



## بررسی بیان موقت آنتی ژن *HAI* ویروس آنفلوانزای پرندگان (*H5N1*) در گیاهان یونجه، سویا و کاهو به روش آگرواینفیلتراسیون

افسانه سادات فرساد<sup>۱</sup>، سعید ملک زاده شفارودی<sup>۲\*</sup>، نسرین مشتاقی<sup>۳</sup>، فاطمه فتوحی<sup>۴</sup>، سعید زیبایی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی-گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات-دانشکده کشاورزی-دانشگاه فردوسی مشهد  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات-دانشکده کشاورزی-دانشگاه فردوسی مشهد  
<sup>۳</sup>دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات-دانشکده کشاورزی-دانشگاه فردوسی مشهد  
<sup>۴</sup>استادیار مرکز تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران  
<sup>۵</sup>استادیار موسسه واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵

### چکیده

آنتی ژن *HAI* ایمونوژن اصلی تولید کننده بیماری فوق حاد پرندگان (*H5N1*) می باشد که منجر به بروز اپیدمی و پاندمی های متعددی در جهان شده است. با توجه به اهمیت فناوری جدید تولید پروتئین های نو ترکیب در گیاهان، تولید این پروتئین نیز بسیار مورد توجه قرار دارد. در مطالعه حاضر از بیان موقت آنتی ژن *HAI* به روش آگرواینفیلتراسیون، برای تولید این پروتئین نو ترکیب در گیاهان یونجه، سویا و کاهو استفاده شده است. همچنین اثر سه پپتید راهنمای *KDEL*، *Extensin* و پپتید راهنمای *ZERA* در تجمع پروتئین به ترتیب در شبکه آندوپلاسمی، فضای آپوپلاستی و اجسام پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. ۷۲ ساعت بعد از آگرواینفیلتراسیون، نتایج *qRT-PCR* نشان داد که کاهو بیشترین و سویا کمترین میزان رونوشت از ژن *HAI* را داشت. بیان موقت پروتئین در برگ های تراریخت، با استفاده از تکنیک الیزا اندازه گیری شد. نتایج آزمون الیزا نشان داد که با هدف گذاری پروتئین به فضای آپوپلاستی، گیاه یونجه بیشترین تجمع پروتئین را داشته است. در حالی که کاهو علیرغم رونویسی بالا از ژن *HAI* تجمع پروتئین نو ترکیب کمتری را نشان داد. بنابراین با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون و انتقال سازه بیانی *HAI*، نتایج نشان داد که گیاه یونجه و هدایت پروتئین به آپوپلاست راهکار مناسبی جهت تولید پروتئین های نو ترکیب *HAI* است.

**کلمات کلیدی:** آگرواینفیلتراسیون، آنتی ژن *HAI*، سویا، کاهو، یونجه.

## مقدمه

گیاهی بهینه شده باشد زیرا دست‌یابی به گیاهان تراریخت با بیان ثابت زمانبر می‌باشد (Obeme *et al.*, 2011). از طرف دیگر با توجه به مشکلات تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت پایدار از جمله خاموشی ژن پس از انتقال، تغییرات نامطلوب در ترکیب کربوهیدرات‌های مرکب و بزرگ‌قندی، وقت‌گیر بودن تولید یک رده گیاهان تراریخت پایدار با قابلیت تولید مطلوب پروتئین و مهم‌تر از همه مشکلات زیست‌محیطی و احتمال فرار ژن و خطرات ناشی از آن سبب شده است که در سال‌های اخیر از روش‌های بیان موقت ژن در گیاه به عنوان روش‌های مناسب برای تولید فرآورده‌های نوترکیب استفاده شود (Wang & Ma, 2011). از دو روش آگرواینفیلتراسیون 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 می‌کنند، اما محدودیت در بیان ژن‌هایی با اندازه بزرگ و نگرانی‌های زیست‌محیطی سبب کاهش کاربرد آن‌ها شده است (Fischer *et al.*, 2004). عوامل مختلفی در افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته نقش دارند که از آن جمله می‌توان به بهینه‌سازی کدونی، بیان کافی و پایدار ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این وجود، روش، زمان و محل بیان ژن در گیاهان بوسیله مجموعه‌ای از

پیشرفت در تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی منجر به توسعه راهبردهای جدید برای تولید نسل جدیدی از واکسن‌ها به نام واکسن‌های نوترکیب یا زیر واحد<sup>۱</sup> در خلال دهه ۱۹۸۰ گردید (Houdebine, 2009). این واکسن‌ها از پروتئین‌های مشتق شده از ویروس‌های بیماری‌زا، باکتری‌ها یا پارازیت‌ها ساخته می‌شوند و تولید آنها به سیستم بیوراکتور و موجوداتی مثل باکتری، مخمر، سلول‌های جانوری و گیاهی نیازمند است، در این روش بخش بیماری‌زای پاتوژن‌ها در تهیه واکسن استفاده نمی‌شود و تنها ژن رمزگردان پروتئین‌های آنتی ژن یک ویروس شناسایی شده و سپس به منظور تولید پروتئین مورد نظر به یک میزبان مناسب وارد می‌شود. در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی، گیاهان تراریخته بهترین میزبان جهت تولید واکسن‌های نوترکیب به حساب می‌آیند زیرا منجر به تولید ارزان آنتی ژن‌هایی می‌شوند که بعنوان واکسن تزریقی و در حالتی ایده‌آل‌تر به صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim & Yang, 2010).

انتقال ژن به کمک 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

<sup>1</sup> . Recombinant or Subunit vaccines

می‌دهند (Carter & Saunders, 2007). هماگلوتینین فراوان ترین پروتئین سطحی غشاء خارجی ویروس است که از قدرت ایمنی‌زایی بالایی برخوردار بوده و به صورت یک پیش ساز پروپیتیدی تولید می‌شود (Spitsina et al., 2009; Norkin, 2010). HA دارای دو زیر واحد بزرگ (HA1) و کوچک (HA2) می‌باشد که تقریباً تمام سایت‌های آنتی‌ژنی ویروس روی دامین HA1 این گلیکوپروتئین قرار دارند و قادر به تحریک تولید پاسخ ایمنی برابر با پروتئین کامل ویروس می‌باشد. به دلیل شدت بالای عفونت و احتمال بروز موتاسیون در آنتی‌ژن ویروس اقدام برای ساخت واکسن‌های موثر برای ماکیان، انسان و حیوانات بر علیه عفونت و پاندمی‌های احتمالی H5N1 در آینده ضروری به نظر می‌رسد (Steel et al., 2010). با توجه به جایگاه با ارزش آنتی‌ژن HA1 در کنترل بیماری آنفلوانزای پرندگان، در اولین گام HA1 در باکتری به عنوان یک میزبان مدل پروکاریوتی بیان شد سپس بیان موقت ژن HA1 در گیاه یونجه، سویا و کاهو با روش آگرواینفیلتراسیون صورت گرفت و اثر سه نوع پپتید راهنما بر تجمع نهایی پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش ها

##### بهینه سازی ژن و طراحی سازه ها

جایگاه‌های برشی موجود در توالی ژن HA1 (Gene ID: CY116646.1) با نرم افزار

عوامل کنترلی تنظیم می‌گردد (Ahmadi et al., 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). سیگنال پپتید KDEL (Wandeltt et al., 1992)، پپتید راهنمای ژن گاما ژئین ذرت (ZERA) (Torrent et al., 2009)، پپتید راهنمای Extensin هویج (Richardson et al., 2001) از جمله پپتیدهای راهنما در گیاهان هستند که به ترتیب پروتئین را در شبکه آندوپلاسمی، اندامک‌های مستقل پروتئینی و فضای آپوپلاستی هدف گذاری می‌کنند (Wandeltt et al., 1992; et al., 2011). (Obeme

استرین شدیداً بیماری‌زای آنفلوانزای پرندگان (H5N1) از سال ۲۰۰۴ سریعاً شروع به پخش شدن کرده و بیماری‌های خطرناکی را در ماکیان چندین کشور آسیایی، اروپایی و آفریقایی ایجاد کرده است (Chichester et al., 2012). دامنه میزبانی این ویروس وسیع بوده و علاوه بر ماکیان، انسان و پستانداران دیگر را نیز آلوده می‌کند. این ویروس از خانواده اورتومیکسوویریده بوده و دارای ژنوم قطعه قطعه تک رشته‌ای از جنس RNA می‌باشد. پوشش سطحی ویروس آنفلوانزا دارای دو گلیکوپروتئین هماگلوتینین و نورآمینیداز است که این گلیکوپروتئین‌های سطحی اجزاء اصلی ساختار آنتی ژنیک ویروس و بخش اساسی واکسن‌های آنفلوانزا را تشکیل

حاوی پلاسمید نوترکیب (pet28a-HA1) قبل و بعد از القا با غلظت ۱ میلی مولار از IPTG توسط ژل SDS-PAGE (شکل ۴- A) و وسترن بلات (Shoji *et al.*, 2011; Pourseyedi *et al.*, 2009) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴- B). پروتئین HA1 بیان شده از سلول BL21 به روش دناتور<sup>۳</sup> و با استفاده از اوره ۸ مولار استخراج شد (Khurana *et al.*, 2010). سپس نمونه‌های پروتئینی با عبور از ستون Ni-NTA agarose شرکت کیاژن تخلیص شدند.

#### تهیه مایه تلقیح و انجام آگرواینفیلتراسیون

از هر کدام از کلونی‌های آگروباکتری سویه LBA4404 واجد ناقل نوترکیب، ۵۰ میلی لیتر کشت شبانه در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ µg/ml کانامایسین، ۵۰ µg/ml ریفامپیسین و (دمای °C ۲۸ و دور شیکر ۱۸۰) تهیه شد و بعد از رسیدن OD به حدود ۰/۵ تا ۰/۶ در ۵۰۰۰ رسوب داده شد و در محیط آگرواینفیلتراسیون (محیط MS ۱/۲، ۳ درصد ساکاروز به همراه ۱۰۰ ppm مویان توئین ۲۰) به مدت ۶۰ دقیقه رشد داده شد تا باکتری به محیط جدید عادت کند. نمونه‌های برگگی در محیط تلقیح حاوی باکتری در داخل دسیکاتور قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتریایی تحت شرایط خلا ۲۵۰ میلی بار و سه بار شکست ناگهانی وارد فضای

CLC Sequence Viewer حذف شدند. سپس توالی اسیدهای آمینه جهت بیان بهینه در باکتری و گیاهان با استفاده از سایت GenScript دستورزی شدند. در نهایت برای سیستم *E. coli* ناقل بیانی pET28a حامل توالی بهینه شده ژن (شکل ۱- A) و برای بیان موقت از طریق آگروباکتریوم نیز سازه های pBI-KDHA1 (شکل ۱- B)، pBI-ZRHA1 (شکل ۱- C) و pBI-ETHA1 (شکل ۱- D) طراحی و ساخته شدند. در ساختار سازه‌های گیاهی، آنتی ژن HA1 در ناقل pBI121 و مابین پیشبرنده<sup>۱</sup> CaMV35S و خاتمه دهنده<sup>۲</sup> NOS با استفاده از آنزیم‌های برشی BamHI و SacI کلون گردید. سازه‌های ساخته شده توسط PCR با آغازگرهای ویژه ژنی (شکل ۲) مورد تایید قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی سازه pET28a-HA1 که صحت ساخت این سازه را تایید می‌کند در شکل ۳ آورده شده است.

#### بیان پروتئین در باکتری *E. coli*

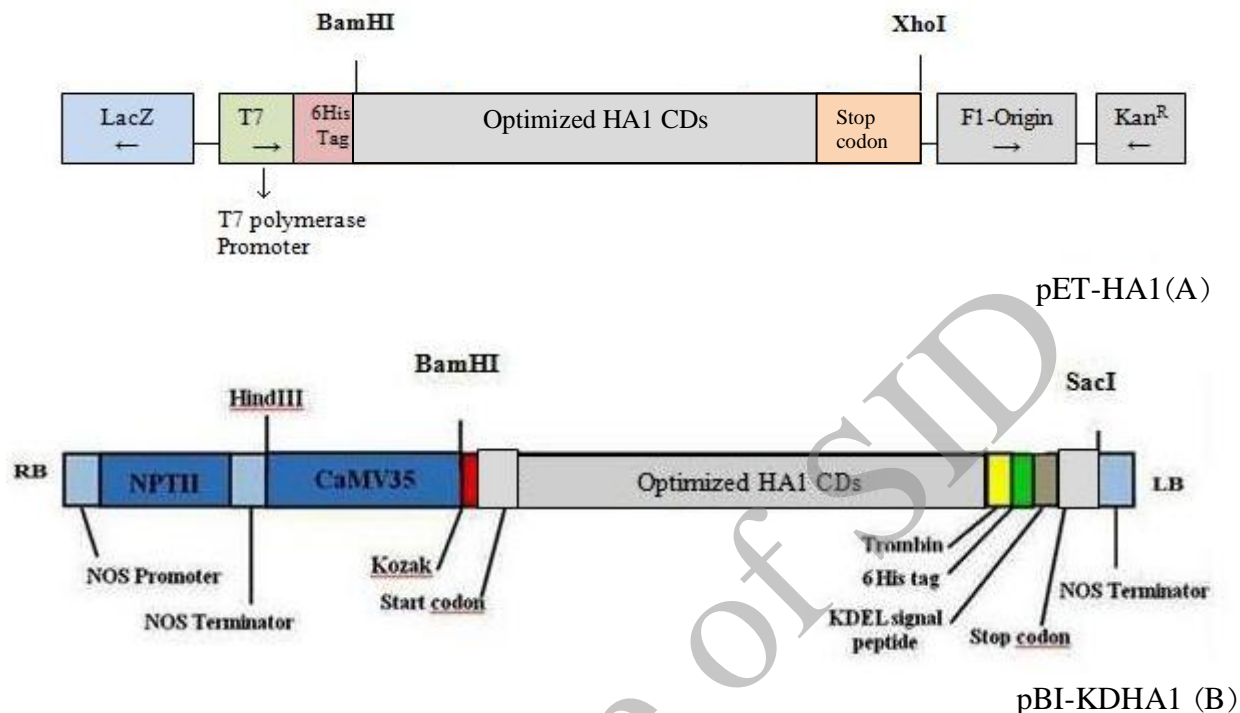
یک کلونی BL21 تایید شده با کلونی پی سی آر، در ۲۵۰ سی سی محیط کشت LB مایع حاوی ۱۰۰ µg/ml کانامایسین رشد داده شد (دمای °C ۳۷ و دور شیکر ۱۸۰). بعد از رسیدن تراکم سلولی در ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵، القای بیان تراژن با IPTG انجام شد. نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از سلول‌های *E. coli*

1. Promoter

2. Terminator

3. Denatured

بین بافتی شد و سپس برگ‌ها بروی کاغذ صافی  
آغشته به محیط MS قرار داده شدند.



شکل ۱- سازه‌های طراحی شده: سازه pET28a-HA1 (A)، سازه pBI121 حاوی ژن HA1 همراه با سیگنال پپتیدهای KDEL، ZERA و Extensin که به ترتیب ژن را در شبکه آندوپلاسمی، اجسام پروتئینی و فضای آپوپلاست هدف گذاری می‌کنند (B، C و D)؛ Nos promoter: نواحی پرموتور ژن نوپالین سنتاز؛ NPTII: ژن نئومایسین فسفوترانسفراز که موجب مقاومت به کانامایسین می‌شود؛ Nos Terminator: ترمیناتور ژن نوپالین سنتاز؛ CaMV35: پرموتور ویروس موزائیک گل کلم؛ KOZAK sequence: توالی افزایش دهنده بیانی (GCAACA)؛ 6His tag: تگ هیستیدین؛ TAA: کدون خاتمه. RB و LB: توالی‌های مرزی راست و چپ.

**Figure 1- Designed constructs: pET28a construct (A), pBI121 construct contained HA1 with KDEL, ZERA and Extensin signal peptide which cause protein accumulation respectively in endoplasmic reticulum, protein bodies and apoplatic space (B, C & D); NPTII: Neomycin phosphotransferase gene which confers kanamycin resistance; CaMV35: Cauliflower mosaic virus promoter; KOZAK sequence: The sequence (GCAACA) that increases the gene expression level; 6His tag: Histidine Tag; TAA: Stop codon. RB & LB: Right & Left Border.**

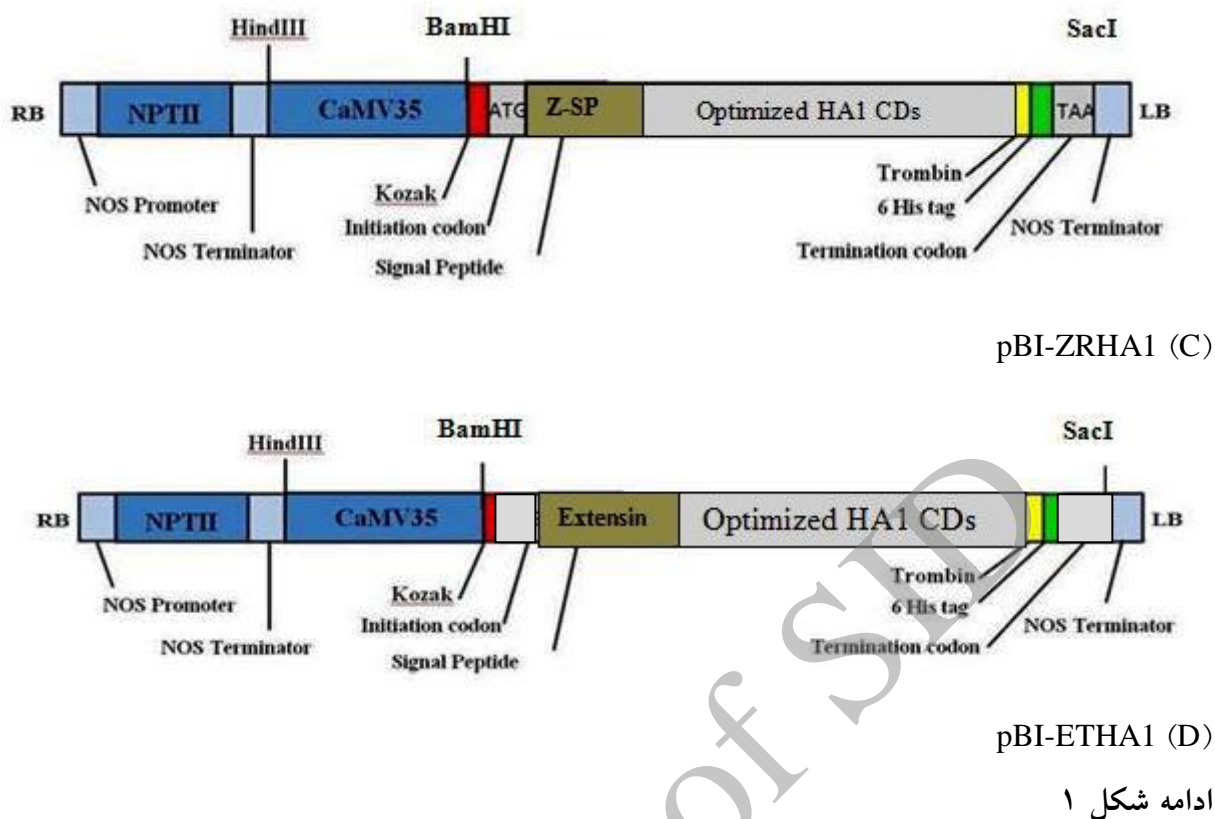
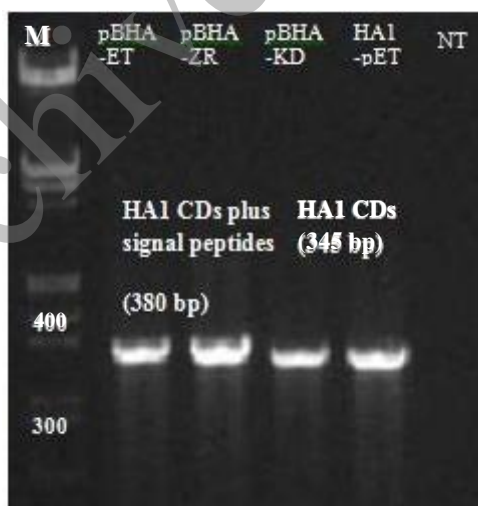


Figure 1 (continued)



شکل ۲- تایید سازه‌های ساخته شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (A) شاهد منفی (NT)؛ نشانگر مولکولی شرکت فرمتناز (M).

Figure 2- Designed constructs verification with PCR (A), Negative Control (NT); Molecular Marker (M).

```

1 ATCCGGATAT AGTTCCTCCT TFCAGCAAAA AACCCCTCAA GACCCGTTTA GAGGCCCC
61 AA
121 GGGGTTATGC TAGTTATGTC TCAGCGGTGG CAGCAGCCAA CTCAGCTTCC TTTCGGGC
181 TT
241 TGTTAGCAGC CGGATCTCAG TGGTGGTGGT GGTGGTGCTC GAGTTAATGA TGATGATG
301 AT
361 GATGTTACAG CTGCGGGCTG TTACGCAGGC CGGTGCGCCAG CACCAGACGG TTGCTTTT
421 CA
481 CATATTTCCG GCATTCGCCA ATGGTCAGCG GATGAATGTT ATGAAACGGC ATGCTGCT
541 GT
601 TAAATCGCGCC CATCGGGGTC TGGCATTGG TGGTGCAGTT GCCATATTC AGTTCGCT
661 TT
721 TCATAATCGC GCTATCGCCT TTTTTCACAA TTTTATACGC ATATTCGGGC GCAATAAA
781 GT
841 TGCCGTTGCT TTCAAAGTTA ATCGCATCGT TCGGTTTCAG AATGGTCCAA AAAAATTC
901 CA
961 TACGACCGCT CTGGCCGTTT ACTTTGCTAC GGGTGCCAAT TTTCGGCACC AGACGCTG
102 GT
1 TCAGGGTGCT GGTGCCAATG CTAATATAGG TGGTGGGTT CTGATACAGA CGGGTCTG
108 TT
1 CCGCCGCATC GTTCGGATGA TGAATGCCCC ACAGCACCAG CAGGTCTTCC TGSTGGT
114 GT
1 TGTTATAGCT TTTTAAATG TCGCGATAGG TGCTGTTTTT TTTAATCAGC CACACCAC
120 GT
1 TACGAAAAAA GCTCGGGCTG CCCAGATACG GGCACGCGCT GCTCACGCCG CTGCTCGC
126 TT
1 CATGATCGCT CCAGCTGCTT TFCGGAATAA TCTGAATTTT TTCAAAATGG TTAATACG
132 GC
1 TCAGCAGATG TTTCAGTTC TACATAATCGT TAAAGCTGCC CGGATAGCAC AGATCGTT
138 GG
1 TCGGGTTCG TTTTCCACA ATATAGCTCC ATTCGGGCAC GTTAATAAAT TCATCGCA
144 CA
    
```

شکل ۳- بخشی از نتیجه تعیین توالی سازه pET28a-HA1 که صحت ساخت این سازه را تایید می کند.

Figure 3- Verification of the pET28a-HA1 construct by DNA sequencing.

بافر استخراج ( 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (DTT) و سانتیفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰g، روشن‌آور جدا و بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1972) غلظت پروتئین کل اندازه‌گیری شد. آزمایش SDS-PAGE روی ژل 12% با ۱۵ میکروگرم پروتئین کل و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت (Shoji *et al.*, 2011). جهت وسترن بلاتینگ ژل به غشاء نیتروسولوزی منتقل شد و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال تگ هیستیدین کونژوگه و سوبسترای DAB<sup>۱</sup> رنگ‌آمیزی گردید (Shoji *et al.*, 2011).

#### استخراج RNA و انجام Real time PCR

بعد از گذشت ۷۲ ساعت از آگرواینفیلتراسیون و اطمینان از بیان ژن، RNA کل استخراج شد و بعد از تیمار DNase، رشته مکمل cDNA با استفاده از یک آغازگر اولیگو dT (۲۰ نوکلئوتیدی) ساخته شد. آزمایش RT-PCR با آغازگرهای ویژه HA1 و ژن Houskeeping صورت گرفت (جدول ۱). مقادیر Ct با نرم افزار REST به دست آمد و سطح نسبی بیان HA1 در مقادیر  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  با روش لیواک و اشمیتگن (Livak & Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

استخراج پروتئین، SDS-PAGE، وسترن بلات

#### و ELISA

۰/۱ گرم از برگ‌های اینفیلتره در ازت مایع پودر شد و بعد از اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر

<sup>1</sup>. Di-aminobenzidine

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

Table 1- Oligonucleotide primers used to PCR and Real time PCR.

آغازگر پسرو Reverse Primer	آغازگر پیشرو Forward Primer	گیاه Plant	ژن Gene
5'GAAGTTCATCTTTTCTCTTTGTGG 3'	5' TAATGGACAATCTGGAAGAATGGAA 3'	-	T* <i>HAI</i>
5' GTTCTGCTGCATCATTGGA 3'	5' TGGAGTTTCTTCTGCATGTCC 3'	-	T** <i>HAI</i>
5' CAGTGATTCCTTGCTCATCCG 3'	5' TGATTGGAATGGAAGCTGCTG 3'	کاهو Lettuce	آکتین <sup>H</sup> <i>Actin</i> <sup>H</sup>
5'GAAAGCCTTCTCCTAAACATGG 3'	5'GTCGAGTGGATTCCCAACAATG 3'	سویا Soybean	بتا توبولین <sup>H</sup> <i>β Tubulin</i> <sup>H</sup>
5' AGCTGAGTCATCAACACCCTCAT 3'	5' GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAACG 3'	یونجه Medicago	MSC27 <sup>H</sup>

\* آغازگر مورد استفاده برای تایید سازه های ژنی (محصول PCR، ۳۴۵ جفت باز)

\*\* آغازگر مورد استفاده برای بررسی های Real time PCR (محصول PCR، ۱۷۰ جفت باز)

T: ژن *HAI* بیان شده به صورت موقت در کاهو، سویا و یونجه

H: ژن استاندارد داخلی برای مقایسه سطح رونوشت برداری ژن *HAI* بیان شده

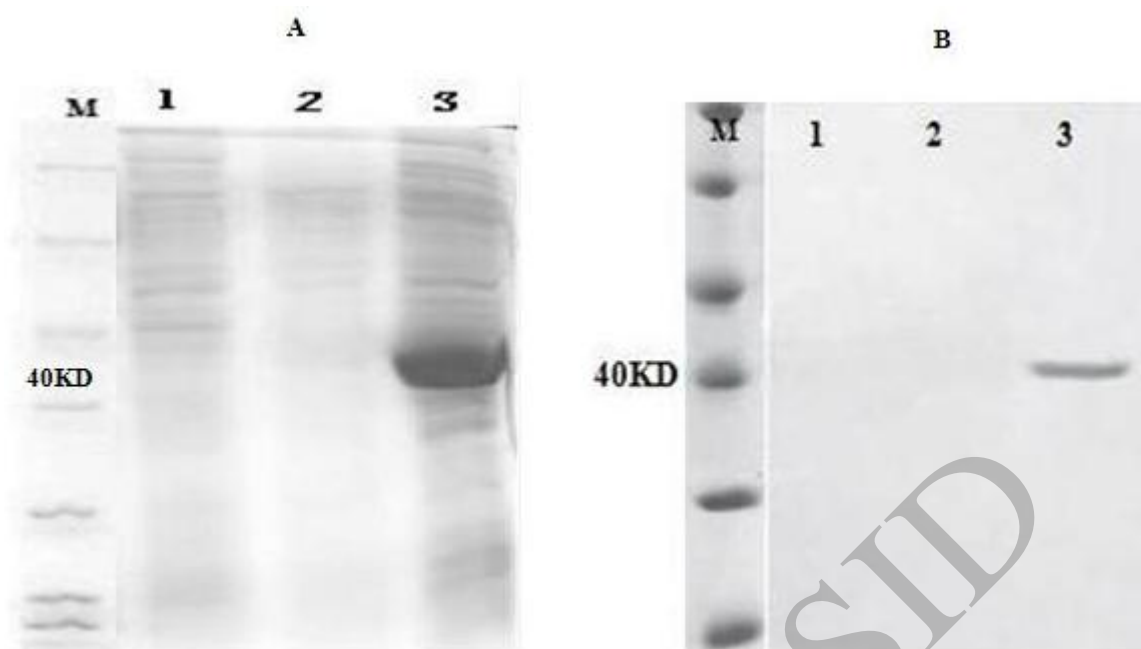
\* primers used to verify gene constructs (PCR product: 345 bp)

\*\*primers used for Real time PCR assey (PCR product: 170 bp)

T: *HAI* gene that expressed transiently in Lettuce, Soybean and Medicago

H: Internal standard gene for comparison of *HAI* gene transcription level





شکل ۴- بررسی نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از *E. coli* توسط ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد (A) نشانگر پروتئینی (شرکت فرمنتاز)؛ ۱ و ۲: نمونه‌های پروتئینی حاوی (pet28a-HA1) قبل از القا با IPTG (۱ میلی مولار)؛ ۳: نمونه پروتئینی حاوی (pet28a-HA1) پس از القا با غلظت ۱ میلی مولار از IPTG، که باند ۴۰ کیلو دالتون مربوط به HA1 در نمونه پس از القا به خوبی قابل مشاهده است. بررسی نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از *E. coli* توسط وسترن بلائینگ (B) M: نشانگر پروتئینی (شرکت فرمنتاز)؛ ۱ و ۲: نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از *E. coli* قبل از القا با ۱ میلی مولار IPTG؛ ۳: نمونه پروتئینی استخراج شده از *E. coli* پس از القا با ۱ میلی مولار از IPTG. (باند ۴۰ کیلو دالتون نشان دهنده وزن مولکولی پروتئین HA1 می‌باشد).

**Figure 4- 12% SDS-PAGE gel analysis of protein samples extracted from *E. coli* cells (A), Lane M: Protein molecular marker (Fermentase); Lane 1 & 2: protein samples containing pet28a-HA1 before 1 mM IPTG induction. Lane 3: HA1 expressed samples (pet28a-HA1) after 1 mM IPTG induction. gel analysis of protein samples extracted from *E. coli* cells using western blot analysis (B), Lane M: Protein molecular marker (Fermentase); Lane 1 & 2: protein samples extracted from infected *E. coli* cells with pET28-HA1 before IPTG induction, 40 KD band shows HA1 molecular weight; Lane 3: protein samples extracted from infected *E. coli* cells with pET28-HA1 after IPTG induction, 40 KD band shows HA1 molecular weight.**

ترتیب که از HA1 خالص شده از باکتری در غلظت‌های صفر تا ۲۵ نانوگرم به عنوان استاندارد

در نهایت انباشت و تعیین غلظت HA1 با ELISA انجام شد (Shoji et al., 2009)، به این

ویروس آنفلوانزای تولید شده در باکتری به صورت نامحلول تولید می‌شود، استخراج پروتئین به روش واسرشته انجام شد. بررسی بیان *HAI* در سطح رونوشت: با تکثیر قطعه ۱۷۰ جفت بازی از cDNA حاصل از mRNA نمونه‌های اینفیلتره شده، رونوشت برداری از آنتی ژن *HAI* به اثبات رسید (شکل ۵- A). تکثیر ژن ACTIN ۱۶۰ جفت بازی نیز به عنوان ژن کنترل داخلی در شکل ۵- B نشان داده شده است. نتایج آزمون Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *HAI* و آغازگرهای ژن کنترل برای هر گیاه نشان داد که بیشترین میزان رونویسی از روی ژن *HAI* در مقایسه با گیاه غیر اینفیلتره شده در کاهو مشاهده شد در حالی که سویا کمترین بیان ژن را در سطح رونوشت برداری نشان داد (شکل ۵- C). با توجه به داده‌های الگوی رونوشت ژن ها، پپتیدهای راهنما تاثیری بر رونوشت برداری نداشتند. از طرف دیگر چون بیان بالای یک ژن همیشه نشان دهنده انباشت بیشتر پروتئین نیست، برای بررسی میزان پروتئین نهایی، آزمون الیزا صورت گرفت. به منظور تعیین غلظت نهایی پروتئین به صورت درصد از کل پروتئین محلول، منحنی استاندارد بر اساس میزان جذب در رقت-های مختلف *HAI* بیان شده در باکتری، ترسیم شد (شکل ۶). نتایج آزمون الیزا با آنتی بادی پلی هیستیدین کونژوگه نشان داد که بیشترین مقدار بیان هنگامی به دست آمد که ژن *HAI* به سمت فضای بین سلولی (آپوپلاستی) هدف گذاری شد

جهت تعیین غلظت پروتئین در گیاهان استفاده شد. بعد از پوشش دادن پلیت ELISA با آنتی ژن و استفاده از آنتی بادی پلی هیستیدین کونژوگه و سوپسترای OPD<sup>۱</sup>، جذب OD<sup>۲</sup> در ۴۵۰ نانومتر در ۳ تکرار قرائت شد و در نهایت، غلظت نهایی پروتئین به صورت درصد از کل پروتئین محلول (TSP<sup>۳</sup>) به دست آمد.

### نتایج و بحث

در این مطالعه برای بیان موقت ژن از روش انتقال آگروباکتریوم تحت خلاء و برگ‌های گیاهان یونجه، سویا و کاهو به عنوان میزبان برای بیان آنتی ژن *HAI* استفاده شد. گیاه سویا به دلیل قابلیت بیان بالا و یونجه و کاهو با توجه به قابلیت تولید برگ فراوان در طول سال، و امکان استفاده مستقیم در جیره غذایی طیور و توانایی نسبتاً خوب تولید پروتئین انتخاب شدند (Fielier *et al.*, 1997). پس از همسانه‌سازی آنتی ژن *HAI* در ناقل بیانی pET28a، کلونی‌های به دست آمده با PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه ژنی (جدول ۱) تایید (شکل ۲) و سازه ژنی به دست آمده توالی یابی شد. نتایج توالی یابی میزان ۹۹ درصد همولوژی را با توالی ژن سنتزی *HAI* نشان داد. بخشی از نتیجه تعیین توالی سازه pET28a-HAI در شکل ۳ آورده شده است. به این دلیل که پروتئین نوترکیب *HAI* مربوط به

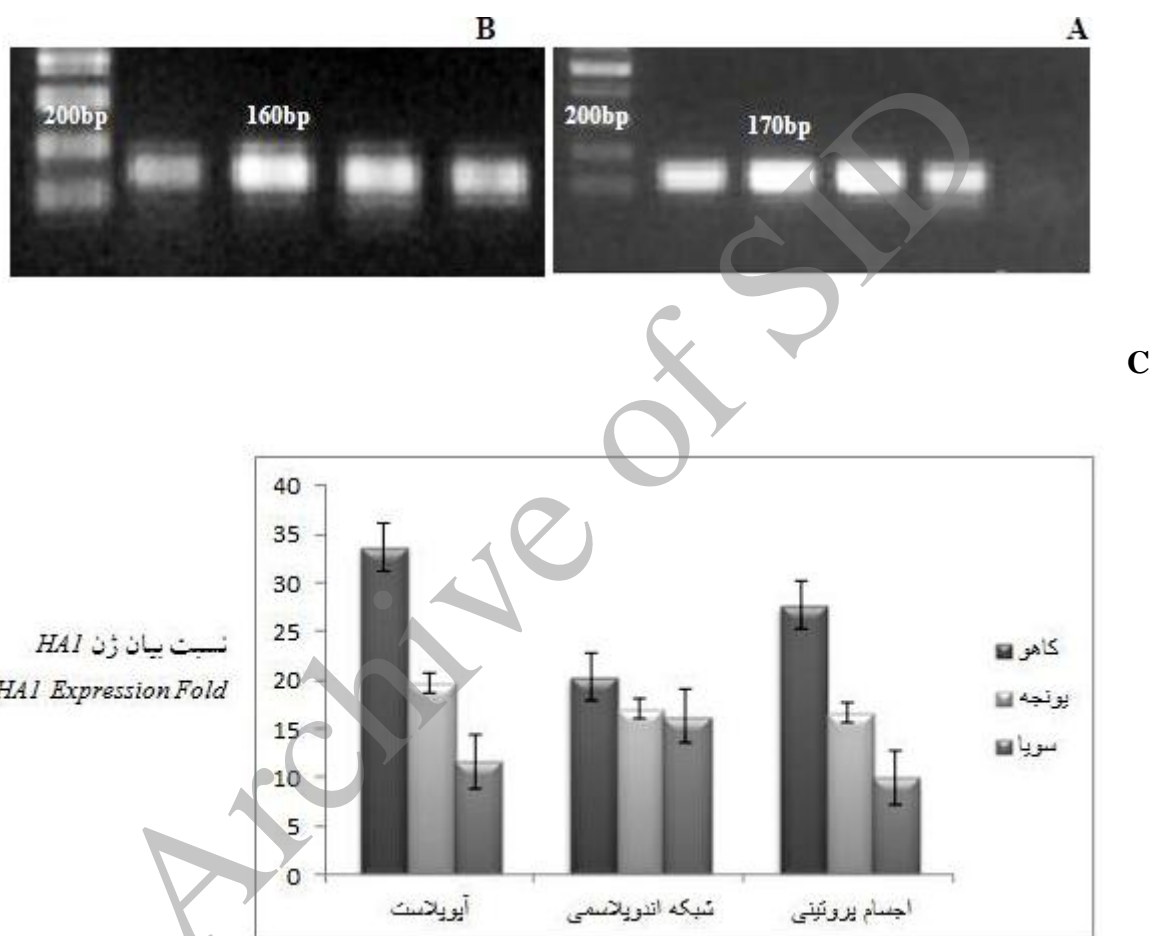
1 . Ophenylenediamine

2 . Optical dencity

3 . Total soluble protein

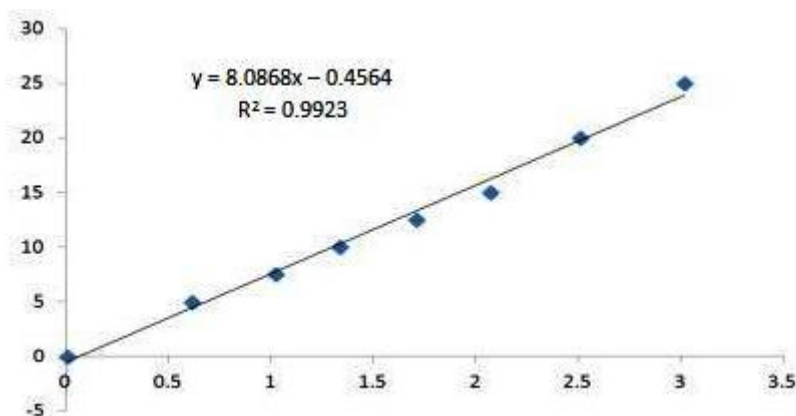
یافت. هدف گذاری پروتئین *HAI* در فضای آپوپلاستی گیاه یونجه، بیشترین عملکرد پروتئین نوترکیب را ارائه داد. در کل گیاه یونجه بیشترین عملکرد پروتئین نوترکیب را داشت (شکل ۷).

و میزان پروتئین تولید شده در آپوپلاست گیاهان یونجه، سویا و کاهو به ترتیب ۳/۵۷، ۳/۲ و ۲/۵ درصد از پروتئین کل محلول بود (شکل ۷). در رتبه دوم بیشترین مقدار بیان هنگامی حاصل شد که پروتئین نوترکیب در اجسام پروتئینی تجمع



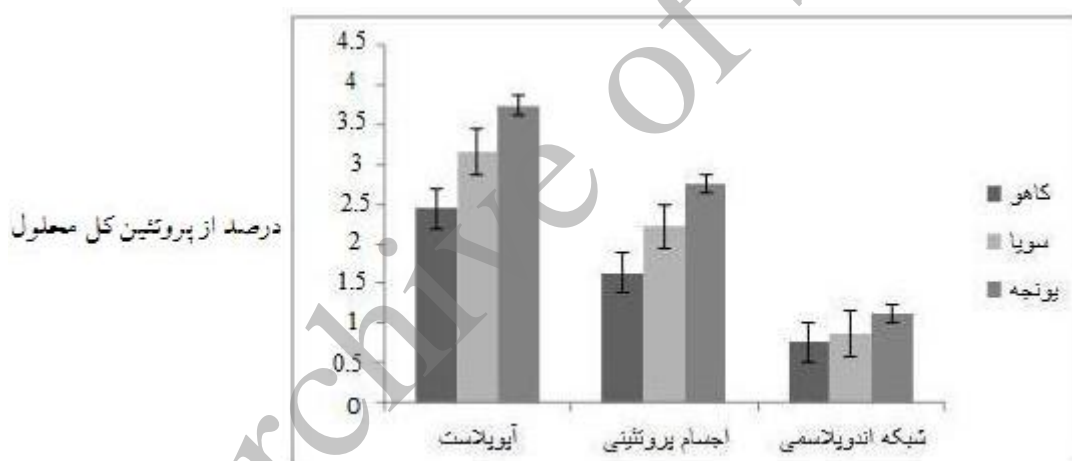
شکل ۵ - بررسی بیان ژن *HAI*: تایید بیان *HAI* در کاهو با RT-PCR (A)، تکثیر ژن *ACTIN* کاهو به عنوان ژن کنترل داخلی (B) و سطح نسبی بیان ژن *HAI* در نمونه‌های اینفیلتره شده با سازه‌های حاوی پپتید راهنمای KDEL، Extensin و ZERA (C).

**Figure 5- *HAI* gene expression assessment: Verification of *HAI* expression in lettuce with RT-PCR (A), Amplification of lettuce *ACTIN* as internal control (B) and relative *HAI* expression level in infiltrated samples with constructs including KDEL, Extensin and ZERA (C).**



شکل ۶- منحنی استاندارد بر اساس میزان جذب در رقت‌های مختلف *HAI* بیان شده در باکتری. محور افقی میزان جذب در آزمون الیزا و محور عمودی غلظت پروتئین در نمونه (بر حسب میکروگرم) را نشان می‌دهد.

**Figure 6- Standard *HAI* curve based on the absorption rate in different concentration of bacterial *HAI*. Horizontal and vertical Axis show the absorption rate in Elisa assay and the protein concentration of the samples ( $\mu\text{g}$ ) respectively.**



شکل ۷- نتایج حاصل از آزمون الیزا (درصد *HAI* نوترکیب از پروتئین کل محلول). بین سه گیاه مورد بررسی، یونجه بیشترین انباشت پروتئین را داشت، بیشترین تولید پروتئین نیز زمانی صورت گرفت که پروتئین در آپوپلاست با استفاده از پپتید راهنمای *Extensin* هدف‌گذاری شد.

**Figure 7- Elisa results (recombinant *HAI* percent of total soluble protein). Among three assayed plants, medicago had the most protein accumulation in apoplastic space by *Extensin* signal peptide.**

قارچ‌ها، حیوانات و گیاهان به عنوان راکتور تولید کننده استفاده شده است. از این میان گیاهان برای تولید داروهای نوترکیب ترجیح داده می‌شوند.

تولید پروتئین‌ها و داروهای نوترکیب اهمیت ویژه‌ای برای محققان و کشورها دارد. در این راستا نیز میزبان‌های مختلفی شامل باکتری‌ها،

انتهای کربوکسیل آنتی ژن *HA* آنفلوانزا برای بیان موقت این پروتئین در توتون استفاده شد (Shoji *et al.*, 2011). در تحقیق حاضر نیز استفاده از سیستم His-tag 6 منجر به تخلیص مناسب و تولید سطوح بالای *HAI* در باکتری گردید.

این تحقیق با هدف استفاده از پتانسیل بالای گیاهان جهت تولید پروتئین *HAI* طراحی و اجرا گردید. برای رسیدن به این هدف لازم است که بهینه‌سازی از جنبه‌های مختلف صورت گیرد. در این تحقیق جهت افزایش بیان ژن از توالی افزایش دهنده سیستم بیان گیاهی استفاده شد که از بررسی توالی‌های قبل از کدون آغاز، در ژن‌هایی با بیان بالا در گیاهان بدست آمده است (Taylor *et al.*, 2000). توالی مورد توافق کذاک (GCAACA) در مولکول‌های mRNA یوکاریوتی توسط ریبوزوم به عنوان جایگاه آغاز ترجمه شناخته می‌شود (Wang *et al.*, 2004).

از عوامل بسیار مهم جهت بهینه‌سازی سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌توان به انتخاب پروموتور قوی، هدف‌گیری پروتئین مورد نظر به بافت مناسب گیاه و نیز قرار گرفتن پروتئین در جایگاه مناسب در داخل سلول اشاره نمود. در مطالعات مختلف به منظور افزایش پایداری پروتئین تولید شده در داخل سلول با استفاده از توالی *KDEL* آن را به شبکه آندوپلاسمی هدف‌گیری نموده‌اند زیرا این توالی موجب افزایش بیان پروتئین نوترکیب می‌شود. هدف دیگر از اضافه کردن توالی *KDEL*

زیرا قیمت تمام شده محصول در گیاهان کمتر از سایر منابع می‌باشد. بعلاوه داروهای نوترکیب تولید شده از طریق گیاهان به علت عدم وجود آلودگی‌های میکروبی و بویژه عوامل بیماریزای مشترک با انسان، ایمنی بالاتری را دارند.

در تحقیق حاضر پس از طی مراحل همسانه سازی در ناقل بیانی pET28a، بیان پروتئین نوترکیب *HAI* در سلول میزبان BL21-DE3 به دلیل عدم وجود پروتئین‌های سلولی و کاهش فعالیت پروتئین‌های روی محصول، با موفقیت انجام شد. ناقل بیانی pET28a با داشتن پیشبرنده قوی T7 قادر به بیان توالی‌های ژنی بعد از خود است و این ناقل بعد از بیان پروتئین نوترکیب به انتهایی آمین آن پروتئین نشانگر 6HisTag اضافه می‌کند. این نشانگر برای تخلیص پروتئین نوترکیب بیان شده با انجام روش کروماتوگرافی میل ترکیبی کاربرد دارد. محصول نوترکیب با این نشانگر تمایلی، به خوبی خالص می‌شود و این نشانگر تأثیری در ایمنی‌زایی پروتئین مورد نظر ندارد (Arnaud *et al.*, 2006).

امروزه جداسازی و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب با سیستم His-tag 6 یک روش معمول می‌باشد (Arnaud *et al.*, 2006)، طوری که زیرواحد *HAI* ویروس آنفلوانزای H5N1 در *E. coli* تولید و از سیستم His-tag 6 جهت تخلیص بالای پروتئین استفاده شد (Khurana *et al.*, 2010). در مطالعات پیشین از سیستم تخلیص His-tag 6 و سیگنال پپتید *KDEL* در

مانعت از ورود پروتئین تولید شده به دستگاه گلژی گیاه است. در غشای سیسترون گلژی، گلیکان‌های گیاهی به پروتئین نو ترکیب اضافه می‌شود که این گلیکان‌ها در بدن انسان پاسخ‌های ایمنی را موجب می‌شوند، در حالی که حضور توالی KDEL از وارد شدن پروتئین به دستگاه گلژی مانعت بعمل می‌آورد (Asgarzadeh et al., 2015). برای اولین بار اثر KDEL بر تجمع پروتئین ویسیلین در شبکه آندوپلاسمی بذور و افزایش پایداری این پروتئین گزارش شد (Wandeltt et al., 1992). محققان گزارش کردند که این توالی به خوبی توسط گیرنده‌های مربوطه شناسایی شده و موجب نگهداری پروتئین تولید شده در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. این مقدار افزایش تولید (تا ۱۰۰ برابر حالتی که از توالی KDEL استفاده نشود) به دلیل قرار گرفتن پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و در امان ماندن آن از تجزیه توسط پروتئازها است (Schouten et al., 1996). هدف دیگر از افزودن توالی KDEL، مانعت از ورود پروتئین تولید شده به دستگاه گلژی گیاه است. در غشای سیسترون گلژی، گلیکان‌های گیاهی به پروتئین نو ترکیب اضافه می‌شود که این گلیکان‌ها در بدن انسان پاسخ‌های ایمنی را موجب می‌شوند. نتایج محققان نشان داده است که توالی KDEL با کارایی بالا از قرار گرفتن پروتئین در دستگاه گلژی مانعت به عمل می‌آورد (Frigerio et al., 2001). در مطالعه‌ای به طور موقت بیان آنتی ژن HA ویروس (H5N1

(A/Indonesia/05/05) که به درون شبکه آندوپلاسمی هدف گیری شده بود در گیاه توتون مورد ارزیابی قرار گرفت و پروتئین تولید شده سطح بیان بالایی (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن تر گیاه) را در سیستم گیاهی نشان داد (2009 Shoji et al., در تحقیقی دیگر بیان گلیکوپروتئین HA ویروس (A/Viet Nam/ H5N1 (1194/2004 به طور کامل و نیز برش خورده به طور موقت با هدف‌گیری های متفاوت (آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، سیتوزول و کلروپلاست) در گیاه توتون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین بیان مشاهده شده به ترتیب مربوط به نمونه‌های تجمع یافته در آپوپلاست و شبکه آندوپلاسمی می‌باشد (2012 Mortimer et al., در سلول‌های تراریخت، تتراپتید 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 امر می‌تواند سبب اشباع گیرنده‌های KDEL شود. با توجه به بیان بیشتر پروتئین نو ترکیب دارای KDEL در گیاه یونجه نسبت به سویا و کاهو می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تعداد گیرنده‌های KDEL در سلول‌های یونجه بیشتر بوده است (شکل ۷). با مقایسه اثرات KDEL و ZERA بر میزان پروتئین تولیدی، نتایج ELISA نشان داد که پتید راهنمای ZERA با انباشت HAI در اجسام پروتئینی نقش بیشتری

موقت و با هدف‌گیری محصول در شبکه آندوپلاسمی و آپوپلاست در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت و بیان بالای آنتی ژن *HAI* با هدف گیری پروتئین به آپوپلاست به دست آمد (Spitsina et al., 2009). نتایج ما نیز کارایی مناسب این پپتید راهنما برای هدف‌گذاری پروتئین‌های نوترکیب را تایید نمود.

به نظر می‌رسد بهینه‌سازی توالی بر اساس ترجیح کدون گیاهی تاثیر زیادی در میزان بیان داشته‌است. 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 سطوح بالای پروتئین گردد. زیرا تنها حدود ۴۰-۲۰ درصد فراوانی پروتئین با غلظت mRNA قابل تعیین است (Nie et al., 2006). غلظت نهایی پروتئین‌ها، به سرعت ترجمه و تجزیه نیز بستگی دارد. هدف-گذاری پروتئین‌ها به سمت اندامک‌ها و فضاهای بین سلولی که در آنها میزان پروتئین‌های سلولی کمتر است سبب افزایش بازده پروتئین نوترکیب می‌شود. اگرچه دستگاه رونویسی در گیاه کاهو بسیار بهتر از سویا و یونجه عمل کرده‌است اما میزان نهایی پروتئین *HAI* کمتر بوده‌است.

در بیان موقت ژن *VP2*، گیاهان یونجه و توتون نسبت به کاهو پتانسیل بیشتری برای تولید پروتئین نوترکیب داشته‌اند (Pourseydi et al., 2009) که با نتایج ما در بیان آنتی ژن *HAI*

ایفا نموده‌است (شکل ۷). زیرا گیاهان دارای آن پپتید راهنما یکنواختی بیشتری نشان داده‌اند و شاید این به دلیل حفظ پروتئین نوترکیب از گزند پروتئین‌های درون سلول‌های گیاهی باشد. اما چون پپتید راهنمای *KDEL* به صورت مبتنی بر گیرنده عمل می‌کند با اشباع این گیرنده‌ها، پروتئین در سیتوسول آزاد و احتمالاً تجزیه می‌شود (شکل ۷). اثر بهتر پپتید راهنمای *ZERA* می‌تواند ناشی از بسته بندی پروتئین در اجسام پروتئینی یا انباشت در نزدیک دیواره سلولی باشد (Torrent et al., 2009).

استفاده از پپتید راهنمای ژن *Extensin* هویج سبب افزایش تجمع پروتئین *HAI* در فضای بین سلولی شد و بدین طریق نوعی ممانعت فیزیکی بین محل تجمع پروتئین نوترکیب و پروتئین‌ها به وجود آورد. هدایت پروتئین به بخش آپوپلاستی، منجر به افزایش میزان پروتئین تولیدی و همچنین بالاتر رفتن درصد پروتئین نوترکیب در میان کل پروتئین‌های محلول در گیاهان مورد بررسی گردید (شکل ۷). این روش علاوه بر تسهیل در استخراج پروتئین، می‌تواند به دلیل آلودگی کمتر پروتئین‌های همراه، هزینه پایین دستی مرتبط به تخلیص پروتئین را کاهش دهد. در مطالعه‌ای با هدف گذاری آنزیم فیتاز در فضای بین سلولی، ۲۰ برابر فیتاز بیشتر در آرآیدوپسیس بدست آمد (Richardson 2001 et al.). بیان آنتی ژن *HA* ویروس *H5N1* (A/Viet Nam/1203/2004) تحت سیستم بیان

پروتئین *HAI* نوترکیب در گیاه یونجه با قابلیت تولید پروتئین بالا، قابلیت کشت مناسب، چند چین برداشت و تولید ۳۰ تن برگ در سال در هر هکتار به سهولت دست یافتنی است (Fischer & Schilberg, 2004). با توجه به خوراکی بودن این پروتئین نوترکیب برای طیور و استفاده از این گیاهان علوفه ای به ویژه یونجه در خوراک مرغ، به نظر می‌رسد با انجام بررسی‌هایی بتوان برگ-های حاوی این پروتئین نوترکیب را مستقیماً در جیره غذایی جوجه‌ها مصرف کرد. گیاه کاهو اگرچه عملکرد بیوماس بیشتری حتی نسبت به یونجه دارد و به حدود ۳۰ تن در هکتار می‌رسد ولی حضور بافت‌های برگ‌ی پر آب که حدود ۹۸ درصد آن‌ها را آب تشکیل می‌دهد، عاملی برای کاهش عملکرد پروتئین و پایداری آن است و در مقایسه با یونجه و سویا قابلیت کمتری برای تولید این پروتئین دارد و نتایج (2004) Fischer & Hashemi *et al.*, (2005) را تایید می‌کند. نتایج حاصل اولین گزارش مبنی بر استفاده از روش اگرواینفیلتراسیون به منظور تولید آنتی ژن *HAI* در گیاهان مختلف می‌باشد که راه را برای انجام تحقیقات بیشتر هموار می‌سازد.

در این پژوهش همه مراحل بیان موقت تنها با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و بدون نگرانی از آزادسازی محیطی انجام شد و نشان داده شد که آنتی ژن *HAI* امکان بیان در گیاهان یونجه، سویا و کاهو را داشته و این آنتی ژن تولید شده با استفاده از آنتی بادی هیس تگ کونژوگه قابل

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

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده این است که با توجه به رفتار بیانی خاص هر پروتئین در محیط سلول، استفاده از روش اگروباکتريوم تحت خلاء می‌تواند یکی از روش‌های مناسب برای بررسی سازه‌های بیانی و میزان بیان ژن در گیاهان باشد (2000) *et al.*, Gidding). با توجه به این نتایج گیاه یونجه پتانسیل خوبی برای تولید پروتئین *HAI* دارد در حالی که میزان تولید در گیاه سویا کمتر و در کاهو بسیار کم است. به نظر می‌رسد تولید این پروتئین با غلظت بالاتر در گیاه یونجه و پایداری آن در محیط آپوپلاستی موجب شده است که میزان بیشتری از این پروتئین تولید گردد. تولید



همچنین با توجه به امکان بیان این آنتی ژن در یونجه، سویا و کاهو و حفظ ساختار مناسب و خواص آنتی ژنیک آن، می توان در ادامه، این گیاهان را به عنوان یک واکسن بالقوه علیه عفونت آنفلوآنزای پرندگان تحت تراریزش پایدار قرار داد.

شناسایی می باشد. از آنجایی که در این بررسی، آنتی ژن مورد نظر در سطح مناسبی از کل پروتئین های تولیدی در گیاهان تولید شد، می توان با بهره گیری از روش اگرواینفیلتراسیون میزان نسبتا بالایی از آنتی ژن را تولید کرده و برای امکان تولید آنتی بادی و برانگیختن پاسخ ایمنی مناسب در حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد.

#### منابع

- Ahmadi N, Rahnema H, Kazemi Tabar S (2011). Cloning of tomato E8 promoter and its analysis in transient assays using Agro-infiltration system. *Journal of Agricultural Biotechnology* 3: 1-14.
- 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.
- Asgharzadeh S, Bagheri Kh, Jalali Javaran M, Mahboudi F (2015). Expression of recombinant gamma interferon in tobacco plant seeds. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 1-16.
- 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.
- Carter JB, Saunders VA (2007). *Virology: principles and applications*. Wiley.
- Chichester JA, Jones MR, Gree BJ, Stow M, Miao F, Moonsammy G, Streatfield SJ, Yusibov V (2012). Safety and Immunogenicity of a Plant-Produced Recombinant Hemagglutinin-Based Influenza Vaccine (HAI-05) Derived from A/Indonesia/05/2005 (H5N1) Influenza Virus: A Phase 1 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose Escalation Study in Healthy Adults. *Viruses* 4: 3227-3244.
- Fieler U, Artsaenko O, Conrad U (1997). Optimisation of Scfv antibody production in transgenic plant. *Immunology* 3: 205-216.
- Fischer R, Schilberg S (2004). *Molecular farming plant-made pharmaceuticals and technical proteins*. WILEYVCH Verlag GmbH & Co.KGaA.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman R (2004). Plant based production of Biopharmaceuticals. *Current Opinion in plant Biology* 7:152-158.
- Frigerio L, Pastres A, Vitale A (2001). Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: selective use of an alternative route to vacuoles. *The Plant Cell* 13: 1109-1126.
- Gidding G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000). Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals. *Natural Biotechnology* 18:1151-1155.

- Hashemi Sohi H, Jourabchi E, Khodabandeh M (2005). Transient expression of human growth hormone in potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) leaves by Agroinfiltration. Iranian Journal of Biotechnology 12: 109-114.
- Hefferon KL (2010). Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine. CRC Press, USA, 27-39.
- Houdebine LM (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 32:107-121.
- Kim TG, Yang MS (2010). Current Trends in Edible Vaccine Development using Transgenic Plants. Biotechnology and Bioprocess Engineering 15:61-65.
- Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, King LR, Ross TM, Golding H (2010). Bacterial HA1 Vaccine against Pandemic H5N1 Influenza Virus Evidence of Oligomerization, Hemagglutination, and Cross-Protective Immunity in Ferrets. Journal of Virology 1246-1256.
- 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.
- Mortimer E, Maclean JM, Mbewana S, Buys A, Williamson AL, Hitzeroth II, Rybicki EP (2012). Setting up a platform for plant-based influenza virus vaccine production in South Africa. BMC Biotechnology 12-14.
- 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.
- Norkin LC (2010). Virology: molecular biology and pathogenesis. ASM Press.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011). Advances in plant molecular farming. Biotechnology Advances 29: 210-222.
- Pourseyedi S, Hashemi Sohi H, Omid M, Ghoreishi 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.
- 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.
- Schouten A, Roosien J, Engelen FA, Jong GAM, Borst-Vrensens AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology 30: 781-793.
- Shoji Y, Bi H, Musiyuchuk K, Rhee A, Horsey A, Roy G (2009). Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. Vaccine 27:1087-1092.
- Shoji Y, Chichester JA, Jones M, Manceva SD, Damon E, Mett V, Musiyuchuk K, Bi H, Farrance C, Shamloul M, Kushnir N, Sharma S, Yusibov V (2011). Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. Human Vaccines 7: 41-50.

- Spitsina S, Andrianova V, Pogrebnyaka N, Smirnova Y, Borisjuka N, Portocarreroa C, Veguillab V, Koprowski H, Golovkina M (2009). Immunological assessment of plant-derived avian flu H5/HA1 variants. *Vaccine* 27: 1289–1292.
- Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, García-Sastre A, Palese P (2010). Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *Mbio* 1: 4-10.
- Taylor J, Jones JDG, Sandler S, Muller GM, Bedbrook J (2000). Optimizing of expression of chimeric genes in plant cells. *Molecular Genetics* 210: 572-577.
- 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 carboxyterminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant Journal* 2:181-192.
- Wang XQ, Rothnagel JA (2004). 5' Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic Acids Research* 32: 227-235.
- Wang A, Ma S (2012). *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*. Springer, New York, 183-198.

## Transient expression of *HAI* antigen of avian influenza virus (H5N1) in alfalfa, soybean and lettuce leaves by agroinfiltration

Farsad A.S.<sup>1</sup>, Malekzadeh Shafaroudi S.<sup>\*1</sup>, Moshtaghi N.<sup>1</sup>, Fotouhi F.<sup>2</sup>, Zibae S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, IRAN.

<sup>2</sup> Influenza Research Lab, Pasteur Institute of IRAN, Tehran, IRAN.

<sup>3</sup> Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, IRAN.

### Abstract

*HAI* antigen is the major host protective immunogen of the highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus (AIV), which leads to great pandemics and epidemics throughout the world. Plants are now gaining widespread acceptance as a general platform for the large scale production of recombinant proteins like influenza vaccines. In present study *HAI* antigen of H5N1 was expressed in Alfalfa (*Medicago sativa*), soybean (*Glycine max*) and Lettuce (*Lactuca sativa*) leaves using agro-infiltration. Also the effect of three signal peptide including KDEL, Extensin and ZERA which cause protein accumulation respectively in endoplasmic reticulum, apoplastic space and protein bodies, were analysed. 72 hours after the agro-infiltration, qRT-PCR results showed that lettuce and soybean respectively had the maximum and minimum of *HAI* transcripts. The expression of *HAI* was detected in leaves extracts by ELISA method. The highest expression was detected in alfalfa leaves with apoplastic signal peptide while the lowest expression was found in lettuce despite the highest transcription rate. The results showed that using agro-infiltration system in alfalfa plant with apoplastic signal peptide was the appropriate strategy for *HAI* antigen production in the assayed plants.

**Key words:** Agro-infiltration, Alfalfa, *HAI* antigen, Lettuce, Soybean.

\* Corresponding Author: Malekzadeh- Shafaroudi S. Tel: 05138804630

Email: malekzadeh-s@um.ac.ir