

یافتن آنتی‌بادی تک دودمانی ضد HER2/neu انسانی Trastuzumab در توتون تاریخته

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

مریم احساسات وطن^۱، مراد جعفری^{*}^۱، رضا درویشزاده^۱

- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشگاه ارومیه.

Ehsasat Vatan M¹, Jafari M^{*1}, Darvishzadeh R¹

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 تواریختی پایدار به واسطه *Agrobacterium tumefaciens* بررسی شد. ریزنمونه‌های برگ توتون رقم Gewone groene با آگروباکتریوم سوبه 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 LC و HC در ژنوم گیاهان تواریخته 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 محتوى آنتی‌بادی در گیاهان تواریخته ۱/۰ درصد پروتئین محلول کل برآورد شد. تجزیه ایمونوبلات عصاره خام گیاهان نشان داد که Trastuzumab در گیاهان به شکل تترامر (H_2L_2) تجمع می‌پاید. تجزیه نتاج T_1 وراثت پایدار و تفکیک همزممان 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 مقرن 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

مقدمه

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 پاتوتژن‌های 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; Afsharfard et al. 2011). کشاورزی مولکولی^۴ 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). میزان‌های گیاهی مختلفی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است، با این حال گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*)

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 معمولاً هزینه‌های درمان را افزایش می‌دهند (Norum et al. 2005). یکی از داروهای تولید شده برای درمان سرطان پستان Trastuzumab (با نام تجاری هرسپتین^۱، یک آنتی‌بادی تک دودمانی^۲ انسانی ضد HER2/neu (HER2/neu) می‌باشد. گیرنده دو فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (Komarova et al. 2011) تکثیر ژن p185HER2/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) 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 اعداد 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 عده آن‌ها را داروهای مربوط به بیماران سرطانی تشکیل می‌دهد، Trastuzumab (در ویال‌های mg ۴۴۰)

¹ Herceptin®² Monoclonal³ Chinese hamster ovary

B5 (Gamborg et al. 1986) میواینوزیتول (0.2 g/l)، آگار گیاهی (7 g/l) و ساکارز (30 g/l) کشت شدند. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ۳۰ روزه حاصل به عنوان ریزنمونه جهت تراریختی استفاده شدند.

تهیه دستواره‌های مولکولی

به منظور ساخت دستواره‌های مولکولی حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره سنگین (HC) و زنجیره سبک (LC) آنتی‌بادی pSAR-NTopTras-HC، از پلاسمیدهای Trastuzumab pSAR-NTopTras-LC (Ehsasatvatan 2014) استفاده شد. لازم به ذکر است که منشا اولیه ژن‌های HC و LC پلاسمیدهای Shojaei and) pBSK-Her2-LC و pBSK-Her2-HC (Gardaneh 2012) بودند که توسط آقای دکتر گردانه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری اعطای شدند. توالی این ژن‌ها بر اساس محاسبه شاخص سازگاری کدون (CAI) (http://genomes.urv.es/CAIcal) و با استفاده از کدون‌های ترجیحی توتوون (Nakamura et al. 2000) با در نظر گرفتن سایر موارد (محتوی A+T و G+C، ساختار ثانویه و پایداری mRNA و mRNAs) با در نظر گرفتن سایر آنالیز Entelechon بهینه‌سازی شدند و در نهایت توالی‌های بهینه شده ژن‌ها (NTopTras-HC و NTopTras-LC) در پلاسمیدهای pSAR-NTopTras-LC و NTopTras-HC 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 (جدول ۱) به ترتیب حاوی جایگاه‌های آنزیمی *HindIII* و *BamHI* تکثیر شدند و محصولات حاصل پس از خالص‌سازی با کیت High Pure PCR Product Purification (Roche) 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 دستواره نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سبک و سنگین Trastuzumab ساخته شدند. در هر دو دستواره، کاسته‌های ژنی Trastuzumab شامل راهانداز تقویت شده

(L. Tremblay et al. 2010) توتوون علاوه بر دارا بودن قابلیت تراریختی و بازیابی 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 Fischer et al. (2004; Biemelt and Sonnewald 2005; Stoger et al. 2005) با توجه به نیاز بالای کشور به Trasuzumab با عنوان یکی از داروهای نوترکیب پر مصرف و گران‌قیمت، تحقیقات محدودی در داخل کشور به منظور تولید این دارو در سیستم پستانداری انجام شده است (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 توتوون گزارش شده و نتایج حاصل حاکی از تولید Trastuzumab در سیستم گیاهی با عملکرد Grohs et al. (2010). در تحقیق حاضر برای اولین بار در کشور بیان ژن‌های رمز کننده Trastuzumab و تولید آن در گیاه توتوون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی بذر و تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در این تحقیق، بذر توتوون رقم Gewone groene (تهیه شده از مرکز تحقیقات توتوون تیرتاش - مازندران) 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 مقطار استریل آبکشی شدند. به منظور تسهیل در جوانه‌زنی، بذور قبل از کشت به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطار استریل قرار داده شدند. در نهایت بذور استریل در محیط کشت Murashige and Skoog (MS) (Murashige 1962) با نصف غلظت نمک‌ها همراه با ویتامین‌های

نگهداری شدند. پس از ۴ روز هم کشته، ریزنمونه ها در محیط شستشو (شامل محیط MS پایه حاوی 500 mg/l سفوتاکسیم) شستشو داده شدند و سپس در محیط گرینش (شامل محیط MS پایه حاوی 150 mg/l کاناامایسین و 250 mg/l سفوتاکسیم، با ترکیب تنظیم کننده های رشد BAP (1 mg/l) و IBA (0.1 mg/l) کشت شدند (Ehsasatvatan 2014). پس از یک دوره گرینش ۳۰ روزه گیاهچه های تاریخته احتمالی گرینش شده در محیط کشت MS حاوی ویتامین های B5 و بدون هر گونه تنظیم کننده رشد ریشه دار شدند. در نهایت گیاهچه های ریشه دار شده، جهت سازگاری به شرایط محیط طبیعی، به گلدان های حاوی پیت: پرلیت ($3:1$) با شرایط رطوبت نسبی 96% درصد و دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ متنقل شدند.

تجزیه های مولکولی PCR

برای تایید اولیه حضور تراژن ها در گیاهچه های تاریخته احتمالی مقاوم به کاناامایسین از تجزیه PCR استفاده شد. DNA ریزنومی از برگ های جوان گیاهچه های مقاوم به عامل انتخابی و گیاهچه های تاریخت نشده توتون (به عنوان شاهد منفی) به روش Duplex PCR استخراج شد و تجزیه PCR (Duplex PCR Dellaporta et al. 1983) استفاده از آغازگرهای اختصاصی HC و LC برای تکثیر قطعه bp (جدول ۱) انجام شد. واکنش های PCR با حجم کلی $20\text{ }\mu\text{l}$ شامل DNA (100 ng) GenetBio Taq Premix، کره، $1\text{ }\mu\text{l}$ PCR μl از هر نوع آغازگر و $7\text{ }\mu\text{l}$ آب مخصوص PCR تهیه شدند. برنامه دمایی PCR شامل یک چرخه و اسرشت سازی اولیه 94°C به مدت ۵ دقیقه، 35 چرخه شامل و اسرشت سازی 72°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها 60°C به مدت یک دقیقه، بسط 72°C به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی 72°C به مدت زمان ۷ دقیقه بود. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مدل 5331 Mastercycler انجام شد و محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آکارز 0.8 mm درصد در دستگاه Gel Doc مورد مشاهده و عکس برداری قرار گرفتند.

تجزیه لکه گذاری سادرن

به منظور تایید تلفیق تراژن ها در ژنوم گیاهان تاریخته توتون از

ویروس موzaئیک کلم (CaMV x2e^1)، ناحیه غیر ترجمه شونده '5'-UTR (CHS)، توالی چالکون سیتیاز (CHS)، توالی نشانه شبکه Arabidopsis basic chitinase آندوپلاسمی ژن کینتاز بازی (signal peptide آراییدوپسیس و توالی پایانی 35S بودند. Sambrook and Russell (2001) به آگروباکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافتد و کلونی های نوترکیب بر اساس کشت Colony در محیط انتخابی حاوی کاناامایسین و همچنین از طریق PCR غربال شدند. کلونی های نوترکیب آگروباکتری جهت تاریختی گیاه توتون استفاده شدند. تلقیح ریزنمونه ها با آگروباکتریوم، گرینش و باز زایی گیاهچه های تاریخته احتمالی

ریزنمونه های برگ کامل پس از جداسازی از گیاهچه های درون شبیه شدند. با تغیرات جزیی به شرح زیر تلقیح شدند. تک کلونی های آگروباکتری سویه LBA4404 حاوی پلاسمید های نوترکیب در 30 ml محیط کشت LB مایع دارای آنتی بیوتیک های ریفارمیسین (50 mg/l) و کاناامایسین (50 mg/l) در دمای 28°C با 200 rpm تا رسیدن به $OD_{600} \sim 0.5 \sim 0.7$ کشت شد. سوسپانسیون باکتری حاصل در 8×3500 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در 30 ml محیط القا (شامل محیط پایه MS با نصف غلظت نمک ها حاوی $150\text{ }\mu\text{M}$ سینامیک اسید) تعلیق شد. پس از ۵ تا ۶ ساعت ادامه کشت در شرایط ذکر شده، سوسپانسیون باکتری در 8×3500 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در 40 ml محیط القا بدون آنتی بیوتیک تعلیق شد و غلظت آن به $OD_{600} \sim 0.4$ رسانده شد و برای تلقیح ریزنمونه های برگ استفاده شد. بدین منظور ریزنمونه ها در سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و سپس جهت حذف باکتری های اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. در نهایت، ریزنمونه های تلقیح شده در محیط کشت توام (شامل محیط MS پایه حاوی $150\text{ }\mu\text{M}$ سینامیک اسید) کشت شدند. ریزنمونه های کشت شده در شرایط 16°C ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی، رطوبت 70 درصد و دمای 24°C در اتفاق رشد به مدت ۴ روز

¹ Duplicate cauliflower mosaic virus 35S promoter

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

آندازه محصول (bp)	توالی (5'-3')	آغازگر
۷۱۸	GACATATCCATTGCCAGGAAGCG GCTAACGTCAACCACCGCATG	رفت opHC برگشت
۶۱۵	CTGAACACCGAATGAACAAGTAC ACTAAAGTCGCGGGCGAGACGTG	رفت opLC برگشت
(HC) ۲۴۱۵ (LC) ۱۷۰۴	CCTGCAAAGCTTCTGCTCGATATAGCAGCGTC TGCCTAAGATCTGCTTGGCCTCTGGATCTGG	رفت P35SCS برگشت

تکثیر رونوشت 18S rRNA در رقابت با رونوشت تراژن‌ها استفاده شد. پس از بهینه‌سازی، از ترکیب 18S rRNA RT-PCR Competimers primers با نسبت ۳:۸ در واکنش استفاده شد. محصولات RT-PCR در ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه RT-PCR در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد و برای سنجش نیمه کمی ImageJ 1.47 (Rasband 2014) پس از نرم‌افزاری نسبت به کنترل داخلی به داده‌های کمی جگالی تصحیح شده¹ تبدیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون LSD² انجام گرفت.

تجزیه لکه‌گذاری وسترن

تجزیه لکه‌گذاری وسترن به منظور ردیابی تجمع آنتی‌بادی Trastuzumab در گیاهان توتون تاریخته صورت گرفت. به این منظور، پروتئین کل برگ از گیاهان تاریخته و همچنین از گیاهان غیرتاریخته به عنوان شاهد منفی به روش (Jafari et al. 2009) استخراج شد و غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش Bradford (Bradford 1976) تعیین شد. در حدود ۵۰ µg نمونه پروتئینی در Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide (SDS-PAGE) و شرایط احیا شده (non-reducing conditions) و شرایط احیا نشده (reducing conditions) با دستگاه Bio-Rad 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

تکنیک لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. در حدود ۲۵ میکروگرم DNA ژنومی با کیفیت بالا از برگ گیاهچه‌های PCR⁺ و گیاهچه‌های تاریخت نشده توتون (به عنوان شاهد منفی) و همچنین پلasmیدهای نوترکیب *NheI* و pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC (به عنوان شاهد مثبت) به وسیله آنزیم Hplc (به عنوان شاهد مثبت) به منظور انتقال DNA روی غشاء نمونه‌های DNA هضم شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد و به وسیله الکتروفوروز با ولتاژ ثابت ۵۰ تلفیک شد. کاوشگرهای اختصاصی تراژن‌ها، نشاندار شده با DIG (Roche) PCR DIG probe synthesis kit با دستورالعمل کیت DIG DNA Labeling and Detection (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 نیمه کمی

به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در گیاهان تاریخته از تجزیه RT-PCR نیمه کمی استفاده شد. بدین منظور، RNA کل از برگ گیاهان تاریخته حاوی تراژن‌ها و گیاه مادری غیرتاریخته توتون (به عنوان شاهد منفی) بر اساس دستورالعمل کیت RNeasy (QIAGEN) Plant Mini Kit (آمریکا) استخراج شد. تجزیه RT-PCR به صورت Multiplex توسط آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها (جدول ۱) 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 Ambion 18S rRNA CompetimerTM (آمریکا) برای کنترل

¹ Adjusted density

² Least significant difference

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 pSAR-NTopTras-HC و pSAR-NTopTras-LC مثبت (پلاسمیدهای نوترکیب NTopTras-LC مورد استفاده در ساخت دستوارهای نوترکیب) بود، در حالی که در پلاسمید غیر نوترکیب pBIN19 هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد. بدین ترتیب دو دستواره نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره سبک و سینکن آنتی‌بادی Trastuzumab با توالی بهینه شده برای توتون به صورت pBIN19-NTopTras-LC و pBIN19-NTopTras-HC شدن (شکل ۲).

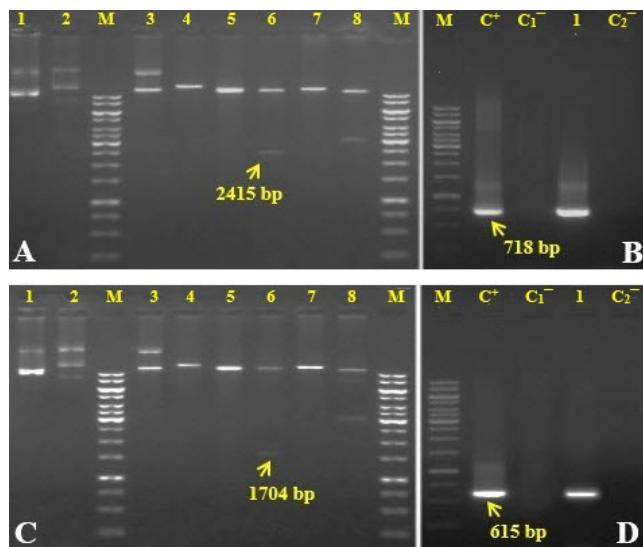
پس از ۴ روز هم‌کشتی، ریزنمونه‌های انتقالی به محیط گرینش حاوی ۱۵۰ mg/l کانامایسین منتقل شدند (شکل ۳، D). القا و باززایی جوانه‌ها به طور مستقیم و بدون فاز کالوس انجام شد. جوانه‌های القا شده بر روی برگ‌های تلقیح نشده در محیط حاوی کانامایسین در اثر عامل انتخابی زرد شدند (شکل ۳، F)، در حالی که در محیط بدون کانامایسین جوانه‌ها به صورت سبز و شاداب باقی مانده و رشد کردند (شکل ۳، H)، که نشان دهنده تاثیر و کارایی کانامایسین به عنوان عامل انتخابی در فرآیند گرینش بود. کانامایسین در ۷۳ درصد از مطالعات تاریخی گیاه Fischer et al. 2004 میزان بسیار پایین فرار در محیط گرینش نشان دهنده این است که مقاومت به کانامایسین به واسطه ژن *nptII* یک سیستم گزینشی مناسب برای باززایی گیاهچه‌های تاریخی توتون می‌باشد (Mayani et al. 2011; Allah Bakhsh et al. 2014). در تحقیق حاضر میزان فرار در حد بسیار پایین (۰.۵٪) بود (داده‌ها نشان داده نشدند). پس از دوره گرینش ۳۰ روزه، شاخصاره‌های

زنجره LC و HC و فرم کامل آنتی‌بادی Trastuzumab با استفاده از مخلوطی از آنتی‌بادی‌های goat Anti-human IgG-Gamma و goat Anti-human γ -specific AP-conjugated antibody IgG-Kappa (κ -chain specific AP-conjugated antibody). Jafari et al. (2009) طبق روش Sigma (آمریکا) 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 غذت 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.

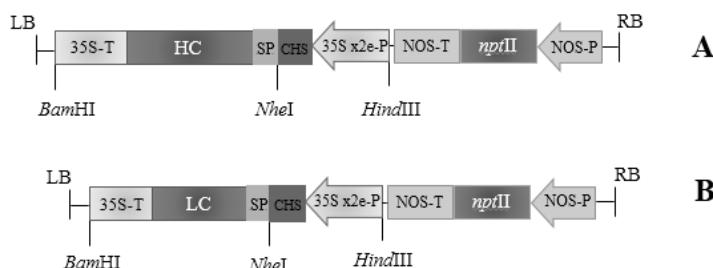
تولید گیاهان تاریخته نسل T₁ و توارث‌پذیری پایدار تراژن‌ها به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در گیاهان تاریخته نسل T₁، تعداد ۵۰ بذر حاصل از خودگشتن یکی از لاین‌های تاریخته توتون T₀ در گلدانهای حاوی پیت: پرلیت (۱:۳) کشت و به طور منظم آبیاری شدند. تمام گلدانها در اتفاق رشد تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشتابی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴°C ± ۲°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 T₁، آزمون Duplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های رمز کننده *LC* و *HC* 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 *BamHI* خطی شدند، ولی اندازه بزرگتر پلاسمیدهای نوترکیب خطی شده از پلاسمید غیرنوترکیب بیانگر الحق قطعه‌ای در آنها بود. برش *HindIII* پلاسمیدهای نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *BamHI* 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 *NheI* باعث خطی شدن



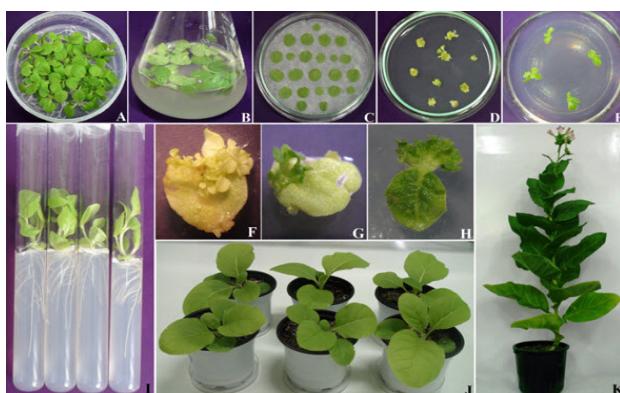
شکل ۱- تایید ساختار مولکولی دستواره‌های نوترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره سبک (A, C .Trastuzumab) و سنگین (HC) آنتیبادی (B) تجزیه برش به ترتیب برای دستواره نوترکیب HC با ۲۴۱۵ bp (band 1)، pBIN19-NTopTras-LC (band 2)، pBIN19-NTopTras-HC (band 3)، ۱ kb DNA Ladder (band M)، pBIN19-NTopTras-LC (band 4)، pBIN19-NTopTras-HC (band 5)، pBIN19 (band 6)، pBIN19-NTopTras-HC (band 7)، pBIN19-NTopTras-LC (band 8)، NheI (band 9)، pBIN19-NTopTras-HC (band 10)، pSAR-NTopTras-HC (band 11)، pBIN19-NTopTras-HC (band 12)، LC (band 13)، pBIN19-NTopTras-HC (band 14)، LC (band 15)، pBIN19-NTopTras-HC (band 16)، C⁺ (band 17)، pBIN19-NTopTras-HC (band 18)، C1⁻ (band 19)، pBIN19-NTopTras-HC (band 20)، C2⁻ (band 21).



شکل ۲- نقشه فیزیکی بخش T-DNA پلاسمیدهای نوترکیب (A) pBIN19-NTopTras-LC و (B) pBIN19-NTopTras-HC (LB) نواحی مرزی راست؛ (RB) نواحی مرزی چپ؛ (NOS-P) رامانداز نوپالین سیتیاز؛ (nptII) ژن نومایسین فسفوتانسферاز؛ (Nos-T) توالی پایانی نوپالین سیتیاز؛ (35Sx2e) رامانداز ویروس موzaïek کلم تقویت شده؛ (CHS) ناحیه غیرترجمه شونده ۵'-UTR (SP) توالی چالکون میتیاز؛ (LC) ژن زنجیره سبک؛ (HC) ژن زنجیره سنگین؛ (35S-T) توالی پایانی 35S.

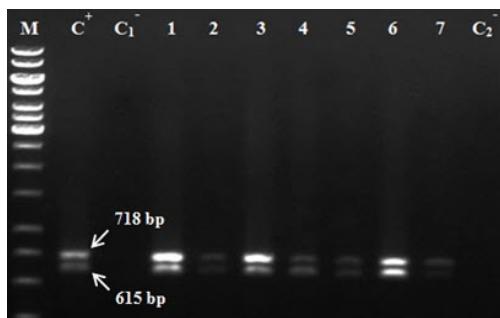
ندادند. در این مطالعه مسیر باززایی به صورت مستقیم بود. باززایی مستقیم دارای مزایای بسیاری از جمله تولید در مقیاس بالا و در یک دوره کوتاه مدت و عدم وجود و یا پایین بودن تنوع سوماکلونی و تغییرات ژنتیکی ناخواسته بهدلیل نداشتن فاز کالوس در کشت درون‌شیشه‌ای (بر خلاف روش باززایی غیر مستقیم) است (Stolarz et al. 1991; Pathi et al. 2013). چنین مزایایی در پروژه‌های تاریختی ژنتیکی گیاهان و همچنین برای تولید گیاهان

سیز (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



شکل ۳- فرآیند تاریختی توتون و باززایی گیاهان تاریخته با ژن‌های *HC* و *LC* آنتی بادی *Trastuzumab* (A). گیاهچه‌های بذری ۳۰ روزه توتون در محیط کشت ۱/۲ 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 گریش حاوی ۱۵۰ mg/l کاتامایسین؛ (E) گیاهچه‌های کوچک جدا شده از روی ریزنمونه‌ها و کشت شده در محیط کشت پایه برای رشد بیشتر؛ (F) نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط کشت حاوی ۱۵۰ mg/l کاتامایسین و زرد شدن ریزنمونه برگی و جوانه‌های القا شده در اثر کاتامایسین؛ (G) باززایی شاخساره‌های سبز طبیعی در محیط گریش (حاوی ۱۵۰ mg/l کاتامایسین)؛ (H) نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط کشت بدون کاتامایسین؛ (I) ریشه‌زایی گیاهچه‌های تاریخته احتمالی در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد؛ (J) سازگاری گیاهچه‌های تاریخته احتمالی (*PCR*⁺) به شرایط گلخانه‌ای؛ (K) گلدهی گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی خارج از گلخانه برای تولید نسل T₁.

(2014) در مطالعه تاثیر پنج سویه *A. tumefaciens* بر میزان تاریختی توتون با روش باززایی غیرمستقیم، حداقل کارایی تاریختی (۲۰ درصد) را با استفاده از سویه LBA4404 گزارش کردند. در تحقیق حاضر میزان کارایی تاریختی بر اساس PCR با سویه LBA4404 و روش باززایی مستقیم بیش از ۹۰ درصد برآورد شد (داده‌ها نشان داده نشدنند).



شکل ۴- تجزیه Duplex PCR برای گیاهچه‌های توتون مقاوم به کاتامایسین pBIN19- حاصل از تلقیح با آگروباکتری حاوی دستواره‌های نوترکیب pBIN19-NTopTras-LC و NTopTras-HC (M .Trastuzumab رمز کننده آنتی بادی *LC* و *HC*). (Fermentas) 1 kb DNA Ladder (C⁺); (C) مخلوط نشانگر وزن مولکولی ۱ kb DNA Ladder (C⁻); (C1⁻) گیاهچه غیر تاریخته (شاهد منفی اول)؛ (C2⁻) گیاهچه‌های تاریخته احتمالی توتون؛ واکنش PCR بدون الگو (شاهد منفی دوم). نوار ۷۱۸ bp تکثیر ژن رمز کننده *HC* و نوار ۶۱۵ bp تکثیر ژن رمز کننده *LC* را نشان می‌دهد.

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 تاریخته باندهایی به اندازه ۷۱۸ bp (HC) و ۶۱۵ bp (LC) هم اندازه با باندهای تکثیر شده برای پلاسمیدهای مورد استفاده در فرآیند تاریختی، pBIN19-NTopTras-HC و pBIN19-NTopTras-LC (به عنوان شاهد مثبت) نشان دادند، در حالی که در گیاه غیرتاریخته تکثیری مشاهده نشد که دلیلی بر عدم حضور ژن‌های مذکور در ژنوم آن است (شکل ۴). همچنین، عدم مشاهده باند در نمونه بدون الگو حاکی از صحت و درستی تجزیه PCR بود. بدین ترتیب آزمون PCR حضور اولیه تراژن‌ها را در گیاهچه‌های مقاوم به کاتامایسین تایید کرد که نشان‌دهنده تلفیق حداقل یک نسخه از تراژن‌ها در ژنوم این گیاهان، صرف نظر از آلدگی احتمالی میان سلولی با آگروباکتری است. کارایی بالای تاریختی، از نقاط قوت یک پروتوكل تاریختی است که بستگی به عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و روش باززایی، ناقل پلاسمیدی، سویه آگروباکتری و کنترل آلدگی Allah Bakhsh et al. (Gelvin 2003) پس از هم‌کشتی دارد.

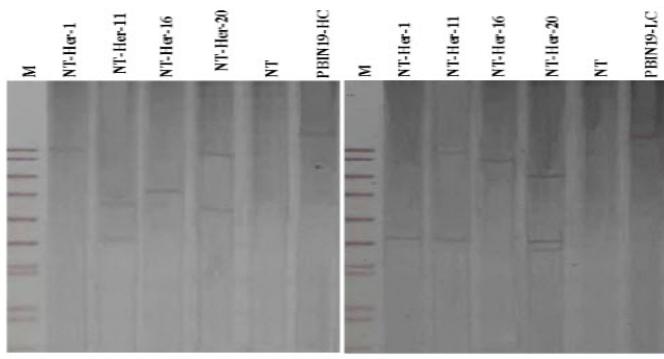
Cheng et al. 2004; Ko 2004; and Koprowski 2005; Jafari et al. 2009. انتقال تراژن‌ها به نسل بعد (T_1) به وسیله تجزیه PCR تایید شد (شکل ۹) که بیانگر پایداری ژنتیکی گیاه تراریخته و وراثت‌پذیری تراژن‌ها در PCR نسل بعد بود. آزمون χ^2 ($P=0.29$) بر اساس داده‌های Duplex برای حضور همزمان هر دو تراژن، نسبت مندلی 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^۲ هر دو تراژن و حاکی از درج آنها در موقعیت مکانی یکسان یا درج در دو مکان نزدیک و شدیداً 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 CompetimerTM 18S rRNA برای تکثیر رونوشت آن به عنوان کنترل داخلی و مقایسه میزان بیان تراژن‌ها استفاده شد. اگر چه 18S rRNA با میزان بیان تقریباً نامتغیر به عنوان کنترل داخلی در تجزیه‌های RT-PCR استفاده می‌شود، با این حال با توجه به میزان بالای رونوشت آن در RNA کل، در تجزیه‌های RT-PCR Multiplex به سرعت اجزای واکنش را به اتمام رسانده و لذا محصول رونوشت‌های نادر به سختی یا به طور غیرممکن قابل تشخیص خواهد بود درحالی که رونوشت 18S در فاز نمایی تکثیر قرار دارد. با استفاده از تکنولوژی CompetimerTM 18S rRNA 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)، برای نمونه‌های گیاهان تراریخته باندهایی با اندازه‌های مورد انتظار ۷۱۸ bp و ۱۵۶ 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 نشان دهنده حضور رونوشت ژن‌های هدف در RNA کل حاصل از گیاهان تراریخته بود. برای نمونه گیاه غیر تراریخته (شاهد منفی

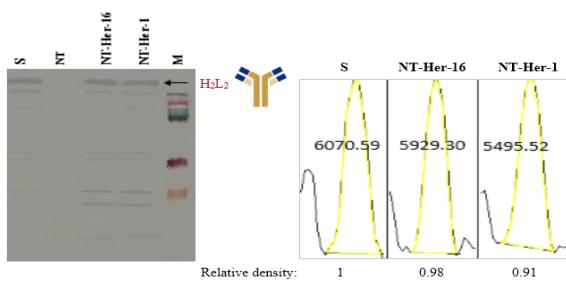
تلفیق تراژن‌ها در گیاهان تراریخته T_0 با استفاده از تجزیه DNA لکه‌گذاری سادرن تایید شد. گیاهچه‌های تراریخته که نشان دهنده آنها به وسیله آنزیم *NheI* برش داده شده بود، باندهایی با اندازه‌های مختلف برای لاین‌های مورد بررسی نشان دادند (شکل ۵). در شاهد مثبت (پلاسمیدهای pBIN19-NTopTras- HC و pBIN19-NTopTras-LC) باندی به اندازه موردنظر مشاهده شد که نشان دهنده دورگه شدن کاوشگر نشاندار با تراژن و اتصال اختصاصی آن برای تشخیص قطعه مکمل خود یعنی ژن‌های *LC* و *HC* است. در نمونه گیاه غیر تراریخته مطابق با انتظار باندی مشاهده نشد که نشان دهنده 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 به عنوان رویدادهای تراریخته مستقل از هم^۱ 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 و NT-Her-20 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 (شکل ۵). 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 تلیچیج بافت گیاهی و تعداد نسخه‌های T-DNA تولید شده در هر باکتری می‌تواند تعداد مکان تراژن و پیوستگی آنها در ژنوم میزان را تحت تاثیر 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 میزان، نوآرایی کمتر DNA و کارایی تراریختی بالاتری می‌شود، نسبت به روش مستقیم انتقال DNA با استفاده از

² Co-segregation

¹ Independent transgenic events

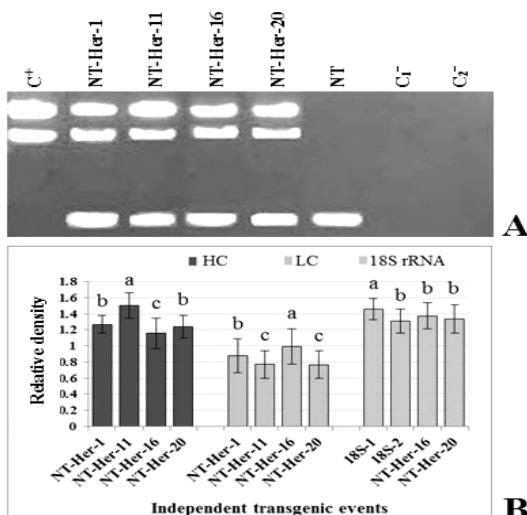


شکل ۵- تجزیه لکه‌گذاری سادرن برای لاین‌های تاریخته توتوون T₀ حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سنتگین و سبک DNA. (A) Trastuzumab شده با NheI و هیبرید شده با کاوشگر اختصاصی ژن HC نشاندار شده با DIG: (B) غشای A استریپ شده و هیبرید شده با کاوشگر اختصاصی ژن LC نشاندار شده با DIG: (C) نشانگر وزن مولکولی VII نشاندار شده با DIG (Roche) (Lain‌های تاریخته مستقل از یکدیگر (Independent) (M) DIG: (D) نشانگر گیاه غیرتاریخته (transgenic events) (NT): (E) شاهد منفی (shaded negative): (F) ناقل‌های پلاسمیدی حاوی ژن HC و یا LC (شاهد مثبت).



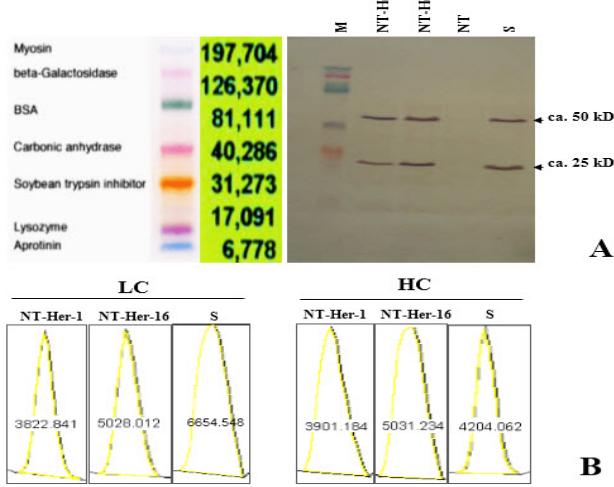
A شکل ۷-۸) تجزیه لکه‌گذاری و سترن برای لاین‌های تاریخخته توتون حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab تحت شرایط احیا نشد. (M) نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained (BioRad) standard (NT-Her-16 و NT-Her-1) لاین‌های تاریخخته مستقل؛ (NT) گیاه غیرتاریخخته (شاهد منفی؛ S) IgG1 انسانی به عنوان استاندارد. علامت پیکان فرم تترامر (H₂L₂) Trastuzumab به عنوان غالب-ترین فرم تولید شده در گیاهان توتون تاریخخته 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) پر اساس، نمونه استاندارد بیان شد.

اول) فقط باند مربوط به رونوشت ژن 18S rRNA مشاهده شد که نشان دهنده عدم وجود رونوشت تراژن ها در گیاه غیر تاریخته، و به عبارت دیگر عدم وجود ژن های HC و LC در ژنوم گیاه مادری غیر تاریخته است. در واکنش RT-PCR دارای RNA الگو به صورت بالک از گیاهان تاریخته و تیمار شده با RNase (شاهد منفی دوم) نیز هیچ گونه باندی مشاهده نشد که بینگر عدم آلودگی نمونه های RNA مورد استفاده در تجزیه با DNA



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

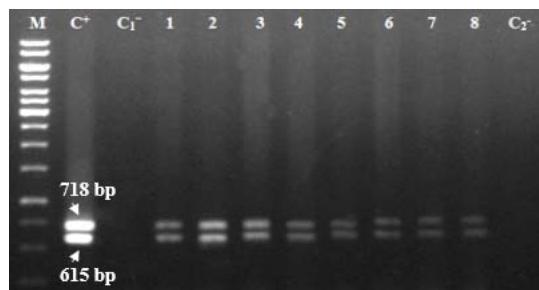
به فرم‌های دیگر آن (فرم هتروتریمر، دیمر و مونومر) است که در کمترین میزان تشکیل شده‌اند بر اساس نتایج حاصل از تجزیه وسترن در شرایط احیا شده، در دو لاین تاریخته توتوون نوارهای موردن انتظار ۵۰ و ۲۵ kDa به ترتیب مربوط به زنجیره سنگین (HC) و زنجیره سبک (LC) آنتیبادی تشخیص داده شد که بیانگر تجمع پروتئین هدف در گیاهان تاریخته است. در گیاه غیرتاریخته (شاهد منفی) هیچ باندی برای پروتئین‌های زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab ریدایی نشد (شکل ۸، A). نتایج حاصل از تجزیه وسترن تلفیق کامل کاسته‌های ژنی (شامل راهانداز، نواحی رمز کننده ژن و توالی پایان‌دهنده) را باز دیگر در لاین‌های تاریخته 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 ۸، B). میزان تقریبی Trastuzumab تجمع یافته معادل با ۱۰ درصد پروتئین محلول کل بود.



شکل ۸ - (A) تجزیه لکه‌گذاری وسترن برای لاین‌های تاریخته توتوون T₀ حاوی ژن‌های رمز کننده زنجیره‌های سنگین و سبک Kaleidoscope prestained (M) نشانگر پروتئین تحت شرایط احیا شده. (B) نشانگر پروتئین (NT-Her-1 و NT-Her-16 (BioRad) standards و NT) لاین‌های تاریخته مستقل؛ (NT) گیاه غیرتاریخته (شاهد منفی)؛ (S) نمونه استاندارد (Hetzceptin) نوارهای ۵۰ kD و ۲۵ kD به ترتیب زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab را نشان می‌دهند. (B) پلاس پروفیل نوارهای زنجیره‌های سنگین و سبک Trastuzumab. 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

می‌باشد. همچنین در واکنش بدون RNA (شاهد منفی سوم) باندی مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم هر گونه آلودگی مخلوط مادر RNA به RT-PCR یا DNA یا RNA کل از گیاهان تاریخته در استفاده میزان تقریباً یکسان RNA میزان بیان ژن‌های هدف در این RT-PCR، به طور نسبی میزان بیان ژن‌های هدف در این NT-11 و NT-Her-1 و NT-Her-16 بیشترین میزان بیان ژن HC و لاین‌های مورد بررسی کمی شد. بر این اساس، لاین‌های NT-Her-1 و NT-Her-16 بیشترین میزان بیان ژن LC را نشان دادند (شکل ۶، B). میزان بیان تراژن در گیاهان تاریخته می‌تواند تحت تاثیر عواملی مانند تعداد نسخه، اثرات موضعی در محل تلفیق و یا متنیله 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) تجزیه لکه‌گذاری سادرن نشان داد که بیشتر گیاهان تاریخته 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 تاریخته گیاهان توتوون 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 حالی که گیاهان بدون بیان uidA 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 تاریخته شود. تجمع آنتیبادی Trastuzumab در بافت برگی توتوون ترایریخته توسط تجزیه لکه‌گذاری وسترن با استفاده از مخلوطی از آنتیبادی‌های اختصاصی - (γ) goat Anti-human IgG-Gamma (goat Anti-human IgG-specific AP-conjugated antibody) و - (κ) Kappa (κ)-chain specific AP-conjugated antibody تحت 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 (H₂L₂) را تایید کرد (شکل ۷، A). باندهای دیگر مشاهده شده در تجزیه ایمونوبلات مربوط

شده در این تحقیق از واریانت تقویت شده راهانداز CaMV 35S x2e استفاده شد. این راهانداز دارای تکرارهای پشت سرهم یک بخش بالا دست به اندازه bp ۲۵۰ است که این بخش تکرار شده باعث تقویت راهانداز هتروولوگوس شده و باعث افزایش فعالیت رونویسی ژن به اندازه دهها برابر نسبت به راهانداز معمول CaMV 35S می شود (Kay et al. 1987). برای افزایش بیان پروتئین هدف در گیاهان علاوه بر استفاده از راهانداز استراتژی های مختلفی برای بهبود عملکرد نهایی پروتئین نوترکیب توسعه داده شده است. از جمله استفاده از تقویت کننده های رونویسی و یا ترجمه (توالی تقویت کننده ترجمه Ω از ویروس موزاییک توتون، TMV)، mRNA نواحی ترجمه نشده' ۵' و ' ۳' UTR (۵' و ۳' تثیت کننده Streatfield 2007) و ژن ۵' UTR (Chalcone synthase) (Voss et al. 1995) در دستواره های ژنی تهیه شده در این سلولی (Voss et al. 1995). در تحقیق نیز از توالی پایان دهنده CHS 5' UTR برای افزایش تجمع و پایداری آنتی بادی Trastuzumab استفاده شد. نواحی 5' UTR و ۳' UTR با تاثیر بر پایداری mRNA و کارایی ترجمه، نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی ایفا می کنند (van der Velden and Thomas 1999; Jansen 2001; Mignone et al. 2002 Torres et al. 1995; Zimmerman 2001). مطالعات مختلف نشان داده اند که ۵' ژن UTR باعث بهبود کارایی ترجمه در سلول های توتون شده است (Anthonisen et al. 2001) همچنین نشان داده شده که ۵' UTR از منشاء sps1 و rbcL و atpB (Garabagi et al. 2012) نیز باعث افزایش میزان ترجمه می شوند. (Satoh et al. 2004) و NtADH (Trujillo et al. 2003) گزارش کردند که انواع مختلف UTR ۵' از منشا گیاهی و یا ویروس های گیاهی متصل به توالی رمز کننده زنجیره های سبک و سنگین آنتی بادی Trastuzumab به طور موثری تجمع این آنتی بادی را تحت تاثیر قرار می دهد. آنها افزایش حداکثر تا ۲۰ برابر میزان بیان پروتئین هدف را با استفاده از کاسته های بیان مختلف حاوی ۵' UTR های متفاوت گزارش کردند. (Kanoria and Burma 2012) نیز در مطالعه خود مشاهده کردند که استفاده از یک ۵' UTR سنتیک باعث افزایش چند برابری بیان ژن های گزارشگر



شکل ۹- تجزیه Duplex PCR برای گیاهان ترازیخته توتون T1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن های HC و LC (M LC و HC) نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (C⁺; Fermentas) (C⁻; C₁⁻) مخلوط ناقل های پلasmیدی حاوی ترازیخته (شاهد مثبت); (C₁⁻) گیاهچه غیر ترازیخته (شاهد منفی اول); (C₂⁻) گیاهان ترازیخته نسل T1 (C₂⁻) 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 می دهد.

در سال های اخیر، انواع مختلف آنتی بادی های نوترکیب با طول کامل با استفاده از سیستم های بیان پایدار و یا بیان موقت با Ko et al. 2005; Giritch et al. (2006; Villani et al. 2008; Grohs et al. 2010; Lai et al. 2010). اکثر تحقیقات نشان داده اند که آنتی بادی های تک دودمانی تولید شده در گیاهان فعالیت های بیولوژیکی (از جمله اختصاصی بودن، سیتو توکسیسیتی و فعالیت خشی سازی) مشابه با آنتی بادی تولید شده در کشت های سلولی پستانداران را حفظ می کنند 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 پروتئین های هتروولوگ تولید شده در گیاهان از تحقیق توسعه ای به محصولات تجاری اطمینان از هزینه های رقابتی تولید است، و بهترین راه برای دست یابی به آن بالا بردن میزان بیان این آنتی بادی مناسب یکی از مهم ترین عوامل نه تنها برای افزایش مورد انتظار بیان پروتئین نوترکیب با افزایش رونوشت ژن هدف، بلکه هماهنگ کننده بیان زنجیره های سبک و سنگین می باشد. راهانداز CaMV 35S از منشا ویروس موزاییک کلم معمول ترین نوع راهانداز استفاده شده در Benfey et al. 1990; Floss et al. 2008; (Sainsbury and Lomonosoff 2008) سازه های بیانی می باشد. در دستواره های ژنی تهیه

Komarnytsky et al. 2000; Nathania and McDonald) 2013). گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های پیچیده مانند آنتی‌بادي‌ها 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 این حال مهندسی گلیکوزیلاسیون گیاه میزان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با گلیکوفرم‌های تیپ انسانی شاید لازم باشد. (Grohs et al. 2010) طی مطالعه‌ای تولید آنتی-بادي Trastuzumab را در توتوون بدون مهندسی گلیکوزیلاسیون تیپ انسانی گزارش کردند و پروتئین حاصل پاسخ ایمنولوژیک 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 آنتی‌بادي 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 پایستی انجام شود. بیان آنتی‌بادي‌های نوترکیب در گیاهان در پلت‌فرم‌های بیانی مختلف به صورت تاریخی پایدار و تاریختی موقت گزارش شده است (Koi et al. 2005; Lai et al. 2010) و معمولاً بیان موقت مبتنی بر وکتورهای وبروسی 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 وبروس ارزیابی کرد. تولید موفق آنتی‌بادي 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.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی با کد ۹۳/۹۳/۰۰۳ 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

CHS و *gfp* می‌شود. در تحقیق حاضر از UTR ۵' ژن 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 پیتیدهای نشانه در انتهای کربوکسیلی افزایش یابد (Conrad and Fiedler 1998). هدف‌گیری پروتئین خارجی به شبکه آندوپلاسمی به طور گستره‌ای برای افزایش تجمع پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تاریخته مورد استفاده قرار گرفته است (Boevink et al. 1999; Zheng et al. 2004; Dobhal et al. 2013). با این حال پروتئین‌ها می‌توانند با استفاده از پیتیدهای نشانه در انتهای آمینی به طور موقت به درون شبکه آندوپلاسمی و نهایتاً به آپوپلاست هدف‌گیری شوند (Gao et al. 2004). در تحقیق حاضر از پیتید نشانه کیتیناز آنتی‌بادي Arabidopsis در انتهای آمینی هر دو زنجیره آنتی‌بادي استفاده شد. این توالی نشانه باعث انتقال موقت پروتئین نوترکیب به شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلزاری و در نهایت ترشح آن به مسیر آپوپلاستیک^۱ 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^۲ 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

¹ Basic chitinase signal peptide

² Apoplastic pathway

³ Guttation fluid

LC کمال تشکر دارد. همچنین از جانب آقای مهندس محمد رضا صلواتی (مرکز تحقیقات توتون تیرتاش، مازندران) به خاطر فراهم آوردن بذر مورد نیاز سپاسگزاری می شود.

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-Sharaf 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, Ole-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.
- Bensey PN, Ren L, Chua NH (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in 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, Opara 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.

انجام تحقیق تشکر و قدردانی می شود. از جانب آقای دکتر موسی گردانه (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیستفناوری، تهران) به خاطر اعطای پلاسمیدهای pBSK-Her2-HC و p2-BSK-Her2.

- 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 requirements 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 coinfecte 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.

- 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 sugar 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.
- Lechtnberg B, Schubert D, Forsbachz A, Gils M, Schmidt R (2003) Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements 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://imagej.nih.gov/ij>.

Sainsbury F, Lomonosoff 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, Olhoff 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.

Streetfield 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, Shiootsu 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.