Archive of SID

تولید آنتی‌بادی نوترکیب تک دومنی(V_{HH}) علیه آنتی ژن عامل تومور(Muc1) با انتقال ژن V_{HH} به گیاه توتون

حمید رجبی معماری[۱]، مختار جلالی جواران[۲]، محمد جواد رسایی[۳]، فاطمه رهبری زاده[۴]، مهدی فروزنده مقدم[۵] و احمد اسماعیلی[۶]

چکیده

بیوراکتورهای گیاهی نسبت به سایر سیستم‌های تولید آنتی‌بادی، اقتصادی‌ترند و پاتوژنهای انسانی نیز در سیستم‌های گیاهی وجود ندارند. آنتی‌بادی تک دومنی با منشاء شتری (V_{HH}) بعلت ویژگی‌هایی مانند اندازه کوچک و سادگی کلونینگ، بیان بالا، پایداری و حلالیت بالا، اختصاصی بودن و تشابه زیاد با زنجیره سنگین آنتی‌بادی انسانی بر دیگر اشکال آنتی‌بادی ترجیح داده می‌شود. در این پژوهش آغازگرهای مناسب با توجه به توالی‌های افزایش دهنده بیان گیاهی، توالی‌های دو طرف V_{HH} و محل‌های برشی مناسب طراحی و ژن مورد نظر پس از جداسازی در ناقل بیانی گیاهی مناسب (pBI121)کلون گردید. ژن مورد نظر با استفاده از آگروباکتریوم نژاد LBA4404 و C58(PGV3101) به گیاهان توتون منتقل گردید و گیاهان تراریخت در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتاکسیم باززایی شدند. آنالیز ملکولی PCR بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان باززایی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، انتقال ژن V_{HH} رابه گیاهان باززایی شده تایید کرد. تولید آنتی‌بادی فعال مونوکلونال تک دومنی علیه آنتی ژن عامل تومور (MUC1) با استفاده از آنالیزهای الایزا و ایمونو بلاتینگ اثبات گردید. این اولین گزارش از تولید آنتی‌بادی مونوکلونال تک دومنی نوترکیب علیه تومور و همچنین اولین گزارش تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن MUC1 در گیاه می‌باشد.

کلید واژه ها: آنتی بادی تک دومنی نوترکیب، MUC1، توتون، انتقال ژن، آنالیز گیاهان تراریخته

مقدمه

تولید زیست داروها و پروتئین های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحا" کشاورزی مولکولی گویند. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود آنتی بادی های نوترکیب، واکسن ها، جایگزین های خونی، فاکتورهای رشد و آنزیم ها می باشد و در حال حاضر در جهان یک پذیرش عمومی برای تولید این پروتئین های نوترکیب از طریق گیاهان بوجود آمده است (۱۵). هم اکنون در کنتاکی آمریکا گیاهان توتون به کارخانه‌های تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده‌اند (۱). در ویرجینیا ذرت برای معالجه بیماری سیستیک فایبروزیس[۷] برداشت می‌شود و در نبراسکا محققین امیدوارند که در مزارع محصولاتی جهت درمان بیماری ایدز تولید کنند (۷). این کار با استفاده از تکنیک‌های انتقال DNA انسانی یا DNA های سایر موجودات بخشنده انجام می‌شود (۱). این کار به مدت بیش از یک دهه است که انجام می‌شود، اما محصولات ذکر شده به تازگی

۱- دانشجوی سابق دکتری تخصصی اصلاح نباتات (ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک) دانشگاه تربیت مدرس و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز (memari@scu.ac.ir)

۲و۶- بترتیب دانشیار و دانشجوی دکتری تخصصی اصلاح نباتات گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۳و۴و۵- بترتیب استاد، استادیار و دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

7- Cystic Fibrosis

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

مراحل نهایی فرآوری خود را پشت سر گذاشته‌اند و وارد آزمایشات کلینیکی و فرایند تجاری شدن گردیده‌اند. تعدادی از بیماران در حال حاضر مقادیری از این گیاهان را به عنوان دارو استفاده می‌کنند (۸). امروزه آنتی بادی‌های نوترکیب حدود ۳۰٪ از تولید پروتئین‌های بیولوژیک را به خود اختصاص داده‌اند (۱۱). فروش جهانی پروتئین‌های داروئی نوترکیب در سال ۱۹۹۵ بالغ بر ۱۰ میلیارد دلار بوده است که برای سال ۲۰۰۵ این رقم ۱۶ میلیارد دلار تخمین زده می‌شود (۷). در حال حاضر حدود ۲۰ پروتئین نوترکیب در بازار وجود دارد که ۶۰٪ فروش آنها مربوط به شش پروتئین داروئی است (۱۵). این پروتئین‌های نوترکیب داروئی عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، واکسن هپاتیت B، هورمون رشد انسانی، انسولین و آلفا اینترفرون. پروتئین‌های بیگانه‌ای که در گیاهان بیان می‌شوند ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند بنابراین گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی با ارزش دارویی یک جایگزین مناسب به شمار می روند (۵ و۶). بیوراکتورهای گیاهی می‌توانند تا ۱۰ کیلوگرم آنتی‌بادی در هکتار تولید کنند. در مقایسه با تولید در بیوراکتورهای دیگر قیمت تمام شده تولید آنتی‌بادی در گیاهان حدود یک دهم است (۸). گونه های گیاهی زیادی را می توان در کشاورزی مولکولی مورد استفاده قرار داد. گونه های میزبان برای کشاورزی مولکولی را می توان به محصولات برگی، محصولات دارای بذر خشک، میوه جات و سبزیجات، دانه های روغنی، گیاهان آبی، گیاهان پست و گیاهان مدل غیرزراعی مانند آرابیدوپسیس تقسیم کرد (۷) که هرکدام دارای مزایا و معایبی هستند (۲۷). دو محصول برگی که تاکنون برای تولید پروتیین های نوترکیب بیشتر مورد استفاده قرار گرفته اند عبارتند از توتون و یونجه (۷ و ۱۲). این دو گیاه میزان زیادی محصول تولید می کنند که این بعلت چند بار برداشت در طول سال است. تاکنون گیاه توتون بیشترین استفاده را در بین گونه های گیاهی به خود اختصاص داده است. در این میان توتون زراعی (*Nicotiana tabacum*) تاریخچه موفقیت آمیز طولانی در تولید پروتئین های نوترکیب دارد. توتون یک محصول غیر غذایی و غیر علوفه ای و یک انتخاب مناسب برای تولید پروتئینهای دارویی است. این موضوع بعلت انعطاف پذیری نسبی آن به دستورزی ژنتیکی است. توتون یک تولید کننده وزن تر عالی (۵۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار عملکرد برگ تازه در یک فصل کاشت) است (۵). همچنین توتون بذر زیادی تولید می کند (بالاتر از ۱ میلیون بذر در یک گیاه). بنابراین در اسرع وقت می تواند تکثیر شده و وارد بازار فروش شود (۱۴). اولین پروتئین نوترکیب دارویی، اولین آنتی بادی نوترکیب با منشا گیاهی، اولین واکسن تولید شده در گیاه و اولین آنزیم صنعتی مشتق از گیاه همگی در توتون تولید شده اند (۷). توتون یک محصول خود گرده افشان است و خویشاوندان زراعی یا وحشی کمی دارد. بنابراین امکان فرار ژن در این حالت بسیار اندک است. علاوه بر این هر دو تکنیک نر عقیمی و عقیمی بذر قبلاً در توتون ایجاد شده اند و تکنولوژی پیشرفته ای برای جلوگیری از انتقال و فرار ژن از طریق گرده یا بذر به گیاهان دیگر به آسانی در دسترس است. بنابراین برخلاف بسیاری از بیوراکتورهای گیاهی توتون مناسب ترین شرایط را از نظر مسایل ایمنی زیستی و اخلاق زیستی و کمترین احتمال آلودگی زنجیره های گیاهی و جانوری را داراست (۱۵).

در سال ۱۹۹۳ کلاس جدیدی از آنتی‌بادی ها در خانواده *Camelidae* کشف گردید که ۷۵-۵۰٪ از آنتی‌بادی‌های کاربردی شتر را تشکیل داده و فاقد زنجیره سبک است (۱۷). در ساختمان این مولکول تنها سه دومن وجود دارد. دو دومن ثابت در C

www.SID.ir

Archive of SID

ترمینال، با دومن‌های ثابت انتهایی آنتی‌بادی انسانی همولوگ بوده و واجد توالی‌های بزرگی که مسئول عملکردهای مشابهند می‌باشند. دومن متغیر N ترمینال تنها از ناحیه متغیر زنجیره سنگین تشکیل یافته و برای تفکیک از VH معمول، V_{HH} نامیده می‌شود.

میزان تمایل[1] این آنتی‌بادی در حد نانومولار است که باعث اتصال بسیار اختصاصی به آنتی‌ژن می‌شود (۲و۱۳). طی سال‌های اخیر در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تلاش‌های موفقیت آمیزی در جهت تهیه آنتی‌بادی‌های نوترکیب علیه تومور صورت گرفته و برای اولین بار تولید آنتی‌بادی‌های تک دومنی نوترکیب علیه MUC1[2] از منشاء شتر تک کوهانه و دو کوهانه در گروه بیوتکنولوژی پزشکی این دانشکده انجام شده است (۱۹و۲۰و۲۱). این کار بوسیله ایمنی سازی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال شترهای دنیای قدیم، کلون کردن دومن متغیر تعدادی از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین آنها، غنی‌سازی، انتخاب و شناسایی عوامل اتصالی به آنتی‌ژن با حداقل اندازه صورت گرفت. آنتی‌بادی‌های تک دومنی همچنین در سیستم های بیانی یوکاریوتی (*Pichia pastoris*) وپروکاریوتی (*Escherichia coli*) تولید گردیدند (۲۲و۲۳). این آنتی‌بادی‌های تک دومنی دارای خواص حلالیت، اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن وتمایل خوبی بودند. این تحقیق اولین مورد از جداسازی V_{HH} آنتی‌پپتید شتری علیه MUC1 می‌باشد. با توجه به نتایج تحقیقات فوق‌الذکر و با توجه به نیاز مراکز درمانی و تشخیصی، در این تحقیق از گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید آنتی‌بادی نوترکیب تک دومنی علیه MUC1 استفاده شده است.

مواد و روش ها

در این پژوهش ژن V_{HH} پس از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pBI121 و بین پیش برنده ویروس موزاییک کلم (CaMV 35S) و منطقه خاتمه دهنده[3] با استفاده از آنزیمهای برشی *Bam*H I و *Sac* I کلون گردید. سازه حاصل به *E. coli* منتقل شده و تکثیر گردید. این سازه سپس به آگروباکتریوم منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم جهت تلقیح گیاهان توتون استفاده شد و گیاهان توتون حاوی ژن V_{HH} با استفاده از محیط کشت انتخابی باززایی شدند. جهت اثبات انتقال ژن و تولید آنتی‌بادی از آنالیزهای PCR، الایزا و ایمونوبلاتینگ استفاده شد.

باکتریها: در این آزمایش از دو باکتری *Escherichia coli* (با نژادهای TG1 و DH5α) و *Agrobacterium tumefaciens* (با نژادهای LBA4404 وC58PGV3101) استفاده شد. از نژادهای باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر ساختارهای تهیه شده استفاده گردید و از آگروباکتریوم جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA از طریق شرکت MWG تهیه گردید که عبارت بودند از :

آغازگر جلوبرنده: 5' TCT AGA GGATCC TAA ACA ATG GTG CAG CTG CAGTCT 3'

آغازگر معکوس: 5' GGA AAT TCG AGC TCT TAG TGA GAT GGT GAC 3'

با توجه به اینکه فاژمید pCANTAB 5E حاوی ژن آنتی‌بادی V_{HH} بر علیه MUC1 دارای جایگاههای برشی *Sfi* I و *Not* I بود، به منظور تغییر این جایگاهها، آغازگر مناسب ژن آنتی‌بادی شتری با توجه به توالی‌های برشی ناقل pBI121

1- Affinity
2- Mucin1
3- Termination Region

www.SID.ir

Archive of SID

یعنی *Bam*H I و *Sac* I، توالی‌های دو طرف V_{HH} و توالی‌های افزایش دهنده بیانی در سیستم‌های گیاهی طراحی گردید. جهت افزایش کارایی برش آنزیمهای برشی دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم به دو طرف آغازگر افزوده گردید.

ناقل‌ها: در مطالعه حاضر از دو ناقل استفاده گردید. ناقل فاژمیدی pCANTAB 5E که حاوی ژن آنتی‌بادی تک دومنی علیه MUC1 بود و ناقل بیانی گیاهی pBI121 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین، محل‌های برشی *Sac* I و *Bam*H I پیش بر CaMV 35S و توالی‌های خاتمه دهنده نسخه‌برداری بود (۳).

گیاهان توتون: در این آزمایش گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) کولتیوار *Xanthi* استفاده گردید. ساقه گیاه توتون به قطعاتی به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر حاوی یک جوانه و یک برگ بریده شد و این قطعات به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از ۲ هفته گیاهان رشد کرده و جهت ترانسفورماسیون آماده شدند.

تکثیر با PCR و تخلیص محصول PCR: تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده انجام گردید. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص Roche استفاده گردید. سپس محصول با *Bam*H I و *Sac* I هضم گردید و مجددا خالص گردید و ژن کد کننده V_{HH} در ناقل بیانی pBI121 کلون گردید.

ترانسفورماسیون *E. coli* با سازه های تهیه شده: باکتریهای مستعد شده *E. coli* ذوب گردیدند و همراه با ۱۰۰ نانوگرم محصول اتصال به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتریها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای $42^{\circ}C$ قرار گرفتند و به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB به میکروتیوبها اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترانسفورم شده روی پتری‌دیش حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) توزیع گردید و در دمای $37^{\circ}C$ به مدت۱۲ ساعت نگهداری گردید.

انتقال سازه‌های ایجاد شده به آگروباکتریوم: تک کلونی آگروباکتریوم که در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب (استرپتومایسین یا ریفامپیسین) بمدت یک شبانه روز در دمای ۳۰ درجه رشد کرده بود با استفاده از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه در $4^{\circ}C$ و بمدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. به رسوب حاصله مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم (۲۰ میلی‌مولار) استریل و سرد اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از سازه (پلاسمید) تخلیص شده به آن اضافه شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. در مرحله بعد تیوب حاوی سازه و آگروباکتریوم به مدت ۵ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ قرارگرفت و یک میلی‌لیتر محیط LB مایع به آن اضافه گردید و بمدت ۳ الی ۴ ساعت در دمای $28^{\circ}C$ شیکر شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل را روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک خاص باکتری (استرپتومایسین و ریفامپیسین) و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) به منظور کنترل و انتخاب جوانه های تراریخت گسترش داده شد و در دمای $30^{\circ}C$ به مدت ۲ تا ۴ روز انکوبه شد.

تراریخت نمودن توتون با استفاده از آگروباکتریوم: گیاهان توتون تیپ وحشی بر روی محیط کشت MS رشد داده شدند و جوانترین برگها (با طول ۴ سانتی‌متر) برای ترانسفورماسیون انتخاب شدند. سوسپانسیون آگروباکتریوم (با OD_{600} =۱ nm) حاوی سازه مورد نظر تهیه گردید. هرکدام از برگهای آماده شده به ۸ تا ۱۰ قطعه تقسیم شدند و به داخل ظروف کشت حاوی ۳۰ میلی‌لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون آگروباکتریوم منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. قطعات برگی سپس بر روی ظروف کشت حاوی محیط کشت MS II (شامل MS +۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA+ ۱ میلی گرم در لیترBAP) منتقل شده و در دمای ۲۶ ̊C در تاریکی به مدت دو روز قرار داده شدند. در مرحله بعدی این قطعات برگی بر روی محیط MS III (شامل ۵۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر کانامایسین + ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفاتاکسیم + MS II) در دمای ۲۶ ̊C با یک دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۴ هفته منتقل شدند. بعد از ساقه زایی، گیاهچه‌ها به محیط MS IV (شامل MS III بدون NAA و BAP) منتقل شدند و در دمای ۲۶ ̊C با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی بمدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا ریشه‌زایی صورت گیرد. گیاهچه‌های کوچک به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط MS IV منتقل گردیدند و در دمای ۲۶ ̊C در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۳ هفته نگهداری شدند. در نهایت گیاهان توتون به گلدانهای حاوی ورمیکولایت منتقل شدند تا برای انتقال به خاک آماده گردند.

استخراج DNA و آنالیز PCR: برگهای جوان از گیاهان باززایی شده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد و گیاهان دارای ژن V_{HH} شناسایی و انتخاب شدند.

استخراج پروتئین و آنالیز ELISA: استخراج پروتئین از برگهای جوان گیاهان تراریخت انجام گرفت. پپتید TSA-P1-24 توسط شرکت Q-BIOGENE سنتز شده و به BSA (آلبومین سرم گاوی)[1] متصل گشت. میزان ۱ میکروگرم از این کونژوگه پپتیدی در داخل هر چاهک قرار داده شد و در دمای ۴ ̊C به مدت یک شب نگهداری شد. جهت کنترل منفی از BSA به مقدار ۱ میکروگرم در ۱۰۰میکرولیتر استفاده گردید. سپس محتویات چاهک خالی و شستشو گردید. و با محلول۱٪ BSA درPBS[2] (۷/۲ : pH و ۱۰mM) برای ۱ ساعت در ۳۷ ̊C نگهداری شد. بعد از این مدت چاهکها شستشو داده شدند و پروتئین استخراج شده از برگهای جوان به چاهکها افزوده شد. در هر آزمایش محلول ۰/۱٪ BSA در PBS (۷/۲ : pH و ۱۰mM) بعنوان شاخص اتصال غیراختصاصی (NSB) در نظر گرفته شد. چاهکهای الایزا برای مدت ۲ ساعت در ۳۷ ̊C نگهداری شد و سپس شستشوی چاهکها مجدداً انجام گرفت. در مرحله بعد به این چاهکها رابیت آنتی کامل[3] متصل به آنزیم اچ آر پی[4] اضافه شد و در ۳۷ ̊C به مدت ۷۵ دقیقه نگهداری شد. پس از پایان این مدت چاهکها شستشه شد و سوبسترا (تترا متیل بنزیدیل[5]) به آن افزوده شد و برای مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردید. واکنش آنزیمی با استفاده از ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲ نرمال HCl متوقف گردید و توسعه رنگ در طول موج ۴۵۰nm اندازه‌گیری شد.

آنالیز ایمونوبلاتنیگ: نمونه‌های پروتئین تخلیص شده از برگهای جوان به نسبت حجمی ۱:۱ با بافر نمونه رقیق گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ ̊C (حمام آب جوش) قرار داده شد تا به کمک حرارت، SDS و حضور ۲- مرکاپتواتانول پروتئینها واسرشته شوند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه به کمک سرنگ همیلتون در سطح خانه‌های ژل افزوده شد. در مرحله بعد پروتئینها از ژل SDS-PAGE به یک نگهدارنده جامد یعنی غشاء نیتروسلولز منتقل شد. جهت انجام این کار پس از انجام SDS-PAGE ژل از دستگاه الکتروفورز خارج شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق در

1- Bovine Serum Albumine

2- Phosphate Buffer Saline
3- Rabbit anti-camel
4- Horse Radish Proxidase
5- 3, 3', 5, 5'-Tetra Methyl Benzidine

www.SID.ir

Archive of SID

بافر انتقال قرار داده شد تا از تغییر اندازه ژل طی انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء نیتروسلولز جلوگیری شود. غشاء نیتروسلولز نیز به مدت ۱۵ دقیقه در بافر انتقال خیس شده و بر روی ژل قرار داده شد و در دو طرف آنها نیز چند کاغذ صافی خیس شده و در بافر انتقال قرار داده شد. کار طوری انجام شد که بین غشاء و ژل حباب هوا ایجاد نگردید. برای خارج کردن حبابها، ساندویچ انتقال حاصل از غشاء، ژل و لایه‌های کاغذ صافی را درون تشتک حاوی بافر انتقال قرار داده و با یک میله شیشه‌ای و با فشار دست و غلتاندن آن حباب های هوا خارج گردید. مجموعه ساندویچ انتقال حاصل بین اسفنجها و سبد پلاستیکی دستگاه قرار داده و مخزن دستگاه از بافر انتقال پر شد. سبد پلاستیکی به گونه‌ای در مخزن قرار گرفت که ژل به طرف کاتد (قطب منفی) و غشاء نیتروسلولزی به سمت آند (قطب مثبت) قرار گرفت. پس از اتصال مخزن به منبع تغذیه با ولتاژ ۱۰۰ و سیستم سرد کننده پس از ۶۰ دقیقه عمل انتقال صورت گرفت. در مرحله بعد ژل را خارج کرده و با رنگ کماسی بلو رنگ آمیزی شد تا از بازده انتقال اطمینان حاصل شود. غشاء نیتروسلولزی بدون اینکه با دست تماس داشته باشد در بافر پوشاننده (شیر خشک ۱۰٪ یا محلول ۰/۱٪ Tween-۲۰ در بافر تریس سالین) قرار گرفت و به مدت ۱ ساعت عمل بلاکینگ بر روی شیکر انجام گرفت. سپس عمل شستشو با بافر PBS به مدت ۱ الی ۲ دقیقه و دو بار انجام گرفت. در مرحله بعدی کاغذ بلات به محلول آنتی‌بادی ثانویه که به میزان ۱به۵۰۰ با بافر PBS رقیق شده بود منتقل گردید و به مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفت و سپس ۵ تا ۶ بار با بافر PBS (هر بار ۵ دقیقه) شسته شد. کاغذ بلات پس از خشک شدن به محلول DAB رقیق شده (سوبسترای HRP) با PBS منتقل گردید و بلافاصله پس از رنگ گرفتن و ظهور باندها با آب مقطر شستشو داده شد.

نتایج

تکثیر ژن آنتی‌بادی تک دومنی علیه MUC1 با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی: ژن V_{HH} با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی‌های انتهای ´۳ و ´۵ ژن آنتی‌بادی و محل‌های برشی *Bam*H I (در آغازگرجلوبرنده) و *Sac* I (در آغازگر معکوس) و توالی‌های افزایش دهنده بیانی Kozak (TAAACA) طراحی شده بود تکثیر گردید.

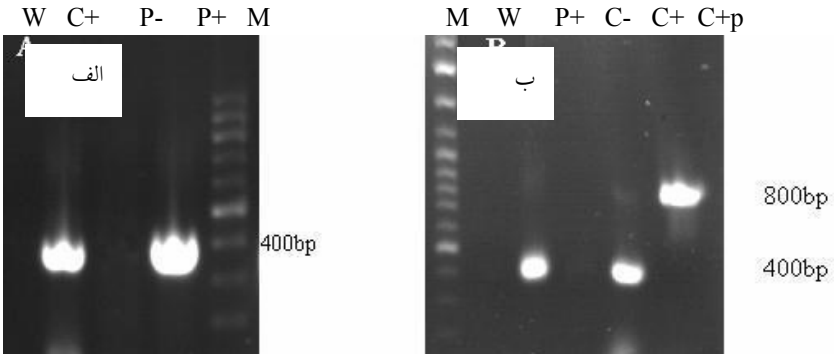
کلون کردن ژن V_{HH} در ناقل بیانی گیاهی: محصول PCR با آنزیمهای *Sac* I و *Bam*H I برش داده شد و در ناقل گیاهی pBI121 کلون گردید. سازه‌های ایجاد شده پس از تخلیص از ژل آگارز به باکتری *E. coli* نژاد TG1 و DH5α منتقل گردید. کلونینگ ژن V_{HH} در pBI121 با استفاده از Colony PCR (شکل ۱ الف) هضم آنزیمی با *Sac* I و *BamH* I وتعیین توالی (شکل ۲) تایید شد و انتقال ناقل بیانی pBI121 به آگروباکتریوم با استفاده از روش شیمیایی (یخ و ذوب) انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی pBI121 دارای V_{HH} روی محیط کشت LB دارای استرپتومایسین یا ریفامپیسین وکانامایسین رشد داده شد. آنالیز Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه ۴۰۰bp را تایید کرد (شکل ۱الف). همچنین PCR با استفاده از آغازگر جلوبرنده مربوط به پیش‌بر CaMV35S و آغازگر معکوس مربوط به ژن V_{HH} انجام گرفت و حضور یک قطعه ۸۰۰bp را نشان داد (شکل ۱ب).

انتقال ژن V_{HH} به گیاه توتون: عمل تراریخت کردن گیاهان توتون با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد LBA4404 و C58 (PGV3101) صورت گرفت. برگ های توتون که با آگروباکتریوم (حاوی pBI121 دارای V_{HH}) تلقیح

www.SID.ir

Archive of SID

شدند بر روی محیط‌کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کاناماسین (۵۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر) و سفاتاکسیم (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند.



شکل۱- تائید کلونینگ و ترانسفورماسیون:

(الف). تایید حضور قطعه حدود ۴۰۰bp (ژن V_{HH})در پلاسمید pBI121 با استفاده از W. PCR :آب (بدونDNA)، C+ :کنترل مثبت (پلاسمید pCANTAB 5E حاویV_{HH}) ، P- :پلاسمید pBI121 بدون V_{HH} (حاوی ژن GUS)، P+ : پلاسمید pBI121 حاوی V_{HH} ،M :مارکر.

(ب). تایید حضور قطعه حدود ۴۰۰bp (ژنV_{HH}) در آگروباکتریوم با استفاده از Colony PCR . M : مارکر ، W :آب (بدون DNA) ، C+ : کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاویV_{HH}) ، P- : آگروباکتریوم بدون پلاسمید pBI121 (بدون V_{HH})، C+ : آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 (و دارای V_{HH})، C+p : Colony PCR از آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 و درنتیجه دارای V_{HH} با استفاده از آغازگر های جلوبرنده پروموترCaMV35S وآغازگر معکوس ژن V_{HH} که تکثیر یک قطعه در حدود ۸۰۰bp را نشان می دهد.

FOR-SEQ:
ACGCTTTCCTGTGTAGATTCCTCTCGCACCTTCAACAGGTTTGGCAT GGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGATCGTGAATTTGTTGCT ACGGATTAGTTCGAGAGGTGATAGGATAGTTTATGCAAAGTCCGTG AGGGGCCGATTCGTCATCTCCAGAGACGACGCCAGGTCCACATTGT ATCTGCAAATG
REV -SEQ:
TTACTCGCCTGAATGTAAACTTTAGTCGATGCTGCACAATAATACAC GCCCGTGTCTTCAGGCTGTAACTTGTTCATTTGCAGATACAATGTGG ACCTGGCGTCGTCTCTGGAAGATGACGAATCGGCCCCTCACGGACT TTGCATAAACTATCCTATCACCTCTCGAACTAATCGTAGCAACAAAT TCACGATCCTTTCCTGGAGCCTGGCG

شکل۲- نتایج حاصل از تعیین توالی ژن V_{HH} ازدوجهت سنس و آنتی سنس در ناقلpBI121

www.SID.ir

Archive of SID

پس از چند هفته ریز نمونه های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند (بعد از باززایی کلا" ۳۶ گیاه با منشأ متفاوت بدست آمد که از این تعداد ۱۱ گیاه نرمال بودند). در حالیکه هیچگونه باززایی بر روی برگهای توتون گیاهان شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون pBI121) مشاهده نشد (شکل ۳ الف و ۳ ب).

شکل۳- تولید گیاهان تراریخت از برگ های گیاه توتون:

(الف). برگهایی که با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 دارای ژن V_{HH} ، تلقیح شده بودند بر روی محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین و سفاتاکسیم گیاهچه های جدید را تولید کردند.

(ب). درگیاهان شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم بدون pBI121) هیچ گونه تولید گیاهچه ای مشاهده نشد.

(ج و د). گیاهچه ها به ترتیب در محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین با غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر و ۵۰ میلی گرم در لیتر باززایی شدند.

(و). گیاهچه های رشد کرده به شیشه های بزرگتر حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر و سفاتاکسیم با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر منتقل شدند

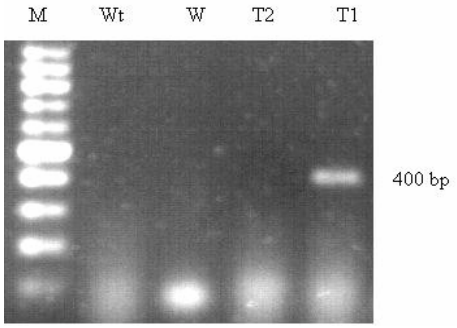
(ی و ه). گیاهان توتون در ابتدا به گلدانهای حاوی ورمیکولایت منتقل شده وسپس انتقال نهایی به خاک انجام گرفت.

استخراج DNA ژنومی و آنالیز PCR:
استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان (۱۱گیاه نرمال) باززایی شده انجام گرفت. آنالیز

www.SID.ir

Archive of SID

PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان وجود یک قطعه ۴۰۰bp را نشان داد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل۴).



شکل۴- آنالیز DNA ژنومی:

آنالیز DNA ژنومی بوسیله PCR وبااستفاده از پرایمر های اختصاصی V_{HH} . یک باند حدود۴۰۰ bpدر گیاه T1 مشاهده گردید، در صورتی که در گیاه تیپ وحشی(Wt)، کنترل آب (W) و یک گیاه بازایی شده دیگر (T2) هیچگونه باندی مشاهده نشد.

آنالیز ELISA: واکنش پروتئین استخراج شده از برگهای جوان گیاهان تراریخت (۱۱گیاه نرمال) نسبت به آنتی‌ژن MUC1 با استفاده از روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که تفاوت واکنش ایمنی‌زایی قابل ملاحظه‌ای در پروتئین‌های باززایی شده از گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیر تراریخت و همچنین NSB وجود دارد. جدول۱ تفاوت $OD_{۴۵۰nm}$ را برای نمونه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد.

آنالیز ایمونو بلاتینگ: آنالیزهای SDS-PAGE و ایمونو بلاتینگ وجود یک باند مشخص با وزن حدود ۱۵KD را در گیاه تراریخت ۱و۲ نشان داد که برابر وزن آنتی‌بادی تک دومنی V_{HH} می‌باشد. در حالی که در گیاهان تیپ وحشی هیچگونه باندی در مورد

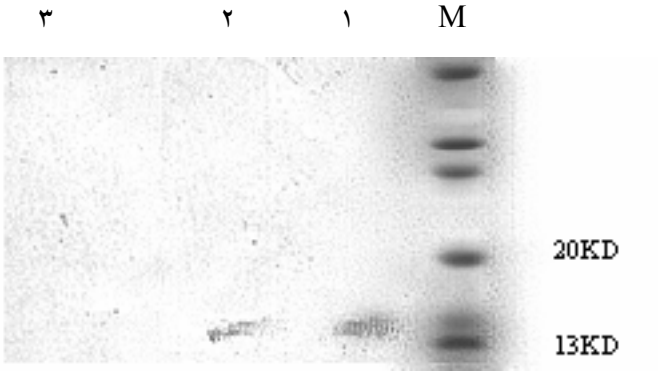
جدول۱- آنالیز ELISA: نتایج الایزا برای پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت (M1, M2, M3) در مقایسه با شاهد منفی(گیاهان تیپ وحشی) و NSB (بافر PBS حاوی ۰/۱درصد BSA) و شاهدمثبت(آنتی بادی پلی کلونال شتری) نشان داده شده است. نتایج بصورت OD در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیان شده است و آزمایش شامل سه تکرار می باشد.

گیاهان تراریخت و کنترل ها	P-BSA ± SD	BSA± SD
گیاه تراریخت M1	۱/٤۸ ± ۰/۱۲	۱/۲۵ ± ۰/۱۲
گیاه تراریخت M2	۲/۱۳ ± ۰/۲۰	۱/٦۹ ± ۰/۱۱
گیاه تراریختM3	۱/٤۷ ± ۰/۱۳	۱/۰۲ ± ۰/۱
شاهد منفی	۱/۰۷ ± ۰/۱۵	۰/۹۷ ± ۰/۱
شاهد مثبت	۱/۲۲ ± ۰/۱۰	۱/۸۹ ± ۰/۱۳
NSB	۰/۷۲ ± ۰/۱۱	۰/۸۷ ± ۰/۰۹

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین استخراج شده از گیاهان شاهد مشاهده نگردید (شکل۵).



شکل ۵- آزمایش ایمونو بلاتینگ برای تایید بیان V_{HH} در گیاه تراریخت:

۱ و ۲: گیاه تراریخت

۳: گیاه تیپ وحشی

M: مارکر

بحث و نتیجه گیری

امروزه آنتی‌بادیها یا قطعات آنتی‌بادی بطور نسبتاً گسترده‌ای در تشخیص و درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵). اما استفاده از آنتی‌بادیها هنوز دارای محدودیتهایی است و این موضوع به این علت است که تولید آنتی‌بادیها از طریق هیبریدوما با سایر سیستمهای میکروبی و جانوری گران و محدود است (۲۶). پژوهشهایی در دست انجام است که امکان جایگزینی سایر سیستمهای دیگر از جمله گیاهان را مورد بررسی قرار می‌دهد. هدف از این پژوهش تولید آنتی‌بادی نوترکیب علیه آنتی‌ژن عامل تومور بود. طبیعت آنتی‌بادی تک دومنی با منشاء شتری (V_{HH}) دارای چندین ویژگی می‌باشد که در مقایسه با سایر مشتقات آنتی‌بادیها نظیر Fab, ScFv و یا آنتی‌بادی کامل به آن برتری می‌دهد. علاوه بر مزایای کلونینگ آسان به علت اندازه کوچک و سهولت انتخاب *in vivo* از یک کتابخانه بالغ سایر مزیتهای آن عبارتند از: میزان بالای بیان و سادگی تخلیص، پایداری و حلالیت بالا، پیچش مولکولی تک دومن، تمایل بالا و اختصاصی و تشابه بالا با قطعات V_H انسانی (۱۳و۱۷). همچنین آنتی‌بادی نوترکیب تک دومنی به علت اندازه کوچک نسبت به سایر آنتی‌بادی ها قابلیت نفوذ در بافت و دفع کلیوی را دارد که مزیت قابل توجهی است (۱۷). آنتی‌بادی تک دومنی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت V_{HH} علیه موسین MUC1 بود. در بین آنتی‌ژنهای مربوط به تومور، مولکول موسین دارای وزن ملکولی ۴۰۰KDa و حامل یکی از انواع اپی‌توپ‌های مربوط به سلول تومور می‌باشد این اپی‌توپ توسط آنتی‌بادی قابل شناسایی بوده و گزارشات متعددی از تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این مولکول وجود دارد. کاملاً ثابت شده است که در سرطان پستان، تخمدان، ریه، پانکراس و پروستات بیان MUC1 بیش از حالت طبیعی است (۹ و۲۹). گیاهان برای بیان تعداد زیادی از اشکال آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های عامل تومور بکار رفته‌اند که اینها شامل ایمونوگلوبولین کامل و مشتقات آنتی‌بادی که بطور مصنوعی سنتز می‌شوند می‌باشد مانند ScFv

www.SID.ir

Archive of SID

T8466 علیه آنتی‌ژن در گندم و برنج، آنتی‌بادی علیه سرطان کلون در توتون و IgG کامل علیه آنتی ژن سرطان جنینی (۴، ۱۵ و ۱۶). اما تاکنون گزارشی در مورد ترانسفورماسیون و تولید V_{HH} علیه آنتی ژن های عامل تومور درگیاه وجود نداشت. گزارشی در مورد کنترل درونی عملکرد آنزیم در گیاه بوسیله تولید قطعات آنتی‌بادی تک دومنی موجود می‌باشد (۱۰) اما هیچ گونه گزارشی در مورد انتقال ژن و تولید یک V_{HH} بعنوان آنتی‌تومور در گیاه وجود ندارد. اگرچه گزارشاتی از تولید آنتی‌بادی مونوکلونال تک دومنی علیه MUC1 در فاژ، مخمر و باکتری وجود داشت (۲۱ و ۲۲ و۲۳) اما هیچگونه گزارشی از تولید آنتی‌بادی مونوکلونال تک دومنی علیه MUCl در گیاه وجود نداشت و این گزارش اولین گزارش از تولید V_{HH} علیه MUC1 در گیاه می‌باشد. در این پژوهش از ناقل بیانی جفتیpBI121 جهت کلونینگ و انتقال ژنV_{HH} به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری ویژگی ها به میزان زیادی در انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد (۳). ناقل بیانی pBI121 حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی، پیش برنده CaMV 35S، توالی کد کننده گلوکورونیداز (GUS) و ترمیناتور NOS می باشد. جهت افزایش بیان در سطح نسخه برداری ژن، پس از هضم ناقل بوسیله آنزیم های مربوطه و حذف ژن گلوکورونیداز، ژن V_{HH} به جای آن و بین پیش بر CaMV 35S و ترمیناتور NOS جایگزین گردید. دو عامل مهم در افزایش نسخه برداری عبارتند از: پیش برنده و سیگنال پلی آدنیلاسیون. در گیاهان دولپه ای مانند توتون پیش برنده CaMV 35S یک انتخاب مناسب و عمومی می باشد زیرا باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر می شود. عامل مهم دیگر در بیان بالای ژن یک سیگنال قوی پلی آدنیلاسیون می باشد که جهت پایداری نسخه های ساخته شده با پیش برنده CaMV 35S، ژن NOS مناسب و عمومی می باشد (۷). همچنین ما از توالی Kozak (TAA ACA) جهت افزایش بیان استفاده نمودیم. این توالی از بررسی توالی های قبل از کدن شروع در ژن های با بیان بالا در گیاهان بدست آمد ودر طراحی آغازگر جلوبرنده مد نظر قرار گرفت (۲۸). جهت انتقال ژن به گیاه توتون از روش انتقال با آگروباکتریوم استفاده گردید که امروزه به طور گسترده ای جهت ترانسفورماسیون گیاهان خصوصا" دولپه ای ها مورد استفاده قرار می گیرد. در ترانسفورماسیون توتون این روش مزایای زیادی نسبت به سایر روش های انتقال ژن دارد که از آن جمله عبارتند از: گیاه توتون به تلقیح با نژادهای آگروباکتریوم(مانند LBA4404 وC58PGV3101) فوق العاده حساس است، گیاهچه ها مستقیما و بدون نیاز به تشکیل کالوس باززایی می شوند، گیاهچه ها به آسانی از محل لبه های بریده شده ریز نمونه (برگ) که بوسیله آگروباکتریوم حاوی ناقل تلقیح شده است رشد می کنند و پتانسیل باززایی از بافت های گیاهی از طریق کشت بافت در این روش نسبت به سایر روشها بسیار بالاست (۷). آنالیز مولکولی با PCR بر روی گیاهان تراریخت، انتقال ژن V_{HH} را به گیاهان باززایی شده نشان داد. وجود یک باند اضافی در آزمایشات SDS-PAGE و ایمونو بلاتینگ با وزن مولکولی ۱۵کیلودالتون، همراه با آزمایشات الایزا، بیان ژن V_{HH} را در گیاهان تراریخت اثبات نمود. این تحقیق با توجه به اهمیت و ضرورت تولید پروتئین های نوترکیب بویژه آنتی بادی تک دومنی علیهMUC1 از منابع ارزان تر، حجم انبوه تر وزمان کوتاه تر انجام گرفت. نظر به آمار قابل توجه بیماریهای سرطانی در ایران و ضرورت تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب خاص سرطان‌ها بخصوص anti-MUC1 از منابع دائمی و ارزان اجتناب ناپذیر می‌باشد. با توجه به مزیت‌های گیاهان بعنوان بیوراکتور در مقایسه با سایر سیستمها

www.SID.ir

Archive of SID

نظیر مخمر، فاژ، باکتری و سیستم‌های پستانداران می‌توان از گیاه بعنوان یک جایگزین مناسب برای تولید آنتی‌بادیهای نوترکیب و خصوصا "V_{HH} استفاده کرد.

منابع

1. Anonymous. 2003. Production of biopharmaceuticals in plants. Available in www.mi ami. com/ mld/miami/news/nation/4695528.html

2. Arbabi Ghahroudi, M; Desmyter, A; Wyns, L; Hamers, and R; Muyldermans, S. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy chain antibodies. Febs letters, 41: 521-526

3. Chen, C; Wang, K; Soong, S. C; and Kin-Ying, T. 2003. Complete sequence of the binary vetor pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding, 11: 287-293.

4. Conrad, U; and Fiedler, U. 2001. Expression of antibody fragments in plant cells. Antibody Engineering; Springer Lab Manual, Berlin, pp: 367-382.

5. Daniell, H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I. K. Ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp: 371-376.

6. Daniell, H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nature Biotechnology, 20: 581-586.

7. Fischer, R; and Schillberg, S. 2004. Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, pp: 114.

8. Giddings, G; Allison, G; Brooks, D; and Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotechnology, 18: 1151-1155.

9. Grilling, A; Bartkoova, J; Burchell, J; Gendler, S; Gillet, C; and Taylor Papadimitriou, J. 1989. A core protein epitope of poly morphic epithelial mucin detected by the molonoclonal antibody SM-3 in selectivity exposed in a range of primary carcinomas. International Journal of Cancer, 43: 1072-1076

10. Jobling, S. A; Jarman, C; The, M. M; Holemberg, N; Blacke, C; and Verhoyen, M. E. 2003. Immunomadulation of enzyme function in plants by single domain antibody fragments. Nature Biotechnology. Research Article, 21: 77-80

11. Joosten, V; Lokman, C; Cees, A. M; Van Der Honde, P; and Punt; J. 2003. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. Microb Cell Fact, 2(1):10-15

12. Khoudi, H.; Laberge, S; Ferull, O J. M; Bazin, R; Darveau, A; Castonguay, Y; Allard, G; Lemiex, R; and Vezina, L. P. 1999. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. Biotechnology Bioengineering, 64: 135-143.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Lauwereys, M; Arbabi Ghahroudi, M; Desmyter, A; Kinne, J; Holzer, W; De Genst, E; Wyns, L; and Muyldermans, S. 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy chain antibodies. The European Molecular Biology Organization Jounal, 17: 3512-3520.

14. Leite, A; Kemper, E. L; Da Silva, J; Luchessi, A. D; Siloto, M. P; Bonaccorsi, E. D; El-Dorry, H. F; and Aruda, P. 2000. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. Molecular Breeding, 6: 47-53.

15. Ma, J. K. C; Drake, P. M. W; and Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics, 4: 794-805

16. Ma, J. K. C; and Hiatt, A. 1996. Expressing antibodies in plants for immunotherapy in transgenic plants. John Wiley and Sons, Chichester, U.K, pp: 229-243.

17. Muyldermans, S. 2001. Single domain antibodies: Current status. Reviews in Molecular Biotechnology, 74: 277-302.

18. Peeters, K; De Wilde, C; and Depicker, A. 2001. Efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secratory pathway and apoplast of Arabidopsis thaliana. European Journal of Biochemistry, 268: 4251-4260

19. Rahbarizadeh, F; Rasaee, M. J; Forouzandeh Moghadam, M; Allameh, A; Narang, A; and Sadeghizadeh; M. F; 2004. Induction of immune response in *camelus bacterianus* and *camelus dromdarius* against MUC1 peptide produces heavy chain antibodies with efficient combining properties. Journal of camel practice and research, 11: 1-9.

20. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh Moghadam, M., Allameh, A., Sadeghizadeh, M. F., Golmakani, M. and Narang, S. A. 2005. Production and characterization of novel heavy-chain antibodies specific for tandem repeat region of MUC1 mucin. Immunological Investigation, 34: 431-452.

21. Rahbarizadeh, F; Rasaee, M. J; Forouzandeh Moghadam, M; Allameh, A; and Sadroddiny, E. 2004. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybridoma and Hybridomics, 23(3):15-19.

22. Rahbarizadeh, F; Rasaee, M. J; Forouzandeh Moghadam, M; and Allameh, A. 2005. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast Pichia pastoris. Molecular Immuonology, 43 (5): 426-435.

23. Rahbarizadeh, F; Rasaee, M. J; Forouzandeh Moghadam, M; and Allameh, A. 2005. High Expresion and Purification of the Recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in Escherichia coli. Protein Expression and Purification, 44(1): 32-38.

24. Rishi, A. S; Nelson, N. D; and Goyal, A. 2001. Molecular Farming in Plants, A current prespective. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 10: 1-12.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Souriau, C; and Hudson, P. 2001. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. Expert Opinion on Biological Therapy, 5: 845-855.

26. Stoger, E; Sack, M; Fischer, R; and Christou, P. 2002. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. Current Opinion in Biotechnology, 13: 161-166.

27. 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.

28. Taylor, J; Jones, J. D. G; Sandler, S; Muller, G. M; and Bedbrook, J. 1987. Optimizing of expression of chimeric genes in plant cells. Molecular and General Genetics, 210: 572-577.

29. Taylor Papadimitriou, J; Burchell, J; Miles, D. W; and Dalziel, M. 1999. MUC1 and cancer. Biochem Biophuys. Acta, 1455: 301-313.

www.SID.ir