SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤
مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

توليد آنتي بادي نوتركيب در گياهان

۱- حميد رجبي معماري[۱] ۲- مختار جلالي جواران[۱*] ۳- محمد جواد رسايي[۲] ۴-مهدي فروزنده مقدم[۲] ۵-فاطمه رهبري زاده[۲]**
۱- گروه اصلاح نباتات دانشكده كشاورزي دانشگاه تربيت مدرس
۲- گروه بيوتكنولوژي دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس

خلاصه

در دسترس بودن پروتئينهاي انساني نوتركيب باعث تحولي در استفاده از پروتئين هاي ارزشمند از نظر دارويي در پزشكي باليني شده است. فروش جهاني پروتئين هاي داروئي نوتركيب در سال ۲۰۰۵در حدود ۱۶ ميليارد دلار تخمين زده مي شود. گياهان يك جايگزين مناسب براي بيان پروتئينهاي دارويي زيستي بجاي حيوانات يا سيستم هاي ميكروبي مي باشند. چون اولاً نسبت به ساير سيستم هاي توليد از نظر اقتصادي بسيار به صر فه تر مي باشد و ثانياً پاتوژنهاي انساني در سيستم هاي گياهي وجود ندارد.از طرف ديگر امكان توليد حجم انبوهي از پروتئين هاي نوتركيب در گياهان وجود دارد. از آنجايي كه پروتئين هاي بيگانه اي كه در گياهان بيان مي شوند ساختار اصلي خود را حفظ مي كنند مي توان از گياهان تراريخت براي توليد پروتئين ها و پپتيدهايي با ارزش دارويي استفاده كرد كه از آن جمله مي توان به آنتي باديها، واكسن ها و هورمونهاي پستانداران اشاره كرد. براي اولين بار جداسازي وتوليد آنتي بادي هاي تک دومني نوتركيب جديد عليه MUC1 از منشا شتر تک كوهانه در گروه بيوتكنولوژي پزشكي دانشگاه تربيت مدرس توسط رهبري زاده و همكاران انجام گرفته و ژن مورد نظردر ناقل فاژميدي pCANTAB كلون شده بود. در اين پژوهش آغازگر مناسب ژن آنتي بادي شتري با توجه به توالي هاي افزايش دهنده بياني در سيستم هاي گياهي طراحي گرديد و ژن مورد نظردر ناقل بياني pBI121 كلون گرديد. ناقل بياني حاوي ژن مورد نظر در باكتري *E.coli* تكثير و سپس به باكتري *Agrobacterium tumefaciens* نژاد *LBA4404* منتقل گرديد. انتقال ژن مورد نظر به سلول گياه توتون (*Nicotiana tabacum L. 'Xanthi'*) از طريق آگروباكتريوم (*Agrobacterium tumefaciens*)انجام شد. جهت انتخاب سلول هاي تراريخت از محيط كشت حاوي كانامايسين با غلظت ۲۵ و ۵۰ ميلي گرم در ليتر استفاده و گياهان توتون مقاوم انتخاب شدند. بررسي مولكولي گياهان مقاوم با استفاده از PCR وجود ژن آنتي بادي تک دومني رادر گياهان موردنظر تاييد كرد.

كلمات كليدي: آنتي بادي تک دومني نوتركيب MUC1، توتون، آگروباكتريوم، انتقال ژن، گياه تراريخت

Production of Recombinant Antibody in Plants

1.Rajabi Memari, H[1]., 2.Jalali Javaran, M[*1]., 3.Rasaee, M.J[2]., 4.Forouzande Moghaddam, M[2], 4.Rahbarizadeh, F[2].

1- Department of Plant Breeding, School of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Department of Medical Biotechnology, School of Medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

The availability of recombinant human proteins causes a development in using valuable proteins in clinical medicine. Plants are a good substitute for the expression of biopharmaceutical products instead of microbial system or animals. They are more economical than other systems , in the other hand there aren't any human pathogens in plant systems. Since heterologous proteins that were expressed in plants, conserve their original structure, we can use plant for production of valuable pharmaceutical proteins and peptides such as antibodies, vaccines and mamalian hormones. Isolation and production of recombinant single domain antibody(VHH) against MUC1 in one-humped camels (Camelus dromedarius and Camelus bactrianus) were conducted by Rahbarizadeh and collegues in Tarbiat Modares University(Department of Medical Biotechnology).They cloned this gene in a phagmid vector, pCANTAB.In this study adequate primers were designed in regard to express increasing the sequence expression of plants . Then VHH was cloned in an expression plant vector, pBI121. The plant expression vector, containing VHH, was amplified in E.coli and then transformed to *Agrobacterium tumefaciens*.The transformation of the gene to Tobacco plant cell(*Nicotiana tabacum L. 'Xanthi'*) was conducted by *Agrobacterium tumefaciens*(sp *LBA4404*).The screening of transgenic plants were conducted on tissue culure medium containing 25mg/lit km and 50 mg/lit km and resistant plants were selected. Molecular analysis were conducted and the plants with VHH gene were screened.

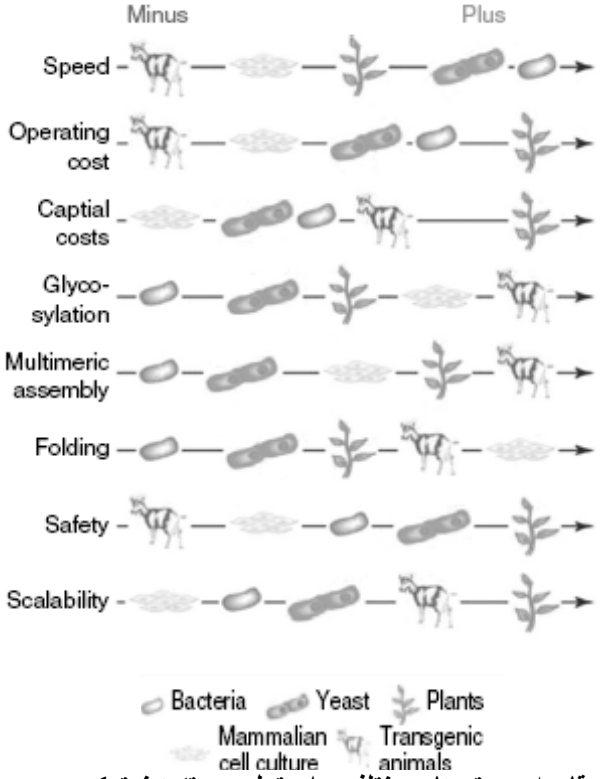
مقدمه:

در كنتاكي آمريكا گياهان توتون به كارخانه هاي توليد داروهاي ضد سرطان تبديل شده اند. در ويرجينيا ذرت براي معالجه بيماري **Cystic Fibrosis** برداشت مي شود و در نبراسكا محققين اميدوارند كه در مزارع محصولاتي جهت درمان بيماري ايدز توليد كنند. از مزارع جو در ايالت واشنگتن تا مزارع نيشكر در هاوايي، دانشمندان آمريكايي محصولات كشاورزي پيشرفته اي را توليد مي كنند كه محصولات ارزانتر و راههاي موثرتري را براي درمان بيماران با اين غذاها فراهم مي كنند. اين كار كه با استفاده از تكنيک هاي انتقال **DNA** انساني يا **DNA** هاي ساير موجودات بخشنده انجام مي شود. گياهان را به گونه اي تغيير مي دهند كه پروتئينهاي نوتركيب انساني را توليد كنند. اين كار به

مدت بيش از يک دهه است که انجام مي شود، اما محصولات ذکر شده به تازگي مراحل نهايي فرآوري خود را پشت سر گذاشته اند و وارد آزمايشات کلينيکي و فرايند تجاري شدن شده اند. بطوريکه تعدادي از بيماران در حال حاضر مقاديري از اين گياهان رابعنوان دارو استفاده مي کنند(**Anonymous,2003**). در دسترس بودن پروتئينهاي انساني نوترکيب باعث تحولي در استفاده از پروتئينهاي ارزشمند از نظر دارويي در پزشکي باليني شده است. امروزه آنتي بادي هاي نوترکيب حدود ۳۰% از توليد پروتئين هاي بيولوژيک را به خود اختصاص داده اند(**Joosten, 2003**). فروش جهاني پروتئين هاي داروئي نوترکيب در سال ۱۹۹۵ بالغ بر ۱۰ميليارد دلار بوده است که براي سال ۲۰۰۵ اين رقم ۱۶ ميليارد دلار تخمين زده مي شود. در حال حاضر حدود ۲۰پروتئين نوترکيب در بازار وجود دارد که۶۰% فروش آنها مربوط به شش پروتئين داروئي است. اين پروتئين هاي نوترکيب داروئي عبارتند از:اريتروپويتين، عامل محرک کلوني گرانولوسيت، واکسن هپاتيت **B**، هورمون رشد انساني، انسولين و آلفا اينترفرون. در حدود ۳۰۰ داروي نوترکيب براي درمان بيماري هاي مختلف بويژه سرطان، ايدز، ناراحتي هاي دستگاه عصبي در مراحل

Protein	Host plant system	Comments	References
Human biopharmaceuticals			
Growth hormone	Tobacco, sunflower	First human protein expressed in plants; initially expressed as fusion protein with *nos* gene in transgenic tobacco; later the first human protein expressed in chloroplasts, with expression levels ~7% of total leaf protein	6,14
Human serum albumin	Tobacco, potato	First full size native human protein expressed in plants; low expression levels in transgenics (0.1% of total soluble protein) but high levels (11% of total leaf protein) in transformed chloroplasts	15,98
α-interferon	Rice, turnip	First human pharmaceutical protein produced in rice	99
Erythropoietin	Tobacco	First human protein produced in tobacco suspension cells	100
Human-secreted alkaline phosphatase	Tobacco	Produced by secretion from roots and leaves	59,60
Aprotinin	Maize	Production of a human pharmaceutical protein in maize	101
Collagen	Tobacco	First production of human structural-protein polymer; correct modification achieved by co-transformation with modification enzyme	13,26
α1-antitrypsin	Rice	First use of rice suspension cells for molecular farming (see REF. 102 for discussion of antibody production in rice cell culture)	103
Recombinant antibodies			
IgG1 (phosphonate ester)	Tobacco	First antibody expressed in plants; full length serum IgG produced by crossing plants that expressed heavy and light chains	7
IgM (neuropeptide hapten)	Tobacco	First IgM expressed in plants and protein targeted to chloroplast for accumulation	104
SIgA/G (*Streptococcus mutans* adhesin)	Tobacco	First secretory antibody expressed in plants; achieved by sequential crossing of four lines carrying individual components; at present the most advanced plant-derived pharmaceutical protein	89,90, 105
scFv-bryodin 1 immunotoxin (CD 40)	Tobacco	First pharmaceutical scFv produced in plants; first antibody produced in cell-suspension culture	106
IgG (HSV)	Soybean	First pharmaceutical protein produced in soybean	72
LSC (HSV)	*Chlamydomonas reinhardtii*	First example of molecular farming in algae	107
Recombinant subunit vaccines			
Hepatitis B virus envelope protein	Tobacco	First vaccine candidate expressed in plants; third plant-derived vaccine to reach clinical trials stage	8,19,20
Rabies virus glycoprotein	Tomato	First example of an 'edible vaccine' expressed in edible plant tissue	77
Escherichia coli heat-labile enterotoxin	Tobacco, potato	First plant vaccine to reach clinical trials stage	21,108
Norwalk virus capsid protein	Potato	Second plant vaccine to reach clinical trials stage	22
Diabetes autoantigen	Tobacco, potato	First plant-derived vaccine for an autoimmune disease	109
Cholera toxin B subunit	Tobacco, potato	First vaccine candidate expressed in chloroplasts	65
Cholera toxin B and A2 subunits, rotavirus enterotoxin and enterotoxigenic *E. coli* fimbrial antigen fusions	Potato	First plant-derived multivalent recombinant antigen designed for protection against several enteric diseases	110
Porcine transmissible gastroenteritis virus glycoprotein S	Tobacco, maize	First example of oral feeding inducing protection in an animal	111

جدول ۱- پروتئين هاى دارويى مهم كه تاكنون در گياهان بيان شده اند



شکل۱- مقایسه سیستم های مختلف برای تولید پروتئین نوترکیب

مختلف آزمايش هاي باليني قرار دارند(**Giddings *et al.*, 2000**).از آنجايي كه پروتئين هاي بيگانه اي كه در گياهان بيان مي شوند ساختار اصلي خود را حفظ مي كنند مي توان از گياهان ترانس ژنيك براي توليد پروتئين ها و پپتيدهايي با ارزش دارويي استفاده كرد كه از آن جمله مي توان به آنتي باديها، واكسن ها و هورمونهاي پستانداران اشاره كرد(**Daniell, 2003b**) . بيوراكتورهاي گياهي مي‌توانند تا ۱۰ كيلوگرم آنتي‌بادي در هكتار توليد كنند. گياهان مورد استفاده در اين مورد عبارتند از توتون، ذرت، سويا و يونجه. در مقايسه با توليد در بيوراكتورهاي ديگر قيمت تمام شده توليد آنتي بادي در گياهان حدود يك دهم است. تفاوت گليكوزيلاسيون بيوراكتورهاي حيواني و گياهي تأثير چنداني در تمايل آنتي‌بادي به آنتي‌ژن ندارد(بي نام ۱۳۸۳). توتون يك محصول غيرغذايي و غيرعلوفه اي و يك انتخاب مناسب براي توليد پروتئينهاي دارويي است. اين بعلت انعطاف پذيري نسبي آن به دستورزي ژنتيكي است. توتون يك توليد كننده وزن تر عالي (٤۰ تن در اي‌كر) برگ تازه براساس چند بار برداشت است كه در يك فصل كاشت انجام مي گيرد. همچنين توتون بذر زيادي (ب‌يشتر از ۱ ميليون بذر در يك گياه) توليد مي كند. بنابراين در اسرع وقت مي توان آن را تكثير ومحصول آن را وارد بازار فروش نمود. توتون بطور گسترده اي بـه عنوان يك سيستم مدل گياهي براي تست مناسب بودن سيستم بيان گياهي براي توليد پروتئين هاي دارويي و يا ديگر ترانس ژن ها بكار مي رود(**Leite *et al.*, 2000**). تاكنون بيشتر ژن ها به كلروپلاست يا ژنوم هسته اي گياه توتون منتقل شده اند، تا به گياهان ديگر. در توتون هم ژنوم هسته اي و هم ژنوم كلروپلاستي براحتي ترانسفورم شده اند. توتون يك محصول خود گرده افشان است و خويشاوندان زراعي يا وحشي كمي دارد. بنابراين امكان فرار ژن در اين حالت بسيار اندك است. چندين مطالعه انجام شده است كه نشان مي دهد ترانس ژن ها وقتي به ژنوم كلروپلاستي در توتون منتقل مي شوند از طريق وراثت مادري توارث مي يابند. علاوه بر اين هر دو تكنيك نر عقيمي و عقيمي بذر قبلاً در توتون ايجاد شده اند. بنابراين تكنولوژي پيشرفته اي براي جلوگيري از انتقال و فرار ژن از طريق گرده يا بذر به ساير گياهان به آساني در دسترس است(**Daniell, 2003a**).

در سال ۱۹۹۳ هارمر كلاس جديدي از آنتي ژن ها را در خانواده **Camelidae** كشف كردكه ۵۰% از آنتي بادي هاي كاربردي شتر را تشكيل داده و فاقد زنجيره سبك است. در ساختمان اين مولكول تنها سه دومن وجود دارد. دو دومن ثابت در **C**-ترمينال، با دومن هاي ثابت انتهايي آنتي بادي انساني همولوگ بوده و واجد توالي هاي بزرگي كه مسؤول عملكرد ها ي مشابهند مي باشند. دومن متغير **N**-ترمينال تنها از ناحيه متغير زنجيره سنگين تشكيل يافته و براي تفكيك از **VH** معمول، **VHH** ناميده مي شود. ميزان **Affinity** اين آنتي بادي در حد نانومولار است كه باعث اتصال بسيار

اختصاصي به آنتي ژن مي شود(**Lauwereys *et al*., 1998**) . ظرف سال هاي اخير در دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس تلاش هاي موفقيت آميزي در جهت تهيه آنتي بادي هاي مونوكلونال عليه **MUC1** و ساير آنتي ژن ها صورت گرفته است. براي اولين بار توليد آنتي بادي هاي تک دومني نوتركيب جديد عليه **MUC1** از منشا شتر دوكوهانه در گروه بيوتكنولوژي دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس توسط رهبري زاده و همكاران انجام گرفت. اين كار بوسيله ايمني سازي وتوليد آنتي بادي پلي كلونال(**Rahbarizadeh *et al*., 2004b**) شترهاي دنياي قديم، كلون كردن دومن متغير تعدادي از آنتي بادي هاي زنجيره سنگين آنها، غني سازي ، انتخاب و شناسايي عوامل اتصالي به آنتي ژن با حداقل اندازه صورت گرفت. اين آنتي بادي هاي تک دومني داراي خواص حلاليت، اتصال اختصاصي به آنتي ژن و **Affinity** خوبي بودند. اين مورد اولين مثال از جداسازي دومن هاي **VHH** آنتي پيتيد شتري مي باشد (**Rahbarizadeh *et al*., 2004a**). همچنين توليد آنتي بادي مونوكلونال **PR81** كه عليه موسين**MUC1** است توسط پاک نژاد و همكاران انجام گرفته است(**Paknejad *et al*., 2003**) . با توجه به نتايج تحقيقات فوق الذكر و با توجه به نياز مراكز درماني و تشخيصي، در اين تحقيق از گياه توتون بعنوان يک منبع مناسب براي توليد آنتي بادي نوتركيب تک دومني عليه **MUC1** استفاده شده است.

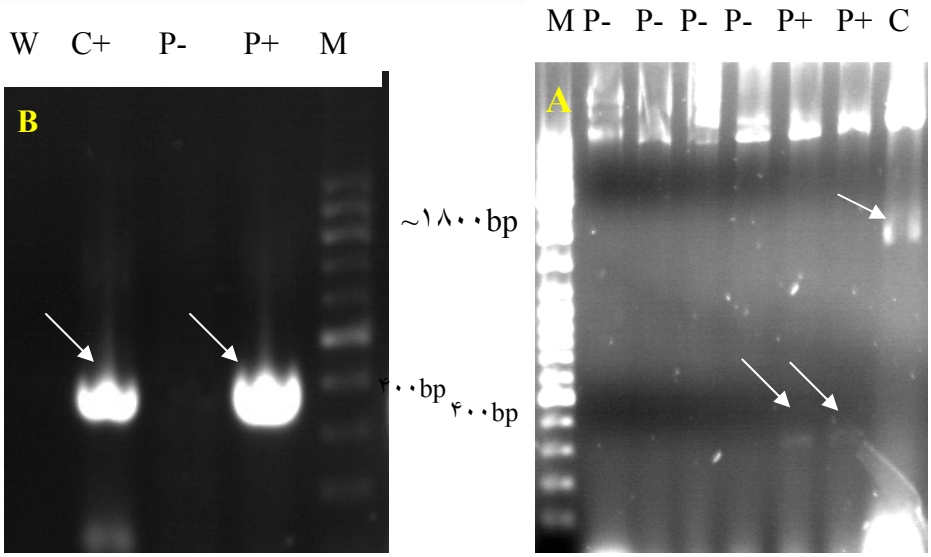
مواد و روش ها:

با توجه به اينكه فاژميد**pCANTAB** حاوي ژن آنتي بادي ***VHH*** بر عليه ***MUC1*** داراي جايگاهاي برشي***NotI*** و***SfiI*** بود، به منظور تغيير اين جايگاهها، آغازگر مناسب ژن آنتي بادي شتري با توجه به توالي هاي برشي ناقل **pBI121** ، - يعني ***BamHI*** و ***SacI*** - توالي هاي دو طرف ***VHH*** و توالي هاي افزايش دهنده بياني در سيستم هاي گياهي طراحي گرديد و ژن مورد نظردر ناقل بياني **pBI121** كلون گرديد. ناقل بياني حاوي ژن مورد نظر در باكتري ***E.coli*** تكثير و سپس به باكتري ***Agrobacterium tumefaciens*** نژاد ***LBA4404*** منتقل گرديد. انتقال ژن مورد نظر به سلول گياه توتون از طريق باكتري ***Agrobacterium tumefaciens*** انجام شد. جهت انتخاب سلول هاي تراريخت از محيط كشت انتخابي **MS** حاوي كانامايسين با غلظت ۲۵ و۵۰ ميلي گرم در ليتر و سفاتاكسيم با غلظت ۲۰۰ميلي گرم در ليتر استفاده و گياهان توتون مقاوم انتخاب شدند. بررسي مولكولي **DNA** ژنومي استخراج شده گياهان مقاوم با استفاده از **PCR** و بوسيله آغازگرهاي اختصاصي انجام گرفت.

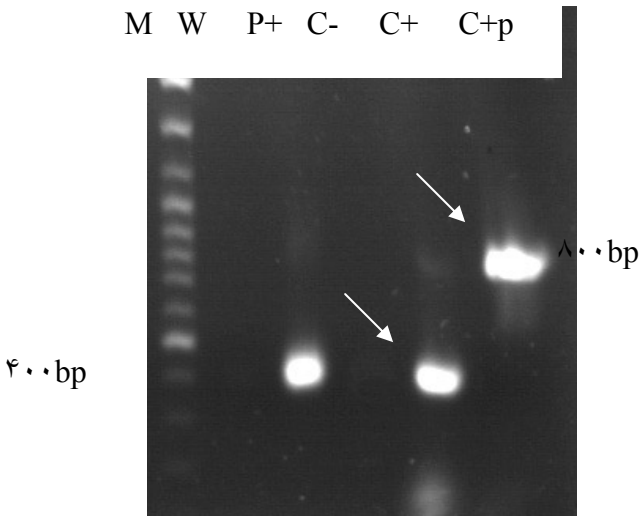
نتايج:

كلون كردن ژن آنتي بادي ***VHH*** بر عليه ***MUC1*** با موفقيت در ناقل بياني**pBI121** انجام شد. با انجام آزمايشات **Colony PCR** ، **PCR** پلاسميد تخليص شده، هضم پلاسميد تخليص شده و آزمايش تعيين توالي، كلون شدن قطعه مورد نظر در ناقل **pBI121** تاييد شد(شكل ۲). انتقال ناقل **pBI121** به باكتري ***Agrobacterium tumefaciens*** با استفاده از روش شيميايي انجام گرفت وباكتري هاي دريافت كننده ناقل بر روي محيط انتخابي**LB** حاوي استرپتومايسين و كانامايسين رشد كردندحضور قطعه حدود **۴۰۰bp** با استفاده ازروش **Colony PCR** تاييد شد(شكل۳). برگ هاي گياه توتون كه با باكتري ***Agrobacterium tumefaciens*** حاوي پلاسميد **pBI121** داراي ژن **VHH** ، تلقيح شده بودند بر روي محيط كشت انتخابي حاوي كانامايسين و سفاتاكسيم گياهچه هاي جديد را توليد كردند در حاليكه درگياهان تيپ وحشي (شاهد) هيچگونه توليد گياهچه اي مشاهده نشد(شكل۴). تعداد گياهاني كه بر روي محيط كشت حاوي **50mg/lit** كانامايسين رشد كردند بسيار كمتر از گياهاني بود كه روي **25mg/lit** رشد كردند.رشد گياهان و بافت هاي تراريخت بر روي محيط انتخابگر نشانه اي از بيان بيشتر اين ژن در گياهان باشد(شكل۵). آناليز **DNA** ژنومي استخراج شده از گياهچه هاي تراريخت توليد شده با استفاده از **PCR** و با آغازگر هاي اختصاصي انجام گرفت و يک باندحدود**bp** ۴۰۰مشاهده گرديد، در صورتيكه در گياهان تيپ وحشي هيچگونه باندي مشاهده نشد(شكل۷).

بر اساس بررسي صورت پذيرفته هر چند گزارشاتي مبني بر توليد آنتي بادي مونوكلونال در گياهان بصورت كامل يا اشكال **ScFv**، **Fab**، **Fv** در دنيا وجود دارد اما تاكنون هيچ گزارشي مبني بر توليد آنتي بادي نوتركيب تک دومني عليه **MUC1** از منشا شتري در گياهان در جهان وجود نداشت. همچنين گزارشي از توليد آنتي بادي نوتركيب تک دومني با منشا شتري(**VHH**)در گياهان در دنيا وجود ندارد و فقط گزارشي مبني بر توليد و تعيين خصوصيات آنتي بادي **VHH** بر عليه **MUC1** در باكتري و مخمر توسط رهبري زاده و همكاران (**Rahbarizadeh *et al*., 2004a**) وجود دارد. با توجه به مزيتهاي سيستم هاي گياهي نسبت به ساير سيستم ها ي توليد آنتي بادي نظير پروكاريوت ها، مخمرها، پستانداران و... استفاده از اين سيستم مورد توجه قرار گرفت. همچنين گياه توتون به عنوان يک گياه مناسب از نظر دستورزي ژنتيكي، توليد محصول زياد و دارا بودن شرايط مناسب از نظر ايمني زيستي مورد استفاده قرار گرفت. نظر به آمار قابل توجه بيماري هاي سرطاني بخصوص سرطان پستان در ايران ضرورت توليد آنتي بادي هاي نوتركيب خاص سرطان ها بخصوص **anti MUC1** از منابع دائمي و ارزان، اجتناب ناپذير مي باشد. اين اولين گزارش از انتقال ژن آنتي بادي تک دومني عليه **MUC1** در گياه مي باشد.

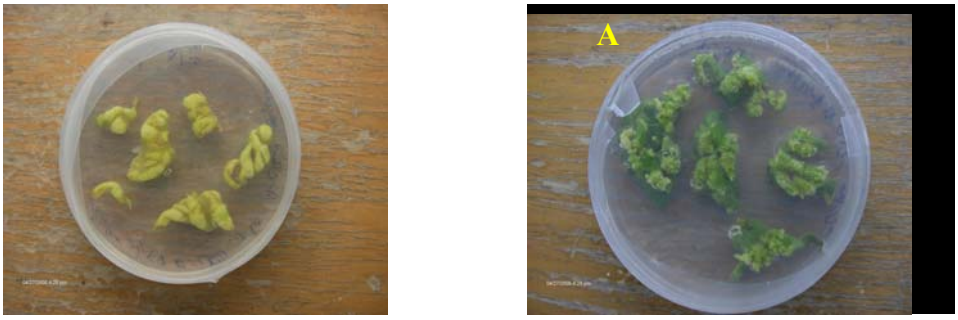


شکل۲- واکنش هضم پلاسمید **pBI121** بااستفاده ازآنزیم های ***BamH1*** و***SacI*** وجود یک قطعه حدود**۴۰۰bp** را نشان مي دهد **(A)**، **C** : پلاسمید **pBI121** بدون **VHH** (حاوي **GUS**)، **P+** : پلاسمید **pBI121** حاوي **VHH**)،**P-**: پلاسمید **pBI121** بدون **VHH** ، **M**: مارکر. تاییدحضور قطعه حدود **۴۰۰bp** (ژن**VHH**)در پلاسمید **pBI121** بااستفاده از **Colony PCR (B)**.**W**: آب، **C+**: کنترل مثبت(پلاسمید **pCANTAB** حاوي**VHH**)،**P-**: پلاسمید **pBI121** بدون **VHH** (حاوي **GUS**)، **P+** : پلاسمید **pBI121** حاوي **VHH**، **M**: مارکر

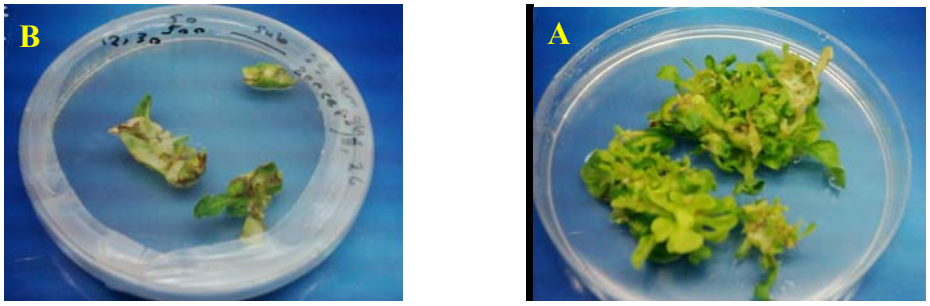


شکل۳- تاییدحضور قطعه حدود **۴۰۰bp** (ژن**VHH**)در ***Agrobacterium tumefaciens*** بااستفاده از **Colony PCR** : **M**: مارکر، **W**: آب، **P+**: کنترل مثبت(پلاسمید **pBI121** حاوي**VHH**)،**P-** : ***Agrobacterium tumefaciens*** بدون پلاسمید **pBI121** و درنتیجه بدون **VHH** ، **C+** : ***Agrobacterium tumefaciens*** حاوي پلاسمید **pBI121** و درنتیجه داراي **VHH** ، **C+p** : **Colony PCR** از ***Agrobacterium tumefaciens***حاوي پلاسمید **pBI121** و درنتیجه داراي **VHH** با استفاده از آغازگر جلوبرندهدر پیشبرنده***camv35S*** وآغازگر معکوس ژن **VHH** که تکثیر يك قطعه در حدود **۸۰۰bp** را نشان مي دهد.

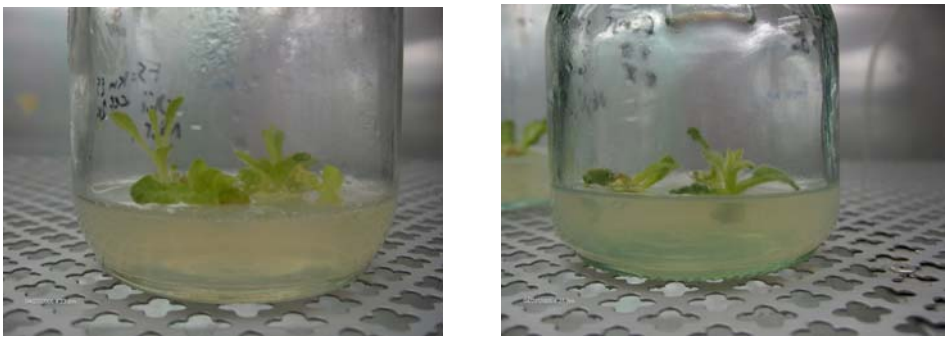
B



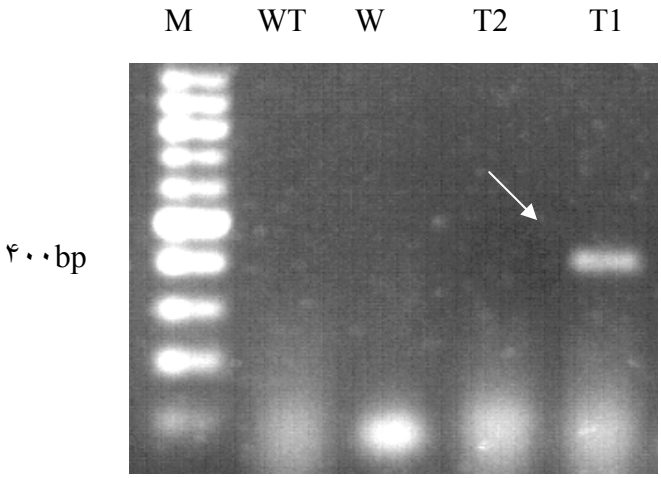
شکل۴- ریزنمونه هاي برگ هاي گیاه توتون تلقیح شده با باکتري ***Agrobacterium tumefaciens*** حاوي پلاسمید **pBI121** داراي ژن **VHH** ، بر روي محیط کشت انتخابي حاوي کانامایسین و سفاتاکسیم. گیاهچه هاي جدید از ریز نمونه هاي تلقیح شده تولید گردید**(A)**، در حالیکه درگیاهان تیپ وحشي یاشاهدهیچگونه گیاهچه اي تولید نگردید**(B)**.



شکل۵- گیاهچه هاي رشد کرده در محیط کشت انتخابي**(Ms+NAA+BAP)** حاوي کانامایسین با غلظت ۲۵ میلي گرم در لیتر **(A)**و ۵۰ میلي گرم در لیتر**(B)**.



شکل۶- گیاهچه هاي رشد کرده به شیشه هاي بزرگتر حاوي محیط کشت**(Ms+NAA+BAP)** حاوي کانامایسین با غلظت ۵۰ میلي گرم در لیتروسفاتاکسیم با غلظت ۲۰۰ میلي گرم در لیتر منتقل شدند.



شكل۷- آناليز **DNA** ژنومي استخراج شده از گياهچه هاي باززايي شده بوسيله **PCR** وبااستفاده از پرايمر هاي اختصاصي آنتي بادي نوتركيب تک دومني عليه **MUC1**. يک باند حدود**bp** ۴۰۰در گياه **T1**مشاهده گرديد، در صورتيكه در گياه تيپ وحشي(**WT**)،كنترل آب(**W**)ويک گياه بازايي شده ديگر(**T2**) هيچگونه باندي مشاهده نشد.

منابع

بي نام، ۱۳۸۳. كارگاه تهيه و توليد آنتي‌باديهاي نوتركيب از منشأ ژنهاي ايمنوگلوبين‌هاي موش و ژنهاي ايمنوگلوبين شتر.انتشارات دانشگاه تربيت مدرس، دانشكده علوم پزشكي.

Anonymous.(2003).Production of biopharmaceuticals in plants Available on this address: http://www.miami.com /mld/miami/news/nation/4695528.html

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

Daniell, H.(2003b). Production of human serum albumin in transgenic crops without interfering with food or feed production , ISB NEWS REPORT SEPTEMBER 2003, Access entire News Report at http://www.isb.vt.edu

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

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. Int. J. Cancer. 43: 1072-1076

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

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 EMBO Jounal Vol 17, pp3512-3520.

Paknejad, M., Rasaee, MJ., Tehrani, FK., Kashanian, S., Mohagheghi, MA., Omidfar, K. and Bazl, MR.(2003). Production of monoclonal antibody, PR81, recognizing the tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybrid Hybridomics, Jun, 22(3):153-8.

Rahbarizadeh, F.,Rasaee, MJ., Forouzandeh Moghadam, M., Allameh, AA.,Narang,S.A. and Sadeghizadeh, M.F.(2004a). Induction of Immune response in camelus bacterianus and camelus dromdarius against MUC1 peptide prouce heavy chain antibodies with efficient combining properties. Journal of camel practice and Research.11.1.2004.pp: 1-9.

Rahbarizadeh, F.,Rasaee, MJ., Forouzandeh Moghadam, M., Allameh, AA. And Sadroddiny E.(2004b).

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

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI