ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۳۷۳-۳۶۵

ارزیابی اثر هدف‌گیری درون سلولی روی تجمع نانوبادی نوترکیب Anti-VEGF در گیاه کدو

Investigating the effect of subcellular targeting on Anti-VEGF recombinant nanobody accumulation in cucurbit plant

مژگان سلیمانی زاده*[۱]، مختار جلالی جواران[۲]، عبدالرضا باقری[۳]، مهدی بهدانی[۴]

۱-استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های دارویی، بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

Mojgan Soleimanizadeh*[1], Mokhtar Jalali Javaran[2], Abdolreza Bagheri[3], Mahdi Behdani[4]

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2- Professor, Department of Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Associate Professor, Venom & Biotherapeutics Molecules Lab, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.soleimani380@gmail.com

(تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۳/۸- تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۸/۲)

چکیده

زراعت مولکولی در سه دهه‌ی اخیر به‌عنوان یک استراتژی جایگزین و مقرون به‌صرفه برای تولید موفق صدها پروتئین نوترکیب دارویی در مقیاس بالا با استفاده از گیاهان ظهور کرده است. از آنجا که سلول‌های توموری برای رشد و تهاجم به رگزایی نیاز دارند، لذا هدف‌گیری مهمترین فاکتور رگزایی یعنی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) با استفاده از پروتئین نوترکیب دارویی Anti-VEGF بیان شده در گیاه می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد موثر برای مهار رگزایی و درمان سرطان عمل نماید. یکی از مشکلات اصلی برای تجاری‌سازی زراعت مولکولی سطح بیان پایین پروتئین نوترکیب می‌باشد. بنابراین رویکردهای متعددی از جمله استفاده از پیش‌برنده‌های قوی رونویسی، بهینه‌سازی کدونی توالی پروتئین، هدف‌گیری درون سلولی مناسب و آزمون سیستم‌های بیانی مختلف مبتنی بر گیاه برای افزایش بیان پروتئین ایجاد شده است. در این مقاله، اثر هدف‌گیری آپوپلاستی و شبکه آندوپلاسمی روی تجمع پروتئین نوترکیب Anti-VEGF در گیاه کدو بررسی شد. بدین منظور، آنالیزهای مولکولی مختلف (RT-PCR، Dotblot، SDS-PAGE ، Westernblot و ELISA) انجام شد. نتایج نشان داد که هدف‌گیری به شبکه آندوپلاسمی می‌تواند منجر به تجمع بالاتر پروتئین نوترکیب (شش برابر) نسبت به آپوپلاست شود. بنابراین شبکه آندوپلاسمی می‌تواند مکان مناسب‌تری برای بیان پروتئین نوترکیب هدف و سایر پروتئین‌های نوترکیب دیگر نسبت به آپوپلاست باشد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین نوترکیب
رگزایی
زراعت مولکولی
شبکه آندوپلاسمی
هدف‌گیری درون سلولی

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

مقدمه

پروتئین‌های نوترکیب، پروتئین‌های خارجی هستند که در میزبان‌های بیانی تولید و نقش مهمی را در بسیاری از جنبه‌های زندگی ما ایفا می‌کنند. به‌طور مثال آنزیم‌های نوترکیب در صنایع غذایی و شیمیایی و به‌عنوان پروتئین‌های با کیفیت بالا برای کاربردهای درمانی و تشخیصی و واکسن‌ها، داروها و آنتی بادی‌های نوترکیب هم برای درمان و یا جلوگیری از بیماری‌های انسان یا حیوان استفاده می‌شوند (Burnett & Burnett 2020; Schillberg & Finnern 2021).

از زمانی که اولین داروی نوترکیب (انسولین انسانی) توسط سازمان غذا و دارو (FDA) تایید شد، افزایش چشمگیری در تعداد و استفاده از پروتئین‌های دارویی به‌خصوص آنتی‌بادی‌ها بوجود آمده است. از آن زمان تاکنون، صدها پروتئین نوترکیب دارویی وارد بازار شده و بیش از صد پروتئین نوترکیب دارویی نیز در حال تولید است (Burnett & Burnett 2020). از سال ۲۰۱۱ تا آگوست ۲۰۱۶ سازمان غذا و دارو امریکا ۶۲ پروتئین دارویی نوترکیب را تایید نموده است که تقریبا نیمی از این تعداد را آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تشکیل می‌دهند (Lagassé et al. 2017). ارزش بازار جهانی پروتئین‌های دارویی در سال ۲۰۱۸ تقریبا ۹۳ میلیارد دلار بوده و پیش‌بینی شده است که تا سال ۲۰۲۳ به ۱۷۳/۸ میلیارد دلار برسد (Burnett & Burnett 2020).

در بیماری سرطان، رگزایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید از شبکه مویرگی قبلی) فرآیندی ضروری برای توسعه تومور بوده و توسط انواعی از فاکتورها تحریک می‌شود (Folkman 2007; Gordon et al. 2010). فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی (VEGF)، یک مولکول کلیدی در این فرآیند بوده و به‌عنوان یکی از اهداف اصلی در درمان سرطان در نظر گرفته می‌شود. ثابت شده که میانکنش بین VEGF و گیرنده‌های آن برای رگزایی تومور ضروری است. بنابراین، مهار میانکنش VEGF/VEGFR2 با استفاده از آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان یک گزینه درمانی برای جلوگیری از رگزایی و گسترش سرطان می‌باشد (Behdani et al. 2012; Karami et al. 2020). نانوبادی‌ها عوامل درمانی موثری در پزشکی به‌حساب می‌آیند. این قطعات که به‌طور معمول در سرم خون شتر موجود بوده، از قطعات آنتی‌بادی متغیر زنجیره سنگین مشتق شده و کوچکترین قطعه آنتی‌بادی بوده که به‌طور اختصاصی به مولکول‌های هدف متصل می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده که این قطعات به‌دلیل اندازه کوچک قدرت نفوذ کافی به تومورهای جامد را داشته و می‌توانند موثرتر از آنتی‌بادی‌های کامل تجاری عمل نمایند. همچنین این قطعات پایدارتر و محلول‌تر می‌باشند (Muyldermans et al. 2009).

کشت‌های سلولی پستانداران هنوز هم سیستم عمده برای تولید آنتی‌بادی‌های تجاری می‌باشند. اما تولید در مقیاس بالا نیاز به سرمایه‌گذاری بالا داشته و هزینه‌های عملیاتی و نگهداری آن‌ها بالاست (Obembe et al. 2011). در سه دهه‌ی اخیر زراعت مولکولی (Molecular farming) به‌عنوان یک استراتژی جایگزین و مقرون به‌صرفه برای تولید موفق صدها پروتئین نوترکیب دارویی از قبیل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و ... در مقیاس بالا با استفاده از گیاهان ظهور کرده است (Schillberg & Finnern 2021). گیاهان سیستم بیانی جذابی با مزایای متعدد از جمله عدم آلودگی به عوامل بیماریزای انسانی، هزینه‌ی پایین تولید نسبت به سایر سیستم‌ها، دارا بودن امکانات سیستم‌های یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه مناسب، تولید در مقیاس بالا و غیره ارائه می‌دهند (Ma & Wang 2012; Dirisala et al. 2017). یکی از مشکلات اصلی برای تجاری‌سازی تولید پروتئین نوترکیب در بیوراکتورهای گیاهی سطوح بیان پایین می‌باشد. رویکردهای متعددی از جمله: استفاده از پیش‌برنده‌های قوی رونویسی، بهینه‌سازی کدونی توالی پروتئین، هدف‌گیری درون سلولی مناسب، و استفاده از سیستم‌های بیانی گیاهی مختلف برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب به‌کار گرفته شده است (Gerasimova et al. 2016; Saberianfar & Menassa 2018).

در این تحقیق، به‌منظور بررسی اثر هدف‌گیری درون سلولی روی تجمع پروتئین نوترکیب Anti-VEGF، پروتئین نوترکیب هدف با استفاده از سیگنال پپتیدهای مناسب به اندامک‌های درون سلولی شبکه آندوپلاسمی و آپوپلاست هدف‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا سازه‌های ژنی هدف در ناقل ویروسی pZGFP همسانه‌سازی و پس از مایه‌زنی گیاهان کدو با ناقل‌های ویروسی نوترکیب و انجام آنالیزهای مولکولی مختلف (RT-PCR، Dotblot، SDS-

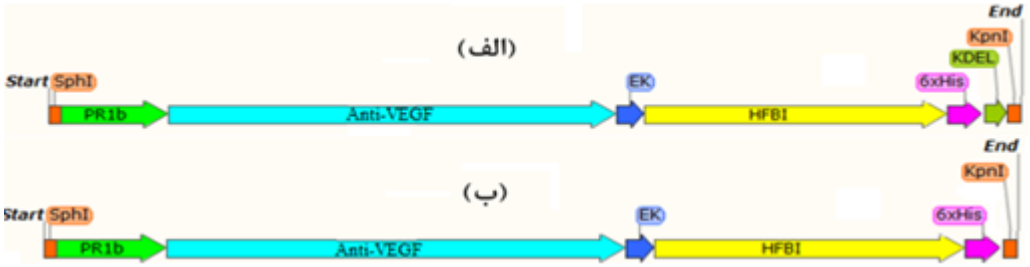
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

Westernblot PAGE و ELISA)، نتایج نشان داد که هدف‌گیری به شبکه آندوپلاسمی بیان پروتئین را حدودا شش برابر نسبت به بیان آن در آپوپلاست افزایش می‌دهد. بنابراین شبکه آندوپلاسمی می‌تواند مکان مناسب‌تری برای بیان سایر پروتئین‌های نوترکیب نسبت به آپوپلاست باشد.

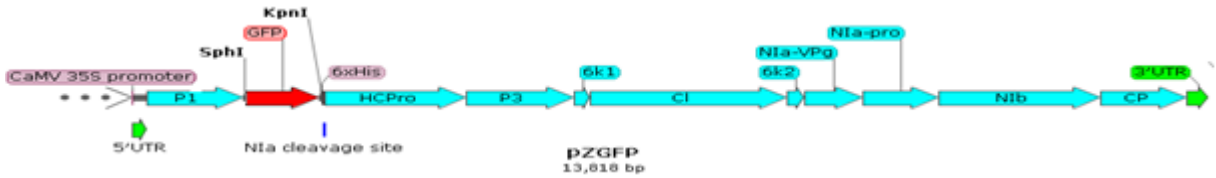
مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو سازه ژنی استفاده شد. سازه ژنی اول (NbI) که جهت هدف‌گیری نانوبادی به شبکه آندوپلاسمی طراحی شده بود (شکل ۱- الف) و شامل توالی‌های Pr1b، ژن رمز کننده‌ی پروتئین Anti-VEGF، جایگاه برش آنزیم انتروکیناز (EK)، پروتئین HFBI (جهت خالص‌سازی پروتئین نوترکیب)، His-tag، سیگنال KDEL و جایگاه آنزیم‌های برشی *Sph*I و *Kpn*I بود.

سازه ژنی دوم (NbII) نیز جهت هدف‌گیری به آپوپلاست طراحی شده و فاقد توالی KDEL بود (شکل ۱- ب). پس از تهیه سازه‌های ژنی هدف، این سازه‌ها در ناقل ویروسی هدف (آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) همسانه‌سازی شدند (شکل ۲). بدین منظور، ناقل‌های pJET-Anti-VEGF،pUC57-Anti-VEGF همراه با ناقل ویروسی هدف مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پس از جداسازی محصولات حاصل از هضم، قطعات مربوط به ژن هدف و ناقل ویروسی با استفاده از کیت تخلیص (Expin Gel SV- GeneAll، کره جنوبی) خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال بین آن‌ها انجام (Sambrook et al. 2006) و محصول واکنش اتصال به سلول‌های مستعد E. coli سویه DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی وارد شد (Sambrook et al. 2006).



شکل ۱- نمایی شماتیک از سازه‌های ژنی هدف جهت هدف‌گیری به شبکه آندوپلاسمی (الف) و آپوپلاست (ب): Pr1b توالی نوکلئوتیدی سیگنال پپتید ترشحی، Anti-VEGF توالی نوکلئوتیدی رمز کننده‌ی ژن نانوبادی، EK توالی جایگاه برش آنزیم پروتئازی انتروکیناز، HFBI توالی رمز کننده‌ی پروتئین HFBI، 6xHis توالی رمز کننده شش اسید آمینه هیستیدین، KDEL سیگنال نگه‌داشت پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، *SphI* و *KpnI* جایگاه‌های تشخیصی آنزیم‌های برشی



شکل ۲- تصویر شماتیک از ناقل ویروسی pZGFP : محل درج ژن هدف حدفاصل بین ژن‌های P1 و HC-Pro و بین جایگاه آنزیم‌های برشی *SphI* و *KpnI* می‌باشد. یک جایگاه هضم پروتئینی مربوط به NIa در انتهای آمینی HC-Pro برای تولید شکل آزاد پروتئین قرار داده شده است.

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

ناقل‌های ویروسی نوترکیب با استفاده کیت (Exprep Plasmid SV-mini-GenaAll، کره جنوبی) استخراج و پس از خراش‌دهی برگ موردنظر با استفاده از پودر کربوراندوم به‌صورت مکانیکی و با استفاده از یک گوش پاک‌کن به مقدار ۱۰ میکروگرم روی برگ گیاه کدو مایه‌زنی شدند.

پس از استخراج RNA کل از برگ گیاهان هدف با استفاده از کیت (Ribospin RNA plant kit، GeneAll، کره جنوبی)، تیمار با آنزیم DNase I و ساخت cDNA با استفاده از master mix HyperScript™ RT، واکنش RT-PCR روی cDNA ساخته شده با آغازگرهای اختصاصی NbF و NbR انجام شد.آغازگرهای اختصاصی از ابتدا و انتهای ژن رمزکننده پروتئین Anti-VEGF و با استفاده از نرم افزار Oligo analyzer طراحی شدند. توالی‌های GCATGC و GGTACC در آغازگرهای اختصاصی به‌ترتیب جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های *Sph*I و *Kpn*I می‌باشند.

NbF: 5′-ATGCGCATGCATGCAAGTTCAATTGCAAG-3′
NbR: 5′-TCGAGGTACCAGAAGAAACAGTAACT-3′

پس از استخراج پروتئین محلول کل از برگ گیاهان کدو مطابق با روش Guy و همکاران (Guy et al. 1992)، پروتئین‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی غشا PVDF بارگذاری شدند. سپس نواحی غیر اختصاصی با قرار دادن در بافر بلوکه کننده BSA (Bovine serum albumin) ۱٪ بلوکه شد. پس از افزودن آنتی‌بادی اولیه (polyclonal rabbit anti-camel IgGs، شرکت Sigma) و ثانویه (Goat anti-rabbit IgG-HRP، شرکت Sigma) به غشاء به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در نهایت غشاء به محلول DAB (Diaminobenzidine tetrahydrochloride) انتقال یافت.

جهت انجام لکه‌گذاری وسترن، پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده و گیاه شاهد، پس از تفکیک روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ ٪ به غشاء PVDF منتقل و تحت تیمار با آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه و در نهایت سوبسترای DAB، باند پروتئینی مورد نظر شناسایی شد.

بدین منظور، نمونه‌های پروتئینی به‌همراه بافر پوشش‌دهنده درون چاهک‌های پلیت ELISA بارگذاری و به‌مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از شستشوی چاهک‌ها با PBS-T، بلوکه کردن آن‌ها با محلول BSA ۱٪ انجام شد. بعد از شستشوی مجدد با محلول PBS-T، آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به هر چاهک اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت محلول TMB (Tetramethyl benzidine) به هر چاهک افزوده و بعد از حدود ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج و بحث

تائید همسانه‌سازی قطعات ژنی هدف در ناقل ویروسی

به‌منظور همسانه‌سازی قطعات ژنی هدف در ناقل ویروسی pZGFP، واکنش هضم آنزیمی ناقل‌های همسانه‌سازی نوترکیب و نیز ناقل pZGFP با آنزیم‌های برشی *Sph*I و *Kpn*I انجام گردید. پس از تخلیص قطعات ژنی و ناقل از روی ژل، واکنش اتصال بین قطعات ژنی هدف و ناقل انجام شد. آزمون‌های کلنی PCR و هضم آنزیمی همسانه شدن قطعات ژنی NbI (شکل ۳- الف و ب) و NbII (شکل ۳- ج و د) را به جای ژن GFP در ناقل ویروسی pZGFP تائید نمودند.

بررسی رونویسی از قطعات ژنی هدف در سطح RNA

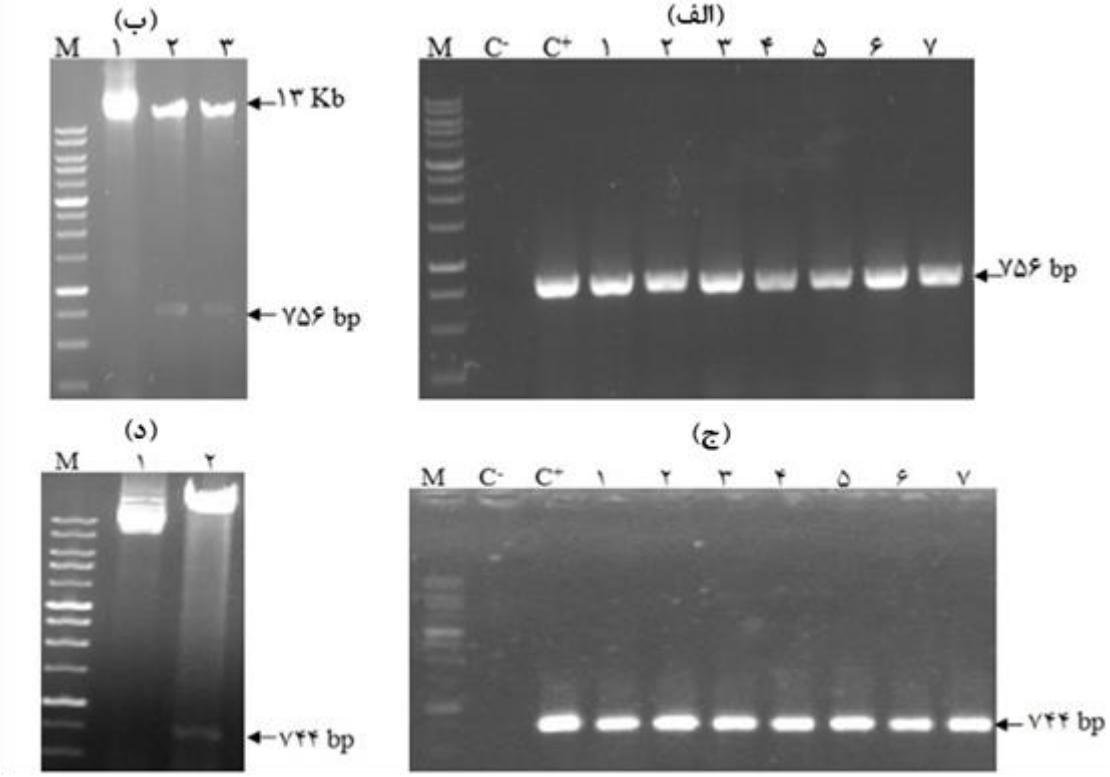
آنالیز مولکولی RT-PCR در روز چهاردهم پس از مایه‌زنی انجام شد. پس از استخراج RNA از برگ گیاهان مایه‌زنی شده و ساخت cDNA، آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف انجام شد. تکثیر قطعه‌ی ۳۹۸ جفت‌بازی در گیاهان مایه‌زنی شده و عدم تکثیر آن در گیاه شاهد و کنترل منفی بیانگر رونویسی موفق از سازه ژنی NbI (شکل ۴- الف) و NbII (شکل ۴- ب) در گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب هدف بود.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده با استفاده از آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای

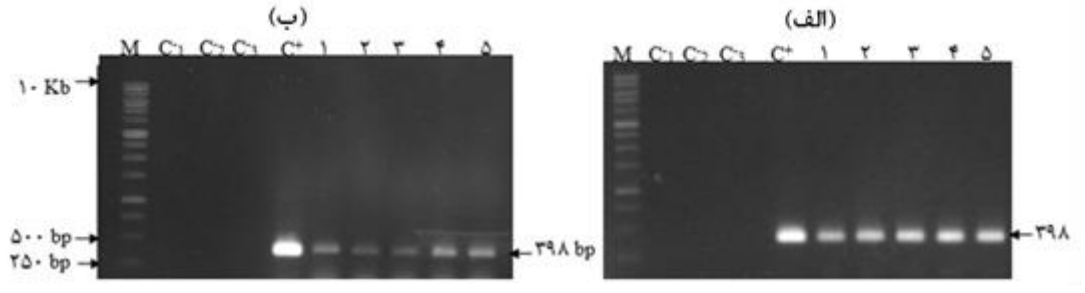
آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای حضور پروتئین‌های نوترکیب NbI (شکل ۵- الف) و Nb42II (شکل ۵- ب) را در گیاهان مایه‌زنی

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

شده با ناقل‌های هدف در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد. شدت لکه‌های رنگی مربوط به پروتئین NbI نسبت به پروتئین نوترکیب NbII بیشتر بود و این نشان داد که بیان پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی بیشتر از آپوپلاست است.

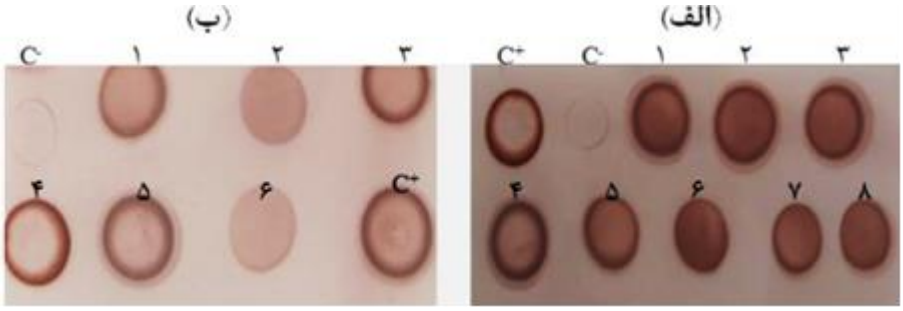


شکل ۳- الف) جداسازی محصول کلونی PCR ژن NbI: M- نشانگر اندازه مولکولی Kb ۱، C^-- کنترل منفی (آب به‌عنوان کنترل)، C^+- کنترل مثبت (ناقل pUC57-NbI)، ۱ تا ۷- کلونی‌های رشد یافته روی محیط انتخابگر ب) جداسازی محصول هضم آنزیمی ناقل pZGFPNbI: M- نشانگر اندازه مولکولی Kb ۱، ۱- ناقل pZGFPNbI برش نخورده، ۲- ناقل pZGFPNbI برش خورده، ج) جداسازی محصول کلونی PCR ژن NbII: M- نشانگر اندازه مولکولی Kb ۱، C^-- کنترل منفی (آب به‌عنوان کنترل)، C^+- کنترل مثبت (ناقل pUC57-NbI)، ۱ تا ۷- کلونی‌های رشد یافته روی محیط انتخابگر د) جداسازی محصول هضم آنزیمی ناقل pZGFPNbII: M- نشانگر اندازه مولکولی Kb ۱، ۱- ناقل pZGFPNbII برش نخورده، ۲- ناقل pZGFPNbII برش خورده



شکل ۴- آزمون RT-PCR جهت بررسی رونویسی قطعات ژنی Nb42I و Nb42II: الف) ۱ تا ۵- گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZNb42I، C^+- کنترل مثبت (ناقل pZNbI)، ب) ۱ تا ۵- گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZNbII، C^+- کنترل مثبت (ناقل pZNbII)، در هر دو شکل: M- نشانگر اندازه مولکولی Kb ۱، C^-_1- کنترل منفی (آب به‌عنوان کنترل)، C^-_2- کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNase I)، C^-_3- کنترل منفی (گیاه شاهد)

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



شکل ۵- الف) آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZNbI و شاهد: لکه‌های ۱ تا ۸- نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده NbI ب) آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZNbII و شاهد: لکه‌های ۱ تا ۶ - نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده NbII، در هر دوشکل C^+- کنترل مثبت (پروتئین Nb42 خالص شده از باکتری) و C^-- کنترل منفی (نمونه پروتئینی گیاه شاهد) می‌باشد.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده با استفاده از آزمون SDS-PAGE و وسترن لکه‌گذاری

بررسی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان هدف در مقایسه با شاهد به روش SDS-PAGE انجام گرفت. مقایسه الگوی باندی گیاهان مایه زنی شده و شاهد تفاوت باندی قابل تشخیصی را در محدوده‌ی مورد انتظار برای قطعات ژنی NbI و NbII نشان نداد (نتایج نشان داده نشده). لذا به‌منظور بررسی بیشتر بیان پروتئین نوترکیب از آزمون لکه‌گذاری وسترن استفاده گردید. آزمون لکه‌گذاری وسترن با آنتی‌بادی اختصاصی نانوبادی بر روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده، حضور یک باند مشخص را در محدوده‌ی موردانتظار برای قطعات ژنی هدف در مقایسه با باند ۱۵ کیلودالتون پروتئین نانوبادی Nb به‌عنوان کنترل مثبت نشان داد. هیچ گونه باند مشابهی در مورد پروتئین استخراج شده از گیاه شاهد مشاهده نگردید.

بررسی کمی بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده با استفاده از آزمون الایزا

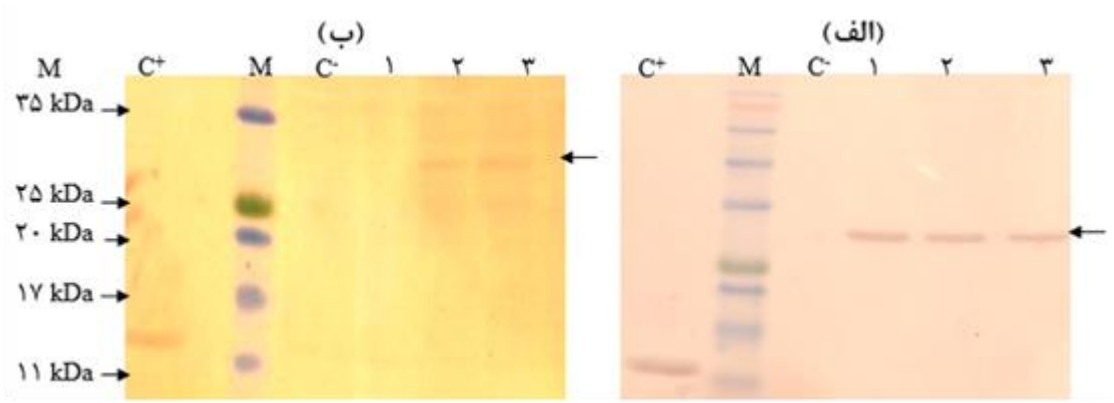
آزمون الایزا جهت برآورد کمی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در روز چهاردهم پس از مایه‌زنی به‌کار گرفته شد. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد برای پروتئین‌های نوترکیب NbI (شکل ۷- الف) و NbII (شکل ۷- ب) گیاه شماره ۱ با بالاترین میزان جذب به ترتیب حاوی ۲۲ و ۳/۷ میکروگرم پروتئین نوترکیب در گرم وزن تر بافت برگی می‌باشند. یعنی بیان پروتئین نوترکیب هدف در شبکه آندوپلاسمی حدودا شش برابر بیان آن در آپوپلاست می‌باشد.

هدف‌گیری پروتئین نوترکیب در سلول یکی از کلیدی‌ترین فاکتورها است که پایداری و کیفیت عملکرد فرآورده نهایی را تعیین می‌کند (Gerasimova et al. 2016). پروتئین‌های نوترکیب به اندامک‌های درون سلولی متفاوت نظیر آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، کلروپلاست و یا واکوئل در سلول‌های گیاهی هدف‌گیری می‌شوند (M Twyman et al. 2013; Saberianfar & Menassa 2018; Sethi et al. 2021). انتخاب صحیح اندامک جهت بیان پروتئین نوترکیب نقش مهمی در سطوح تولید پروتئین‌های خارجی دارد (Karg & Kallio 2009).

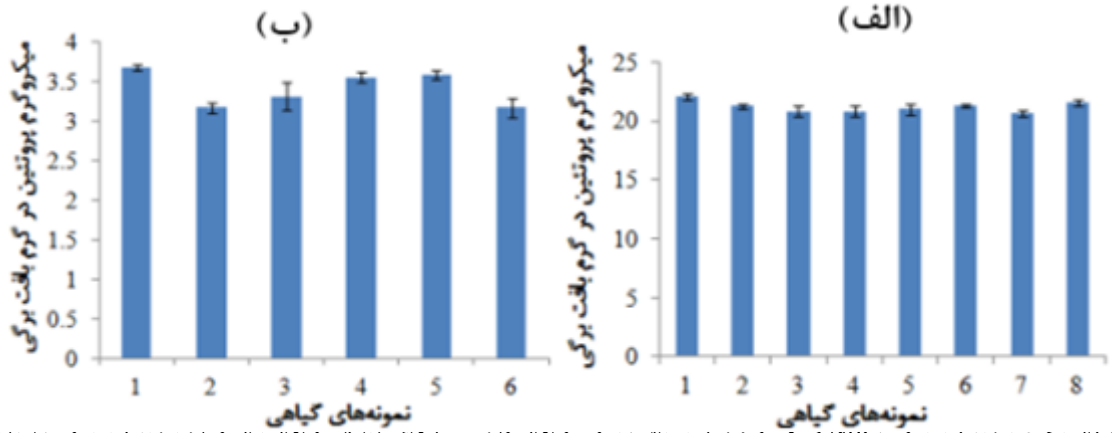
گزارش شده که پس از هدف‌گیری پروتئین نوترکیب T84.66 (آنتی‌بادی نوترکیب علیه آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک) به اندامک‌های درون سلولی آپوپلاست و شبکه آندوپلاسمی میزان تجمع این پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی ۱۰ برابر میزان تجمع آن در آپوپلاست بود (Vaquero et al. 2002; Benchabane et al. 2008). در گزارش دیگری نیز میزان تجمع پروتئین نوترکیب scFvT84.66 در شبکه آندوپلاسمی حدود ۲۵ برابر میزان تجمع آن در آپوپلاست بود (Stoger et al. 2002). همچنین در سال ۲۰۱۲ پروتئین نوترکیب اینترلوکین-۶ (IL-6) به اندامک‌های درون سلولی آپوپلاست و شبکه آندوپلاسمی هدف‌گیری شد و نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان پروتئین نوترکیب IL-6 در شبکه آندوپلاسمی حدود ۱۰ برابر بیان این پروتئین در اندامک آپوپلاست می‌باشد (Nausch et al.

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

2012). در درون شبکه آندوپلاسمی پروتئازهـای کمتـری وجـود داشته و پروتئین نوترکیب از تجزیه توسط پروتئازها محافظت می‌شود (Sethi et al. 2021). همچنین این اندامک به فولد مناسب و سرهم کردن پروتئین‌های نوترکیب کمک می‌کند (Saberianfar & Menassa 2018).



شکل ۶- الف) آزمون لکه‌گذاری وسترن برای تایید بیان پروتئین نوترکیب NbI: چاهک‌های ۱ تا ۳- گیاهان کدو حاوی پروتئین نوترکیب NbI ب) آزمون لکه‌گذاری وسترن برای تایید بیان پروتئین نوترکیب NbII: چاهک‌های ۱ تا ۳- گیاهان کدو حاوی پروتئین نوترکیب NbII ، C^+- کنترل مثبت (پروتئین Nb42 خالص شده از باکتری)، M- نشانگر پروتئینی (سیناژن)، C^-- کنترل منفی (گیاه شاهد)



شکل ۷- الف) میزان تجمع پروتئین نوترکیب NbI در هر گرم وزن تر بافت برگی گیاهان کدو. ستون‌های ۱ تا ۸- گیاهان بیان کننده پروتئین نوترکیب ب) میزان تجمع پروتئین نوترکیب NbII در هر گرم وزن تر بافت برگی گیاهان کدو: ستون‌های ۱-۶ گیاهان بیان کننده پروتئین نوترکیب

مطالعات نشان داده است هنگـامی کـه آنتـی‌ژن NY-ESO-1 بـه آپوپلاست گیاه کدو هدف‌گیری شد هیچ‌گونه پروتئینـی شناسـایی نگردید (Lacorte 2006). به‌طور مشابه نشان داده شده کـه سـطح بیان آنتی‌ژن SAG1 در آپوپلاست حدود ۰/۷ میکروگـرم در گـرم وزن تر بود یعنی حدود $\frac{1}{50}$ بیان این آنتی‌ژن در شبکه آندوپلاسمی می‌باشد (Laguía-Becher et al. 2010). فعالیت پروتئازی بـالا در آپوپلاست در تعدادی از موارد از تجمع پروتئین نوترکیب نمونه است (Lienard et al. 2007). به‌طور مثال بیان بالای (۳۰٪ TSP) نانوبادی علیه لیزوزیم سفیده تخم مرغ در آپوپلاست گیاه توتون نشان داده شده است (Teh & Kavanagh 2010). در تحقیق حاضر بیان قطعه Nb42II هدف‌گیری شده به آپوپلاست ۳/۷ میکروگرم در گرم بافت برگی بود که نسبت به برخی از گزارشات بیان شده بالاتر بود (Laguía-Becher et al. 2010; Lacorte et al. 2014). بیان پایین در آپوپلاست احتمالا به‌دلیل

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

حضور یکسری از پروتئازها از جمله آسپارتیک، سرین و سیستئین پروتئازها می‌باشد (Pillay et al. 2014). برای به حداقل رساندن اثر پروتئازها بر پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاه روش‌های نظیر حذف و یا تغییر نواحی فعالیت پروتئازها در پروتئین‌های نوترکیب، خاموش کردن ژن‌های رمز کننده پروتئازهای اساسی گیاه و ممانعت از فعالیت پروتئازها با بیان همزمان مهارکننده‌های آن‌ها در سلول پیشنهاد شده است (Benchabane et al. 2008). در سه دهه‌ی اخیر زراعت مولکولی به‌عنوان یک استراتژی جایگزین و مقرون به‌صرفه برای تولید فرآورده‌های دارویی زیستی از قبیل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، چالش پیش روی زراعت مولکولی بوده که مانع تولید اقتصادی واکسن‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و ... در مقیاس بالا ظهور کرده است. با این حال تجمع ناکافی پروتئین نوترکیب پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان می‌شود. بهینه کردن توالی رمز کننده ژن مورد نظر مطابق با ترجیح کدونی گیاه میزبان، هدف‌گیری درون سلولی مناسب پروتئین نوترکیب و استفاده از پروتئین‌های الحاق شونده می‌توانند به‌عنوان رویکردهای مولکولی مناسب جهت افزایش بیان پروتئین در گیاهان به‌کار گرفته شود. این تحقیق نشان داد که هدف‌گیری پروتئین نوترکیب دارویی Anti-VEGF به شبکه آندوپلاسمی نسبت به آپوپلاست تجمع پروتئین را چندین برابر می‌نماید. لذا شبکه آندوپلاسمی می‌تواند مکان مناسب‌تری برای بیان پروتئین نوترکیب هدف و سایر پروتئین‌های نوترکیب دیگر نسبت به آپوپلاست باشد.

منابع:

Behdani M, Zeinali S, Karimipour M et al. (2012) Expression, purification, and characterization of a diabody against the most important angiogenesis cell receptor: vascular endothelial growth factor receptor 2. Advanced Biomedical Research 1.

Benchabane M ,Goulet C, Rivard D et al. (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. Plant biotechnology journal 6:633-648.

Burnett MJ, Burnett AC (2020) Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. Plants, People, Planet 2:121-132.

Dirisala VR, Nair RR, Srirama K et al. (2017) Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. Acta physiologiae plantarum 39:1-9.

Folkman J (2007) Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? Journal of pediatric surgery 42:1-11.

Gerasimova S, Smirnova O, Kochetov A et al. (2016) Production of recombinant proteins in plant cells. Russian Journal of Plant Physiology 63:26-37.

Gordon MS, Mendelson DS, Kato G (2010) Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. International Journal of Cancer 126:1777-1787.

Guy C, Haskell D, Neven L et al. (1992) Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. Planta 188:265-270.

Karami E, Sabatier J-M, Behdani M et al. (2020) A nanobody-derived mimotope against VEGF inhibits cancer angiogenesis. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry 35:1233-1239.

Karg SR, Kallio PT (2009) The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology advances 27:879-894.

Lacorte C (2006) Improving and assessing viral vectors for recombinant protein production in plants. Wageningen University and Research.

Lacorte C, Carrijo J, Murad A et al. (2014) Transient expression of the cancer/testis cancer antigen NY-ESO-1 in Nicotiana benthamiana using a PVX-based viral vector. In: BMC Proceedings. BioMed Central. pp. 1-2.

Lagassé HD, Alexaki A, Simhadri VL et al. (2017) Recent advances in (therapeutic protein) drug development. F1000Research 6.

Laguía-Becher M, Martín V, Kraemer M et al. (2010) Effect of codon optimization and subcellular targeting on Toxoplasma gondii antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice .BMC biotechnology 10:1-14.

Lienard D, Dinh OT, Van Oort E et al. (2007) Suspension-cultured BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens. Plant biotechnology journal 5:93-108.

M Twyman R, Schillberg S, Fischer R (2013) Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Current Pharmaceutical Design 19:5486-5494.

Ma S, Wang A (2012) Molecular farming in plants: an overview. Molecular farming in plants: recent advances and future prospects 1-20.

Muyldermans S, Baral T, Retamozzo VC et al. (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Veterinary immunology and immunopathology 128:178-183.

Nausch H, Mikschofsky H, Koslowski R et al. (2012) High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in Nicotiana benthamiana. PloS one 7:e48938.

Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S et al. (2011) Advances in plant molecular farming. Biotechnology advances 29:210-222.

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

Pillay P, Schlüter U, Van Wyk S et al. (2014) Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells. Bioengineered 5:15-20.

Saberianfar R, Menassa R (2018) Strategies to increase expression and accumulation of recombinant proteins. Mol Pharming Appl Chall Emerg Areas 119-135.

Sambrook J, Russell DW, Sambrook J (2006) The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, NY.

Schillberg S, Finnern R (2021) Plant molecular farming for the production of valuable proteins–Critical evaluation of achievements and future challenges. Journal of plant physiology 258:153359.

Sethi L, Kumari K, Dey N (2021) Engineering of plants for efficient production of therapeutics. Molecular Biotechnology 63:1125-1137.

Stoger E, Sack M, Perrin Y et al .(2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. Molecular Breeding 9, 149-158.

Teh Y-HA, Kavanagh TA (2010) High-level expression of Camelid nanobodies in Nicotiana benthamiana. Transgenic research 19:575-586.

Vaquero C, Sack M, Schuster F et al. (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. The FASEB journal 16:408-410.

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