

## بیان توالی کدکننده پروتئین شیمریک *ipaD-stxB* در باکتری *E. coli* و کاهو

زینب چقابودی<sup>۱</sup>، علیرضا عباسی<sup>۲</sup>، حسین هنری<sup>۳</sup>، دیاگو ارزانز<sup>۴</sup>، فریبا ابویی مهریزی<sup>۱</sup> و هوشنگ علیزاده<sup>۲\*</sup>  
۱، دانشجوی سابق دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۲، گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، دانشیار دانشگاه امام حسین، ۴، استاد گروه بیو تکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه پلی تکنیک، والنسیا، اسپانیا  
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۰۱)

### چکیده

شیگلوز، یک بیماری عفونی است که توسط شیگلا ایجاد می‌شود. پروتئین *IpaD* یکی از مهم‌ترین عامل‌های بیماری‌زا در شیگلا است. برای تولید پروتئین نوترکیب، توالی کدکننده *ipaD-stxB* همسانه سازی و به ناقل بیانی (+) pET28a منتقل و توسط PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. بیان پروتئین نوترکیب در باکتری (*E. coli* (BL21) با SDS-PAGE، آزمون الایزا و لکه‌گذاری وسترن تأیید شد. در این تحقیق پروتئین نوترکیب حدود ۵۴٫۸۷ درصد پروتئین کل باکتری را به خود اختصاص داد. ناقل بیانی گیاهی واجد توالی کدکننده *ipaD-stxB* با روش Golden Braid 3.0 ساخته و با کمک اگروباکتریوم سویه C58 در کاهو به صورت موقت بیان شد. بیان پروتئین نوترکیب *ipaD-stxB* در سطح رونویسی (ترانسکریپتوم) با qRT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون الایزا تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: *StxB ipaD*، آزمون الایزا، کاهو، وسترن بلائینگ.

### Expression of Schemeric Protein Coding *ipaD+stxB* in *E.coli* and Lettuce

Zeinab Chaghakboodi<sup>1,2</sup>, Alireza Abbasi<sup>2</sup>, Hossein Honari<sup>3</sup>, Diego Orzaez<sup>4</sup>, Fariba Abui Mehrizi<sup>1,2</sup> and Houshang Alizadeh<sup>2\*</sup>

1, Ph.D Graduate, 2, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran 3, University of Emam Hosein 4, Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Polytechnic University, Valencia, Spain

(Received: July 16, 2017– Accepted: August 23, 2017)

### ABSTRACT

*Shigella dysenteriae* as the primary cause of epidemic diarrhea have been reported. Shigellosis is an infectious disease caused by Shigella. The IpaD protein is one of the most important virulence factors in Shigella. For production of recombinant protein, coding sequence of *ipaD+stxB* cloned to pET28(a) expression vector and cloned gene confirmed by PCR and restriction enzyme digestions. Coding sequence expressed in *E. coli* (BL21) was confirmed by SDS-PAGE, ELISA and Western blot. The recombinant protein accounted for about 54.87% of total bacterial proteins. Plant expression vector constructed via Golden Braid method. Transient expression of *ipaD+stxB* in lettuce performed with *agrobacterium* C58 strain and was confirmed at the level of transcriptome and protein through RT-PCR and ELISA assay.

Keywords: ELISA, *ipaD*, *StxB*, Lettuce, western blot.

### مقدمه

پلی پپتید *IpaD* یکی از مهم‌ترین عامل‌های بیماری‌زای موجود در انواع شیگلا<sup>۱</sup> بوده، به‌گونه‌ای که سرآغاز و گذرگاه همه فعالیت‌های تهاجمی شیگلا مرهون فعالیت کلیدی *IpaD* است. پادتن (آنتی‌بادی) هایی که ناحیه انتهایی آمین پروتئین *IpaD* را شناسایی می‌کنند توانایی برهمکنش این پروتئین با نمک‌های صفراوی به‌ویژه دی اکسی کولات را سرکوب می‌کنند. در این حالت باکتری قادر به انجام فعالیت ویژه خود برای فراخوانی و به‌کارگیری عامل‌های لازم برای ورود به یاخته میزبان نخواهد بود. در نتیجه توان شیگلا برای ایجاد روزنه در یاخته یوکاریوتی از بین رفته و فرآیند ورود باکتری به درون یاخته میزبان سرکوب می‌شود. با توجه به اینکه ناحیه N انتهایی آمین *IpaD* یک ایمونژن<sup>۲</sup> بسیار قوی در بروز شیگلوز است می‌توان از آن در طراحی واکسن استفاده کرد (Lamphear et al., 2004). شیگاتوکسین یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیمیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل‌شونده به گیرنده (رسپتور) همو پنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی (STxA) ضروری است (Engedal et al., 2011). نتایج تحقیقات نشان داد، پلی پپتید *IpaD* می‌تواند منجر به تولید پادتن Anti-IpaD شود. همچنین مشخص شد، پیش از به‌کارگیری دیگر کمک بازدارنده (افکتور) های پروتئینی روی سطح باکتری، پادتن ضد *IpaD* با تداخل در عملکرد *IpaD* که در رأس سوزن قرار گرفته است آن را بلوکه کرده و بدین ترتیب بازدارنده انجام عملکرد *IpaD* می‌شود و در نتیجه ورود باکتری به یاخته‌های میزبان سرکوب می‌شود (Arai et al., 2001). از این‌رو این پروتئین به‌عنوان پادگن (آنتی‌ژن) نامزد واکسن شیگلوز قابلیت اتصال با یک ایمنو ادجوانت، مناسب را دارد. نتایج نشان داد، پروتئین به‌دست‌آمده از ترکیب ژن‌های *ipaD* و *stxB* می‌تواند موش سوری را نسبت به شیگا توکسین مصون کند، موش‌های ایمن شده توانستند ۷/۵ برابر LD50 شیگا توکسین *E.coli O157:H7* را تحمل کنند (Honari et al., 2013). با توجه به اینکه استفاده از

سامانه‌های گیاهی اقتصادی‌تر از تولید پروتئین نوترکیب در دیگر سامانه‌هاست، می‌توان بافت یا اندام خاصی از گیاه را که حاوی پروتئین نوترکیب مورد نظر است، به‌صورت خوراکی مصرف کرد. به کمک تولید انبوه در گیاهان، آسیب‌های ناشی از آلودگی با عامل‌های بیماری‌زای انسان به‌ویژه بیماری‌های مشترک نیز کاهش می‌یابد (Daniell et al., 2000). تولید پروتئین دارویی در گیاهان نسبت به دیگر سامانه‌های بیانی برتری‌های زیادی دارد (Commandeur et al., 2003). برتری‌هایی مانند استفاده رایگان از نور خورشید، خاک، آب، کودهای ارزان و بدون بیمارگر (پاتوژن)‌های انسانی گیاهان را برای تولید واکسن مناسب می‌سازد چراکه گیاهان توانایی انجام تغییرپذیری پس از ترجمه را دارند (Hatt et al., 1989, Ma et al., 2003). امروزه بیش از ۱۰۰ نوع پروتئین نوترکیب در گیاهان تولید شده است. کاهو گیاهی است که به‌سرعت در سرتاسر جهان برای تولید پروتئین‌های دارویی استفاده می‌شود (Kapusta et al., 1999, Zuo et al., 2001, Sun et al., 2006). انتقال ژن به کمک باکتری *Agrobacterium tumefaciens* برای تولید گیاهان تراریخته بسیار مرسوم است. بر پایه الگوی بیان ژن دو روش بیانی ثابت و موقت وجود دارد، در بیان ژن ثابت باید شرایط کشت بافتی و بازاریابی گونه گیاهی بهینه شده باشد که فرآیندی زمانبر است؛ بنابراین لازم است پیش از تراریختگی (ترانسفورماسیون) پایدار فعالیت ژن‌ها بررسی شود. امروزه برای بررسی بیان ژن از بیان موقت به کمک باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به‌عنوان آگرواینفیلتریشن استفاده می‌شود (Obembe et al., 2011). با بیان موقت ژن در مدت‌زمان کوتاهی میزان زیادی از پروتئین هدف به دست می‌آید که دستیابی به چنین محصولی در این مدت‌زمان با روش‌های انتقال دائم امکان‌پذیر نیست، همچنین در بیان موقت، ژن تحت تأثیر ادغام کروموزمی و اثر مکانی قرار نمی‌گیرد (Wang & Ma, 2012). نخستین گام در زراعت مولکولی و تولید واکسن‌های زیرواحدی در گیاهان یافتن گیاه میزبان مناسب است. بهترین روش و نزدیک‌ترین روش برای دستیابی به این واقعیت، بیان موقت ژن مورد نظر در این گیاهان و بررسی کیفیت و کمیت تولید آن‌ها است (Li et al., 2007). با انتخاب گیاهانی مانند سبزی‌ها و میوه‌ها به‌عنوان سامانه بیانی می‌توان از آن‌ها به‌عنوان منبع

۱-Shigella

۲-Immunogen

شامل ۴۰ نانوگرم محصول بازیابی شده از روی ژل، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰٫۵ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر بافر *Pfu 10X-buffer* به صورت ۹۴ درجه سلسیوس ۴ دقیقه، ۵۸ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، و ۷۲ درجه سلسیوس ۱۵ دقیقه انجام شد و پس از پایان این واکنش آغازگرهای اختصاصی *ipaDF* و *stxB* (۲۰ پیکومول از هر آغازگر) به مخلوط واکنش اضافه شد و واکنش PCR معمولی با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و با شرایط زیر انجام شد (جدول ۲). پس از الحاق قطعه‌های ژنی و ساخت پروتئین نوترکیب برای تأیید درستی کار تعیین توالی (توسط شرکت بایونیر، کره جنوبی) انجام شد.

#### انتقال سازه های ژن کد کننده پروتئین نوترکیب در *E. coli*

عامل بیانی *pET28a(+)* حاوی ژن‌های *stxB + ipaD* با روش تکانه (شوگ) دمایی به یاخته‌های مستعد (به روش کلرید کلسیم) (Sambrook and Russell, 2001)، اشرشیاکلی سویه بیانی BL21 منتقل شد و غربالگری همسانه‌های به دست آمده روی محیط LB آگار حاوی ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین انجام شد. درستی همسانه‌سازی توسط هضم آنزیمی تأیید شد (شکل ۳). روش کار بنا بر دستورکار Nezhad moghadam et al. (2006) انجام شد.

#### تأیید پروتئین نوترکیب

برای تخلیص پروتئین نوترکیب از فام‌نگاری (کروماتوگرافی) جذبی Ni-NTA آگارز با دستورکار شرکت کیاژن (Ni-NTA Agarose 25ml nickel-) (charged resin USA, Cat no. 30210) استفاده شد.

برای انجام آزمون الیزا استخراج پروتئین کل در سه تکرار زیستی (بیولوژیکی) انجام و آزمایش در دو تکرار فنی و با استفاده از آنتی سرم *ipaD* (تهیه شده از دانشگاه امام حسین (ع)) با نسبت ۱:۲۰۰ و آنزیم کانزوگه HRP انجام شد.

#### تأیید پروتئین نوترکیب با لکه گذاری وسترن

برای بررسی پروتئین نوترکیب به دست آمده از باکتری-های تراریخت شده با سازه بیانی *pET28a(+)* آزمون وسترن بلات انجام شد. به این منظور ۱۵ میکروگرم از پروتئین باکتری در کنار نمونه شاهد (باکتری میزبان بدون سازه) روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد جداسازی شد.

آنتی ژن برای واکسینه کردن (واکسیناسیون) به صورت خوراکی استفاده کرد (Twyman et al., 2003). از آنجا که پروتئین *ipaD* نقش مهمی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیلا دارد در این تحقیق، برای بیان آنتی ژن ایمونوزنیک برای بیماری شیگلوز از انتهای آمین پروتئین *IpaD* و زیر واحد B شیگاتوکسین (*StxB*) (به منظور افزایش تحریک سیستم ایمنی به عنوان ادجوانت) متصل شده بود استفاده شد. ژن شیمیریک در باکتری *E. coli* و گیاه کاهو بیان شد.

#### مواد و روش‌ها

##### طراحی کاست ژنی در ناقل *pET28a(+)*

توالی *ipaD* و *stxB* از بانک ژن دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد. بر پایه نوع نیاز آغازگرها طراحی (جدول ۱) و توسط شرکت بایونیر<sup>۳</sup> کره جنوبی ساخته (سنتز) شد. با توجه به نوع طراحی، جایگاه‌های برشی و نیز لینکر فورینی (شش اسید آمینه که به ترتیب شامل 5' Gly-Val-Arg-Arg-His-Arg3" است، برای این کاست تعبیه و در ناقل (وکتور) بیانی *pET28a(+)* همسانه سازی شد.

##### الحاق قطعه‌های ژنی *ipaD* و *stxB* با روش SOEing PCR

در آغاز واکنش PCR به منظور افزایش قطعه ژنی *ipaD* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ipaDF* و *ipaDSR* توسط آنزیم *Pfu* (تهیه شده از شرکت ترموساینس، کد آنزیم Ep0501) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (شکل ۲-الف) و پس از آن واکنش PCR برای افزایش قطعه ژنی *stxB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ipaDSF* و *stxBR* توسط آنزیم *Pfu* در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (شکل ۲-ب). هر واکنش شامل ۴۰ نانوگرم DNA الگو، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰٫۵ میلی مولار، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر بافر *Pfu 10X-buffer* در دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس بهینه شد. خالص سازی قطعه‌ها از روی ژل با روش گلس میلک (با روش راسل و سمبروک، ۲۰۰۱) انجام شد. سپس برای انجام سوئینگ (Soeng) پی‌سی‌آر (شکل ۲-ج) در آغاز یک واکنش PCR آغازین

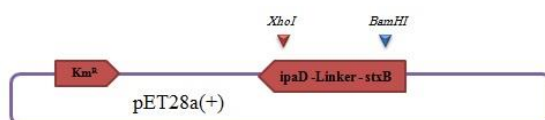
از آنزیم کانژوگه آلکالین فسفاتاز و سوبسترای BCIP/NBT برای آشکارسازی نوار (باند) مربوط به پروتئین نوترکیب استفاده شد (بر پایه دستورکار شرکت (Abcam).

انتقال پروتئین از ژل اکریلامید به غشای PVDF انجام و انسداد (بلاکینگ) به منظور نداشتن اتصال غیراختصاصی با استفاده از BSA ۳ درصد انجام شد. در این آزمون از پادتن آنتی هیستیدین تگ به نسبت ۱:۴۰۰۰ و همچنین پادتن پلی کلونال اختصاصی *ipaD* به نسبت ۱:۲۰۰ استفاده شد. در فاصله هر مرحله شستشو با بافر PBS-T سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. همچنین

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای کاست ژنی *ipaD-stxB*

Table1. Primers used for gene cassette *ipaD-stxB*

Name	Sequence
IpaDF	5'GTCGACGGATCCCGTACCACCAACCAGGCGC3'
IpaDSR	5'GGTGTAAGAAGACACCGCGT3'
IpaDSF	5'GCGGTGTCTTCTTACACCCGTGCGCGTCGTACCCCG3'
StxBR	5'GGTACCCTCGAGACGGAAGATAACTTCAGAGAA3'



شکل ۱. نمای کلی سازه بیانی باکتریایی

Figure 1. Schematic of bacterial expression construel

جدول ۲. چرخه حرارتی انجام شده برای واکنش SOEing PCR

Table2. Thermal cycles for SOEing PCR

Time	Temperature	Process
min 4	94°C	(Denaturing)
second 35	94°C	(Denaturing)
econd 35	58°C	(Annealing)
second 35	72°C	(Extension)
min 10	72°C	(Final extension)

طراحی آغازگر با روش گلدن برید 2006 (Orzaez) انجام و توسط شرکت سیگما ساخت شد (جدول ۳).

بیان موقت سازه ژنی در گیاه کاهو

طراحی آغازگر و ساخت سازه گیاهی

با توجه به ترادف ژن توالی کدکننده *ipaD* و *stxB*

جدول ۳. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای کاست ژنی *ipaD-stxB* برای انتقال موقت به گیاه کاهو

Table3. Primers used for gene cassette *ipaD-stxB* for transient expression to lettuce

Sequenc	Name
5'GCGCCGTCTCGCTCGAATGGGATCCCGTACCACCA3'	Forward
5'GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTTAACGGAAGATAACTTCAGAGAA3'	Revers

محصول PCR در پلاسמיד pUPD2 (شکل ۴-الف) با دستورکار کیت گلدن برید انجام شد (Orzaez, 2016).

همسانه سازی محصول PCR و ساخت سازه گیاهی

به روش Golden Braid

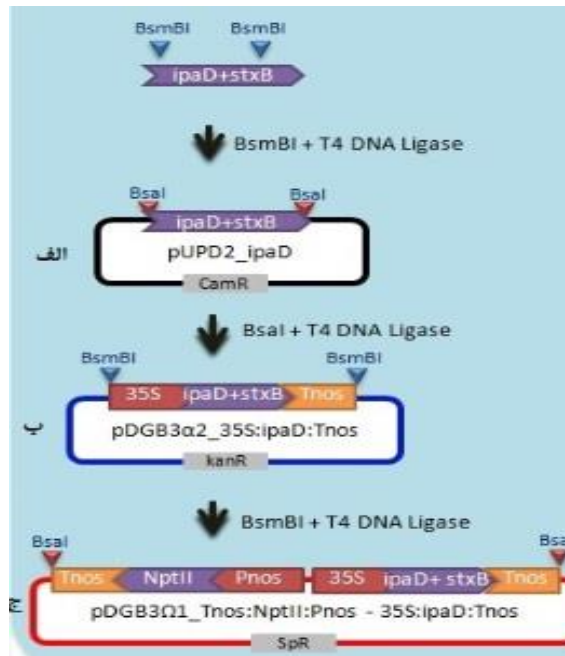
همسانه سازی در ناقل Universal Domesticator

ساخت واحدهای بیانی در ناقل سطح آلفا واحدهای بیانی متشکل از راه انداز، توالی کننده و

پس از انجام PCR، بازیابی محصول PCR با استفاده از دستورکار کیت شرکت کایژن انجام شد. همسانه سازی

می‌شدند (شکل ۴-ب). الحاق نهایی به پلاسمید pDGB3Ω1 (شکل ۴-ج) با دستورکار کیت گلدن برید Orzaez (2006) انجام شد.

پایان‌دهنده است که در ناقل pDGB سطح آلفا همسانه‌سازی می‌شوند. درواقع ناقل UD حاوی توالی مورد نظر که از لحاظ توالی نیز تأیید شده‌اند به‌عنوان الگو برای واکنش GB-BsaI و ساخت واحدهای بیانی استفاده



شکل ۴. نمای کلی ساخت سازه گیاهی

Figure 4. Schematic of plant vector

پس‌از آن نمونه‌های گیاهی در نیتروژن مایع فریز و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند.

**تأیید پروتئین نو ترکیب در کاهو با آزمون الایزا**  
از نمونه‌های انتقال موقت استخراج پروتئین انجام (Guy *et al.*, 1992) و بر پایه روش (Bradford, 1976) تعیین غلظت پروتئین‌ها صورت گرفت. روش کار با دستورکار (Engvall & Perlmann, 1971) انجام شد.

#### استخراج RNA ، ساخت cDNA و شرایط واکنش PCR

برای ارزیابی نمونه‌های انتقال موقت کاهو در سطح RNA، استخراج از نمونه‌های گیاهی در سه تکرار زیستی با استفاده از کیت استخراج RNA با دستورکار شرکت دنایست انجام شد. تیمار با DNaseI و ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت تاکارا و با دستورکار آن شرکت انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده بنا بر جدول ۴ بوده است.

#### مواد گیاهی مورد استفاده

در این تحقیق از گیاه کاهوی ایرانی رقم TN-96-39 (تهیه‌شده از بانک ژن گیاهی ایران) برای انتقال موقت و بررسی بیان پادگن‌ها استفاده شد. بذرها در محیط 1/2MS در دوره ۸/۱۶ روشنایی/ تاریکی قرار گرفتند. برای همسانه‌سازی از باکتری *Escherichia coli* سویه DH5a و برای انتقال سازه‌ها به گیاه از *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 استفاده شد.

#### انتقال موقت سازه ژنی به گیاه

سازه ژنی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 به روش انجماد و ذوب منتقل شد (Wang, 2015). برای انتقال به گیاه، محیط اینفیلتراسیون کاهو با دستورکار (Kapila *et al.*, 1997) آماده و پس از دو ساعت نگهداری آگروباکتریوم در محیط اینفیلتراسیون، انتقال به برگ‌های کاهو تحت خلأ انجام شد. برگ‌ها به مدت ۳ روز در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند و

جدول ۴. توالی آغازگرهای مورد استفاده در ارزیابی بیان موقت پروتئین نو ترکیب.

Table 4. Primers used for qRT-PCR

Name	Sequence
R.SH.F	5'GCAAGAAGGAATACCCGATCAA3'
R.SH.R	5'CAGGTACTGCTCGTTGATGTT3'
F.Actin	5'TGATTGGAATGGAAGCTGCTG3'
R.Actin	5'CAGTGATTTTCCTTGCTCATCCG3'

### نتیجه‌گیری و بحث

#### هضم ناقل (pET28a(+))

پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E. coli* *Bl21DE3* انتقال داده شد. به منظور تأیید حضور قطعه در ناقل بیانی از هضم آنزیمی توسط آنزیم با اثر محدود *BamHI* استفاده شد که در این حالت ژن *ipaD* که حدود ۳۲۰ جفت باز طول دارد، از ناقل خارج شد (شکل ۳).

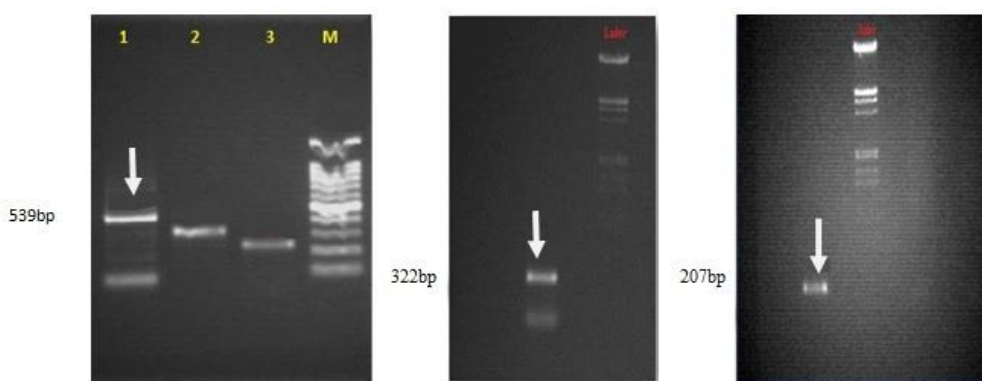
#### افزایش و الحاق قطعه‌های ژنی *ipaD+stxB* با روش

##### سوئینگ پی سی ار

نتایج به دست آمده از افزایش ژن *ipaD-stxB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در شکل ۲ نشان داده شده است. قطعه ۵۳۹ جفت بازی به دست آمده از انجام **SOEing PCR** با آنزیم *Pfu* روی ژل آگارز تأییدی بر درستی افزایش قطعه مورد نظر است.

### بررسی بیان ژن نسبی در سطح رونویسی

برای بررسی پادگن *IpaD* در سطح رونویسی، پس از ۷۲ ساعت از اینفیلتراسیون، استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت دناریست برای گیاه تراریخت (بیان موقت) و گیاه شاهد (بدون سازه مورد نظر) در سه تکرار زیستی انجام شد. نمونه‌های cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت تاکارا و بر پایه دستورکار مربوطه ساخته شد. به منظور اجزای واکنش RT-PCR واکنش به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر کیت 5X HOT FIREPol حاوی اواگرین، ۰/۴ μM آغازگر پیشرو، ۰/۴ آغازگر پسرو و ۶۰۰ نانوگرم cDNA بود. برای نرمال سازی نتایج ژن مرجع اکتین استفاده شد. تجزیه نتایج با استفاده از نرم افزار REST2009 حضور رونوشت پادگن *IpaD* را در گیاه کاهو تأیید می کند. آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای ژن خانه دار اکتین در جدول ۴ ارائه شده است.



ج

ب

الف

شکل ۲. امتزاج توالی کدکننده پادگن *ipaD* و *stxB* با روش **SOEing PCR** (الف) تکثیر قطعه ژنی *ipaD* (ب) افزایش قطعه ژنی *stxB* (ج) تکثیر قطعه‌های ژنی *ipaD* و *stxB* با سوئینگ پی سی آر، چاهک شماره ۱ قطعه ژنی به دست آمده از ترکیب *ipaD* و *stxB* چاهک شماره ۲ افزایش قطعه ژنی *ipaD*، چاهک شماره ۳ افزایش قطعه ژنی *stxB* و M نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 2. Fusion of *ipaD* and *stxB* by SOEing PCR. A: Amplification of *stxB*, B: Amplification of *ipaD*, C: Amplification of *ipaD* + *stxB* by SOEing PCR, lane 2 amplification of *ipaD*, lane 3 amplification of *stxB* and M molecular size marker 100bp. Agarose gel 1%.



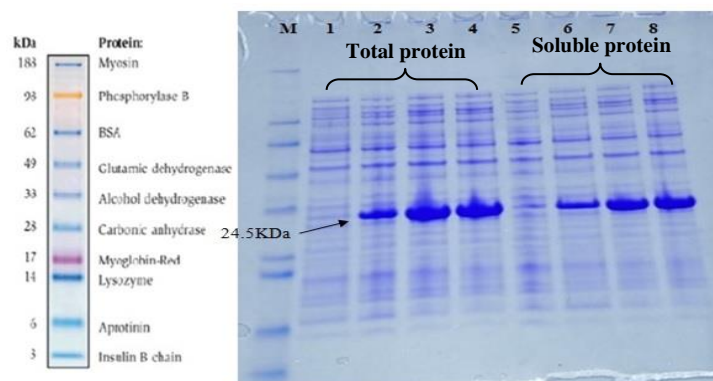
شکل ۳. هضم ناقل بیانی pETipaD + STxB با آنزیم BamHI. ستون‌های ۱ و ۲ پلاسمید هضم شده. ستون‌های ۳ و ۴ پلاسمید. ستون ۵ نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی.

**Figure 3. Digestion of expression vector pETipaD+stxB with BamHI enzyme. Columns 1 and 2; digested plasmids. Columns 3 and 4; plasmids (control). Column 5; molecular size marker 100bp.**

استخراج و روی ژل اکریلامید جداسازی شدند. الگوی پروتئین‌های تولیدی از هر استخراج مشاهده می‌شود. همچنین پروتئین خالص با وزن مولکولی ۲۴,۵ کیلودالتون در محدوده وزنی مورد انتظار روی ژل مشاهده شد. همچنین نتیجه تخلیص پروتئین‌های نوترکیب حاصل از عصاره پروتئینی باکتری حاوی سازه موردنظر که با استفاده از روش فام‌نگار جذبی Ni-NTA آگارز به دست آمد، در شکل ۵ مشاهده می‌شود. نتایج به دست آمده با نتایج (Honari et al., 2013) همخوانی داشت.

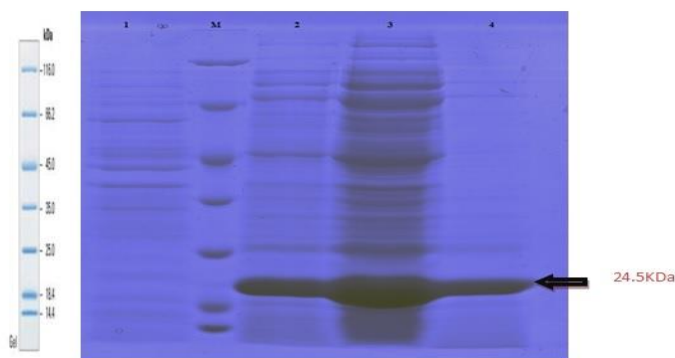
### نتایج بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* سویه BL21 (DE3)

پس از بیان اولیه پروتئین‌های نوترکیب در باکتری و مقایسه زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، زمان ۴ ساعت پس از القا برای نمونه‌برداری در نظر گرفته شد. نتایج الگوی نواری پروتئین‌های نمونه شاهد (باکتری بدون ناقل) و مقایسه با پروتئین‌های تولیدشده از باکتری حاوی سازه معرفی شده در شکل (۵)، نشان داده شده است. پروتئین ناشی از القای باکتری BL21 حاوی سازه pETipaD-stxB در حالت غیرالقایی، القاشده با IPTG و همچنین نمونه پروتئین حاصل از باکتری شاهد (بدون سازه)



شکل ۵- بیان پروتئین نوترکیب ipaD+stxB در باکتری BL21. چاهک شماره ۱ نمونه شاهد (باکتری بدون القا)، شماره‌های ۲، ۳ و ۴ (نمونه‌برداری در زمان‌های ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از القا، پروتئین کل)، چاهک شماره ۵ نمونه شاهد (باکتری بدون القا)، شماره‌های ۶، ۷ و ۸ (نمونه‌برداری در زمان‌های ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از القا، پروتئین محلول). در هر دو حالت (پروتئین کل و پروتئین محلول) پروتئین با وزن مورد انتظار در موقعیت ۲۴,۵ کیلودالتون نشانگر پروتئینی مشاهده شد. حرف M نشانگر اندازه پروتئینی See Blue(NuPAGE)MES است.

**Figure 5. Expression of recombinant protein ipaD+stxB in BL21. Column 1; control, columns 2, 3 and 4; sampling 1, 2 and 4h after induction (total protein), column 5; control, columns 6, 7 and 8; sampling 1, 2 and 4h after induction (soluble protein). M marker size protein (Blue) (SDS PAGE 12%).**



شکل ۶. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب *ipaD+stxB* بیان شده در باکتری BL21. ستون ۱ شاهد (باکتری بدون سازه)، حرف M نشانگر اندازه پروتئینی Unstained Protein marker Fermentas. ستون ۲ و ۳ باکتری حاوی سازه مورد نظر پیش از تخلیص، ستون ۴ باکتری حاوی سازه مورد نظر پس از خالص‌سازی با روش فام‌نگاری جذبی Ni-NTA آگارز.

**Figure 6. Purification of recombinant protein *ipaD+stxB* expressed in BL21. Column 1; control, M marker size protein. Columns 2 and 3; bacterial extract before purification; column 4; bacteri after purification with Ni-NTA agaros absorbtion chromatography (SDS PAGE 12%).**

بنابراین برای ۶ میکروگرم پروتئین کل مورد استفاده در آزمون ۵۴/۸۷ درصد پادگن محاسبه شد. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج (Shokriani Hajibehzad *et al.*, 2016) (Honari *et al.*, 2013) همخوانی داشت.

برای بررسی وجود پادگن *ipaD-stxB* در پروتئین کل حاصل از سازه *pETipaD-stxB*، آزمون الایزا با استفاده از پادتن اختصاصی *ipaD* انجام شد. نتیجه این آزمون که با استفاده از چهار تکرار زیستی و دو تکرار فنی و چهار میزان متفاوت پروتئین کل به دست آمد نشان داد، بین نمونه‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری از نظر میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر وجود دارد (شکل ۷-الف)، بدون در نظر گرفتن درصد پادگن تولیدی می‌توان گفت که معنی‌دار شدن تفاوت نمونه‌ها و شاهد، دست‌کم گویای تولید پروتئین نوترکیب در باکتری با قابلیت واکنش با پادتن است. همچنین نتایج بیان باکتریایی پروتئین نوترکیب، نشان داد که وجود اجوان *stxB* احتمال دارد سبب نامحلول شدن پروتئین نوترکیب شود و این ویژگی می‌تواند سهم پادگن را در پروتئین کل افزایش دهد زیرا نامحلول شدن پروتئین‌ها امکان دور ماندن از دسترس پروتئین‌ها را فراهم می‌کنند (Aboei Mehrizi *et al.*, 2016).

**تأیید پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی با استفاده از آزمون وسترن بلاتینگ**  
برای تأیید پروتئین نوترکیب حاصل از سازه‌های باکتریایی

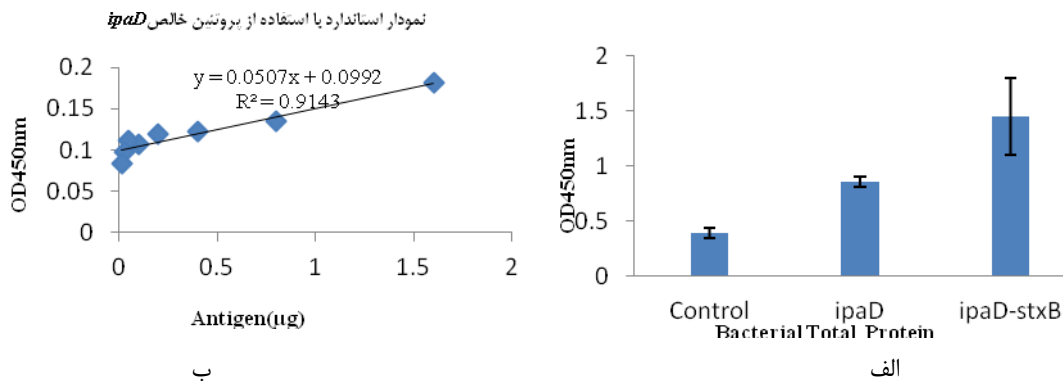
### نتایج بررسی پروتئین‌های نوترکیب باکتری با استفاده از آزمون الایزا

بررسی واکنش پادگن تولیدی حاصل از سازه (شکل ۷-الف) در *E. coli* با استفاده از پادتن آنتی‌هیستیدین‌تگ و همچنین پادتن اختصاصی پادگن از آزمون الایزا انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون الایزا به دو صورت کیفی و کمی ارائه شد. در گزارش نتایج به‌صورت کیفی، تنها تفاوت میزان جذب نمونه حاوی پروتئین نوترکیب و میزان جذب حاصل از نمونه شاهد در طول موج ۴۵۰ نانومتر با هم مقایسه شدند. در آزمون کمی از نمودار استاندارد استفاده شد. به این منظور از مقادیر مختلف پادگن خالص در آزمون الایزا استفاده و میزان جذب در ۴۵۰ نانومتر به دست آمد. با استفاده از میزان پادگن خالص و میزان جذب در ۴۵۰ نانومتر، نمودار استاندارد ترسیم و معادله خط به دست آمد (شکل ۷-ب). از این معادله خط برای برآورد میزان برآوردی پروتئین نوترکیب موجود در پروتئین باکتری استفاده شد تا نتیجه آزمون به‌صورت کمی قابل ارائه باشد. نتایج بررسی روی پروتئین کل باکتری BL21 حاوی سازه *pETipaD-stxB* نشان داد، میزان جذب به‌دست‌آمده از آزمون الایزا در نمونه‌های پروتئین کل حاصل از باکتری‌های حاوی سازه و پروتئین کل شاهد تفاوت معنی‌داری دارند (شکل ۷-الف)، که این تفاوت تولید پروتئین نوترکیب و قابلیت برهمکنش با پادتن مونوکلونال آنتی‌هیستیدین‌تگ را نشان می‌دهد.



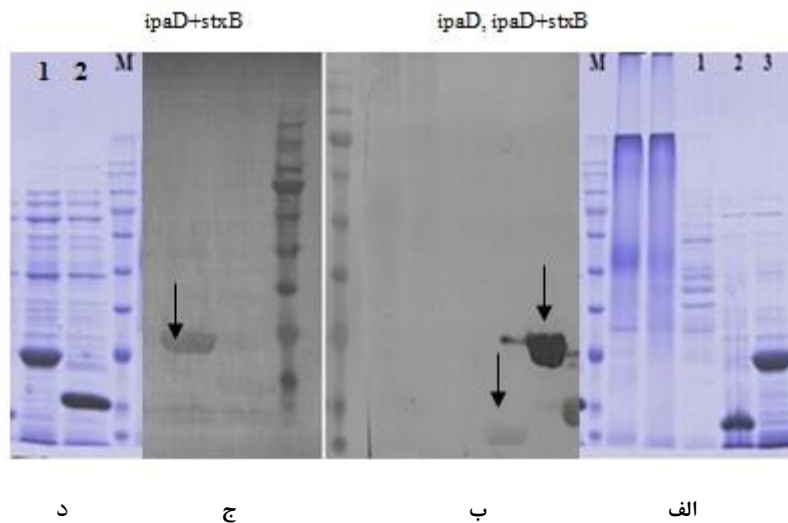
پادتن اختصاصی (شکل ۸-ج) انجام شد در شکل (۸) ارائه شده است.

در *E. coli* آزمون وسترن بلات انجام شد. نتیجه این آزمون برای پروتئین حاصل از سازه **pETipaD-stxB** که با استفاده از پادتن آنتی هیستیدین تگ (شکل ۸-ب) و



شکل ۷. آزمون الایزا برای پروتئین نو ترکیب *ipaD+ stxB* در باکتری **BL21** (الف) مقایسه میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای پروتئین شاهد (بدون سازه) و پروتئین باکتری **BL21** حاوی سازه در آزمون الایزا با استفاده از پادتن اختصاصی *ipaD* (ب) معادله خط حاصل از این نمودار استاندارد برای برآورد میزان پادگن *ipaD-stxB* در پروتئین کل مورد ارزیابی استفاده شد.

**Figure 7. ELISA for recombinant protein expressed in BL21. A) absorbtion in 450 nm with polyclonal antibody against ipaD. B) Standard curve for ipaD used polyclonal antibody against ipaD as a first antibody.**



شکل ۸. آزمون وسترن بلات برای تأیید پروتئین نو ترکیب *ipaD+ stxB* در باکتری (الف) شماره ۱ شاهد (بدون سازه) شماره ۲ (پروتئین *ipaD*) و شماره ۳ (پروتئین *ipaD-stxB*). حرف M مارکر پروتئینی **Prestained protein ladder10-170** (ب) وسترن بلات با پادتن آنتی هیستیدین تگ (ج) وسترن بلات با پادتن اختصاصی *ipaD*. (د) شماره ۱ (پروتئین *ipaD-stxB*) شماره ۲ (پروتئین *ipaD*) و حرف M نشانگر پروتئینی.

**Figure 8. Western blotting for confirm expression of recombinant protein in bacteria. A) Column 1; control (Bacteria without construct), column 2; ipaD protein and column 3; ipaD+stxB protein. M; marker size ladder. B) Western blotting with anti tagged histidin C) western blotting with polyclonal antibody against ipaD. D) Column 1; ipaD+stxB protein; column 2; ipaD.**

به دست آمده از باکتری حاوی سازه و پروتئین کل شاهد تفاوت معنی داری دارند، که این تفاوت تولید پروتئین

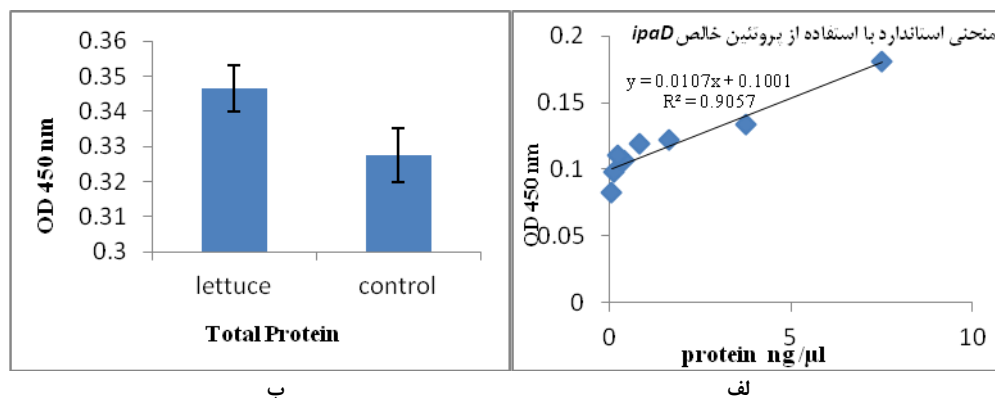
بنا بر نتایج به دست آمده در این تحقیق میزان جذب به دست آمده از آزمون الایزا در نمونه های پروتئین کل

تحقیق پس از استخراج پروتئین از برگ‌های اینفیلتره شده گیاه کاهو (تجاری) آزمون الیزا انجام شد. در این تحقیق از سه تکرار برای گیاهان تراریخت و سه تکرار برای گیاه شاهد استفاده شد و نتایج به‌دست‌آمده از رنگ تولیدشده تجزیه آماری شد. همه نتایجی که بیان می‌شود پس از تجزیه آماری با نرم‌افزار SPSS در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار شدند. در شکل ۹-الف مقایسه بین میزان جذب و میزان پادگن در گیاه کاهو و همچنین در نمونه شاهد ارائه شده است. در نظام انتقال موقت عامل‌های مختلفی از جمله شمار روز پس از اگرواینفیلتراسیون تا زمان نمونه‌برداری بر میزان بیان پروتئین نوترکیب تأثیر دارد، بنابراین در ۲ تا ۳ روز پس از اگرواینفیلتراسیون بیشترین بیان پروتئین مشاهده شده و پس‌از آن کاهش می‌یابد (Choi et al., 2008).

نوترکیب و قابلیت برهمکنش با پادتن را نشان می‌دهد. همچنین در روش لکه‌گذاری وسترن در ناحیه موردنظر ستونی که باکتری‌های واجد سازه قرار گرفته بود نوار مشاهده شد. نتایج بررسی‌های (Honari et al., 2015) نشان داد، با ترکیب کردن *ipaD-stxB* میزان عیار (تیتراژ) پادتن و ایمنی‌زایی در حیوان آزمایشگاهی افزایش می‌یابد. تولید پروتئین نوترکیب *ipaD-stxB* می‌تواند به ایمنی‌زایی در برابر شیگلوز کمک کرده و روزنه‌ای برای تولید واکسن نامزد ایجاد کند.

### تأیید پروتئین نوترکیب در کاهو با آزمون الیزا

تولید پروتئین‌ها در سامانه بیان موقت یکی از سازوکارهای مهم در بررسی بیان پروتئین‌های تولیدشده و بررسی میزان مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب است. در این



شکل ۹. آزمون الیزا برای پروتئین نوترکیب *ipaD+stxB* در گیاه کاهو (الف) مقایسه میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای گیاه شاهد (بدون سازه) و گیاه حاوی پروتئین نوترکیب با استفاده از پادتن اختصاصی *ipaD* (ب) معادله خط به‌دست‌آمده از این نمودار استاندارد برای برآورد میزان پادگن *ipaD-stxB* در پروتئین کل مورد ارزیابی استفاده شد.

Figure 9. ELISA for recombinant protein *ipaD+stxB* expressed in lettuce. A) absorbance in 450 nm with *ipaD* polyclonal antibody B) Standard curve for *ipaD+stxB* used *ipaD* polyclonal antibody.

کل (%TSP)<sup>۵</sup> محاسبه شد. میزان درصد پادگن نسبت به پروتئین کل محلول حدود ۰/۲۵ درصد برآورد شده است.

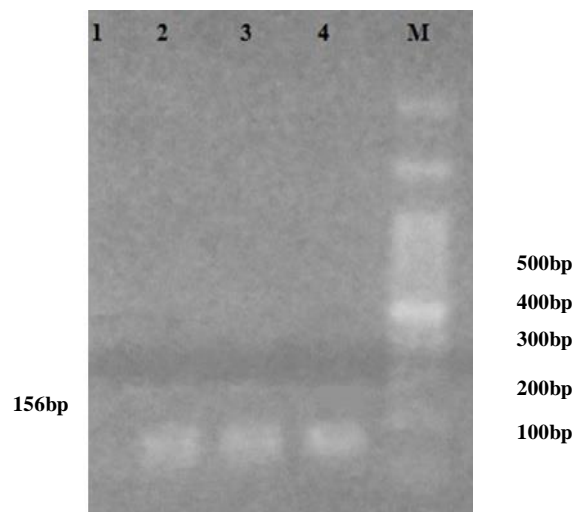
### نتیجه بررسی بیان ژن در سطح رونویسی

به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها برای انتقال موقت سازه گیاهی از qRT-PCR استفاده شد. در شکل ۱۰ واکنش PCR برای انتقال موقت سازه با استفاده از آغازگرهای *ipaD* روی سه تکرار زیستی برای کاهو و نمونه شاهد (نمونه برگ‌های غیرتراریخته) انجام شد. چنانچه در تصویر ژل

به‌منظور ترسیم نمودار استاندارد از پروتئین خالص *ipaD* غلظت‌های مختلف استفاده شد و بر پایه رابطه غلظت پادگن خالص و میزان جذب به‌دست‌آمده از نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر، نمودار استاندارد و معادله خط مربوط به آن به دست آمد. در شکل ۹-الف میزان جذب نمونه‌های بیان موقت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با هم مقایسه شده‌اند. در ادامه به کمک معادله خط به‌دست‌آمده از نمودار استاندارد (شکل ۹-ب)، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به میزان پادگن تبدیل و میزان پروتئین نوترکیب به‌دست‌آمده از بیان موقت نمونه‌های برگ‌های کاهو بر پایه درصد پادگن تولیدی نسبت به پروتئین

۵- Total soluble protein (%TSP)

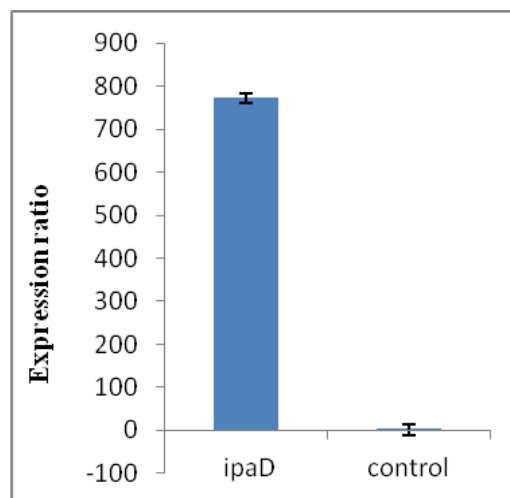
مشاهده می‌شود نوار مربوط به قطعه *ipaD* تنها در سه تکرار زیستی کاهو مشاهده می‌شود و کنترل منفی شامل نمونه شاهد، نواری را نشان نداد.



شکل ۱۰. RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *ipaD* به منظور تأیید رونویسی از روی توالی کدکننده *ipaD* روی نمونه‌های کاهو پس از آگرواینفیلتراسیون (ژل آگارز یک درصد) چاهک شماره ۱ شاهد (کاهو)، شماره ۲، ۳ و ۴ گیاه کاهو بیان‌کننده پادگن *ipaD* نشانگر

اندازه مولکولی DNA Ladder, 100 bp Plus, Sinaclon

**Figure 10.** RT-PCR with specific primers of *ipaD* for confirm transcription of *ipaD* in lettuce after agroinfiltration. Column 1; control, columns 2, 3 and 4; transient expression. M molecular size ladder 100 bp. Sinacolon (Agarose gel 1%).



شکل ۱۱. بیان نسبی *ipaD* اندازه‌گیری شده با q-RT-PCR در برگ کاهو.

**Figure 11.** Relative expression *ipaD* measured via q-RT-PCR in lettuce leaves.

های مختلف در بافت برگ و هزینه‌های پایین دستی کم برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب بسیار مورد توجه است (Negrouk *et al.*, 2005).

#### نتیجه‌گیری کلی

نتیجه به دست آمده از بیان پروتئین نو ترکیب *ipaD-stxB* در باکتری، پروتئینی با وزن مولکولی ۲۴٫۵ کیلودالتون در

در نتایج بررسی‌های خود (Pourseyedi *et al.*, 2009) نشان دادند، یونجه و توتون در مقایسه با کاهو قابلیت و ظرفیت (پتانسیل) بیشتری برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارند. بافت برگ کاهو محتوای آب بالایی دارد و پروتئین‌ها در این شرایط پایداری خوبی نداشته و تجزیه می‌شوند به همین دلیل میزان بیان در کاهو پایین است (Hefferon, 2009). کاهو به دلیل میزان اندک آلکالوئید-

کردن نتایج آزمون الایزا، مشخص شد، درمجموع پروتئین نوترکیب ۰/۲۵ درصد پروتئین محلول کل برگ کاهو را به خود اختصاص داده است. مقایسه سامانه بیانی باکتری و گیاه نشان‌دهنده میزان بالای تولید پادگن (۵۴/۸۷ درصد پروتئین کل) در باکتری نسبت به گیاه (۰/۲۵ درصد پروتئین محلول کل برگ) است. اما تولید و بیان پروتئین نوترکیب در گیاه به‌منظور تولید واکسن گیاهی خوراکی اهمیت دارد.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از اعضاء هیئت علمی و کارکنان گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، که امکانات اجرای این طرح را فراهم نمودند قدردانی می‌شود.

محدوده وزنی مورد انتظار روی ژل اکریل‌امید نشان داد. آزمون الایزا تفاوت معنی‌داری را بین نمونه‌های پروتئین کل به‌دست‌آمده از باکتری‌های حاوی سازه و پروتئین کل شاهد (باکتری‌های بدون سازه) نشان داد که بیانگر تولید پادگن و قابلیت برهمکنش آن با پادتن پلی کلونال *ipaD* است. برحسب برآورد، پادگن تولیدی (۵۴/۸۷ درصد پروتئین کل باکتری) را به خود اختصاص داده است. لکه‌گذاری وسترن با پادتن پلی کلونال *ipaD* و پادتن اختصاصی مونوکلونال آنتی هیستیدین تگ تولید پروتئین نوترکیب را تأیید کرد. سازه ساخته‌شده برای تولید پادگن *ipaD+stxB* در گیاه با انتقال موقت به کمک آگروباکتری به کاهو در سطح RNA با استفاده از RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون الایزا تأیید شد. همچنین با ترسیم نمودار استاندارد با استفاده از پادگن خالص *ipaD* و کمی

### REFERENES

1. Aboei Mehrizi, F. A., Abbasi, A., Honari, H. & Alizadeh, H. (2016). The use of viral translation enhancer and suppressor of gene silencing 2b to construct binary vector for high expression of protective antigen and lethal factor of the bacteria that cause anthrax. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 47(3), 353-366. (In Farsi).
2. Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N. & Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein engineering*, 14(8), 529-532.
3. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
4. Choi, M. S., Yoon, I. S., Rhee, Y., Choi, S. K., Lim, S. H., Won, S. Y., ... & Lomonosoff, G. (2008). The effect of Cucumber mosaic virus 2b protein to transient expression and transgene silencing mediated by agro-infiltration. *Plant Pathol J*, 24, 296-304.
5. Commandeur, U., Twyman, R. M. & Fischer, R. (2003). The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet*, 5(110), 1-9.
6. Daniell, H., Streatfield, S. J. & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science*, 6(5), 219-226.
7. Engedal, N., Skotland, T., Torgersen, M. L. & Sandvig, K. (2011). Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microbial biotechnology*, 4(1), 32-46.
8. Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
9. Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. & Smelser, C. (1992). Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, 188(2), 265-270.
10. Hefferon, K. L. (2009). *Biopharmaceuticals in plants: toward the next century of medicine*. CRC Press.
11. Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342(6245), 76-78.
12. Honari, H., Amlashi, I., Minaei, M. E., & Safaei, S. (2013). Immunogenicity in guinea pigs by IpaD-STxB recombinant protein. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*, 4 (73), 84 - 93. (In Farsi).
13. Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant science*, 122(1), 101-108.
14. Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O. & Legocki, A. B. (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB Journal*, 13(13), 1796-1799.
15. Lamphear, B. J., Jilka, J. M., Kesi, L., Welter, M., Howard, J. A., Streatfield, S. J. (2004). A corn-based delivery system for animal vaccines: An oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Vaccine*, 22(19), 2420-2424.
16. Li, J., Chen, M., Liu, X. W., Zhang, H. C., Shen, F. F. & Wang, G. P. (2007). Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 112(3), 258-265.
17. Ma, J. K., Drake, P. M. & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical

- proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 794-805.
18. Nezhad moghadam, M. R. Modaresi, M. H. Bababshamsi, M. & Chanankhah, M. (2006). Streptokinase, extraction, cloning and expression of high recombinant active protein by the simplification approach in the purification process. *Research in medicine*. 30(3), 245-252. (In Farsi).
  19. Niyogi, S. K. (2005). Shigellosis. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43(2), 133-143.
  20. Obembe, O. O., Popoola, J. O., Leelavathi, S. & Reddy, S. V. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology advances*, 29(2), 210-222.
  21. Orzaez, D. (2016). lab Golden Braid 3.0 kit.
  22. Pourseyedi, S., Hashemi Sohi, H., Omid, M., Ghoreishi, S. A., Boushehri, S. N. & Jourabshi, E. (2009). Transient expression of VP2 gene of very virulent IBDV in tobacco, Alfalfa and lettuce leaves by agroinfiltration. *Veterinary Journal*. 83, 18-25. (In Farsi).
  23. Russell Sambrook, J. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edn. Coldspring Harbour. CSHL.
  24. Shokrian Hajibehzad, S., Honari, H., Nasiri, J., Mehrizi, F. A. & Alizadeh, H. (2016). High-level transient expression of the N-terminal domain of IpaD from *Shigella dysenteriae*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(3), 293-302.
  25. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma, B. & Ezura, H. (2006). Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS letters*, 580(2), 620-626.
  26. Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. & Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology*, 21(12), 570-578.
  27. Wang A. & Ma S (2012) *Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects*: Springer.
  28. Wang, K. (2015). *Agrobacterium* protocol. Third edition, Methods in molecular biology 1223, Humana press.
  29. Zuo, X., Zhang, X., Shan, L., Xiao, C., He, D. & Ru, B. (2000). Expression of human intestinal trefoil factor (hITF) gene in lettuce. *Acta Botanica Sinica*, 43(10), 1047-1051.