طراحی و ساخت وکتور پلاستیدی حاوی ژن BADH

مقاله پژوهشی

حسین هنری*[1]، مصطفی بخشی[2]، بلال تقی‌پور[3]

۱. گروه و مرکز تحقیقات علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده/ انتقال ژنهای خارجی به کلروپلاست گیاهان دارای مزایای زیادی است که میتوان به بیان بالای پروتئین‌های خارجی و عدم آلودگی زیست محیطی اشاره کرد. با توجه به توالی یابی ژنوم پلاستید کاهو می‌توان قطعات همولوگ زیادی را برای طراحی وکتور به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب در این گیاه استفاده کرد. در این پژوهش از قطعات همولوگ rbcL-accD و پروموتر Prrn و ترمیناتور TpsbA برای ژن هدف همراه قطعه ژنی BADH مقاومت به بتائین آلدهید به همراه پروموتر rrn ۱۶S و ترمیناتور psbA گیاه اسفناج برای ساخت وکتور B-۳۹-pcL۹۶ پلاسمید کلروپلاستی کاهوی Lactuca sativa رقم TN-۹۶-۳۹ ایرانی استفاده شد. این سیستم راه تولید وسیع داروهایی همانند پروتئینهای پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها، آنتی بادیهای نوترکیب را در گیاه کاهو که بصورت خوراکی مصرف میشود هموار خواهد کرد.

واژگان کلیدی: انتقال پلاستیدی، کاهو، ساخت حامل، ژن

مقدمه

در سالهای اخیر گیاهان بعنوان سیستم بیان ژن‌ها، جهت تولید واکسن با در نظر گرفتن مزایای زیادی که دارند مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند (۱و ۲). تولید واکسن‌های خوراکی موضوع جذابی در بیوتکنولوژی بوده زیرا مدیریت را آسان و هزینه‌ها را به شدت کاهش می‌دهد. خوراکی شدن پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند هزینه تولید را تا ۹۰٪ کاهش دهد (۳). امروزه در مهندسی ژنوم کلروپلاستی استفاده از آنتی بیوتیک یک مشکل اساسی بوده به همین منظور محققین برای حل این مسئله به روش‌های جدیدی متوسل شده‌اند. تا به امروز تحقیقات گسترده‌ای به منظور تولید حامل‌های مختلف با ویژگی‌های متنوع به منظور انتقال ژن به پلاستید گیاهان صورت پذیرفته است (۴). در گیاهان عالی، پستانداران و باکتریها ژنی بنام BADH[1] وجود دارد. این ژن آنزیمی را بیان می‌کند که قادر است سم بتائین آلدهید[2] را به گلیسین بتائین[3] که یک ماده غیر سمی است، تبدیل نماید (۵). حضور گلیسین بتائین درسلول باعث محافظت[4] اسمزی گیاه در برابر آب نمک و یا استرس محیطی می‌گردد. در گیاهان و باکتری‌ها گلیسین بتائین علاوه بر بالا بردن قدرت اسمزی سلول مانع عملکرد سلول نمیشود. اگر در کشت سلولی برای انتخاب سلول‌های نوترکیب از بتائین آلدهید استفاده گردد با استفاده از ژن آنزیم BADH ترانسفورم شده میتوان عمل غربالگری را انجام داد (۶). بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) قادر به زدودن سموم بتائین آلدهید در سلول گیاهی بوده و سلول‌های گیاهی ترانسفورم شده در محیط کشت حاوی بتائین آلدهید رشد کرده و با این تکنیک سلول‌های ترانسفورم شده را می‌توان انتخاب

1. Betaine aldehyde dehydrogenase
2. Betaine Aldehyde
3. Glycine betaine
4. Osmoprotectant

* **حسین هنری، Ph.D**
مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
پست الکترونیک: honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۲۷ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۶/۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

کرد (۷). در طراحی وکتور پلاستیدی دو جایگاه دارای همولوژی کامل با کلروپلاست لازم است که تاکنون از ۱۴ جایگاه دوتایی استفاده نموده‌اند (۸). در طراحی وکتور پلاستیدی کاهو، کاناموتو[5] و همکاران (۹) از جایگاه rbcL-accD[6] و لیلولت[7] و همکاران (۱۰) از trnI-trnA بعنوان قطعات همولوژی جهت انتقال ژن به کلروپلاست استفاده کرده‌اند. کاهو یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات دنیا و دارای بیوماس بالایی است. درحال حاضرکاهو در۷۶ کشور جهان بصورت سنتی وگلخانه‌ای و در چهار فصل کشت و از برگ‌های آن به عنوان سالاد استفاده می‌شود. با تولید گیاهان تراریخته در سطح وسیع داروهایی همانند پروتئین‌های پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها، آنتی بادی‌های نوترکیب را می‌توان تولید کرد. میزان بیان ژن‌های خارجی در کلروپلاست گیاهان مختلف، متفاوت بوده و از ۲٪ تا۴۷٪ کل پروتئین محلول را گزارش کرده‌اند (۱۱). گیاه کاهو با توجه به نوع مصرف و بیوماس آن دارای پتانسیل مطلوب برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌های خوراکی است. میزان بیان پروانسولین[8] و GFP[9] به ترتیب به مقدار ۲/۵٪ و۳۶٪ کل پروتئین محلول در برگ‌های تازه کاهو گزارش شده است (۹). هدف از انجام این پژوهش بومی نمودن فناوری ساخت وکتورهای پلاستیدی بر اساس گونه‌های بومی موجود در ایران است تا بتوان با الحاق ژن در آن و انتقال آن به کلروپلاست کاهوی ایرانی راه را برای تولید پروتئین‌های با کاربرد داروئی در داخل کشور هموار نمود.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA ژنومی کاهو

پس از تخریب سلول‌های برگ گیاه کاهو، DNA ژنومی کاهو به روش CTAB[10] استخراج گردید. ماده شوینده ستیل تری متیل آمونیوم بروماید به عصاره سلولی اضافه گردید و DNA با اتصال به CTAB ترسیب یافت. سپس با سانتریفوژ (۱۸K-۳ SIGMA) مخلوط حاصل با سرعت ۱۴۰۰۰rpm در مدت زمان ۱۰ دقیقه محلول روئی که حاوی سایر اجزا و محتویات سلول (پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ...) بود، خارج گردید. در ادامه با حل نمودن رسوب حاصل در NaCl با غلظت ۱ مولار ترکیب DNA-CTAB شکسته شد و با DNA با استفاده از اتانول رسوب دهی و تغلیظ گردید. محتوای RNA نیز با اضافه نمودن ۵ میکرولیتر ریبونوکلئاز (Fermentas) A از محتوای اسید نوکلئیکی حذف گردید. به منظور بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده میزان ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز گردید.

تهیه ژن BADH به صورت صناعی

با استخراج توالی ژن کد کننده BADH مربوط به گیاه اسفناج (بدلیل فعالیت بالای آن در قیاس با سایر گیاهان) از پایگاه NCBI[11] و قرار دادن توالی‌های مربوط به پروموتر ۱۶Srrn و ترمیناتور TpsbA مربوط به گیاه توتون به ترتیب در انتهای '۵ و '۳ آن، ژن بصورت صناعی در وکتور کلونینگ pUC۱۸ از شرکت ندای فن تهیه گردید.

تکثیر قطعات مورد نظر

ابتدا توالی دقیق مربوط به ژن‌هایی که برای ساخت وکتور مورد استفاده قرار گرفت با جستجو در پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI استخراج گردیدند. طراحی پرایمر برای هر ژن با استفاده از نرم افزار Oligo صورت پذیرفت (جدول ۱). با استفاده از جفت پرایمرهای طراحی شده قطعات همولوگ پلاستیدی و راه‌اندازها و پایان دهندههای مربوطه از روی DNA گیاه کاهو بوسیله تکنیک PCR[12] با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase (Fermentas) تکثیر گردیدند. برنامه PCR به قرار زیر بود: دناتوراسیون اولیه[13] (۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه)، ۳۰ چرخه تکثیر ژن (دناتوراسیون ثانویه[14]: ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال[15] پرایمر: بر اساس جدول ۱ در ۶۰ ثانیه، گسترش[16]: ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه)، گسترش نهایی[17]: ۷۲ درجه به مدت ۴ دقیقه و نهایتاً نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد. ژن‌های prrn (۱۱۳ bp) و TpsbA (۳۳۹ bp) بدلیل اندازه کوچکشان پس از تخلیص با استفاده از کیت تجاری تخلیص از ژل آگارز با نقطه ذوب پائین (Bioneer)، با استفاده از تکنیک سوئینگ PCR[18] امتزاج یافتند و به یک قطعه bp۴۵۴ تبدیل گردید. برنامه این فرآیند به قرار زیر بود: دناتوراسیون اولیه (۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه)، ۱۰ چرخه تکثیر ژن (دناتوراسیون ثانویه: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرهای داخلی: ۶۵ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش: ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه)، افزودن پرایمرهای خارجی،

5. Kanamoto
6. Acetyl-CoA carboxylase beta subunit- Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
7. Lelivelt
8. Proinsulin
9. Green Fluorescent Protein
10. Cetyltrimethylammonium Bromide
11. National Center for Biotechnology Information
12. Polymerase Chain Reaction
13. Primary denaturation
14. Secondary denaturation
15. Annealing
16. Extension
17. Final extension
18. SOEing-PCR

Archive of SID
www.SID.ir

۳۵ چرخه تکثیر ژن (دناتوراسیون ثانویه: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر: ۶۵ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش: ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه)، گسترش نهایی: ۷۲ درجه به مدت ۴ دقیقه و نهایتاً نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد.

همسانه سازی قطعات تکثیر یافته در حامل pGEM

پس از تکثیر قطعات مورد نظر توسط تکنیک PCR با استفاده از آنزیم Pfu DNA polymerase (Fermentas) تخلیص هر کدام از محصولات PCR با استفاده از کیت تخلیص ژن (Bioneer) انجام شد. در ادامه با استفاده از تکنیک T-cloning ژن BADH پس از آدنیله شدن پایانه‌های '۳ و '۵ آن توسط آنزیم Taq DNA polymerase طی مدت زمان نیم ساعت و تخلیص محصولات آدنیله شده، در وکتور pGEM با استفاده از آنزیم T۴ لیگاز (Promega) الحاق[19] گردید. واکنش هضم آنزیمی برای سایر ژن‌ها با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثری[20] (Fermentas) که جایگاه برش آنها در هنگام طراحی پرایمرها برای هر ژن در توالی پرایمرها تعبیه شده بود صورت پذیرفت که واکنش‌های برشی برای هر ژن به قرار زیر بود:

- برش ژن accD: برش توسط آنزیم‌های Not I و Sac I.
- برش ژن‌های Pro۱۶s و psbA که توسط سوئینگ PCR با هم امتزاج یافته‌اند: برش توسط آنزیم‌های Pst I و Not I.
- برش ژن rbcL: برش توسط آنزیم‌های Apa I و XhoI..

پس از واکنش هضم آنزیمی قطعات مورد نظر که حاوی پایانه‌های چسبنده بودند توسط کیت تجاری تخلیص شدند. با وارد کردن ژن BADH انتهای '۵ آن که دارای جایگاه برشی Xho I بود و جایگاه Apa I موجود در MCS وکتور pGEM تحت برش آنزیمی واقع شدند و پس از تخلیص حامل برش خورده و خطی شده ژن rbcl در این حامل الحاق گردید. در مرحله بعد جایگاه‌های برشی Pst I موجود در انتهای '۳ ژن BADH و جایگاه برشی Not I موجود در MCS حامل pGEM تحت هضم آنزیمی واقع شدند و مانند مرحله قبلی ژن‌های امتزاج یافته Pro۱۶s و psbA در بین این جایگاه‌ها همسانه سازی گردید. با ادامه روند قبلی ژن accD نیز بین جایگاه‌های برشی Not I و Sac I همسانه سازی گردید. تمامی واکنش‌های الحاق توسط آنزیم T۴ لیگاز (Fermentas) صورت پذیرفت. در پایان به منظور اطمینان از فرآیند همسانه سازی هضم آنزیمی دو قطعه اصلی در حامل مذکور صورت پذیرفت.

نتایج

تکثیر قطعات به وسیله آنزیم Taq و Pfu پلیمراز

ژن‌های مورد نظر از DNA گیاه کاهو با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای rbcL (bp۱۱۰۰)، accDL (bp۱۱۰۰))، Pro۱۶s (bp۱۱۳) و psbA (bp۳۳۸) استخراج شدند. ژن‌های Pro۱۶s و psbA با استفاده از تکنیک SOEing-PCR امتزاج یافتند و به یک قطعه bp۴۵۴ تبدیل گردید. پرایمر مشترک این دو ژن به نحوی در نظر گرفته شده که دارای سه جایگاه برشی باشد و بتوان از این بخش بعنوان MCS وکتور استفاده کرد. نتیجه فرآیند PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید که نتایج آن در شکل ۱ به نمایش درآمده است.

الحاق ژن‌ها در وکتور pGEM

پس از الحاق ژن BADH توسط تکنیک T-cloning در حامل pGEM، الحاق سایر ژن‌ها پس از تیمار با آنزیم‌های محدودالاثر طراحی شده در پایانه‌هایشان و ایجاد پایانه‌های چسبنده به ترتیب ذکر شده در بخش قبل در MCS وکتور pGEM الحاق شدند. نتیجه این الحاق به شکل نقشه باز در شکل ۲-الف و به شکل وکتور حلقوی در شکل ۲-ب با جزئیات مربوط به توالی و ترتیب ژن‌های الحاق یافته و محل‌های الحاق به نمایش در آمده است.

هضم آنزیمی وکتورB-۳۹-pcL۹۶

به منظور تأیید وجود ژن‌ها در وکتور B-۳۹-pcL۹۶ نوترکیب، برش با آنزیم‌های Xho I , Pst I و Hind III انجام شد. محصول پیش بینی شده از برش‌ها پس از پایان زمان این فرآیند با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مشخص گردید که نتیجه آن در شکل ۳ نشان داده شده است. اندازه قطعات حاصل از این برش هم‌اندازه قطعات مورد نظر بودند که این امر تأییدی بر صحت همسانه سازی ژن‌های مورد نظر بود.

بحث

سیستم بیان ژن‌ها درکلروپلاست گیاهان جهت تولید واکسن‌های خوراکی به دلایل مزایای زیاد مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. ترانسفورماسیون به پلاستید گیاهان وابسته به طراحی و تهیه وکتور

19. Ligation
20. Restriction enzymes

Archive of SID
www.SID.ir

اختصاصی پلاستیدی، انتقال وکتور پلاستیدی به وسیله تفنگ ژنی(۱۲و ۱۳) یا پلی اتیلن گلایکول(۱۰)، الحاق ژن به پلاستید ژنوم گیاه بوسیله نوترکیبی در نواحی طراحی شده همتا و غربالگری سلول‌های ترانسفورم شـده و باززایی آنها در محیط آنتی بیوتیک و سمومی همانند بتائین آلدئید است. کلروپلاست گیاهان یک میزبان ایده‌ال برای بیان ژن‌های خارجی میباشـد (۱۴). برای انتقال ژن‌های خارجی بوسیله نوترکیبی به ژنوم کلروپلاست، از توالی‌های همولوگ ژنوم کلرپلاست در وکتور اختصاصی گیاه مورد نظر استفاده می‌شود. با توجه به وجود ۱۴ جایگاه دوتایی همولوگ در کلروپلاست گیاهان عالی (۸) می‌توان از آنها برای ساخت وکتورهای پلاستیدی استفاده نمود. با توجه به تعیین توالی ژنوم پلاستیدی کاهو می‌توان از نواحی همولوگ برای طراحی وکتور پلاستیدی استفاده کرد (۹). کاناموتو و همکاران و للیلولت و همکاران به ترتیب از جایگاههای rbcL-accD و trnI-trnA برای ساخت وکتور پلاستیدی استفاده کردند (۹و۱۰). بدلیل بالا بودن میزان بیان ژن در استفاده از جایگاه‌های rbcL-accDدر کاهو در طراحی وکتور، دو جایگاه اشـاره شده مد نظر قرار گرفت. نواحی همولوگ برای استفاده در وکتور مورد نظر بایستی به‌طور متوالی بر روی ژنوم کلروپلاست قرار گرفته باشند. همچنین گروه تحقیقاتی کاناموتو از پروموترهای قوی اختصاصی کاهو و غیر اختصاصی توتون برای ژن aadA استفاده نموده و تفاوت معنی داری را گزارش نکرده‌انـد (۹). یکی از مزایای جذاب تکنولوژی ترانس پلاستمیک تولید پروتئین بالا در کلروپلاست میباشد (۱۵). با تولید گیاهان تراریخته در سطح وسـیع داروهایی همانند پروتئین‌های پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسنها، آنتی بادیهای نوترکیب را میتوان تولید کرد.

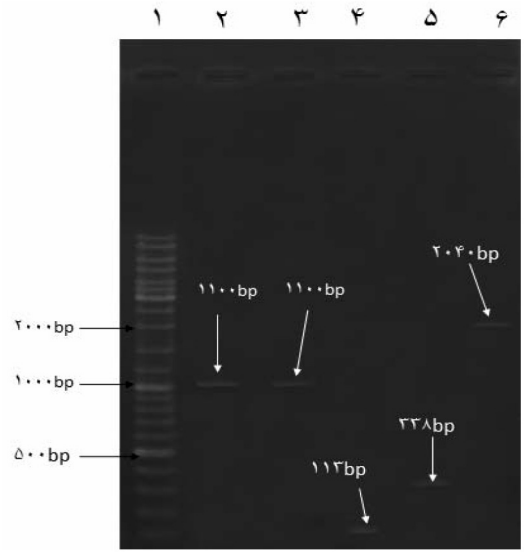
نتیجه گیری

در این پژوهش با مد نظر قرار دادن تولید پروتئین‌های نوترکیب در حجم انبوه در گیاهان اقدام به طراحی و ساخت حامل پلاستیدی مخصـوص رقم بومی گیاه کاهو گردید. ۲ ژن مهم و دخیل در بیان ژن‌های خارجی در پلاستید گیاه مورد نظر که همولوگ دو جایگاه در ژنوم پلاستید کاهو بودند و همچنین توالی یک پروموتر و ترمیناتور قوی که با تکنیک سـوئینگ PCR با هم امتزاج یافتند در ساخت این حامل بیانی استفاده گردیدند. به منظور غربالگری کارآمد نمونه‌های نوترکیب نیز از یک ژن مقاومت نسبت به سم بتائین آلدئید استفاده گردید و این ژن نیز درساخت حامل مورد استفاده قرار گرفت. با فناوری بومی بوجود آمده در خصوص وکتورهای پلاسـتیدی برای گیاهانی که پلاستید آنها توالی یابی گردیده است می‌توان وکتور اختصاصی برای انتقال ژن به این گیاهان را به کمک مهندسی ژنتیک تهیه نمود.

جدول۱: توالی پرایمرهای طراحی و سنتز شده برای هر یک از ژن‌ها.

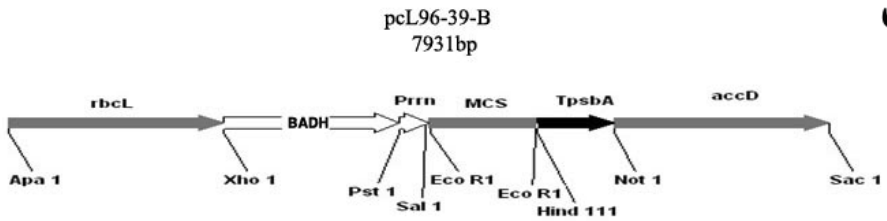
نام ژن	عدد دسترسی	توالی پرایمر	Tm
BADH	M31480.1	′GAGCTCATCGCT CGAGCGAGGG GAC3′For: 5	65.9
		′AGGACACTGCAGTTATTTGCCAACTA3′Rev: 5	64.4
accD	YP_398338	For: 5′ATGCGGCCGCCCACCCATCCTGTATATTGTCC3′	68.2
		′GCGCGAGCTCTTCATCCATAGGCTCCCAAG3′Rev: 5	67.1
Pro16s	AP007232.1	′CTGCAGGATATTTTGATTTGCTACCC3′For: 5	56.64
		′GAATTCGTCGACATTTCGCCCGGAGTTCGCTCC3′Rev: 5	68.1
TpsbA	AP007232.1	For: 5′ GTCGACGAATTCAAGCTTCTGGAGGAGCAGCAATGAAG3′	67.7
		Rev: 5′GCGGCCGCTGCAAACCGCTTTTGATTTAC3′	64.3
rbcL	YP_398337	For: 5′ATGGGCCCAGTATGGTCGTCCCCTGTTG3′	65.8
		′CGCTCGAGCGATCCAGGGAAAATACAGG3′Rev: 5	64.3

Archive of SID
www.SID.ir

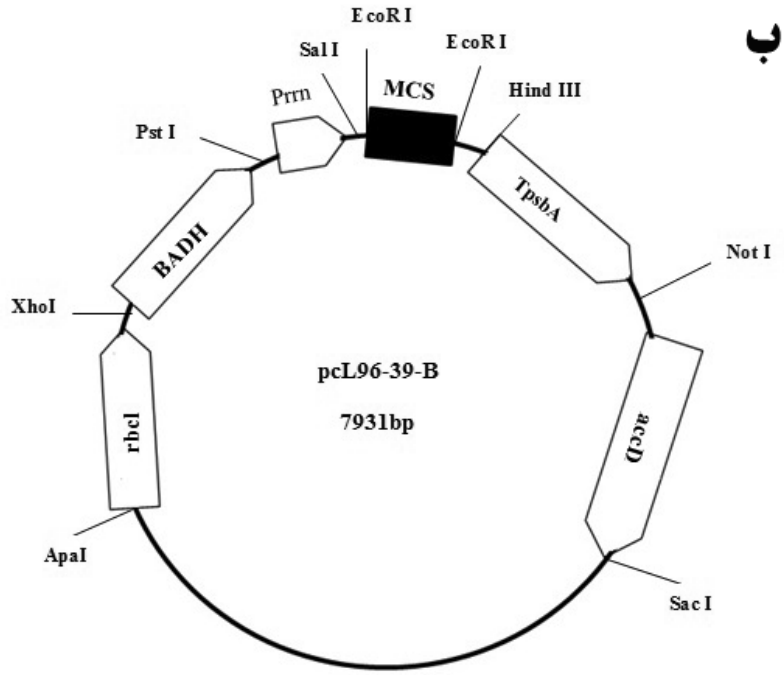


شکل۱: الگوی الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد. تکثیر قطعات ژنی مورد نظر توسط آنزیم Taqپلیمراز. ردیف ۱: نشـانگر مولکولی DNA. ردیف ۲: ژن (bp۱۱۰۰) rbcL. ردیف ۳: ژن (bp۱۱۰۰) accDL. ردیـف ۴: ژن (bp۱۱۳) Pro۱۶s. ریف ۵: ژن (bp۳۳۸) psbA. ردیف ۶: ژن BADH به همراه توالی‌های پروموتر ۱۶Srrn و ترمیناتور TpsbA مربوط به گیاه توتون الحاق یافته به انتهای '۵ و '۳ آن.

الف

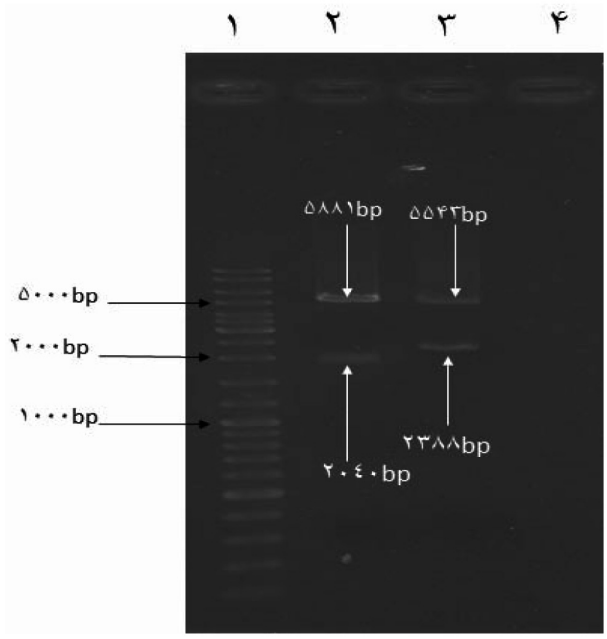


ب



شکل۲: االف) شمای باز و ترتیب ژن‌های الحاق یافته در وکتور pGEM و ایجاد وکتورpcL۹۶-۳۹-B. ب) نقشه حلقوی وکتور پلاستیدی pcL۹۶-۳۹-B.

www.SID.ir



شکل۳: الگوی الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد. قطعات حاصل از برش آنزیمی بر روی پلاسـمید B-۳۹-pCL۹۶ ساخته شده. ردیف ۱ شامل: نشانگر مولکولی. ردیف۲ شامل: BADH= ۲۰۴۰ bp و قطعهbp ۵۸۹۱ شامل قطعات (prrn- MCS - ۱۱۰۰-۱۱۰۰bp))، (accD-۳۰۰۰bp) + rbcL-pGEM) bp), TpsbA =۶۸۱bp) می‌باشد. ردیف ۳ شامل: (prrn- MCS = BADH- ۲۳۸۸ bp) و قطعهbp ۵۵۴۳ شامل قطعات (rbcL- pGEM) (۳۰۰۰bp)-،(۱۱۰۰bp) TpsbA ۱۱۰۰-(accD)، (۳۴۳bp= ۵bp+bp) می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References /منابع

1. Sala F, Manuela Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine 2003; 30: 803-808.
2. Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. Vaccine 2001; 21: 2735-2741.
3. Mishra N, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Vyas SP. edible vaccines: A new approach to oral immunization. Indian J Biotechnol. 2008; 7: 283-294.
4. Maliga P. Engineering the plastid genome of higher plants. Curr. Opin. Plant Biol. 2002; 5: 164–172.
5. Sakamoto A, Murata N. Genetis engineering of glycinebetaine synthesis in plants; current status and implications for enhancement of stress tolerance. J Exp Bo. 2000; 51: 81-88.
6. Weigel P, Weretilnyk EA, Hanson AD. Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. Plant Physiol. 1986; 82: 753-759.
7. Chebolu S, Daniell H. Chloroplast-Derived Vaccine Antigens and Biopharmaceuticals: Expression, Folding, Assembly and Functionality. Curr Top Microbiol. 2009; 332: 33–54.
8. Lutz KA, Azhagiri AK, Tungsuchat-Huang T, Maliga P. A Guide to Choosing Vectors for Transformation of the Plastid Genome of Higher Plants. Plant Physiol. 2007; 145: 1201–1210.
9. Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, et al. Efficient and stable transformation of Lactuca sativa L. cv. Cisco (lettuce) Plastids. Transgenic Res. 2006; 15: 205–217.
10. Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, et al. Stable plastid transformation in lettuce (Lactuca sativa L.) Plant Mol Biol. 2005; 58: 763–774.
11. Daniell H. Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive. Proc. Natl. Acad. Sci. 2007; 104: 6879-6880.
12. Watson J, Koya V, Leppla SH, Daniell H. Expression of Bacillus anthracis protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. Vaccine 2004; 22: 4374–4384.
13. Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H. plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. Infect Immun. 2005; 73: 8266-8274.
14. Verma D, Daniell H. Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. Plant Physiol. 2007; 145: 1129–1143.
15. Egelkrout E, Rajan V, Howard JA. Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Sci. 2012; 184: 83-101.

Archive of SID

www.SID.ir