ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۳۴-۱۲۷

تاثیر نوع پپتید راهنما بر انباشت پروتئین ضدویروس گریفیتسین در توتون تراریخته

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

یاور وفایی[۱]، مصباح بابالار[۲]، محمد افشار شاندیز[۲]، شکوفه صدراوی[۲]، هوشنگ علیزاده[*۲]

۱- استادیار، دانشگاه کردستان.

۲- به ترتیب استاد، کارشناس‌ارشد، دانشجوی کارشناس‌ارشد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Vafaee Y[1], Babalar M[2], Afshar Shandiz M[2], Sadravi S[2], 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 گریفیتسین *GRFT* توانایی غیرفعال کردن HIV و جلوگیری از انتقال سلول به سلول HIV را دارد. در این تحقیق ابتدا توالی ژن بر اساس ترجیح کدونی گیاه بهینه‌سازی شد، سپس دو سازه ژنی pBIgR-KD و pBIgR-ZR ساخته شدند که ژن *GRFT* به ترتیب تحت کنترل 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. شاخساره‌های تشکیل شده بر روی محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به محیط القای ریشه (MS ½ بدون هورمون) منتقل شدند. بررسی شاخساره‌های تراریخت مقاوم به کانامایسین با PCR و سادرن بلات الحاق موفق دو تا سه نسخه از ژن *GRFT* را در لاین‌های مورد بررسی نشان داد. بررسی بیان گریفیتسین در سطح رونوشت با RT-PCR و Real Time PCR نشان از قابلیت متفاوت لاین‌های تراریخته توتون در بیان *GRFT* داشت. بر اساس نتایج SDS-PAGE یک باند احتمالی در ناحیه KD ۲۷ مشاهده شد. آزمون وسترن بلات دو باند پروتئینی به صورت دایمر و مونومر به ترتیب با وزن‌های مولکولی ۱۳ و ۲۷ کیلودالتون را نشان داد. کمی‌سازی نتایج آزمون ELISA نشان داد که با هدف‌گذاری پروتئین در اجسام پروتئینی در مقایسه با شبکه آندوپلاسمی انباشت بالاتر پروتئین نوترکیب را در پی دارد. بر اساس این تحقیق با بهینه‌سازی توالی ژن، انتخاب میزبان مناسب و استفاده از پپتید راهنمای موثر می‌توان سطوح بالایی از پروتئین نوترکیب را به دست آورد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم
پپتید راهنما
توتون
گریفیتسین
HIV

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]

مقدمه

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 آنفولانزای مرغی و ویروس هپاتیت C (HCV) نیز بیماری‌های اپیدمی خطرناک ایجاد کرده‌اند (Kim 2010; O'Keef 2010). ایدز در سال ۱۹۸۱ شناسایی شد و مبارزه با عامل آن یعنی HIV همچنان ادامه دارد (Krambovitis 2005). در فرآیند آلودگی، HIV از لایه اپیتلیوم 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 آلودگی را رقم می‌زنند. بیشتر روش‌های درمانی کنونی محدودیت‌هایی همچون سمیت، دوره‌های درمانی سخت، داروشناسی ناقص و ظهور سوش‌های مقاوم HIV دارند (Trabattoni 2010).

گریفیتسین 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 وgp41 سطح ویروس را هدف قرار می‌دهد و این دلیل قابلیت فوق‌العاده *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، H5N1 (آنفولانزای مرغی)، ویروس هپاتیت C و ویروس تب خال نیز موثر می‌باشد (Zeitlin 2009).

بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان به ۱۰-۲ درصد هزینه سیستم‌های میکروبی نیاز دارد (Twyman 2003) و گیاهان توانایی تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های پیچیده را دارند. تراریزش ژنوم هسته‌ای میزان چندان بالایی از پروتئین نوترکیب را در پی ندارد (Droan 2006) و هدایت پروتئین نوترکیب به سمت اندامک‌های سلول و حفظ آن‌ها از گزند پروتئازهای سلولی، عملکرد بالاتر پروتئین نوترکیب را در پی دارد. پپتید راهنمای KDEL باعث نگهداشت پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود (Floss 2009). با توجه به اشباع پذیر بودن گیرنده‌های پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، با KDEL نمی‌توان به سطوح بسیار بالایی از پروتئین خارجی دست یافت (Croft 1999). پپتید راهنمای Zera 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).

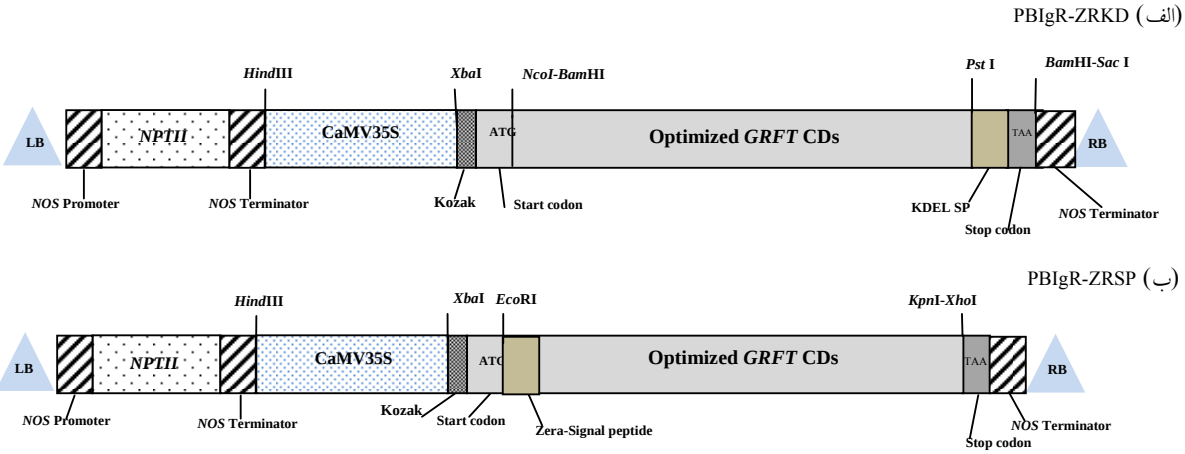
GRFT نوترکیب در باکتری و نیز به صورت موقت با ناقل‌های مبتنی بر ویروس در گیاه توتون بیان شده است (Giomarelli 2006; O'keef 2009) اما هزینه بالا و وجود اندوتوکسین‌ها از معایب این سیستم‌ها می‌باشد (Twyman 2003). از آنجا که گزارشی از بیان دائم *GRFT* در گیاهان وجود ندارد، در این تحقیق توالی بهینه شده ژن *GRFT* 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 پپتید راهنمای Zera و پپتید 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

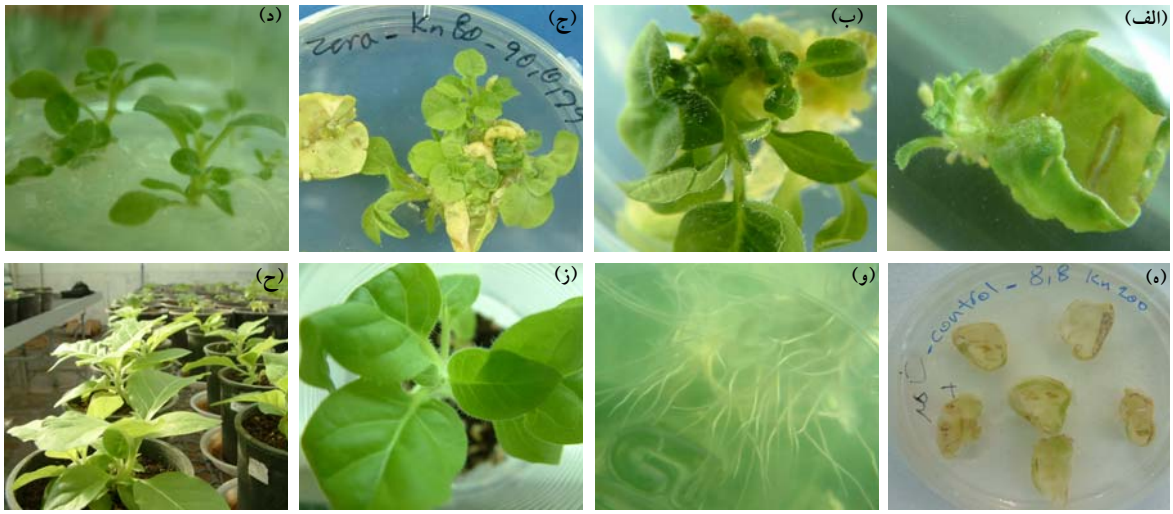
بهینه‌سازی توالی و طراحی ناقل سایت‌های برشی ناخواسته از توالی ژن *GRFT* (Gene ID:CS255217.1) با نرم‌افزار BIOlabs-NEB Cutter شناسایی و حذف شدند و برای اطمینان از حداکثر بیان ژن، بر اساس ترجیح کدونی گیاه (http://www.kazusa.or.jp/codon)، در بعضی نواحی ژن کدون‌های مناسب قرار داده شدند و سپس توالی از لحاظ میزان GC، ساختار ثانویه mRNA، ترکیب بازی مناسب و تنوع کدونی بهینه شد. توالی سنتزی ژن گریفیتسین همراه با پپتید راهنمای KDEL با برش آنزیمی *Xba*I و *Bam*HI در ناقل pBI121 همسانه شد تا ناقل pBIgR-KD ساخته شود. برای ساخت ناقل pBIgR-ZR نیز ژن *GRFT* حاوی بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera از ناقل pGH30222 با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I وارد ناقل pBI121 شد.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]



شکل۱- سازه pBIgR-KD حاوی ژن *GRFT* و پپتید راهنما KDEL (الف) و سازه pBIgR-ZRSP حاوی بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera (ب). RB و LB نواحی مرزی راست و چپ؛ *NOS*-P و *NOS*-T به ترتیب راه‌انداز و خاتمه‌دهنده ژن نوپالین سنتاز و CaMV35S راه‌انداز ویروس موزائیک گل‌کلم.



شکل ۲- مراحل باززایی گیاهان تراریخته. الف) شروع باززایی مستقیم ۱۲ روز بعد از تلقیح؛ ب و ج) شاخساره‌های مقاوم به کانامایسین با برگ‌های کاملاً سبز بعد از گذشت یک ماه؛ (ه) شاخسارهای غیرتراریخت سفید شده تحت فشار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین؛ و) ریشه‌های تشکیل شده در محیط ریشه‌زایی؛ ز) گیاه تراریخت در مرحله عادت‌دهی؛ ح) گیاهان توتون منتقل شده به گلخانه.

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 ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB (حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین و ۵۰ µg/ml ریفامپسین) ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد و رسوب باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح (نمک‌های محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگان) حل شد. ریزنمونه‌های زخم خورده به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر تهیه شده از برگ‌های جوان توتون به مدت ۸ دقیقه در محلول تلقیح قرار داده شدند و به محیط هم کشتی (محیط کامل MS حاوی mg/ml یک BA و mg/ml ۰/۱ NAA بدون آنتی‌بیوتیک) به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. سپس به محیط القای شاخساره (MS به علاوه mg/ml ۱۰۰ کانامایسین و mg/ml ۵۰۰ سفاتوکسیم) منتقل شد. شاخساره‌های باززاشده (شکل۲- الف، ب و ج)، به محیط افزایش طول شاخساره (شکل۲- د) منتقل شدند و هنگامی که طول آن‌ها

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]

به حدود ۸ سانتی‌متر رسید به محیط ریشه‌زایی (شکل۲- و) و سپس برای عادت‌دهی به ظروف یکبار مصرف حاوی پرلیت/ورمیکولیت منتقل شدند (شکل۲- ز) و در نهایت در گلدان‌ها خاکی در گلخانه کاشته شدند (شکل۲- ح).

تایید و بررسی گیاهان تراریخت

جهت گزینش با PCR از ۲۰ شاخساره با روش Murray and Thompson (1980)، DNA استخراج شد. PCR با آغازگرهای (Gr-F: 5′-GGTGGTTCTCCTTTCTCTGG-3′ و Gr-Rev: 5′-AAGATAATCACCAGCACTACCG-3′) و نیز با آغازگر پیشرو راه‌انداز 35S (35S-F: 5′- AACCCACAGATGGTTAGAGAGG-3′) و برگشت (گریفیتسین) صورت گرفت. برای آزمون سادرن بلات، ۷۵ میکروگرم DNA به وسیله آنزیم *Eco*RI برش داده‌شد و بعد از تفکیک بر روی ژل آگارز یک درصد، با استفاده از خاصیت کاپیلاری به غشای نایلونی منتقل شد. با استفاده از کیت DIG- DNA Labeling (Roche، آلمان) پروب نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین 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 وضوح بالا تهیه شد.

واکنش RT-PCR و Real time PCR

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 برای تایید حضور رونوشت با استفاده از آغازگرهای (Gr-RT-F: 5′- GGTGGTAACCTTTCTCCTACTTTCAC-3′ و Gr-RT-Rev: 5′- CCACCATAAGGACCGAATCTTC-3′) صورت گرفت. از ژن آکتین (Gene ID: CS255217.1) به عنوان شاهد (با آغازگرهای NtAct-F:5′ TGAAGGTTACGCCCTTCCTC -3′ و NtAct-Rev:5′-GCGGACAATTTCCCGTTC-3′) استفاده شد. واکنش Real Time PCR با کیت Power SYBR® Green و با دستگاه ABI صورت گرفت. مقادیر Ct با نرم‌افزار REST به دست آمد و سطح نسبی بیان *GRFT* در مقادیر $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با روش Livak and Schmittgen (2001) به دست آمد.

استخراج پروتئین، SDS-PAG، وسترن‌بلات و ELISA

به ۰/۲ گرم برگ پودر شده، یک میلی‌لیتر بافر استخراج (50 mM 1 mM DTT Tris–HCl 0.5M NaCl, 2 mM EDTA) اضافه و بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ g ×۴۰۰۰، روشناور جدا و با روش Bradford (1970) غلظت پروتئین کل اندازه‌گیری شد. SDS-PAGE با ۳۰ µg پروتئین کل و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت. برای آزمون وسترن بلات نیز پروتئین تفکیک شده بروی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد به غشای PVDF منتقل شد. سپس بر اساس دستورالعمل Sambrook and Russell (2001) به ترتیب مراحل بلوکه‌کردن (در بافر PBST حاوی ۵ درصد شیرخشک)، اضافه کردن آنتی‌بادی پلی‌کلنال بر علیه پروتئین *GRFT* (آنتی‌بادی اولیه)، آنتی‌بادی 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 داده‌های 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.

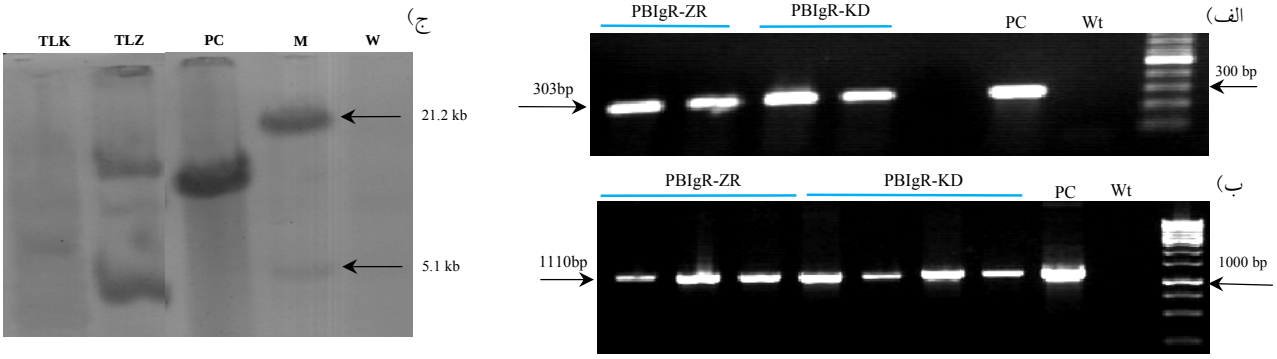
نتایج و بحث

جهت بررسی گیاهان تراریخته به واسطه باززایی و کارایی تراریزش بالا در رقم سامسون، از هر سازه ژنی حدود ۳۰ گیاه تراریخت به گلخانه منتقل کنیم (شکل۲- ح). PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن و آغازگر 35S نشان از الحاق موفق ژن به ژنوم توتون داشت (شکل۳- 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 (شکل۳- ج).

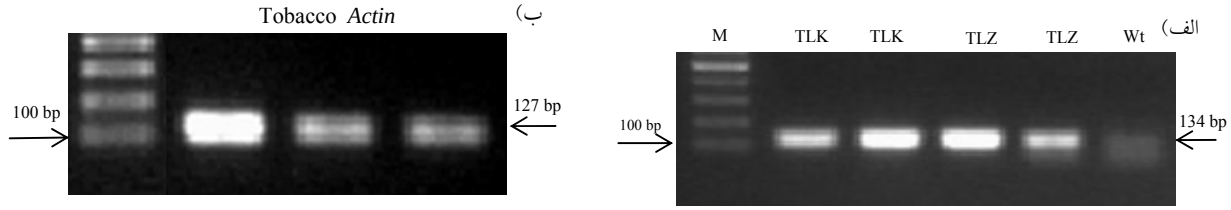
سنجش بیان *GRFT* در سطح رونوشت با تکثیر قطعه ۱۵۰ جفت بازی از cDNA ساخته شده حاصل از mRNA لاین‌های انتخابی،

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]



شکل۳- تایید انتقال ژن به ژنوم هسته‌ای لاین‌های تراریخته توتون. الف) تکثیر قطعه ۳۰۳ جفت‌بازی ژن گریفیتسین؛ ب) تکثیر قطعه ۱۱۱۰ جفت‌بازی (۸۰۰ نوکلئوتید راه‌انداز CaMV همراه با ۳۱۰ نوکلئوتید 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).



شکل۴- تایید رونوشت‌برداری از ژن گریفیتسین در لاین‌های تراریخته توتون (الف) تکثیر رونوشت ۱۳۴ جفت‌باز ژن *GRFT* از cDNA (ب) تکثیر قطعه ۱۲۷ جفت‌بازی از ژن آکتین به عنوان ژن استاندارد جهت مقایسه سطح بیان تراژن گریفیتسین در لاین‌های مورد بررسی.

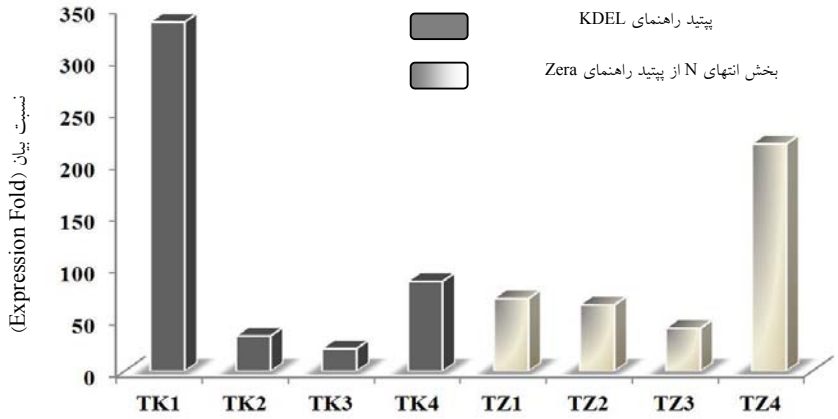
رونوشت‌برداری از تراژن *GRFT* قرار گرفته در ژنوم این لاین‌ها نیز به اثبات رسید (شکل۴). با مقایسه میزان بین ژن گریفیتسین نسبت به ژن آکتین به عنوان ژن کنترل درونی، بر اساس نتایج Real Time-PCR تفاوت چشمگیری بین لاین‌های تراریخته در بیان ژن *GRFT* وجود داشت طوری که بیشترین بیان ژن در لاین TK1 (۳۳۶ برابر) و کمترین در لاین TK3 (۱۹ برابر) بود (شکل ۵). بیان ژن گریفیتسین در لاین‌های تراریخته شده با سازه‌های pBIgR-KDSP و pBIgR-ZRSP نشان می‌دهد که نوع پپتید راهنما (KDEL و بخش انتهایی پپتید راهنمای Zera) تاثیر بروی رونوشت‌برداری نداشته است.

نتایج حاصل از SDS-PAGE، وسترن بلات و ELISA

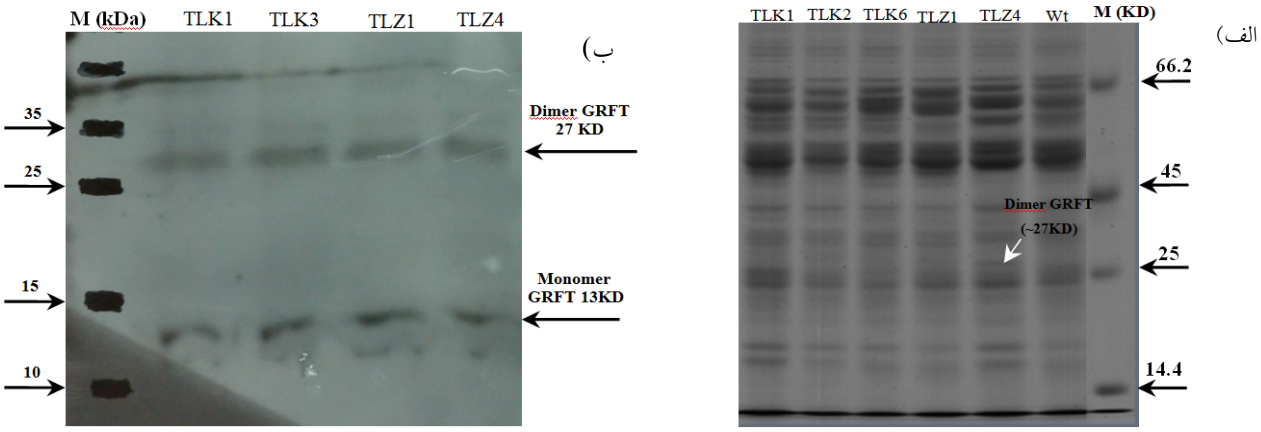
تفکیک پروتئین کل بر روی ژل SDS-PAGE یک باند احتمالی مربوط به گریفتسین در ناحیه ۲۷ کیلودالتون را نشان داد (شکل۶- الف). اما برای تایید بیشتر لاین‌های تراریخت وسترن بلات و ELISA نیز صورت گرفت. در آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلنال تولید شده در موش بر علیه پروتئین *GRFT* هر چهار لاین TLK1، TLK3، TLZ1 و TLZ4 بیان پروتئین نوترکیب *GRFT* را به صورت مونومر و دایمر نشان دادند (شکل۶- ب). کمی‌سازی انباشت 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 انباشت پروتئینی بیشتری داشته‌اند (شکل۷). با مقایسه میزان انباشت پروتئین هر لاین (شکل۷) با میزان بیان و رونویسی ژن (شکل۵) 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 آن ها با PCR مثبت بودند که نشان‌دهنده قابلیت باززایی و کارایی تراریزش بالا می‌باشد. وجود توالی‌های شبیه به SAR (نواحی اتصال داربست) 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

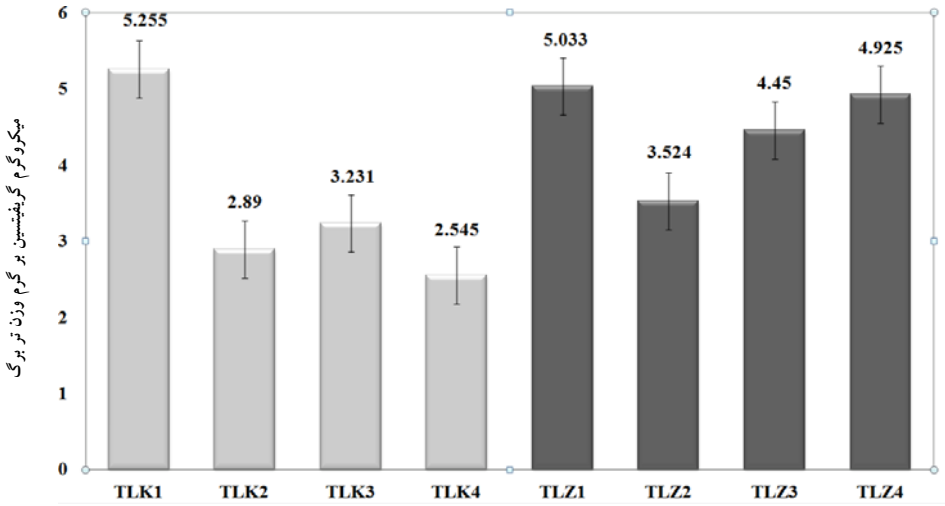
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]



شکل ۵- نتایج حاصل از Real Time PCR. نسبت بیان بین لاین‌های تراریخته توتون حاصل از سازه‌های ژنی PBIgR-KD و PBIgR-ZR. از نظر نسبت بیان تراژن *GRFT*، لاین‌های مورد نظر اختلاف زیادی با یکدیگر نشان می‌دهند.



شکل۶- الف) بررسی پروتئین کل گیاهان تراریخته توتون؛ در ناحیه حدود ۲۷ کیلودالتونی یک باند پلی‌مورفیسم در لاین توتون TLZ4 مشاهده می‌شود. در این لاین پروتئین نوترکیب تحت کنترل بخش انتهای N پپتید راهنمای Zera قرار دارد. ب) بررسی لاین‌های تراریخت توتون با وسترن بلات، دو باند در نواحی ۱۳ و ۲۷ کیلودالتون به ترتیب نشان‌دهنده پروتئین گریفیتسین در دو حالت مونومر و دایمر می‌باشد.



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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]

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 الحاق آن می‌باشد (Fischer et al. 2008). پس همیشه بیان بالای یک ژن، انباشت بالاتر پروتئین را در پی ندارد، موضوعی که در این تحقیق نمایان بود. با وجود مشاهده یک باند ۲۷ کیلودالتونی 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 تایید 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. KDEL مبتنی بر گیرنده‌های سطح شبکه آندوپلاسمی بوده و اشباع پذیر هستند (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 His-Tag 6 جهت خالص‌سازی به توالی ژن الحاق 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.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]

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, Irifune 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 20:759-71.

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.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.1.2]