

بیان ژن انسانی فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) در گیاه توتون

تراریخت

۱. معصومی اصل^۱، م. جلالی جواران^{۲*}، ف. مهبودی^۲، ه. عزیززاده^۴

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشکده

کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_jalali@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

بکارگیری بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی در دهه ۱۹۹۰ نشان داد که بسیاری از داروها می‌توانند در حجم انبوه و به قیمت بسیار ارزان در گیاهان تولید شوند. جذابیت سیستم‌های گیاهی به دلیل مزایایی همچون ایمنی بالا، هزینه پائین، تغییرات پس از ترجمه و حجم بالای تولید نسبت به سیستم‌های کلاسیک (مثل باکتری‌ها، مخمرها و سلول‌های جانوری) است. پروتئین دارویی tPA (tissue Plasminogen Activator) بطور اختصاصی و نسبتاً قوی به لخته‌های خونی متصل شده و ترجیحاً پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته‌ها را فعال و لخته خونی را از بین می‌برد. از پروتئین نوترکیب tPA به منظور درمان سکنه‌های قلبی و مغزی استفاده می‌شود. در این تحقیق، بیان ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) در گیاه توتون بررسی شده است. این پروتئین نوترکیب تحت کنترل پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت. توالی افزایش دهنده Kozak و ترادف کد کننده پپتید نشانه KDEL، به ترتیب به دو انتهای آمینی و کربوکسیلی ژن tPA افزوده شدند. سازه تهیه شده به ژنوم گیاه توتون منتقل و گیاهان تراریخت روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب شدند. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از فنون RT-PCR، SDS-PAGE، زیموگرافی و وسترن بلات انجام شده و کلیه این آزمایش‌ها نشان داد که ژن هدف (tPA) به گیاهان توتون منتقل شده و به نحو فعالی در گیاهان تراریخت بیان می‌شود و پروتئین نوترکیب تولیدی، توانایی حل لخته‌های خونی را دارد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین نوترکیب،
فعال کننده پلاسمینوژن بافتی،
زیموگرافی،
وسترن بلات،
توتون

مقدمه

فیبرین بوجود می‌آورد و موجب متمرکز شدن فعالیت پلاسمین در این ناحیه می‌گردد (۱).

بیماری‌های قلبی- عروقی مثل سکته، حمله میوکاردیال حاد و ترومبومبولیسم وریدی احتمالاً اصلی‌ترین عامل مرگ و میر در جمعیت انسانی می‌باشند. مهمترین عامل مطرح در این شرایط، اغلب انسداد لخته‌ای در رگ‌های خونی مهم می‌باشد که موجب نرسیدن خون به اندام‌های حیاتی (قلب و مغز) می‌گردد. یک دیدگاه درمانی ترومبوز، تزریق داخل وریدی فعال کننده‌های پلاسمینوژن به عنوان داروی حل کننده لخته خون می‌باشد (۶). استرپتوکایناز یک فعال کننده پلاسمینوژن با منشاء باکتریایی است که توسط بعضی از سویه‌های استرپتوکوکوس تولید شده و در کلینیک‌ها نیز استفاده می‌شود. این دارو نسبتاً گران بوده و به دلیل منشاء غیر انسانی آن (مخمر و باکتری)، استفاده از آن با واکنش‌های نامطلوب و تب‌زا همراه است. علاوه بر این، استرپتوکایناز نه فقط پلاسمینوژن متصل به فیبرین بلکه پلاسمینوژن موجود در گردش خون را نیز فعال می‌کند که خطر خونریزی شدید وجود دارد. پروتئین tPA اختصاصی عمل کرده و به لخته‌های خونی بطور نسبتاً قوی متصل می‌شود و ترجیحاً پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته‌ها را فعال می‌کند و اثر کمی روی پلاسمینوژن موجود در گردش خون یا دیگر فاکتورهای موثر در لخته خون دارد. بنابراین tPA نوترکیب احتمالاً موثرترین عامل فیبرینولیتیک است زیرا میل الحاقی فیبرین به tPA، نه تنها فعالیت کاتالیتیک را به لخته متمرکز می‌کند بلکه کارایی کاتالیتیک tPA را نیز افزایش می‌دهد. tPA همراه با تزریق هیپارین به عنوان یک داروی ضد لخته کمکی در طی ۹۰ دقیقه حدود ۷۵٪ سرخرگ‌های بسته شده کرونری را دوباره باز می‌کند و مرگ و میر را ۲۵٪ کاهش می‌دهد. البته استفاده از این عوامل تجزیه کننده لخته برای مقاصد کلینیکی گاهی اوقات ممکن است به بررسی دقیق اجزای سیستم فعال کننده پلاسمینوژن نیاز داشته باشد زیرا فعالیت بیش از حد تجزیه لخته خون احتمالاً منجر به خونریزی بویژه خونریزی مغزی به عنوان یک اثر جانبی می‌گردد (۲۰).

از آنجایی که پروتئین‌های بیگانه‌ای که در گیاهان بیان می‌شوند ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند، می‌توان از گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی با ارزش دارویی استفاده نمود (۷).

رایج ترین سیستم بیانی برای پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از موجودات شبه هسته‌دار (بخصوص باکتری‌ها) است و در این بین اشیریشیاکولی (E. coli) با توجه به سهولت دستکاری، صرفه نسبی اقتصادی و سادگی ذاتی بیان پروتئین در پروکاریوت‌ها (فقدان فرایند پیرایش) سیستم غالب می‌باشد اما تولیدات نوترکیب آن ممکن است همراه با مواد سمی باشد که استفاده از آن را در شرایط *in vivo* دشوار می‌سازد ضمن آنکه امکان تخریب پروتئولیتیک پروتئین بیگانه وجود داشته و بیان و تجمع آن می‌تواند باعث تشکیل انکلوژن بادی‌های نامحلول گردد که نیازمند شکل‌گیری مجدد و مراحل تخلیص پر زحمت و گرانقیمتی است و در نهایت محصول نهایی درصد کمی از پروتئینی است که در انکلوژن بادی وجود داشته است (۱۲).

مشخص شده که فعال کننده‌های پلاسمینوژن نقش مهمی در سیستم فیبرینولیتیک دارند. این آنزیم‌ها قادر به تبدیل پلاسمینوژن به فرم فعال کاتالیتیک آن (پلاسمین) می‌باشند که شبکه فیبرینی همراه با لخته‌های خونی را تخریب می‌کند (شکل ۱). دو نوع اصلی فعال کننده‌های پلاسمینوژن وجود دارند که عبارتند از: فعال کننده پلاسمینوژن نوع اروکیناز^۱ و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA)^۲ (۴ و ۱۶). پروتئین tPA، فعال کننده اصلی پلاسمینوژن در خون می‌باشد در صورتی که نقش اصلی uPA پروتئولیز وابسته به بافت است و عقیده بر این است که نقش آن در حذف فیبرین داخل عروقی نسبت به tPA، ثانویه می‌باشد. فیبرینولیز بطور عمده در سطح فیبرین آغاز و منتشر می‌شود زیرا این سطح، محل‌های اتصال برای تماس بهینه بین تعدادی از اجزای سیستم فیبرینولیتیک بخصوص پلاسمینوژن و tPA را مهیا می‌کند. این اثر تحریکی، غلظت بالایی از پلاسمینوژن و tPA را در رسوبات

^۱ - Urokinase type Plasminogen Activator

^۲ - Tissue type Plasminogen Activator

سنتز cDNA، از کیت ReverteAid First Strand cDNA Synthesis استفاده شد.

بررسی گیاهان در سطح پروتئین: جهت استخراج پروتئین از روش Guy و همکاران استفاده شده و SDS-PAGE روی پروتئین استخراجی با ژل ۱۲ درصد و رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو انجام شد.

آزمون زیموگرافی: در این آزمون مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده با مقدار مساوی از بافر لودینگ مخلوط و در ژل ۱۲٪ حاوی ژلاتین ۱٪ و پلاسمینوژن ران شد، با جریان ۱۰ میلی آمپر در اتاق سرد، ران شد. سپس ژل با تریتون (۲/۵٪) به مدت یک ساعت در دمای اتاق شستشو داده شد و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل گلیسین ۰/۱ مولار قرار داده شد. در نهایت، ژل با کوماسی بلو به مدت ۰/۵ ساعت رنگ آمیزی شده و سپس به صورت کامل رنگ بری شد. فعالیت tPA به صورت باندهای روشن در زمینه آبی رنگ مشخص می شود.

آزمون وسترن بلاتینگ: در طی این آزمون مقدار ۱۵۰ میکروگرم از پروتئین در ژل ۱۲٪ ران شده و سپس با استفاده از دستگاه انتقال دهنده، باندها به کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند. سپس بلاک کردن کاغذ نیتروسولوز با استفاده از BSA (1.5%) انجام شد. پس از سه بار شستشو با PBS و تریتون، آنتی بادی اولیه tPA افزوده و به مدت ۳ ساعت شیکر شد و دوباره ۳ بار شستشو کرده و سپس آنتی بادی ثانویه افزوده شده و ۱/۵ ساعت شیکر شد. در نهایت ۳ بار دیگر شستشو داده و سوسترای Dab را روی کاغذ نیتروسولوز اضافه نموده و حضور پروتئین موردنظر به صورت باند مشخص شد.

نتایج

از آزمون RT-PCR جهت بررسی انجام رونویسی از ژن tPA واقع در سازواره، استفاده شد. پس از استخراج RNA کل و تولید cDNA، واکنش RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی باعث تولید باندهای ۱۷۰۰ جفت باز از کل ژن و ۶۳۵ جفت باز از وسط ژن گردید. پس از انجام الکتروفورز، باندهای ۶۳۵ و ۱۷۰۰ جفت بازی روی ژل مشاهده شد (شکل ۲).

ژن tPA روی بازوی کوتاه کروموزوم ۸ انسان واقع شده است (۲۰). cDNA های ژن tPA دارای ۲۵۳۰ باز (بجز توالی polyA) می باشد که ۵۶۲ اسید آمینه را رمز می کند. از ۳۵ اسید آمینه موجود در قبل از شروع توالی پروتئین بالغ (۱- تا ۳۵-)، احتمالاً ۲۳-۲۰ اسید آمینه آن مربوط به سیگنال پپتید آگزیز می باشد که در ادامه آن توالی ۱۵-۱۲ اسید آمینه ای مربوط به توالی آبدوست پروتئین قرار گرفته است. بهر حال پس از ترجمه و ترشح tPA، توالی ۳۵ تائی فوق حذف و پروتئین بالغ با ۵۲۷ اسید آمینه بدست می آید (۱۸).

توتون به عنوان یک سیستم مطلوب گیاهی برای تولید پروتئین های دارویی یا دیگر ژن های انتقال یافته بکار می رود. دامنه وسیع سیستم بیانی موجود از مزایای دیگر این گیاه است. در توتون به راحتی می توان ژن خارجی را به ژنوم هسته ای یا کلروپلاستی منتقل نمود (۸). اولین پروتئین نوترکیب دارویی، اولین آنتی بادی نوترکیب با منشاء گیاهی (۹)، اولین واکسن تولید شده در گیاه (۱۴) و اولین آنزیم صنعتی مشتق از گیاه (۱۷) همگی در توتون تولید شده اند.

با توجه به نیاز روزافزون بیماران قلبی- عروقی به این دارو و هزینه بالای تولید آن در سایر سیستم های بیانی، ضروری است امکان تولید این پروتئین در گیاه توتون بررسی شود تا بتوان امکان تولید این پروتئین دارویی نوترکیب را در گیاهان غیر مدل، در سطح وسیع، حجم انبوه و با قیمت ارزان ارزیابی کرد.

مواد و روش ها

پس از همسانه سازی ژن tPA در ناقل بیانی گیاهی pBI121 (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) و تهیه سازه pBI-tPA (مقاله پذیرش شده در مجله زیست شناسی ایران)، ژن هدف با روش مبتنی بر آگروباکتریوم به هسته سلول های گیاه توتون منتقل گردید (۶) و از سلول های تراریخت گیاهان تراریخت بدست آمده و گیاهان انتخابی در سطوح DNA، RNA و پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

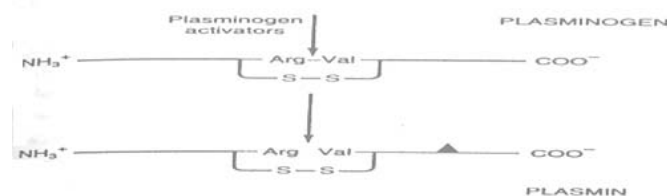
بررسی در سطح RNA: استخراج RNA از برگ های جوان و با استفاده از کیت RNX-Plus شرکت سیناژن انجام گرفت. برای

tPA به صورت باندهای شفاف و روشن پدیدار شدند. باندهای شفاف در مورد نمونه‌های کنترل مثبت (اکتیلاز) و بعضی از نمونه‌های پروتئین گیاهی مشاهده شد ولی در مورد گیاهان غیر تراریخت چنین وضعیتی مشاهده نشد (شکل ۴).

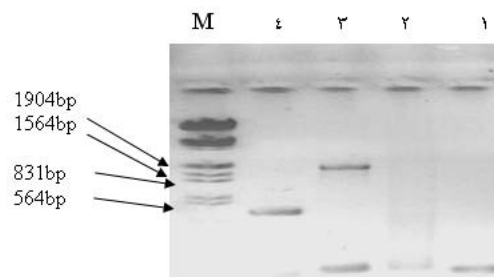
آنالیز وسترن بلات بر روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت نیز وجود یک باند مشخص با وزن حدود ۶۳-۶۵ کیلو دالتون را نشان داد که برابر وزن مولکولی پروتئین tPA می‌باشد. هیچگونه باند مشابهی در مورد پروتئین استخراج شده از گیاهان شاهد مشاهده نگردید (شکل ۵).

انجام SDS-PAGE روی پروتئین استخراجی: در این آزمون پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت، در مقایسه با گیاهان شاهد یک باند اضافی با وزن مولکولی حدود ۶۳-۶۵ کیلودالتون (KDa) نشان دادند که برابر وزن پروتئین مورد نظر (tPA) می‌باشد (شکل ۳).

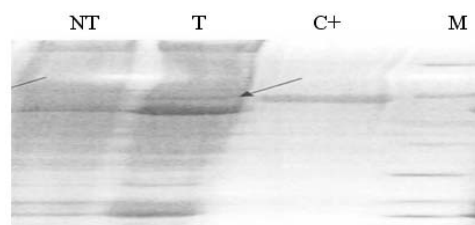
آزمون زیموگرافی: این آزمون شبیه آنالیز SDS-PAGE می‌باشد با این تفاوت که هنگام تهیه ژل جداکننده، پروتئین‌های پلاسمینوژن و ژلاتین به ژل اضافه می‌گردد. در هر حال پس از انجام رنگ آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو، زمینه ژل به رنگ آبی در آمده و نواحی دارای ژلاتین هضم شده ناشی از عملکرد اولیه



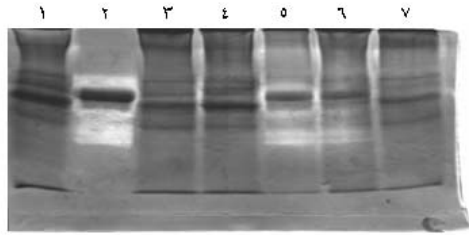
شکل ۱- نحوه اثر فعال کننده پلاسمینوژن روی پلاسمینوژن



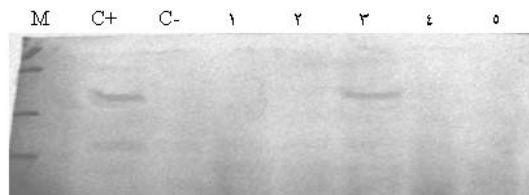
شکل ۲- نتایج بررسی بیان ژن tPA در سازواره با روش RT-PCR چاهک های ۱ و ۲: کنترل منفی (آب) و گیاه تراریخت، چاهک ۳: باند ۱۷۰۰ جفت بازی طول کامل ژن هدف و چاهک ۴: باند ۶۳۵ جفت بازی از وسط ژن. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۳- آنالیز SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت). چاهک M: نشانگر پروتئینی. چاهک کنترل مثبت: داروی اکتیلاز، چاهک T: گیاه تراریخت. چاهک NT: گیاه شاهد (غیر تراریخت). در چاهک T یک باند اضافی در راستای کنترل مثبت مشاهده می‌شود در حالی که در گیاه شاهد این باند مشاهده نگردید.



شکل ۴- نتایج آزمون زیموگرافی برای تعدادی از گیاهان. چاهک ۱: گیاه کنترل (غیر تراریخت)، چاهک ۲: کنترل مثبت (داروی اکتیلاز) و چاهک های ۳-۷: گیاهان تراریخت.



شکل ۵- نتایج وسترن بلات. چاهک M: مارکر وزنی. چاهک C+: داروی اکتیلاز. چاهک C-: گیاه غیر تراریخت. چاهک های ۱-۵: گیاهان تراریخت.

بحث

و حیوانات تراریخت استفاده می‌کنند، از لحاظ هزینه، سطح تولید، ایمنی تولید و درستی محصول اشکالاتی دارند (۱۴). پژوهش‌هایی در دست انجام است که امکان جایگزینی سایر سیستم‌ها شامل گیاهان را مورد بررسی قرار می‌دهد. هدف از این پژوهش تولید پروتئین نوترکیب دارویی آلتپلاز (tPA) در گیاه توتون بود. گیاهان بطور بالقوه یک منبع ارزان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند. کوسنادی و همکاران تخمین زده‌اند که هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰ الی ۵۰ برابر کمتر از تولید همان پروتئین توسط فرمانتور اشیریشیاکولی است (۱۰).

در این پژوهش از ناقل بیانی جفتی pBI121 جهت کلونینگ وانتقال ژن tPA به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری ویژگی‌های مطلوب به میزان زیادی در انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). جهت افزایش بیان سطح نسخه برداری، ژن tPA بین پیش بر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS جایگزین گردید. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از پیش برنده CaMV 35S در توتون می‌تواند میزان بیان را در مقایسه با پیش برهای دیگر مانند Ubi تا ۶۰ برابر افزایش دهد (۲۲).

سکته، سومین عامل مرگ و میر افراد بالغ در کشورهای توسعه یافته است. هر ساله، بیش از سه میلیون نفر در آمریکا فقط از این بیماری رنج می‌برند. داروی لخته شکن tPA، تنها دارویی است که FDA (آژانس غذا و داروی آمریکا) تزریق آن را برای غلبه بر سکته مجاز شمرده است (۳). از آلتپلاز (tPA) حاصل از فن‌آوری DNA نوترکیب و نیز استرپتوکیناز به عنوان داروی فیبرینولیتیک برای درمان استفاده می‌شود. ولی هزینه تقریبی هر بار درمان با tPA حدود ۲۹۰۰ دلار می‌باشد (۱).

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) بخاطر تمایل بالای آن به فیبرین، یک عامل ترومبولیتیک ارزشمند است (۱۶). پروتئین tPA نوعی سرین پروتئاز است که از اندوتلیوم رگ‌های تحت شرایط آسیب یا تنش به گردش خون می‌ریزد و تا پیش از اتصال به فیبرین، فعالیت کاتالیزوری ندارد. tPA پس از اتصال به فیبرین، پلاسمینوژن درون لخته را تجزیه می‌کند و پلاسمین را می‌سازد، پلاسمین هم با هضم فیبرین، از آن محصولات تجزیه‌ای محلول می‌سازد و لذا لخته را حل می‌کند.

سیستم‌های تولید سنتی پروتئین‌های نوترکیب دارویی که از فرمنتاسیون‌های میکروبی، کشت سلول‌های حشرات و پستانداران

در نهایت توسط مواد رنگزا یا لومینسانس فعالیت پروتئین مورد نظر تشخیص داده می‌شود (۲).

در طی تحقیق، بعضی از نمونه‌های پروتئینی گیاهی که در آنالیز زیموگرافی فعالیت نشان می‌دادند در آنالیز وسترن بلات حضور پروتئین مورد نظر را اثبات نکردند که این می‌تواند اثبات کننده حساسیت بالای آنالیز زیموگرافی نسبت به آنالیز وسترن بلات باشد.

وظیفه و چالش جدید کشاورزی مولکولی در زمینه تولید زیست داروها، ترکیب روش‌های مهندسی ژنتیک جهت افزایش بیان با روش‌های تخلیص اقتصادی و در نهایت رسیدن به یک پلات فرم تولیدی مناسب می‌باشد. باید توجه داشت که عملیات تخلیص پروتئین‌های نوترکیب تحت شرایط آزمایشگاهی که با استفاده از بافرها و افزودنی‌های گرانتیمت صورت می‌گیرد، ممکن است که در مقیاس آزمایشگاهی توجیه پذیر باشد اما در مقیاس وسیع نیاز به تحقیق و کار بیشتر در زمینه تخلیص پروتئین نوترکیب دارد. برای حل این مشکلات، باید ضمن بکارگیری روش‌های جدید برای افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب، روش‌های تخلیص جدید که علاوه بر ارزان بودن، مقیاس پذیری (توان تولید در مقیاس وسیع) داشته باشند نیز مورد ارزیابی و اصلاح قرارگیرد.

منابع

- ۱- نیاورانی، ا، ملک نیا ن. و پاسالار پ. (۱۳۸۱). بیوشیمی هارپر. چاپ سوم. انتشارات سماط (ترجمه).
2. Ausubel MF, Brent R, Kingston ER, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003) Current protocols in molecular biology. Johnwiley & sons Inc .
3. Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, Touzani O, Vivien D (2004) Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in storke-induced injury. *TRENDS in Neurosciences*. 27(3):155-160.
4. Brown M, Tyrell A (1985) Isolation of human t-PA genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene*. 33:279-284.

بررسی‌های مولکولی با تکنیک PCR بر روی گیاهان تراریخت، انتقال ژن tPA در گیاهان باززایی شده را اثبات نمود.

وجود یک باند اضافی در آزمایشات SDS-PAGE پروتئین با وزن مولکولی حدود ۶۳-۶۵ کیلوالتون، همراه با آزمایشات RT-PCR، زیموگرافی و وسترن بلات نیز بیان ژن tPA را در گیاهان تراریخت اثبات نمودند.

در این تحقیق که از آنالیز زیموگرافی برای ارزیابی فعالیت سرین پروتئاز tPA استفاده شد، نشان داده شد که این آزمون فوق العاده حساس است و مقادیر کمتر از ۱۰ پیکوگرم از ماتریکس متالوپروتئاز روی زیموگرام ژلاتین قابل شناسایی است که از این لحاظ با آزمون ELISA قابل مقایسه می‌باشد (۱۲). اهمیت زیموگرافی در این است که فعالیت دامین سرین پروتئاز را بصورت باندهای مجزا روی ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد اما اندازه باندها در زیموگرام معادل باندهای وسترن بلات نیست. نمونه‌های گیاهی غیر تراریخت نواحی شفاف را نشان ندادند ولی نمونه‌های تراریخت نواحی شفافی را نشان دادند که در ژل دارای پلاسمینوژن نتیجه عمل tPA می‌باشد. در بعضی از گیاهان تراریخت علیرغم وجود قطعه ژن مورد نظر احتمالاً به دلیل قرار گرفتن ژن در ناحیه هتروکروماتینی ژنوم گیاه و یا اثرات موضعی ژن وارد شده، پروتئین مورد نظر تولید نشده و یا پروتئین تولید شده ولی به علت مشکلاتی که در مراحل پس از ترجمه داشته پروتئین تولیدی فعالیت بیولوژیک ندارد. علاوه بر این، گاهی حضور پروتئازهای گیاهی در داخل عصاره پروتئینی باعث تجزیه پروتئین مورد نظر شده و در آزمون زیموگرافی فعالیت بیولوژیک دیده نمی‌شود. مبدع این روش نیز نشان داده است که پروتئازهای غیروابسته به پلاسمینوژن را می‌توان بوسیله حذف پلاسمینوژن از ماتریکس ژلاتین- پلی آکریل آمید، مشخص نمود (۱۲).

آنالیز ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات) با استفاده از آنتی بادی های مونو یا پلی کلونال، آنتی ژن‌های خاصی را شناسایی می‌کند. نمونه‌های پروتئینی که اغلب در داخل SDS و عوامل احیاء کننده‌ای همچون دی تیوتریتول (DTT) یا ۲- مرکاپتواتانول (ME-۲) حل شده‌اند، توسط SDS-PAGE از هم تفکیک شده و

5. Chen PR, Lee CC, Chang H, Tasi ChE (2005) Sesamol regulates plasminogen activator gene expression in cultured endothelial cells: a potential effect on the fibrinolytic system. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16:59-64.
6. Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*. 12:3114-3124.
7. Daniell H (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol. J*. 1:1071-1079.
8. Daniell H (2003b) Production of human serum albumin in transgenic crops without interfering with food or feed production. Access entire news report at: <http://www.isb.vt.edu>
9. Gallois P, Marinho P (1995) Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens* – expression heterologous genes in tobacco. *Methods in Molecular Biology*. 49:39-48 .
10. Hahn B, Sim J, Kim H, Ahn M, Pak H, Kim N, Kim Y (2008) Expression and characterization of human tissue-Plasminogen Activator in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11105-008-0075-y .
11. Hiatt A, Ma JKC, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K and Lehner T (1989) Generation and assembly of secretory antibodies in plants: *Science*: 268: 716-719.
12. Huessen S, Dowdle EB(1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and co-polymerized substrates. *Anal Biochem*. 102: 196-202.
13. Joosten V, Lokman C, Cees A M, Van Der Honde P and Punt J (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. *Microb Cell Fact*. 2(1):10
14. Ma S and Jevnikar AM (1999) Autoantigens produced in plants for oral tolerance therapy of autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 464: 179-194 .
15. Mason HS, Lam DM and Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS*. 89(24): 11745-11749.
16. Mattes R (2001) The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 27(4):325-335.
17. Mosher DF (1990) Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. *Clin Cardiol*. 13(VI): 5-11
18. Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, Ooyen AJJ, Van Elzen PJM, Van Den Rietveld K. and Hoekema A(1992) Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. New York, N.Y. : Nature Publishing Company; *Biotechnology* 10 (3): 292-296.
19. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HI, Goeddel DV, Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli*. *Nature* 301:214-221 .
20. Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y (1996) Tissue plasminogen activator: characteristic , applications and production technology. *Biotechnology Advances*. Vol. 14, No.3: 239-260 .
21. Sandra J, Degen F, Rajput B (1986) The human tissue plasminogen activator gene. *The journal of biological chemistry*. 261,15:6972-6985 .
22. Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KS and Bapat VA (2003) Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Protein Expr Purif*. 32(1):10-7.

