ دلار می‌باشد (Grohs et al. 2010; Potvin et al. 2010; Komarova et al. 2011). کشاورزی مولکولی[4] چشم‌اندازی نوین در حوزه بیوتکنولوژی برای تولید مولکول‌های نوترکیب دارویی با ارزش مانند آنزیم‌ها، واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌ها فراهم کرده است (Jalali et al. 2009). پیشرفت‌های اخیر در مهندسی ژنتیک گیاهی حتی بیان پروتئین‌های نوترکیب پیچیده مانند آنتی‌بادی‌های تک دودمانی نوترکیب انسانی را نیز در گیاهان امکان‌پذیر ساخته است (Mayani et al. 2011). میزبان‌های گیاهی مختلفی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است، با این‌حال گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*

[1] Herceptin®
[2] Monoclonal
[3] Chinese hamster ovary
[4] Molecular farming

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

(.L بسیار مورد توجه بوده است (Tremblay et al. 2010). توتون علاوه بر دارا بودن قابلیت تراریختی و باززایی بالا، مزایای مهم دیگری مانند عملکرد بالای زیست‌توده، ظرفیت افزایش مقیاس بالا، غیر خوراکی بودن (عدم آلودگی زنجیره غذایی)، رشد و برداشت در تمام طول سال، و در دسترس بودن زیرساخت‌های پردازش در مقیاس بزرگ را دارد (Fischer et al. 2004; Biemelt and Sonnewald 2005; Stoger et al. 2005).

با توجه به نیاز بالای کشور به Trasuzumab به عنوان یکی از داروهای نوترکیب پرمصرف و گران‌قیمت، تحقیقات محدودی در داخل کشور به منظور تولید این دارو در سیستم پستانداری انجام شده است (Shojaei and Gardaneh 2012; Akbarzadeh-Sharbaf et al. 2013). با توجه به مزایای قابل توجه سیستم گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، تولید Trastuzumab در چنین سیستمی نیز خالی از لطف نیست، که در خارج از کشور تولید آن در گیاه توتون گزارش شده و نتایج حاصل حاکی از تولید Trastuzumab در سیستم گیاهی با عملکرد بیولوژیک قابل مقایسه با هرسپتین تجاری است (Grohs et al. 2010). در تحقیق حاضر برای اولین بار در کشور بیان ژن‌های رمز کننده Trastuzumab و تولید آن در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی بذر و تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای

در این تحقیق، بذر توتون رقم Gewone groene (تهیه شده از مرکز تحقیقات توتون تیرتاش- مازندارن) که دارای پایین‌ترین مقدار نیکوتین است، جهت تراریختی استفاده شد. بذور بعد از شستشوی اولیه با آب جاری به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، با اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه و محلول ۲۰ درصد (v/v) هیپوکلریت سدیم همراه با یک یا دو قطره Tween 20 به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس ۵ بار هر کدام به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. به منظور تسهیل در جوانه‌زنی، بذور قبل از کشت به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار داده شدند. در نهایت بذور استریل در محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) با نصف غلظت نمک‌ها همراه با ویتامین‌های B5 (Gamborg et al. 1986)، میواینوزیتول (۰/۲ g/l)، آگار گیاهی (۷ g/l) و ساکارز (۳۰ g/l) کشت شدند. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ۳۰ روزه حاصل به عنوان ریزنمونه جهت تراریختی استفاده شدند.

تهیه دستوارهای مولکولی

به منظور ساخت دستوارهای مولکولی حاوی ژن‌های رمز کنندهٔ زنجیره سنگین (HC) و زنجیره سبک (LC) آنتی‌بادی Trastuzumab، از پلاسمیدهای pSAR-NTopTras-HC و pSAR-NTopTras-LC (Ehsasatvatan 2014) استفاده شد. لازم به ذکر است که منشا اولیه ژن‌های HC و LC پلاسمیدهای pBSK-Her2-HC و pBSK-Her2-LC (Shojaei and Gardaneh 2012) بودند که توسط آقای دکتر گردانه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری اعطا شدند. توالی این ژن‌ها بر اساس محاسبه شاخص سازگاری کدون (CAI) (http://genomes.urv.es/CAIcal) و با استفاده از کدون‌های ترجیحی توتون (Nakamura et al. 2000) با در نظر گرفتن سایر موارد (محتوی A+T و G+C، ساختار ثانویه و پایداری mRNA و توالی‌های مورد توافق اطراف کدون آغازین) بوسیله نرم‌افزار آنلاین Entelechon بهینه‌سازی شدند و در نهایت توالی‌های بهینه شده ژن‌ها (*LC*- و *NTopTras-HC*) در پلاسمیدهای pSAR-NTopTras-HC و pSAR-NTopTras-LC همسانه شدند (Ehsasatvatan 2014).

ژن‌های بهینه شده *HC* و *LC* از پلاسمیدهای pSAR-NTopTras-HC و pSAR-NTopTras-LC به وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای P35SCS-Fwd و P35SCS-Rev (جدول۱) به ترتیب حاوی جایگاه‌های آنزیمی *Hind*III و *Bam*HI تکثیر شدند و محصولات حاصل پس از خالص‌سازی با کیت High Pure PCR Product Purification (Roche، آلمان) و برش با آنزیم‌های مقتضی به طور جداگانه در پلاسمید pBIN19 (Bvan 1984) طی فرآیند اتصال با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (Sambrook and Russell 2001) درج شدند و بدین ترتیب دو دستوارهٔ نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سبک و سنگین Trastuzumab ساخته شدند. در هر دو دستواره، کاست‌های ژنی *HC* (۲۴۱۵ bp) و *LC* (۱۷۰۴ bp) شامل راه‌انداز تقویت شده

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

ویروس موزائیک کلم (CaMV x2e[1])، ناحیه غیرترجمه شونده '5 (5'-UTR) ژن چالکون سینتاز (*CHS*)، توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی ژن کینیتاز بازی (Arabidopsis basic chitinase signal peptide) آرابیدوپسیس و توالی پایانی 35S بودند.

دستوارهها با روش ذوب و انجماد (Sambrook and Russell 2001) به آگروباکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافتند و کلونی‌های نوترکیب بر اساس کشت در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و همچنین از طریق Colony PCR غربال شدند. کلونی‌های نوترکیب آگروباکتری جهت تراریختی گیاه توتون استفاده شدند.

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، گزینش و باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

ریزنمونه‌های برگ کامل پس از جداسازی از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ۳۰ روزه با آگروباکتری طبق روش (2009) .Jafari et al با تغیرات جزیی به شرح زیر تلقیح شدند. تک کلونی‌های آگروباکتری سویه LBA4404 حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در ۳۰ ml محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین (۵۰ mg/l) و کانامایسین (۵۰ mg/l) در دمای ۲۸°C با ۲۰۰ rpm تا رسیدن به OD_{600}~۰/۵–۰/۷ کشت شد. سوسپانسیون باکتری حاصل در $g \times$ ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در ۳۰ ml محیط القا (شامل محیط پایه MS با نصف غلظت نمک‌ها حاوی ۱۵۰ µM سینامیک‌اسید) تعلیق شد. پس از ۵ تا ۶ ساعت ادامه کشت در شرایط ذکر شده، سوسپانسیون باکتری در $g \times$ ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در ۴۰ ml محیط القا بدون آنتی‌بیوتیک تعلیق شد و غلظت آن به OD_{600} ~۰/۴ رسانده شد و برای تلقیح ریزنمونه‌های برگ استفاده شد. بدین منظور ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شده و سپس جهت حذف باکتری‌های اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. در نهایت، ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط کشت توام (شامل محیط MS پایه حاوی ۱۵۰ µM سینامیک اسید) کشت شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت ۷۰ درصد و دمای ۲۴°C در اتاقک رشد به مدت ۴ روز نگه‌داری شدند. پس از ۴ روز هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط شستشو (شامل محیط MS پایه حاوی ۵۰۰ mg/l سفوتاکسیم) شستشو داده شدند و سپس در محیط گزینش (شامل محیط MS پایه حاوی ۱۵۰ mg/l کانامایسین و ۲۵۰ mg/l سفوتاکسیم، با ترکیب تنظیم کننده‌های رشد BAP (۱ mg/l) و IBA (۰/۱ mg/l) کشت شدند (Ehsasatvatan 2014). پس از یک دوره گزینش ۳۰ روزه گیاهچه‌های تراریخته احتمالی گزینش شده در محیط کشت MS حاوی ویتامین‌های B5 و بدون هر گونه تنظیم کننده رشد ریشه‌دار شدند. در نهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، جهت سازگاری به شرایط محیط طبیعی، به گلدان‌های حاوی پیت: پرلیت (۳:۱) با شرایط رطوبت نسبی ۹۶ درصد و دمای ۲۴ ±۲°C منتقل شدند.

تجزیه‌های مولکولی

تجزیه PCR

برای تایید اولیه حضور تراژن‌ها در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی مقاوم به کانامایسین از تجزیه PCR استفاده شد. DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهچه‌های مقاوم به عامل انتخابی و گیاهچه‌های تراریخت نشده توتون (به عنوان شاهد منفی) به روش Dellaporta et al. (1983) استخراج شد و تجزیه Duplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HC و LC برای تکثیر قطعه bp ۷۱۸ از ناحیه رمز کننده HC و قطعه ۶۱۵ از ناحیه رمز کننده LC (جدول ۱) انجام شد. واکنش‌های PCR با حجم کلی ۲۰ µl شامل ۱۰ µl Taq Premix (GenetBio، کره)، ۱ µl (۱۰۰ ng) DNA ژنومی، ۰/۵ µl از هر نوع آغازگر و ۷ µl آب مخصوص PCR تهیه شدند. برنامه دمایی PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی °C ۹۴ به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها ۶۰°C به مدت یک دقیقه، بسط ۷۲°C به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی ۷۲°C به مدت زمان ۷ دقیقه بود. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Eppendrof مدل Mastercycler 5331 انجام شد و محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه Gel Doc مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند.

تجزیه لکه‌گذاری سادرن

به منظور تایید تلفیق تراژن‌ها در ژنوم گیاهان تراریخته توتون از

[1] Duplicate cauliflower mosaic virus 35S pormoter

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آنالیزهای PCR و RT-PCR ژن‌های *HC* و *LC* در گیاهان تراریخته توتون.

آغازگر		توالی (′3–′5)	اندازه محصول (bp)
opHC	رفت	GACATATCCATTGCCAGGAAGCG	۷۱۸
	برگشت	GCTAACGTCAACCACCACGCATG	
opLC	رفت	CTGAACACCGAATGAACAAGTAC	۶۱۵
	برگشت	ACTAAGTCGCGGGCGAGACGTG	
P35SCS	رفت	CCTGCAAAGCTTCTGCTCGATATAGCAGCGTC	(HC) ۲۴۱۵
	برگشت	TGCCTAAGATCTGCTTGGCCTCTGGATCTTGG	(LC) ۱۷۰۴

تکنیک لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. در حدود ۲۵ میکروگرم DNA ژنومی با کیفیت بالا از برگ گیاهچه‌های PCR^+ و گیاهچه‌های تراریخت نشده توتون (به عنوان شاهد منفی) و همچنین پلاسمیدهای نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC و *Nhe*I pBIN19-NTopTras-LC (به عنوان شاهد مثبت) به وسیله آنزیم مورد هضم قرار گرفتند. به منظور انتقال DNA روی غشا، نمونه‌های DNA هضم شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد و به وسیله الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۵۰ تفکیک شد. کاوشگرهای اختصاصی تراژن‌ها، نشاندار شده با DIG (Digoxigenin)، از نواحی رمز کننده ژن‌های *HC* و *LC* مطابق با دستورالعمل کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche، آلمان) تهیه شد. دورگه‌سازی، مراحل شستشو و تشخیص سیگنال‌ها بر اساس دستورالعمل کیت DIG DNA Labeling and Detection (Roche، آلمان) صورت گرفت.

تجزیه RT-PCR نیمه‌کمی

به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در گیاهان تراریخته از تجزیه RT-PCR نیمه کمی استفاده شد. بدین منظور، RNA کل از برگ گیاهان تراریخته حاوی تراژن‌ها و گیاه مادری غیرتراریخته توتون (به عنوان شاهد منفی) بر اساس دستورالعمل کیت RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN، آمریکا) استخراج شد. تجزیه RT-PCR به صورت Multiplex توسط آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها (جدول۱) برای نمونه‌های RNA کل استخراج شده بر اساس دستورالعمل کیت Titan One Tube RT-PCR (Roche، آلمان) انجام شد. برای کمی کردن نسبی بیان تراژن‌ها از رونوشت ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی و همچنین از تکنولوژی Competimer™ 18S rRNA (Ambion، آمریکا) برای کنترل تکثیر رونوشت 18S rRNA در رقابت با رونوشت تراژن‌ها استفاده شد. پس از بهینه‌سازی، از ترکیب 18S rRNA Competimers:primers با نسبت ۳:۸ در واکنش RT-PCR استفاده شد. محصولات RT-PCR در ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه RT-PCR در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد و برای سنجش نیمه کمّی بیان تراژن‌ها، شدت نوارهای تکثیر شده در نرم‌افزار ImageJ 1.47 (Rasband 2014) پس از نرمال‌سازی نسبت به کنترل داخلی به داده‌های کمّی چگالی تصحیح شده[1] تبدیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون LSD[2] انجام گرفت.

تجزیه لکه‌گذاری وسترن

تجزیه لکه‌گذاری وسترن به منظور ردیابی تجمع آنتی‌بادی Trastuzumab در گیاهان توتون تراریخته صورت گرفت. به این منظور، پروتئین کل برگ از گیاهان تراریخته و همچنین از گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی به روش Jafari et al. (2009) استخراج شد و غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش برادفورد (Bradford 1976) تعیین شد. در حدود ۵۰ µg نمونه پروتئینی در ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel) ۱۰ درصد بارگذاری شد و الکتروفورز در شرایط احیا شده (reducing conditions) و شرایط احیا نشده (non-reducing conditions) با دستگاه Protein II (Bio-Rad) انجام شد. پس از انجام الکتروفورز، پروتئین‌ها به وسیله دستگاه Semi-dry transblot (Bio-Rad) با ولتاژ ثابت ۲۰ از ژل بر روی غشاء نیتروسلولزی (Bio-Rad) منتقل شدند. تشخیص ایمونولوژیکی

[1] Adjusted density
[2] Least significant difference

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

زنجیره LC و HC و فرم کامل آنتی‌بادی Trastuzumab با استفاده از مخلوطی از آنتی‌بادی‌های goat Anti-human IgG-Gamma (γ)-specific AP-conjugated antibody و goat Anti-human IgG-Kappa (κ)-chain specific AP-conjugated antibody (Sigma، آمریکا) طبق روش Jafari et al. (2009) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری میزان نسبی تجمع پروتئین نوترکیب، غشای وسترن به وسیله نرم‌افزار ImageJ 1.47 مورد تجزیه قرار گرفت و شدت نوارها پس از نرمال‌سازی نسبت به نمونه استاندارد (IgG1 انسانی، Sigma) با غلظت ۵۰ ng به داده‌های کمی چگالی نسبی (Relative density) تبدیل شدند و تجمع پروتئین نوترکیب به صورت درصدی از پروتئین محلول کل یا به صورت میزان پروتئین نوترکیب نسبت به وزن تر بیان شد.

تولید گیاهان تراریخته نسل T_1 و توارث‌پذیری پایدار تراژن‌ها

به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در گیاهان تراریخته نسل T_1، تعداد ۵۰ بذر حاصل از خودگشنی یکی از لاین‌های تراریخته توتون T_0 در گلدان‌های حاوی پیت: پرلیت (۱:۳) کشت و به طور منظم آبیاری شدند. تمام گلدان‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای $24 \pm 2^{\circ}C$ قرار گرفتند. استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های ۶ هفته‌ای به روش Dellaporta et al. (1983) انجام شد. به منظور تایید انتقال وارثت‌پذیر تراژن‌ها به نسل T_1، آزمون Duplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های رمز کننده *HC* و *LC* انجام شد و برای انطباق تفرق آنها با نسبت مندلی ۳:۱ از آزمون χ^2 در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

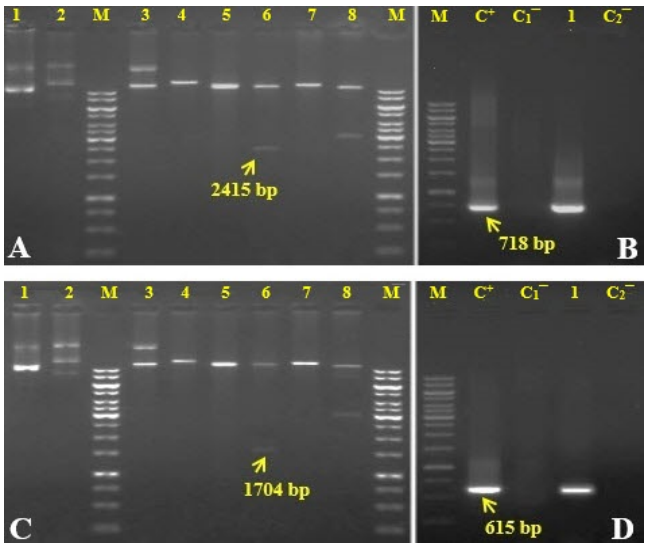
نتایج و بحث

هضم با آنزیم‌های برشی مختلف، ساختار مولکولی دستوارهای ساخته شده را تایید کرد (شکل ۱). پلاسمیدهای نوترکیب و غیر نوترکیب pBIN19 در برش با آنزیم *Bam*HI خطی شدند، ولی اندازه بزرگتر پلاسمیدهای نوترکیب خطی شده از پلاسمید غیرنوترکیب بیانگر الحاق قطعه‌ای در آن‌ها بود. برش پلاسمیدهای نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III منجر به ایجاد قطعاتی با اندازه ۲۴۱۵ bp (کاست ژنی *HC*) و ۱۷۰۴ bp (کاست ژنی *LC*)، که همان قطعات الحاقی بودند، شد (شکل ۱، A و C). برش با آنزیم *Nhe*I باعث خطی شدن پلاسمید غیرنوترکیب pBIN19 (به دلیل وجود جایگاه برشی در backbone) شد، در صورتی که در پلاسمیدهای نوترکیب به علت وجود دو جایگاه برای این آنزیم یک قطعه دیگر با طول حدود ۳۰۰۰ bp حاصل شد، بدین ترتیب حضور تراژن در پلاسمیدهای نوترکیب مورد تایید قرار گرفت. برای اطمینان بیشتر از صحت دستوارهای ساخته شده، حضور تراژن‌ها توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تایید شد (شکل ۱، B و D). تجزیه PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تراژن‌ها وجود قطعه ۷۱۸ bp برای ژن *HC* و ۶۱۵ bp برای ژن *LC* را نشان داد که برابر با اندازه مورد انتظار قطعه تکثیر شده در شاهد مثبت (پلاسمیدهای نوترکیب pSAR-NTopTras-HC و pSAR-NTopTras-LC مورد استفاده در ساخت دستوارهای نوترکیب) بود، در حالی‌که در پلاسمید غیر نوترکیب pBIN19 هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد. بدین ترتیب دو دستواره نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی Trastuzumab با توالی بهینه شده برای توتون به صورت pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC نامگذاری شدند (شکل ۲).

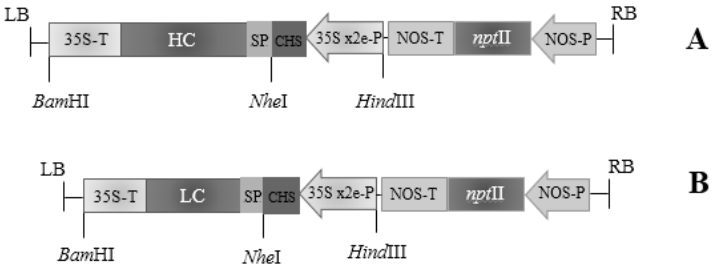
پس از ۴ روز هم‌کشتی، ریزنمونه‌های انتقالی به محیط گزینش حاوی ۱۵۰ mg/l کانامایسین منتقل شدند (شکل۳، D). القا و باززایی جوانه‌ها به طور مستقیم و بدون فاز کالوس انجام شد. جوانه‌های القا شده بر روی برگ‌های تلقیح نشده در محیط حاوی کانامایسین در اثر عامل انتخابی زرد شدند (شکل۳، F)، در حالی‌که در محیط بدون کانامایسین جوانه‌ها به صورت سبز و شاداب باقی مانده و رشد کردند (شکل۳، H)، که نشان دهنده تاثیر و کارایی کانامایسین به عنوان عامل انتخابی در فرآیند گزینش بود. کانامایسین در ۷۳ درصد از مطالعات تراریختی گیاه توتون به عنوان عامل انتخابی موثر گزارش شده است (Fischer et al. 2004). میزان بسیار پایین فرار در محیط گزینش نشان‌دهنده این است که مقاومت به کانامایسین به واسطه ژن *npt*II یک سیستم گزینشی مناسب برای باززایی گیاهچه‌های تراریخته توتون می‌باشد (Mayani et al. 2011; Allah Bakhsh et al. 2014). در تحقیق حاضر میزان فرار در حد بسیار پایین (۵٪ >) بود (داده‌ها نشان داده نشدند). پس از دوره گزینش ۳۰ روزه، شاخساره‌های

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]



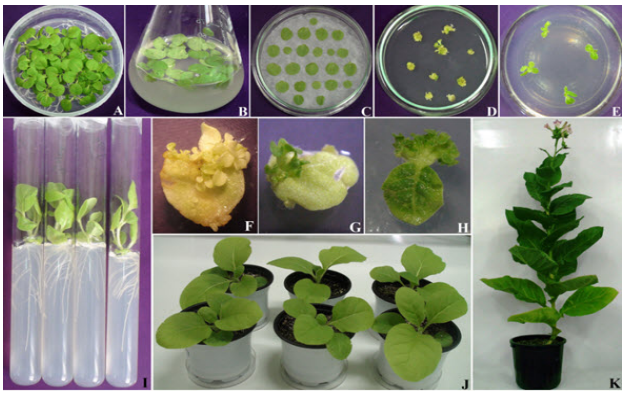
شکل۱- تایید ساختار مولکولی دستواره‌های نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کنندهٔ زنجیره سبک (LC) و سنگین (HC) آنتی‌بادی Trastuzumab (A, C) تجزیه برش به ترتیب برای دستواره نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC. M) نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)؛ 1) پلاسمید pBIN19 برش نیافته؛ 2) پلاسمید نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC, -LC برش نیافته؛ 3) برش پلاسمید pBIN19 با *Bam*HI؛ 4) برش پلاسمید نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC, -LC با *Bam*HI؛ 5) برش پلاسمید pBIN19 با *Bam*HI+*Hind*III؛ 6) برش پلاسمید نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC, -LC با *Bam*HI+*Hind*III (باند ۲۴۱۵ bp مطابق با اندازه مورد انتظار برای کاست ژنی *HC* و نوار ۱۷۰۴ bp مطابق با اندازه مورد انتظار برای کاست ژنی *LC*؛ 7) برش پلاسمید pBIN19 با *Nhe*I؛ 9) برش پلاسمید نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC, -LC با *Nhe*I؛ B, D) تجزیه PCR به ترتیب برای دستواره نوترکیبLC– و pBIN19-NTopTras-HC، C^+) پلاسمید pSAR-NTopTras-HC, -LC به عنوان شاهد مثبت؛ C_1^-) پلاسمید pBIN19 به عنوان شاهد منفی اول؛ ۱) پلاسمید نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC, LC؛ C_2^-) واکنش برش بدون DNA الگو به عنوان شاهد منفی دوم.



شکل ۲- نقشه فیزیکی بخش T-DNA پلاسمیدهای نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC (A) و pBIN19-NTopTras-LC (B). RB) نواحی مرزی راست؛ LB) نواحی مرزی چپ؛ Nos-P) راه‌انداز نوپالین سینتاز؛ *npt*II) ژن نئومایسین فسفوترانسفراز؛ *Nos-T*) توالی پایانی نوپالین سینتاز؛ 35Sx2e) راه‌انداز ویروس موزائیک کلم تقویت شده؛ CHS) ناحیه غیرترجمه شونده 5′ (5′-UTR) ژن چالکون سینتاز؛ SP) توالی نشانه ژن کینیتاز بازی آرابیدوپسیس؛ *HC*) ژن زنجیره سنگین؛ *LC*) ژن زنجیره سبک؛ 35S-T) توالی پایانی 35S.

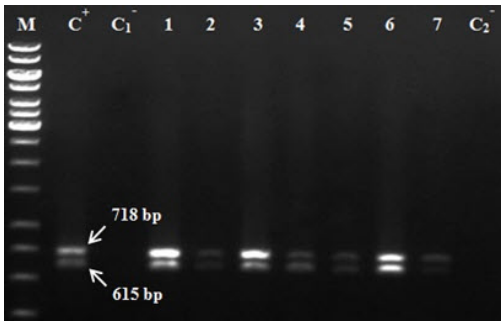
سبز (مقاوم به کانامایسین) از روی ریزنمونه‌های تلقیح شده جدا شدند و در محیط کشت MS پایه حاوی ویتامین‌های B5 و بدون تنظیم کننده رشد منتقل شدند. دو هفته بعد از انتقال به این محیط، همه گیاهچه‌ها (صددرصد) ریشه‌دار شدند (شکل ۳، I). سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به شرایط محیطی غیراستریل (گلخانه) با موفقیت انجام گرفت (شکل ۳، J). گیاهان سازگار شده تغییرات مورفولوژیکی قابل مشاهده‌ای در مقایسه با گیاهان مادری نشان ندادند. در این مطالعه مسیر باززایی به صورت مستقیم بود. باززایی مستقیم دارای مزایای بسیاری از جمله تولید در مقیاس بالا و در یک دوره کوتاه مدت و عدم وجود و یا پایین بودن تنوع سوماکلونی و تغییرات ژنتیکی ناخواسته به‌دلیل نداشتن فاز کالوس در کشت درون‌شیشه‌ای (بر خلاف روش باززایی غیر مستقیم) است (Stolarz et al. 1991; Pathi et al. 2013). چنین مزایایی در پروژه‌های تراریختی ژنتیکی گیاهان و همچنین برای تولید گیاهان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]



شکل ۳- فرآیند تراریختی توتون و باززایی گیاهان تراریخته با ژن‌های *HC* و *LC* آنتی‌بادی Trastuzumab. A) گیاهچه‌های بذری ۳۰ روزه توتون در محیط کشت ½ MS؛ B) تلقیح ریزنمونه‌های برگی با سوسپانسیون آگروباکتری حاوی پلاسمید نوترکیب؛ C) کشت ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط هم‌کشتی؛ D) کشت و باززایی شاخساره‌ها روی ریزنمونه‌ها در محیط گزینش حاوی ۱۵۰ mg/l کانامایسین؛ E) گیاهچه‌های کوچک جدا شده از روی ریزنمونه‌ها و کشت شده در محیط کشت پایه MS برای رشد بیشتر؛ F) نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط کشت حاوی کانامایسین (۱۵۰ mg/l) و زرد شدن ریزنمونه برگی و جوانه‌های القا شده در اثر کانامایسین؛ G) باززایی شاخساره‌های سبز طبیعی در محیط گزینش (حاوی ۱۵۰ mg/l کانامایسین)؛ H) نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط کشت بدون کانامایسین؛ I) ریشه‌زایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد؛ J) سازگاری گیاهچه‌های تراریخته احتمالی (PCR^+) به شرایط گلخانه‌ای؛ K) گلدهی گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی خارج از گلخانه برای تولید نسل T_1.

با یکنواختی ژنتیکی بالا در پروژه‌های به نژادی و یا جهت استفاده در کشاورزی مولکولی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس انبوه حائز اهمیت است (Mondal et al. 2001). در تجزیه Duplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها، گیاهچه‌های تراریخته باندهایی به اندازه ۷۱۸ bp (HC) و ۶۱۵ bp (LC) هم اندازه با باندهای تکثیر شده برای پلاسمیدهای مورد استفاده در فرآیند تراریختی، pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC (به عنوان شاهد مثبت) نشان دادند، در حالی‌که در گیاه غیرتراریخته تکثیری مشاهده نشد که دلیلی بر عدم حضور ژن‌های مذکور در ژنوم آن است (شکل ۴). همچنین، عدم مشاهده باند در نمونه بدون DNA الگو حاکی از صحت و درستی تجزیه PCR بود. بدین ترتیب آزمون PCR حضور اولیه تراژن‌ها را در گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین تایید کرد که نشان‌دهنده تلفیق حداقل یک نسخه از تراژن‌ها در ژنوم این گیاهان، صرف نظر از آلودگی احتمالی میان سلولی با آگروباکتری است. کارایی بالای تراریختی، از نقاط قوت یک پروتوکل تراریختی است که بستگی به عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و روش باززایی، ناقل پلاسمیدی، سویه آگروباکتری و کنترل آلودگی *A. tumefaciens* پس از هم‌کشتی دارد (Gelvin 2003). Allah Bakhsh et al. (2014) در مطالعه تاثیر پنج سویه *A. tumefaciens* بر میزان تراریختی توتون با روش باززایی غیرمستقیم، حداکثر کارایی تراریختی (۲۰ درصد) را با استفاده از سویه LBA4404 گزارش کردند. در تحقیق حاضر میزان کارآیی تراریختی بر اساس PCR با سویه LBA4404 و روش باززایی مستقیم بیش از ۹۰ درصد برآورد شد (داده‌ها نشان داده نشدند).



شکل ۴- تجزیه Duplex PCR برای گیاهچه‌های توتون مقاوم به کانامایسین حاصل از تلقیح با آگروباکتری حاوی دستوارهای نوترکیب pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *HC* و *LC* رمز کنندهٔ آنتی‌بادی Trastuzumab. M) نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)؛ (C^+) مخلوط ناقل‌های پلاسمیدی حاوی تراژن‌ها (شاهد مثبت)؛ ($C1^-$) گیاهچه غیر تراریخته (شاهد منفی اول)؛ ۷-۱) گیاهچه‌های تراریخته احتمالی توتون؛ ($C2^-$) واکنش PCR بدون DNA الگو (شاهد منفی دوم). نوار ۷۱۸ bp تکثیر ژن رمز کنندهٔ *HC* و نوار ۶۱۵ bp تکثیر ژن رمز کننده *LC* را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

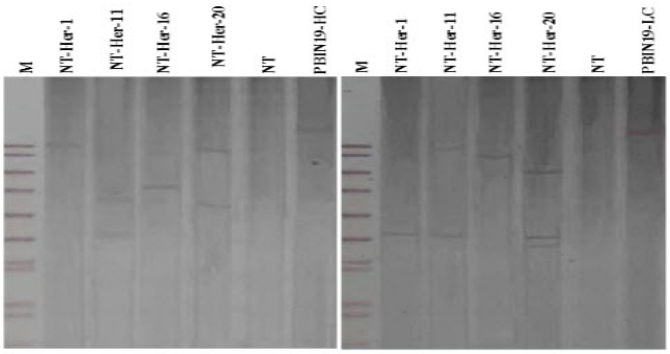
تلفیق تراژن‌ها در گیاهان تراریخته T_0 با استفاده از تجزیه لکه‌گذاری سادرن تایید شد. گیاهچه‌های تراریخته که DNA ژنومی آن‌ها به وسیله آنزیم *Nhe*I برش داده شده بود، باندهایی با اندازه‌های مختلف برای لاین‌های مورد بررسی نشان دادند (شکل۵). در شاهد مثبت (پلاسمیدهای pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC) باندی به اندازه موردانتظار مشاهده شد که نشان‌دهنده دورگه شدن کاوشگر نشاندار با تراژن و اتصال اختصاصی آن برای تشخیص قطعه مکمل خود یعنی ژن‌های *HC* و *LC* است. در نمونه DNA گیاه غیرتراریخته مطابق با انتظار باندی مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم وجود قطعه همولوگ با کاوشگر اختصاصی تراژن در ژنوم آن است. تجزیه لکه‌گذاری سادرن الگوی نواری منحصر به فردی برای هر یک از لاین‌های مورد بررسی نشان داد. بنابراین می‌توان این لاین‌ها را به عنوان رویدادهای تراریخته مستقل از هم[1] در نظر گرفت. تعداد نوارها در هر کدام از لاین‌ها نشان دهنده تعداد نسخه‌های درج شده از تراژن‌ها در ژنوم آن‌ها بود به طوری که می‌توان گفت لاین‌های NT-Her-16 و NT-Her-1 یک نسخه و لاین NT-Her-11 دو نسخه از هر یک از تراژن‌ها را دریافت کرده‌اند و لاین NT-Her-20 دارای دو نسخه از *HC* و سه نسخه از *LC* می‌باشد. در این تحقیق بر اساس نتایج حاصل از تجزیه لکه‌گذاری سادرن ژن‌های هدف در تعداد نسخه‌های پایین (یک یا دو نسخه) در ژنوم لاین‌های تراریخته مورد بررسی درج شدند (شکل۵). درج نسخه‌های کم در گیاهان تراریخته نتیجه بسیار مطلوبی است و عوامل متعددی مانند پتانسیل و توانایی بافت گیاهی و سلول‌های آگروباکتری مورد استفاده، تعداد سلول‌های باکتری در تلقیح بافت گیاهی و تعداد نسخه‌های T-DNA تولید شده در هر باکتری می‌تواند تعداد مکان تراژن و پیوستگی آن‌ها در ژنوم میزبان را تحت‌تاثیر قرار دهد (Somers et al. 2004). تراریختی پایدار گیاهان از طریق آگروباکتریوم و همچنین با استفاده از بمباران ذره‌ای امکان‌پذیر است ولی از آنجاکه تراریختی با واسطه آگروباکتریوم منجر به درج تعداد نسخه‌های پایین‌تری از T-DNA در ژنوم گیاه میزبان، نوآرایی کمتر DNA و کارایی تراریختی بالاتری می‌شود، نسبت به روش مستقیم انتقال DNA با استفاده از بمباران ذره‌ای دارای ارجحیت است (Cheng et al. 2004; Ko and Koprowski 2005; Jafari et al. 2009). انتقال تراژن‌ها به نسل بعد (T_1) به وسیله تجزیه PCR تایید شد (شکل ۹) که بیانگر پایداری ژنتیکی گیاه تراریخته و وراثت‌پذیری تراژن‌ها در نسل بعد بود. آزمون χ^2 (P= 0.29) بر اساس داده‌های PCR Duplex برای حضور همزمان هر دو تراژن، نسبت مندلی ۳:۱ را در نسل T_1 تایید کرد. وراثت مندلی ۳:۱ برای هر دو تراژن در گیاهان T_1 نشان دهنده تفکیک همزمان[2] هر دو تراژن و حاکی از درج آنها در موقعیت مکانی یکسان یا درج در دو مکان نزدیک و شدیدا پیوسته در ژنوم گیاه تراریخته مورد بررسی است.

تجزیه RT-PCR بیان ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سنگین و سبک آنتی‌بادی Trastuzumab در گیاهان تراریخته T_0 را تایید کرد. در این تجزیه از تکنولوژی 18S rRNA Competimer™ برای تکثیر رونوشت آن به عنوان کنترل داخلی و مقایسه میزان بیان تراژن‌ها استفاده شد. اگر چه 18S rRNA با میزان بیان تقریبا نامتغیر به عنوان کنترل داخلی در تجزیه‌های RT-PCR استفاده می‌شود، با این‌حال با توجه به میزان بالای رونوشت آن در RNA کل، در تجزیه‌های Multiplex RT-PCR به سرعت اجزای واکنش را به اتمام رسانده و لذا محصول رونوشت‌های نادر به سختی یا به طور غیرممکن قابل تشخیص خواهند بود درحالی‌که رونوشت 18S در فاز نمایی تکثیر قرار دارد. با استفاده از تکنولوژی 18S rRNA Competimer™ میزان تکثیر رونوشت 18S را می‌توان تا حد تکثیر مناسب رونوشت هدف کاهش داد. در این تحقیق طی بهینه‌سازی، نسبت مناسب competimer: 18S primer ۸:۳ در تجزیه RT-PCR تعیین شد و بدین صورت از رونوشت 18S به عنوان یک کنترل داخلی قابل اعتماد استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه (شکل ۶، A)، برای نمونه‌های گیاهان تراریخته باندهایی با اندازه‌های مورد انتظار (۷۱۸ bp و ۶۱۵ bp، به ترتیب برای ژن‌های *HC* و *LC*) و مطابق با باندهای تکثیر شده در واکنش حاوی مخلوط پلاسمیدهای نوترکیب مورد استفاده در فرآیند تراریختی (شاهد مثبت) تکثیر شد که نشان‌دهنده حضور رونوشت ژن‌های هدف در RNA کل حاصل از گیاهان تراریخته بود. برای نمونه گیاه غیر تراریخته (شاهد منفی

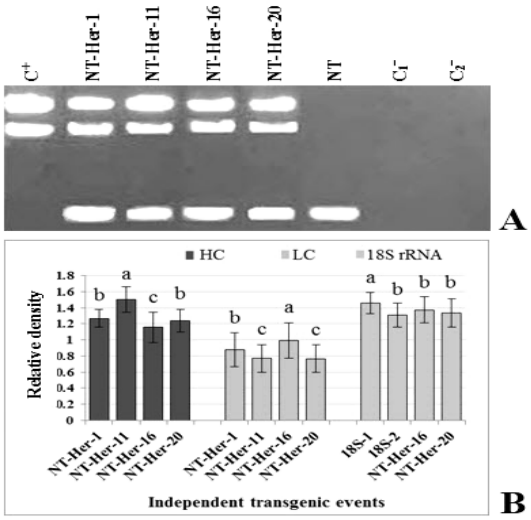
[1] Independent transgenic events

[2] Co-segregation

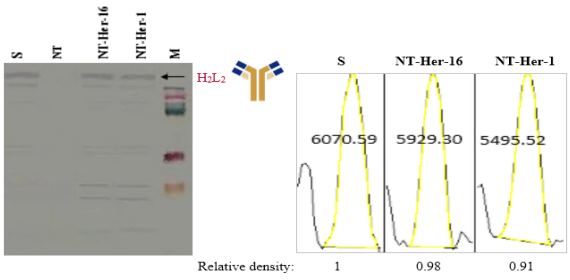
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]



شکل ۵- تجزیه لکه‌گذاری سادرن برای لاین‌های تراریخته توتون T_0 حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab. A) DNA ژنومی هضم شده با *Nhe*I و هیبرید شده با کاوشگر اختصاصی ژن *HC* نشاندار شده با DIG؛ B) غشای A استریپ شده و هیبرید شده با کاوشگر اختصاصی ژن *LC* نشاندار شده با DIG؛ M) نشانگر وزن مولکولی VII نشاندار شده با DIG (Roche)؛ (NT-Her-1, -11, -16, -20) لاین‌های تراریخته مستقل از یکدیگر (Independent transgenic events)؛ NT) گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی)؛ pBIN19-NTopTras-HC, -LC) ناقل‌های پلاسمیدی حاوی ژن *HC* و یا *LC* (شاهد مثبت). تعداد نوارها بیانگر تعداد نسخه‌های درج شده از تراژن‌ها در ژنوم گیاه است.



شکل ۶- A) تجزیه Semi-quantitative RT-PCR در گیاهان توتون تراریخته To حاوی ژن‌های رمز کنندهٔ آنتی‌بادی Trastuzumab. A) الکترفورگرام بیان ژن‌های *LC* و *HC*؛ +C) مخلوط پلاسمیدهای pBIN19-NTopTras-HC,-LC (شاهد مثبت)؛ (NT-Her-1, -11, -16, -20) لاین‌های تراریخته توتون To؛ NT) گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی اول)؛ $C1^-$) واکنش RT-PCR دارای RNA الگو به صورت بالک از گیاهان تراریخته و تیمار شده با RNase (شاهد منفی دوم)؛ $C2^-$) واکنش RT-PCR بدون RNA الگو (شاهد منفی سوم). B) نمودار بیان کمی شده (نسبی) تراژن‌ها بر اساس نرم‌افزار ImageJ 1.47. شدت نوارها پس از نرمال سازی با نوار کنترل داخلی (18S rRNA) مربوط به هر لاین تراریخته به مقدار کمی چگالی تصحیح شده (Adjusted density) تبدیل شدند. مقادیر دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون LSD از نظر آماری معنی‌دار ($P' \leq 0.01$) هستند.

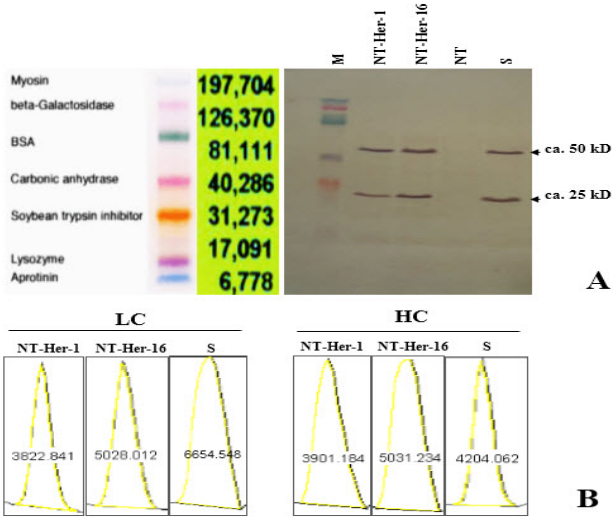


شکل ۷- A) تجزیه لکه‌گذاری وسترن برای لاین‌های تراریخته توتون T_0 حاوی ژن‌های رمز کنندهٔ زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab تحت شرایط احیا نشده. M) نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained standard (BioRad)؛ NT-Her-16 و NT-Her-1) لاین‌های تراریخته مستقل؛ NT) گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی)؛ S) IgG1 انسانی به عنوان استاندارد. علامت پیکان فرم تترامر (H_2L_2) Trastuzumab به عنوان غالب‌ترین فرم تولید شده در گیاهان توتون تراریخته را نشان می‌دهد. B) پلات پروفیل نوارهای حاصل از الگوی تترامر Trastuzumab. پیک حاصل از هر نوار توسط نرم افزار ImageJ کمی شد و به صورت چگالی نسبی (Relative density) بر اساس نمونه استاندارد بیان شد.

اول) فقط باند مربوط به رونوشت ژن 18S rRNA مشاهده شد که نشان‌دهنده عدم وجود رونوشت تراژن‌ها در گیاه غیر تراریخته، و به عبارت دیگر عدم وجود ژن‌های *HC* و *LC* در ژنوم گیاه مادری غیر تراریخته است. در واکنش RT-PCR دارای RNA الگو به صورت بالک از گیاهان تراریخته و تیمار شده با RNase (شاهد منفی دوم) نیز هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد که بیانگر عدم آلودگی نمونه‌های RNA مورد استفاده در تجزیه با DNA

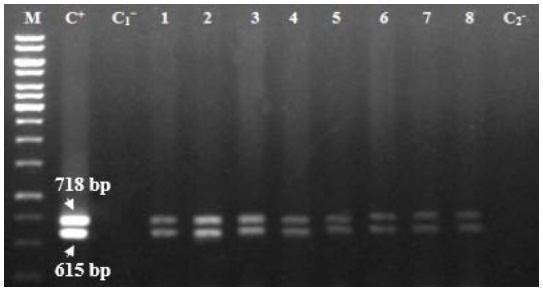
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

می‌باشد. همچنین در واکنش بدون RNA (شاهد منفی سوم) باندی مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم هر گونه آلودگی مخلوط مادر RT-PCR به RNA یا DNA غیر هدف است. با توجه به استفاده میزان تقریبا یکسان RNA کل از گیاهان تراریخته در تجزیه RT-PCR، به طور نسبی میزان بیان ژن‌های هدف در این لاین‌های مورد بررسی کمی شد. بر این اساس، لاین‌های NT-Her-11 و NT-Her-1 به ترتیب بیشترین میزان بیان ژن *HC* و لاین‌های NT-Her-16 و NT-Her-1 بیشترین میزان بیان ژن *LC* را نشان دادند (شکل۶، B). میزان بیان تراژن در گیاهان تراریخته می‌تواند تحت‌تاثیر عواملی مانند تعداد نسخه، اثرات موضعی در محل تلفیق و یا متیله شدن تراژن قرار گرفته و منجر به خاموشی تراژن یا ژن‌های درونی شود (Matzke and Matzke 1995; Kohi et al. 1996; Lechtenberg et al. 2003). در تحقیق حاضر، نتایج تجزیه لکه‌گذاری سادرن نشان داد که بیشتر گیاهان تراریخته مورد بررسی دارای درج تک نسخه‌ای از تراژن‌ها هستند و تجزیه RT-PCR نیمه کمی بالاترین میزان بیان ژن‌های هدف این گیاهان را نشان داد. Li et al. (2002) در مطالعه‌ای بر روی تاثیر تعداد نسخه‌های تراژن بر میزان بیان ژن *uidA* در تراریختی گیاهان توتون به کمک آگروباکتری سویه LBA4404 گزارش کردند که گیاهان با میزان بالای بیان *uidA* فقط دارای یک نسخه درج شده از ژن *uidA* هستند در حالی‌که گیاهان بدون بیان *uidA* دارای تعداد نسخه‌های بالاتری از ژن هدف (سه یا چهار نسخه) هستند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تعداد نسخه‌های ژنی بالا ممکن است باعث خاموشی بیان ژن‌های خارجی در گیاهان تراریخته شود. تجمع آنتی‌بادی Trastuzumab در بافت برگی توتون تراریخته توسط تجزیه لکه‌گذاری وسترن با استفاده از مخلوطی از آنتی‌بادی‌های اختصاصی goat Anti-human IgG-Gamma (γ)-specific AP-conjugated antibody و goat Anti-human IgG-Kappa (κ)-chain specific AP-conjugated antibody تحت شرایط SDS-PAGE احیا شده و غیر احیا تشخیص داده شد. در شرایط غیر احیا، غالب بودن باند پررنگ با اندازه بزرگتر مطابق با نوار مشاهده شده در IgG1 انسانی (به عنوان شاهد مثبت) تجمع آنتی‌بادی Trastuzumab به فرم تترامر (H_2L_2) را تایید کرد (شکل ۷، A). باندهای دیگر مشاهده شده در تجزیه ایمونوبلات مربوط به فرم‌های دیگر آن (فرم هتروتریمر، دیمر و مونومر) است که در کمترین میزان تشکیل شده‌اند بر اساس نتایج حاصل از تجزیه وسترن در شرایط احیا شده، در دو لاین تراریخته توتون نوارهای مورد انتظار ۵۰ kDa و ۲۵ kDa به ترتیب مربوط به زنجیره سنگین (HC) و زنجیره سبک (LC) آنتی‌بادی تشخیص داده شد که بیانگر تجمع پروتئین هدف در گیاهان تراریخته است. در گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی) هیچ باندی برای پروتئین‌های زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab ردیابی نشد (شکل ۸، A). نتایج حاصل از تجزیه وسترن تلفیق کامل کاست‌های ژنی (شامل راه‌انداز، نواحی رمز کنندهٔ ژن و توالی پایان‌دهنده) را بار دیگر در لاین‌های تراریخته تایید کرد. با مقایسه شدت نوارها و تجزیه غشا به وسیله نرم‌افزار ImageJ مشخص شد که میزان بیان در لاین NT-Her-16 نسبت به لاین NT-Her-1 بیشتر است (شکل ۷، B). میزان تقریبی Trastuzumab تجمع یافته معادل با ۰/۱ درصد پروتئین محلول کل بود.



شکل ۸- A) تجزیه لکه‌گذاری وسترن برای لاین‌های تراریخته توتون T_0 حاوی ژن‌های رمز کنندهٔ زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab تحت شرایط احیا شده. M) نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained standards (BioRad)؛ NT-Her-16 و NT-Her-1) لاین‌های تراریخته مستقل؛ NT) گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی)؛ S) نمونه استاندارد (Hetceptin). نوارهای kD ۲۵ و kD ۵۰ به ترتیب زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab را نشان می‌دهند. B) پلات پروفیل نوارهای زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab. پیک حاصل از هر نوار توسط نرم افزار ImageJ کمّی شد و به صورت چگالی نسبی (Relative density) بر اساس نمونه استاندارد بیان شد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]



شکل ۹- تجزیه Duplex PCR برای گیاهان تراریخته توتون T_1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *HC* و *LC* M) نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)؛ C^+) مخلوط ناقل‌های پلاسمیدی حاوی تراژن‌ها (شاهد مثبت)؛ C_1^-) گیاهچه غیر تراریخته (شاهد منفی اول)؛ ۱۷-۱) گیاهان تراریخته نسل T_1؛ C_2^-) واکنش PCR بدون DNA الگو (شاهد منفی دوم). نوار ۷۱۸ جفت بازی تکثیر ژن زنجیره سنگین و نوار ۶۱۵ جفت بازی تکثیر ژن زنجیره سبک Trastuzumab را نشان می‌دهد.

در سال‌های اخیر، انواع مختلف آنتی‌بادی‌های نوترکیب با طول کامل با استفاده از سیستم‌های بیان پایدار و یا بیان موقت با موفقیت در گیاهان تولید شده‌اند (Ko et al. 2005; Giritch et al. 2006; Villani et al. 2008; Grohs et al. 2010; Lai et al. 2010). اکثر تحقیقات نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های تک دودمانی تولید شده در گیاهان فعالیت‌های بیولوژیکی (از جمله اختصاصی بودن، سیتوتوکسیسیتی و فعالیت خنثی‌سازی) مشابه با آنتی‌بادی تولید شده در کشت‌های سلولی پستانداران را حفظ می‌کنند (Olea-Popelka et al. 2005; Almquist et al. 2006; McLean et al. 2007 Suzuki et al. 2007; Ben-Kasus et al. 2009; Fischer et al. 2009; Gomord et al. 2010; Grohs et al. 2010). مهمترین عامل برای تبدیل پروتئین‌های هترولوگ تولید شده در گیاهان از تحقیق توسعه‌ای به محصولات تجاری اطمینان از هزینه‌های رقابتی تولید است، و بهترین راه برای دست‌یابی به آن بالا بردن میزان بیان است. انتخاب راه‌انداز مناسب یکی از مهم‌ترین عوامل نه تنها برای افزایش مورد انتظار بیان پروتئین نوترکیب با افزایش رونوشت ژن هدف، بلکه هماهنگ کننده بیان زنجیره‌های سبک و سنگین می‌باشد. راه‌انداز CaMV 35S از منشا ویروس موزاییک کلم معمول‌ترین نوع راه‌انداز استفاده شده در سازه‌های بیانی می‌باشد (Benfey et al. 1990; Floss et al. 2008; Sainsbury and Lomonossoff 2008). در دستواره‌های ژنی تهیه شده در این تحقیق از واریانت تقویت شده راه‌انداز CaMV 35S x2e استفاده شد. این راه‌انداز دارای تکرارهای پشت سرهم یک بخش بالادست به اندازه ۲۵۰ bp است که این بخش تکرار شده باعث تقویت راه‌انداز هترولوگوس شده و باعث افزایش فعالیت رونویسی ژن به اندازه ده‌ها برابر نسبت به راه‌انداز معمول CaMV 35S می‌شود (Kay et al. 1987). برای افزایش بیان پروتئین هدف در گیاهان علاوه بر استفاده از راه‌انداز استراتژی‌های مختلفی برای بهبود عملکرد نهایی پروتئین نوترکیب توسعه داده شده است. از جمله استفاده از تقویت کننده‌های رونویسی و یا ترجمه (توالی تقویت کنندهٔ ترجمه Ω از ویروس موزاییک توتون، TMV)، نواحی ترجمه نشده '۵ و '۳ (5' UTR و 3') تثبیت کنندهٔ mRNA (5' UTR ژن *Chalcone synthase*) (Streatfield 2007) و توالی‌های نشانه برای هدف‌گیری پروتئین به بخش‌های معین زیر سلولی (Voss et al. 1995). در دستواره‌های ژنی تهیه شده در این تحقیق نیز از توالی پایان‌دهنده CHS 5' UTR برای افزایش تجمع و پایداری آنتی‌بادی Trastuzumab استفاده شد. نواحی 5' UTR و 3' UTR با تاثیر بر پایداری mRNA و کارایی ترجمه، نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی ایفا می‌کنند (van der Velden and Thomas 1999; Jansen 2001; Mignone et al. 2002). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که 5' UTR ژن *Chalcone synthase* باعث بهبود کارایی ترجمه در سلول‌های توتون شده است (Torres et al. 1995; Zimmerman et al. 1998). همچنین نشان داده شده که 5' UTR از منشاء ژن‌های *rbcL* و *atpB* (Anthonisen et al. 2001) و *sps1* (Trujillo et al. 2003) و *NtADH* (Satoh et al. 2004) نیز باعث افزایش میزان ترجمه می‌شوند. Garabagi et al. (2012) گزارش کردند که انواع مختلف 5' UTR از منشا گیاهی و یا ویروس‌های گیاهی متصل به توالی رمز کننده زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی Trastuzumab به طور موثری تجمع این آنتی‌بادی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آنها افزایش حداکثر تا ۲۰ برابر میزان بیان پروتئین هدف را با استفاده از کاست‌های بیان مختلف حاوی 5' UTR های متفاوت گزارش کردند. Kanoria and Burma (2012) نیز در مطالعه خود مشاهده کردند که استفاده از یک 5′UTR سنتتیک باعث افزایش چند برابری بیان ژن‌های گزارشگر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

gus و *gfp* می‌شود. در تحقیق حاضر از 5´ UTR ژن *CHS* استفاده گردید، به نظر می‌رسد این توالی از عوامل افزایش دهنده تجمع Trastuzumab بوده است.

پایداری و تجمع پروتئین نوترکیب می‌تواند با هدف‌گیری و نگه‌داری آن در اجزا سلولی مسیرهای ترشحی، مانند شبکه آندوپلاسمی با استفاده از پپتیدهای نشانه در انتهای کربوکسیلی افزایش یابد (Conrad and Fiedler 1998). هدف‌گیری پروتئین خارجی به شبکه آندوپلاسمی به طور گسترده‌ای برای افزایش تجمع پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گرفته است (Boevink et al. 1999; Zheng et al. 2004; Dobhal et al. 2013). با این‌حال پروتئین‌ها می‌توانند با استفاده از پپتیدهای نشانه در انتهای آمینی به طور موقت به درون شبکه آندوپلاسمی و نهایتا به آپوپلاست هدف‌گیری شوند (Gao et al. 2004). در تحقیق حاضر از پپتید نشانه کیتیناز بازی[1] Arabidopsis در انتهای آمینی هر دو زنجیره آنتی‌بادی Trastuzumab استفاده شد. این توالی نشانه باعث انتقال موقت پروتئین نوترکیب به شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی و در نهایت ترشح آن به مسیر آپوپلاستیک[2] می‌شود (Xu et al. 2007). اگر چه میزان بالای پروتئازها در فضای آپوپلاست می‌تواند برای پروتئین نوترکیب مشکل‌آفرین باشد، ولی ترشح در فضای آپوپلاست نیز می‌تواند منجر به تجمع بیش از حد و حتی پایداری بالای پروتئین نوترکیب در مقایسه با تجمع سیتوزولی شود (Zimmermann et al. 1998; Schillberg et al. 1999; Peeter et al. 2001). برای جلوگیری از تخریب بیش از حد پروتئین نوترکیب در آپوپلاست توسط پروتئازها، می‌توان با ایجاد شرایط رطوبت بالا به طور کوتاه مدت (۲۴ ساعت) تعرق گیاه را بالا برد و منجر به آزادسازی پروتئین نوترکیب از فضای آپوپلاست به جریان تعریق در سطح بیرونی برگ شد تا پروتئین هدف بتواند به صورت مایع تعریقی[3] در سطح برگ تجمع یابد، در اینصورت استخراج آن می‌تواند به راحتی و بدون استفاده از یک بافر استخراج کمپلکس انجام گیرد بدون اینکه بخش قابل توجهی از پروتئین در اثر عدم لیز مناسب دیواره سلولی هدر رود (Komarnytsky et al. 2000; Nathanial and McDonald 2013). گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های پیچیده مانند آنتی‌بادی‌ها برای پایداری بیشتر، کاهش حساسیت به پروتئازها و عملکرد بیولوژیکی مناسب آنها ضروری است. اگر چه این فرآیند در سلولهای گیاهی (با اندکی تفاوت) مشابه با سلول‌های پستانداری انجام می‌شود، با این‌حال مهندسی گلیکوزیلاسیون گیاه میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با گلیکوفرم‌های تیپ انسانی شاید لازم باشد. Grohs et al. (2010) طی مطالعه‌ای تولید آنتی-بادی Trastuzumab را در توتون بدون مهندسی گلیکوزیلاسیون تیپ انسانی گزارش کردند و پروتئین حاصل پاسخ ایمونولوژیک مناسب و مشابه با Herceptin تجاری حاصل از CHO بر علیه رده‌های سلولی سرطان پستان بیان کننده HER2/neu نشان داد. لذا انتظار بر این است که آنتی‌بادی تولید شده در تحقیق حاضر نیز بتواند پاسخ ایمنولوژیک مناسب در برابر رده‌های سلولی سرطانی نشان دهد، با این حال تجزیه سیتوتوکسیتی، پروفیل گلیکوزیلاسیون، مقایسه ساختاری Trastuzumab گیاهی با هرسپتین تجاری از جمله مواردی است که در مطالعات بعدی بایستی انجام شود. بیان آنتی بادی‌های نوترکیب در گیاهان در پلت‌فرم‌های بیانی مختلف به صورت تراریختی پایدار و تراریختی موقت گزارش شده است (Koi et al. 2005; Lai et al. 2010) و معمولا بیان موقت مبتنی بر وکتورهای ویروسی کارآیی بالایی از نظر تولید قابل توجه پروتئین‌های نوترکیب نشان داده‌اند (Gleba et al. 2007). لذا در مطالعات بعدی می‌توان تولید Trastuzumab را با استفاده از وکتورهای بیانی مبتنی بر ویروس ارزیابی کرد. تولید موفق آنتی‌بادی تک دودمانی در تحقیق حاضر نشان داد که پلت‌فرم گیاهی می‌تواند به عنوان یک تکنولوژی جایگزین مناسب برای تولید پروتئین‌های دارویی با ارزش بالا مانند Trasntuzumab مورد استفاده قرار گیرد.

[1] Basic chitinase signal peptide
[2] Apoplastic pathway
[3] Guttation fluid

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی با کد ۹۳/ک/۰۰۳ مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه است که بدینوسیله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه ارومیه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی لازم جهت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود. از جناب آقای دکتر موسی گردانه (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران) به خاطر اعطای پلاسمیدهای pBSK-Her2-HC و pBSK-Her2-LC کمال تشکر دارد. همچنین از جناب آقای مهندس محمدرضا صلواتی (مرکز تحقیقات توتون تیرتاش، مازندران) به خاطر فراهم آوردن بذر مورد نیاز سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Afsharfard A, Mozaffar M, Orang E, Tahmasbpour E (2013) Trends in epidemiology, clinical and histopathological characteristics of breast cancer in Iran: results of a 17 year study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 14:6905-6911 (In Farsi).

Akbarzadeh-Sharbaf S, Yakhchali B, Minuchehr Z, Shokrgozar MA, Zeinali S (2013) Expression enhancement in trastuzumab therapeutic monoclonal antibody production using genomic amplification with methotrexate. Avicenna Journal of Medical Biotechnology 5:87-95.

Allah Bakhsh, Anayol E, Ozcan SF (2014) Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. Emirates Journal of Food and Agriculture 26:259-264.

Almquist KC, McLean MD, Niu YQ, Byrne G, Olea-Popelka FC, Murrant C, Barclay J, Hall JC (2006) Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. Vaccine 24:2079-2086.

Benfey PN, Ren L, Chua NH (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomainsin early stages of plant development. EMBO Journal 9:1677-1684.

Ben-Kasus T, Schechter B, Lavi S, Yarden Y, Sela M (2009) Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: relevance of receptor endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 106:3294-3299.

Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research 12: 8711-8721.

Biemelt S, Sonnewald U (2005) Molecular farming in plants. Nature encyclopedia of life sciences London Nature Publishing Group.

Boevink P, Martin B, Oparka K, Cruz SS, Hawes C (1999) Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin. Planta 208:392-440.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Cheng M, Lowe BA, Spencer TM, Ye X, Armstrong CL (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant 40:31-45.

Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. Plant Molecular Biology 38:101-109.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation Version II. Plant Molecular Biology Report 1:19-21.

Dobhal Chaudhary VK, Singh A, Pandey D, Kumar A, Agrawal S (2013) Expression of recombinant antibody (single chain antibody fragment) in transgenic plant *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. Molecular Biology Reports 40:7027-7037.

Ehsasatvatan M (2014) *Agrobacterium*- mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with the light and heavy-chain genes encoding trastuzumab antibody. Dissertation, University of Urmia, Iran.

Fischer R, Emans NJ, Twyman RM, Schillberg S (2004) Molecular farming in plants: technology platforms. In: Goodman RB (Ed.) Encyclopedia of plant and crop science, Marcel Dekker, New York, 753-756.

Fischer R, Schillberg S, Twyman RM (2009) Molecular Farming of Antibodies in Plants: Recent Advances in Plant Biotechnology. Springer press, New York, 35-63.

Fischer R, Twyman RM, Schillberg S (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health Vaccine 21:820-825.

Floss DM, Sack M, Stadlmann J, Rademacher T, Scheller J, Stoger E, Fischer R, Conrad U (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. Plant Biotechnology Journal 6:379-391.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirments of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.

Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004) Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca^{2+}] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. Plant Physiology 134:898-908.

Garabagi F, Gilbert E, Loos A, McLean MD, Hall JC (2012) Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. Plant Biotechnology Journal 10:1118-1128.

Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:16-37.

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

Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organizational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology 20:1203-1207.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2006) Viral vectors for the expression of proteins in plants. Current Opinion in Biotechnology 18:134-141.
Gomord V, Fitchette A, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye, L (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnology Journal 8:564-587.
Grohs BM, Niu Y, Veldhuis LJ, Trabelsi S, Garabagi F, Hassell JA, Mclean MD, Hall JC (2010) Plant produced Trastuzumab inhibits the growth of HER2 positive cancer cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58:10056-10063.
Jafari M, Norouzi p, Malboobi MA, Ghareyazie B, Valizadeh M, Mohammadi SA, Mousavi M (2009) Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic suger beetplants expressing synthetic *cry1Ab* gene. Euphytica 165:333-344.
Jafari M, Norouzi P (2012) Plants as green bioreactors for vaccine antigens production. Journal of Biosafety 4: 67-90 (In Farsi).
Jalali Javaran M, Mohebodini M, Masoumi Asl M, Seifi Nabi Abad H, Alizadeh H, Mahbodi F, et al. (2009) The success of molecular farming in Iran. Journal of Agricultural Biotechnology 1:19-48 (In Farsi).
Jansen, RP (2001) mRNA localization: message on the move. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:247-256.
Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 60: 277-300.
Kanoria S, Burma PK (2012) A 28 nt long synthetic 50UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants. BMC Biotechnology 12:85.
Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236:1299-1302.
Kingsbury NJ, McDonald KA (2013) Selective Recovery of apoplast-targeted recombinant proteins from plant leaf tissue. In: AIChE annual meeting. USA, California, San Francisco.
Ko K, Koprowski H (2005) Plant biopharming of monoclonal antibodies. Virus Research 111: 93-100.
Ko K, Steplewski Z, Glogowska M, Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant derived mAb. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102:7026-7030.
Kohi A, Ghareyazie B, Kim HS, Khush GS, Benett J (1996) Cytosine methylation implicated in silencing of β-glucuronidase genes in transgenic rice. In: Rice Genetics III Proceeding of the 3rd International Rice Genetics Symposium. Philippines, IRRI, Manila, 16-20.
Komarnytsky S, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Alam M Z, Raskin I (2000) Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid. Plant Physiology 124:927-933.
Komarova TV, Kosorukov VS, Frolova OY, Petrunia IV, Skrypnik KA, Gleba YY, Dorokhov YL (2011) Plant-made trastuzumab (herceptin) inhibits her2/neu+ cell proliferation and retards tumor growth. PLoS ONE 6: 1-7.
Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS, Chen Q (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences-USA 107:2419-2424.
Lechgtenberg B, Schuberty D, Forsbachz A, Gils M, Schmidt R (2003) Neither inverted repeat T-DNA configurations norarrangments of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. Plant Journal 34:507-551.
Li XG, Chen SB, Lu ZX, Chang TJ, Zeng QC, Zhu Z (2002) Impact of copy number on transgene expression in tobacco. Acta Botanica Sinica 44:120-123.
Matzke MA, Matzke AJM (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? Plant Physiology 107:679-685.
Mayani M, McLean MD, Hall JC, Filipe CDM, Ghosh R (2011) Recovery and isolation of recombinant human monoclonal antibody from transgenic tobacco plants. Biochemical Engineering Journal 54:103-108.
McLean MD, Almquist KC, Niu Y, Kimmel R, Lai Z, Schreiber JR, Hall JCA (2007) human anti-Pseudomonas aeruginosa serotype O6ad immunoglobulin G1 expressed in transgenic tobacco is capable of recruiting immune system effector function in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51:3322-3328.
Mignone, F, Gissi, C, Liuni, S, Pesole, G (2002) Untranslated regions of mRNAs. Genome Biology 3:1-10.
Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK (2001) Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L) O Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Reports 20:712-720.
Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-479.
Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status of the year. Nucleic Acids Research 28:292.
Norum J, Risberg T, Olsen JA (2005) A monoclonal antibody against HER-2 (Trastuzumab) for metastatic breast cancer: a model-based cost-effectiveness analysis. Annals of Oncology 16: 909-914.
Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. Biotechnology Advances 29:210-222.
Olea-Popelka F, McLean MD, Horsman J, Almquist K, Brandle JE, Hall JC (2005) Increasing expression of an anti-picloram single-chain variable fragment (ScFv) antibody and resistance to picloram in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:6683-6690.
Peeters K, De Wilde C, Depicker A (2001) Highly efficient targeting and accumulation of a F(ab) fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. European Journal of Biochemistry 268:4251-4260.
Potvin, G, Zhang, Z (2010) Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. Biotechnology Advances 28:910-918.
Rasband WS (2014) ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available at http://imagejnihgov/ij.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]

Sainsbury F, Lomonossoff GP (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. Plant Physiology 148:1212-1218.
Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
Satoh J, Kato K, Shinmyo A (2004) The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. Journal of Bioscience and Bioengineering 98:1-8.
Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fisher R (1999) Apoplastic and cytosolic expression of full size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. Transgenic Research 8: 255-263.
Shojaei S, Gardaneh M (2012) Monoclonal antibody Herceptin expression in eukaryotic cells and the analysis of HER2 reduction in breast cancer cell lines. Iranian Journal of Breast Diseases 5:29-44. (In Farsi).
Somers DA, Olhoft PM, Makarevitch IF, Suitashev SK (2004) Mechanism(s) of transgene locus formation. In: DZ Skinner and GH Liang (Eds.) Genetically modified crop: their development, uses and risks Food Products, Haworth Press, New York, 30-34.
Stoger E, Ma JKC, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Current Opinion in Biotechnology 16:167-173.
Stolarz A, Macewicz J, Lorz H (1991) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum L*. Journal of Plant Physiology 137:347-357.
Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. Plant Biotechnology Journal 5:2-15.
Suzuki E, Niwa R, Saji S, Muta M, Hirose M, Iida S, Shiotsu Y, Satoh M, Shitara K, Kondo M, Toi M (2007) A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients Clinical Cancer Research 13:1875-1882.
Torres E, Vaquero C, Nicholson L, Sack M, Stöger E, Drossard J, Christou P, Fischer R, Perrin Y (1999) Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. Transgenic Research 8:441-449.
Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. Biotechnology Advances 28:214-221.
Trujillo MM, Briones VL, Chavez-Barcenas T, Herrera-Estrella L (2003) Functional analysis of the 5' untranslated region of the sucrose phosphate synthase rice gene (*sps1*). Plant Science 165:9-20.
van der Velden AW, Thomas AA (1999) The role of the 5′ untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 31:87-106.
Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E, Donini M (2008) Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. Plant Biotechnology Journal *7*:59-72.
Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch H, Liao Y, Kreuzaler F, Fischer R (1995) Reduced virus infectivity in *N tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. Molecular Breeding 1:39-50.
Xu F, Fan C, He Y (2007) Chitinases in *Oryza sativa* ssp. japonica and Arabidopsis thaliana. Journal of Genetics and Genomics 34:138-150.
Zheng H, Kunst L, Hawes C, Moore I (2004) A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Plant Journal 37:398-414.
Zimmermann S, Schillberg S, Liao YC, Fischer R (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabaccum*. Molecular Breeding 4:369-379.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.2.0]