Archive of SID

Crop Biotech.
Autumn (2015) 11: 1-13.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره یازدهم، پائیز ۱۳۹۴ (۱۳-۱)

ارزیابی گیاه تراریخت کلزای بیان‌کننده پروتئین نوترکیب از زیر واحد B سم‌های STX2 و CTX باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *ویبریوکلرا*

آتنا مظفری[۱]، روح‌اله کاظمی[۲]، جعفر امانی[۳]، محیات جعفری[٤]، علی هاتف سلمانیان[٥*]

۱. کارشناس‌ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۳.دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
٤. کارشناس‌ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
٥. استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٤/۲۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۷/۲۸)

Molecular analysis of transgenic canola plant containing chimeric B subunit of bacterial toxin STX2 and CTX from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*

Atena Mozafari[1], Rouhollah Kazemi[2], Jafar Amani[3], Mahyat Jafari[4], Ali Hataf Salmanian[5*]

1. M.Sc., Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
2. Ph.D student, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. M.Sc., Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
5. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

(Received: July 12, 2015 - Accepted: Oct. 17, 2015)

Abstract

Diarrheal diseases have been considered as one of the most major world health problems in all age categories. Among all the pathogens caused to diarrhea, entrohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and *Vibrio cholerae* are the most important agents. *E. coli* O157:H7 as the most important serotype of EHEC bacteria caused diarrhea by producing STX2 toxin. In *vibrio cholera*e the cholera toxin (CTX) also is the main virulence factor that leads to diarrhea. Both of these toxins are belong to AB_5 family and due to non-toxicity and natural immunogenic characteristic of B subunit, it could be introduced as an appropriate candidate for immunogenicity against these toxins. Plant seeds are an effective biological bioreactor for production of recombinant immunogenic antigens and also foreign proteins can be expressed in plants with the native structure. In this research, the production of recombinant protein composed of binding subunits of STX2 and cholera toxin was evaluated in canola seed as an oral vaccine candidate. The SC construct composed of (*stx2B* and *ctxB*) was subcloned to plant vector under the control of canola seed specific promoter (*fae*) and transformed to *Agrobacterium tumefaciens*. Then the recombinant vector was transformed to plant host via *Agrobacterium* mediated transformation. Transgenic plants was evaluated and the amount of chimeric protein expressed in transgenic canola seed was determined by semi quantitative ELISA and subsequently the amount of chimeric proteins was estimated 40 milligram per 1 gram seed. The results showed that the canola seed can efficiently produce recombinant protein.

Keywords: Transgenic canola plant; EHEC; *Vibrio cholerae*; Edible immunogen

چکیده

بیماری‌های اسهالی یکی از مهمترین معضلات بهداشت جهانی، در تمامی رده‌های سنی مطرح می‌باشند. از میان عوامل ایجاد کننده این بیماری‌ها می‌توان به *Escherichia coli* Enterohemorrhagic (EHEC) و *Vibrio cholerae* اشاره کرد. در گروه EHEC سروتایپ O157:H7، شایع‌ترین عامل ایجاد اسهال، از طریق سم STX2 ایجاد بیماری می‌کند. در *ویبریوکلرا* نیز توکسین CTX منجر به بروز بیماری می‌گردد. هر دوی این سموم دارای ساختار AB_5 هستند. با توجه به غیر سمی بودن زیرواحد B و ایمنی‌زایی ذاتی این زیرواحد، می‌توان آن را کاندیدای مناسبی برای ایجاد ایمنی علیه این سموم معرفی کرد. بذور گیاهان رآکتور زیستی مناسبی برای تولید ایمونوژن‌های نوترکیب محسوب شده و پروتئین‌های بیگانه‌ای که در گیاه بیان می‌شوند می توانند ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند. در این تحقیق بیان پروتئین نوترکیب متشکل از زیرواحد اتصالی دو سم کلرا و STX2 با ترجیح کدونی گیاه به‌عنوان کاندیدای یک ایمونوژن خوراکی در بذر بررسی شد. بدین منظور قطعه ژنی *sc* (*stx*2B و *ctx*B) به ناقل بیانی گیاهی تحت کنترل پیش‌برنده اختصاصی بذر کلزا FAE (Fatty Acid Elongase) منتقل و پس از تائید حضور سازه ژنی با روش‌های مولکولی، به *اگروباکتریوم تومی فاشینس* جهت تراریختی گیاه انتقال و جهت بیان پروتئین به گیاه کلزا منتقل شد. پس از تأیید تراریختی، میزان بیان گیاهی پروتئین نوترکیب در بذر به روش الایزا ارزیابی و میزان پروتئین حدود ٤۰ میلی‌گرم در یک گرم بذر تخمین زده شد. نتایج این تحقیق بیانگر کارایی بالای استفاده از بذر برای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیاه کلزای تراریخت، EHEC، *ویبریوکلرا*، ایمونوژن خوراکی.

* نویسنده مسئول: علی هاتف‌سلمانیان
E-mail: salman@nigeb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عفونت‌های روده‌ای که توسط عوامل مختلف بیماری‌زای روده‌ای ایجـاد می‌گردند، هنوز به عنوان یکی از موارد مشکل ساز برای بهداشت عمومی مطرح بوده و سالانه موارد زیادی از بیماری‌ها را در کشورهای مختلف از جمله ایران ایجاد می‌نمایند (Jafari *et al*., 2009). عوامل باکتریایی مسئول حدود ۲۴ درصد از بروز اسهـال‌ها می‌باشند و در این بین *اشریشیا کلای* خون‌ریزی‌دهنده [1] و *ویبریوکلرا* [2] از عوامل عمـده و مهم در ایجاد اسهـال اندمیک و اپیدمیـک از طریق تولید توکسین در سراسر دنیا به شمار می‌روند (WHO/UNICEF 2014; Nguyen and Sperandio, 2012). دامنه علائم بالینی ناشی از آلودگی با سویه EHEC وسیع است و به همین دلیل اغلب تشخیص را دشوار می‌سازد. این باکتری می‌تواند ایجاد آلودگی بدون علامت، اسهال معمولی، اسهال خونی، کولیت هموراژیک (Hemorrhagic Colitis)، نشانگان اورمی همولیتیک (Hemolytic Uremic Syndrome) و حتی مرگ نماید (Matthew *et al*., 2010). سویه O157:H7 این باکتری به عنوان سویه اصلی تهدیدکننده سلامت عمومی در کشورهای صنعتی و سروتیپ اصلی بیماری‌زای انسانی شناخته شده است. به طور کلی بیماری‌زایی ناشی از حضور این باکتری در بدن در دو مرحله صورت می‌گیرد: مرحله اول اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده و مرحله دوم، تولید سم میکروبی و انتقال این سم به بافت‌های دورتر مثل کلیه‌ها می‌باشد (Kühne *et al*., 2004). *ویبریوکلرا* نیز یکی از اعضای مهم خانواده ویبریوناسه (Vibrionaceae) و یکی از عوامل اسهال اپیدمیک (وبا) است که با تولید انتروتوکسین ایجاد بیماری اسهال می‌کند. انتروتوکسین تولید شده توسـط این باکتری به محیط خارج سلولی ترشح شده و پس از اثرگذاری بر روی سلول‌های میزبان از انتقـال یون‌ها توسط سلول‌های اپیتلیـال روده جلوگیری می‌کند (Maheshwari *et al*., 2011). علی رغم کاهش موارد ابتلا به این باکتری‌ها در دهه‌های اخیر، در کشورهای جهان و از جمله ایران، هنوز هم بیماری اسهال یک خطر جدی به حساب می‌آید و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و جزو عوامل خطرناک اعلام شده توسط سازمان بهداشت جهانی است (Kühne *et al*., 2004). سموم تولید شده توسط این دو باکتری از ساختار سموم خانواده AB_5 پیروی می‌کنند. توکسین‌های این خانواده از بخش A با فعالیت آنزیمی و بخش B به عنوان عامل غیر سمی و مسئول اتصال به گیرنده تشکیل شده‌اند. بخش B این سم پروتئینی متشکل از ۵ زیرواحد یکسان است که به شکل یک حلقه پنتامریک و متصل به زیرواحد A می‌باشد (Odumosu *et al*., 2010). زیرواحد B بخش مهم سم از نظر ایمنی‌زایی است و آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه این واحد در مقایسه با زیرواحد A به طور کارآمدتری سم را خنثی می‌کنند. در مطالعات مشخص شده است که می‌توان از زیرواحد غیر سمیB علاوه بر نقش ایمنی‌زایی به عنوان یک حامل ایمونوژنیک زیستی برای تحریک سیستم ایمنی در واکسن‌ها نیز استفاده کرد (Sanchez and Holmgren, 2005). علی رغم شیوع بالا، درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیر چندانی بر کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط این دو باکتری ندارد (Mellies *et al*., 2007). با توجه به این مسئله که یکبار ابتلا به این عفونت‌ها در بدن فرد ایجـاد مصـونیت می‌کند (Sizemore *et al*., 2004)، کارایی واکسیناسیون برای ایجاد ایمنی و پیشگیری از این عفونت‌ها اثبات می‌شود. از آنجایی که راه عفونت‌زایی این باکتری‌ها معمولاً از طریق مدفوعی-دهانی (Faecal-Oral) می‌باشد و بیشتر سیستم ایمنی مخاطی در مبارزه با آن‌ها دخیل است، به نظر

1. Enterohemorrhagic *Escherichia coli.* EHEC
2. *Vibrio cholerae*

www.SID.ir

Archive of SID

می‌رسد که بهترین راه مقابله از طریق ایجاد تیتر بالای پاسخ‌های IgA اختصاصی ترشحی و در سطوح مخاط و به ویژه روده خواهد بود. در سیستم‌های جدید تولید و ارایه مواد ایمنی‌زا، واکسن‌های خوراکی (Edible Vaccine) که به طور عمده شامل اجزایی از گیاهان تراریخت است، می‌توانند آنتی‌ژن مورد نظر را در بافت‌های خوراکی خود تولید کنند. استفاده از سیستم‌های گیاهی به‌عنوان سیستم بیان پروتئین‌های نوترکیب، مزایایی چون حفظ ساختار اصلی پروتئین بیگانه در گیاه، سالم بودن فرآورده حاصل از نظر آلودگی به پاتوژن‌های انسانی و حیوانی را در بر دارد (Arun *et al*., 2009). تا کنون پروتئین‌های نوترکیب مختلفی جهت تشخیص، کاربرد آنزیمی، آنتی‌ژن‌های واکسن، آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های دارویی در گیاهان تولید شده است (Kisung ko *et al*., 2014). کلید اصلی تولید واکسن در گیاه تراریخت، انتخاب گیاه و اندام بخصوصی از آن است که بتوان ماده مورد نظر را در آن به مقدار زیاد تولید و نگهداری کرد و همچنین بتوان آن را به صورت خوراکی تجویز نمود. در میان بافت‌های مختلف، بذر به علت داشتن ویژگی‌هایی مانند امکان نگهداری آسان، میزان پروتئین بالا، فعالیت پروتئازی محدود و میزان آب بسیار کم محل مناسبی جهت تولید و حفظ پروتئین نوترکیب است (Orellana-Escobedo *et al*., 2014). برای ایجاد ایمنی بر علیه دو باکتری مورد اشاره و از طریق واکسن‌های خوراکی تاکنون اجزای ایمنی‌زای متعددی از این دو باکتری به صورت جداگانه و در بخش‌های عمومی گیاهان تراریخت تولید شده است، اما داده‌ای مبنی بر طراحی یک سازه ژنی واحد از بخش‌های اتصالی سموم مورد نظر و بیان و تجمع آن در یک قسمت خاص گیاه وجود ندارد. بدین منظور در این تحقیق امکان تولید و تجمع یک ایمونوژن خوراکی مصنوعی شامل زیرواحد سموم STX و CTX (SC) در بذر گیاه کلزای تراریخت مورد بررسی قرار گرفت، تا در مراحل بعد بررسی ایمنی‌زایی آن به عنوان یک ایمنوژن خوراکی ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد و سویه باکتری

سویه *اشریشیا کلای* O157:H7 و *ویبریوکلرا* از آزمایشگاه مرجع بیمارستان بوعلی تهران تهیه شد. سویه باکتری *اشریشیا کلای* DH5α و *اگروباکتریوم تومی فاشینس* سویه LBA4404 جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاهی از شرکت اینویتروژن (Invitrogen) فراهم گردید. پلاسمید pTZ57R/T از شرکت فرمنتاز تهیه وهمچنین از پلاسمید pBI1400 (دکتر سلمانیان- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) به منظور بیان اختصاصی ژن در بذر گیاه کلزا استفاده شد. آنتی‌بادی کانژوگه ضد موش OPD ازشرکت سیگما تهیه گردید. بذور کلزا (*Brassica napus* L.) رقم PF-7045-91 از مرکز تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه آنزیم‌ها، هورمون‌ها و مواد مورد استفاده از شرکت Fermentas و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از شرکت‌های دارویی تهیه شد. بقیه مواد شیمیایی از شرکت Merck با خلوص بیولوژی مولکولی تهیه گردید. تمامی روش‌های مورد استفاده بر اساس منابع معتبر علمی انجام گرفت (Sambrook and Russell, 2004).

تکثیر ژن *sc* (*stxB-ctxB*) از طریق واکنش زنجیره‌ای PCR

به منظور دستیابی به ژن کایمریک واجد دو ناحیه stx_B و ctx_B (*sc*) از سازه سه قسمتی از پیش

www.SID.ir

Archive of SID

سنتزشده (دکتر سلمانیان- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) حاوی بخش‌های B از سموم LT، STX و CTX (LSC) در پلاسمید pUC57، به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. توالی کدکننده دو پروتئین STXB و CTXB توسط لینکر از هم جدا شدند و عملکرد مؤثر رابط پپتیدی در تفکیک دو قسمت پروتئینی با آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. جهت تکثیر قطعه ژن مورد نظر، از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱) استفاده شد. آغازگر رفت دارای جایگاه برش آنزیمی *sma*I و همچنین توالی کزاک و آغازگر برگشت حاوی جایگاه برشی آنزیم *Sac*I بود. همچنین توالی چهار اسیدآمینه‌ای KDEL به منظورجهت‌گیری و تجمع پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی سلول گیاهی در انتهای کربوکسیلی پروتئین تعبیه شد.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر و شناسایی قطعه مورد نظر (*sc*).
جایگاه برش آنزیمی در توالی مشخص شده است.

آغازگر	توالی	Tm (°C)
رفت	CCATACCCGGGAAAACAA**ATG**GCTGATTGTGCTAAG	67/2
برگشت	GAATTCGAGCTC**TCA**CAATTCATCCTTCTC	63/3

واکنش PCR با آنزیم *Taq* Max (fermentas) و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و به کارگیری ۱۰ نانوگرم DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای تکثیر، از دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار یون منیزیوم استفاده شد. کیفیت محصول واکنش پس از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد.

تهیه سازه ژنی pBI1400-*sc*

به منظور سهولت کار و انجام آنالیزهای اولیه ابتدا محصول PCR در ناقل حدواسط pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. سپس ناقل نوترکیب pTZ57R/T-*sc* و ناقل pBI1400 طبق روش استاندارد مورد هضم آنزیمی (*sma*I/*sac*I) قرار گرفت. قطعه خارج شده از ناقل pTZ57R/T-*sc* خالص شده و در ناقل pBI1400 برش خورده همسانه‌سازی شد (شکل ۱). پس از پایان واکنش اتصال، مخلوط به درون میزبان *اشریشیا کلای* DH5α مستعد منتقل و کلنی‌های مورد نظر بر روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک کاناماییسین انتخاب شدند. پس از اطمینان از مراحل اتصال با استفاده از روش‌های هضم آنزیمی، واکنش PCR و توالی یابی، پلاسمید نوترکیب استخراج و با روش ذوب- انجماد به باکتری *اگروباکتریوم* مستعد شده منتقل شد (Sambrook and Russell, 2004).

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن

برای تراریختی گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)، بذر گیاه رقم PF-7045-91 ابتدا ضدعفونی سطحی، سپس استریل و برای کشت به صورت فاصله دار بر روی محیط MS½[1] (دارای نصف میزان املاح ضروری کم مصرف و پر مصرف) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه قرار گرفتند (Kang *et al.*, 2004). برای تراریختی گیاه با *اگروباکتریوم* نوترکیب واجد پلاسمید pBI1400-*sc* ابتدا کشت در محیط مایع حاوی کاناماییسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ریفامپیسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. از کشت شبانه *اگروباکتریوم* نوترکیب، رسوب تهیه (۴۷۱×g، ۱۰دقیقه) و رسوب حاصل در محیط MS مایع حاوی استوسرینگون (۱۰ mM) همگن شد.

www.SID.ir

Archive of SID

برگ‌های لپه‌ای از قبل به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت پیش کشت (محیط MS حاوی mg/L ۰/۱ هورمون NAA و mg/L ۴/۵ هورمون BAP) قرار گرفته بودند. دمبرگ‌های برگ‌های لپه‌ای به مدت زمان ۱۰ دقیقه در محیط سوسپانسیون *اگروباکتریوم* قرار داده شدند. سپس برگ‌های لپه‌ای در محیط هم‌کشتی (محیط MS هورمون دار) قرار گرفتند و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ریزنمونه‌ها، به محیط انتخابی (mg/L ۲۰۰ سفوتاکسیم و ۸mg/L کانامایسین) انتقال یافتند. پس از حدود هفت تا ده روز نوساقه‌های متعددی روی بعضی از ریزنمونه‌ها به وجود آمد. تعدادی از این نوساقه‌ها بر روی محیط انتخابی فوق، سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند. نوساقه‌های سبز باززا شده روی محیط گزینشگر، جدا شده و به محیط طویل شدن نو ساقه (محیط MS فاقد هورمون) منتقل گردیدند. پس از رشد کافی و تشکیل مریستم فعال، نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی (محیط MS½[1] حاوی mg/L ۰/۱ هورمون IBA) انتقال داده شدند (Zebarjadi *et al*., 2011; Kahrizi *et al*., 2007) و پس از رشد ریشه‌ها گیاهان به خاک منتقل و در نهایت پس از گلدهی در شرایط ایزوله بذر گیاه تراریخت احتمالی تهیه شد.

تأیید تراریختی گیاهان کلزا

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های کلزای تراریخت و غیرتراریخت (کنترل منفی) با استفاده از کیت (vivantis) انجام گرفت وغلظتDNA به کمک اسپکتروفتومتر (در طول موج ۲۶۰nm) اندازه‌گیری شد. با استفاده از جفت آغازگرهای تخصصی واکنش PCR بر روی نمونه‌های با شرایط قبلی صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل ۱. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب از pBI1400-*sc*. محل همسانه سازی ژن *sc* و جایگاه اتصال آغازگرهای اختصاصی در شکل مشخص شده است.

بررسی بیان پروتئین SC در بذر گیاه تراریخت

پس از تکمیل رشد گیاهان تراریخت احتمالی بذور آن‌ها جمع آوری شده و پروتئین محلول تام آن استخراج شد. برای این منظور ۵۰ میلی‌گرم بذر گیاه تراریخت در نیتروژن مایع منجمد و پس از ساییده شدن با استفاده از محلول استخراج پروتئین تام بافت (شرکت اینترون) پروتئین بذر استخراج شد. از محلول بدست آمده به روش برادفورد سنجش پروتئین صورت گرفت. سپس واکنش الایزای نیمه کمی با استفاده از پروتئین خالص LSC نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* (گروه دکتر سلمانیان) طراحی و با توجه به جذب نوری خوانده شده در برابر رقت‌های متوالی پروتئین، یک نمودار استاندارد رسم گردید. بدین منظور مقادیر مختلف پروتئین LSC از ۲۵۰ نانوگرم تا ۷ پیکوگرم با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشاننده (بافر کربنات- بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار با pH معادل ۸) در کف چاهک الیزا قرار

www.SID.ir

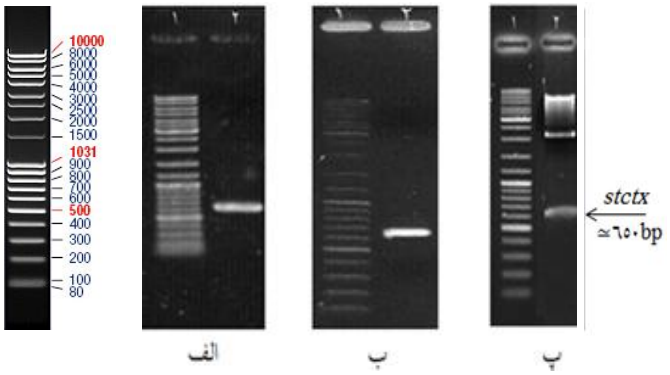
Archive of SID

گرفت. پس از انجام شستشو با بافر PBST (بافر PBS حاوی توئین ۰/۰۵درصد)، چاهک‌ها با استفاده از بافر PBST حاوی ۳٪ شیر خشک بدون چربی[1] پوشانده شد. پس از انجام شستشو به عنوان آنتی‌بادی اولیه، رقت ۱:۱۰۰۰ سرم موش‌های ایمن شده علیه پروتئین CTX (تولیدشده در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه دکتر سلمانیان) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از مرحله شستشو، آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز[2] (رقت ۱:۵۰۰۰) به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شستشو به چاهک‌ها محلول OPD[3] افزوده شد و واکنش با استفاده از اسید سولفوریک ۲/۵مولار متوقف شد. بر اساس جذب‌های بدست آمده در ۴۹۲ نانومتر نمودار استاندارد الایزا ترسیم شد. سپس با اندازه‌گیری جذب نوری پروتئین نوترکیب SC موجود در پروتئین استخراج شده از بذر گیاهان تراریخت و مقایسه آن با نمودار استاندارد، میزان غلظت پروتئین نوترکیب SC در پروتئین محلول تام بذر محاسبه گردید. از بذر گیاه غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی واکنش استفاده شد و آزمایش در سه تکرار مستقل انجام گرفت (Moravec *et al.*, 2007).

نتایج

تکثیر ژن دو قسمتی *sc* و همسانه سازی آن در ناقل pTZ57R/T

جهت دستیابی به ژن کایمریک دو قسمتی *sc* از ساختار سه قسمتی *lsc* موجود در پلاسمید pUC57، به عنوان الگو استفاده گردید. طی واکنش PCR قطعه مورد نظر با طول ۶۳۵ جفت نوکلئوتید (شامل دو ژن به طول ۵۱۹ نوکلئوتید به همراه لینکر به طول ۴۵ نوکلئوتید و ترادف‌های مربوط به کدون‌های شروع و خاتمه، جایگاه‌های برشی، ترادف‌های کزاک، KDEL و 6XHis) تکثیر و پس از مشاهده بر روی ژل آگارز یک درصد، باند مورد نظر توسط کیت تخلیص محصول PCR خالص‌سازی شد (شکل الف-۲). واکنش اتصال بین محصول PCR و ناقل pTZ57R/T صورت گرفت و سپس به درون سلول مستعد *E. coli* DH5α انتقال داده شد. برای اطمینان از صحت عمل کلونینگ، پس از خالص‌سازی پلاسمید از کلنی‌های مورد نظر واکنشPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه*sc* (شکل ب-۲) و هضم آنزیمی با آنزیم‌های دو سر ژن (شکل پ-۲) انجام شد.



شکل ۲. مراحل تکثیر، همسانه سازی و تایید مولکولی کلنی نوترکیب حاوی *sc*-pTZ57R/T. ستون ۱در همه شکل‌ها: نشانگر اندازه DNA (Mix 100bp). الف. ستون۲: محصول تکثیر و خالص سازی شده قطعه *sc* از ژل آگارز، ب. تایید همسانه سازی ژن مورد نظر در پلاسمید، با روش PCR. پ. ستون۲: تایید همسانه سازی ژن مورد نظر، با روش هضم آنزیمی.

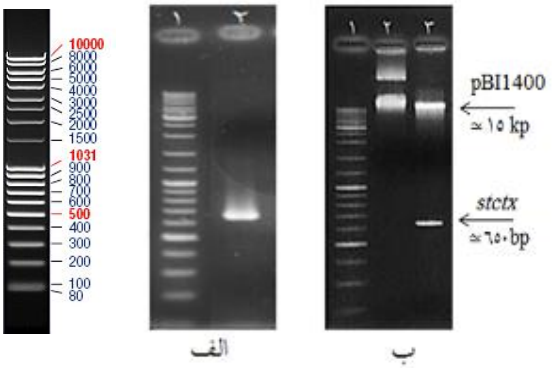
1. Skim milk
2. Mouse IgG HRP Congugate
3. O-phenilenediamine

www.SID.ir

Archive of SID

زیر همسانه‌سازی قطعه *sc* در ناقل پلاسمیدی pBI1400.

قطعه موردنظر از پلاسمید pTZ57R/T با هضم آنزیمی (*Sma*I و *Sac*I) جدا و در همان جایگاه‌ها در پلاسمید pBI1400 همسانه‌سازی و به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5α منتقل گردید. پس از انتخاب اولیه بر روی محیط کشت جامد حاوی کانامایسین، صحت همسانه‌سازی با روش PCR، هضم آنزیمی (شکل ۳) و تعیین توالی، تایید شد.



شکل ۳. مراحل تایید مولکولی کلنی نوترکیب حاوی pBI1400-*sc*. ستون ۱ در همه شکل‌ها: نشانگر اندازه DNA (Mix 100bp). الف. با روش PCR، ب. با استفاده از روش هضم آنزیمی؛ ستون ۲: پلاسمید حاوی قطعه کایمریک *sc* قبل از برش با آنزیم؛ ستون ۳: پلاسمید حاوی قطعه کایمریک *sc* پس از هضم آنزیمی

به‌منظور انتقال ژن *sc* به گیاه، سازه ژنی pBI1400-*sc* با استفاده از روش ذوب و انجماد وارد سلول *اگروباکتریوم* شد. کلنی‌های مقاوم به کانامایسین بر روی محیط جامد انتخاب و حضور سازه ژنی از طریق واکنش PCR بر روی کلنی‌های باکتری تایید گردید (شکل ۴).

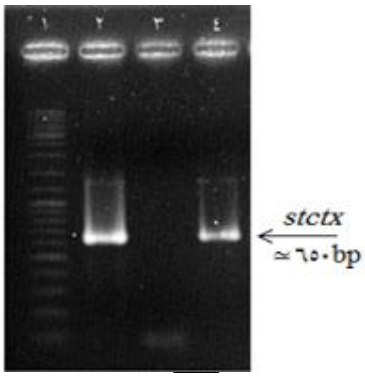
کشت بافت و تراریختی گیاه کلزا

مراحل جوانه زنی بذور تا تولید گیاهان تراریخت و انتقال به محیط گلدان در شکل ۵ (مراحل ۶-۱) ارائه شده است.

بررسی مولکولی گیاه تراریخت کلزا

آزمون PCR به منظور اثبات حضور سازه ژنی در گیاهان تراریخت

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت، DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA از برگ‌های جوان و سبز گیاهان، استخراج گردید. سپس PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *sc* انجام شد (شکل ۶).

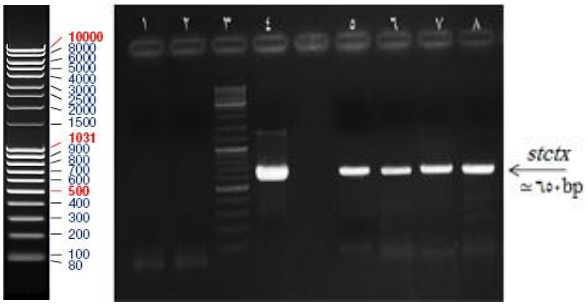


شکل ۴. تایید حضور ناقل pBI1400-*sc* در *اگروباکتریوم* از طریق روش PCR. ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (Mix 100bp)؛ ستون ۲: کنترل مثبت: پلاسمید حاوی ژن *lsc*؛ ستون ۳: کنترل منفی: فاقد DNA ؛ ستـون ۴: کلنی‌های *اگروباکتریوم*‌های حاوی pBI1400-*sc*

www.SID.ir

Archive of SID

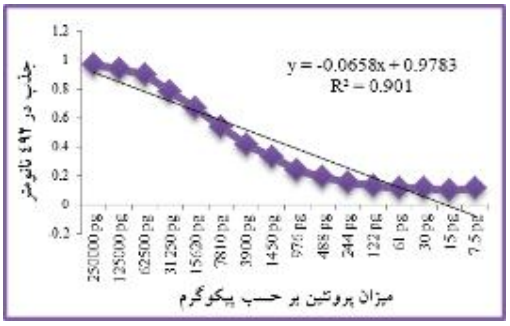
شکل ۵. مراحل انتقال سازه ژنی به گیاهان کلزا تا مرحله بذر دهی. ۱. کشت بذور کلزا، ۲. برگ‌های اولیه، ۳. برگ‌های اولیه در مجاورت *اگروباکتریوم*، ۴. گیاهچه رشد کرده بر محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، ۵. گیاه کلزا در مرحله گلدهی،۶. بذور گیاه کلزای تراریخت (احتمالی)



شکل ۶. اثبات حضور سازه ژنی باروشPCR ؛ ستون ۱: کنترل منفی: فاقد DNA؛ ستون ۲: کنترل منفی: DNA ژنومی گیاه کلزای غیرتراریخت؛ ستون ۳: نشانگر اندازه DNA (Mix 100bp)؛ ستون ۴: کنترل مثبت: پلاسمید حاوی ژن *lsc* ؛ ستون ۸-۵: محصول PCR ازDNA ژنومی گیاه کلزای تراریخت شده با سازه *sc*

بررسی میزان تولید پروتئین نوترکیب SC در گیاهان تراریخت

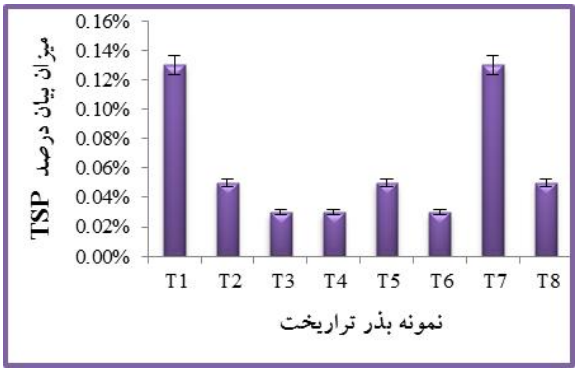
جهت اندازه گیری میزان پروتئین محلول به صورت کمی، از روش برادفورد استفاده شد. حضور پروتئین نوترکیب مورد نظر (SC) با روش الایزا و با استفاده از آنتی‌بادی به‌دست آمده از موش‌های ایمن شده با پروتئین LSC مورد ارزیابی قرار گرفت. با مقایسه ODهای به دست آمده در این آزمون با نمودار استاندارد الایزا (شکل۷) میزان تولید پروتئین نوترکیب در بذر تراریخت گیاه کلزا به طور متوسط ۰/۰۶ (۰/۰۳-۰/۱۳) درصد پروتئین محلول بافت (شکل ۸) تعیین شد. به‌طور متوسط میزان پروتئین نوترکیب به‌دست آمده از یک گرم بذر کلزای تراریخت حدود ۴۰ میکروگرم محاسبه گردید.



شکل ۷. منحنی استاندارد الایزا بر اساس مقادیر متفاوت از پروتئین خالص شده LSC.
این نمودار برای تعیین غلظت محلول TSP گیاه و برای تعیین غلظت پروتئین SC مورد استفاده قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸. میزان پروتئین نوترکیب بیان شده (SC) در بذر کلزای تراریخت (میزان محاسبه شده پروتئین در گیاه کنترل منفی (کلزای غیرتراریخت) از میزان بیان در نمونه‌ها کسر شده است). (T1-T8 لاین‌های مجزا و مختلف گیاه کلزای تراریخت را مشخص می‌نماید).

بحث

عفونت‌های روده‌ای و بیماری‌های اسهالی که توسط عوامل بیماری‌زای مختلف روده‌ای ایجاد می‌گردند، همچنان یکی از بزرگترین معضلات بهداشت جهانی می‌باشند (Qadri *et al*., 2005). *اشریشیا کلای* خونریزی‌دهنده روده‌ای (EHEC) به لحاظ شیوع بیشتر و همچنین ایجاد بیماری‌های گوارشی مانند اسهال خونی (کولیت خونریزی‌دهنده)، اسهال غیرخونی، بیماری‌های سیستمیک مانند سندرم اورمی همولیتیک و مشکلات سیستم اعصاب مرکزی در انسان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای ایجاد بیماری، این باکتری قادر است سمی بسیار قوی به نام شیگا توکسین (STX) تولید نماید (Melton-Celsa *et al*., 2012). در کنار این باکتری بیماری‌زا، بیماری وبا با شیوع جهانی نوعی بیماری اسهالی حاد است که توسط باکتری *ویبریوکلرا* ایجاد می‌شود و در شرایط کنترل نشده می‌تواند در عرض چند ساعت به از دست دادن شدید آب بدن و در نهایت مرگ منجر شود. یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری سم روده‌ای کلراتوکسین (CTX) است (Batlan, 2007; Jawets, 2004). هر دو این سموم روده‌ای (CTX و STX) از خانواده سموم AB_5 بوده که زیر واحد پنتامری B مسئول اتصال توکسین به گیرنده اسفنگولیپیدی سطح سلول یوکاریوتی می‌باشد (Odumosu *et al*., 2010). تحقیقات متعددی از سال‌های ۱۹۹۵ تا کنون به منظور بررسی توانایی این سموم در ایجاد ایمنی در برابر اسهال در دنیا انجام شده است که در آن‌ها از قسمت‌های مختلف سم و یا آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه این سموم به منظور ایجاد ایمنی در برابر سمیّت این باکتری‌ها استفاده شده است (Garcia-Angulo *et al*., 2013; Loc *et al*., 2011; Huy *et al*., 2011). با توجه به عملکرد زیرواحد B این مولکول کاندیدای مناسبی برای استفاده در واکسن‌های مختلف و از جمله واکسن‌های خوراکی خواهد بود. در این سموم زیرواحدB، با اتصال به گیرنده‌های مختلف سطح سلول‌های هدف می‌تواند به‌خوبی در دسترس سیستم ایمنی قرار گیرد و با توجه به ترادف اسیدهای آمینه آن، موجب تحریک پاسخ ایمنی در میزبان شود (Beddoe *et al*., 2010). از طرف دیگر انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید پروتئین کایمریک، یکی از مسائلی است که در تحقیقات در زمینه واکسن‌های زیرواحدی و همچنین در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، واکسن و داروهای بیولوژیکی استفاده از سیستم‌هایی مانند سیستم پروکاریوتی

www.SID.ir

Archive of SID

(نظیر *E. coli*)، مخمر و یا سلول‌های جانوری رایج است (Kisung ko, 2014). علی‌رغم مزایای هر یک از این سیستم‌ها مشکلاتی نیز در تولید وجود دارد که می‌توان به هزینه بالای تولید، مشکل در مقیاس تولید، ایمنی محصول تولیدی از نظر مواد جانبی و نیز متفاوت بودن پروتئین‌های تولید شده با شکل طبیعی آن‌ها اشاره کرد (Kwon *et al*., 2013). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که زراعت مولکولی در گیاهان از نظر عملی، اقتصادی و ایمنی نسبت به سایر سیستم‌های معمول تولید پروتئین‌های نوترکیب، سودمندتر می‌باشد (Ku.Sahu *et al*., 2014).

در این بررسی نیز تولید پروتئین نوترکیب SC به عنوان کاندیدای واکسن بر علیه دو بیماری باکتریایی روده‌ای در گیاه مورد توجه قرار گرفت. برای رسیدن به این هدف بهینه سازی ساختار ژنی از جنبه‌های مختلف انجام گرفت. در ژن مصنوعی طراحی شده حضور اسیدآمینه آلانین در ابتدای پروتئین SC با کدون GCT بعد از کدون آغاز، اسید نوکلئیک G^{+4} و C^{+5} مورد نظر را برای افزایش چند برابری بیان پروتئین در مرحله ترجمه، تأمین نمود. در مطالعات مختلف اثبات شده است که می‌توان به منظور افزایش پایداری پروتئین تولید شده در داخل سلول از توالی ۴ اسیدآمینه KDEL استفاده کرد و پروتئین را به شبکه آندوپلاسمی هدف گیری نمود. وجود این توالی موجب تجمع پروتئین در فضاهای کنترل شده، افزایش نیمه عمر پروتئین، کمک به بسته‌بندی صحیح پروتئین‌ها و پایداری آن می‌گردد (Frigerio *et al*., 2001). از طرف دیگر استفاده از پیش برنده اختصاصی نظیر FAE و هدف گیری مناسب پروتئین به داخل بذر موجب افزایش بیان به مقدار بالاتری می‌شود (Petruccelli *et al*., 2006). پیش برنده FAE مربوط به آنزیم Fatty Acid Elongase است و تنها در انتهای دوره بذر دهی و طی مدت زمان کوتاهی تحت کنترل عناصر تنظیمی به فعالیت می‌پردازد، اما علی‌رغم فعالیت محدود، این پیش‌برنده قادر به تولید مقادیر مناسبی از پروتئین نوترکیب است (Salmanian and Kahrizi, 2007). برای ارزیابی پروتئین SC تولید شده در بذور گیاهان از آنتی‌بادی موشی علیه پروتئین CTXB تولیـد شده در باکتری *E. coli* (تهیه شده در گروه دکتر سلمانیان) استفاده شد. اتصال این آنتی‌بادی به پروتئین SC حاکی از آن است که این پروتئین علی‌رغم بیان در سیستم گیاهی ساختار متفاوتی به خود نگرفته است. به عبارت دیگر الگوهای احتمالی قندی شدن سیستم‌های گیاهی تأثیری بر ساختارهای مهم آن نداشته است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان پروتئین کایمریک SC در دانه کلزا و تحت کنترل پیش‌برنده FAE از ۰/۰۳ تا ۰/۱۳ درصد پروتئین‌های محلول متغیر بود و میزان پروتئین نوترکیب بدست آمده از یک گرم بذر کلزا حدود ۴۰-۱۰ میکروگرم بود. این نتیجه بیانگر کارایی و فعالیت این پیش برنده در دانه کلزاست. در مطالعات قبلی میزان پروتئین CTXB به صورت متصل به زیرواحد B انسولین انسانی در گیاه توتون تراریخت بین ۰/۰۸-۰/۱ درصد پروتئین محلول تام گزارش شده است (Li *et al*., 2006). از این منظر، میزان بیان پروتئین کایمریک در برگ توتون بالا بوده است، اما باید توجه داشت که برگ گیاه به خاطر داشتن آب فراوان (تا ۹۵درصد وزن گیاه)، پروتئازهای زیاد، محتویات پروتئینی کم، وجود آلکالوئید و در نهایت عدم وجود شرایط ذخیره سازی مناسب، عملاً اندام مناسب برای تولید، تجمع و نگهداری پروتئین‌های نوترکیب و مواد ایمونوژن نظیر واکسن نیست. در مطالعه‌ی Rossi و همکاران (۲۰۱۳) نیز میزان بیان پروتئین STX در بذر توتون ۰/۳ درصد بوده است که بیانگر بیان مناسبی در بذر است. Ding و همکاران (۲۰۰۶) بیان فاکتور رشد فیبروبلاستی را تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S در حدود ۰/۰۴٪ پروتئین محلول تام دانه گزارش دادند اما این بیان تحت کنترل پیش برنده اختصاصی دانه (گلیسینین) به ۲/۳٪ پروتئین محلول تام رسیده است که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده نقش پیش‌برنده اختصاصی در افزایش بیان می‌باشد. مقایسه این گزارش با نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پیش برنده FAE بسیار بهتر از پیش‌برنده CaMV 35S در دانه عمل نماید. اما می‌توان میزان بیان را با استفاده از پیش برنده‌های ذخیره‌کننده پروتئین در دانه، نظیر گلیسینین به طور مشهودی بهبود بخشید. در تمامی این مطالعات بیان پروتئین نوترکیب در گیاه به صورت تک قسمتی انجام شده است. در مطالعات مشابه که پروتئین مورد نظر به صورت دو قسمتی و در اتصال با یک آنتی‌ژن دیگر بیان گردیده، میزان درصد بیان پروتئین قابل مقایسه با نتایج این تحقیق می‌باشد. این مسئله نشان دهنده موفقیت قابل قبولی در بیان پروتئین کایمریک طراحی شده در بذور گیاه کلزای تراریخت است. در مطالعه‌ی Huy و همکاران (۲۰۱۱) میزان بیان پروتئین نوترکیب sCT-B متصل با sCOE (ژن مصنوعی اپی‌توپ خنثی کننده ویروس اسهال اپیدمیک خوکی) در کاهو ۰/۰۰۶۵ درصد TSP و در مطالعه مشابهی توسط Kim و همکاران (۲۰۰۴) میزان بیان پروتئین دو قسمتی CTB و LFP (پروتئین ایمنی‌زا از باکتری عامل سیاه زخم) ۰/۰۰۲ درصد کل پروتئین محلول در غده سیب‌زمینی بوده است که در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق، پروتئین کایمریک SC بیان مناسب‌تری در بذور کلزای تراریخت داشته است. در بررسی دیگری بیان پروتئین نوترکیب کایمریک EIT (حاوی ۳ آنتی‌ژن از باکتری *اشریشیا کلای* خونریزی‌دهنده) دربذر کلزا و تحت کنترل پیش برنده اختصاصی بذر FAE در حدود ۰/۳ درصد محلول تام پروتئین بذر بوده است (Amani *et al*. 2011) که نشانگر بیان بالاتری از پروتئین درسیستم‌های اختصاصی بافت‌های ذخیره‌ای مانند بذر تحت کنترل پیش برنده اختصاصی است.

در مطالعات قبل، تحقیقاتی در خصوص بیان ژن‌های کامل سموم *stx* و *ctx* در گیاه تراریخت و استفاده از آن به طریق خوراکی (edible vaccin) انجام شده است و بیان هر یک از این فاکتورها به تنهایی یا متصل به سایر آنتی‌ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. مشخص شده است که بخش‌های اتصالی به صورت نوترکیب (نسبت به کل پروتئین) می‌توانند ایمنی مناسب‌تری ایجاد کنند. ایمنی‌زایی سموم STX و CTX از طریق تزریقی اثبات شده (Clemens *et al*.,2011, Karaman *et al*., 2012, Matsui *et al*., 2009) و انتظار می‌رود نوع خوراکی نیز بتواند تحریک سیستم ایمنی و پاسخ‌های مخافظتی مناسبی را در مدل حیوانی ایجاد نماید.

در این تحقیق نیز بیان پروتئین کایمریک دو قسمتی SC در بذر کلزا به عنوان یک بیورآکتور زیستی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، با موفقیت انجام شد تا در ادامه مسیر ایمنی‌زایی این پروتئین نوترکیب در مدل حیوانی از طریق خوراکی مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از مساعدت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (طرح ۸۹۰۰۰۵۳۹) و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (طرح شماره ۴۱۱) برای تامین امکانات آزمایشگاهی و شرایط انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH (2011) Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. Plant Science. 180: 620-627.

Arun K, Sharma A, Manoj K (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. Biotechnology

www.SID.ir

Archive of SID

Advances. 27: 811-832.

Batlan F (2007) Law in the time of cholera: disease, state power, and quarantines past and future. Temple Law Review. 80: 50-53.

Beddoe T, Paton AW, Nours JL, Rossjohn J, Paton JC (2010) Structure, Biological Functions and Applications of the AB5 Toxins. Trends in Biochemical Sciences. 35(7): 411-418.

Clemens J, Shin S, Sur D, Nair GB and Holmgren J (2011) New-generation vaccines against cholera. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 8: 701-710

Ding SH, Huang LY, Wang YD, Sun HC, Xiang ZH (2006) High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. Biotechnology Letters .28 (12):869-875.

Frigerio L, Pastres A, Vitale A (2001) Influence of KDEL on the Fate of Trimeric or Assembly-Defective Phaseolin: Selective Use of an Alternative Route to Vacuoles. The Plant Cell. 13: 1109-1126.

Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. (2013) Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. Vaccine . 31 (32):3229-3235.

Huy NX, Yang MS, Kim TG (2011) Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). Molecular Biotechnology. 48:201–209.

Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-ahrabi S, Derakhshan F, Zali MR (2009) Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic Escherichia coli and Shigella species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology. 20 (3): 56-62.

Jawets, EA (2004) Medical Microbiology, 23 edn. The McGraw-Hill Companies.

Kang, T. J., Han, S. C., Jang, M. O., Kang, K. H., Jang, Y. S., & Yang, M. S. (2004). Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. Applied Biochemistry and Biotechnology. 117 (3): 175-187.

Karaman S, Cunnick J, Wang K (2012) Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. Plant cell reports. 31 (3): 527-537.

Kim TG, Galloway DR, Langridge WH (2004) Synthesis and assembly of anthrax lethal factor-cholera toxin B-subunit fusion protein in transgenic potato. Molecular Biotechnology. 28: 175-183.

Kisung K (2014) Expression of Recombinant vaccines and Antibodies in plants. Monoclonal Antibadies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. 33(3): 192-198.

Ku. Sahu P, Patel T, Sahu P, Singh S, Tirkey P, Sharma D (2014) Molecular Farming: A biotechnological approach in agriculture for production of useful metabolites. International Biotechnology and Biochemistry. 4(2): 23-30.

Kühne SA, Hawes WS, La Ragione RM, Woodward MJ, Whitelam GC, Gough KC (2004) Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157: H7. Clinical Microbiology. 42(7): 2966-2976.

Kwon K, Verma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H (2013) Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. Advanced Drug Delivery Reviews. 65: 782-799.

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 (5): 417-424.

Loc NH, Van Song N, Tien NQD, Minh TT, Nga PTQ, Kim TG, Yang MS (2011) Expression of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic watercress (*Nasturtium officinale* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105(1): 39-45.

Maheshwari M, Nelapati K, Kiranmayi B (2011) *Vibrio cholerae* A Review.Veterinary World. 4(9): 423-428.

Matsui T, Asao H, Ki M, Sawada K, Kato K (2009) Transgenic lettuce producing a candidate protein for vaccine against edema disease. Bioscience,

www.SID.ir

Archive of SID

Biotechnology, and Biochemistry. 73 (7): 1628-1634.

Matthew A, Croxen B, Finlay B (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.Nature. Reviews Microbiology. 8: 26-38.

Mellies JL, Barron AM, Carmona AM (2007) Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. American Society for Microbiology. 75(9): 4199–4210

Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, O'Brien A (2012) Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 357: 67-103.

Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T (2007) Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. Vaccine. 25 (9):1647-1657.

Nguyen Y, Sperandio V (2012) Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC) pathogenesis: Mini Review Article, Cellular and Infection Microbiology. 2: 1-7.

Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W (2010) AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. Toxins. 2: 1612-1645.

Orellana-Escobedo L, S. Korban S, Rosales-Mendoza S (2014) Seed-Based Expression Strategies. Springer Science Business Media. New York.

Petruccelli S, Otegui MS, Lareu F, Dinh OT, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN (2006) A KDEL-tagged monoclonal anti body is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seed. Plant Biotechnology. 4(5): 511-527.

Qadri F, Svennerholm AM, Faruque A, Sack RB (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clinical Microbiology Reviews .18 (3):465-483.

Rossi L, Giancamillo AD, Reggi S, Domeneghini C, Baldi A, Sala V, Dell'Orto V, Coddens A, Cox E, Fogher C (2013) Expression of verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model. Journal of Veterinary Science. 14(3):263-270.

Salmanian AH and Kahrizi D (2007) Study on Effect of Genotype and Explant Type on Shoot Regeneration in Rapeseed (Brassica napus L). Iranian Journal of Biology. 2 (3): 1-10

Sambrook J, Russell D.W (2004) Molecular cloning A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Fourth edition.

Sanchez J, Holmgren J (2005) Virulence factors pathogenesis and vaccine production in cholera and EHEC diarrhea. Current opinion in immunology. 17(4): 388-398.

Sizemore DR, Roland KL, Ryan US (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches. Expert review of vaccines. 3 (5):585-595.

WHO (2014) World health statistics.World Health Organization (WHO). www.who.int.

Zebarjadi AR, Jalali Javaran M, Salmanian AH, Karimzadeh G (2011) Cloning and Characterization of Responsible Gene for Erucic Acid Biosynthesis in Brassica napus. Iranian Journal of Biology. 24 (1390): 1-15.

www.SID.ir