Archive of SID

انتقال ژن آنتی بادی مونوکلونال نوترکیب V_{HH} بر علیه آنتی ژن MUC1 به گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

سبا دیمیاد*[۱]، مختار جلالی جواران[۱]، حمید رجبی معماری[۲]، محمد جواد رسایی[۳] و فاطمه رهبری زاده[۳]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[۲] اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۱۳

چکیده

با توجه به کاربردهای گسترده تشخیصی و درمانی آنتی بادیهای مونوکلونال، تولید آنها از منابع دائمی، ایمن و ارزان حائز اهمیت می باشد. از جمله، می توان به آنتی بادی مونوکلونال تک دومنی با منشأ شتری V_{HH} اشاره نمود که به دلیل دارا بودن ویژگیهایی از جمله: تشابه بسیار با زنجیره سنگین آنتی بادیهای انسانی، حلالیت، تمایل و اتصال اختصاصی به آنتی ژن، بر دیگر انواع آنتی بادیها ترجیح داده می شود. در این تحقیق انتقال ژن آنتی بادی مذکور توسط اگروباکتریوم به ریز نمونه های کوتیلدونی گیاه کلزا صورت گرفت. حضور و بیان ژن آنتی بادی نوترکیب در گیاهان تراریخته به ترتیب با آزمونهای PCR و SDS-PAGE در گیاهان باززایی شده روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین ($10-25\ mg\ l^{-1}$) اثبات گردید. در این پژوهش تلاش گردید ضمن انتقال ژن آنتی بادی نوترکیب به گیاه کلزا، زمینه مناسب برای تولید سایر پروتئینهای نوترکیب در این گیاه ایجاد گردد.

واژه های کلیدی: آنتی بادی مونوکلونال نوترکیب، V_{HH}، کلزا، انتقال ژن، اگروباکتریوم

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۸۸۹۶۵۳۴۳، پست الکترونیکی: Deemyad@modares.ac.ir

مقدمه

کشاورزی مولکولی رویکردی جدید جهت ساخت مواد مؤثره و اولیه دارویی می باشد، به طوری که می توان پروتئینهای نوترکیب ارزشمندی را در مقیاس زیاد و به قیمت ارزان، در موجودات تراریخته ایجاد نمود. همواره گیاهان بطور سنتی به عنوان منبع دارویی مورد استفاده قرار می گرفته اند، اما استفاده از گیاهان تراریخته در کشاورزی مولکولی به منزلهٔ انقلاب علمی و ظهور منبع جدید دارویی (شامل: پروتئینهای پلاسما، آنزیمها، فاکتورهای رشد، واکسنها و آنتی بادیهای نوترکیب) می باشد. تا چندی پیش، گسترهٔ استفاده از این نوع مواد دارویی ارزشمند به دلیل دشواری تولید آنها در خارج از بدن جانوران یا سلولهای جانوری محدود بود. به کارگیری بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی در دههٔ ۱۹۹۰ نشان داد که بسیاری از این داروها را می توان در گیاهان تولید نمود (۲).

هدف از فناوری کشاورزی مولکولی، تولید مواد دارویی ایمن تر، با تولید آسان تر، هزینه کمتر و حجم انبوه تر نسبت به سایر روشها (به خصوص حیوانات تراریخته، کشتهای میکروبی و فرمانتور) می باشد (۲).

گیاهان، انتخاب مناسبی در مقایسه با باکتریها، به عنوان سیستم بیان، بوده زیرا از نظر ژنتیکی انعطاف پذیرند، کشت آنها آسان است و می توانند پروتئینهای پیچیدهٔ فعال را بسازند. سلولهای گیاهی، بسیاری از تغییرات پس از ترجمه که برای عملکرد بهینه زیستی پروتئینهای پستانداران

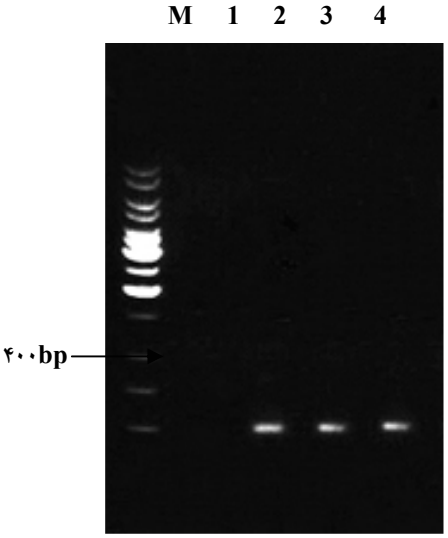
www.SID.ir

Archive of SID

لازم است را انجام می دهند (۱۲). به عنوان مثال برای انعطاف پذیری سیستم بیانی گیاهی، می توان به تولید آنتی بادیهای نوترکیب در توتون اشاره نمود که از نظر اختصاصی بودن و میل ترکیبی، همانند آنتی بادیهای مونوکلونال ساخته شده با منشأ سلولهای هیبریدوما می باشند (۱۹و۲٦).

امکان بهره برداری از گیاهان برای ساخت پروتئینهای نوترکیب پستانداران برای اولین بار در سال ۱۹۸۹، با بیان موفقیت آمیز آنتی بادی فعال با اندازهٔ کامل در توتون تراریخته اثبات گردید (٤ و۲۰).

کاربرد درمانی آنتی بادیهای نوترکیب کاملاً شناخته شده است. آنتی بادیهای مونوکلونال (mAbs) برای تشخیص و درمان در پزشکی، بهداشت و بیوتکنولوژی بسیار حیاتی می باشد. بهینه سازی سیستم و تولید موفقیت آمیز آنتی بادیها در گیاهان، فرصت تولید آنتی بادیها را در مقیاس انبوه ایجاد نمود (۷).



شکل۱- تأیید حضور قطعه حدود ٤۰۰bp (ژن V_{HH}) در *Agrobacterium tumefaciens*. M: مارکر مولکولی ۱Kb، ستون ۱: کنترل منفی(بدون DNA)، ستون۲: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی V_{HH})، ستون ۳ و ٤: کلونیهای تراریخته

با گسترش سریع فناوری کشاورزی مولکولی، بسیاری از پروتئینهای درمانیِ با ارزش، با موفقیت در گیاهان تراریخته تولید شدند که مشتمل بر آنتی بادیهای نوترکیب (rAbs) (۱۲و۱۳)، آنزیمها (۵)، هورمونها (۱۰و۲۲)، اینترلوکینها (۱٤)، پروتئینهای پلاسما (۲۱)، آلفا-۱- آنتی تریپسین انسانی (۲۵) و واکسن های خوراکی(۱۵) می باشند. بنابر این سلولهای گیاهی قابلیت بیان پروتئینهای نوترکیب و پیچیده را دارند (۲و۵).

بحث بر سر انتخاب گیاه مناسب، بسیار گسترده است. اولین محصول کشاورزی مولکولی در بازار، آویدین نوترکیب در ذرت است (۷و۸). محصولات دارای بذر خشک نیز به عنوان میزبان در کشاورزی مولکولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در تلاش برای به دست آوردن گیاهان دیگر برای استفاده به عنوان بیوراکتور، گیاهان تک لپه ای و دولپه ای زیادی مورد آزمایش قرار گرفته اند. از این گیاهان می توان به ذرت، برنج، گندم، کلزا، نخود و سویا اشاره کرد (۲۳).

آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژن MUC1 در سال ۲۰۰٤ از منشأ شتر دو کوهانه تهیه گردید (۱۸). این آنتی‌بادی تک دومنی دارای خواص حلالیت، اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن و تمایل (Affinity) خوبی می باشد. با توجه به اهمیت آنتی بادی تک دومنی V_{HH} در تشخیص و درمان بسیاری از بیماریهای سرطانی و هزینه بسیار بالای تولید آن با استفاده از سایر روشها (مانند حیوانات تراریخته، سلولهای هیبریدوما و ...)، تولید آن در گیاهان مورد توجه قرار گرفت و در گیاه توتون با موفقیت انجام شد (۱۹). به دلیل ویژگیهای خاص گیاه کلزا از نظر تحقیقات انجام شده بر روی آن (در زمینه های انتقال ژن، باززایی گیاهان تراریخته و ...) در قالب این تحقیق امکان تولید این پروتئین نوترکیب (آنتی بادی تک دومنی V_{HH}) با بهره گیری از پیش برنده عمومی (CaMV 35S) در کلزا مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

در این پژوهش باززایی گیاهان تراریخته از سلولهای تراریخت شده صورت گرفت و گیاهان تراریخته مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده: ۱- باکتریها: در این تحقیق از دو باکتری *Escherichia coli* (نژاد DH5α) و *Agrobacterium tumefaciens* (نژاد LBA4404) استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر ساختارهای تهیه شده و از اگروباکتریوم جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه کلزا استفاده شد.

۲- آغازگرها: طراحی آغازگرها با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن V_{HH} (با شماره شناسایی AY845430.1 در بانک اطلاعات ژن (GeneBank) قابل دسترسی می باشد) و همچنین توالی افزایش دهنده بیانی (Kozak) (۹،۱۱و۲٤) ، محلهای برش آنزیمی (*Sac* I و *Bam*HI) در ناقل بیانی pBI121 و نیز توالی لنگر برای افزایش کارآیی آنزیم توسط شرکت MWG صورت گرفته است (۱۹):

Forward primer (F-P): 5' TCT AGA GGA TCC TAA ACA ATG GTG CAG CTG CAG TCT 3'

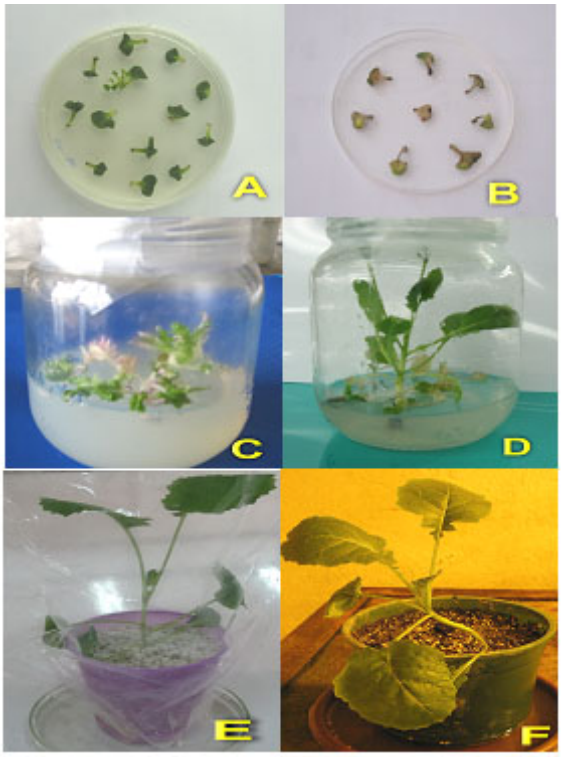
Backward primer (B-P): 5' GGA AAT TCG AGC TCT TAG TGA GAT GGT GAC 3'

۳- سازه حاوی ژن V_{HH}: قطعه ژن هدف (آنتی بادی V_{HH})، در سال ۱۳۸۵ توسط رجبی معماری و همکاران (۱۹)، در ناقل بیانی گیاهی pBI121 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین بود، بین پیش برنده CaMV 35S و توالی خاتمه دهنده NOS کلون گردید.

٤- گیاهان کلزا: در این آزمایش گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) رقم PF4570/91 استفاده گردید. بذور سترون کلزا در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS (۱۷) بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و پس از ٦ روز برگهای کوتیلدونی جهت تراریزش استفاده شدند.

روشهای مورد استفاده: ۱- تخلیص سازه پلاسمیدی حاوی ژن V_{HH} از باکتری *E. coli*: سازه حاوی ژن آنتی بادی V_{HH}، به روش Minipreperation که اساس آن بر مبنای هضم قلیایی باکتری است، از باکتری *E.coli* استخراج گردید.

۲- انتقال سازه‌های پلاسمیدی تخلیص شده به آگروباکتریوم: انتقال سازه pBI V_{HH} به اگروباکتریوم سویه LBA4404 به روش ذوب و انجماد صورت گرفت (٦). سلولهای تراریخت شده روی پلیتهای محیط جامد LB (Lauria Bertani medium) حاوی آنتی بیوتیکهای کانامایسین (۵۰ mg l^{-1}) و استرپتومایسین (۸۰ mg l^{-1}) به منظور کنترل و انتخاب کلونیهای تراریخت کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ٤ روز قرار داده شدند. همچنین حضور سازه با انجام PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن V_{HH} در کلونیهای باکتریایی تأیید گردید.

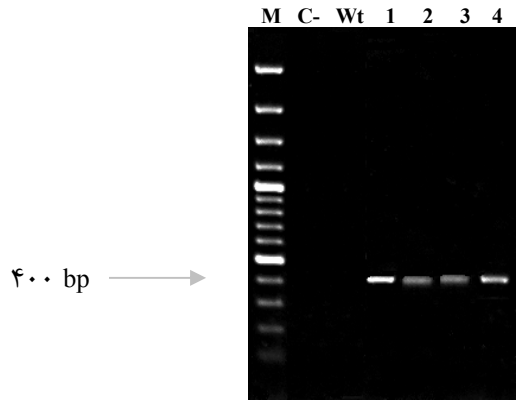


شکل۲- گیاهان تراریخت حاصل از تلقیح برگهای لپه ای گیاه کلزا با ژن V_{HH}: گیاهچه های جدید باززایی شده در سطح محیط انتخابی (A) ریزنمونه های شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم بدون pBIV_{HH}) در سطح محیط انتخابی (B) انتقال گیاهچه های باززایی شده به شیشه های بزرگتر حاوی محیط MS IV (C) انتقال گیاهچه های باقی مانده به

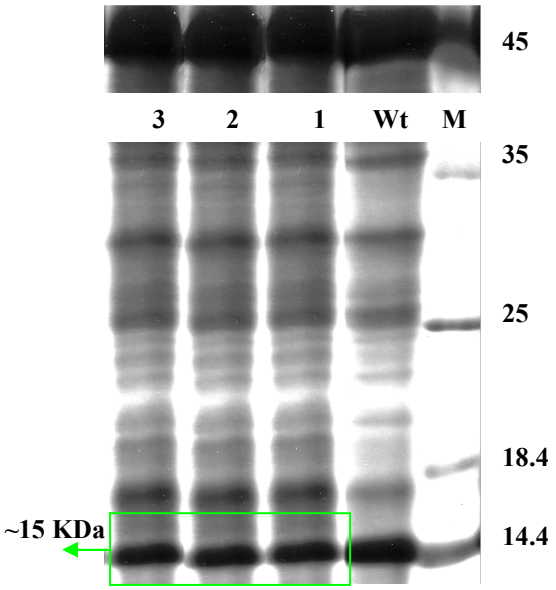
www.SID.ir

Archive of SID

محیط ریشه زایی(MS V) (D) انتقال گیاهچه ها به گلدانهای حاوی پرلایت (E) انتقال نهایی گیاهان کلزای باززایی شده به خاک (F).



شکل۳- آنالیز گیاهچه های باززایی شده و شاهد با استفاده از روش PCR و آغازگر های اختصاصی (F-P و B-P) آنتی بادی V_{HH}. M: مارکر مولکولی ۱۰۰bp، C- : کنترل آب (بدون DNA) Wt: گیاه تیپ وحشی (غیر تراریخته)، ستون ۱: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی V_{HH})، ستون ۲، ۳ و ٤: گیاهان تراریخته



شکل ٤- تأیید بیان V_{HH} در گیاه تراریخت با استفاده از روش SDS-PAGE: در گیاهان تراریخت در منطقه حدود ۱۵ کیلو دالتون یک باند مشاهده می شود ولی در گیاه تیپ وحشی هیچگونه باندی مشاهده نمی گردد. M: مارکر مولکولی پروتئین Wt: گیاه تیپ وحشی (غیر تراریخت)، ستون ۱، ۲، ۳: گیاهان تراریخته.

۳- انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخته به روش Moloney و همکاران (۱٦) با استفاده از ریز نمونه های کوتیلدونی انجام شد. به این ترتیب که از برگهای کوتیلدونی ٦ روزه گیاه کلزا رقمPF4570/91 به عنوان ریز نمونه استفاده گردید و پس از تراریخت سازی با اگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی سازه pBI V_{HH} (۱= $OD_{600\ nm}$)، ریز نمونه ها به تشتکهای پتری حاوی محیط کشت MS II منتقل شدند و پس از ٤٨ ساعت نگهداری در تاریکی، به محیط MS III انتقال یافتند. گیاهچه های باززایی شده برای طویل سازی ساقه به محیط MS IV و سپس جهت ریشه زایی به محیط MS V منتقل گردیدند. در نهایت گیاهان ریشه دار به خاک منتقل و برای خودگشن سازی و بذر گیری در شرایط گلخانه نگهداری شدند. ترکیب محیطهای کشت مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

۴- آنالیز گیاهان تراریخته: استخراج DNA و انجام PCR: برگهای جوان از گیاهان باززایی شده برای ا ستخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس روش CTAB (۱)، DNA از گیاهان (تراریخته و کنترل) استخراج گردید. آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (F-Pو B-P) انجام شد و گیاهان دارای ژن V_{HH} شناسایی و انتخاب شدند.

استخراج پروتئین و آنالیز SDS-PAGE: استخراج پروتئین بر اساس روش Guy و همکاران(۳)، با استفاده از نمونه های ۰/۵ گرمی از برگهای جوان گیاهان تراریخته انجام گرفت. نمونه‌های پروتئین تخلیص شده، به نسبت حجمی ۱:۱ با بافر نمونه (۱/۲۵ ml، (۰/۵M, pH ٦/۸ Tris-HCl، ۰/۲ g SDS، ۰/۵ ml، ۲- مرکاپتو اتانول و ml ۱ گلیسرول) مخلوط شده و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد (حمام آب جوش) قرار داده شد و تا زمان انجام الکتروفورز بر روی ژل اکریل آمید ۱۲/۵

www.SID.ir

Archive of SID

درصد، نمونه ها در ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

نتایج

۱– استخراج سازه حاوی ژن هدف (آنتی بادیV_{HH}) از باکتری *E.coli* انجام شد.

۲– تأیید حضور ناقل بیانی pBI V_{HH} در اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*):آگروباکتریوم حاوی V_{HH} pBI روی محیط کشت LB دارای کانامایسین (۵۰ $mg\ l^{-1}$) و استرپتومایسین (۸۰ $mg\ l^{-1}$) رشد نمود و آنالیزPCR روی کلونیهای باکتریایی با آغازگرهای اختصاصی (F-P وB-P)، حضور قطعه ٤۰۰bp را تأیید کرد (شکل۱). ۳– انتقال ژن V_{HH} به گیاه کلزا: عمل تراریخت کردن گیاهان کلزا با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) نژاد LBA4404 صورت گرفت. برگهای کوتیلدونی کلزا که با آگروباکتریوم (حاوی pBI121 دارای V_{HH}) تلقیح شدند بر روی محیط کشت انتخابی (MS III) قرار گرفته و پس از ٤–۲ هفته ریز نمونه های تلقیح شده تولید گیاهچه تراریخته کردند (شکل۲A). در صورتی که روی ریزنمونه های شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم حاوی pBI121فاقد ژن هدف) هیچ گونه باززایی مشاهده نشد (شکل۲B).

جدول۱– ترکیبات محیطهای کشت مورد استفاده در تراریختی و باززایی گیاهان کلزا

نام محیط	MS V	MS IV	MS III	MS II
نمکهای MS	X۰/۵	X ۰/۵	X۱	X۱
آگار($g\ l^{-1}$)	٤	٤	۸	۸
ساکارز($g\ l^{-1}$)	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰
٦- بنزیل آمینو پورین BAP($mg\ l^{-1}$)	–	۱	٤/۵	٤/۵
ایندول-۳-بوتیریک اسید IBA ($mg\ l^{-1}$)	۲	–	–	–
کانامایسین ($mg\ l^{-1}$)	–	۲۵	۱۰	–
سفاتوکسیم ($mg\ l^{-1}$)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	–
pH	۵/۸	۵/۸	۵/۸	۵/٦

ریز نمونه هایی که در این شرایط سبز باقی ماندند، به محیط کشت طویل سازی ساقه (MS IV) منتقل شدند. در این محیط میزان غلظت کانامایسین به ۲۵ $mg\ l^{-1}$ می رسد و بدین ترتیب برخی نمونه های تراریخت نامطلوب نیز سفید و نکروز می شوند (شکل ۲C).

گیاهان تراریخت واقعی که در این شرایط سبز باقی ماندند به محیط ریشه زایی (MS V) منتقل شدند (شکل۲D).

پس از ریشه دار شدن گیاهان تراریخت، گیاهان ابتدا به پرلایت (شکل ۲E) و سپس به خاک منتقل شدند (شکل ۲F) و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و طول روز ١٦ ساعت به رشد خود ادامه دادند.

٤– استخراج DNA ژنومی و آنالیز PCR: آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان باززایی شده، وجود یک قطعه ٤۰۰bp را نشان داد در حالی که در گیاهان شاهد هیچگونه باندی مشاهده نشد (شکل۳).

۵– آنالیز پروتئین در گیاهان تراریخته و شاهد: آنالیز SDS-PAGE وجود یک باند مشخص با وزن حدود ۱۵ کیلودالتون را نشان داد که برابر وزن آنتی‌بادی تک دومنی

www.SID.ir

Archive of SID

V_{HH} می‌باشد. هیچگونه باندی درمورد پروتئین استخراج شده از گیاهان شاهد مشاهده نگردید (شکل ٤).

بحث

ژن V_{HH} علیه موسین MUCl، درسال ۱۳۸۵ توسط رجبی معماری و همکاران، در ناقل بیانی pBI121 کلون گردید. سازواره تهیه شده به گیاه توتون منتقل و از این گیاه به عنوان بیوراکتور استفاده شد (۱۹).

با توجه به اهمیت آنتی بادی تک دومنی V_{HH} در تشخیص و درمان بسیاری از بیماریهای سرطانی که تولید آن را از منابع ایمن، ارزان و انبوه مانند سیستمهای گیاهی ضروری می سازد و نیز برخی خصوصیات نامطلوب گیاه توتون از جمله، نیاز به نگهداری محصول به صورت تازه، استخراج و تخلیص سریع پروتئین از برگها و وجود نیکوتین و دیگر ترکیبات آلکالوئیدی سمی که تخلیص پروتئین را از آن مشکل می سازند، جایگزین نمودن گیاه مناسب تری به عنوان بیوراکتور به جای توتون ضروری می نماید. بیان آنتی بادی مونوکلونال V_{HH} با منشأ شتری در گیاه کلزا در قالب این تحقیق صورت پذیرفت. جهت انتقال ژن به گیاه کلزا از روش آگروباکتریوم استفاده گردید که امروزه به طور گسترده ای جهت تراریزش گیاهان خصوصاً دولپه ایها مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش گیاهچه ها مستقیماً و بدون نیاز به تشکیل کالوس باززایی شدند. پتانسیل باززایی از طریق کشت بافت گیاهی و اگروباکتریوم نسبت به سایر روشها بسیار مطلوب تر است (٦و١٦). گیاهان تراریخته روی محیط کشت حاوی کانامایسین ($mg\ l^{-1}$ ۲۵– ۱۰) انتخاب و برای انجام آزمونهای مختلف مولکولی و همچنین تهیه نسلهای بعد، باززایی شدند.

در آنالیز مولکولی PCR و با استفاده از آغازگر های اختصاصی ژن بر روی گیاهان تراریخته، باند اضافه ای در منطقه bp ٤۰۰ که معادل اندازه قطعه ژن V_{HH} می باشد مشاهده گردید که نشان می دهد گیاهان باززایی شده حداقل یک کپی از ژن V_{HH} را دارا می باشند.

آنالیز SDS-PAGE بر روی پروتئین تخلیص شده از برگهای گیاهان تراریخته و شاهد، وجود یک باند اضافی با وزن مولکولی ۱۵کیلودالتون را در گیاهان تراریخته نشان می دهد که می تواند متعلق به آنتی بادی تک دومنی V_{HH} باشد. با توجه به کاربردهای تشخیصی و درمانی آنتی بادیهای نوترکیب از جمله آنتی بادی تک دومنی علیه MUC1 و همچنین قدرت گیاهان در تولید پروتئینهای نوترکیب در مقیاس انبوه، ایمن و ارزان، سیستم گیاهی جایگزین مناسبی جهت تولید پروتئینهای نوترکیب نسبت به سایر سیستمهای تولید سنتی می باشد. لذا در این تحقیق علاوه بر انتقال ژن V_{HH} به گیاه کلزا سعی در بهینه سازی شرایط انتقال ژن به این گیاه و باززایی گیاهان تراریخته گردید. بدیهی است که با انجام موفق این تحقیق، زمینه انتقال سایر ژنهای مفید و تولید سایر پروتئینهای نوترکیب (از جمله: آنتی بادی، هورمون، واکسن و ...) فراهم گردیده است.

منابع

1-Doyle, J. J. and Doyle,J. I. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus, 12: 13-15.

2-Fischer, R., Schillberg, S. (2004). Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical proteins, 114.

3-Guy, C.L., and Haskell, D. (1992) Detection of polypeptides associated with the cold acclimation process in spinach. Electrophoresis, 9:787-796

4-Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. Nature, 342: 76 78.

5-Hogue, R. S., Lee, J. M. and An, G. (1990). Production of a foreign protein product with genetically modified plant cells. Enzyme Microbiology Technolology, 12: 533–538.

www.SID.ir

Archive of SID

6-Holsters, M., De Wale, D., Depicker, A., Messens, M., VanMontagu, M., Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Genetics, 163: 181-187.

7-Hood, E., Witcher, D., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehigh, R., Hernan, R., Kappel, W., Ritland, D., Li, C. P. and Howard, J. (1997). Commercial production of Avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Molecular Breeding, 3: 291–306.

8-Hood, E. E., Kusnadi, A., Nikolov, C. and Howard, J. A. (1999). Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. Advances in Experimental Medicine and Biology, 464: 127–147.

9-Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. Annual Review. Cell Biology, 25: 110-115

10-Leite, A., Kemper, E., Da Silva, M., Luchessi, A., Siloto, R., Bonaccorsi, E., El-Dorry, H. and Arruda, P. (2000). Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco. plants Molecular Breeding, 6: 47–53.

11-Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., Scheele, G.A. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. EMBO Journal, 6 (1): 43–8.

12-Ma, J. K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N. D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd , C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995). Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science, 268: 716–719.

13-Ma, J. K., Lehner, T., Stabila, P., Fux, C. I. and Hiatt, A. (1994). Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. European Journal of Immunology, 24: 131–138.

14-Magnuson, N. S., Linzmaier, P. M., Reeves, R., An, G., Hayglass, K. and Lee, J. M. (1998). Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. Protein Expression and Purification, 13: 45–52.

15-Mason, H. S. and Arntzen, C. J. (1995). Transgenic plants as vaccine production systems. Trends of Biotechnology, 13: 388–392.

16-Moloney, M. M., Walker, J. M. and Shama K.K. (1989). High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors. Plant Cell Reports, 8: 238-242.

17-Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology of Plant, 15: 437-497.

18-Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh Moghadam, M., Allameh, A.lA., and Sadroddiny, E .(2004). Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybridoma and Hybridomics, 23:151-159.

19-Rajabi-Memari, H., Jalali-Javaran, M., Rasaee, M. J., Rahbarizadeh, F., Forouzandeh Moghadam, M., and Esmaili, A. (2006). Expression and Characterization of Recombinant Single-Domain Monoclonal Antibody against MUC1 Mucin in Tobacco Plants. Hybridoma and Hybridomics, 25:209-215

20-Schillberg, S., Emans, N., and Fischer, R. (2002). Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemistry Reviews, 1: 45–54.

21-Sijmons, P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., vanden Elzen, P. J. M. and Hoekema, A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Bio/Technology, 8: 217–221.

22-Staub, J., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. and Russell, D. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nature Biotechnology, 18: 333–338.

23-Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Kee, D., Perrin, Y., Christou, P., and Fischer, R. (2000). Cereal crops as viable production and storage system for pharmaceutical ScFv antibodies. Plant Molecular Biology, . 42: 583-590.

24-Taylor, J.l., Jones, J.D.G., Sandler, S., Muller, G.M., Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. (1987). Optimizing the expression of chimeric genes in plant cells. Molecular Genetics, 210: 572-577.

25-Terashima, M., Murai, Y., Kawamura, M., Nakanishi, S., Stoltz, T., Chen, L., Drohan, W., Rodriguez, R. L. and Katoh, S. (1999). Production of functional human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 52: 516–523.

www.SID.ir

Archive of SID

26-Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H., Liao, Y., Kreuzaler, F. and Fischer, R. (1995). Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. Molecular Breeding, 1: 39–50.

Expression of V_{HH} Recombinant Monoclonal Antibody against MUC1 in Canola Plants (*Brassica napus* L.)

Deemyad S.[1], Jalali Javaran M.[1], Rajabi Memari H.[2], Rasaee M.J.[3], and Rahbarizadeh F.[3]

[1]Plant Breeding Dept., School of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

[2]Plant Breeding Dept., School of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of IRAN

[4] Medical Biotechnology Dept., School of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

According to the wide range of monoclonal antibodies applications in distinction and treatment of diseases, their production from safe, permanent and inexpensive sources has a great importance. The camel-based single-domain antibody (V_{HH}) has individual characteristics such as: similarity to human VH fragment, solubility, high affinity and specific attachment to the antigen. So it has preferred to the other kinds of antibodies. In this report the antibody gene against MUC1 was transferred into Canola plants by agrobacterium mediated transformation method. The transformed plants initially selected on kanamycin (10-25 mg l^{-1}). The presence and expression of the transgene was confirmed in transformants by PCR and SDS-PAGE. This study is an attempt for transfering an antibody gene to Canola and preparing the best field for production of other recombinant proteins in this plant.

Keywords: Recombinant Monoclonal antibody $V_{HH,}$ Canola, transformation, agrobacterium

www.SID.ir