

تأثیر نوع پپتید راهنمای بر انباست پروتئین ضدویروس گریفیتیسین در توتون تواریخته

Effect of signal peptide type on recombinant anti-HIV griffithsin protein accumulation in transgenic tobacco plants

یاور وفایی^۱، مصباح ببالار^{۲*}، محمد افسار شاندیز^۲، شکوفه صدراوی^۲، هوشنگ علیزاده^۲

۱- استادیار، دانشگاه کردستان.

۲- به ترتیب استاد، کارشناس ارشد، دانشجوی کارشناس ارشد و استادیار پردازی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Vafee Y¹, Babalar M², Afshar Shandiz M², Sadravi S², Alizadeh H^{*2}

1. Assistant Professor, University of Kurdistan, Iran

2. Professor, Graduate Student, MSc Student and Assistant Professor, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

تا سال ۲۰۱۰ حدود ۳۴ میلیون نفر آلوده به ویروس HIV بوده‌اند. ایدز با روش‌های کنونی قابل درمان نیست اما پروتئین گریفیتیسین GRFT توانایی غیرفعال کردن HIV و جلوگیری از انتقال سلول به سلول HIV را دارد. در این تحقیق ابتدا توالی ڈن بر اساس ترجیح کدومی گیاه بهینه‌سازی شد، سپس دو سازه ڈنی pBIgR-ZR و pBIgR-KD را ساخته شدند که ڈن GRFT به ترتیب تحت کترول پپتید راهنمای KDEL و بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera قرار گرفت. قطعات برگی توتون رقم سامسون با آگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی سازه‌های مورد نظر تلقیح شد. شاخسارهای تشکیل شده بر روی محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به محیط الای ریشه (MS ½ بدون هورمون) منتقل شدند. بررسی شاخسارهای تواریخته ماقوم به کانامایسین با PCR و سادرن بلاط الحق موفق دو تا سه نسخه از ڈن GRFT را در لاین‌های مورد بررسی نشان داد. بررسی بیان گریفیتیسین در سطح رونوشت با RT-PCR و Real Time PCR نشان از قابلیت متفاوت لاین‌های تواریخته توتون در بیان GRFT داشت. بر اساس نتایج SDS-PAGE یک باند احتمالی در ناحیه ۲۷ KD مشاهده شد. آزمون وسترن بلاط دو باند پروتئینی به صورت دایم و مونومر به ترتیب با وزن‌های مولکولی ۱۳ و ۲۷ کیلو Dalton را نشان داد. کمی‌سازی نتایج آزمون ELISA نشان داد که با هدف گذاری پروتئین در اجسام پروتئینی در مقایسه با شیشه آندوپلاسمی انباست بالاتر پروتئین نوترکیب را در پی دارد. بر اساس این تحقیق با بهینه‌سازی توالی ڈن، انتخاب میزبان مناسب و استفاده از پپتید راهنمای مؤثر می‌توان سطوح بالایی از پروتئین نوترکیب را به دست آورد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم

پپتید راهنمای

توتون

گریفیتیسین

HIV

مقدمه

عملکرد بالاتر پروتئین نوترکیب را در پی دارد. پیتید راهنمای KDEL باعث نگهداشت پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود (Floss 2009). با توجه به اشیاع پذیر بودن گیرنده‌های پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، با KDEL نمی‌توان به سطوح بسیار بالای از پروتئین خارجی دست یافت (Croft 1999). پیتید راهنمای با تشکیل اندامک‌های مستقل، پروتئین نوترکیب را در این اجسام پروتئینی بسته‌بندی می‌کند و با چند سانتریفیوژ ساده می‌توان پروتئین نوترکیب را از عصاره گیاهی جدا کرد (Torrent 2009).

GRFT نوترکیب در باکتری و نیز به صورت موقت با ناقل‌های مبتنی بر ویروس در گیاه توتون بیان شده است (Giomarelli 2006; O'keef 2009) اما هزینه بالا و وجود اندوتوکسین‌ها از معایب این سیستم‌ها می‌باشد (Twyman 2003). از آنجا که گزارشی از بیان دائم *GRFT* در گیاهان وجود ندارد، در این تحقیق توالی بهینه شده ژن *GRFT* توسط آگروباکتریوم به ژنوم هسته‌ای توتون منتقل شد و اثر هدف‌گذاری پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و اندام‌های پروتئینی با الحاق ژن *GRFT* به بخش انتهای N پیتید راهنمای Zera و پیتید راهنمای KDEL بررسی شد. هدف اصلی این تحقیق دست‌یابی به یک سیستم پایدار و ارزان قیمت در تولید پروتئین‌های ضد ویروسی می‌باشد.

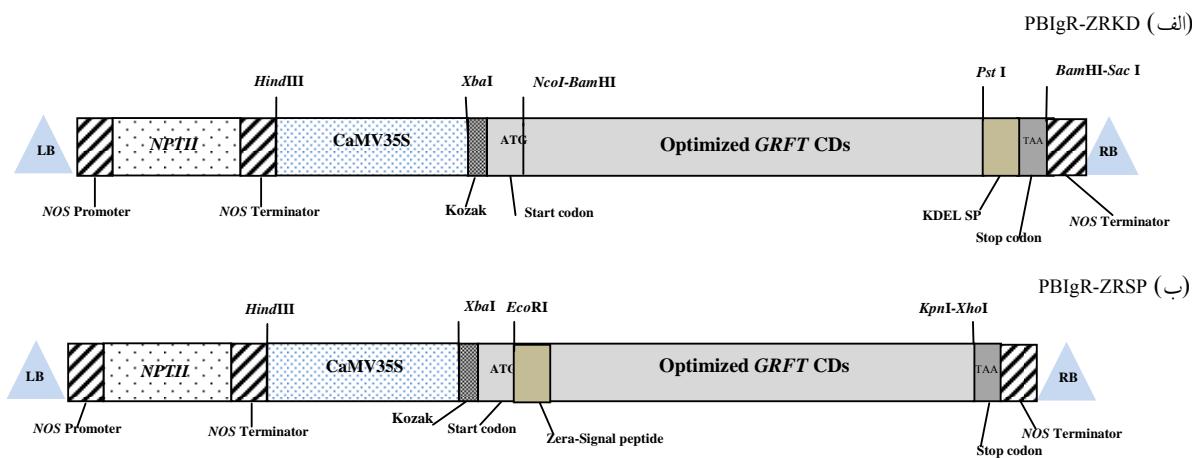
مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی توالی و طراحی ناقل سایت‌های برشی ناخواسته از توالی ژن *GRFT* (Gene ID:CS255217.1) با نرم‌افزار -BIOlabs- NEB Cutter NEB شناسایی و حذف شدن و برای اطمینان از حداقل توالی سنتزی ژن گریفیتیسین همراه با پیتید راهنمای *KDEL* با برش آنزیمی *XbaI* و *BamHI* در ناقل pBI121 همسانه شد تا ناقل pBigr-KD ساخته شود. برای ساخت ناقل ناقل pBigr-ZR نیز ژن *GRFT* حاوی بخش انتهای N پیتید راهنمای Zera از ناقل pGH30222 با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* وارد ناقل pBI121 شد.

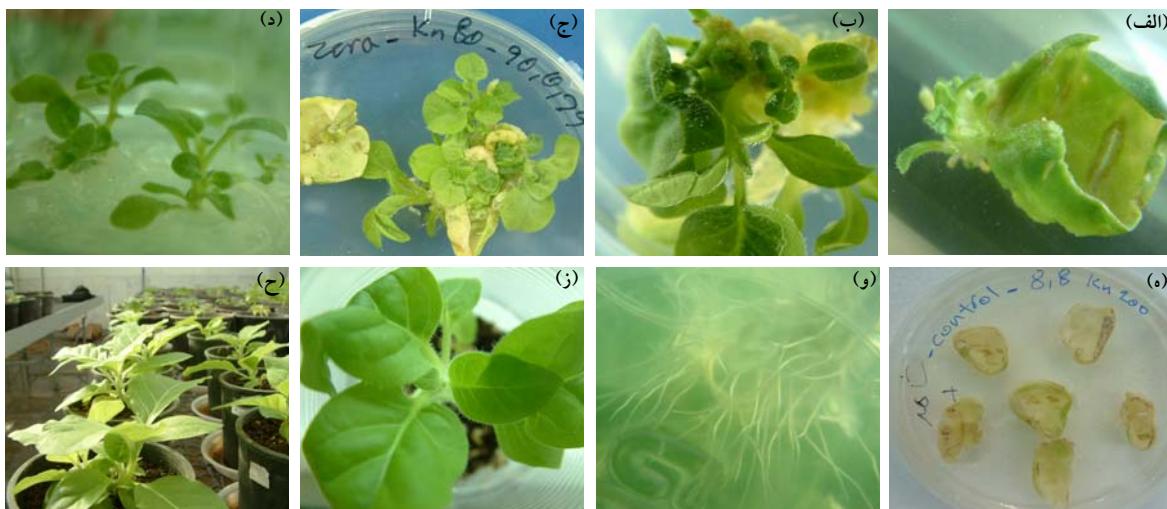
بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی حدود ۳۴ میلیون نفر آلوده به ویروس ایدز بوده‌اند (UNAIDS/WHO 2010). علاوه بر HIV ویروس‌های کوروناویروس عامل SARS، ویروس H5N1 عامل آنفلونزای مرغی و ویروس هپاتیت C (HCV) نیز بیماری‌های اپیدمی خطرناک ایجاد کرده‌اند (O'Keef Kim 2010; Holl 2010). ایدز در سال ۱۹۸۱ شناسایی شد و مبارزه با عامل آن یعنی HIV همچنان ادامه دارد (Krambovitis 2005). در فرآیند آلدگی، HIV از لایه اپتیلیوم مخاطی عبور کرده و سلول‌های دارای گیرنده CD4 را آلوده می‌کند (Ulrich 1988). تکثیر بعدی ویروس تعداد آن را به حدود ۱۰۰ میلیون مولکول RNA ویروس در هر میلی‌لیتر پلاسمای خون می‌رساند (Holl 2010). گلیکوپروتئین‌های GP120 و GP41 سطح ویروس با اتصال به گیرنده‌های CD4 اولین مرحله آلدگی را رقم می‌زنند. بیشتر روش‌های درمانی کنونی محدودیت‌هایی همچون سمیت، دوره‌های درمانی سخت، داروشناسی ناقص و ظهور سوش‌های مقاوم HIV دارند (Trabattoni 2010).

گریفیتیسین یک پروتئین حاصل از جلبک قرمز *Griffithsia* sp. قوی‌ترین ترکیب بین لکتین‌های ضد HIV می‌باشد. این پروتئین با ۶ جایگاه اتصال به کربوهیدرات، گلیکوپروتئین‌های gp120 و gp41 سطح ویروس را هدف قرار می‌دهد و این دلیل قابلیت فوق العاده *GRFT* در مهار ویروس‌ها است (Balzarini 2006). عدم سمیت سلولی، ثبات در pH و دماهای مختلف و حفظ ساختار در شرایط فیزیولوژیک بدن آن را به یکی از عوامل فعال در فرمولاسیون‌های ضد ویروس تبدیل کرده است (Kouokam 2011). *GRFT* در مهار ویروس‌های عامل SARS (آنفلونزای مرغی)، ویروس هپاتیت C و ویروس تب خال نیز موثر می‌باشد (Zeitlin 2009).

بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان به ۲-۱۰ درصد هزینه سیستم‌های میکروبی نیاز دارد (Twyman 2003) و گیاهان توانایی تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های پیچیده را دارند. ترازیزش ژنوم هسته‌ای میزان چندان بالایی از پروتئین نوترکیب را در بی ندارد (Droan 2006) و هدایت پروتئین نوترکیب به سمت اندامک‌های سلول و حفظ آنها از گرنده پروتوتازهای سلولی،



شکل ۱- سازه pBIgR-KD حاوی ژن *GRFT* و پپتید راهنمای N (الف) و سازه pBIgR-ZRSP حاوی بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera (ب). LB و RB نواحی مرزی راست و چپ؛ *NOS-T* و *NOS-P* به ترتیب راهانداز و خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز و CaMV35S راهانداز ویروس موذاییک گل کلم.



شکل ۲- مراحل باززایی گیاهان تراپریخته. (الف) شروع باززایی مستقیم ۱۲ روز بعد از تلقیح؛ (ب و ج) شاخصاره‌های مقاوم به کاتامایسین با برگ‌های کاملاً سبز بعد از گذشت یک ماه؛ (ه) شاخصاره‌ای غیرتراپریخت سفید شده تحت فشار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کاتامایسین؛ و (ز) ریشه‌های تشکیل شده در محیط ریشه‌زایی؛ (ز) گیاه تراپریخت در مرحله عادت‌دهی؛ (س) گیاهان توتون منتقل شده به گلخانه.

خورده به ابعاد $5 \times 0.5 \times 0.5$ سانتی‌متر تهیه شده از برگ‌های جوان توتون به مدت ۸ دقیقه در محلول تلقیح قرار داده شدند و به محیط هم کشته (محیط کامل MS حاوی $1 mg/ml$ BA و $1 mg/ml$ NAA بدون آنتی‌بیوتیک) به مدت ۲۴ ساعت کشته شدند. سپس به محیط القای شاخصاره (MS به علاوه $1 mg/ml$ کاتامایسین و $500 mg/ml$ سفاتوکسیم) منتقل شد. شاخصاره‌های باززاشده (شکل ۲-الف، ب و ج)، به محیط افزایش طول شاخصاره (شکل ۲-د) منتقل شدند و هنگامی که طول آن‌ها

بعد از تایید، سازه‌های طراحی شده با روش انجماد و ذوب به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم سویه LB4404 منتقل شدند. یک تک کلون تایید شده آگروباکتری در 50 میلی‌لیتر محیط کشت LB (حاوی $50 \mu g/ml$ کاتامایسین و $50 \mu g/ml$ ریفارمپسین) $18-24$ ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد رشد داده شد و رسوب باکتری در 20 میلی‌لیتر محیط تلقیح (نمک‌های محیط کشت MS باکتری در 20 گرم در لیتر گلوکز و 150 میکرومولار استوسرینگان) حل شد. ریزنمونه‌های زخم

REST به دست آمد و سطح نسبی بیان *GRFT* در مقادیر $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با روشنگ علیزاده و همکاران (Livak and Schmittgen 2001) به دست آمد.

استخراج پروتئین، SDS-PAGE، وسترن بلات و ELISA به ۰/۲ گرم برگ پودر شده، یک میلی لیتر بافر استخراج (۰/۵ mM DTT Tris-HCl ۰/۵M NaCl، ۲ mM EDTA ۱ mM) اضافه و بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ 8×۴۰۰۰ روشنافور جدا و با روش Bradford (1970) غلظت پروتئین کل اندازه گیری شد. SDS-PAGE با $30 \mu\text{g}$ پروتئین کل و رنگآمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت. برای آزمون وسترن بلات نیز پروتئین تفکیک شده بروی ژل ۱۲/۵ SDS-PAGE درصد به غشای PVDF منتقل شد. سپس بر اساس دستورالعمل Sambrook and Russell (2001) به ترتیب مراحل بلوکه کردن (در بافر PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک)، اضافه کردن آنتی بادی پلی کلنان بر علیه پروتئین *GRFT* (آنتی بادی اولیه)، آنتی بادی ثانویه انجام گرفت و در نهایت با اضافه کردن سوبسترا و بافر لومینسنس، در تاریکی غشا در معرض فیلم قرار گرفت. تعیین میزان انباشت *GRFT* با آزمون ELISA نیز بر اساس دستورالعمل Sambrook and Russell (2001) صورت گرفت. جذب در تراکم نوری ۴۵۰ نانومتر در ۳ تکرار قرائت شد، اعداد مربوط به کنترل منفی از داده های حاصل کسر شد و بر اساس غلظت استانداردها (۵ تا ۲۰ نانوگرم از *GRFT* خالص شده از *E. coli*)، غلظت نهایی پروتئین به صورت نانوگرم در گرم وزن تر برگ توتون به دست آمد.

نتایج و بحث

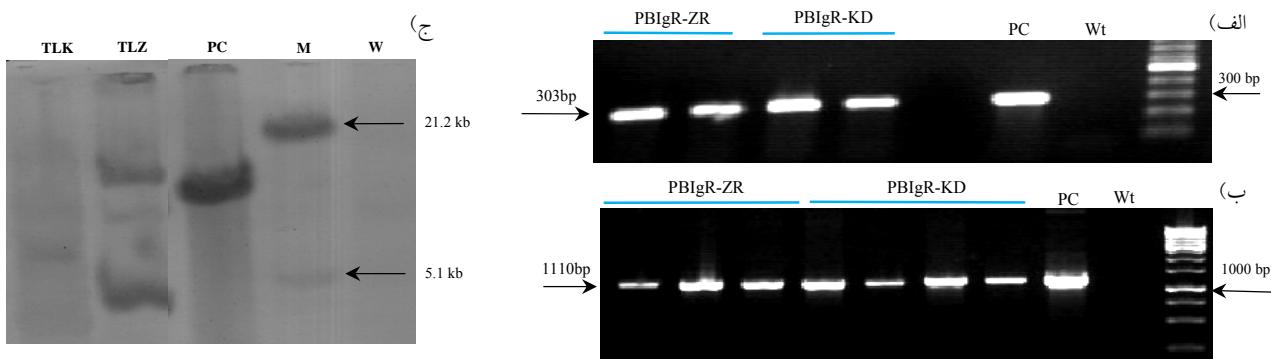
جهت بررسی گیاهان تاریخی به واسطه بازیابی و کارایی تاریخیش بالا در رقم سامسون، از هر سازه ژنی حدود ۳۰ گیاه تاریخت به گلخانه منتقل کنیم (شکل ۲-ج). PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن و آغازگر ۳۵S نشان از الحق موفق ژن به ژنوم توتون داشت (شکل ۳-الف و ب). نتایج سادرن بلات نشان داد که لاین TLK (ژن با پپتید راهنمای (KDEL) و TLZ (ژن همراه با بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera) به ترتیب دارای یک و دو نسخه *GRFT* هستند (شکل ۳-ج).

سنجهش بیان *GRFT* در سطح رونوشت با تکثیر قطعه ۱۵۰ جفت بازی از cDNA ساخته شده حاصل mRNA لاین های انتخابی،

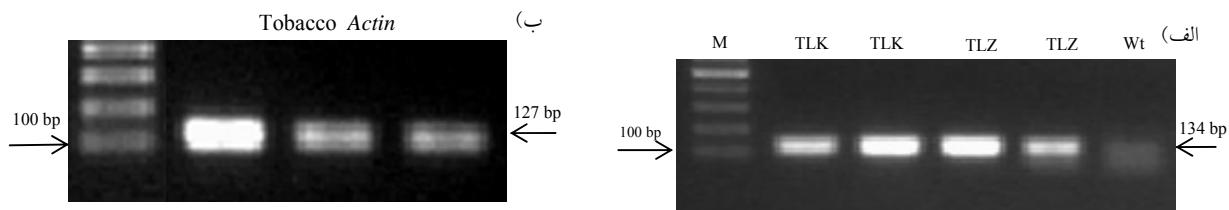
به حدود ۸ سانتی متر رسید به محیط ریشه زایی (شکل ۲-و) و سپس برای عادت دهی به ظروف یکبار مصرف حاوی پرلیت/ورمیکولیت منتقل شدند (شکل ۲-ز) و در نهایت در گلدان ها خاکی در گلخانه کاشته شدند (شکل ۲-ح). تایید و بررسی گیاهان تاریخی

جهت گزینش با PCR از ۲۰ شاخصاره با روش Murray and Thompson (1980) استخراج شد. PCR با آغازگرهای Gr-Rev: Gr-F: ۵'-GGTGGTTCTCCTTCTCTGG-۳' و ۳۵S-F: ۵'-) ۳۵S راهانداز پیشرو (AACCCACAGATGGTTAGAGAGG-۳' (گریفیتیسین) صورت گرفت. برای آزمون سادرن بلات، ۷۵ میکروگرم DNA به وسیله آنزیم EcoRI برش داده شد و بعد از تفکیک بر روی ژل آگاراز یک درصد، با استفاده از خاصیت کاپیلاری به غشای نایلوونی منتقل شد. با استفاده از کیت DIG-DNA Labeling (Roche) DNA دیگوکسیژین تهیه شد. بقیه مراحل بر اساس دستورالعمل مربوطه (Roche، آلمان) انجام گرفت و در نهایت از باندهای ظاهر شده با دستگاه GS-8000 (Bio Rad، آمریکا) تصاویر با واضح بالا تهیه شد.

واکنش Real time PCR و RT-PCR کل با روش bioZOLTM بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده BioWORLD (آمریکا) استخراج شد و بعد از تیمار dNase، رشته مکمل cDNA با استفاده از یک آغازگر اولیگو ۲۵ نوکلئوتیدی) ساخته شد. RT-PCR برای تایید حضور Gr-RT-F: ۵'- رونوشت با استفاده از آغازگرهای (Gr-RT- GGTGGTAACCTTCTCCTACTTCAC-۳' (Rev: ۵'- CCACCATAAGGACCGAACATCTTC-۳' گرفت. از ژن آکتین (Gene ID: CS255217.1) (بالا شاهد NtAct-F: ۵'- TGAAGGTTACGCCCTCCTC-۳' (NtAct-Rev: ۵'- GCGGACAATTCCCGTTC-۳' و Power SYBR[®] با کیت استفاده شد. واکنش Real Time PCR با نرم افزار Green و با دستگاه ABI صورت گرفت. مقادیر Ct با نرم افزار



شکل ۳- تایید انتقال ژن به ژنوم هسته‌ای لاین‌های تراریخته توتون. (الف) تکثیر قطعه ۳۰۳ جفت بازی ژن گریفیتسین؛ (ب) تکثیر قطعه ۱۱۱۰ جفت بازی (۸۰۰ نوکلتوتید CaMV همراه با ۳۱۰ نوکلتوتید از توالی ژن؛ (ج) تعداد نسخه‌های الحاق شده از ژن گریفیتسین در ژنوم هسته‌ای توتون؛ برای آزمون سادرن از هر سازه ژنی یک گیاه انتخاب شد. (W) گیاه شاهد غیر تراریخت؛ (PC) شاهد مثبت (پلاسمید).



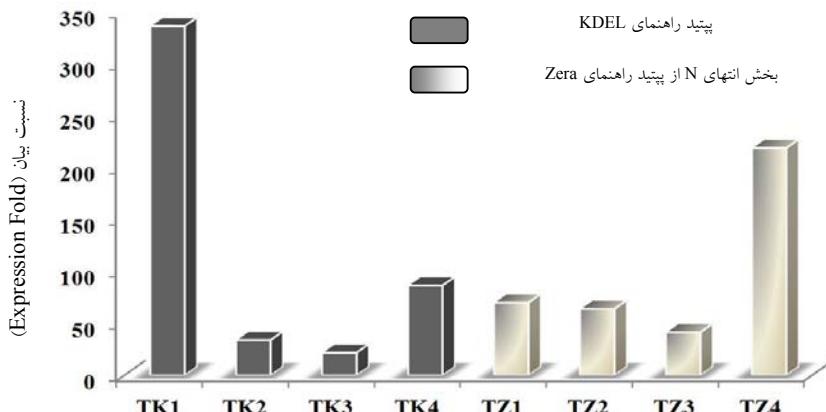
شکل ۴- تایید رونوشتبرداری از ژن گریفیتسین در لاین‌های تراریخته توتون (الف) تکثیر رونوشت ۱۳۴ جفت باز ژن *GRFT* از cDNA (ب) تکثیر قطعه ۱۲۷ جفت بازی از ژن آکتین به عنوان ژن استاندارد جهت مقایسه سطح بیان تراژن گریفیتسین در لاین‌های مورد بررسی.

نوترکیب *GRFT* را به صورت مونومر و دایمر نشان دادند (شکل ۶- ب). کمی‌سازی انباست پروتئین به صورت میکروگرم گریفیتسین بر گرم وزن تر برگ نشان داد لاین‌هایی که ژن تحت کنترل پپتید راهنمای Zera بوده است در مقایسه با پپتید راهنمای KDEL انباست پروتئینی بیشتری داشته‌اند (شکل ۷). با مقایسه میزان انباست پروتئین هر لاین (شکل ۷) با میزان بیان و رونویسی ژن (شکل ۵) ارتباطی بین بیان ژن و میزان تولید پروتئین مشاهده نمی‌شود.

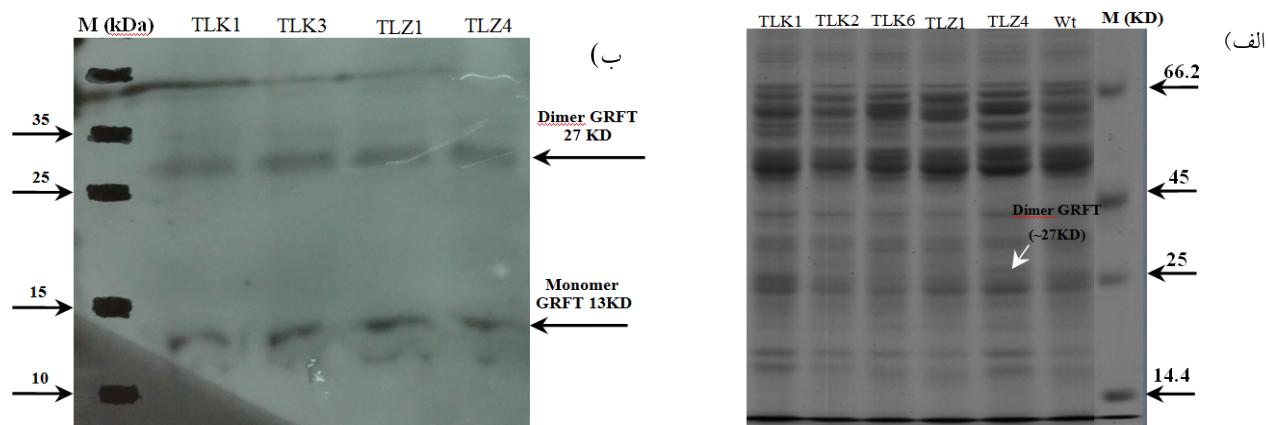
توتون توانایی بالایی در بیان و ترجمه پروتئین‌های نوترکیب دارد. در این تحقیق از هر ریزنمونه حدود ۱۰ شاخساره به دست آمد و حدود ۷۰ درصد آن‌ها با PCR مثبت بودند که نشان‌دهنده قابلیت بازایی و کارایی تراریزش بالا می‌باشد. وجود توالی‌های شبیه به SAR (نواحی اتصال داریست) دلیل کارایی تراریزش و بیان ژن توتون است (Shimizu et al. 2001). در این مطالعه تنها یک یا سه نسخه از تراژن به ژنوم توتون منتقل شد که ایده‌آل‌ترین حالت می‌باشد زیرا تعداد بالای نسخه‌های ژنی سبب خاموشی ژن و

رونوشتبرداری از تراژن *GRFT* قرار گرفته در ژنوم این لاین‌ها نیز به اثبات رسید (شکل ۴). با مقایسه میزان بین ژن گریفیتسین نسبت به ژن آکتین به عنوان ژن کنترل درونی، بر اساس نتایج Real Time-PCR تفاوت چشمگیری بین لاین‌های تراریخته در بیان ژن *GRFT* وجود داشت طوری که بیشترین بیان ژن در لاین TK1 (۳۳۶ برابر) و کمترین در لاین TK3 (۱۹ برابر) بود (شکل ۵). بیان ژن گریفیتسین در لاین‌های تراریخته شده با سازه‌های pBigr-ZRSP و pBigr-KDSP نشان می‌دهد که نوع پپتید راهنمای (Zera) و بخش انتهایی پپتید راهنمای KDEL تاثیر بروی رونوشتبرداری نداشته است.

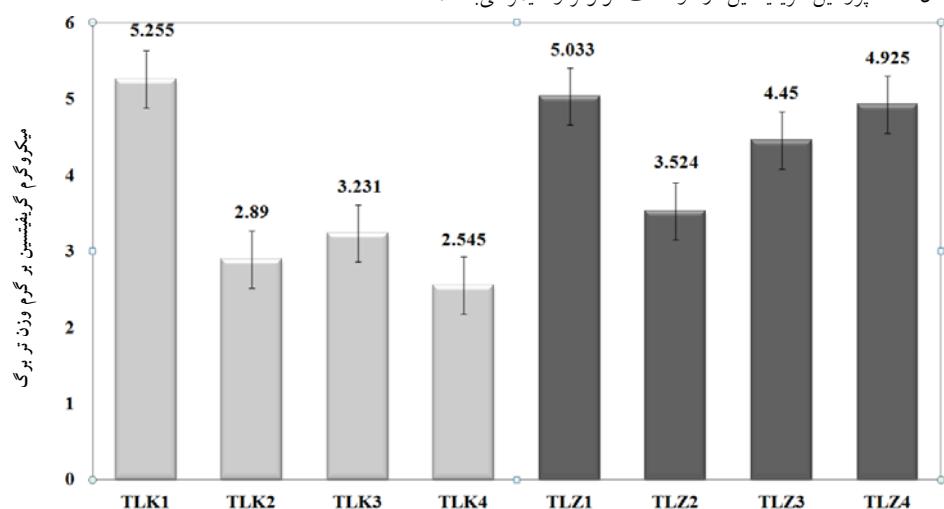
نتایج حاصل از SDS-PAGE، وسترن بلاط و تفکیک پروتئین کل بر روی ژل SDS-PAGE یک باند احتمالی مربوط به گریفیتسین در ناحیه ۲۷ کیلودادالتون را نشان داد (شکل ۶- الف). اما برای تایید بیشتر لاین‌های تراریخت وسترن بلاط و ELISA نیز صورت گرفت. در آزمون وسترن بلاط با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلنان تولید شده در موش بر علیه پروتئین *GRFT* هر چهار لاین TLK1، TLK3، TLZ1 و TLZ4 بیان پروتئین



شکل ۵- نتایج حاصل از Real Time PCR. نسبت بیان بین لینهای تاریخته توتوون حاصل از سازههای ژئی PBIGR-ZR و PBIGR-KD از نظر نسبت بیان ترازن GRFT، لینهای مورد نظر اختلاف زیادی با یکدیگر نشان می‌دهند.



شکل ۶- (الف) بررسی پروتئین کل گیاهان تاریخته توتوون؛ در ناحیه حدود ۲۷ کیلو Dalton یک باند پالی مورفیسم در لین توتوون TLZ4 مشاهده می‌شود. در این لین پروتئین نوترکیب تحت کترول بخش انتهای N پیتید راهنمای Zera قرار دارد. (ب) بررسی لینهای تاریخت توتوون با وسترن بلات، دو باند در نواحی ۱۳ و ۲۷ کیلو Dalton به ترتیب نشان‌دهنده پروتئین گریفتیسین در دو حالت مونومر و دایمر می‌باشد.



شکل ۷- نتایج حاصل از آزمون ELISA (نتایج به صورت میکروگرم گریفتیسین در هر گرم وزن تر برگ می‌باشد). لین TLK1 بیشترین (۵/۲۵۵ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) و لین TLK4 کمترین (۵/۲۵۵ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) را دارا بوده‌اند.

میتوانی بر گیرنده‌های سطح شبکه آندوپلاسمی بوده و اشباع پذیر است (Croft et al. 1999). یعنی قسمتی از پروتئین نوترکیب، به پذیرنده‌های اختصاصی خود متصل نشده و در نتیجه با وزیکول‌های انتقالی به غشای پلاسمایی منتقل می‌شوند (Movafeghi 2006). اثر بهتر پپتید راهنمای Zera می‌تواند ناشی از بسته‌بندی پروتئین در اجسام پروتئینی باشد (Torrent et al. 2009). در این تحقیق هدف تنها ارزیابی میزان تولید پروتئین و مقایسه اثر دو پپتید راهنمای KDEL و بخش انتهای N از Zera بود، در نتیجه هیچگونه توالی برچسب همانند Tag 6 His-Tag خالص‌سازی به توالی ژن الحق نشد و فقط شرایط بیان ارزیابی شد. با انتخاب میزبان گیاهی، راهانداز و پپتید راهنمای مناسب و توالی بهینه شده ژن می‌توان عملکرد پروتئین نوترکیب را افزایش داد. با توجه به عدم وجود گلیکوزیلاسیون در GRFT پیشنهاد می‌شود که پروتئین بیان شده در گیاه، خالص‌سازی شود و از نظر قابلیت غیرفعال‌سازی ویروس‌ها از جمله HIV بررسی شود.

منابع

- Balzarini J (2006) Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research* 71: 237-247.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA, Denecke J (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell* 11:2233-2248.
- Doran PM (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnology* 24:426-432.
- Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, Schmidt R, Mette MF (2008) Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *Plant Journal* 53:1-10.
- Floss DM, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Quendler H, Rademacher T, Stoger E, Scheller J, Fischer R, Conrad U (2009) Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnology Journal* 7:899-913.

عدم بیان ژن می‌شود (Vaucheret 2006). میزان رونوشت ژن GRFT در لاین TLK1 حدود ۳۳۶ برابر بود که می‌تواند ناشی از اثر راهانداز 35S و نیز استفاده از توالی بهینه شده باشد اما ارتباط چندان مشخصی با میزان پروتئین ترجمه شده وجود نداشت. اختلاف چشمگیر در بیان ژن بین لاین‌های توتون می‌تواند ناشی از "اثر موضعی" باشد که در آن بیان ژن خارجی متاثر از محل الحق آن می‌باشد (Fischer et al. 2008). پس همیشه بیان بالای یک ژن، انباست بالاتر پروتئین را در پی ندارد، موضوعی که در این تحقیق نمایان بود. با وجود مشاهده یک باند ۲۷ کیلو Daltonی احتمالی بروی SDS-PAGE، چون بروی این نوع ژل پروتئین‌های بیش از یک درصد کل پروتئین محلول قابل مشاهده هستند و چون بیان در ژنوم هسته‌ای به ندرت به یک درصد پروتئین کل می‌رسد (Meyers et al. 2010)، پس برای تأیید بیشتر از وسترن بلات و آزمون الیزا استفاده شد. نتایج ELISA نشان داد که بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera منجر به تجمع GRFT بیشتری در مقایسه با KDEL شده است.

- Giomarelli B, Schumacher KM, Taylor TE, Sowder RC, Hartley JL, McMahon JB, Mori T (2006) Recombinant production of anti-HIV protein, griffithsin, by auto-induction in a fermentor culture. *Protein Expression and Purification* 47:194-202.
- Holl H, Xu K, Peressin M, Lederle A, Elizabeth M, Biedma ME, Delaporte M, Decoville T, Schmidt S, Laumond G, Aubertin AM, Moog C (2010) Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T- or B-lymphocytes. *Journal of Virology* 84: 4172-4182.
- Kazusa DNA Research Institute (2011) http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=42_36.
- Kim JH, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka T (2010) Role of host-specific amino acids in the pathogenicity of avian H5N1 influenza viruses in mice. *Journal of General Virology* 91: 1284-1289.
- Kouokam JC, Huskens D, Schols D, Johannemann A, Riedell SK, Walter W, Walker JM, Matoba N, O'Keefe BR, Palmer KE (2011) Investigation of Griffithsin's Interactions with Human Cells Confirms Its Outstanding Safety and Efficacy Profile as a Microbicide Candidate. *Public Library of Science ONE* 8: 1-15.
- Krambovitis K, Porchis F, Spandidos DA (2005) HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs. *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 1165-1173.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.
- Meyers B, Zaltsman A, Lacroix B, Kozlovsky SV, Krichevsky A (2010) Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. Biotechnology Advances 28: 747-756.
- Movafeghi A (2006) Study of the role of C-terminal HDEL signal sequence of proteins using immunogoldlabeling of transgenic and wild tobacco cells. Iranian Journal of Biology 3: 282-289 (In Farsi).
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant 15: 473-497.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.
- O'Keefe B, Mori T, McMahon J (2010) Antiviral griffithsin compound, compostion and methods use. US Patent. US 2010/021242 A1.
- O'Keefe BR, Vojdani F, Buffa Y, Shattock RG, Montefiori DC, Bakke J, Mirsalis J, d'Andrea DA, Hume SD, Bratcher B, Saucedo CJ, McMahon JB, Pogue JP, Palmer KP (2009) Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 106: 6099-6104.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt MA, Parrott WA (2001) Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* L. Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by Real-Time polymerase chain reaction. Plant Cell Reports 20:422-428.
- Shimizu K, Takahashi M, Goshima N, Kawakami S, Iriune K, Morikawa H (2001) Presence of an SAR-like sequence in junction regions between an introduced transgene and genomic DNA of cultured tobacco cells: its effect on transformation frequency. Plant Journal 26: 375-384.
- Torrent M, Llop-Tous I, Ludevid MD (2009) Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. Methods Molecular Biology 483:193-208.
- Trabattoni D, Lo Caputo S, Biasin M, Seminari E, Di Pietro M, Ravasi G, Mazzotta F, Maserati R, Clerici M, (2002) Modulation of human immunodeficiency virus (HIV)-specific immune response by using efavirenz, nelfinavir, and stavudine in a rescue therapy regimen for HIV-infected, drug-experienced patients. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9: 1114-1118.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends in Biotechnology 12: 570-578.
- Ullrich R, Schmidt W, Zippel T, Schneider T, Zeitz M, Riecken EO (1998) Mucosal HIV infection. Pathobiology 66: 145-50.
- Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. Genes and Development 20:759-771.
- Wandeltt C, Rafiqul M, Khan SC, Harmut ES, Spencer D, Higgins TJV (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. Plant Journal 2:181-192.
- Zeitlin L, Pauly M, Whaley KJ (2009) Second-generation HIVmicrobicides: Continued development of griffithsin. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 15: 6029-6030.