



بررسی اثر بهینه‌سازی کدونی بر میزان بیان نانوبادی Anti-VEGF

مژگان سلیمانی زاده^۱، عبدالرضا باقری^۲، مختار جلالی جواران^{۳*}، علیرضا سیفی^۴، مهدی بهدانی^۵، فاطمه کاظمی لمعه

دشت^۶

^۱ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲ استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۴ استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۵ دانشیار بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

^۶ استادیار بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰

چکیده

گیاهان به دلایل متعددی به عنوان بیوراکتورهای ارزشمند برای تولید انواع پروتئین‌های نو ترکیب (به‌ویژه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و...) می‌توانند مورد بهره‌برداری قرار گیرند. استفاده از ناقل‌های ویروسی گیاهی برای بیان موقت، یک استراتژی مفید برای تولید پروتئین‌های مهم دارویی از قبیل آنتی‌بادی‌ها در مقیاس بالا و در یک دوره زمانی خیلی کوتاه پیشنهاد می‌شود. امروزه، سرطان دومین عامل مرگ و میر در جامعه بشری است. شواهد قانع کننده نشان می‌دهد که فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) به دلیل نقش ضروری در رگزایی یک هدف مهم برای درمان سرطان می‌باشد. در این مطالعه قطعات مختلف نانوبادی Anti-VEGF (Nb42) به طور موقت تحت کنترل راه‌انداز قوی ویروسی در گیاه کدو با استفاده از ناقل ویروسی مبتنی بر ZYMV بیان گردید. این قطعات شامل توالی معمولی نانوبادی (Nb42I) و توالی بهینه شده نانوبادی برای بیان در گیاه (Nb42II) بودند. پس از مایه‌کوبی گیاهان، حضور رونوشت‌های قطعات مختلف ژنی Nb42 در گیاهان مایه‌کوبی شده کدو با استفاده از آزمون RT-PCR شناسایی گردید. همچنین بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از آزمون‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای، SDS-PAGE، لکه‌گذاری وسترن و الایزا تأیید گردید. بر اساس نتایج الایزا، میزان بیان نانوبادی Nb42I و Nb42II به ترتیب ۲ و ۶/۸ میکروگرم در هر گرم بافت برگی بود. در مجموع، نانوبادی نو ترکیب Nb42 می‌تواند به طور موثر در گیاه کدو بیان گردد و سیستم بیانی مبتنی بر ZYMV یک سیستم تولیدی مناسب برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان خانواده کدوئیان خواهد بود.

کلمات کلیدی: بیان موقت، بهینه‌سازی کدونی، زراعت مولکولی، ناقل ویروسی، نانوبادی.

می‌باشد. در سال ۱۹۸۹ اولین آنتی‌بادی مونوکلونال در گیاهان تراریخته تولید شد (Hiatt *et al.*, 1989). از آن زمان تاکنون شکل‌های مختلفی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در سیستم‌های گیاهی با استفاده از سیستم‌های بیانی موقت مبتنی بر ویروس یا تراریخته پایدار تولید شده‌اند. برای تولید گیاهان تراریخته پایدار زمان زیادی لازم است و عملکرد پروتئین معمولاً پایین می‌باشد (Huang *et al.*, 2010). در مقابل، بیان موقت با استفاده از ناقل‌های ویروسی گیاهی یک راهبرد امیدوار کننده برای تولید سریع سطوح بالای پروتئین خارجی در گیاهان می‌باشد (Lico *et al.*, 2008). ویروس موزائیک زرد کدو^۳ به‌عنوان یک ناقل مبتنی بر پوتی‌ویروس^۴ برای بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان خانواده کدوئیان دستورزی شده است (Hsu *et al.*, 2004).

رگزایی^۵، یک فرایند چند مرحله‌ای بسیار کنترل شده شامل تکثیر سلول‌های اندوتلیال، سازماندهی سلول‌ها به ساختارهای لوله‌ای و بلوغ ساختارهای لوله‌ای به شکل رگ‌های پایدار می‌باشد (Folkman, 1971). در شرایط ایجاد تومور، رگزایی منجر به رشد، تهاجم و متاستاز سرطان می‌گردد (Behdani *et al.*, 2012). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^۶، یک مولکول

بروز سرطان در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته در حال افزایش می‌باشد. بنابراین تولید مولکول‌های ارزان و جدید برای درمان سرطان ضروری می‌باشد (Pereira *et al.*, 2011). درمان‌های سرطان شامل شیمی‌درمانی، جراحی و دیگر درمان‌های طولانی مدت سرطان را گرانترین بیماری برای درمان می‌سازد (Moussavou *et al.*, 2015). مطالعات آزمایشگاهی و بالینی نشان داده است که یکی از پاسخ‌های ضد توموری تولید تعداد زیادی از آنتی‌بادی‌ها برای کشتن مستقیم سلول تومور، کشتن سلول تومور بواسطه ایمنی‌زایی و ریشه‌کنی عروق^۱ می‌باشد (Scott *et al.*, 2012). درمان سرطان با آنتی‌بادی مونوکلونال به‌دلیل قیمت بالا، آلودگی بالقوه به عوامل بیماری‌زای انسانی و مقیاس‌پذیری محدود سیستم سلولی پستانداران کاربرد گسترده‌ای ندارد (Moussavou *et al.*, 2015). کارخانه‌های سلولی گیاهی روش ایمن‌تر و ارزاتری برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد سرطان ارائه می‌دهند و به‌دلیل مقیاس‌پذیری بالا^۲، قیمت پایین تولید و توانایی سرهم کردن آنتی‌بادی مونوکلونال مورد توجه ویژه قرار دارند (Ma *et al.*, 2003; Moussavou *et al.*, 2015).

زراعت مولکولی، استفاده از گیاهان به‌عنوان ابزارهایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ارزشمند از قبیل پروتئین‌های دارویی و صنعتی

³ Zucchini yellow mosaic virus

⁴ Potyvirus-based vector

⁵ Angiogenesis

⁶ Vascular endothelial growth factor

¹ Vascular ablation

² High scalability

آنتی‌بادی شتری تنها از طریق یک دومین متغیر اقدام به شناسایی آنتی‌ژن می‌نماید که به این دومین متغیر، نانوبادی اطلاق می‌گردد (Muyldermans *et al.*, 2009). نانوبادی‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فردی از قبیل: همسانه‌سازی آسان، ایمنی‌زایی کم، وزن مولکولی پایین (۱۵ کیلو دالتون)، تولید ارزان، حلالیت و پایداری بالا، اختصاصیت و تمایل بالا برای اتصال به آنتی‌ژن کاندیدهای جالبی برای درمان سرطان می‌باشند (Behdani *et al.*, 2012; Kazemi-*Lomedasht et al.*, 2015).

یکی از چالش‌های اصلی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی عملکرد پایین پروتئین نو ترکیب می‌باشد. بهینه‌سازی کدون‌ی یکی از رویکردهای مولکولی جهت حل این چالش می‌باشد. بهینه‌سازی کدون‌ی یک استراتژی برای تغییر محتوی کدون‌ی توالی ژن هدف مطابق با ترجیح کدون‌ی گیاه میزبان می‌باشد. نشان داده شده است که کدون‌های هم معنی می‌توانند به‌طور معنی‌داری بیان پروتئین هدف را با کنترل تنظیم کارایی ترجمه تغییر دهند، لذا برای بیان موثر، ژن هدف بایستی مطابق با الگوی ژنوم میزبان طراحی گردد (Tian *et al.*, 2017; Webster *et al.*, 2017). هدف از این تحقیق استفاده از یک ناقل ویروسی مبتنی بر پوتی ویروس برای بررسی اثر بهینه‌سازی کدون‌ی، بر میزان بیان ژن نانوبادی Nb42 در گیاه کدو بود. در ابتدا قطعات ژنی مختلف نانوبادی در ناقل

کلیدی در رگ‌زایی تومور بوده و توسط سلول‌های سرطانی در هنگام سرطان تولید می‌شود. از آنجایی که میان‌کنش VEGF با گیرنده‌های آن برای رگ‌زایی تومور ضروری به نظر می‌رسد، بنابراین مهار VEGF می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد جذاب برای درمان سرطان محسوب گردد (Ebrahimizadeh *et al.*, 2015).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال خنثی‌کننده علیه VEGF گروه مهمی از داروهای مورد استفاده برای درمان سرطان می‌باشند. مطالعات اخیر روی توسعه آنتی‌بادی‌ها به‌ویژه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مولکول‌های کوچک که سلول‌های اندوتلیال مرتبط با تومور را هدف قرار می‌دهد، متمرکز شده است (Youssofian *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). علی‌رغم موفقیت‌های مهم و مزیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از نظر اتصال به یک هدف خاص، هنوز هم این آنتی‌بادی‌ها محدودیت‌هایی دارند. نگرانی‌های از جمله قیمت بالای تولید، تحریک پاسخ ایمنی، دشواری نفوذ به بافت‌های متراکم از قبیل تومورهای فشرده، نیاز به فرآیندهای تولید و اندازه بزرگ از آن جمله می‌باشند (Kolkman & Law, 2010).

شناسایی نانوبادی‌ها زمینه‌ای جدید در فن‌آوری آنتی‌بادی ایجاد کرده است. در واقع نانوبادی، یک نوع منحصر به فرد از قطعات عملکردی آنتی‌بادی است که در سرم خون شترسانان موجود می‌باشد. زنجیره سنگین

گردید. قطعه ژنی نانوبادی بهینه شده (Nb42II) به طور مشابه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NbF2 و NbR2 (جدول ۱) از ناقل pUC57 در بردارنده ژن هدف (pUC57-Nb42HFBI) تهیه شده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس) تکثیر شد.

درج فرآورده‌های تکثیر شده PCR در ناقل همسانه‌سازی pJET (فرمتاز، شماره دسترسی ژن بانک EF694056.1) مطابق با دستورالعمل کیت K1232 شرکت فرمتاز انجام گرفت. ناقل‌های نوترکیب حاصل به ترتیب pJETNb42I و pJETNb42II نامگذاری شدند و سپس با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5 α منتقل شدند (Sambrook & Russell, 2001). آزمون Colony PCR برای انتخاب کلنی‌های مثبت حاوی قطعات ژنی هدف از بین سایر کلنی‌ها، با استفاده از آغازگرهای pJET1.2 R و pJET1.2 F انجام گرفت (جدول ۱). پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌های رشد یافته در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک با استفاده از کیت Expres Plasmid SV-mini و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (GenaAll، کره جنوبی)، هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های برشی SphI و KpnI انجام گردید. در نهایت برای تأیید بیشتر همسانه‌سازی، توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای pJET1.2 F و pJET1.2 R انجام شد.

ویروسی مورد نظر همسانه‌سازی گردید و پس از مایه‌کوبی گیاهان موردنظر، بررسی بیان گیاهان مایه‌کوبی شده در سطح RNA با آزمون RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای^۷، SDS-PAGE^۸، لکه‌گذاری وسترن^۹ و الایزا^{۱۰} انجام گرفت. در این تحقیق ما برای اولین بار اثر بهینه‌سازی کدونی را بر میزان بیان ژن نانوبادی Nb42 با استفاده از سیستم بیانی ویروسی در گیاه کدو بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

بذور گیاه کدو (*Cucurbita pepo* L.) به‌عنوان میزبان اصلی در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲۵ ± ۲°C، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند. برای بستر کاشت گلدان‌ها از خاک استریل در ترکیب با کمپوست و ورمیکولیت با نسبت حجمی ۲:۱:۱ استفاده شد.

دو قطعه مختلف از ژن نانوبادی Nb42 (با توالی آمینواسیدی مشابه) مورد بررسی قرار گرفت. توالی کد کننده ژن نانوبادی بهینه نشده (Nb42I) توسط آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NbF1 و NbR1 (جدول ۱) از ناقل pHEN6c-Nb42 (تهیه شده توسط دکتر کاظمی، انسیستو پاستور ایران) تکثیر

⁷ Dot blot

⁸ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

⁹ Western blot

¹⁰ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

کنترل منفی (Mock) در نظر گرفته شد. به منظور انجام بررسی بیان ژن هدف، نمونه برداری از برگ گیاهان مایه‌کوبی شده و شاهد ۱۴ روز پس از مایه‌کوبی انجام پذیرفت.

استخراج RNA کل از برگ گیاهان مایه‌کوبی شده و شاهد با استفاده از کیت Ribospin Plant و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (GeneAll، کره) انجام گرفت. سپس کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. پس از تیمار با آنزیم DNase I، ساخت cDNA مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه صورت گرفت (GeneAll، کره). سپس واکنش RT-PCR با cDNA ساخته شده از قطعه ژنی Nb42I و آغازگرهای اختصاصی NbF1 و NbR1 (جدول ۱) و همچنین با cDNA ساخته شده از قطعه ژنی Nb42II با آغازگرهای اختصاصی NbF2 و NbR2 (جدول ۱) انجام گرفت.

به منظور استخراج پروتئین، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگگی از گیاهان مایه‌کوبی شده و شاهد با ازت مایع سائیده شده و در یک میلی‌لیتر از بافر استخراج پروتئین (۵۰ میلی‌مولار تریس، ۲ میلی‌مولار EDTA^{۱۱}، ۰/۰۴٪ مرکاپتواتانول و ۱ میلی‌مولار بازدارنده پروتئاز PMSF، سیگما-آلدریج) مخلوط گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد ورتکس گردید. در مرحله بعد سانتریفوژ در ۱۵۰۰۰g،

در این تحقیق از ناقل ویروسی pZGFP به منظور بیان موقت قطعات ژنی هدف در گیاه کدو استفاده شد (Hsu *et al.*, 2004). به منظور همسانه‌سازی قطعات ژنی هدف در ناقل ویروسی، ناقل‌های همسانه‌سازی نوترکیب به همراه ناقل ویروسی pZGFP مورد هضم با آنزیم‌های برشی SphI و KpnI قرار گرفتند. پس از جداسازی محصولات حاصل از هضم روی ژل آگارز، قطعات مربوط به ژن هدف و ناقل ویروسی با استفاده از کیت Expin Gel SV (GeneAll، کره جنوبی) خالص‌سازی شدند. سپس محصول واکنش اتصال به روش قبلی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α وارد شد. تائید همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل ویروسی با استفاده از آزمون کلنی PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعات ژنی هدف (جدول ۱) و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی SphI و KpnI انجام شد. ناقل‌های ویروسی حاصل pZNb42I و pZNb42II نامیده شدند.

ناقل‌های ویروسی نوترکیب با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (GeneAll، کره) استخراج و پس از خراش‌دهی برگ موردنظر با استفاده از پودر کربوران‌دوم، به صورت مکانیکی و با استفاده از یک گوش پاک کن روی برگ گیاه کدو مالیده شدند. برای مایه‌کوبی هر گیاه، مقدار ۱۰ میکروگرم از پلاسمیدهای استخراجی استفاده گردید. گیاه مایه‌کوبی شده با بافر به‌عنوان شاهد یا

¹¹ Ethylenediaminetetraacetic acid

۱۰۶۰۰۰۲۳) تیمار شده با متانول بارگذاری شد. پس از خشک شدن غشاء در دمای اتاق، بلوکه کردن نواحی غیر اختصاصی آن با استفاده از بافر بلوکه کننده (BSA ۱٪) انجام شد. سپس مراحل شستشوی غشاء با محلول PBS-T و انکوبه شدن با آنتی‌بادی اولیه polyclonal rabbit anti-camel IgGs (تهیه شده توسط دکتر بهدانی، انستیتوپاستور ایران) صورت پذیرفت. پس از شستشوی مجدد غشاء با محلول PBS-T، آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti-rabbit IgG-HRP، Sigma) به غشاء اضافه شد. در پایان، غشاء پس از شست شو با محلول PBS-T به محلول رنگ‌آمیزی (سوبسترای^{۱۴} DAB ۱٪) انتقال یافت و بلافاصله پس از ظهور لکه‌های رنگی غشاء با آب مقطر شستشو داده شد.

بررسی گیاهان هدف در سطح پروتئین به روش لکه‌گذاری وسترن (Western-blotting) انجام شد. پس از جداسازی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE، ابتدا ژل، غشاء PVDF و کاغذ واتمن در بافر انتقال (۴۸ میلی‌مولار تریس (۸/۳ pH)، ۳۹ میلی‌مولار گلیسین، ۱/۳ میلی‌مولار SDS و ۲۰٪ متانول) قرار داده شدند. برای انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء، از دستگاه Trans-Blot semi-dry (BioRad، امریکا) و دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. در مرحله بعد غشاء PVDF به مدت ۵ ساعت در بافر بلوکه کننده (شیر خشک بدون چربی ۵٪ PBS-T) قرار

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. فاز روئی که حاوی پروتئین بود به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت پروتئین محلول کل در مقایسه با پروتئین سرم آلبومین گاوی^{۱۲} (BSA) به عنوان استاندارد تخمین زده شد (Bradford, 1976).

آزمون SDS-PAGE برای تفکیک پروتئین‌ها با الکتروفورز روی ژل اکریلامید ۱۲/۵٪ انجام شد (Laemmli, 1970). بدین منظور، نمونه‌های پروتئینی به همراه بافر نمونه‌گذاری ۵X (۲ میلی‌مولار تریس (۶/۸ pH)، ۵۰٪ گلیسرول، ۱۰٪ SDS، ۰/۱٪ بروموفنول بلو و ۰/۰۵٪ مرکاپتواتانول) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و سپس درون چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ صورت پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ابتدا رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو ۲۵۰-G^{۱۳} (Bradford, 1976) و سپس رنگ‌بری مناسب صورت پذیرفت و عکسبرداری از آن انجام گرفت.

بررسی گیاهان هدف در سطح پروتئین به روش لکه‌گذاری نقطه‌ای (Dot blotting) به روش Huang et al. (2006) و همکاران انجام شد (Huang et al., 2006). ابتدا پروتئین‌های استخراج شده به صورت نقطه‌ای روی غشاء PVDF (GE Healthcare، امرشام، شماره کاتالوگ

¹² Bovine serum albumin

¹³ Coomassie Blue G-250

¹⁴ Diaminobenzidine tetrahydrochloride

و Nb42II) با استفاده از آغازگرهای ناقل pJET (جدول ۱)، درج ژنهای هدف را در ناقل مذکور تأیید نمود (شکل ۱- الف و ج). هضم آنزیمی ناقل استخراج شده از یک کلنی مثبت (از هر یک از ناقل‌های نوترکیب) با آنزیم‌های SphI و KpnI نیز همسانه‌سازی ژنهای هدف را تأیید کرد (شکل ۱- ب و د). همچنین نتایج حاصل از توالی‌یابی، صحت توالی درج شده در ناقل pJET را تأیید نمود. به‌منظور همسانه‌سازی قطعات ژنی هدف در ناقل ویروسی pZGFP، واکنش هضم آنزیمی ناقل‌های همسانه‌سازی نوترکیب و نیز ناقل pZGFP با آنزیم‌های برشی SphI و KpnI انجام گرفت. پس از تخلیص قطعات ژنی و ناقل از روی ژل، واکنش اتصال بین قطعات ژنی هدف و ناقل انجام شد. آزمون کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نانوبادی (جدول ۱) و هضم آنزیمی، همسانه شدن قطعات ژنی Nb42I (شکل ۲- الف و ب) و Nb42II (شکل ۲- ج و د) را به جای ژن GFP در ناقل ویروسی pZGFP تأیید نمودند. تکثیر قطعه‌ی ۳۹۸ جفت بازی در نتیجه آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نانوبادی (جدول ۱) در گیاهان مایه‌کوبی شده و نیز عدم تکثیر آن در گیاه شاهد و کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNaseI) بیانگر بیان موفق از هر دو قطعه‌ی ژنی هدف در گیاهان مایه‌کوبی شده با ناقل‌های نوترکیب در سطح رونویسی بود (شکل ۳).

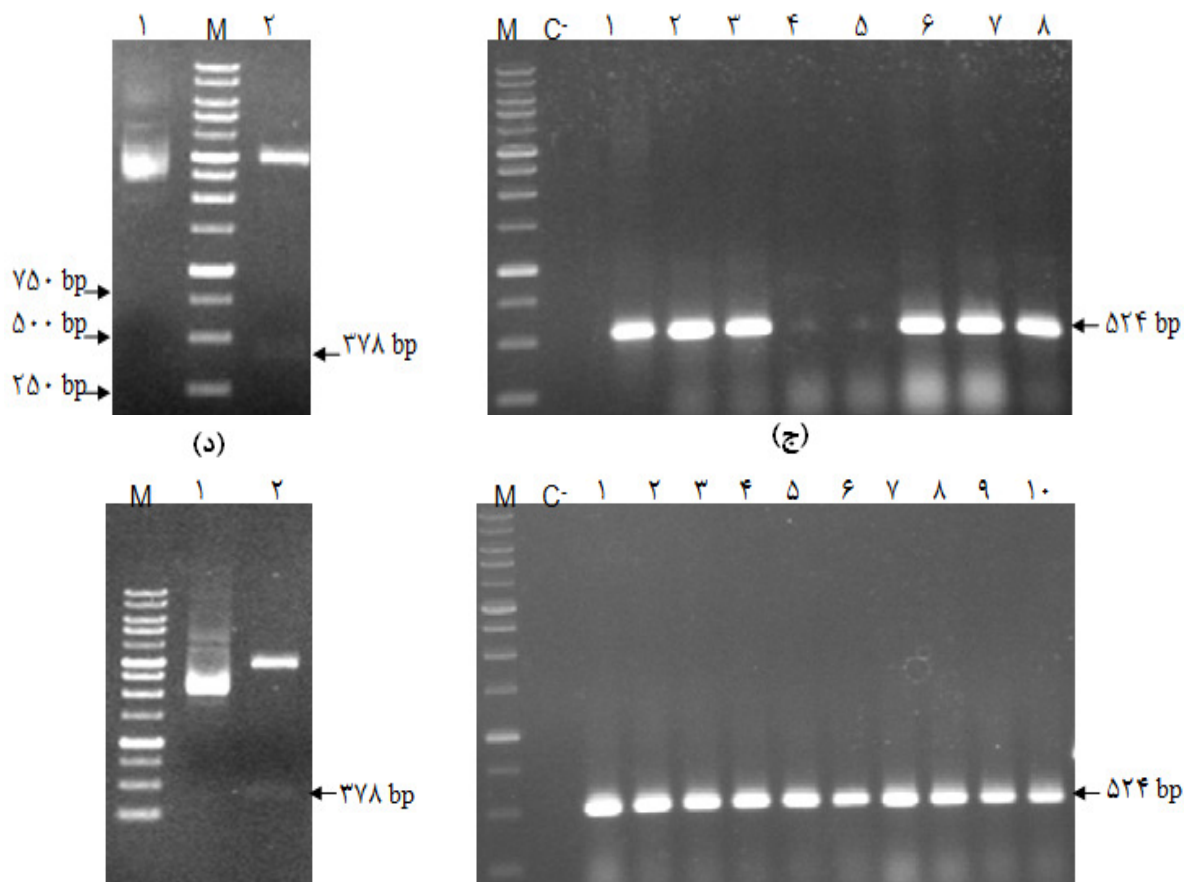
گرفت. بقیه‌ی مراحل مشابه با آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای انجام شد. کمی‌سازی بیان پروتئین در گیاهان هدف با استفاده از روش الایزا (ELISA) به روش غیر مستقیم انجام شد (Engvall & Perlmann, 1971) و هدف از انجام آن تعیین میزان کمی پروتئین موردنظر بود. به این صورت که ابتدا، نمونه‌های پروتئینی موردنظر به‌همراه بافر پوشش‌دهنده^{۱۵} در سه تکرار درون چاهک‌های پلیت بارگذاری شدند. سپس مراحل شستشو با محلول PBS-T و بلوکه کردن چاهک‌ها با محلول BSA ۱٪ انجام شد. بعد از شستشوی مجدد با محلول PBS-T، انکوبه شدن با آنتی‌بادی اولیه صورت پذیرفت. در نهایت پس از افزودن آنتی‌بادی ثانویه، محلول سوبسترای^{۱۶} TMB به هر چاهک افزوده شد و بعد از توقف واکنش آنزیمی با اسید سولفوریک ۱ مولار، میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Microplate reader (BioTek, آمریکا) خوانده شد.

نتایج

پس از همسانه‌سازی قطعات ژنی هدف در ناقل همسانه‌سازی pJET، آزمون کلنی PCR با کلنی‌های رشد یافته روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک انجام شد و مشاهده قطعات تکثیر شده (قطعه ۵۲۴ جفت بازی برای ژن‌های Nb42I

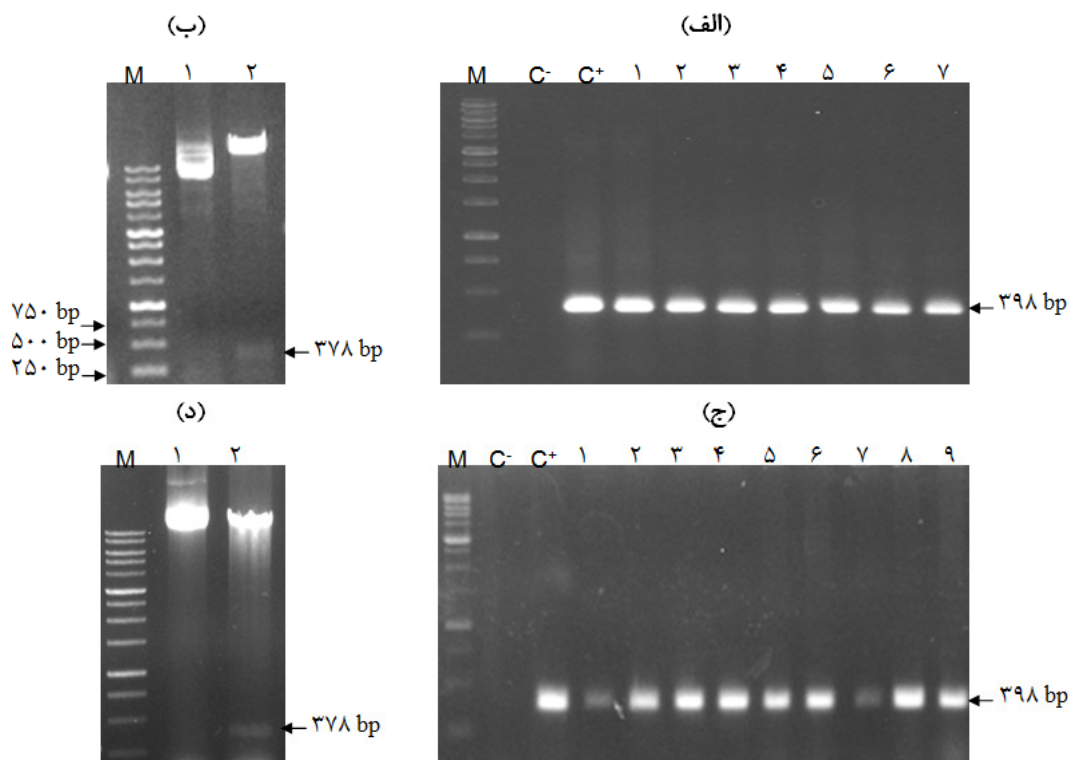
¹⁵ Coating buffer

¹⁶ 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine



شکل ۱- الف) آشکارسازی محصول کلنی PCR ژن Nb42I روی ژل آگارز ۱٪: چاهک‌های ۱ تا ۸- کلنی‌های رشد یافته روی محیط ب) هضم آنزیمی ناقل pJETNb42I روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- ناقل برش نیافته، چاهک ۲- ناقل برش یافته ج) آشکارسازی محصول کلنی PCR ژن Nb42II روی ژل آگارز ۱٪: چاهک‌های ۱ تا ۱۰- کلنی‌های رشد یافته روی محیط د) هضم آنزیمی ناقل pJETNb42II روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- ناقل برش نیافته، چاهک ۲- ناقل برش یافته، -M- نشانگر مولکولی ۱Kb، -C- کنترل منفی (بدون DNA الگو).

Figure 1- Detection of colony PCR product of Nb42I gene on the 1% agarose gel: lanes 1-8- colonies grown on the medium b) Enzyme digestion of pJETNb42I vector on the 1% agarose gel: lane 1- undigested vector, lane 2- digested vector c) Detection of colony PCR product of Nb42II gene on the 1% agarose gel: lanes 1-10- colonies grown on the medium d) Enzyme digestion of pJETNb42II vector on the 1% agarose gel: lane 1- undigested vector, lane 2- digested vector, M- 1Kb molecular marker, C- negative control (without template DNA).

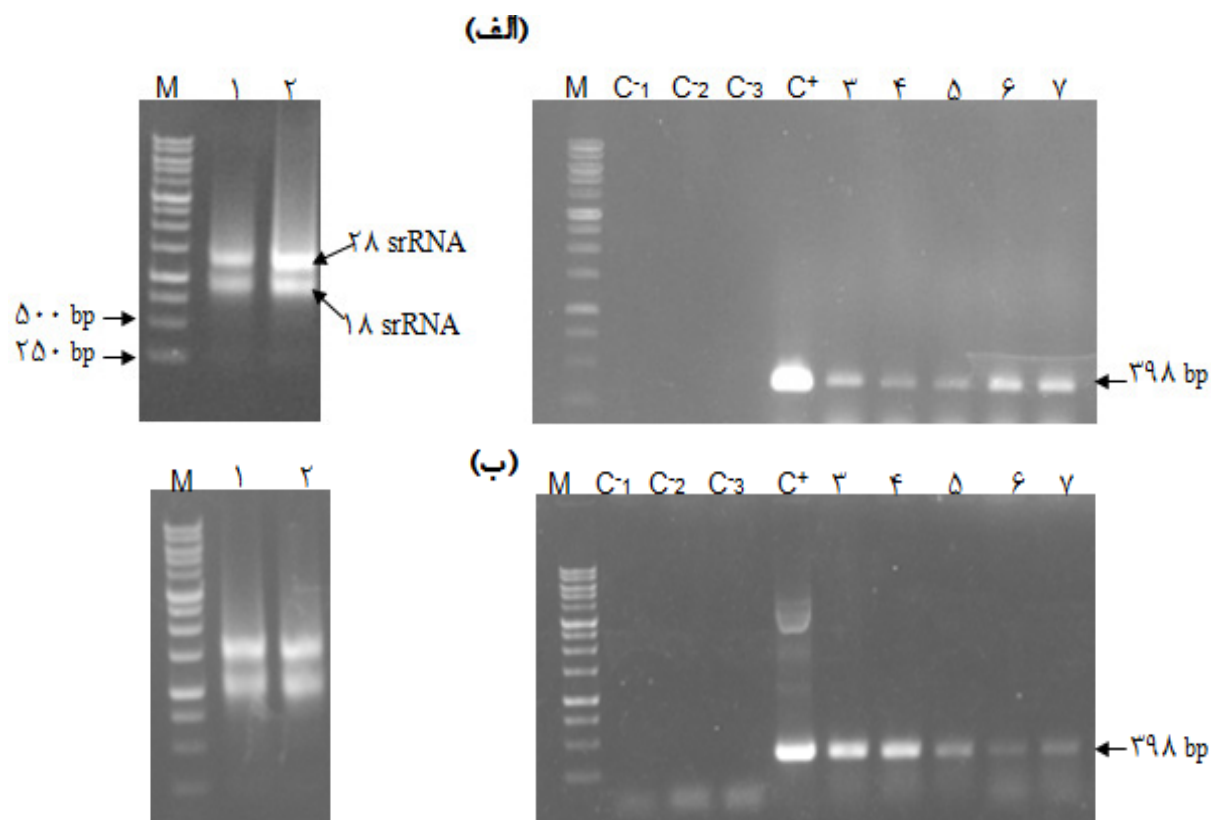


شکل ۲- الف) آشکارسازی محصول کلنی PCR ژن Nb42I روی ژل آگارز ۱٪: چاهک‌های ۱ تا ۷- کلنی‌های رشد یافته روی محیط، C⁺- ناقل pHEN6c-Nb42 (ب) هضم آنزیمی ناقل pZNb42I روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- ناقل برش نیافته، چاهک ۲- ناقل برش یافته (ج) آشکارسازی محصول کلنی PCR ژن Nb42II روی ژل آگارز ۱٪: چاهک‌های ۱ تا ۹- کلنی‌های رشد یافته روی محیط، C⁺- ناقل pUC57-Nb42HFBI (د) هضم آنزیمی ناقل pZNb42II روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- ناقل برش نیافته، چاهک ۲- ناقل برش یافته، M- نشانگر مولکولی 1Kb، C⁻- کنترل منفی (بدون DNA الگو).

Figure 2- Detection of colony PCR product of Nb42I gene on the 1% agarose gel: lanes 1-7- colonies grown on the medium, C⁺- pHEN6c-Nb42 vector b) Enzyme digestion of pZNb42I vector on the 1% agarose gel: lane 1- undigested vector, lane 2- digested vector c) Detection of colony PCR product of Nb42II gene on the 1% agarose gel: lanes 1-10- colonies grown on the medium, C⁺- pUC57-Nb42HFBI vector d) Enzyme digestion of pZNb42II vector on the 1% agarose gel: lane 1- undigested vector, lane 2- digested vector, M- 1Kb molecular marker, C⁻- negative control (without template DNA).

به معنی تولید پروتئین نوترکیب نیست، بنابراین لازم است پروتئین هدف ردیابی گردد و مقدار تولیدی پروتئین هدف مشخص گردد.

هدف از مایه‌کوبی برگ‌های گیاهان در این تحقیق، بیان موقت پروتئین نوترکیب نانوبادی Nb42 می‌باشد. اگرچه با بررسی‌هایی که در سطح RNA انجام شد، بیان این ژن در برگ‌های مایه‌کوبی شده تأیید گردید؛ اما درج ژن لزوماً



شکل ۳- الف) آشکارسازی RNA استخراج شده و محصول RT-PCR ژن Nb42I روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- RNA گیاه شاهد، چاهک ۲- RNA گیاه مایه کوبی شده با ناقل pZNb42I، چاهک‌های ۳ تا ۷- گیاهان مایه کوبی شده با ناقل pZNb42I، C⁺- کنترل مثبت (ناقل pZNb42I) ب) آشکارسازی RNA استخراج شده و محصول RT-PCR ژن Nb42II روی ژل آگارز ۱٪: چاهک ۱- RNA گیاه شاهد، چاهک ۲- RNA گیاه مایه کوبی شده با ناقل pZNb42II، چاهک‌های ۳ تا ۷- گیاهان مایه کوبی شده با ناقل pZNb42II، C⁺- کنترل مثبت (ناقل pZNb42II)، M- نشانگر مولکولی 1Kb، C⁻₁ تا C⁻₃- کنترل‌های منفی (آب، RNA و گیاه شاهد) می‌باشند.

Figure 3- a) Detection of extracted RNA and of RT-PCR product of Nb42I gene on the 1% agarose gel: lane 1- control plant RNA, lane 2- inoculated plant RNA with pZNb42I, lane 3-7- inoculated plants with pZNb42I vector, C⁺- positive control (pZNb42I vector) b) Detection of extracted RNA and of RT-PCR product of Nb42II gene on the 1% agarose gel: lane 1- control plant RNA, lane 2- inoculated plant RNA with pZNb42II, lane 3-7- inoculated plants with pZNb42II vector, C⁺- positive control (pZNb42II vector), M- 1Kb molecular marker, C⁻₁- C⁻₃- negative controls (water, RNA, and control plant).

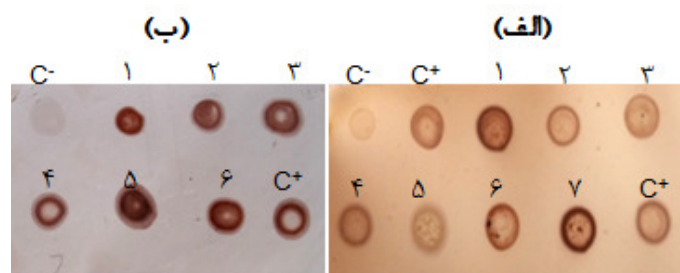
جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر و تایید درج ژن هدف در ناقل pJET.

Table 1- Specific primers designed for the amplification and confirmation of the target gene insertion into the pJET vector.

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence	اندازه قطعات تکثیری (bp)	جایگاه برشی (زیرخط دار) Restriction site (Underlined)
NbF ₁	5'-ATGCGCATGCCAGGTCCAGCTG CAGGAGTC-3'	۳۹۸	SphI
NbR ₁	5'-TCGAGGTACCTGAGGAGACGGT GACCTGGGTCC-3'	۳۹۸	KpnI
NbF ₂	5'-ATGCGCATGCCAAGTTCAATTGC AAG-3'	۳۹۸	SphI
NbR ₂	5'-TCGAGGTACCAGAAGAAACAGTA ACTTG-3'	۳۹۸	KpnI
pJET1.2 F	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	۵۲۴	-
pJET1.2 R	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	۵۲۴	-

برای قطعات ژنی هدف نشان نداد. لذا به منظور بررسی بیشتر بیان پروتئین نوترکیب از آزمون لکه گذاری وسترن استفاده گردید. آزمون لکه گذاری وسترن با آنتی بادی اختصاصی نانوبادی (polyclonal rabbit anti-camel IgG) روی پروتئین های استخراج شده از گیاهان مایه کوبی شده، حضور یک باند مشخص را در محدوده ی موردانتظار (۱۷-۱۱ kDa) برای قطعات ژنی Nb42I و Nb42II در مقایسه با باند ۱۵ کیلودالتون پروتئین نانوبادی Nb42 به عنوان کنترل مثبت نشان داد. هیچ گونه باند مشابهی در مورد پروتئین استخراج شده از گیاه شاهد مشاهده نشد (شکل ۵).

نتایج آزمون لکه گذاری نقطه ای حضور پروتئین نوترکیب Nb42I را در عصاره پروتئینی استخراج شده از برگ گیاهان مایه کوبی شده با ناقل pZNb42I در مقایسه با گیاه شاهد (گیاه مایه کوبی شده با بافر) (شکل ۴- الف) و همچنین حضور پروتئین نوترکیب Nb42II را در عصاره پروتئینی استخراج شده از برگ گیاهان مایه کوبی شده با ناقل pZNb42II در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد (شکل ۴- ب). این نتایج بیانگر بیان موفق پروتئین های نوترکیب Nb42I و Nb42II در گیاهان مایه زنی شده با ناقل های هدف بود. پس از انجام آزمون SDS-PAGE، مقایسه الگوی بانندی گیاهان مایه کوبی شده و شاهد تفاوت بانندی قابل تشخیصی را در محدوده ی مورد انتظار



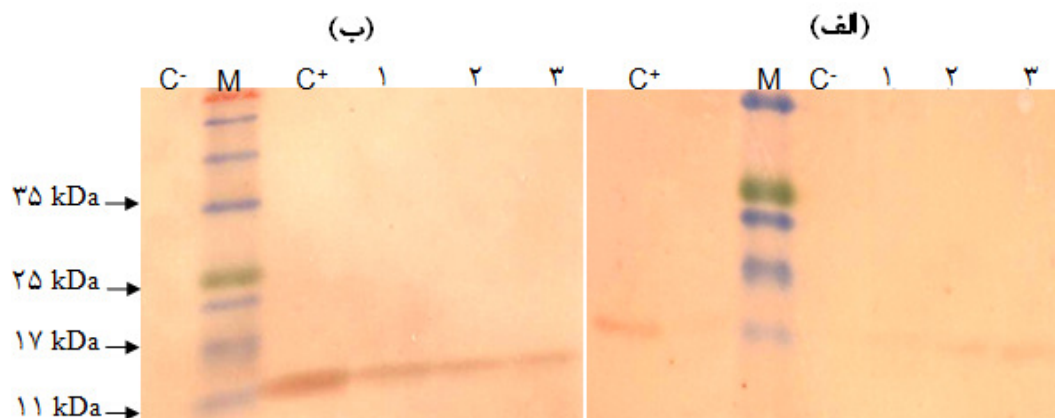
شکل ۴- الف) آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان مایه‌کوبی شده با ناقل pZNb42I و گیاه شاهد: لکه‌های ۱ تا ۷- نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده Nb42I (ب) آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان مایه‌کوبی شده با ناقل pZNb42II و شاهد: لکه‌های ۱ تا ۶ - نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده Nb42II، C⁺- کنترل مثبت (پروتئین خالص شده از باکتری)، C⁻ - کنترل منفی (نمونه پروتئینی گیاه شاهد).

Figure 4- a) Dot blot analysis of inoculated plants with pZNb42I vector and control plant: spots 1-7- protein samples of plants expressing Nb42I b) Dot blot analysis of inoculated plants with pZNb42II vector and control plant: spots 1-6- protein samples of plants expressing Nb42II, C⁺- positive control, bacterial purified Nb42 protein, C⁻- negative control (protein sample of control plant).

ب و د). به‌منظور به دست آوردن میزان بیان، میانگین داده‌های جذب خوانده شده برای هر گیاه با دستگاه ELISA Reader، در معادله رگرسیونی به دست آمده با استفاده از غلظت‌های مشخص پروتئین کنترل مثبت (نانوبادی بیان شده در باکتری) قرار داده شد و میزان پروتئین بیان شده در برگ گیاهان هدف تعیین گردید.

در نهایت، جهت برآورد کمی پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاهان مایه‌کوبی شده از آزمون الایزا استفاده شد. این آزمون تفاوت معنی‌داری بین میزان جذب نوری پروتئین گیاهان مایه‌کوبی شده و شاهد برای قطعات ژنی مختلف نشان داد. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود برای پروتئین نوترکیب Nb42I گیاه شماره ۱ و برای پروتئین نوترکیب Nb42II گیاه شماره ۵ بیشترین تفاوت میزان جذب را نسبت به گیاه شاهد نشان دادند (شکل ۶- الف و ج).

این گیاهان با بیشترین میزان جذب به ترتیب حاوی ۲ و ۶/۸ میکروگرم پروتئین نوترکیب در گرم بافت برگی می‌باشند (شکل ۶ -



شکل ۵- الف) آزمون لکه گذاری وسترن برای تایید بیان پروتئین نو ترکیب Nb42I: چاهک های ۱ تا ۳- گیاهان کدو حاوی پروتئین نو ترکیب Nb42I (ب) آزمون لکه گذاری وسترن برای تایید بیان پروتئین نو ترکیب Nb42II: چاهک های ۱ تا ۳- گیاهان کدو حاوی پروتئین نو ترکیب Nb42II، C⁺- کنترل مثبت (پروتئین Nb42 خالص شده از باکتری)، M- نشانگر پروتئینی (سیناژن)، C⁻- کنترل منفی (گیاه شاهد).

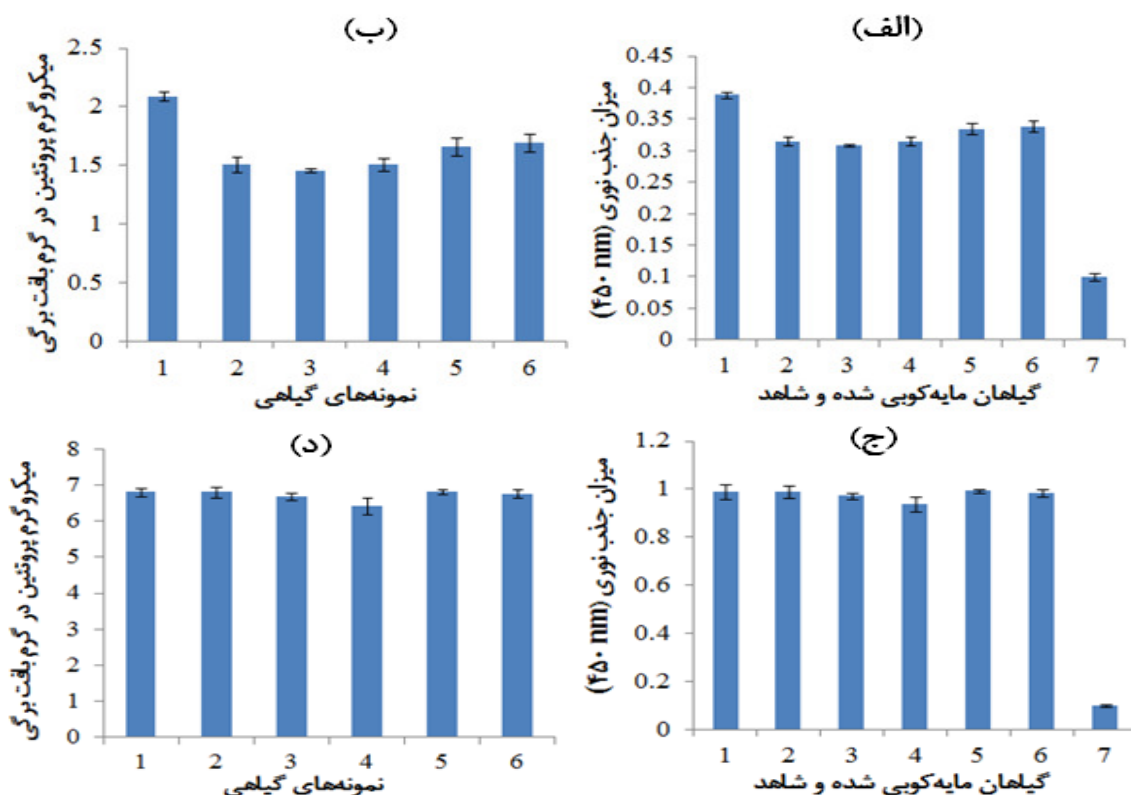
Figure 5- a) Western blot analysis for confirmation of Nb42I recombinant protein expression: lanes 1-3- cucurbit plants containing the Nb42I recombinant protein b) Western blot analysis for confirmation of Nb42II recombinant protein expression: lanes 1-3- cucurbit plants containing the Nb42II recombinant protein, C⁺- positive control (bacterial purified Nb42 protein), M- protein marker (cinnagen), C⁻-negative control (control plant).

بحث و نتیجه گیری

زراعت مولکولی و تولید پروتئین های نو ترکیب در ایران با موفقیت های ارزشمندی همراه بوده است. تولید پروتئین های دارویی مهم از قبیل اینترفرون گاما (Bagheri *et al.*, 2013)، انسولین (Yarbakht *et al.*, 2015)، فعال کننده ی پلاسمینوژن بافتی (Abdoli-Nasab *et al.*, 2013)، نانوبادی علیه گیرنده فاکتور رشد سلول های عروق خونی^{۱۷} (Mirzaee *et al.*,

2017) و غیره توسط تیم تحقیقاتی دکتر جلالی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، نمونه هایی از این موفقیت ها می باشند. برای گیاهان تراریخته نسل سوم با هدف تولید پروتئین های مورد استفاده دارویی و صنعتی، چالش اصلی دسترسی به سطح بالای بیان پروتئین می باشد.

¹⁷ Anti-Vascular endothelial growth factor receptor



شکل ۶- الف) نمودار آزمون الایزا برای گیاهان کدو بیان کننده پروتئین نوترکیب Nb42I در مقایسه با گیاه شاهد. ستون‌های ۱ تا ۶- گیاهان مایه‌کوبی شده با ناقل ویروسی نوترکیب pZNb42I، ستون ۷- گیاه شاهد ب) میزان تجمع پروتئین نوترکیب Nb42I در هر گرم بافت برگ گیاهان کدو: ستون‌های ۱ تا ۶- گیاهان کدو بیان کننده پروتئین نوترکیب Nb42II در مقایسه با گیاه شاهد. ستون‌های ۱ تا ۶- گیاهان مایه‌کوبی شده با ناقل ویروسی نوترکیب pZNb42II، ستون ۷- گیاه شاهد د) میزان تجمع پروتئین نوترکیب Nb42II در هر گرم بافت برگ گیاهان کدو: ستون‌های ۱ تا ۶- گیاهان کدو بیان کننده پروتئین نوترکیب.

Figure 6- a) ELISA chart for cucurbit plants expressing the Nb42I recombinant protein compared with control plant: columns 1-6- inoculated plants with pZNb42I recombinant viral vector, column 7- control plant b) The amount of Nb42I recombinant protein accumulation per gram of leaf tissue from cucurbit plants: columns 1-6- cucurbit plants expressing the recombinant protein c) ELISA chart for cucurbit plants expressing the Nb42II recombinant protein compared with control plant: columns 1-6- inoculated plants with pZNb42II recombinant viral vector, column 7- control plant d) The amount of Nb42II recombinant protein accumulation per gram of leaf tissue from cucurbit plants: columns 1-6- cucurbit plants expressing the recombinant protein.

2007). بعلاوه، بهینه کردن توالی ژن رمز کننده فاکتور رشد اپیدرمی مطابق با ترجیح کدونی گیاه توتون، منجر به افزایش بیان این پروتئین شده است (Thomas & Walmsley 2014).

در تحقیق حاضر، قطعات مختلف نانوبادی (Nb42I و Nb42II) به طور موقت با استفاده از ناقل ویروسی و تحت کنترل پیشبرنده ویروسی قوی ۳۵S ویروس موزائیک کلم گل در گیاه کدو بیان شدند. پس از انجام همسانه سازی موفق قطعات مختلف ژنی در ناقل ویروسی، آزمون RT-PCR رونویسی از قطعات مختلف ژنی هدف را تأیید نمود. واکنش پروتئین استخراج شده از برگ گیاهان مایه کوبی شده نسبت به آنتی بادی اختصاصی نانوبادی با استفاده از روش الیزا مورد آزمون قرار گرفت. نتایج آزمون الیزا نشان داد که میزان بیان پروتئین های نو ترکیب Nb42I و Nb42II به ترتیب ۲ و ۶/۸ میکروگرم پروتئین در هر گرم بافت برگی می باشد که در مقایسه با برخی از تحقیقات انجام شده در زمینه ی بیان نانوبادی در گیاهان بالاتر بود

(Korouzhdehy et al., 2011; Magee et al., 2004). بیان شکل بهینه شده نانوبادی (Nb42I) تقریباً ۳/۵ برابر شکل بهینه نشده (Nb42II) می باشد که در مقایسه با برخی تحقیقات انجام شده در زمینه ی بررسی اثر بهینه سازی کدونی بیشتر بود (Batard et al., 2000; Li et al., 2007). این افزایش بیان نشان داد که فاکتور

رویگردهای مختلفی برای افزایش سطح بیان پروتئین هدف در گیاهان تراریخته پیشنهاد می شود از قبیل: انتخاب پیشبرنده مناسب، عناصر افزایش دهنده^{۱۸}، بهینه سازی کدونی، هدف گیری درون سلولی پروتئین نو ترکیب، پایداری پروتئین هدف و غیره (Benchabane et al., 2008; Gerasimova et al., 2016; Streatfield 2007; Ullrich et al., 2015). در دهه های اخیر نشان داده شده است که یک فاکتور موثر مهم در افزایش سطح بیان پروتئین نو ترکیب بهینه سازی کدونی است (Webster et al., 2017). به طور مثال، توالی نوکلئوتیدی انتهای ۵' توالی ژن P450 مطابق با ترجیح کدونی گیاه میزبان توتون تغییر داده شد و این تغییر منجر به افزایش سطوح خیلی پایین بیان گردید و پروتئین نو ترکیب با استفاده از آزمون لکه گذاری وسترن قابل شناسایی بود (Batard et al., 2000). به طور مشابه هنگامی که توالی نوکلئوتیدی ژن CTB^{۱۹} مطابق با ترجیح کدونی گیاه توتون تغییر داده شد، بیان ژن بهینه شده در مقایسه با ژن بهینه نشده ۱۵ برابر افزایش یافت (Kang et al., 2004). همچنین ژن cry6A با تغییر کدون های نادر با کدون های هم معنی خود در گیاه گوجه فرنگی بهینه گردید. بیان پروتئین در شکل تغییر نیافته آن قابل تشخیص نبود در حالی که ژن تغییر یافته توسط آزمون لکه گذاری وسترن شناسایی گردید (Li et al.,

¹⁸ Enhancer elements

¹⁹ Cholera toxin B subunit

گیاه شاهد وجود ندارد. حضور این باندها بیانگر بیان موفق پروتئین‌های نوترکیب مورد نظر بود. مصرف آنتی‌بادی‌ها با اهداف تشخیصی و درمانی (به‌ویژه برای درمان سرطان) روز به روز در حال افزایش می‌باشد. بنابراین، ایجاد یک سیستم کارا به منظور تولید انبوه و ارزان آن‌ها امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. فن‌آوری بیان موقت با استفاده از ناقل‌های ویروسی شرایطی را فراهم می‌کند که می‌توان در مدت زمانی اندک بیان آنتی‌بادی را چندین برابر نسبت به گیاهان تراریخته افزایش داد. از طرف دیگر یکی از چالش‌های اصلی که مانع تولید اقتصادی پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته می‌شود سطوح تجمع ناکافی پروتئین نوترکیب می‌باشد. بهینه کردن توالی رمز کننده ژن مورد نظر مطابق با ترجیح کدونی گیاه میزبان می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد مناسب جهت بیان پروتئین در گیاهان در تحقیقات آینده به کار گرفته شود.

بهینه‌سازی کدونی می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور موثر برای افزایش بیان پروتئین در نظر گرفته شود.

تاکنون نانوبادی‌های مختلف با سطوح متغییر موفقیت در گیاهان بیان شده‌اند. در مقایسه با سامانه‌ی بیان موقت، هنگامی که نانوبادی‌های شتری در گیاهان تراریخته بیان شدند، در سطوح خیلی کم تجمع یافتند (Korouzhdehy *et al.*, 2011; Magee *et al.*, 2004). به‌طور مثال، به‌منظور کاهش سمیت $TNF\alpha^{20}$ بیان نانوبادی علیه آن در گیاه توتون صورت گرفت و تجمع کمتر از ۱ درصد پروتئین کل (TSP) برای نانوبادی مذکور گزارش شد (Winichayakul *et al.*, 2009). در سال ۲۰۱۱ نیز Conrad و همکاران نانوبادی علیه TNF را در گیاهان تراریخته توتون بیان نمودند و سطح بیان آن پس از الحاق به دنباله ELP²¹ از ۰/۰۳ به ۱/۷ درصد TSP تغییر یافت (Conrad *et al.*, 2011). بعلاوه سطوح بیان کمتر از ۱٪ نیز برای نانوبادی علیه گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در گیاه کاهو بدست آمده است (Mirzaee *et al.*, 2017).

نمونه‌هایی گیاهی که در آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای و الیزا در تایید یکدیگر بودند با روش لکه‌گذاری وسترن مورد آزمون قرار گرفتند. نتیجه‌ی این آزمون نشان داد که برای قطعات ژنی Nb42I و Nb42II در محدوده‌ی بین باندهای ۱۱ و ۱۷ کیلودالتون بانندی مشاهده می‌گردد که در

²⁰ Tumor necrosis factor α cytotoxicity

²¹ elastin-like pentapeptide

- Abdoli-Nasab M, Jalali-Javaran M, Cusidó RM, Palazón J, Baghizadeh A, Alizadeh H (2013). Expression of the truncated tissue plasminogen activator (K2S) gene in tobacco chloroplast. *Molecular Biology Reports* 40:5749-5758.
- Bagheri K, Javaran MJ, Mahboudi F, Moeini A, Zebarjadi A (2013). Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. *African Journal of Biotechnology* 9:5066-5072.
- Batard Y, Hehn A, Nedelkina S, Schalk M, Pallett K, Schaller H, Werck-Reichhart D (2000). Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379:161-169.
- Behdani M, Zeinali S, Khanahmad H, Karimipour M, Asadzadeh N, Azadmanesh K, Khabiri A, Schoonoghe S, Anbouhi MH, Hassanzadeh-Ghassabeh G (2012). Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. *Molecular Immunology* 50:35-41.
- Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D (2008). Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnology Journal* 6:633-648.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rose John S, Scheller J (2011). ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnology Journal* 9:22-31.
- Ebrahimzadeh W, Gargari SLMM, Javidan Z, Rajabibazl M (2015). Production of Novel VHH Nanobody Inhibiting Angiogenesis by Targeting Binding Site of VEGF. *Applied Biochemistry Biotechnology* 176:1985-1995.
- Engvall E, Perlmann P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285:1182-1186
- Gerasimova S, Smirnova O, Kochetov A, Shumnyi V (2016). Production of recombinant proteins in plant cells. *Russian Journal Plant Physiology* 63:26-37.
- Hiatt A, Caffferkey R, Bowdish K (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78.
- Hsu C-H, Lin S-S, Liu F-L, Su W-C, Yeh S-D (2004). Oral administration of a mite allergen expressed by zucchini yellow mosaic virus in cucurbit species downregulates allergen-induced airway inflammation and IgE synthesis. *Journal Allergy Clinical Immunology* 113:1079-1085.
- Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, Zeitlin L, Whaley KJ, Arntzen CJ, Mason HS, Chen Q (2010). High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnology and Bioengineering* 106:9-17.
- Huang Z, Santi L, LePore K, Kilbourne J, Arntzen CJ, Mason HS (2006). Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 24:2506-2513.

- Kang T-J, Loc N-H, Jang M-O, Yang M-S (2004). Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants. *Molecular Breeding* 13:143-153.
- Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Bagheri KP, Habibi-Anbouhi M, Abolhassani M, Arezumand R, Shahbazzadeh D, Mirzahoseini H (2015). Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. *Molecular Immunology* 65:58-67.
- Kolkman JA, Law DA (2010). Nanobodies—from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies* 7:e139-e146.
- Korouzhdehy B, Dadmehr M, Piri I, Rahbarizadeh F, Solouki M (2011). Expression of biological active VHH camelid single domain antibody in transgenic tobacco. *African Journal of Biotechnology* 10:4234-4241.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Li XQ, Wei JZ, Tan A, Aroian RV (2007). Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Plant Biotechnology Journal* 5:455-464.
- Lico C, Chen Q, Santi L (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal Cell Physiology* 216:366-377.
- Ma JK, Drake PM, Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* 4:794-805.
- Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesy P, Kavanagh TA (2004). T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. *Transgenic Research* 13:325-337.
- Mirzaee M, Jalali-Javaran M, Moieni A, Zeinali S, Behdani M, Shams-Bakhsh M, Modarresi M (2017). Anti-VEGFR2 nanobody expression in lettuce using an infectious Turnip mosaic virus vector. *Journal Plant Biochemical Biotechnology*:1-8.
- Moussavou G, Ko K, Lee J-H, Choo Y-K (2015). Production of Monoclonal Antibodies in Plants for Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International* 2015: 9p.
- Muyldermans S, Baral T, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen V, Revets H (2009). Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary immunology and immunopathology*, 128: 178-183.
- Pereira DM, Cheel J, Areche C, San-Martin A, Roviroso J, Silva LR, Valentao P, Andrade PB (2011). Anti-proliferative activity of meroditerpenoids isolated from the brown alga *Styopodium flabelliforme* against several cancer cell lines. *Marine Drugs* 9:852-862.
- Sambrook JR, Russell D (2001). DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. *Quarterly Review of Biology* 76:348-349.
- Scott AM, Wolchok JD, Old LJ (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12:278-287.
- Streatfield SJ (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* 5:2-15.
- Thomas DR, Walmsley AM (2014). Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Reports* 33:1801-1814.
- Tian J, Yan Y, Yue Q, Liu X, Chu X, Wu N, Fan Y (2017). Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in *E. coli*. *Scientific Reports* 7:9926.
- Ullrich KK, Hiss M, Rensing SA (2015). Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 32:61-67.

- Webster GR, Teh AYH, Ma JKC (2017). Synthetic gene design-the rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants. *Biotechnology and Bioengineering* 114:492-502.
- Winichayakul S, Pernthaner A, Scott R, Vlaming R, Roberts N (2009). Head-to-tail fusions of camelid antibodies can be expressed in planta and bind in rumen fluid. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 53:111-122.
- Yarbakht M, Jalali-Javaran M, Nikkhah M, Mohebodini M (2015). Dicistronic expression of human proinsulin-protein A fusion in tobacco chloroplast. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 62:55-63.
- Youssoufian H, Hicklin DJ, Rowinsky EK (2007). Review: monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor receptor-2 in cancer therapy. *Clinical cancer research*. 13:5544s-5548s.
- Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9:28-39.

Study of the effect of codon optimization on Anti-VEGF nanobody expression

Soleimanizadeh M.¹, Bagheri A.R.², Jalali javaran M.^{*3}, Seifi A.R.⁴, Behdani M.⁵, Kazemi-lomedasht F.⁶

¹Ph.D. Student of Agriculture Biotechnology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

²Professor of Department of Biotechnology and Plant Breeding, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³Associate Professor of Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

⁴Assistant Professor of Department of Biotechnology and Plant Breeding, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

⁵Associate Professor of Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

⁶Assistant Professor of Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Plants can be exploited for the production of various recombinant proteins as valuable bioreactors because of many reasons. The use of plant viral vectors for the transient expression offers as a useful strategy for the large-scale production of proteins with pharmaceutical importance, such as antibodies within a very short time period. Today, cancer is the second cause of death in human society. Compelling evidence suggests that vascular endothelial growth factor (VEGF), due to its essential role in angiogenesis, is a critical target for cancer treatment. In This study, Anti-VEGF (Nb42) nanobody different fragments were transiently expressed under the control of a viral strong promoter in cucurbit plant using ZYMV-based viral vector. These fragments included natural nanobody sequence (Nb42I) and optimized nanobody sequence (Nb42II) for expression in plant. After inoculation of plants, the presence of transcripts of the Nb42 gene fragments in cucurbit inoculated plants was detected by using RT-PCR. Also, the recombinant protein expression was confirmed by Dot blotting, SDS-PAGE, Western blotting and ELISA. Based on the ELISA results, the expression level of Nb42I and Nb42II nanobody fragments was 2 and 6.8 µg/g of leaf tissue respectively. Taken together, recombinant Nb42 nanobody could be efficiently expressed in cucurbit plant and ZYMV-based expression system would be an appropriate platform for production of recombinant proteins in cucurbit plants

Keywords: *Transient expression, Codon optimization, Molecular farming, Viral vector, Nanobody.*

* Corresponding Author: Jalali M.

Tel+: 09123091917

Email: m_jalali@modares.ac.ir