

## تأثیر نوع میزان گیاهی و نوع پیتید راهنمای بر انباست پروتئین ضد ویروس گریفیتیسین

### Effect of plant host and signal peptide on anti-virus Griffithisn protein accumulation

یاور وفایی<sup>۱</sup>، مصباح بابالار<sup>۲</sup>، محمد افسار شاندیز<sup>۳</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>۴\*</sup>

۱، ۲، ۳، ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Vafaee Y<sup>1</sup>, Babalar M<sup>2</sup>, Afshar Shandiz M<sup>3</sup>, Alizadeh H<sup>\*4</sup>

1,2,3,4. MSc Student, Professor, MSc Student and Assistant Professor, Agricultural College,  
University of Tehran, Karaj, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

#### چکیده

تولید ترکیباتی دارویی که در درمان بیماری‌های مانند ایدز نقش دارند، اهمیت زیادی دارد. در این بین، اثر گریفیتیسین (GRFT) به عنوان یک لکتین در ممانعت از ورود HIV به سلول در غلظت‌های پیکومول تایید شده است. برای بررسی تولید و انباست مناسب گریفیتیسین در بافت گیاهی سه گیاه یونجه، سویا و کاهو به عنوان میزان‌های گیاهی جهت بیان موقع انتخاب شدند. همچنین اثر سه پیتید راهنمای Extensin و زیر واحد SP پیتید راهنمای ZERA در انباست GRFT به ترتیب در شبکه آندوبلاسمی، فضای آپوپلاستی و فضای نزدیک به دیواره سلول‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. ۲۲ ساعت بعد از آگرواینفلتراسیون، نتایج qRT-PCR نشان داد که کاهو بیشترین و یونجه کمترین میزان رونوشت از ژن GRFT را داشت. نتایج آزمون الیزا با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال GRFT نشان داد که با هدف گذاری پروتئین به فضای آپوپلاستی، گیاه سویا بیشترین تجمع پروتئین را داشته است. در حالی که کاهو علیرغم رونویسی بالا از ژن GRFT، انباست پروتئین نوترکیب کمتری را نشان داد. نتایج نشان داد که گیاه سویا و هدایت پروتئین به آپوپلاست راهکار مناسبی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب GRFT می‌باشد.

#### واژه‌های کلیدی

آگرواینفلتراسیون،  
زراعت مولکولی،  
گریفیتیسین،  
لکتین،  
HIV

## مقدمه

بخش‌های مختلف سلول هدایت کنند (Fischer et al. 2011; Wandeltt et al. 1992; KDEL.(2004), پپتید راهنمای ژن Extensin (Richardson et al. 2001) و پپتید راهنمای ژن Torrent et al. 2009) از جمله پیتیدهای راهنمای در گیاهان هستند که به ترتیب پروتئین را در شبکه آنтопلاسمی، فضای آپوپلاستی و اندامک‌های مستقل پروتئینی<sup>۳</sup> هدف‌گذاری می‌کنند (Wandeltt et al. 1992; Obeme et al. 2006; Scillberg et al. 2002)، آنتی‌ژن‌ها (Rice et al. 2005; Scillberg et al. 2002)، پروتئین‌های دارویی (Tiwani et al. 2009) و آنزیم‌ها (Fischer et al. 2004) می‌باشند.

ویروس افت ایمنی انسان (HIV) جزو خانواده رترورویروس‌ها است که سلولهای سیستم ایمنی، به خصوص T-CD4 lymphocytes را آلوده کرده و منجر به تخریب این سلول‌ها می‌شود (Rsti et al. 2006). ورود HIV به سلول‌های هدف از طریق گلیکوپروتئین‌های gp120 و gp41 سطح پوششی ویروس صورت می‌گیرد. این گلیکوپروتئین‌ها به یک پروتئین گیرنده سلولی به نام CD4 و یک گیرنده همکار (عمدتاً CXCR4 و یا CCR5) متصل می‌شوند (Balzarini et al. 2006). هم gp120 و هم gp41 به میزان زیادی گلیکوزیله هستند و به طور مسلم هر عاملی که بتواند با گلیکان‌های سطح HIV برهمنکنش داشته باشد به طور موثر می‌تواند ارتباط بین gp120 (یا gp41) و گیرنده‌های آن را در سطح سلول دچار اختلال کند و از ورود HIV به داخل سلول جلوگیری کند (Boyd et al. 2004; Balzarini et al. 2006). برآورد شده که یک عامل ضد ویروسی با کارایی ۶۰ درصد می‌تواند از میلیون‌ها مورد جدید انتقال ایدز در سرتاسر دنیا جلوگیری نماید (Boyd et al. 2004). قابلیت کنترل آلودگی HIV توسط پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات‌ها سبب شده که این پروتئین‌ها به عنوان داروهای موثر در پیشگیری از آلودگی به ایدز پیشنهاد شوند (Balzarini et al. 2006).

پروتئین‌های مورد استفاده در درمان HIV باید در شرایط مختلف فیزیولوژی بدن به عنوان مثال pH‌های پایین مهبلی پایدار باشند. همچنین با توجه به شیوع ایدز در کشورهای بسیار فقیر آفریقایی، بتوان با سیستم‌های ارزان قیمت به سهولت و با هزینه پایین آن‌ها را تولید کرد (Boyd et al. 2004).

<sup>3</sup> Protein body

تولید پروتئین‌های دارویی، پروتئین‌های کارکرده، آنتی‌بادی‌ها و سایر پروتئین‌های صنعتی در گیاهان، زراعت مولکولی نامیده می‌شود (Fischer et al. 2004). هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تاریخته ۲ تا ۱۰ درصد هزینه تولید در سیستم‌های باکتریایی می‌باشد (Giddings et al. 2010). برخی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان شامل پیتیدهای فعل زیستی (Rice et al. 2005; Scillberg et al. 2002)، آنتی‌ژن‌ها (Scillberg et al. 2002)، پروتئین‌های دارویی (Tiwani et al. 2009) و آنزیم‌ها (Fischer et al. 2004) می‌باشند.

انتقال ژن به کمک باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس و تفنگ ژنی روش‌های مرسوم تولید گیاهان تاریخت می‌باشند. بر اساس الگوی بیان ژن، دو روش بیان ثابت و موقع وجود دارد. در بیان ثابت باید شرایط کشت بافت و بازیابی گونه گیاهی بهینه شده باشد بطوری که دست‌یابی به گیاهان تاریخت با بیان ثابت زمانبر است (Obeme et al. 2011). بیان موقع ژن بستره مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان است زیرا پروتئین در زمان کوتاهی قابل دست‌یابی است. در این روش مقادیر مناسب از پروتئین هدف در طی چند روز بدست می‌آید که حصول این حجم پروتئین در چنین زمانی با روش‌های انتقال دائم امکان‌پذیر نیست. همچنین سیستم بیان موقع وابسته به ادغام کروموزومی ژن‌های خارجی نیست و تحت تاثیر مکان<sup>۱</sup>الحق ژن قرار نمی‌گیرد (Wang and Ma 2011). از دو روش آگرواینفیلتراسیون<sup>۲</sup> و آلودگی با ویروس‌های گیاهی برای بیان موقع ژن‌های خارجی استفاده می‌شود. اگرچه ناقل‌های ویروسی به دلیل آلودگی سیستمیک امکان تولید بالای مقادیر پروتئین نوترکیب را ایجاد می‌کند. اما محدودیت در بیان ژن‌های با اندازه بزرگ و نگرانی‌های زیست محیطی سبب کاهش کاربرد آن شده است (Fischer et al. 2004). امروزه از بیان موقع با استفاده از آگروباکتریوم در تولید سریع داروهای زیستی استفاده می‌شود (Wang and Ma 2011). پیتیدهای راهنما توالی‌هایی هستند که در انتهای کربوکسیل یا آمینی پروتئین قرار دارند تا پروتئین را به

<sup>1</sup> Position effect

<sup>2</sup> Agroinfiltration

بیان پروتئین در باکتری *E. coli* و تولید پلی کلونال آنتی بادی: یک کلونی BL21 تایید شده با کلونی-پی اسی آر در ۵۰۰ سی سی محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین رشد داده شد (دماه ۳۷ °C و دور شیکر ۲۸۰) بعد از رسیدن تراکم سلولی در ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵، القای بیان تراژن با IPTG انجام و پروتئین GRFT استخراج شده پس از عبور از ستون Ni-NTA agarose شرکت کیاژن بر روی ژل SDS-PAGE برده شد (شکل ۲) بررسی کمی بیان پروتئین نیز بر اساس روش (Pourseyedi et al. 2009) انجام شد و ۱۰ میکروگرم آنتی ژن به موش به فواصل ۲۱ روز تزریق شد و بعد از خونگیری سرم حاوی آنتی بادی به دست آمد (Sadraeian et al. 2011).

تهیه مایه تلچیح و انجام آگرواینفیلتراسیون: از هر کدام از کلونی‌های آگروبکتری سویه LBA4404 واجد ناقل نوترکیب، ۵۰ میلی‌لیتر کشت شبانه در محیط کشت LB مایع حاوی  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  کانامایسین،  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  ریفامپیسین و (دمای  $28^\circ\text{C}$  و دور شیکر کانامایسین،  $28^\circ\text{C}$  و دور شیکر)  $280$  تا  $5/0$  در  $0/6$  در  $8$  (۲۸۰) تهیه شد و بعد از رسیدن OD به حدود  $0/5$  در  $5000$  رسوب داده شد و در محیط آگرواینفیلتراسیون (محیط MS  $1/2$  درصد ساکاروز به همراه  $100 \text{ ppm}$  مویان توئین  $20$ ) به مدت  $40$  دقیقه رشد داده شد تا باکتری به محیط جدید عادت کند. نمونه‌های برگی در محیط تلچیح حاوی باکتری در داخل دسیکاتور قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتریایی تحت شرایط خلا  $250$  میلی‌بار و سه بار شکست ناگهانی وارد فضای بین بافتی شد و سپس برگ‌ها بروی کاغذ صافی آگسته به محیط MS قرار داده شدند.

## استخراج RNA و انجام Real time PCR

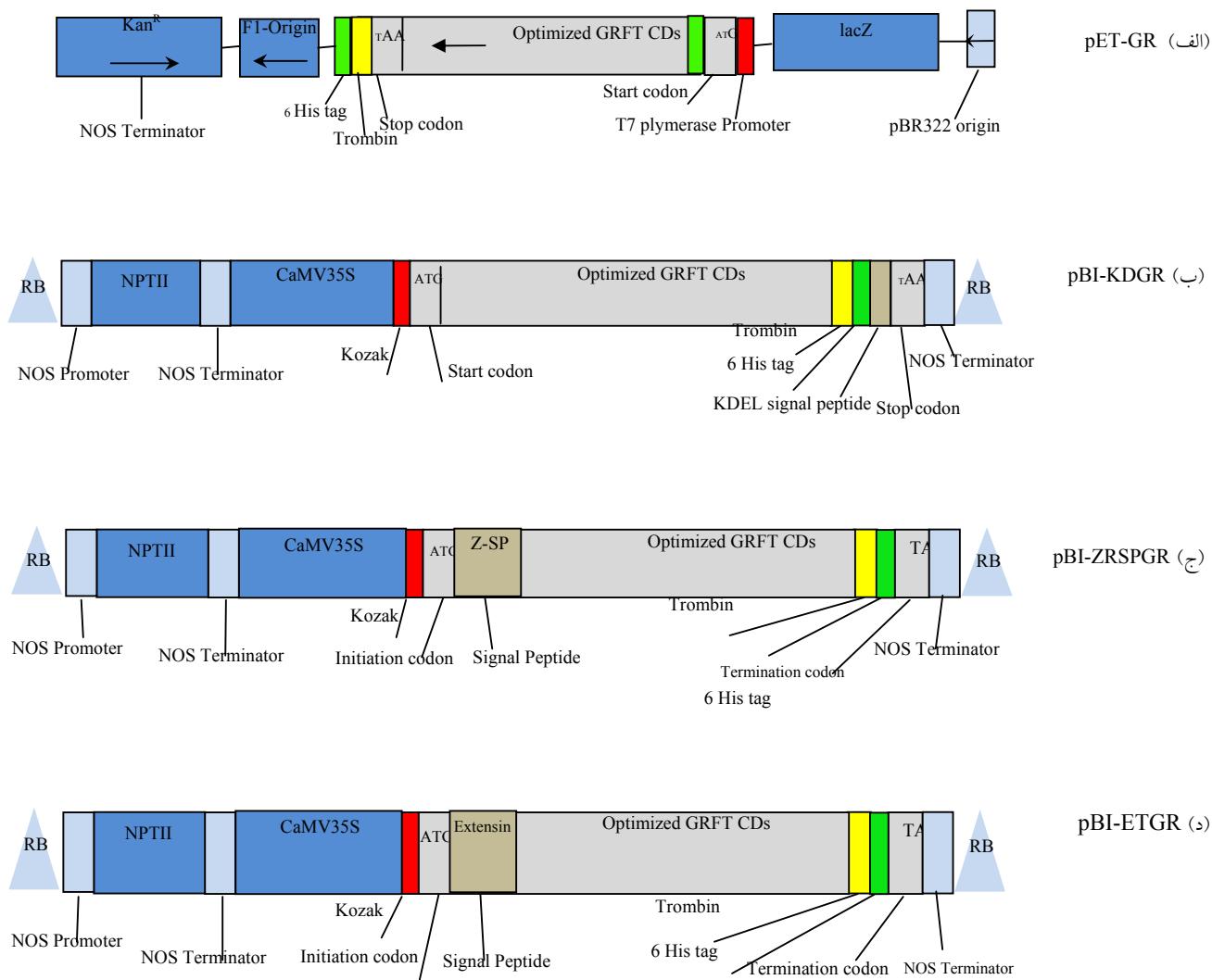
بعد از گذشت ۷۲ ساعت از آگرواینفیلتراسیون و اطمینان از بیان RNA کل با روش bioZOL™ بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (BioWORLD، آمریکا) استخراج شد و بعد از تیمار DNase، رشته مکمل cDNA با استفاده از یک آغازگر اولیگو dT ۲۵ نوکلئوتیدی) ساخته شد. RT-PCR با آغازگرهای ویژه GRFT و ژن Houskeeping صورت گرفت (جدول ۱). مقادیر Ct با نرم افزار REST به دست آمد و سطح نسبی GRFT در مقادیر  $\Delta\Delta Ct$ <sup>2</sup> با روش لیواک و اشمیتگن بیان

لکتین‌ها از انواع پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات هستند و در تعداد زیادی از موجودات زنده وجود دارند (Shron et al. 2006). امروزه تحقیقات زیادی بروی لکتین‌ها صورت گرفته است. لکتین‌ها با کربوهیدرات‌ها به صورت غیرکرووالانسی بر همکنش داده و اغلب این پیوند‌ها به صورت دو طرفه و کاملاً اختصاصی هستند (Sharon et al. 2006). تحقیقات عصاره‌های حاصل از جلبک دریایی (*Griffithsia* sp.) جمع‌آوری شده از آب‌های ساحلی نیوزلند دارای فعالیت ضدویروسی می‌باشد. مقادیر کمی پروتئین در حد پیکومول از این عصاره جمع‌آوری شده و گریفیتیسین GRFT نامیده شد که در مطالعات بالینی انسان به طرز غیر قابل برگشت سبب غیرفعال شدن ویروس HIV شد. اهداف مولکولی GRFT بروی HIV بخش‌های اولیگوساکاریدی غنی از مانوز در گلیکوپروتئین‌های سطح ویروس است. با اتصال GRFT، اتصال، امتزاج و ورود ویروس به داخل سلول ممانعت می‌شود. GRFT اجزای پلی‌ساکاریدی سایر ویروس‌های مشابه به HIV همچون SIV و HTLV و نیز ویروس‌های عامل سرخک، ایولا و وبا را نیز هدف قرار می‌دهد (Boyd et al. 2004).

با توجه به جایگاه با ارزش دارویی GRFT، در اولین گام در باکتری به عنوان یک میزبان مدل پروکاریوتی بیان شد سپس بیان موقت ژن *GRFT* در گیاه یونجه، کاهو و سویا با روش آگر واینفیلتراسیون صورت گرفت و اثر سه نوع پپتید راهنمایی پرتوشن برسی شد.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی ژن و طراحی سازه‌ها  
جایگاه‌های برشی موجود در توالی ژن گریفیتیسین (Gene ID: CS255217.1) با نرمافزار BIOLabs-NEB Cutter حذف شد. سپس برخی قسمت‌های توالی بدون تغییر در اسیدهای آمینه pET28 مذکور شدند. در نهایت برای سیستم *E.coli* ناقل بیانی pBI-KDGR (شکل ۱-ب) و برای بیان موقع a- حامل توالی بهینه شده ژن (شکل ۱-الف) و از طریق آگروباکتریوم سازه‌های pBI-ETGR (شکل ۱-ب)، pBI-ZRSPGR (شکل ۱-ج) و pBI-ETGR (شکل ۱-د) نیز طراحی و ساخته شدند.



شکل ۱- سازه های طراحی شده (الف) سازه a pET 28 a (ب، ج و د) به ترتیب سازه pBI121 حاوی زن GRFT همراه با سیگنال پپتیدهای ZERA-SP و KDEL که به ترتیب زن را در شبکه آندوپلاسمی، فضای نزدیک به دیواره سلولی و فضای آپوپلاست هدف گذاری می کنند.

گرفت . در نهایت انباشت و تعیین غلظت ELISA با GRFT گرفت . در نهایت انباشت و تعیین غلظت ELISA با GRFT خالص شده از باکتری صورت گرفت به این ترتیب که از GRFT خالص شده از باکتری غلظت های صفر تا ۲۰ نانوگرم به عنوان استاندارد جهت تعیین غلظت پروتئین استفاده شد. بعد از پوشش دادن پلیت ELISA با آنتی زن و استفاده از آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه و سوبسترای TMB، جذب (OD) در ۴۵۰ نانومتر در ۳ تکرار قرائت شد، اعداد کنترل منفی از داده های اصلی کسر شد و در نهایت، غلظت نهایی پروتئین به صورت درصد از کل پروتئین محلول به دست آمد.

Livak and Schmittgen 2001) به دست آمد.

استخراج پروتئین، ELISA و SDS-PAGE استخراج پروتئین ایونیتله در ازت مایع پودر شد و بعد از ۱۰ گرم از برگ های ایونیتله در ازت مایع پودر شد و بعد از اضافه کردن ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج ( ۵۰ mM Tris-HCl (pH 8.0), ۰.۵ M NaCl, ۲ mM EDTA and ۱ mM dithiothreitol (DTT) و سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در Bradford ۱۲۰۰ g ، روشنایر جدا و بر اساس روش برادفورد ( ۱۹۷۲) غلظت پروتئین کل اندازه گیری شد. SDS-PAGE با ۳۰ میکرو گرم پروتئین کل و رنگ آمیزی با کوماسی بلو صورت

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای آزمون Real time PCR

| ژن                       | گیاه  | آغازگر پیشرو                   | آغازگر پسرو                   |
|--------------------------|-------|--------------------------------|-------------------------------|
| <sup>*</sup> T گریفیتین  | -     | 5' TCTGGTGGTTCTCCTTTCTG3'      | 5' ATCACCGCACTACCATTAAATTG 3' |
| <sup>**</sup> T گریفیتین | -     | 5' GGTGGTAACCTTCTCCTACTTCAC3'  | 5' CCACCATAAGGACCGAACATCTC 3' |
| <sup>H</sup> آکتنین      | کاهو  | 5' TGATTGGAATGGAAGCTGCTG 3'    | 5' CAGTGATTCCCTGCTCATCCG 3'   |
| <sup>H</sup> بتا توبولین | سویا  | 5' GTCGAGTGGATTCCCAAACAATG3'   | 5' GAAAGCCTCCTCCTAACATGG3''   |
| MSC27 <sup>H</sup>       | یونجه | 5' GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAACG3' | 5' AGCTGAGTCATCAACACCCCTCAT3' |

\* آغازگر مورد استفاده برای تایید سازهای ژنی (محصول PCR ۳۰۳ جفت باز). \*\* آغازگر مورد استفاده برای برسی های (محصول PCR ۱۶۰ جفت باز). H ژن استاندارد داخلی برای مقایسه سطح رونوشت برداری ژن خارجی بیان شده.

## نتایج و بحث

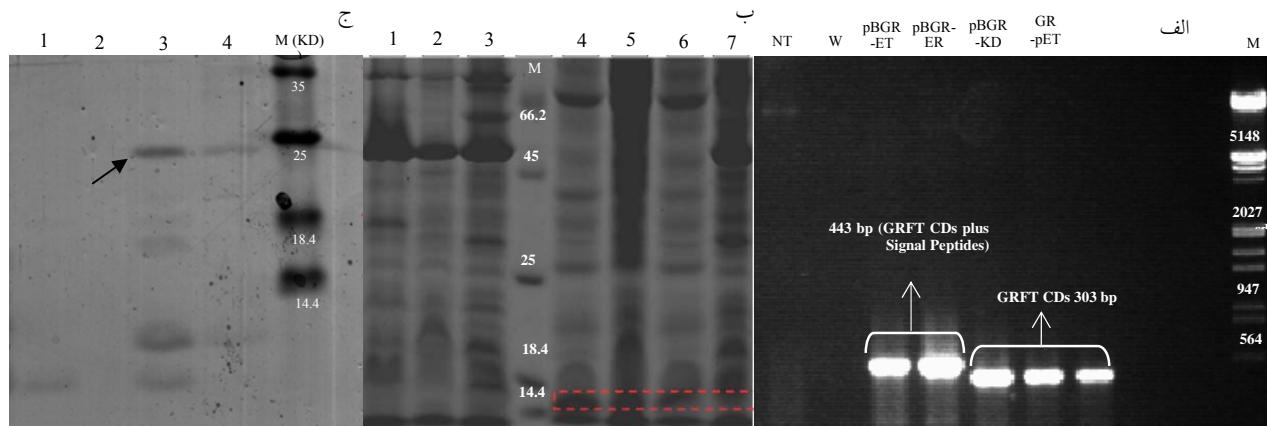
توجه به داده های الگوی رونوشت ژن ها، پپتیدهای راهنما تاثیری بر رونوشت برداری نداشتند. از طرف دیگر چون بیان بالای یک ژن همیشه نشان دهنده انباست بیشتر پروتئین نیست، برای برسی میزان پروتئین نهایی، آزمون الیزا صورت گرفت.

نتایج آزمون الیزا با آتنی بادی پلی کلونال تولید شده در موش نشان داد که بیشترین مقدار بیان هنگامی به دست آمد که ژن *GRFT* به سمت فضای بین سلولی (آپوپلاستی) هدف گذاری شد. در رتبه دوم بیشترین مقدار بیان هنگامی حاصل شد که پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی تجمع یافت. تفاوت قابل مشاهده ای نیز هنگامی که پروتئین *GRFT* در درون فضای سیتوپلاسمی رها شد، قابل ملاحظه نبود. هدف گذاری پروتئین نوترکیب *GRFT* در فضای آپوپلاستی گیاه سویا، بیشترین عملکرد پروتئین نوترکیب را ارائه داد. در کل گیاه سویا بیشترین عملکرد پروتئین نوترکیب را داشت.

امروزه جداسازی و خالص سازی پروتئین های نوترکیب با سیستم ۶ یک روش معمول می باشد (Arnau et al. 2006). Giomarelli et al. (2006) با استفاده از همین سیستم، توانستند ۷۰ درصد کل پروتئین محلول باکتری، *GRFT* نوترکیب تولید کنند. در مطالعه حاضر، عصاره گیری طبیعی و استفاده از سیستم ۶ His-tag تولید سطوح پایین *GRFT* را در باکتری در پی داشت.

پس از همسانه سازی ژن *GRFT* در ناقل بیانی pET 28 a کلونی های به دست آمده با PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه ژنی تایید (شکل ۲-الف) و سازه ژنی به دست آمده توالي یابی شد. نتایج توالي یابی میزان ۹۹ درصد همولوژی را با توالي ژن سنتزی *GRFT* (FJ594069.1) نشان داد. برای تعیین اینکه پروتئین نوترکیب تولید شده در باکتری به صورت محلول تولید می شود یا به صورت اجسام مجتمع، استخراج پروتئین به دو روش طبیعی و واسرشته انجام شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد که قسمت عمده پروتئین به صورت محلول در باکتری باقی می ماند طوری که بر روی ژل تفاوت قابل ملاحظه ای را می توان مشاهده کرد (شکل ۲-ب).

بررسی بیان گریفیتین در سطح رونوشت: با تکثیر قطعه ۱۵۰ جفت بازی از cDNA حاصل از mRNA نمونه های اینفیلتره شده، رونوشت برداری از تراژن *GRFT* به اثبات رسید (شکل ۳-الف). نتایج آزمون Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *GRFT* و آغازگرهای ژن کنترل برای هر گیاه نشان داد که بیشترین رونویسی از روی ژن *GRFT* در مقایسه با گیاه غیر اینفیلتره شده در کاهو مشاهده شد در حالی که یونجه کمترین بیان ژن را در سطح رونوشت برداری نشان داد (شکل ۳-ب). با



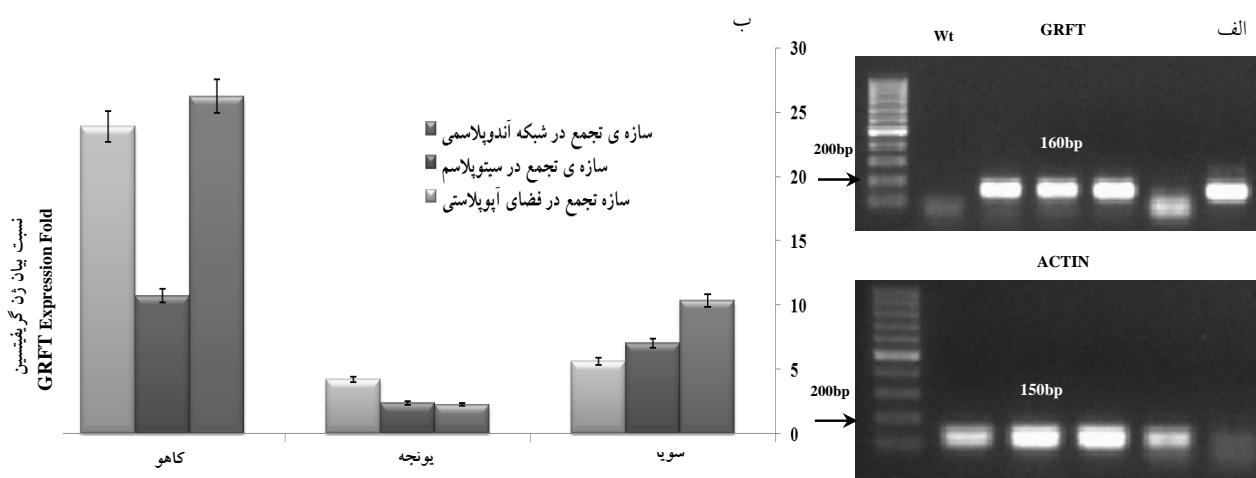
شکل ۲- (الف) تایید سازه‌های ساخته شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. (NT) شاهد منفی؛ (W) شاهد مولکولی. بعد از تایید دو کلونی مثبت بری مراحل بعد استفاده شد؛ (ب) بررسی پروتئین بیان شده در *E.coli* چاهک ۱) پروتئین کل استخراج شده از باکتری BL21 بدون ناک به عنوان کنترل منفی؛ چاهک ۲ و ۳) پروتئین کل استخراج شده به روش واسرشته؛ چاهک ۵ و ۶) پروتئین خالص سازی با ستون Ni-NTA agarose. چاهک ۱) پروتئین خالص سازی با روشن غیرواسرشته. (ج) تایید پروتئین چاهک ۲) پروتئین پس از اضافه کردن بافر الوشن (Elution)؛ چاهک ۳) پروتئین بعد از اضافه کردن بافر الوشن (Elution)؛ چاهک ۴) پروتئین چاهک ۵) پروتئین چاهک ۶) پروتئین چاهک ۷) پروتئین چاهک ۸) پروتئین چاهک ۹) پروتئین چاهک ۱۰) پروتئین چاهک ۱۱) پروتئین چاهک ۱۲) پروتئین چاهک ۱۳) پروتئین چاهک ۱۴) پروتئین چاهک ۱۵) پروتئین چاهک ۱۶) پروتئین چاهک ۱۷) پروتئین چاهک ۱۸) پروتئین چاهک ۱۹) پروتئین چاهک ۲۰) پروتئین چاهک ۲۱) پروتئین چاهک ۲۲) پروتئین چاهک ۲۳) پروتئین چاهک ۲۴) پروتئین چاهک ۲۵) کیلودالتونی نشانده‌نده پروتئین دایمر است.

آنژیم فیتاز در فضای بین سلولی، ۲۰ برابر فیتاز بیشتر در آرایدوبسیس بدست آورند. نتایج ما نیز کارآیی مناسب این پپتید راهنما برای هدف‌گذاری پروتئین‌های نوترکیب را نشان داد. Wandeltt et al. (1992) اولین بار اثر KDEL بر تجمع پروتئین ویسلین در شبکه آندوپلاسمی بذور و افزایش پایداری پروتئین را گزارش کردند. در سلول‌های تراریخت، تترابیتید KDEL نمی‌تواند نقش خود را به طور کامل ایفا کند (Movafeghi 2006) زیرا تجمع پروتئین‌های طبیعی است، همین می‌تواند سبب اشتعاب گیرنده‌های از سلول‌های دارای توالی راهنما در شبکه آندوپلاسمی بیشتر نباشد. با توجه به بیان بیشتر پروتئین نوترکیب دارای KDEL شود. با توجه به یونجه و کاهو می‌توان نتیجه KDEL در گیاه سویا نسبت به یونجه و کاهو می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تعداد گیرنده‌های KDEL در سلول‌های سویا بیشتر بوده است.

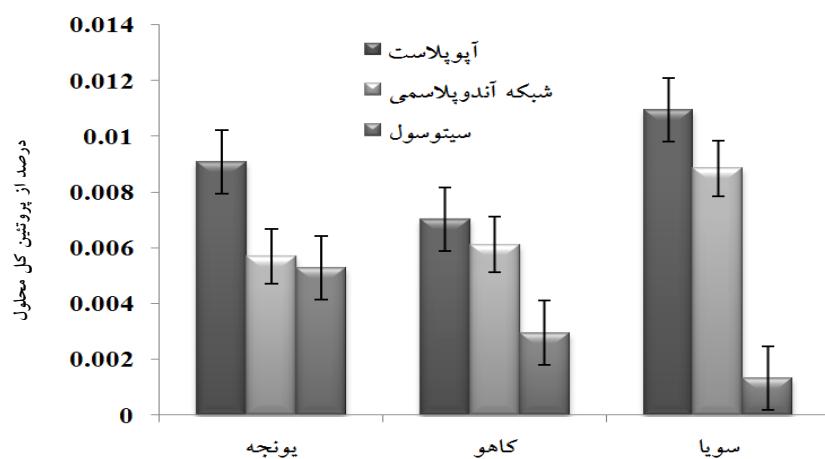
به نظر می‌رسد بهینه‌سازی توالی بر اساس ترجیح کدون گیاهی تاثیر زیادی در میزان بیان داشته است. امروزه بهینه‌سازی توالی ثانی یکی از راهکارهای افزایش رونویسی و ترجمه ژن‌های خارجی می‌باشد که در این تحقیق در مورد گیاه کاهو مشاهده شد. افزایش رونوشت‌های mRNA ژن الزاماً نمی‌تواند منجر به

در بیان موقت ژن VP2 گیاهان یونجه و توتون نسبت به کاهو پتانسیل بیشتری برای تولید پروتئین نوترکیب داشته‌اند (Pourseydi et al. 2009) این با نتایج ما در بیان پروتئین نوترکیب GRFT مطابقت دارد. همچنین نتایج ما نشان داد که در گیاه یونجه علیرغم بیان پایین‌تر در سطح رونوشت، با هدف‌گذاری پروتئین در جایگاه مناسب سلول، پروتئین نوترکیب بیشتری به دست آمد که بیانگر دستگاه ترجمه قدرتمند یونجه است. بافت برگی کاهو دارای محتوى آب بالايي است و پروتئين‌ها ثبات خوبی در اين شرایط نداشته و تجزيه می‌شوند اما کاهو بدليل داشتن ترکیبات آلkaloidی کم و هزینه کمتر فرآيندهای پایین دست مورد توجه است (Hefferon 2010). سویا نیز از اهداف مناسب زراعت مولکولی است طوری که آنتی‌بادی تولید شده در این گیاه جزو محدود پروتئین‌هایی است که وارد فاز بالینی شده است (Fischer et al. 2004).

استفاده از پپتید راهنمای ژن Extensin هويچ سبب افزایش تجمع پروتئین GRFT در فضای بین سلولی شد و بدین طریق نوعی ممانعت فیزیکی بین محل تجمع پروتئین نوترکیب و پروتئازها به وجود آورد. Richardson et al. (2001) توансنتد با هدف‌گذاری



شکل ۳- بررسی بیان ژن *GRFT* (الف) بالا: تایید بیان *GRFT* در کاهو با RT-PCR. پایین: تکثیر ژن *ACTIN* کاهو به عنوان ژن کنترل داخلی (ب) سطح نسبی بیان ژن *GRFT* در نمونه‌های اینفلیتره شده با سازه‌های حاوی پپتید راهنمای ZERA، KDEL و زیر واحد SP از پپتید راهنمای Extensin



شکل ۴- نتایج حاصل از آزمون الیزا (درصد *GRFT* نوترکیب از پروتئین کل محلول). بین سه گیاه مورد بررسی، سویا بیشترین انباشت پروتئین را داشت، بیشترین تولید پروتئین نیز زمانی صورت گرفت که پروتئین در شبکه آندوپلاسمی با استفاده از پپتید راهنمای Extensin هدف گذاری شد.

### منابع

- Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen I (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and purification* 48:1-13.
- Balzarini J (2006) Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research* 71: 237-247.
- Boyd M, Mori T, O'Keefe B (2004) Griffithsin, Glycosylation-Resistant Griffithsin, and Related Conjugate, Compositions, Nucleic Acid, Vectors, Host Cells, Method of Production and Method of use. US Patent. PCT/US2005/018778.

سطح بالای پروتئین گردد. زیرا تنها حدود ۲۰-۴۰ درصد فراوانی پروتئین با غلط mRNA قابل تعیین است ( Nie et al. 2006). غلط نهایی، به سرعت ترجمه و تجزیه نیز بستگی دارد. هدف گذاری پروتئین‌ها به سمت اندامک‌ها و فضاهای بین سلولی که در آن‌ها میزان پروتئازهای سلولی کمتر است سبب افزایش بازده پروتئین نوترکیب می‌شود. اگرچه دستگاه رونویسی در گیاه کاهو بسیار بهتر از سویا و یونجه عمل کرده است اما میزان نهایی پروتئین *GRFT* کمتر بوده است.

- 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.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current opinion in Biotechnology* 12: 450-54.
- 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
- Hefferon KL (2010) Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine . CRC Press, USA, 27-39.
- 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.
- 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* 19: 282-289.
- Nie L, Wu G, Zhang W (2006) Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339:603-610.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances* 29: 210-222.
- Pourseyedi S, Hashemi Sohi H, Omidi M, Ghoreshi SA, Shah Nejat Boushehri AA, Jourabshi E (2009) Transient expression of VP2 gene of very virulent IBDV in tobacco, Alfalfa and lettuce leaves by agroinfiltration. *Veterinary Journal (Pajouhesh and Sazandegi)* 83: 18-25.
- Rice J, Ainley WM, Shewen P (2005) Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Animal Health Research Reviews* 6:199-209
- Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE (2001) Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal* 25:6: 641-649.
- Rsti A (2006) Immunology for nurses. Salemi press, Tehran, IRAN (In Farsi)
- Sadraeian M, Honari H, Madanchi H, Hesaraki M (2011) Extraction, Cloning and Expression of RTB, as a Vaccine Adjuvant/Carrier, in *E.coli* and Production of Mouse Polyclonal Antibody (Anti-B chain Abs). *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7: 247-254.
- Schillberg S, Emans N, Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemistry Reviews* 1:45-54.
- Sharon N (2006) Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *Journal of Biochemistry* 10:1-29.
- Torrent M, Llop-Tous I, Ludevid MD (2009) Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Methods in Molecular Biology* 483:193-208.
- 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.
- Wang A, Ma S (2012) Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. Springer, New York, 183-198.