ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٤٦٨- ٤٦١

ساخت و انتقال سازه‌های حاوی ژن پروانسولین به منظور بیان گذرا در یونجه

Construction and transformation of cassettes containing human Proinsulin gene for transient expression in alfalfa plants

فرگل مظاهری[١]، اسماعیل قاسمی[٢]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[*١]، منصور امیدی[٣]، سیروس قبادی[١]، هوشنگ علیزاده[٣]

١- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
٢- استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
٣- به ترتیب استاد و استادیار پردیس کشاورزی کرج دانشگاه تهران

Mazaheri F[1], Ghasemi E[2], Sayed Tabatabaei BE[*1], Omidi M[3], Ghobadi C[1], Alizadeh H[3]

1. Graduated MSc Student, Professor, Assistant Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isafahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Assistant Professor, Ramin University, Khuzestan, Iran
3. Professor, Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sayedt@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٣/٨/٢٠- تاریخ پذیرش:٩٤/٢/١٥)

چکیده

در حال حاضر میلیون‌ها نفر در سراسر جهان برای گریز از اثرات کشنده بیماری دیابت به تزریق دائمی انسولین نیاز دارند. توسعه سیستمی که بتواند این دارو را با قیمت و فراوانی مناسب در اختیار مصرف‌کنندگان قرار دهد، امری ضروری است. امروزه با توسعه تکنیک مهندسی ژنتیک، انسولین انسانی در باکتری‌ها و مخمر تولید می‌شود ولی به علت معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در این موجودات، مانند هزینه نسبتا بالا، امکان آلودگی با پروتئین‌های غیرضروری و نیاز به مراحل هزینه‌بر خالص‌سازی، بخشی از تحقیقات بر روی تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان متمرکز شده است. پژوهش حاضر به منظور بیان گذرای دو سازه متفاوت در برگ‌های یونجه صورت گرفته‌است. سازه pLPC شامل یک ژن الحاقی به صورت زیرواحد B سم Heat-labile باکتری *E. coli* (LTB)-پروانسولین-پنتراتین و سازه pEPC حاوی یک الحاق ژنی دیگر به صورت پپتید راهنمای اکستنسین-پروانسولین-پنتراتین، ساخته و از طریق برش آنزیمی و توالی‌یابی مورد تایید قرار گرفتند. سازه‌ها به اگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل و از طریق اگروانیفیلتراسیون به گیاه یونجه انتقال یافتند. بیان ژن و تولید پروانسولین فعال در برگ‌های گیاه به‌وسیله RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین و به وسیله کیت تشخیص طبی Mono-bind تایید شد. میزان پروانسولین فعال تولیدی در برگ‌های یونجه تیمار شده با سازه‌های pLPC و pEPC به‌ترتیب ٧٦ و ٧١/٦ نانوگرم در هر گرم برگ تر یونجه بود.

واژه‌های کلیدی
اکستنسین
اگروانیفیلتراسیون
پنتراتین
زیرواحد B سم Heat-labile
E. coli

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]

مقدمه

با پیشرفت فناوری مهندسی ژنتیک و امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب، انسولین انسانی برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ توسط دانشمندان و با همکاری شرکت Genetech تولید (Chance and Frank 1993) و در سال ۱۹۸٦ در مخمر بیان شد (Thim et al. 1986). در سال ۱۹۹۸، پروتئین ترکیبی هورمون انسولین انسانی همراه با زیر واحد B سم وبا (CTB) در سیب‌زمینی تولید شد. میزان تولید هورمون انسولین و زیر واحد CTB ۰/۱ درصد کل پروتئین محلول در بافت‌های تراریخت را تشکیل می‌داد و پس از فرآوری، انسولین خالص ۰/۰۲۲ درصد کل پروتئین محلول سیب‌زمینی بود (Arakawa et al. 1998). هم‌چنین نتایج بررسی امکان بیان هورمون انسولین در بذر گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که می‌توان انسولین را به وسیله راه‌انداز بذری در بذر گیاه بیان کرد. انسولین بیان شده در گیاه تا ۰/۱۳ درصد پروتئین کل موجود در بذر بود. نتایج مثبت ارزیابی فسفریلاسیون در سلول‌های جانوری و آزمون تحمل به انسولین در موش‌های آزمایشگاهی نشان‌دهنده فعالیت زیستی این محصول به ترتیب در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و همچنین شرایط طبیعی (*in vivo*) بود (Bailyes et al. 1992). در مطالعه دیگری CTB به همراه سه نسخه از انسولین ترکیب و در ژنوم هسته توتون تلفیق شد. بررسی‌ها نشان داد که سطح بیان فقط ۰/۱ درصد کل پروتئین‌های قابل حل بود (Li et al. 2006). طی تحقیقی ژن هورمون انسولین همراه با ژن *CTB* به ژنوم کلروپلاست توتون و کاهو منتقل شد. تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخت نشان‌دهنده میزان بیان ۱٦ و ۲/۵ درصد کل پروتئین محلول به ترتیب در توتون و کاهو بود (Ruhlman et al. 2007). بیان پروانسولین انسانی در آندوسپرم بذرهای گیاه ذرت در سال ۲۰۰۷ بررسی شد. در این تحقیق حداکثر غلظت پروانسولین تولیدی در عصاره استخراجی ۱۸/۸۷ میلی‌گرم بر لیتر یا ۰/٤۲ درصد کل پروتئین محلول گزارش شد (Farinas et al. 2007). انتقال ژن پروانسولین انسانی تحت کنترل یک راه‌انداز مختص بذر به نام راه‌انداز گاما-کافیرین[1] سورگوم به وسیله تفنگ ژنی به گیاه سویا گزارش شد. گیاهان تراریخت، ژن پروانسولین را بیان و در بذرهای رسیده تجمع دادند. بذرهای تراریخت در دمای اتاق به مدت ۷ سال نگهداری و سپس برای وجود پروتئین پروانسولین مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان داد که پروانسولین موجود در بذرهای تراریخت پس از هفت سال هم‌چنان پایدار بوده و خواص دارویی خود را حفظ کرده بود (Cunha et al. 2010). در سال ۲۰۱۱، گزارش موفقیت انتقال سازه حاوی CTB-پروانسولین انسانی به کلروپلاست توتون و کاهو اعلام شد. گیاهان با پلاستید تراریخت[2] از نظر هموپلاسمی و درج هدفمند مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. در این پژوهش میزان پروانسولین تولیدی در برگ‌های پیر توتون و کاهو به ترتیب نزدیک به ٤۷ درصد و ۵۳ درصد از پروتئین کل محلول برگ بود. پروانسولین تولید شده بسیار پایدار بوده به نحوی که در برگ‌های خشک کاهو بیش از ٤۰ درصد پروانسولین مشاهده شد. به منظور تایید فعالیت بیولوژیکی انسولین تولید شده، موش‌های دیابتی با کاهوهای تراریخت تغذیه شدند. نتایج نشان‌دهنده مشابه بودن کاهش سطح قند خون در موش‌های دیابتی تغذیه شده با کاهوهای تراریخت با موش‌های دیابتی بود که انسولین تجاری به آن‌ها تزریق شده بود. با توجه به پایداری بی‌نظیر پروانسولین در برگ‌های خشک و تولید سطح بالای این هورمون، این روش می‌تواند راهی ساده و ارزان برای تولید پروانسولین خوراکی و تزریقی باشد (Boyhan and Daniell 2011).

با توجه به توانایی گیاهان در تولید پروتئین‌های ارزشمند، این مطالعه در جهت بررسی تولید پروانسولین خوراکی در سیستم‌های گیاهی نظیر یونجه صورت پذیرفت. در این پژوهش برای اولین بار از پپتیدهای نفوذ کننده به سلول در زراعت مولکولی استفاده شد و انتظار می‌رود این پپتیدها، پروانسولین را از سلول‌های پوششی عبور دهند. یکی دیگر از اهداف این تحقیق، تولید موقت پروانسولین انسانی در سیستم‌های گیاهی بود که تا به حال گزارش نشده‌است.

[1] γ-Kafirin

[2] Transplastomic

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]

مواد و روش‌ها

باکتری، ناقل و گیاه مورد استفاده

در این پژوهش به منظور انجام مراحل مختلف همسانه‌سازی از باکتری *E.coli* DH5α و به منظور انتقال ژن به گیاه یونجه رقم همدانی از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. سازه‌های pEPC و pLPC دارای تعدادی توالی سنتزی بودند که به بیان بیشتر، عملکرد بهتر و یا خالص‌سازی ساده‌تر پروتئین نوترکیب کمک کنند. جهت افزایش بیان ژن مورد مطالعه، از توالی کزاک CGA/GCCAUGG در انتهای ′۵ ژن استفاده شد که نقش بسیار مهمی در شروع ترجمه در یوکاریوت‌ها دارد. با توجه به کارایی توالی‌های ذکر شده دو سازه pEPC و pLPC به گونه زیر طراحی شدند.

بهینه‌سازی ژن و طراحی سازه‌های pLPC و pEPC

ژن پروانسولین انسانی (Gene ID: NC_000011) به منظور بیان در سیستم گیاهی بدون تغییر در آمینواسید بیانی بهینه‌سازی شد. در نهایت برای بیان موقت از طریق اگروباکتریوم، سازه‌های pLPC وpEPC طراحی و ساخته شدند (شکل۱) و از طریق توالی‌یابی مورد تایید قرار گرفتند.

سازه pLPC از سمت ′۵ به ′۳ به ترتیب دارای توالی کزاک، توالی LTB، پروانسولین، پنتراتین، ترومبین و توالی ٦ اسیدآمینه هیستیدین می‌باشد و همچنین سازه pEPC از سمت ′۵ به ′۳ دارای توالی کزاک، توالی راهنمای اکستنسین، پروانسولین، ترومبین و توالی ٦ اسیدآمینه هیستیدین است (شکل ۱).

آغازگرها

به منظور انجام مراحل مختلف پژوهش از آغازگرهای مختلفی استفاده شد که در جدول ۱ آمده‌اند.

تهیه مایه تلقیح و انجام آگروایفیلتراسیون

سازه‌های ایجاد شده با روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم منتقل (Wang et al. 2005) و در محیط انتخابی (۱۰۰ μg/ml کانامایسین۱ و ۵۰ μg/ml ریفامپسین۲) کشت شدند. همسانه‌های حاوی ناقل‌های نوترکیب با کمک PCR و با استفاده از آغازگرهای Extfw و Prorv تایید شدند. اگروباکتری‌های دارای ناقل نوترکیب کشت داده‌شده و تحت شرایط g × ۵۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و پس از حذف روشناور در شرایط استریل، به رسوب باقی‌مانده، محیط کشت تلقیح (نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و ۰/۲ میلی‌مولار استوسیرینگان) اضافه شد. در مرحله بعد امولسیون باکتریایی به مدت ٤٥ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا باکتری به محیط کشت عادت کند. نمونه‌های برگی یونجه در داخل دسیکاتور حاوی امولسیون باکتریایی قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتریایی تحت شرایط خلاء ۲۵۰ میلی بار و سه شکست ناگهانی وارد فضای بین بافتی شد و سپس برگ‌ها بر روی کاغذ صافی آغشته به محیط MS قرار داده شدند (Janssen and Gardner 1990).

استخراج RNA و انجام واکنش RT-PCR

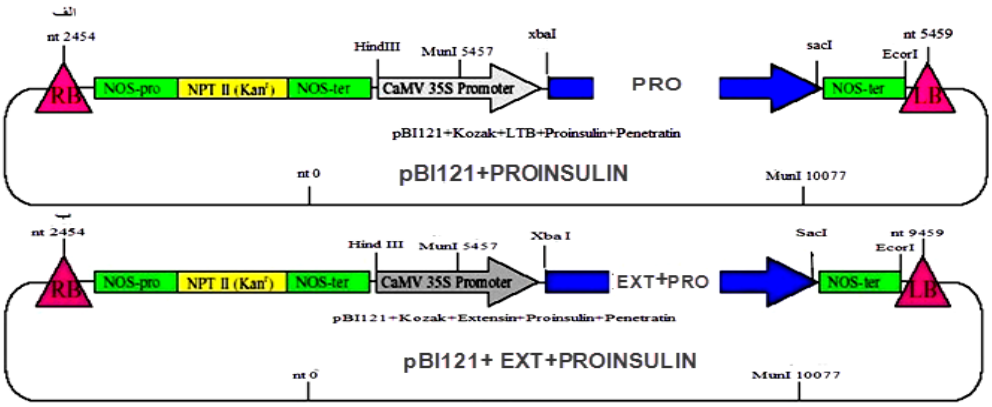
بعد از گذشت ۷۲ ساعت از اگروایفلتراسیون و اطمینان از بیان ژن، RNA کل با روش bioZOL™ براساس دستورالعمل شرکت سازنده (BioWORLD Co. آمریکا) استخراج و پس از تیمار با DNaseI (شرکت فرمنتاز طبق دستورالعمل شرکت)، رشته مکمل cDNA با استفاده از آغازگر الیگو dT و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس شرکت فرمنتاز مطابق دستورالعمل شرکت ساخته شد. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای Profw و Prorv صورت گرفت.

استخراج پروتئین و آزمون الیزا

یک گرم از برگ‌های اگروایفیلتره شده در نیتروژن مایع پودر و بعد از افزودن ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (فسفات بافرpH:7) به مدت ۲۰ دقیقه در g ×۱۲۰۰سانتریفیوژ شد (Guy et al.1992). روشناور جدا و براساس روش برادفورد، غلظت کل پروتئین تعیین (Bradford 1972) و منحنی استاندارد غلظت پروتئین در نرم‌افزار Excel رسم شد. انباشت و تعیین غلظت پروتئین انسولین تولیدی با روش ELISA، طبق دستورالعمل کیت Mono-bind انجام شد. میزان جذب در ٤٥٠ نانومتر در سه تکرار قرائت و اعداد کنترل منفی از داده‌های اصلی کسر شد و در نهایت، غلظت نهایی پروتئین به صورت درصدی از کل پروتئین محلول به‌دست آمد.

[1] Kanamycin
[2] Rifampicin

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]



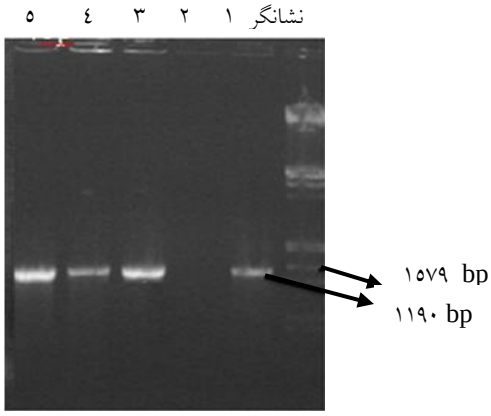
شکل۱- سازه‌های ساخته شده در این پژوهش. الف) سازه pLPC ؛ ب) سازه pEPC.

جدول۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

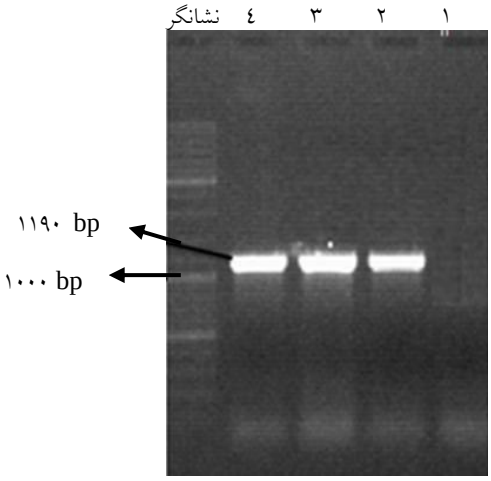
نام آغازگر	توالی آغازگر('۳-'۵)
Profw	CCATGGGGATCC TTTGTACATCAACATTTGTGTGGT
Prorv	GAGCTCCCATGGATTACAATAATTTTCCAATTGATACC
Extfw	GAGCTCCCATGGACGTTGAATTTTAATCCAAAATTGAT
35S2fw	AACCCACAGATGGTTAGAGAGG
35S1fw	CTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCC

نتایج و بحث

حضور سازه‌های pLPC و pEPC در *Agrobacterium tumefaciens* رشد کرده بر روی محیط کشت انتخابی، با تکثیر قطعه ۱۵۷۹ جفت بازی (شکل ۲) و ۱۱۹۰ جفت بازی (شکل ۳) با استفاده از واکنش همسانه-PCR با آغازگرهای 35S2fw و Prorv تایید شد.



شکل۲- تایید حضور سازه pLPC در اگروباکتریوم با استفاده از همسانه-PCR با آغازگرهای 35S2fw و Prorv. نشانگر Lambda DNA/*Eco*RI +*HindIII*؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ٥) تکثیر قطعه ۱۵۷۹ جفت بازی در همسانه‌های دارای سازه pLPC؛ چاهک ٤) شاهد.

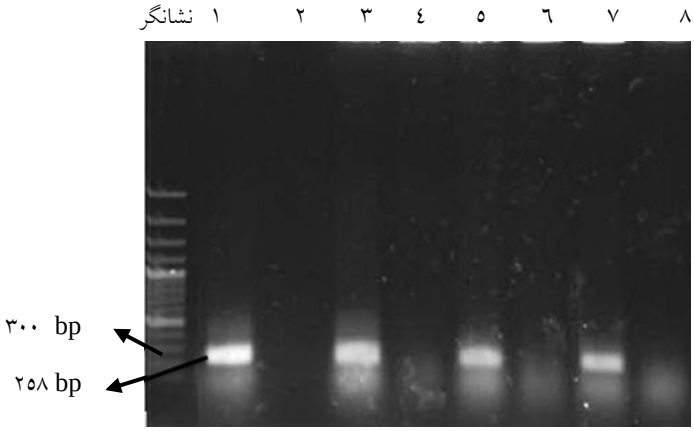


شکل۳- تایید حضور سازه pEPC در اگروباکتریوم با استفاده از همسانه-PCR با آغازگرهای 35S2fw و Prorv . چاهک۱) شاهد؛ چاهک‌های ۲، ۳ و ٤) تکثیر یک قطعه ۱۱۹۰ جفت بازی در همسانه‌های دارای سازه pEPC؛ نشانگر GeneRuler DNA Ladder Mix (فرمنتاز).

تغییر رنگ برگ‌ها به سبز تیره نشان‌دهنده صحت انجام اگروانفیلتراسیون بود (Janssen and Gardner 1990) (شکل٤). تکثیر قطعه ۲۵۸ جفت بازی با استفاده از آغازهای Profw و Prorv تایید کننده بیان ژن در سطح RNA در برگ‌های آلوده به اگروباکتریوم‌های دارای سازه‌های pLPC و pEPC بود (شکل ٥).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]

شکل٤- الف) محفظه خلاء نیم‌لیتری مورد استفاده برای اگروایفیلتراسیون؛ ب) برگ یونجه بعد از اینفیلتراسیون؛ ج) برگ یونجه قبل از اینفیلتراسیون.

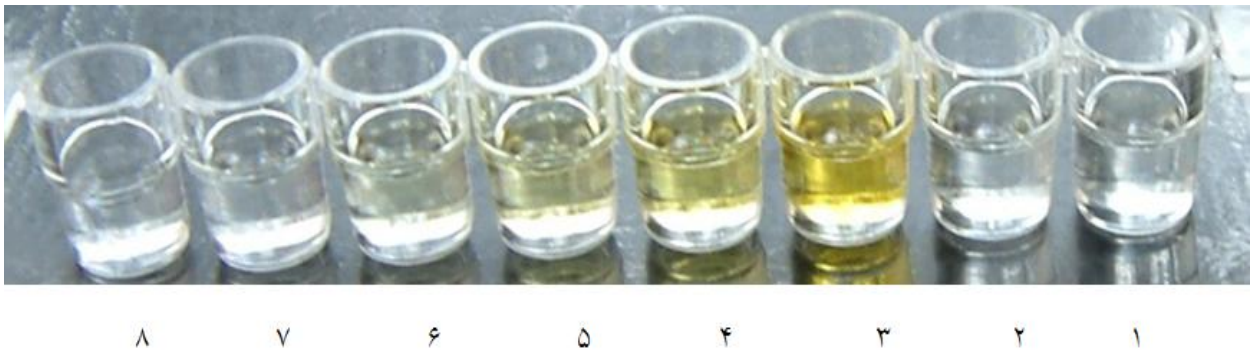


شکل٥- تأیید بیان ژن انتقالی در برگ‌های یونجه اگروایفیلتره شده به‌وسیله واکنش RT-PCR. چاهک‌های ۲، ٤) تکثیر قطعه ۲۵۸ جفت بازی برگ‌های اگروایفیلتره شده با ناقل pEPC؛ چاهک ٦ و ۸) تکثیر یک قطعه ۲۵۸ جفت بازی درآزمون RT-PCR برگ‌های اگروایفیلتره شده با ناقل pLPC؛ چاهک‌های ۵،۳،۱ و۷) کنترل منفی با دو آغازگر 35S2fw و Prorv (عدم تکثیر نشان‌دهنده عدم وجود DNA در RNA استخراجی بود)؛ نشانگر) GeneRuler DNA Ladder Mix.

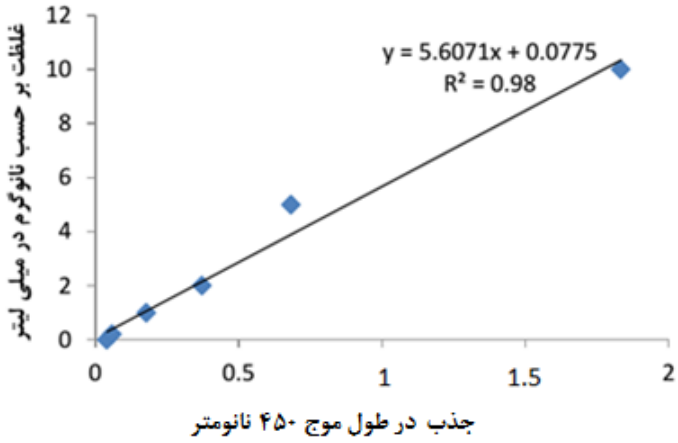
به منظور تایید عدم وجود آلودگی DNA واکنش PCR با آغازگر رفت راه‌انداز (35S2fw) و آغازگر برگشت ژن پروانسولین انجام شد، عدم تکثیر قطعه، نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی DNA بود. متوسط غلظت پروتئین استخراجی در برگ‌های یونجه با روش برادفورد و در ۵۹۵ نانومتر، نزدیک به ۳۵۱۷/۹۲ میکروگرم در هر گرم برآورد شد. برای بررسی تولید انسولین فعال در برگ‌های یونجه اگروایفیلتره شده از کیت تشخیص طبی Mono-bind استفاده شد. جهت تعیین مقدار انسولین تولید شده در بافت‌های تراریخت، با استفاده از استانداردهای موجود در کیت Mono-bind (شکل٦)، منحنی استاندارد غلظت انسولین در نرم‌افزار Excel رسم و معادله تعیین غلظت انسولین به‌دست آمد (شکل ۷). براساس نتایج به دست آمده از واکنش الایزا متوسط غلظت پروانسولین تولیدی در برگ‌های یونجه اگروایفیلتره شده با استفاده از سازه‌های pLPC و pEPC به ترتیب در حدود ۷٦ و ۷۱/٦ نانوگرم در هر گرم برگ تازه بود (شکل ۸).

تولید انسولین به علت برخی معایب مانند هزینه نسبتا بالا، امکان آلودگی با پروتئین‌های غیرضروری در باکتری و مخمر، بر روی تولید در گیاهان متمرکز شده‌است. در این پژوهش سعی شد پروانسولین انسانی با استفاده از دو سازه مختلف در برگ‌های گیاه یونجه به صورت گذرا بیان شود. تفاوت این دو سازه در توالی‌های کمکی الحاق شده به ژن پروانسولین بود. سازه pEPC دارای توالی اکستنسین در قسمت ′۵ ژن پروانسولین می‌باشد که امکان خالص‌سازی انسولین تولیدی از اندام‌های گیاهی را تسهیل می‌کند. در صورتی که پپتید راهنمای اکستنسین به ناحیه ′۵ پروتئینی متصل شود، قادر است آن را به ناحیه آپوپلاست سلول گیاهی منتقل کند. با انتقال پروتئین نوترکیب به ناحیه آپوپلاستی، مرحله خالص‌سازی به‌سهولت انجام خواهد شد. در سازه pEPC هم مانند سازه pLPC توالی پنتراتین در ناحیه ′۳ ژن پروانسولین، الحاق شد که این توالی می‌تواند امکان عبور انسولین از سلول‌های پوششی روده را فراهم آورد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]



شکل٦- رنگ‌گیری غلظت‌های مختلف انسولین. ۱و۲) شاهد؛ ۳ تا ۸) غلظت‌های مختلف انسولین به‌ترتیب ۱۰، ۵، ۲، ۰/۱،۲ و صفر نانوگرم در میلی‌لیتر.



شکل ۷- منحنی استاندارد غلظت پروانسولین

شکل۸- نتایج بررسی تولید پروانسولین در برگ‌های اینفیلتره شده با استفاده از کیت مونوبایند. ۱ تا ۳) تایید تولید پروانسولین در برگ‌های یونجه اگروایفیلتره شده به‌وسیله سازه pBI121+LPC؛ ٤ تا ٦) تائید تولید پروانسولین فعال در برگ‌های یونجه اگروایفیلتره شده به‌وسیله سازه pBI121+EPC.

اگرچه تا به حال پروانسولین انسانی در گیاهان تولید شده اما هیچ کدام از الحاق‌های مورد استفاده در این پژوهش، در گیاهان بیان نشده‌است. بنابراین با توجه به توانایی قابل توجه توالی‌های LTB و پنتراتین در تحویل خوراکی پروتئین‌ها در این پژوهش الحاق آن‌ها به پروانسولین امکان تحویل خوراکی آن بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده میزان انسولین تولیدی در برگ‌های اگروایفیلتره شده برای سازه‌های pLPC وpEPC، به‌ترتیب ٧٦ نانوگرم و ٧١/٦ نانوگرم در هر گرم برگ تازه بود. نتایج حاصل، اختلاف قابل توجهی با پژوهش‌های انجام شده در زمینه انتقال پایدار انسولین به گیاهان مختلف مانند؛ Arakawa et al. (1998) در سیب‌زمینی، Nykiforuk and et al. (2006)در آرابیدوپسیس، Li et al. (2006) در توتون، Ruhlman et al. (2007) در کلروپلاست توتون و کاهو،.Cunha et al (2010) در سورگوم دارد که تایید کننده بیان بالاتر در حالت گذرا نسبت به پایدار

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]

است (Garabagi et al. 2012). در تحقیقی که توسط (2007) . Haghighi et alانجام شده، میزان پروتئین هورمون رشد انسانی در گیاه یونجه به‌صورت گذرا ۰/۱ درصد از کل پروتئین استخراج شده بود. (2009) .Pourseyedi et al در آزمایش دیگری میزان بیان گذرای پروتئین VP2 را در گیاهان یونجه ۳/۸ برابر گیاهان شاهد اعلام کردند و ابراز داشتند که میزان پروتئین تولیدی در یونجه بیشتر از توتون و کاهو بوده‌است. میزان پروتئین انسولین تولیدی حاصل از این آزمایش (به طور میانگین ۲/۰۹ درصد از پروتئین کل) به نتایج (2009) .Pourseyedi et al نزدیک‌تر است. تایید تولید انسولین در بافت‌های تراریخت به‌وسیله کیت Mono-bind فعال بودن انسولین تولیدی در بافت‌های گیاهی را نشان می‌دهد و بیانگر قابلیت کاربرد آن در پزشکی است. نتایج مثبت حاصل از انتقال گذرا دو سازه pEPC و pLPC به گیاه یونجه می‌تواند مقدمه‌ای برای انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه باشد.

منابع

Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH (1998) A plant-based cholera toxin B subunit–insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nature Biotechnology 16: 934-938.

Bailyes E, Guest P, Hutton J (1992) Insulin synthesis. Insulin: Molecular Biology to Bailyes Pathology. Oxford University Press Oxford, New York, Toronto.

Beignon AS, Briand JP, Rappuoli R, Muller S, Partidos C (2002) The LTR72 mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* enhances the ability of peptide antigens to elicit CD_{4+} T cells and secrete gamma interferon after coapplication onto bare skin. Infection and Immunity 70: 3012-3019.

Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcome DC (2000) Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. Plant Journal 21: 73-81.

Boyhan D, Daniell H (2011) Low cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. Plant Biotechnology Journal 9: 585-598.

Bradford MM (1976) A dye binding assay for protein. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Chance RE, Frank BH (1993) Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin. Diabetes Care 16: 133-142.

Cunha N, Araújo A, Leite A, Murad A, Vianna G, Rech E (2010) Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. Genetic Molecular Research 9: 1163-1170.

Farinas C, Leite A, Miranda E (2007) Recombinant human proinsulin from transgenic corn endosperm: solvent screening and extraction studies. Brazilian Journal of Chemical Engineering 24: 315-323.

Garabagi F, McLean MD, Hall JC (2012) Transient and stable expression of antibodies in Nicotiana species. In Antibody Engineering. Humana Press, Springer, New York, USA, 389-408.

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

Janssen BJ, Gardner RC (1990) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with Agrobacterium. Plant Molecular Biology 14: 61-72.

Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proceeding of the National Academy of Science of the USA 88: 1864-1868.

Haghighi H, Hashemi Sohi H, Jourabchi E, Ghorbanli ML (2007) The transient expression growth hormone (HGH) leaves of human in alfalfa leaves. Daneshvar Medicine 15:31-38 (In Farsi)

Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI (2001) Safety and immunogenicity of oral inactivated whole cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. Infection and Immunity 69: 3581-3590.

Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene 234: 187-208.

Li D, O'Leary J, Huang Y, Huner NP, Jevnikar AM, Ma S (2006) Expression of cholera toxin B subunit and the B chain of human insulin as a fusion protein in transgenic tobacco plants. Plant Cell Reports 25: 417-424.

Liang, JF, Yang VC (2005) Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency. Biochemical and Biophysical Research Communications 335: 734-738.

Mäe M, Langel Ü (2006) Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. Current. Current Opinion in Pharmacology 6: 509-514.

Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren H J, Markley NA, Moloney MM (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from Arabidopsis thaliana seeds. Plant Biotechnology Journal 4: 77-85.

Pourseyedi S, Hashemi Sohi H, Omidi M, Ghoreshi SA, Shah Nejat Boushehri AA, Jourabshi E (2009) Transient expression of VP_2 gene of very virulent IBDV in tobacco,

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]

Alfalfa and lettuce leaves by agroinfiltration. Pajouhesh and Sazandegi 83: 18-25 (In Farsi)
Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007) Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts–oral administration protects against development of insulitis in non-obese diabetic mice. Plant Biotechnology Journal 5: 495-510.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory press. New York, USA.
Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, Fiil NP (1986) Secretion and processing of insulin precursors in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 83: 6766-6770.
Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-spEPCific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 11128-11133.
Wang B, Siahaan TJ, Soltero RA (2005) Drug delivery: principles and applications. John Wiley & sons. New York. USA.
Yang Y, Li R, Qi M (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. Plant Journal 22: 543-551.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.2.4]