

بیان دو سیستم‌رونی ژنهای رمز کننده آنتی‌بادی مونوکلونال trastuzumab در توتون با استفاده از یک توالی جایگاه میانی ورود ریپوزوم

مراد جعفری^{۱,۲*} و مریم احساسات وطن^۱

^۱ ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

^۲ ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست‌فناوری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۲

چکیده

آنتی‌بادیهای مونوکلونال هتروداایمرهای متشکل از چهار زنجیره پپتیدی، دو زنجیره سبک (L) یکسان و دو زنجیره سنگین (H) یکسان هستند. بیان همزمان مقدار برابر ژنهای رمز کننده برای تولید پایدار و گر دایش به صورت یک آنتی‌بادی کارکردی ضروری است. به منظور بیان همزمان چندین ژن، سیستمهای مختلفی از جمله وکتورهای مبتنی بر جایگاه میانی ورود ریپوزوم (IRES) توسعه یافته‌اند. در مطالعه حاضر، یک حامل دی‌سیسترونیک برای بیان همزمان ژنهای رمز کننده زنجیره‌های سنگین و سبک آنتی‌بادی ضد سرطان سینه trastuzumab (Herceptin®) با استفاده از توالی IRES از فاکتور پروتئین شوک حرارتی-۱ توتون (*Nicotiana tabacum*) (NHFSF1) ساخته شد. کارآیی دستواره در توتون به روش آگرواینفیلتراسیون ارزیابی شد. بیان دی‌سیسترونیک تراژنها در سطح رونوشت RNA با آنالیز RT-PCR نیمه کمی تشخیص داده شد. آنالیز وسترن بلات بیان کارآمد فرم تترامر trastuzumab را در بافت برگ توتون مورد تأیید قرار داد و محتوی آنتی‌بادی ۷ روز پس از اینفیلتراسیون ۰/۴۴ درصد پروتئین کل محلول برآورد شد. نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده کارآیی عناصر IRES گیاهی برای بیان دی‌سیسترونیک پروتئینهای هترومولتی مر در گیاهان است.

واژه های کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال trastuzumab، بیان دو سیستم‌رونی، فاکتور شوک حرارتی-۱ توتون، جایگاه میانی ورود ریپوزوم (IRES)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۳۱۴۹، پست الکترونیکی: m.jafari@urmia.ac.ir

مقدمه

برسد (۱۷). یکی از پرفروش‌ترین آنتی‌بادیهای نو ترکیب، trastuzumab (Herceptin®) یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی ضد HER2/Neu مورد استفاده در درمان سرطان پستان است که در سیستم پستانداری (سلولهای تخمدان همستر چینی، CHO) تولید می‌شود (۲۱)، که بسیار گران‌قیمت می‌باشد. کشاورزی مولکولی (Molecular farming) چشم‌اندازی نوین در حوزه بیوتکنولوژی برای تولید بیومولکولهای نو ترکیب دارویی فراهم کرده است (۲) و (۶). پیشرفتهای اخیر در مهندسی ژنتیک گیاهی بیان و

آنتی‌بادیهای نو ترکیب یکی از ابزارهای زیستی بسیار پرکاربرد در تحقیقات، تشخیصها و درمان بسیاری از بیماریها از جمله سرطانها هستند. بیش از ۳۰ درصد داروهای زیستی (Biopharmaceuticals) آنتی‌بادیهای نو ترکیب هستند (۳۹). بازار فروش جهانی آنتی‌بادیهای مونوکلونال یکی از بخشهای سریع رو به رشد صنعت داروسازی است. در سال ۲۰۱۳، فروش جهانی آنتی‌بادیهای مونوکلونال ۷۵ میلیارد دلار بوده است و پیش بینی می‌شود این رقم تا سال ۲۰۲۰ به ۱۲۵ میلیارد دلار

در ۳۰ سال گذشته اعتقاد بر این بود که تقریباً تمام mRNAهای یوکاریوتی دارای مکانیسم بیان ژن تک سیسترونی هستند که برای هر ژن نیاز به یک راه‌انداز دارد، امروزه مشخص شده است که بیش از ۳ درصد mRNAهای مهره‌داران و شاید سایر یوکاریوت‌ها در 5' UTR خود دارای IRES هستند (۲۸). عناصر IRES توالیهای نوکلئوتیدی هستند که اغلب در 5' UTR برخی mRNAها قرار دارند و ریبوزومهای یوکاریوتی را برای آغاز ترجمه پروتئین در وسط مولکول mRNA بدون نیاز به کلاهک 5' که به طور طبیعی برای شروع ترجمه نیاز است، به کار می‌گیرند (۳۰، ۴۲ و ۵۰) و برای بیان دو ژن به شکل یک پیام دو سیسترونی استفاده می‌شوند (۷، ۲۳ و ۴۴). هنگامی که IRES بین چندین چارچوب قرائت باز (ORF) قرار می‌گیرد، ORF اول با مکانیسم استاندارد وابسته به کلاهک ترجمه می‌شود، در حالی که ترجمه ORF بعدی از طریق مکانیسم مستقل از کلاهک و به صورت وابسته به IRES انجام می‌شود (۲۳ و ۴۱). ترجمه مستقل از کلاهک (Cap-independent translation) اولین بار در یک IRES پولیوویروس کشف شد (۵۰). از آن زمان به بعد ناقله‌های دو سیسترونی به طور گسترده‌ای برای کاربردهای *in vitro* و *in vivo* مورد استفاده قرار گرفتند (۱۹، ۲۸، ۳۴، ۳۶ و ۵۱). تا به امروز بیش از ۴۰ توالی IRES از طریق آنالیزهای *in silico* ساختار ثانویه mRNA انواع ویروس‌های جانوری و گیاهی از جمله ویروس خراشک توتون (TEV) (۱۱)، توباموویروس آلوده کننده کروسیفر (crTMV) (۴۸) و ویروس لکه حلقوی کلروتیک هیبیسکوس (HCRSV) (۲۹)، گزارش شده است. در گیاهان نیز مکانیسم ترجمه وابسته به IRES در mRNAهای سلولی رمز کننده پروتئین شوک حرارتی *Nicotiana tabacum* (NtHS) (۱۶)، پروتئین شوک حرارتی HSP101 در ذرت (۱۵)، پروتئین ریبوزومی S18 (RPS18) در *Arabidopsis* (۴۷) و همچنین ژن رمز کننده پروتئین الکل دهیدروژناز (ADH) در ذرت (۳۹) شناسایی شده است.

تولید پروتئینهای نو ترکیب پیچیده مانند آنتی‌بادیهای مونوکلونال انسانی را در گیاهان نیز امکان‌پذیر ساخته است (۴۰)، که عملکرد نسبتاً بالا، هزینه‌های بسیار پایین تولید و افزایش سریع مقیاس تولید از مهمترین مزایای سیستمهای گیاهی می‌باشد (۱).

در بسیاری از موارد، تولید آنتی‌بادیهای IgG (Immunoglobulin G) شامل بیان حداقل دو ژن می‌باشد. حتی در مواردی که آنتی‌بادیهای تک زنجیره‌ای در گیاهان بیان می‌شوند، بیان همزمان ژنهای چارچوب‌های اختصاصی (پروتئین شوک حرارتی، ایزومرازهای دی‌سولفات پروتئین) برای تا خوردگی و تجمع فرم صحیح آنتی‌بادی همراه با ژن رمز کننده آنتی‌بادی بسیار مفید خواهد بود (۴۶). استفاده از راهکار بیان پلی‌سیسترونی برای تولید این مولکولهای چند زنجیره‌ای در سیستم گیاهی می‌تواند بسیار جالب و قابل توجه باشد. به طور کلی راهکارهایی که برای بیان همزمان چندین ژن خارجی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند به دو گروه تقسیم می‌شوند: (۱) راهکارهایی که شامل انتقال و بیان تعداد مورد نظر از واحدهای رونویسی (هر یک شامل راه‌انداز، ناحیه رمز کننده و سیگنال پلی‌آدنیلایسیون، همراه با سایر عناصر سیس با کاربردهای مورد نظر) می‌باشند (۲۰ و ۴۹)، که شامل تراریختی مجدد، تجمع چندین تراژن توسط انتقال پی در پی ژنهای منفرد به گیاهان تراریخته (۴۵ و ۴۷)، ترانسفورمسیون همزمان، انتقال ترکیبی چندین تراژن در یک آزمایش تراریختی (۵) و (۳۵) و تلاقیهای جنسی بین گیاهان تراریخته حامل تراژنهای مختلف (۳۷، ۳۸ و ۵۳) هستند (۲) راهکارهایی که چندین ناحیه رمز کننده پروتئین را در یک دستواره پلی‌ژنیک (پلی‌سیسترونی) ترکیب می‌کنند از جمله، پروتئین همجوشی، راه‌اندازهای دو طرفه و جایگاههای میانی ورود ریبوزوم (Internal Ribosome Entry Sites; IRESs) که می‌توانند برای بیان همزمان چندین نسخه از یک ژن و یا چندین ژن از طریق یک واحد رونویسی مورد استفاده قرار گیرند (۹).

Laboratory) به دست آمد و یک جفت آغازگر اختصاصی (UTRHSF-Fwd و UTRHSF-Rev، جدول ۱) با استفاده از نرم افزار 7 Oligo برای تکثیر یک قطعه ۴۵۳ bp طراحی شد. برای همسانه‌سازی آسان قطعه 5' UTR NtHSF1-IRES جایگاههای برشی آنزیمهای محدود کننده *XhoI* و *BamHI* به ترتیب در توالیهای آغازگرهای رفت و برگشت اضافه شدند. DNA ژنومی از برگ گیاهان گلخانه‌ای دو هفته‌ای به روش CTAB (۸) استخراج شد و در واکنش PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد. واکنشهای PCR با حجم کلی ۲۵ µl شامل بافر 10X PCR به میزان ۱ µl dNTPs (۱۰ mM)، ۱/۵ µl MgCl₂ (۲۵ mM)، ۲/۵ آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ µM) هر کدام ۰/۵، ۱۰۰ ng/µl DNA ژنومی ۱ µl، آنزیم Pfu (۲/۵ U/µl) DNA Polymerase ۱ µl و آب مخصوص PCR ۱ µl تهیه شدند. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه و سپس یک چرخه بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه Gel Doc مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند.

بیان پلی‌سیسترونی پروتئینهای چند زنجیره‌ای مانند آنتی‌بادیها به واسطه IRES به طور گسترده‌ای در سلولهای پستانداری مورد مطالعه قرار گرفته است (۳، ۴، ۵، ۶، ۲۴، ۳۴)، همچنین از توالیهای IRES گیاهی برای بیان دو سیسترونی ژنهای گزارشگر (Reporter genes) استفاده شده است (۱۵، ۱۶، ۳۹ و ۵۲)، با این حال، بر اساس منابع علمی قابل دسترس گزارشی در مورد استفاده از عناصر IRES گیاهی برای بیان پلی‌سیسترونی پروتئینهای نو ترکیب در گیاهان وجود ندارد. در مطالعه حاضر همسانه‌سازی یک توالی IRES گیاهی از منشاء توتون و استفاده از آن برای بیان دو سیسترونی آنتی‌بادی مونوکلونال trastuzumab در سیستم گیاهی برای اولین بار گزارش می‌شود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذور گیاه توتون رقم Gewone groene (تهیه شده از مرکز تحقیقات توتون تیرتاش، مازندران) تحت شرایط گلخانه‌ای کشت شدند. گیاهان گلخانه‌ای حاصل در جداسازی ژن و تراریختی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی توالی 5' UTR NtHSF1: توالی mRNA بخش 5' UTR فاکتور شوک حرارتی ۱ توتون (NtHSF-1)، که قبلاً فعالیت IRES آن گزارش شده است (۱۴)، از پایگاه اطلاعاتی EMBL (European Molecular Biology)

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

آغازگر	توالی 5'-3'	طول محصول (bp)
UTR-HSF-Fwd [†]	AAGTCTCGAGGGCACGAGGCTCCCA	۴۵۳
UTR-HSF-Rev [‡]	GAGCGGATCCCTGTGTTTTCCCTG	
LC-Fwd1	GCTCGGATCCATGGATATTCAGATGACCC	۶۱۵
LC-Fwd1	TGCCTAAGATCTGCTTGGCCTCTGGATCTTGG	
LC-Fwd2	CTGAACACCGAATGAACAAGTAC	۷۱۸
LC-Rev2	ACTAAGTCGGGGCAGACGTG	
HC-Fwd	GACATATCCATTGCCAGGAAGCG	۷۱۸
HC-Rev	GCTAACGTCAACCACCACGCATG	

[†] Forward; [‡] Reverse

کشت در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و همچنین از طریق Colony PCR غربال شدند. همچنین ساختار مولکولی دستواره با برش آنزیمی بررسی شد. در نهایت کلنی مورد تأیید آگروباکتری در تراریختی توتون استفاده شد.

تراریختی گیاه توتون با روش آگرواینفیلتراسیون: برای تراریختی به روش آگرواینفیلتراسیون مطابق با روش Leuzinger و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییر به شرح زیر عمل شد (۳۲): ابتدا کشت شبانه از دو نوع کلنی آگروباکتریوم سویه LBA4404، هر کدام حاوی دستواره نوترکیب pBIN19-Tras-IRESHSF یا pCambia1302 (حاوی ژن گزارشگر *mgfp*) در ۳۰ ml محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین (۵۰ mg/l) انجام شد. کشت شبانه باکتری در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب هر دو نوع باکتری در ۳۰ ml محیط القاء (۱۰/۵ g/l K₂HPO₄، ۱۰/۵ g/l KH₂PO₄، ۴/۵ g/l (NH₄)₂SO₄، ۱ g/l NaCitrate، ۰/۵ g/l glycerol، ۴ mM MES، ۱ mM MgSO₄، ۱ g/l glucose، ۱۰ mM MES، ۱۵۰ μM اسید) غنی شده با سینامیک اسید (۱۵۰ μM)، کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین (۵۰ mg/l) حل شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ rpm نگهداری شد. پس از ۵ ساعت هر دو نوع سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شده و رسوبهای حاصل در بافر اینفیلتراسیون (۱۰ mM MgSO₄؛ ۱۰ mM MES؛ pH=۵/۵) حاوی ۱۵۰ μM سینامیک‌اسید حل شد و غلظت باکتری به ۰/۴ OD₆₀₀ رسانده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ rpm نگهداری شد. سوسپانسیون‌های باکتری تهیه شده به طور جداگانه یا ترکیبی توسط سرنگ بدون سوزن به برگ گیاهان ۶ هفته‌ای توتون تزریق شدند. همچنین تعدادی از برگها با بافر اینفیلتراسیون عاری از باکتری (شاهد منفی) تلقیح شدند. گیاهان تلقیح شده به اتافک رشد با دمای ۲۴±۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. ۷ روز پس از اینفیلتراسیون،

محصول PCR پس از خالص‌سازی با کیت High Pure PCR Product Purification (Roche، آلمان)، جهت توالی‌یابی (شرکت Bioneer، کره) ارسال شد. انطباق و تعیین مشابهت توالی به دست آمده از طریق الگوریتم BLASTn در پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت و هم‌ترازی چندگانه توالیها و آنالیز فیلوژنتیکی توسط نرم افزار 6 CLC Sequence Viewer انجام گرفت. پس از تأیید درستی توالی قطعه تکثیر شده، محصول PCR در تهیه دستواره نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه دستواره نوترکیب دی‌سیسترون: به منظور ساخت دستواره مولکولی دی‌سیسترون حاوی ژنهای رمزکننده زنجیره سنگین (HC) و زنجیره سبک (LC) آنتی‌بادی مونوکلونال trastuzumab، از پلاسمیدهای pBIN19-TrasHC و pBIN19-TrasLC حاوی توالیهای بهینه شده (بر اساس کدونهای ترجیحی توتون) ژنهای HC و LC (۱۸) استفاده شد. توالی 5' UTR NtHSF1 پس از برش با آنزیمهای *XhoI* و *BamHI* در پلاسمید pBIN19-TrasHC طی فرآیند اتصال با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase درج شد. سپس توالی ژن LC از پلاسمید pBIN19-TrasLC توسط آغازگرهای LC-Fwd1 و LC-Rev1 (جدول ۱) حاوی جایگاه برش آنزیمی *BamHI* تکثیر شد و پس از خالص‌سازی و برش با آنزیم مذکور در دستواره نوترکیب اولیه درج شد (۴۳). برای جلوگیری از خود اتصالی حامل، برداشتن فسفات از انتهای 5' با استفاده از آلکالین فسفاتاز (FastAP، Fermentas) انجام شد. بدین ترتیب دستواره نوترکیب دی‌سیسترون حاوی ژن رمزکننده زنجیره H به عنوان سیسترون اول، ژن رمزکننده زنجیره L به عنوان سیسترون دوم و توالی 5' UTR NtHSF1-IRES در بین سیسترون‌ها برای بیان آنتی‌بادی trastuzumab ساخته شد و به صورت pBIN19-Tras-HSFIRE نام‌گذاری شد. دستواره نوترکیب با روش ذوب و انجماد (۳۹) به آگروباکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت و کلنیهای نوترکیب بر اساس

قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. در این آنالیز از رونوشت ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی برای کمی نمودن نسبی بیان تراژنها و از تکنولوژی 18S rRNA Competimer™ (Ambion، آمریکا) برای کنترل تکثیر رونوشت آن در رقابت با رونوشت تراژنها استفاده شد. بدین منظور پس از بهینه‌سازی، از نسبت ۳:۸ competitors:primers در واکنش RT-PCR استفاده شد. محصولات RT-PCR در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. برای سنجش نیمه کمی بیان تراژنها، شدت نوارهای تکثیر شده پس از نرمال‌سازی نسبت به کنترل داخلی در نرم افزار ImageJ 1.47 به داده‌های کمی چگالی تصحیح شده (Adjusted density) تبدیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال (0/01) P انجام شد.

آنالیز لکه‌گذاری وسترن (Western blotting): آنالیز لکه‌گذاری وسترن به منظور ردیابی بیان پروتئینهای LC و HC آنتی‌بادی trastuzumab در پروتئین کل برگ گیاهان توتون آگرواینفیلتر شده صورت گرفت. ۷ روز پس از اینفیلتراسیون، استخراج، پروتئین کل از برگهای اینفیلتر شده و برگ گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی به روش Jafari و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد (۲۶) و غلظت پروتئین کل استخراج شده به روش برادفورد (۱۰) تعیین شد. در حدود ۵۰ میکروگرم از نمونه پروتئین گیاهان تراریخته و شاهد، پس از واسرشت‌سازی در ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel) ۱۰ درصد بارگذاری شد و الکتروفورز در شرایط احیاء شده (reducing conditions) و شرایط احیاء نشده (non-reducing conditions) با دستگاه Protein II (Bio-Rad) انجام شد. انتقال پروتئینها از ژل بر روی غشاء نیتروسولوزی (Bio-Rad، آمریکا) به وسیله دستگاه Semi-dry transblot (Bio-Rad) با ولتاژ ۲۰ انجام شد و تشخیص ایمونولوژیکی پروتئینهای هدف بر اساس روش Jafari و همکاران (۲۰۰۹) (۲۶) و با استفاده از

برگها برای آنالیزهای بعدی برداشت شدند. قبل از آنالیزهای مولکولی اساسی، تعدادی از برگهای تلقیح شده با ترکیبی از پلاسمیدهای pBIN19- + pCAMBIA1302 GFP و TraslHC-IRESHSF برای ردیابی بیان پروتئین GFP و کارآمدی روش آگرواینفیلتراسیون استفاده شدند، بدین منظور علاوه بر تابش مستقیم نور UV بر برگها در تاریکخانه، به وسیله میکروسکوپ کونفوکال نیز ارزیابی شدند و عکس‌برداری از تشعشعات از طریق عبور از یک فیلتر ۵۳۰-۵۰۰ nm انجام شد.

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای (Dot blotting): بدین منظور DNA ژنومی از برگهای تلقیح شده به روش CTAB استخراج شد. در حدود ۱۰ μg DNA ژنومی و همچنین غلظتهای مختلفی (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ pg) از پلاسمید نوترکیب به عنوان شاهد مثبت پس از واسرشت‌سازی بر روی غشای نایلونی باردار مثبت (Roche، آلمان) لکه‌گذاری شدند. کاوشگر اختصاصی نشاندار با استفاده از سیستم DIG از ناحیه رمز کننده تراژنها بر اساس دستورالعمل کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche) تهیه شد. دوره‌سازی غشای لکه‌گذاری شده با کاوشگر، مراحل شستشو و تشخیص سیگنالها طبق دستورالعمل کیت DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche، آلمان) صورت گرفت.

آنالیز RT-PCR نیمه کمی (Semi-quantitative reverse transcription-PCR): به منظور تأیید بیان تراژنها در گیاهان اینفیلتر شده از آنالیز RT-PCR نیمه کمی استفاده شد. برای استخراج RNA کل از نمونه‌های برگگی اینفیلتر شده حاوی تراژنها و گیاه مادری غیرتراریخته توتون (شاهد منفی) بر اساس دستورالعمل کیت RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) عمل شد. آنالیز RT-PCR بر اساس دستورالعمل کیت Titan One Tube RT-PCR (Roche) توسط آغازگرهای اختصاصی تراژنها (LC-Fwd2, -Rev و HC-Fwd2, -Rev، جدول ۱) به صورت Multiplex در

قطعات تکثیر شده در شاهد مثبت (مخلوط پلاسمیدهای pBIN19-NTopTras-LC و pBIN19-NTopTras-HC مورد استفاده در ساخت دستواره نوترکیب، چاهک C⁺) بود. در پلاسمید غیر نوترکیب pBIN19 هیچ‌گونه تکثیری مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود قطعات متناظر در آن می‌باشد (چاهک C₁⁻). عدم تکثیر در واکنش بدون DNA الگو نیز نشان دهنده صحت واکنش PCR و عدم وجود هرگونه آلودگی بود (چاهک C₂⁻). برای اطمینان بیشتر از صحت دستواره ساخته شده، ساختار مولکولی دستواره ساخته شده توسط آنالیز برش با آنزیمهای محدود کننده تأیید شد (شکل ۲، B). در اثر برش دوگانه با آنزیمهای BamHI و HindIII در پلاسمید نوترکیب اولیه نواری با اندازه بزرگتر نسبت به نوار ایجاد شده در پلاسمید pBIN19-TrasHC مشاهده شد که نشانگر درج توالی 5' UTR NtHSF1-IRES در آن بود (چاهکهای ۱ و ۲). دستواره ساخته شده در این مرحله به صورت pBIN19-TrasHC-IRES_{HSF} نام‌گذاری شد. پلاسمیدهای نوترکیب نهایی و pBIN19-TrasHC-IRES_{HSF} در برش توسط آنزیم HindIII به صورت خطی در آمدند، ولی اندازه بزرگتر پلاسمید نوترکیب خطی شده نشان دهنده وارد شدن قطعه الحاقی (ژن LC) در آن بود (چاهکهای ۳ و ۴). برش با آنزیم BamHI باعث خطی شدن پلاسمید pBIN19-TrasHC-IRES_{HSF} شد (چاهک ۵)، در صورتی که در پلاسمید نوترکیب نهایی به دلیل وجود جایگاه دیگر برای این آنزیم بر روی قطعه الحاقی، یک قطعه دیگر با طول حدود ۸۵۰ bp حاصل شد (چاهک ۶). برای تأیید جهت صحیح درج قطعه الحاقی، پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم XhoI برش یافت، که ایجاد قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار نشان دهنده درج قطعه الحاقی با جهت صحیح بود (چاهک ۷). بدین ترتیب ساختار دستواره نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF} حاوی ژنهای رمزکننده زنجیره‌های L و H آنتی‌بادی trastuzumab جدا شده با توالی IRES فاکتور شوک حرارتی ۱ توتون تأیید

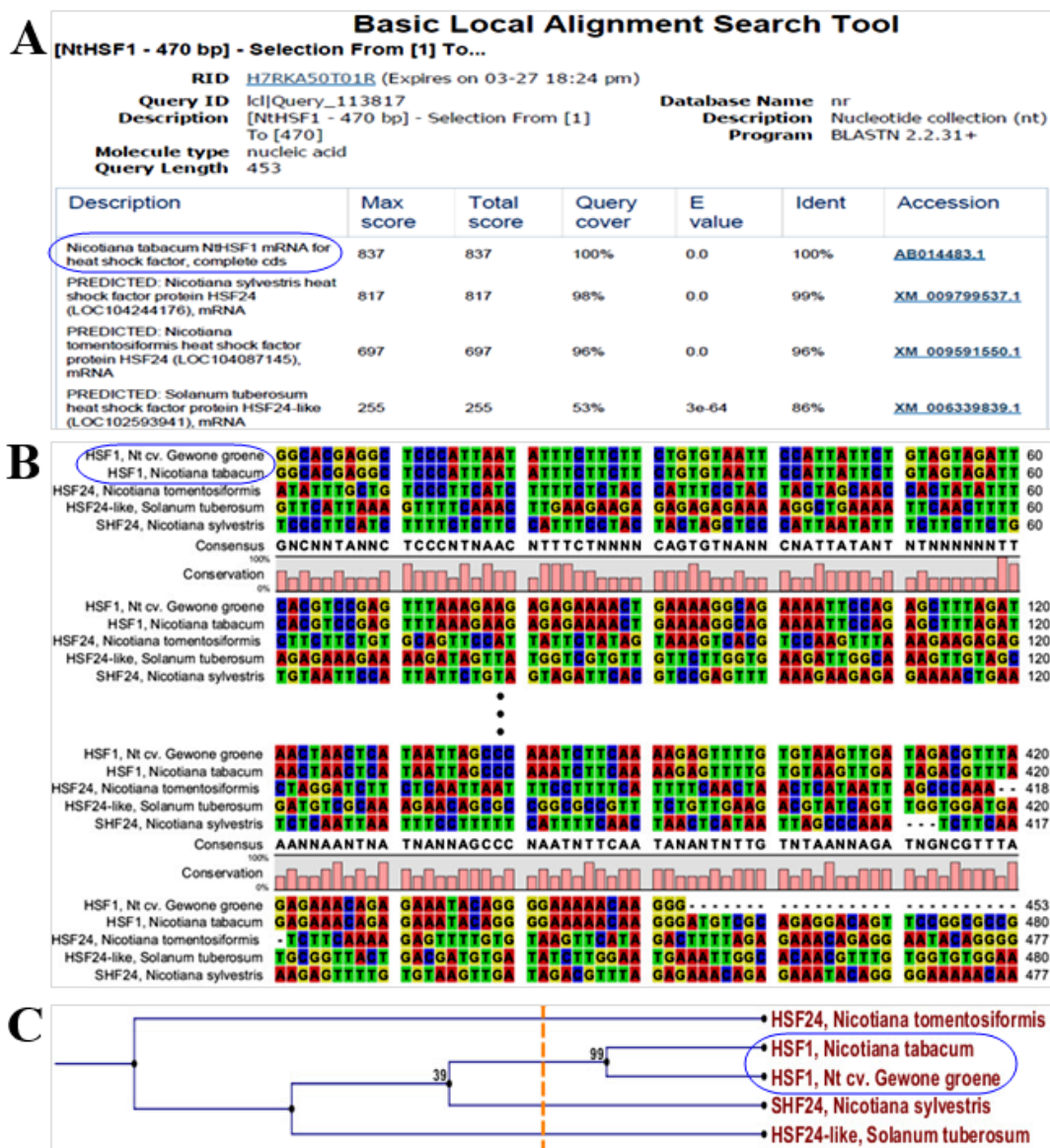
آنتی‌بادیهای (γ)-goat Anti-human IgG-Gamma و specific AP-conjugated antibody goat Anti-human و IgG-Kappa (κ)-chain specific AP-conjugated antibody (Sigma، آمریکا) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری میزان نسبی تجمع پروتئین نوترکیب، آنالیز غشای وسترن به وسیله نرم افزار ImageJ 1.47 انجام شد و شدت نوارها پس از نرمال سازی نسبت به نمونه استاندارد به داده‌های کمی چگالی نسبی (Relative density) تبدیل شدند و تجمع پروتئین نوترکیب به صورت درصدی از پروتئین محلول کل (Total soluble protein, TSP) بیان شد.

نتایج

آنالیز بیوانفورماتیکی توالی 5' UTR NtHSF1: نتایج هم‌ردیفی توالی 5' UTR NtHSF1 با استفاده از الگوریتم BLASTn نشان داد که توالی جداسازی شده از توتون رقم Gewone groene با توالی HSF1 ثبت شده برای توتون زراعی در NCBI دارای انطباق ۱۰۰ درصد است (شکل ۱، A). همچنین این توالی با فاکتورهای HSF24 شناسایی شده در توتونهای *N. sylvestris* و *N. tomentosiformis* و همچنین توالی شبه HSF24 در سیب‌زمینی شباهت بسیار بالایی نشان داد. آنالیز هم‌ردیفی چندگانه این توالیها نیز مؤید این مطلب بود (شکل ۱، B) و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که نتایج حاصل از BLAST و نتایج هم‌ردیفی چندگانه بر هم منطبق هستند و نزدیک‌ترین توالی به توالی جداسازی شده در این مطالعه HSF1 توتون معمولی است (شکل ۱، C)، لذا درستی توالی 5' UTR NtHSF1-IRES تأیید شد.

تأیید دستواره نوترکیب توسط آنالیز PCR و برش آنزیمی: حضور تراژنها توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تأیید شد (شکل ۲، A). آنالیز Duplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تراژنها تکثیر همزمان قطعه ۷۱۸ bp برای ژن HC و ۶۱۵ bp برای ژن LC را نشان داد که برابر با اندازه مورد انتظار

شد (شکل ۳).



شکل ۱- آنالیز بیوانفورماتیک توالی 5' UTR NtHSF1 جداسازی شده از توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم Gewone groene. A: هم‌ردیفی توالی

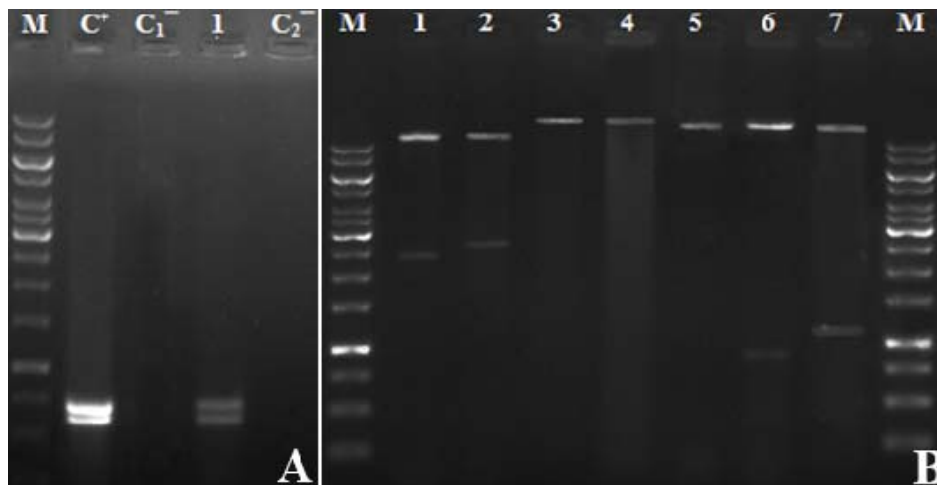
به دست آمده با استفاده از الگوریتم BLASTn در NCBI. B و C: به ترتیب هم‌ردیفی چندگانه توالیها با استفاده از نرم افزار CLC Sequence

Viewer و درخت فیلوژنی بر اساس الگوریتم UPGMA حاصل از داده‌های هم‌ردیفی چندگانه.

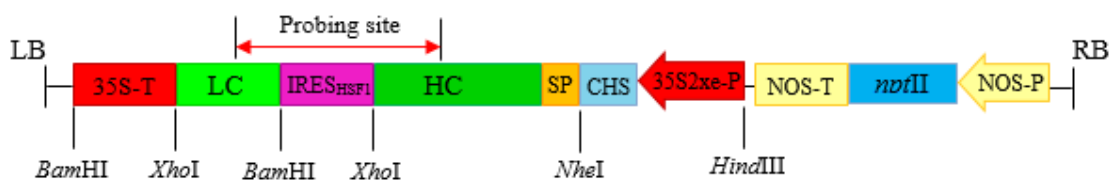
در نمونه‌های بدون DNA (آب) نیز به عنوان شاهد منفی دوم هیچ‌گونه سیگنالی مشاهده نشد، که بیانگر عدم آلودگی سیستم هیبریداسیون بود. در نمونه‌های DNA مربوط به برگهای اینفیلتر شده با آگروباکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF} مشابه با نمونه DNA این پلاسمید (به عنوان شاهد مثبت) سیگنال شاهد

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای: بر اساس نتایج حاصل از این آنالیز (شکل ۴)، در نمونه DNA برگ اینفیلتر شده با بافر اینفیلتراسیون، به عنوان شاهد منفی اول، سیگنالی مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود توالی هومولوگ با کاوشگر اختصاصی تراژنها (LC و HC) در ژنوم این گیاهان است.

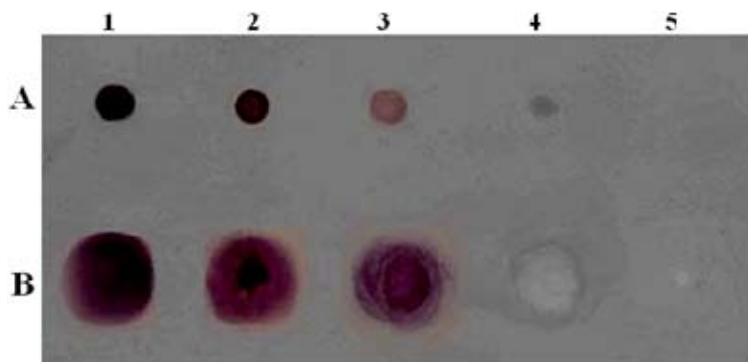
شد. نتایج این آنالیز نشان دهنده درج حداقل یک نسخه از تراژنها در ژنوم سلولهای برگ‌ی اینفیلتر شده بود.



شکل ۲- تأیید ساختار مولکولی دستواره نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1} حاوی ژنهای رمزکننده زنجیره‌های L و H آنتی‌بادی trastuzumab و 5' UTR NtHSF1-IRES (A) آنالیز Duplex PCR برای دستواره نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1}. نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (B) آنالیز برش آنزیمی برای دستواره نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1} با استفاده از آنزیمهای *Bam*HI، *Hind*III، *Xho*I، یا *Hind*III.



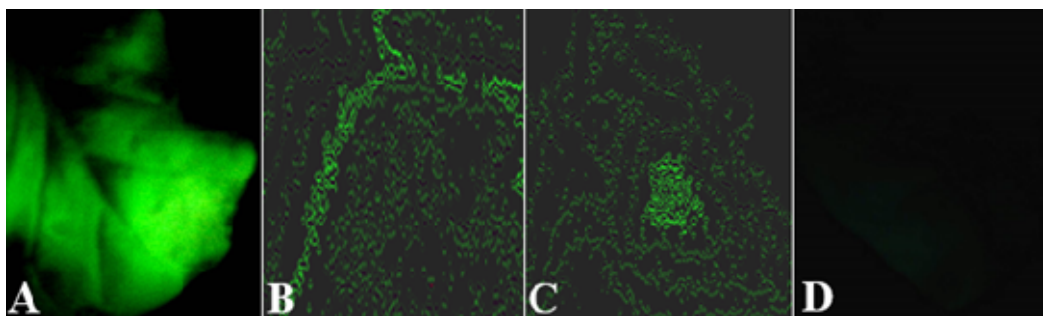
شکل ۳- نقشه فیزیکی بخش T-DNA پلاسمید نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1}. RB: توالی مرزی راست، LB: توالی مرزی چپ، Nos-P: راه‌انداز ژن *nptII*، ژن Nos-T: neomycin phosphotransferase، توالی پایانی ژن *nos*، *35S2xe*: راه‌انداز ویروس موزائیک کلم تقویت شده، CHS: ناحیه غیرترجمه شونده 5' (5'-UTR) ژن چالکون سینتاز، SP: توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی ژن کینیتاز بازی آراییدوپیس، HC: ژن رمز کننده زنجیره H، IRES: 5' UTR NtHSF1-IRES، LC: ژن رمز کننده زنجیره L، 35S: توالی پایانی.



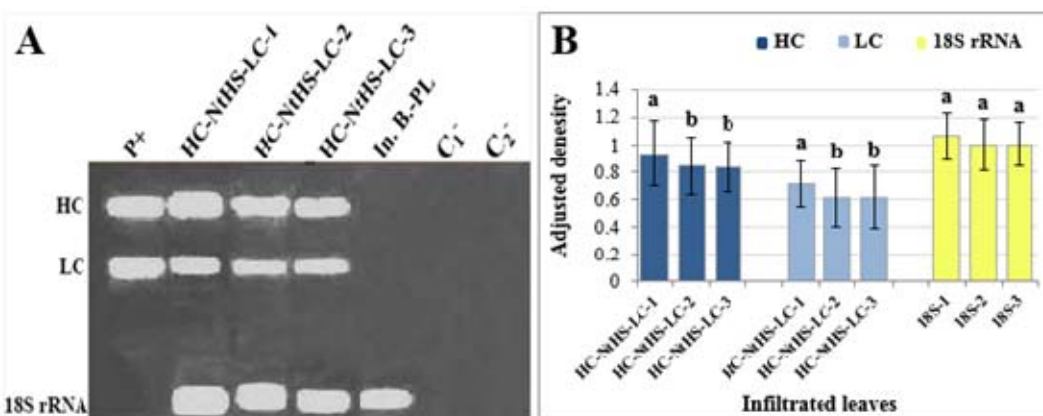
شکل ۴- آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای با کاوشگر نشاندار شده با DIG اختصاصی ژنهای HC و LC رمز کننده آنتی‌بادی trastuzumab. A1 تا A4: به ترتیب غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ پیکوگرم از پلاسمید نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1} به عنوان شاهد مثبت، A5: ddH₂O. B1 و B2: نمونه‌های برگ‌ی اینفیلتر شده با آگروباکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1}. B3: نمونه برگ‌ی اینفیلتر شده با دو تیپ سلول آگروباکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pBIN19-TrasHLC-IRES_{HSF1} و pCambia1302. B4: نمونه برگ‌ی اینفیلتر شده با بافر اینفیلتراسیون، B5: ddH₂O.

ترتیب برای ژنهای HC و LC و هم اندازه با نوارهای تکثیر شده در واکنش حاوی پلاسمید نو ترکیب pBIN19-*TrasHLC-IRES_{HSF}* به عنوان شاهد مثبت تکثیر شد که حاکی از حضور رونوشت ژنهای هدف در RNA تام بود. برای نمونه بافت برگ گیاه مادری بدون اینفیلتراسیون (شاهد منفی اول) فقط نوار مربوط به رونوشت ژن 18S rRNA مشاهده شد که نشان دهنده عدم وجود رونوشت ژنهای هدف در گیاه غیر تراریخته، و به عبارت دیگر عدم وجود ژنهای HC و LC در ژنوم گیاه مادری غیر تراریخته است.

بیان تراژنها در بافت برگ: بیان موقت ژن *gfp* در برگهای توتون اینفیلتره شده با ترکیبی از پلاسمیدهای pBIN19-*TrasHLC-IRES_{HSF}* + pCambia1302 (شکل ۵) تأییدی بر کارآمدی روش آگرواینفیلتراسیون به کار رفته در این تحقیق بود. بیان ژنهای HC و LC توسط آنالیز RT-PCR نیمه کمی تأیید شد (شکل ۶). در این آنالیز از تکنولوژی Competimer™ 18S rRNA برای تکثیر رونوشت آن به عنوان کنترل داخلی و مقایسه میزان بیان تراژنها استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز (شکل ۶، A)، برای نمونه‌های بافت برگ حاصل از اینفیلتراسیون نوارهایی با اندازه‌های مورد انتظار (۷۱۸ bp و ۶۱۵ bp به



شکل ۵- بیان پروتئین GFP در برگهای توتون آگرواینفیلتره شده با ترکیبی از پلاسمیدهای pCambia1302 (حاوی ژن *mgfp*) + pBIN19-*TrasHLC-IRES_{HSF}*. A: تشعشع نور سبز در اثر تابش نور UV برگ آگرو اینفیلتر شده با ترکیبی از پلاسمیدها، C و B: تصویر میکروسکوپی از سلولهای برگ تراریخته با ژن *mgfp* دارای تشعشع نور سبز، D: عدم انعکاس نور سبز در برگ تلقیح شده با بافر اینفیلتراسیون بدون پلاسمید.

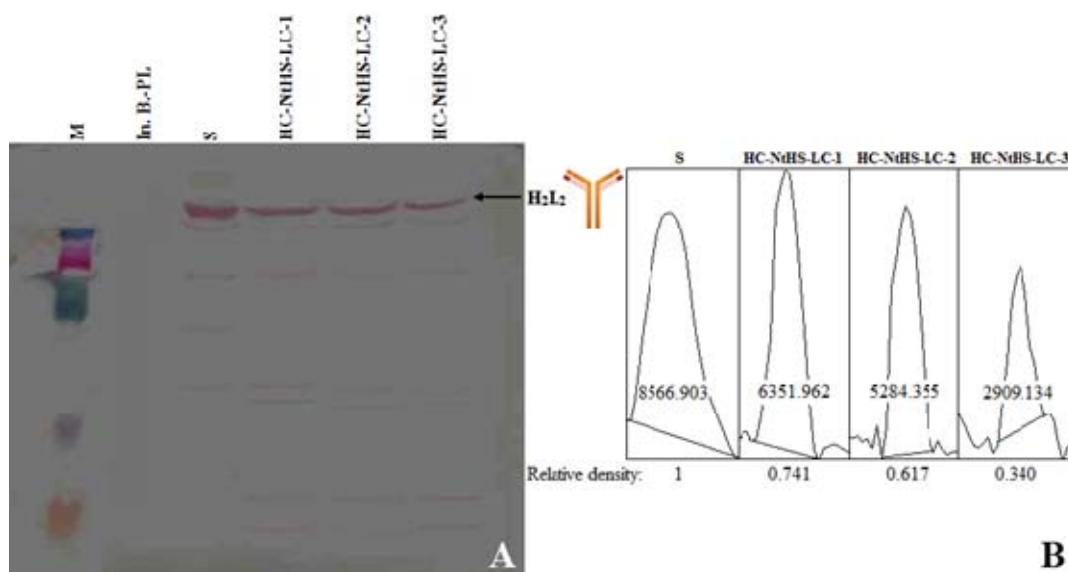


شکل ۶- A آنالیز Semi-quantitative RT-PCR برای ژنهای رمز کننده آنتی‌بادی trastuzumab در گیاهان توتون پس از آگرواینفیلتراسیون، (A) الکتروفورگرام بیان ژنهای LC و HC. P⁺: پلاسمید نو ترکیب pBIN19-*TrasHLC-IRES_{HSF}* (شاهد مثبت)، -1، -2، -3: HC-NtHS-LC-1، -2، -3: برگهای اینفیلتر شده با آگروباکتری حاوی پلاسمید pBIN19-*TrasHLC-IRES_{HSF}*، In. B.-PL: برگ اینفیلتر شده با بافر اینفیلتراسیون (شاهد منفی اول)، C₁، C₂، C₃: واکنش RT-PCR دارای RNA الگو به صورت بالک از برگهای اینفیلتر شده و تیمار شده با RNase (شاهد منفی دوم)، C₂⁻: واکنش RT-PCR بدون RNA الگو (شاهد منفی سوم). B) نمودار بیان کمی شده (نسبی) تراژنها بر اساس نرم افزار ImageJ 1.47. مقادیر دارای حروف غیر مشترک بر اساس آزمون LSD از نظر آماری معنی دار (P < ۰/۰۱) هستند.

آنتی‌بادی trastuzumab در بافت برگگی توتون ۷ روز پس از اینفیلتراسیون توسط آنالیز لکه‌گذاری تحت شرایط SDS-PAGE احیاء شده و غیر احیاء تشخیص داده شد. در شرایط غیر احیاء، حضور نوار پررنگ با اندازه بزرگ نشان دهنده الگوی تترامر (H_2L_2) آنتی‌بادی trastuzumab مطابق با نوار مشاهده شده در IgG1 انسانی (شاهد مثبت) می‌باشد که این فرم غالب‌ترین فرم آنتی‌بادی تجمع یافته بود (شکل ۷، A). باندهای دیگر مشاهده شده در آنالیز ایمونوبلات مربوط به فرمهای دیگر آن (هتروتریمر، دیمر و مونومر) است که در کمترین میزان تشکیل شده‌اند. با مقایسه شدت نوارها و آنالیز غشاء به وسیله نرم افزار ImageJ مشخص شد که میزان تجمع فرم تترامر آنتی‌بادی در نمونه‌های برگگی مختلف متفاوت و بیش از ۰/۴۴ درصد پروتئین محلول کل است (شکل ۷، B).

عدم مشاهده هیچ‌گونه نواری در واکنش RT-PCR دارای RNA الگو به صورت بالک از نمونه‌های برگگی اینفیلتر شده و تیمار شده با RNase (شاهد منفی دوم) بیانگر عدم آلودگی نمونه‌های مورد استفاده در آنالیز با DNA بود. همچنین در واکنش بدون RNA (شاهد منفی سوم) نواری مشاهده نشد که نشان دهنده عدم هر گونه آلودگی مخلوط مادر و آنالیز RT-PCR به RNA یا DNA غیر هدف بود. با توجه به استفاده از مقدار تقریباً یکسان RNA تام از گیاهان مورد بررسی و میزان بیان تقریباً ثابت از ژن 18S rRNA در آنالیز RT-PCR، به طور نسبی میزان بیان ژن هدف در این گیاهان کمی شد. بر این اساس، نمونه HC-1 NtHS-LC بیشترین میزان بیان ژنهای HC و LC را نشان داد (شکل ۶، B).

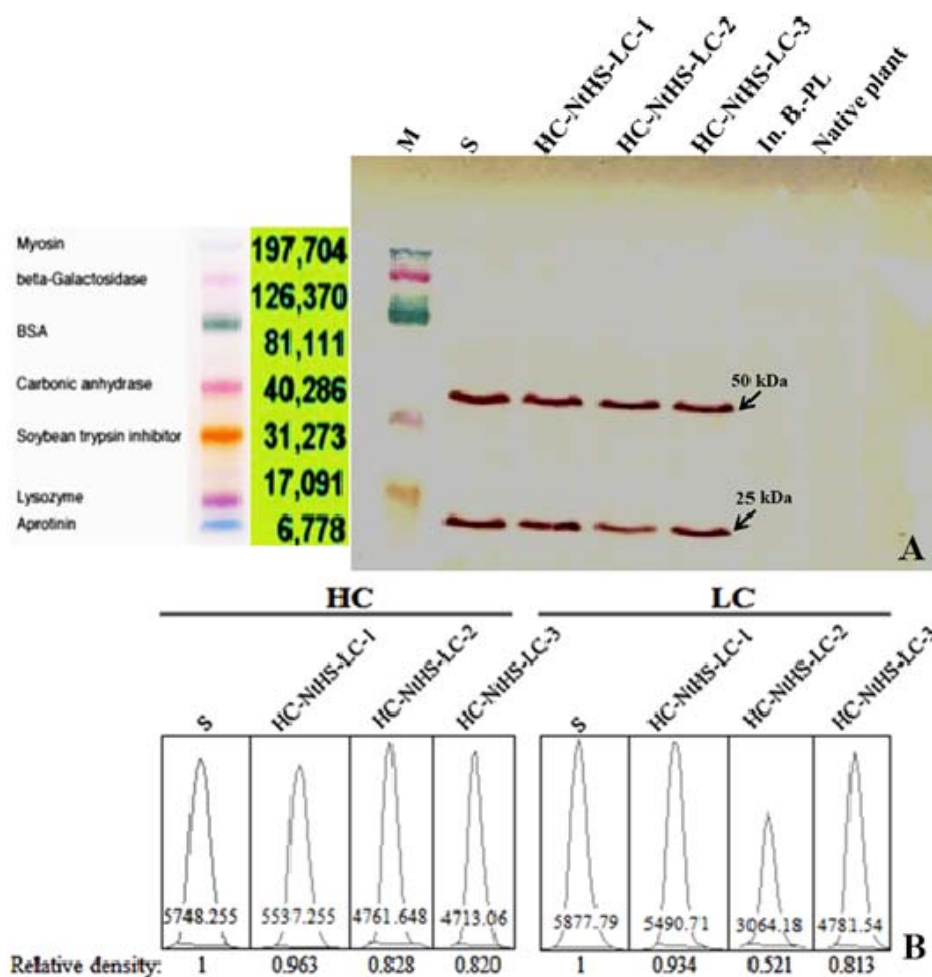
تجمع آنتی‌بادی trastuzumab به فرم تترامر: تجمع



شکل ۷- A) آنالیز لکه‌گذاری وسترن برای نمونه‌های برگگی توتون ۷ روز پس از اینفیلتراسیون با آگروباکتری حاوی پلاسمید pBIN19-TrasHLC- IRES_{HSF} تحت شرایط غیر احیاء. M: نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained standard (BioRad). In. B.-PL: برگ اینفیلتره شده با بافر اینفیلتراسیون (شاهد منفی)، S: IgG1 انسانی. HC-NtHS-LC-1, -2, -3: برگهای اینفیلتره شده با آگروباکتری حاوی دستواره پلاسمید نوترکیب، علامت پیکان فرم تترامر (H_2L_2) trastuzumab به عنوان فرم غالب تولید شده را نشان می‌دهد. B) پلات پروفیل نوارهای حاصل از الگوی تترامر trastuzumab. پیک حاصل از هر نوار توسط نرم افزار ImageJ کمی شد و به صورت چگالی نسبی (Relative density) بر اساس نمونه استاندارد بیان شد.

زنجیره‌های H و L در نمونه‌های مختلف تقریباً ۱ درصد پروتئین محلول کل است (شکل ۸، B). آنالیز لکه‌گذاری وسترن نشان داد که آنتی‌بادی trastuzumab به طور موفقیت‌آمیزی در بافت برگ گیاه توتون پس از آگرواینفیلتراسیون با یک وکتور دو سیستمی مبتنی بر یک IRES گیاهی بیان می‌شود.

در آنالیز وسترن بلات تحت شرایط احیاء شده نوارهای مورد انتظار ۵۰ kDa و ۲۵ kDa به ترتیب مربوط به زنجیره H و زنجیره L مطابق با نوارهای حاصل از Herceptin (شاهد مثبت) مشاهده شد، در حالی‌که در بافت برگ گیاه مادری بدون اینفیلتراسیون (شاهد منفی) چنین نوارهایی تشخیص داده نشد (شکل ۸، A). همچنین مقایسه شدت نوارها در شرایط احیاء شده نشان داد که میزان بیان



شکل ۸- A) آنالیز لکه‌گذاری وسترن برای نمونه‌های برگ توتون ۷ روز پس از اینفیلتراسیون با آگروباکتری حاوی ژنهای رمزکننده زنجیره‌های L و H آنتی‌بادی trastuzumab تحت شرایط احیاء شده. M: نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained standard (BioRad)، S: نمونه استاندارد (Herceptin)، HC-NtHS-LC-1, -2, -3: برگهای اینفیلتر شده با آگروباکتری حاوی دستواره پلاسمید نوترکیب، In. B.-PL: برگ اینفیلتر شده با بافر اینفیلتراسیون (شاهد منفی اول)، Native plant: نمونه برگ گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی دوم). نوارهای ۵۰ kDa و ۲۵ kDa، به ترتیب زنجیره‌های L و H را نشان می‌دهند. B) پلات پروفیل نوارهای حاصل از الگوی تترامر trastuzumab. پیک حاصل از هر نوار توسط نرم افزار ImageJ کمی شد و به صورت چگالی نسبی (Relative density) بر اساس نمونه استاندارد بیان شد.

بحث

با استفاده از دستواره بیانی دو سیستم‌رونی حاوی توالی NtHS-IRES در سیستم بیان موقت معادل با ۰/۴۴ درصد پروتئین محلول کل به دست آمد که در مقایسه با سطح بیان trastuzumab (۰/۱ درصد پروتئین محلول کل) در تحقیق دیگر ما (۲۰) با استفاده از دستواره‌های بیانی مبتنی بر ناقل دوتایی بدون توالی IRES قابل توجه است. Dorokhov و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که mRNA ۴۵۳ نوکلئوتیدی 5' UTR فاکتور ۱ پروتئین شوک حرارتی *N. tabacum* (NtHSF-1) در دستواره دو سیستم‌رونی آزمایش شده برای بیان همزمان پروتئین‌های GFP و GUS در پروتوپلاست توتون به عنوان IRES عمل می‌کند (۱۶). نتایج مطالعه Dinkova و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان دهنده کارایی توالی 5' UTR پروتئین شوک حرارتی HSP101 ذرت، یک mRNA سلول گیاهی، با توجه به ترجمه مستقل از کلاهدک در طی تنش حرارتی به عنوان یک عنصر IRES بود (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر، Vanderhaeghen و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از بیان دو سیستم‌رونی ژنهای گزارشگر لوسیفراز (*luc*) و کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (*cat*) در یک سیستم *in vitro* عصاره جوانه گندم نشان دادند که 5' UTR پروتئین ریپوزومی S18 (RPS18) واسطه ترجمه مستقل از کلاهدک بوده و به صورت یک توالی IRES عمل می‌کند (۵۲). Mardanova و همکاران (۲۰۰۸) نیز با استفاده از دستواره دو سیستم‌رونی حاوی ژنهای گزارشگر در سلولهای *N. benthamiana* در شرایط *in vivo* و در سیستم ترجمه RRL (Rabbit Reticulocyte Lysate) در شرایط *in vitro* نشان دادند که توالی پیشرو mRNA ژن *adh1* حاوی توالی IRES است (۳۹).

ناقل‌های پلی‌سیستم‌رونی مبتنی بر IRES به طور گسترده‌ای برای بیان چندین ژن به طور همزمان در سلولهای پستانداری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲۲، ۲۷، ۳۲ و ۳۳). حجازی و همکاران (۱۳۸۲) از وکتور آدنوویروس نوترکیب IL-2/IRES/B7.1 برای بیان همزمان IL-2 و B7.1 در سلولهای لوکمیک C1498 موش استفاده کردند

استراتژیهای مختلفی برای انتقال همزمان چندین ژن به گونه‌های گیاهی توسعه یافته است. با این حال، استفاده از روشهای سنتی برای انتقال چندین ژن به طور همزمان دارای معایب متعددی می‌باشد از جمله می‌توان به الگوی نامطلوب درج T-DNA، صرف زمان بیشتر مورد نیاز برای ترانسفورماسیون مجدد و یا تلاقی بین گیاهان تراریخته (۱۳ و ۱۴) اشاره نمود و مهم‌تر اینکه تراژنهایی از منابع مختلف به طور معمول در مکانهای متفاوتی از ژنوم گیاه درج می‌شوند که ممکن است منجر به الگوهای بیان متفاوت و تفکیک تراژن‌ها در نسل بعدی شود (۳۰). با استفاده از توالیهای لینکر می‌توان برای بیان همزمان ژن‌ها استفاده کرد (۷)، با این حال پلی‌پپتیدهای حاصل به صورت پیوسته باقی خواهند ماند و برای گردایش آنها به صورت پروتئینهای مرکب مانند آنتی‌بادیها مناسب نخواهد بود. یکی از روشهای مهم بیان همزمان بیش از یک ژن، استفاده از توالیهای IRES است. از مزایای اصلی استفاده از توالیهای IRES برای بیان همزمان چندین ژن، تولید پروتئینهای متعدد با نسبت مولی کنترل شده و انتقال تنها یک کاست بیانی به سلولهای گیاهی می‌باشد (۱۲). از آنجایی که با استفاده از ناقل‌های دو سیستم‌رونی در نهایت یک مولکول DNA در ژنوم گیاه درج خواهد شد، تمام ژنهای همسانه شده در آن با هم قابل توارث به نتاج خواهند بود. با توجه به اهمیتی که بیان همزمان دو زنجیره پلی‌پپتیدی L و H برای تاخوردگی صحیح و تجمع مولکول آنتی‌بادی دارد، در این مطالعه امکان بیان همزمان ژنهای HC و LC به صورت یک کاست بیان کننده دو سیستم‌رونی با استفاده از توالی IRES فاکتور شوک حرارتی ۱ توتون (NtHSF1-IRES) بررسی شد. آنالیز ایمونوبلات عصاره خام بیان همزمان زنجیره‌های L و H و تجمع آنتی‌بادی به شکل تترامر (H₂L₂) در بافتهای برگ اینفیلتر شده را نشان داد. در این تحقیق عملکرد بیان trastuzumab

صحیح می‌شوند. شجاعی و همکاران (۲۰۱۳) بیان همزمان زنجیره‌های L و H آنتی‌بادی trastuzumab را با استفاده از ناقل لنتی‌ویروسی با توالی IRES از ژنوم ویروس پولیو (Polio-IRES) در سیستم بیان پستانداری گزارش نمودند (۴). با این حال، گزارشی در مورد بیان دو سیستمی پروتئین‌های نوترکیب چند زنجیره‌ای با استفاده از توالی‌های IRES در سیستم‌های گیاهی وجود ندارد. بیان کارآمد آنتی‌بادی trastuzumab در این تحقیق نشان دهنده توانایی بالای توالی NtHSF1-IRES 5' UTR برای بیان همزمان ژن‌های هترولوگ در سیستم‌های گیاهی است. از حامل دو سیستمی تهیه شده در این تحقیق می‌توان در تولید پایدار این آنتی‌بادی با ارزش در یک میزبان گیاهی مناسب مانند توتون استفاده نمود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان پلی‌سیستمی به واسطه توالی‌های IRES می‌تواند به عنوان یک راهکار نوین در کشاورزی مولکولی برای تولید پروتئین‌های چند زنجیره‌ای مانند آنتی‌بادی‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه ارومیه صمیمانه سپاسگزار می‌شود. از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی لازم جهت انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از جناب آقای مهندس محمدرضا صلواتی (مرکز تحقیقات توتون تیرتاش، مازندران) به خاطر فراهم آوردن بذر مورد نیاز تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

(۳). نتایج این مطالعه نشان داد که وکتور آدنوویروس نوترکیب توانایی القای بیان همزمان IL-2 و B7.1 در سلول‌های آلوده شده را دارد. Li و همکاران (۲۰۰۷b) در مطالعه خود کاستهای بیانی مختلفی را برای بیان مونو و دو سیستمی آنتی‌بادی نوترکیب در سیستم پستانداری طراحی کردند (۳۴). نتایج مطالعه آنها نشان داد که سطح بیان آنتی‌بادی با استفاده از دستواره بیانی دو سیستمی به واسطه EMCV-IRES در مقایسه با بیان مونوسیستمی مشابه است و این آنتی‌بادی پایداری طولانی مدت در لاین‌های سلولی CHO نشان می‌دهد. Ho و همکاران (۲۰۱۲) از ناقل‌های تری‌سیستمی حاوی ژن‌های رمزکننده زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی و ژن نشانگر انتخابی نئومایسین فسفوترانسفراز II (*nptII*) جدا شده با توالی EMCV-IRES در یک رونوشت و همچنین ناقل‌های مونوسیستمی حاوی یک راه‌انداز برای هر یک از این ژنها برای بیان آنتی‌بادی مونوکلونال در لاین‌های سلولی CHO استفاده کردند (۲۴). نتایج مطالعه آنها نشان داد که استفاده از ناقل‌های تری‌سیستمی منجر به کاهش تعداد کلون‌های غیر بیان‌کننده، افزایش بازده و کنترل نسبت بیان ژن‌های HC و LC می‌شود. Ho و همکاران (۲۰۱۳) ناقل‌های تری‌سیستمی حاوی ژن‌های رمزکننده زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال و ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) را برای مقایسه اثر توالی‌های IRES و furin-2A (F2A) بر سطح بیان و کیفیت آنتی‌بادی مونوکلونال در سلول‌های CHO DG44 طراحی کردند (۲۵). نتایج مطالعه آنها نشان داد که ناقل‌های تری‌سیستمی حاوی توالی IRES منجر به تجمع آنتی‌بادی با اندازه

منابع

- جعفری، م.، نوروزی، پ.، ۱۳۹۱، گیاهان به عنوان بیوراکتورهای سبز برای تولید آنتی‌ژن‌های واکسن. مجله ایمنی زیستی، دوره چهارم، شماره سوم، ۶۷-۹۰.
- جلالی جواران، م.، محب‌الدینی، م.، معصومی اصل، ا. و همکاران، ۱۳۸۸، موفقیت‌های کشاورزی مولکولی
- حجازی، م. س.، فرزانه، ف.، ۱۳۸۲، بیان همزمان اینترلوکین-۲ و B7.1 توسط وکتور آدنوویروس نوترکیب با استفاده از یک کاست بیان‌کننده محتوی جایگاه میانی ورود ریپوزوم (IRES).

۴. فصلنامه علوم دارویی، سال نهم، شماره اول، ۸۹-۹۷.
۴. شجاعی، س.، گردانه، م.، ۱۳۹۱، بیان آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین در سلولهای یوکاریوتی و آنالیز کاهش بیان HER2 در رده‌های سلولی سرطان پستان. فصلنامه بیماری‌های پستان ایران، سال پنجم، شماره اول، ۲۹-۴۴.
۵. محمدزاده، ر.، مطلبی، م.، زمانی، م.، ۱۳۹۴، طراحی و ساخت سازه بیانی گیاهی جهت تولید پروتئین کایمری حاوی PGIP1
7. Allera-Moreau C, Chomarar P, Audinot V, Cogé F, Gillard M, Martineau Y, Boutin JA, Prats AC (2006) The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie* 88:737-746.
8. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, Ch. 2.4.
9. Bouabe H, Fassler R, Heesemann J (2008) Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system. *Nucleic Acids Res* 36:28.
10. Bradford MM (1976) "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
11. Carrington JC, Freed DD (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* 64:1590-1597.
12. Dafny-Yelin M, Tzfira T (2007) Delivery of Multiple Transgenes to Plant Cells. *Plant Physiology*, 145: 1118-1128.
13. De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1999) The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* 20: 295-304.
14. De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1997) T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J* 11: 15-29.
15. Dinkova TD, Zepeda H, Martinez-Salas E, Martinez LM, Nieto-Sotelo J, de Jimenez ES (2005) Cap-independent translation of maize Hsp101. *Plant J* 41: 722-731.
16. Dorokhov YL, Skulachev MV, Ivanov PA, Zvereva SD, Tjulkin LG, Merits A, Gleba YY, Hohn T, Atabekov JG (2002) Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *PNAS*, 99(8): 5301-5306.
17. Ecker DM, Jones SD, Levine HL (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* 7(1): 9-14.
18. Ehsasatvatan (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with the light and heavy-chain genes encoding Trastuzumab antibody. Dissertation, University of Urmia, Iran.
19. Fallot S, Ben Naya R, Hieblot C, Mondon P, Lacazette E, Bouayadi K, Kharrat A, Touriol C, Prats H (2009) Alternative-splicing-based bicistronic vectors for ratio-controlled protein expression and application to recombinant antibody production. *Nucleic Acids Research* 37(20): 1-10.
20. Goderis IJWM, De Bolle MFC, Francois IEJA, Wouters PFJ, Broekaert WF, Cammue BPA (2002) A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Molecular Biology* 50: 17-27.
21. Goel S, Chirgwin J, Francis P, Stuart-Harris R, Dewar J, Mileshekin L, Snyder R, Michael M, Koczwara B (2011) Rational use of Trastuzumab in metastatic and locally advanced breast cancer: Implications of recent research. *The Breast* 20: 101-110.
22. Greber, D., Fussenegger, M., 2007. Multi-gene engineering: simultaneous expression and knockdown of six genes off a single platform. *Biotechnology and Bioengineering* 96: 821-834.
23. Hellen CUT, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes and Development* 15: 1593-1612.
24. Ho SCL, Bardor M, Feng H, Mariati, Tong YW,

- Song Z (2012) IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *Journal of Biotechnology* 157: 130-139.
25. Ho SCL, Bardor M, Li B, Lee JJ, Song Z, Tong YW, Goh LT, Yang Y (2013) Comparison of Internal Ribosome Entry Site (IRES) and Furin-2A (F2A) for Monoclonal Antibody Expression Level and Quality in CHO Cells. *Plos One* 8(5):1-12.
 26. Jafari M, Norouzi p, Malboobi MA, Ghareyazie B, Valizadeh M, Mohammadi SA, Mousavi M (2009) Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beetplants expressing synthetic *cryIAb* gene. *Euphytica* 165: 333-344.
 27. Jostock T, Vanhove M, Brepoels E, van Gool R, Daukandt M, Wehnert A, van Hegelsom R, Dransfield D, Sexton D, Devlin M, Ley A, Mullberg J (2004) Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-onphage display libraries. *Journal of Immunological Methods* 289: 65-80.
 28. Jung H, Kim JK, Ha SH (2011) Use of Animal Viral Internal Ribosome Entry Site Sequence Makes Multiple Truncated Transcripts without Mediating Polycistronic Expression in Rice. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54(5): 678-684.
 29. Koh DC, Wong SM, Liu DX 2003. Synergism of the 3'-untranslated region and an internal ribosome entry site differentially enhances the translation of a plant virus coat protein. *Journal of Biological Chemistry* 278: 20565-20573.
 30. Komar AA, Hatzoglou M (2011) Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10(2): 229-240.
 31. Komori T, Imayama T, Kato N, Ishida Y, Ueki J, Komari T (2007) Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol* 145: 1155-1160
 32. Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q (2013) Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments* 77: 1-9.
 33. Li J, Menzel C, Meier D, Zhang C, Dubel S, Jostock T (2007a) A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *Journal of Immunological Methods* 318: 113-124.
 34. Li J, Zhang C, Jostock T, Dubel S (2007b) Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. *Protein Engineering, Design & Selection* 20(10): 491-496.
 35. Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, Chiang VL (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 4939-4944.
 36. Lin YJ, Huang LH, Huang CT (2013) Enhancement of Heterologous Gene Expression in *Flammulina velutipes* Using Polycistronic Vectors Containing a Viral 2A Cleavage Sequence. *Plos One* 8(3):1-7.
 37. Lucker J, Schwab W, van Hautum B, Blaas J, van der Plas LH, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA (2004) Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiology* 134: 510-519.
 38. Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716-719.
 39. Mardanova ES, Zamchuk LA, Skulachev MV, Ravin NV (2008) The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene* 420: 11-16.
 40. Mayani M, McLean MD, Hall JC, Filipe CDM, Ghosh R (2011) Recovery and isolation of recombinant human monoclonal antibody from transgenic tobacco plants. *Biochemical Engineering Journal* 54: 103-108.
 41. Mountford PS, Smith AG (1995) Internal Ribosome Entry Sites And Dicistronic Rnas In Mammalian Transgenesis. *Trends In Genetics* 11: 179-184.
 42. Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.
 43. Sambrook J, Russell, DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 44. Sasaki Y, Sone T, Yahata K, Kishine H, Hotta J, Chesnut J.D, Honda T, Imamoto F (2008) Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: Eukaryotic clones containing two and three

- ORF multi-gene cassettes expressed from a single promoter. *Journal of Biotechnology* 136: 103-112.
45. Seitz C, Vitten M, Steinbach P, Hartl S, Hirsche J, Rathje W, Treutter D, Forkmann G (2007) Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. *Phytochemistry* 68: 824-833.
 46. Shusta EV, Raines RT, Plunkthun A, Wittrup KD (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nature Biotechnology* 16: 773-777.
 47. Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2003) Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 14672-14677.
 48. Skulachev, MV, Ivanov PA, Parpova OV, Korpela T, Rodionova N P, Dorokhov YL, Atabekov JG (1999) Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA 1(2). *Virology* 263: 139-154.
 49. Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, Hao M, Reiser SE, Taylor NB, Tran M, Valentin HE, Rodriguez DJ, Stone DA (1999) Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nature Biotechnology* 17: 1011-1016.
 50. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.
 51. Toth RL., Chapman S, Carr F, Cruz SS, A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS Letters* 489: 215-219.
 52. Vanderhaeghen R, De Clercq R, Karimi M, Van Montagu M, Hilson P, Van Lijsebettens M (2006) Leader sequence of a plant ribosomal protein gene with complementarity to the 18S rRNA triggers in vitro cap-independent translation. *FEBS Lett*, 580 (11): 2630-2636.
 53. Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology* 21: 1493-1497.

Bicistronic expression of the genes encoding the trastuzumab monoclonal antibody in tobacco using an internal ribosome entry site sequence

Jafari M.^{1,2} and Ehsasatvatan M.¹

¹ Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

² Agricultural Biotechnology Dept., Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Monoclonal antibodies are heterotetramers consisting of four peptide chains—two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains and simultaneous equimolar expression of the corresponding genes is required to stable produce and assembly into a functional antibody. In order to co-express of multiple genes, different systems have been developed such as internal ribosome entry site (IRES) based vectors. IRES sequences are genetic elements that can drive cap-independent translation initiation of cistrons located downstream of the element. In this study, we constructed a bicistronic vector for co-expression of genes encoding the H and L chains of the anti-breast cancer antibody trastuzumab (Herceptin®) using an IRES sequence derived from the *Nicotiana tabacum* heat-shock factor 1 (NtHSF1). The effectiveness of construction was evaluated in *N. tabacum* using agroinfiltration method. Bicistronic expression of transgenes at the RNA transcription level was detected by semi-quantitative RT-PCR analysis. Western blot analyses revealed the efficient accumulation of tetrameric form of trastuzumab in tobacco leaf tissues and antibody content were ca. 0.44% of total soluble protein within 7 days after infiltration. The results of this study demonstrate the efficacy of a plant derived IRES element for bicistronic expression of heteromultimeric proteins.

Key words: monoclonal antibody trastuzumab, bicistronic expression, tobacco heat-shock factor-1, internal ribosomal entry site (IRES)