ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۳۱۲- ۳۰۵

تاثیر نوع میزبان گیاهی و نوع پپتید راهنما بر انباشت پروتئین ضد ویروس گریفیتسین

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

یاور وفایی[۱]، مصباح بابالار[۲]، محمد افشار شاندیز[۳]، هوشنگ علیزاده*[۴]

۳،۲،۱ و۴- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استاد، دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Vafaee Y[1], Babalar M[2], Afshar Shandiz M[3], Alizadeh H[*4]

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 بیماری‌هایی مانند ایدز نقش دارند، اهمیت زیادی دارد. در این بین، اثر گریفیتسین (*GRFT*) به عنوان یک لکتین در ممانعت از ورود HIV به سلول در غلظت‌های پیکومول تایید شده است. برای بررسی تولید و انباشت مناسب گریفیتسین در بافت گیاهی سه گیاه یونجه، سویا و کاهو به عنوان میزبان‌های گیاهی جهت بیان موقت انتخاب شدند. همچنین اثر سه پپتید راهنمای KDEL، Extensin و زیرواحد SP پپتید راهنمای ZERA در انباشت *GRFT* به ترتیب در شبکه آندوپلاسمی، فضای آپوپلاستی و فضای نزدیک به دیواره سلول‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. ۷۲ ساعت بعد از آگروانفیلتراسیون، 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 هدف‌گذاری پروتئین به فضای آپوپلاستی، گیاه سویا بیشترین تجمع پروتئین را داشته است. در حالی که کاهو علیرغم رونویسی بالا از ژن *GRFT*، انباشت پروتئین نوترکیب کمتری را نشان داد. نتایج نشان داد که گیاه سویا و هدایت پروتئین به آپوپلاست راهکار مناسبی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب GRFT می باشد.

واژه‌های کلیدی

آگروانفیلتراسیون،
زراعت مولکولی،
گریفیتسین،
لکتین،
HIV

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]

مقدمه

تولید پروتئین‌های دارویی، پروتئین‌های کارکردی، آنتی‌بادی‌ها و سایر پروتئین‌های صنعتی در گیاهان، زراعت مولکولی نامیده می‌شود (Fischer et al. 2004). هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته ۲ تا ۱۰ درصد هزینه تولید در سیستم‌های باکتریایی می‌باشد (Giddings et al. 2010). برخی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان شامل پپتیدهای فعال زیستی (Scillberg et al. 2002)، آنتی‌ژن‌ها (Rice et al. 2005)، آنتی-بادی‌ها (Scillberg et al. 2002)، پروتئین‌های دارویی (Tiwan et al. 2009) و آنزیم‌ها (Fischer et al. 2004) می‌باشند.

انتقال ژن به کمک باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس و تفنگ ژنی روش‌های مرسوم تولید گیاهان تراریخت می‌باشند. بر اساس الگوی بیان ژن، دو روش بیان ثابت و موقت وجود دارد. در بیان ثابت باید شرایط کشت بافت و باززایی گونه گیاهی بهینه شده باشد بطوری که دست‌یابی به گیاهان تراریخت با بیان ثابت زمانبر است (Obeme et al. 2011). بیان موقت ژن بستری مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان است زیرا پروتئین در زمان کوتاهی قابل دست‌یابی است. در این روش مقادیر مناسبی 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 موقت وابسته به ادغام کروموزومی ژن‌های خارجی نیست و تحت تاثیر مکان[1] الحاق ژن قرار نمی‌گیرد (Wang and Ma 2011). از دو روش آگروااینفیلتراسیون[2] و آلودگی با ویروس‌های گیاهی برای بیان موقت 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 موقت با استفاده از آگروباکتریوم در تولید سریع داروهای زیستی استفاده می شود (Wang and Ma 2011). پپتیدهای راهنما توالی‌هایی هستند که در انتهای کربوکسیل یا آمینی پروتئین قرار دارند تا پروتئین را به بخش‌های مختلف سلول هدایت کنند (Fischer et al. 2004). KDEL (Wandeltt et al. 1992)، پپتید راهنمای ژن *Extensin* هویج (Richardson et al. 2001) و پپتید راهنمای ژن گاما زئین ذرت (*ZERA*) (Torrent et al. 2009) از جمله پپتیدهای راهنما در گیاهان هستند که به ترتیب پروتئین را در شبکه آندوپلاسمی، فضای آپوپلاستی و اندامک‌های مستقل پروتئینی[3] هدف‌گذاری می‌کنند (Wandeltt et al. 1992; Obeme et al. 2011).

ویروس افت ایمنی انسان (HIV) جزو خانواده‌ی رتروویروس‌ها 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 برهمکنش 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).

[1] Position effect
[2] Agroinfilteration
[3] Protein body

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]

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 غیرکووالانسی بر همکنش داده و اغلب این پیوندها به صورت دو طرفه و کاملا 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 گریفیتسین 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 FIV، SIV و HTLV و نیز ویروس‌های عامل سرخک، اِبولا و وبا را نیز هدف قرار می‌دهد (Boyd et al. 2004).

با توجه به جایگاه با ارزش دارویی GRFT، در اولین گام GRFT در باکتری به عنوان یک میزبان مدل پروکاریوتی بیان شد سپس بیان موقت ژن *GRFT* در گیاه یونجه، کاهو و سویا با روش آگروباکتریوم صورت گرفت و اثر سه نوع پپتید راهنما در انباشت نهایی پروتئین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی ژن و طراحی سازه‌ها

جایگاه‌های برشی موجود در توالی ژن گریفیتسین (Gene ID: CS255217.1) با نرم‌افزار BIOlabs-NEB Cutter حذف شد. سپس برخی قسمت‌های توالی بدون تغییر در اسیدهای آمینه دستورزی شدند. در نهایت برای سیستم *E.coli* ناقل بیانی pET28a- حامل توالی بهینه شده ژن (شکل۱- الف) و برای بیان موقت از طریق آگروباکتریوم سازه‌های pBI-KDGR (شکل۱- ب)، pBI-ZRSPGR (شکل۱- ج) و pBI-ETGR (شکل۱- د) نیز طراحی و ساخته شدند.

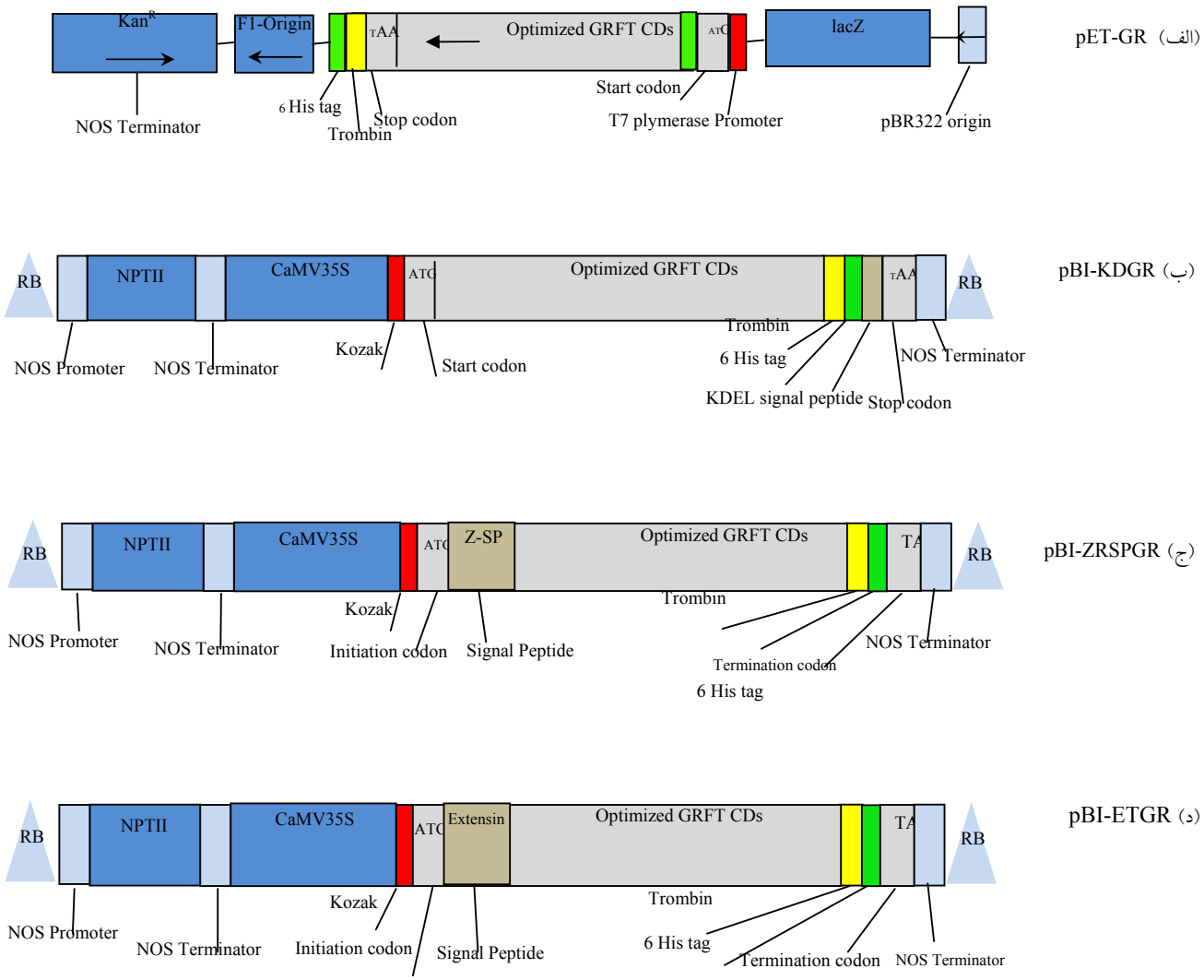
بیان پروتئین در باکتری *E .coli* و تولید پلی کلونال آنتی‌بادی: یک کلونی BL21 تایید شده با کلونی-پی‌سی‌آر در ۵۰۰ سی‌سی محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین رشد داده شد (دمای ۳۷ °C و دور شیکر ۲۸۰) بعد از رسیدن تراکم سلولی در ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵، القای بیان تراژن با IPTG انجام و پروتئین GRFT استخراج شده پس از عبور از ستون Ni-NTA agarose شرکت کیاژن بر روی ژل SDS-PAGE برده شد (شکل۲) بررسی کمی بیان پروتئین نیز بر اساس روش (Pourseyedi et al. 2009) انجام شد و ۱۰ میکروگرم آنتی‌ژن به موش به فواصل ۲۱ روز تزریق شد و بعد از خونگیری سرم حاوی آنتی‌بادی به دست آمد (Sadraeian et al. 2011).

تهیه مایه تلقیح و انجام آگروباکتریوم: از هرکدام از کلونی‌های آگروباکتری سویه LBA4404 واجد ناقل نوترکیب، ۵۰ میلی‌لیتر کشت شبانه در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین، ۵۰ µg/ml ریفامپیسین و (دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۲۸۰) تهیه شد و بعد از رسیدن OD به حدود ۰/۵ تا ۰/۶ در *g* ۵۰۰۰ رسوب داده شد و در محیط آگروباکتریوم (محیط MS ۱/۲ ۳ درصد ساکاروز به همراه ۱۰۰ppm مویان توئین ۲۰) به مدت ۴۰ دقیقه رشد داده شد تا باکتری به محیط جدید عادت کند. نمونه‌های برگی در محیط تلقیح حاوی باکتری در داخل دسیکاتور قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتریایی تحت شرایط خلا ۲۵۰ میلی‌بار و سه بار شکست ناگهانی وارد فضای بین بافتی شد و سپس برگ‌ها بروی کاغذ صافی آغشته به محیط MS قرار داده شدند.

استخراج RNA و انجام Real time PCR

بعد از گذشت ۷۲ ساعت از آگروباکتریوم و اطمینان از بیان ژن، RNA کل با روش bioZOL^{TM} 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 (جدول۱). مقادیر Ct با نرم‌افزار REST به دست آمد و سطح نسبی بیان GRFT در مقادیر $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با روش لیواک و اشمیتگن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]



شکل۱- سازه‌های طراحی شده (الف) سازه pET 28 a (ب، ج و د) به ترتیب سازه pBI121 حاوی ژن GRFT همراه با سیگنال پپتیدهای KDEL؛ ZERA-SP و Extensin که به ترتیب ژن را در شبکه آندوپلاسمی، فضای نزدیک به دیواره سلولی و فضای آپوپلاست هدف‌گذاری می‌کنند.

(Livak and Schmittgen 2001) به دست آمد.

استخراج پروتئین، SDS-PAGE و ELISA

۰/۱ گرم از برگ‌های اینفیلتره در ازت مایع پودر شد و بعد از اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (DTT)) و سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰ g ، روشناور جدا و بر اساس روش برادفورد (Bradford 1972) غلظت پروتئین کل اندازه‌گیری شد. SDS-PAGE با ۳۰ میکروگرم پروتئین کل و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت . در نهایت انباشت و تعیین غلظت GRFT با ELISA صورت گرفت به این ترتیب که از GRFT خالص شده از باکتری غلظت‌های صفر تا ۲۰ نانوگرم به عنوان استاندارد جهت تعیین غلظت پروتئین استفاده شد. بعد از پوشش دادن پلیت ELISA با آنتی‌ژن و استفاده از آنتی‌بادی اولیه، آنتی‌بادی ثانویه و سوبسترای TMB، جذب (OD) در ۴۵۰ نانومتر در ۳ تکرار قرائت شد، اعداد کنترل منفی از داده‌های اصلی کسر شد و در نهایت، غظت نهایی پروتئین به صورت درصد از کل پروتئین محلول به دست آمد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]

جدول۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای آزمون Real time PCR

ژن	گیاه	آغازگر پیشرو	آغازگر پسرو
گریفیتسین ^{T*}	-	5′ TCTGGTGGTTCTCCTTTTTCTG3′	5′ ATCACCAGCACTACCATTAATTTG 3′
گریفیتسین ^{T**}	-	5′ GGTGGTAACCTTTCTCCTACTTTCAC3′	5′ CCACCATAAGGACCGAATCTTC 3′
آکتین ^{H}	کاهو	5′ TGATTGGAATGGAAGCTGCTG 3′	5′ CAGTGATTTCCTTGCTCATCCG3′
بتا توبولین ^{H}	سویا	5′GTCGAGTGGATTCCCAACAATG3′	5′GAAAGCCTTCCTCCTAAACATGG3′′
MSC27 ^{H}	یونجه	5′ GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAACG3′	5′ AGCTGAGTCATCAACACCCTCAT3′

* آغازگر مورد استفاده برای تایید سازه‌های ژنی (محصول PCR ۳۰۳ جفت باز).
** آغازگر مورد استفاده برای بررسی‌های Real time PCR (محصول PCR ۱۶۰ جفت باز)
T ژن گریفیتسین ژن خارجی بیان شده به صورت موفت در کاهو، سویا و یونجه.
H ژن استاندارد داخلی برای مقایسه سطح رونوشت‌برداریِ ژن خارجی بیان شده

نتایج و بحث

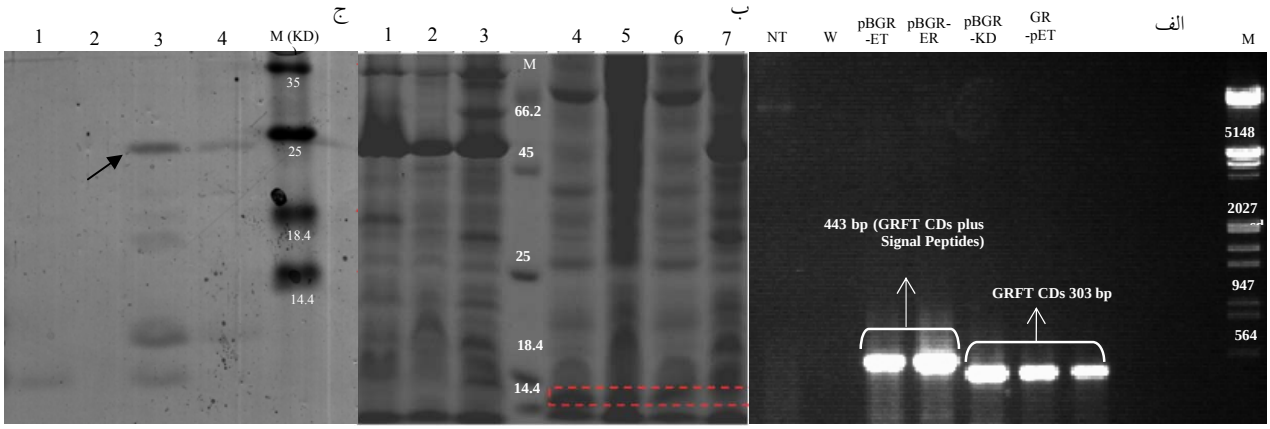
پس از همسانه‌سازی ژن *GRFT* در ناقل بیانی pET 28 a، کلونی‌های به دست آمده با PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه ژنی تایید (شکل۲- الف) و سازه ژنی به دست آمده توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی میزان ۹۹ درصد همولوژی را با توالی ژن سنتزی *GRFT* (FJ594069.1) نشان داد. برای تعیین اینکه پروتئین نوترکیب تولید شده در باکتری به صورت محلول تولید می‌شود 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 ملاحظه‌ایی را می‌توان مشاهده کرد (شکل۲- ب).

بررسی بیان گریفیتسین در سطح رونوشت: با تکثیر قطعه ۱۵۰ جفت بازی از cDNA حاصل از mRNA نمونه‌های اینفیلتره شده، رونوشت‌برداری از تراژن *GRFT* به اثبات رسید (شکل۳- 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 رونوشت‌برداری نشان داد (شکل۳- ب). با توجه به داده‌های الگوی رونوشت ژن‌ها، پپتیدهای راهنما تاثیری بر رونوشت‌برداری نداشتند. از طرف دیگر چون بیان بالای یک ژن همیشه نشان‌دهنده انباشت بیشتر پروتئین نیست، برای بررسی میزان پروتئین نهایی، آزمون الیزا صورت گرفت.

نتایج آزمون الیزا با آنتی‌بادی پلی کلونال تولید شده درموش نشان داد که بیشترین مقدار بیان هنگامی به دست آمد که ژن *GRFT* به سمت فضای بین سلولی (آپوپلاستی) هدف‌گذاری شد. در رتبه دوم بیشترین مقدار بیان هنگامی حاصل شد که پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی تجمع یافت. تفاوت قابل مشاهده‌ای نیز هنگامی که پروتئین *GRFT* در درون فضای سیتوپلاسمی رها شد، قابل ملاحظه نبود. هدف‌گذاری 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 خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب با سیستم 6 His-tag یک روش معمول می‌باشد (Arnau et al. 2006). Giomarelli et al. (2006) با استفاده از همین سیستم، توانستند ۷۰درصد کل پروتئین محلول باکتری، *GRFT* نوترکیب تولید کنند. در مطالعه حاضر، عصاره‌گیری طبیعی و استفاده از سیستم 6 His-tag تولید سطوح پایین *GRFT* را در باکتری در پی داشت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]



شکل۲- الف) تایید سازه‌های ساخته شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. NT) شاهد منفی؛ w) آب؛ M) نشانگر مولکولی. بعد از تایید دو کلونی مثبت بری مراحل بعد استفاده شد؛ ب) بررسی پروتئین بیان شده در *E.coli* چاهک۱) پروتئین کل استخراج شده از باکتری BL21 بدون ناقل به عنوان کنترل منفی؛ چاهک ۲و ۳) پروتئین کل استخراج شده به روش واسرشته؛ چاهک ۵ و ۶) پروتئین استخراج شده به روش غیرواسرشته. ج) تایید پروتئین خالص‌سازی با ستون Ni-NTA agarose. چاهک۱) نشانگر پروتئینی؛ چاهک ۲) پروتئین پس از اضافه کردن بافر الوشن (Elution)؛ چاهک ۳) پروتئین بعد از اضافه کردن بافر شستشو. باند ۲۵ کیلودالتونی نشان‌دهنده پروتئین دایمر است.

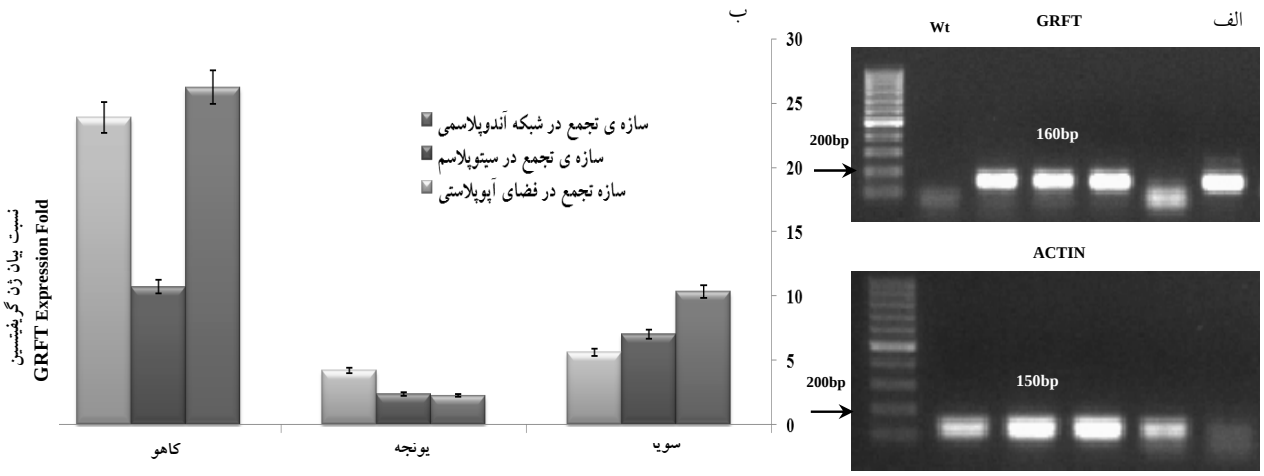
در بیان موقت ژن *VP2* گیاهان یونجه و توتون نسبت به کاهو پتانسیل بیشتری برای تولید پروتئین نوترکیب داشته‌اند (Pourseydi et al. 2009) این با نتایج ما در بیان پروتئین نوترکیب *GRFT* مطابقت دارد. همچنین نتایج ما نشان داد که در گیاه یونجه علیرغم بیان پایین‌تر در سطح رونوشت، با هدف‌گذاری پروتئین در جایگاه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

استفاده از پپتید راهنمای ژن *Extensin* هویج 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) توانستند با هدف‌گذاری آنزیم فیتاز در فضای بین سلولی، ۲۰ برابر فیتاز بیشتر در آرابیدوپسیس بدست آورند. نتایج ما نیز کارآیی مناسب این پپتید راهنما برای هدف‌گذاری پروتئین‌های نوترکیب را نشان داد.

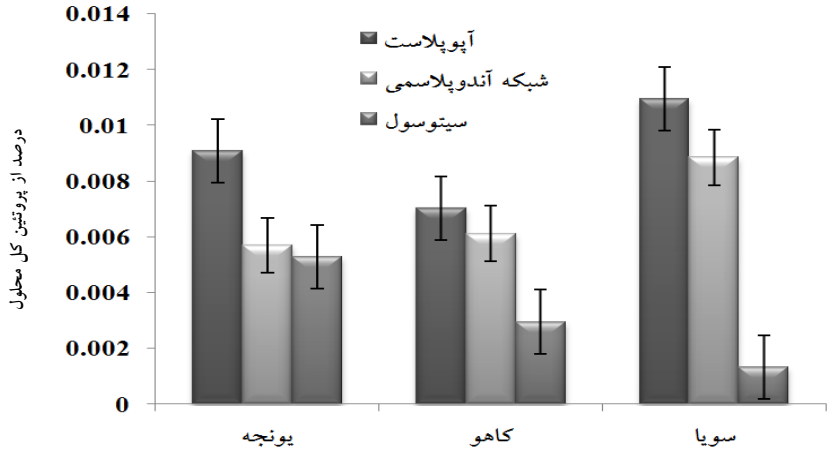
Wandeltt et al. (1992) اولین بار اثر KDEL بر تجمع پروتئین ویسیلین در شبکه آندوپلاسمی بذور و افزایش پایداری پروتئین را گزارش کردند. در سلول‌های تراریخت، تتراپپتید KDEL نمی‌تواند نقش خود را به طور کامل ایفا کند(Movafeghi 2006) زیرا تجمع پروتئین‌های دارای توالی راهنما در شبکه آندوپلاسمی بیش از سلول‌های طبیعی است، همین می‌تواند سبب اشباع گیرنده‌های KDEL شود. با توجه به بیان بیشتر پروتئین نوترکیب دارای KDEL در گیاه سویا نسبت به یونجه و کاهو می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا 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 ژنی 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]



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 اینفیلتره شده با سازه‌های حاوی پپتید راهنمای KDEL ، Extensin و زیرواحد SP از پپتید راهنمای ZERA.



شکل۴- 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 هدف‌گذاری شد.

سطوح بالای پروتئین گردد. زیرا تنها حدود ۴۰-۲۰ درصد فراوانی پروتئین با غلظت mRNA قابل تعیین است (Nie et al. 2006). غلظت نهایی، به سرعت ترجمه و تجزیه نیز بستگی دارد. هدف‌گذاری 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.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]

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 Biotechnoology 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-ΔΔCt 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.10.6]