Archive of SID

شماره ۸۳، تابستان ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی

(پژوهش و سازندگی)

# بررسی بیان موقت ژن VP2 ویروس بسیار حاد بیماری بورس عفونی در برگ توتون، یونجه و کاهو به روش آگروواینفیلتراسیون

• **شهرام پورسیدی**
دانشجوی دوره دکتری دانشگاه تهران و عضو هیئت علمی دانشگاه شهید باهنر کرمان (نویسنده مسئول)
• **هاله هاشمی سهی**
مرکز تحقیقات ژنتیک و فناوری زیستی
• **منصور امیدی**
استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
• **سید علی قرشی**
مرکز تحقیقات ژنتیک و فناوری زیستی
• **علی اکبر شاه نجات بوشهری**
دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
• **عصمت جورابچی**
کارشناس ارشد پژوهشگاه ملی ژنتیک و فناوری زیستی
تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۷
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۵۰-۳۲۲۰۰۴۱-۰۳۴۱
Email: Spseyedi@mai.uk.ac.ir

## چکیده

**پروتئین VP2 ایمونوژن اصلی محافظت‌کننده جوجه‌ها در برابر ویروس بیماری بورس عفونی است و با توجه به اهمیت و مقبولیت فناوری جدید تولید پروتئین‌های نوترکیب شامل واکسن‌ها، پادتن‌ها و داروها درگیاهان، تولید پروتئین نوترکیب VP2 بسیار مورد توجه قرار دارد. در این تحقیق از بیان موقت ژن VP2 به روش آگروواینفیلتراسیون یا انتقال ژن تحت خلاء توسط آگروباکتریوم، برای تولید این پروتئین نوترکیب درگیاهان توتون، یونجه وکاهو استفاده شده است. بدین منظور آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI۱۲۱ حاوی ژن VP2 به طول ۱۳۵۶ جفت باز تحت پروموتر CaMV۳۵S به بافت برگ‌های تازه این گیاهان منتقل گردید. بیان موقت پروتئین در برگ‌های تراریخت، با استفاده از پلیت الایزا و لکه‌گذاری پروتئین اندازه‌گیری شد. با استفاده از روش آگروواینفیلتراسیون و انتقال سازه بیانی VP2، بیشترین بیان این پروتئین به ترتیب در برگ‌های ترآریخت یونجه و توتون و کمترین بیان در برگ‌های ترآریخت کاهو بدست آمد.**

**کلمات کلیدی: پروتئین نوترکیب، آگروواینفیلتراسیون، VP2، توتون، یونجه، کاهو، ویروس بیماری بورس عفونی، گامبورو، گیاه**

www.SID.ir

Archive of SID



Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 83 pp: 18-25

**Transient expression of VP2 gene of very virulent IBDV in tobacco, Alfalfa and lettuce leaves by agroinfiltration** *By: Shahram Pourseyedi,Scientific Member of Shahid Bahonar Kerman Unibersity (Corrosporting Author Tel: +983413220041), Haleh Hashemi Sohi, Genetic Research Center, Mansour Omidi, Seied Ali Ghoreshi, Scientific Members of Tehran University, A. A. Shah Nejat Boushehri, Jourabshi, E. Genetic Research Center.*

VP2 protein is the major host protective immunogen of infectious bursal disease virus (IBDV) of chickens. Plants are now gaining widespread acceptance as a general platform for the large scale production of recombinant proteins including vaccine, antibodies and pharmaceuticals. In present study VP2 gene of an Iranian isolate of IBDV was cloned under strong plant expression promoter CaMV35S and introduced to Agrobacterium tumefaciens. Using agro-infiltration method, VP2 protein was expressed in Tobacco (*Nicotiana tobacum*), Alfalfa (*Medicago sativa*) and Lettuce (*Lactuca sativa*) leaves. The expression of VP2 was detected in leaves extracts by western blot and ELISA methods. The highest expression was detected in alfalfa and tobacco leaves and lowest expression was found in lettuce.

**Key words: Recombinant protein, Agro-infiltration, Tobacco, Alfalfa, Lettuce, VP2, Infectious bursal disease virus (IBDV), Gumboro, Plant.**

## مقدمه

بیماری بورس عفونی یا گامبورو یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های جوجه و فوق العاده واگیردار در نقاط مختلف دنیا است وتوسط ویروسی از جنس بیرناویروس و خانواده بیرناویریده ایجاد می‌شود. این بیماری بسیار حاد ویروسی با تخریب سلول‌های لمفوسیت بورس فابریسیوس و اندام‌های لمفوئیدی دیگر سبب می‌شود که جوجه‌های جوان مبتلا، پاسخ ایمنی ضعیفی نسبت به واکسیناسیون نشان داده و به عفونت‌های ثانویه و بیماری‌های دیگر نیز بسیار حساس گردند (۲۵). ژنوم این ویروس از دو قطعه RNA دو رشته‌ای ۲/۸ و ۳/۲ کیلو بازی تشکیل شده است. ژنوم کوچک‌تر پروتئین بزرگ VP1 را کد می‌کند در حالی که ژنوم بزرگتر، پلی پروتئینی را کد می‌کند که با قابلیت پروتئولیزی خودبخودی به سه پروتئین کامل VP4، VP3 VP2 تقسیم می شود (۲). تنها اپی توپ‌های فضایی سطح پروتئین VP2 با وزن مولکولی ۴۱ کیلو دالتون قابلیت تحریک آنتی بادی‌های خنثی‌کننده ویروس را دارند (۲۳،۱۷).

به دلیل وجود مشکلات فراوان برای ریشه‌کنی این ویروس و عمدتاً غیر قابل تشخیص بودن به موقع بیماری در حالت تحت بالینی (۳)، کنترل بیماری با رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون گله مادری انجام می شود. با توجه به اثرات بیماری‌زائی جدیدترین واکسن‌های موجود، احتمال برگشت بیماری پس از چند بار واکسیناسیون و عدم صرفه اقتصادی، تولید واکسن در گیاهان به ویژه واکسن‌های خوراکی با توجه به مزایای استفاده سیستم‌های یوکاریوتی، چند سالی است که مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است به طوری که هم اکنون تعداد زیادی از آنتی ژن‌های عوامل بیماری‌زا درگیاهان بیان شده‌اند (۱۱،۱۰،۱). این واکسن‌ها علاوه بر قابلیت تحریک سیستم ایمنی و صرفه اقتصادی، فوائد دیگری از جمله پایداری، ایمنی و درجه تاثیر بیشتر، سازگاری بهتری نسبت به واکسن‌های رایج دارند (۲۳). با توجه به اهمیت پروتئین VP2 نوترکیب برای واکسیناسیون طیور (۱۹،۱۶) تولید این پروتئین با روش مهندسی ژنتیک اخیرا در یوکاریوت‌ها از جمله مخمر (۲۹،۱۶) و گیاهان آرابید و پسیس (۲۸) و برنج (۱۲) انجام شده و توانائی آن نیز به عنوان واکسن نو ترکیب نیز به اثبات رسیده است.

دو روش برای انتقال ژن به درون ژنوم گیاه و بیان پروتئین نوترکیب، بیان شده است (۸). در روش اول ژن مورد نظر به داخل ژنوم هسته یا ژنوم اندامک‌های سیتوپلاسمی منتقل شده و گیاه تراریخت دائم تولید می گردد. در روش دوم که بیان موقت ژن مورد نظر است، ژن توسط یک ویروس گیاهی یا انتقال بدون پوشش و یا با استفاده از باکتری آگروباکتریوم به گیاه میزبان منتقل می‌گردد (۲۷). در حالت آخر، که آگروباکتریوم حاوی ژن مورد نظر تحت مکش خلأ بتدریج به بافت برگ تازه گیاه نفوذ می‌کند آگروانفیلتراسیون نامیده شده است. با ورود باکتری به سلول برگ، پروتئین‌های باکتریایی فرآیند انتقال ژن به سلول‌های میزبان را تسهیل کرده و بیان پروتئین مورد نظر سه تا چهار روز پس از نفوذ، قابل تشخیص می‌گردد (۱۴). بررسی چگونگی بیان ژن و میزان آن، آزمون درستی سازه‌های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک بدون نیاز به تولید گیاه تراریخت پایدار، بررسی تولید پروتئین‌های پیچیده مولتی مر (۲۰)، بیان کمپلکس‌های پروتئینی چند واحدی و تعویض یا جایگزینی بخش‌هائی از زیرواحدهای پروتئینی (۷) از دیگر توانائی‌های این روش است. قابلیت ویژه این روش تولید چند صد میلی‌گرم پروتئین نوترکیب با سرعت و سهولت قابل توجه است (۹). تولید پروتئین VP2 نوترکیب در برگ‌های گیاهانی مانند یونجه که به صورت مستقیم در جیره غذائی طیور مصرف می‌گردند بسیار ارزشمند است، اگرچه می‌توان این پروتئین را با استفاده از برچسب هیستیدین یا برچسب‌های دیگر برروی ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص نمود (۲۶).


www.SID.ir

Archive of SID



امروزه آگروواینفیلتراسیون به عنوان راهکاری جدید و جایگزین برای روش انتقال دائم ژن، برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب خصوصاً در گیاهانی که قابلیت تولید برگ فراوان دارند مطرح است، بطوریکه با استفاده از این روش درگیاه یونجه با ظرفیت تولید ۷۵۰۰ برگ در هر هفته می‌توان چندین میلی گرم پروتئین نوترکیب را تولید و عرضه نمود (۹).

در این تحقیق که بخشی از برنامه تولید پروتئین نوترکیب VP2 در گیاه سیب زمینی است، از آگروواینفیلتراسیون برای بررسی امکان تولید این پروتئین در برگ‌های توتون (*Nicotiana tobacum* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.) وکاهو (*Lactuca sativa* L.) استفاده شده است تا علاوه بر تولید آن عملکرد ناقل بیانی این ژن نیز برای انتقال دائم به گیاه سیب زمینی بررسی گردد.

## مواد و روش‌ها

### سازه های حاوی ژن کدکننده پروتئین VP2

در این بررسی از پلاسمید pTZ۵۷R حاوی ژن کد کننده پروتئین VP2 با طول ۱۳۵۶ جفت باز که توسط Shamsara و همکاران از سویه ایرانی این ویروس جدا شده و با شماره AY۷۰۴۹۱۲ در بانک ژن ثبت شده است استفاده گردید (۲۳). ابتدا دو پرایمر VP2-F و VP2-R به ترتیب به صورت زیر طراحی شد.

(۵′- CGGGATCCAATCGCAGCGATGACAAAC -۳′)

(۵′-TAGAGCTCTTAATGGTGATGGTGATGGT -۳′)

(۳′ -GCCTTATGGCCCGGATTAT

در پرایمر اول جایگاه برش آنزیمBamHI و در پرایمر دوم یک توالی کد کننده برچسب هیستیدینی (۶xHis) در انتهای ′۵ ژن و پس از آن جایگاه برش آنزیم SacI در نظر گرفته شد. جایگاه آنزیم‌های انتخاب شده در توالی ژن VP2 وجود نداشتند. سپس با استفاده از این پرایمرها، PCR با انجام واسرشت اولیه با ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز شد. سپس ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و۱ دقیقه سنتز DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از ۱۰ دقیقه دمای اتصال نهائی در۷۲oC، ژن VP2 به طول ۱۳۵۶ جفت باز تکثیر و از روی ژل آگارز خالص و جدا گردید.

از سوی دیگر ناقل دوتائی pBI121 حاوی پروموتر CaMV35S و خاتمه دهنده NOS نیز در همان دو جایگاه آنزیمی بریده و پس از حذف توالی GUS، توالی کد کننده پروتئین VP2 بین پروموتر و توالی خاتمه دهنده قرار گرفت و با استفاده از روش Sambrook و همکاران (۲۲) به باکتری *E.coli* منتقل شد. به منظور کسب اطمینان از صحیح قرار گرفتن قطعه درجلوی پروموتر، پس از برش پلاسمید با آنزیم‌های BamHI و SacI قطعه‌ای به طول ۱۴۰۰ جفت باز بر روی ژل جدا گردید. برای اطمینان از حضور ژن، با استفاده ازجفت پرایمر اختصاصی مربوط به قطعه کامل VP2 به اندازه ۱۳۵۶ جفت باز و همچنین قطعه ۷۴۰ جفت باز دردرون ژن، از روش PCR با شرایط قبل استفاده شد. سرانجام سازه نهائی pBI121 حاوی ژن VP2 پس از خالص سازی با روش Bevan (۵) به آگرو باکتریوم سویه PGV3850 منتقل گردید و تائید نهائی آن با انجام PCR با همان شرایط قبل با پرایمرهای VP2-F و VP2-R انجام شد.

### آماده کردن آگرو باکتریوم

آگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر در محیط لوریا برتانی (ال. بی) به مدت ۱۸ ساعت کشت شد. پس از اینکه چگالی نوری محیط کشت (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید، نمونه‌ها ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس در محیط مخصوص انتقال حاوی نمک های MS، بافر ام. ای. اس. ۱۰میلی مولار و استوسرینگون ۲۰۰ میکرو مولار با pH برابر ۵، تعلیق و برای تهیه سوسپانسیون یکنواخت ۱/۵ تا ۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شدند.

### انتقال ژن به برگ گیاه با واسطه آگروباکتریوم در خلاء (آگرو اینفیلترآسیون)

۰/۵ گرم برگ کاملاً سبز و تازه هرگیاه که به طور طبیعی کشت شده بودند پس از شستشو با آب مقطر استریل در بشرحاوی ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری غوطه ور شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دسیکاتور تحت مکش ۱ میلی بار قرار داده و با قطع ناگهانی خلاء، شرایط لازم برای نفوذ باکتری‌ها به بخش‌های میان بافتی برگ که هوای آن تخلیه شده بود فراهم گردید. سپس برگ‌های هر گیاه به صورت وارونه بر روی کاغذ صافی داخل پلیت قرار داده و در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنائی ۶۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند. پس از ۳ شبانه روز برگ‌های تراریخت برای استخراج پروتئین تام در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### تولید سرم پادتن

با توجه به اینکه آنتی بادی پروتئین VP2 به صورت تجارتی عرضه نمی‌شود، به منظور تولید سرم پادتن علیه این پروتئین، حیوان آزمایشگاهی (خرگوش) بوسیله واکسن D78 که در ایران به طور گسترده برای واکسیناسیون جوجه‌ها علیه بیماری گامبورو به کار می‌رود، ایمن شد.

برای این منظور سه نوبت با فاصله دو هفته، هر نوبت ۱ میلی‌لیتر واکسن D78 تازه رقیق شده حاوی حدود ۸۰۰ دز به صورت زیر جلدی به ناحیه پشت خرگوش تزریق گردید. تزریق اول واکسن به نسبت ۱:۱ با آدجوانت فروند کامل، تزریق دوم به نسبت ۱:۱ با آدجوانت فروند ناقص و تزریق آخر بدون آدجوانت فروند انجام شد. هشت روز بعد از آخرین تزریق، پس از تائید ایمن شدن حیوان (۲۹) با آزمایش الایزا، خون گیری نهائی از قلب حیوان انجام و سرم جدا شده تا زمان استفاده در۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### استخراج پروتئین VP2

استخراج پروتئین با روش Lameli (۱۶) با کمی تغییر انجام شد. برای این کار حدود ۵۰۰ میلی گرم از برگ‌های تراریخت را با قرار دادن در هاون حاوی نیتروژن مایع، کاملا پودر کرده، ۰/۵میلی لیتر بافر استخراج


www.SID.ir

Archive of SID


(کلرید سدیم ۰/۵ مولار، ای. دی. تی. ا ۵ میلی مولار، تریس-اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار (pH=۸)، دی. تی. تی ۵ میلی مولار و پی. ام. اس. اف ۲ میلی مولار) به ویال حاوی هر نمونه اضافه و ۳ تا ۴ ساعت بر روی یخ در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند. سپس برای جدا کردن پروتئین تام، نمونه‌ها ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و محلول رویی هر ویال جداگانه در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

**آنالیزکیفی میزان بیان پروتئین با استفاده از پلت الایزا**

۳۰ میکرولیتر پروتئین تام استخراج شده از برگ‌های تراریخت و برگ‌های غیر تراریخت (کنترل منفی) با ۸۰ میکرولیتر بافر پوشش‌دهنده (حاوی ۱۰/۶ گرم کربنات سدیم، ۸/۴ گرم بی کربنات سدیم و ۰/۲ گرم سدیم آزاید در یک لیترآب مقطر با pH=۹/۶) به چاهک‌های پلت الایزا افزوده و پلت به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از واکسن D78 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. سرم ایمن به نسبت ۱ به ۵۰۰ با بافر 1X از توئین کازئین 10X (حاوی ۶۰/۵۵ گرم تریس، ۳/۷ گرم ای. دی. تی. ا، ۸۷/۷ گرم کلرید سدیم، ۲۰ گرم کازئین و ۴/۴ میلی لیتر توئین۲۰ دریک لیتر آب مقطر با pH=۸) رقیق گردید و۵۰ میکرولیتر از محلول حاصل، به عنوان آنتی بادی اولیه، به هر چاهک اضافه و ۲-۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۳ بار شستشو با بافر توئین کازئین 1X هر بار به مدت ۵ دقیقه، آنتی سرم خرگوش کونژوگه به HRP باتوجه به دستورالعمل شرکت سازنده (Roche Apl. Science)، به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ با بافر توئین کازئین 1X رقیق و۵۰ میکرولیتربه هر چاهک اضافه و ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس سه بار شستشو با بافر توئین کازئین 1X مشابه مرحله قبل انجام شد. در پایان پس از افزودن محلول کروموژن/سوبسترا ($ABTS/H_2O_2$) جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت گردید.

**لکه‌گذاری پروتئین با وسترن بلات**

پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت و گیاهان غیرتراریخت (کنترل منفی) بر روی ژل ۱۲ درصد پلی آکریل آمید با شدت جریان ثابت ۳۰ میلی آمپر به مدت ۴-۳ ساعت الکتروفورز گردید (۱۵). انتقال نمونه‌های پروتئین از روی ژل به غشاء پلی وینیلیدن دی فلوراید انجام شد.

سپس غشای حاوی باندهای منتقل شده، در مجاورت آنتی بادی سرم تولید شده با غلظت ۱ به ۵۰۰ به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد بر روی شیکر قرار گرفت و پس از سه بار شستشو، ۱/۵ ساعت در مجاورت آنتی سرم خرگوش کونژوگه به HRP هم زده و پس از سه بار شستشو، رنگ آمیزی با استفاده از بافر شستشو و سوبسترای اختصاصی۴-کلرو۱- نفتول انجام گردید. علاوه بر این آزمون لکه گذاری پروتئین با قرار دادن غشاء حاوی باندهای منتقل شده، درآنتی بادی مونوکلونال علیه برچسب هیستیدینی با غلظت ۱ به ۵۰۰ طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Roche Apl. Science) استفاده شد تا بیان پروتئین با دو آنتی بادی مختلف بررسی گردد.

## نتیجه و بحث

در این تحقیق برای بیان موقت ژن از روش انتقال آگروباکتریوم تحت خلاء و برگ‌های گیاهان توتون، یونجه وکاهو به عنوان میزبان برای بیان ژن VP2 استفاده شد. گیاه توتون علی رغم تولید مواد آلکالوئیدی به دلیل قابلیت بیان بالا به عنوان گیاه مدل، و یونجه وکاهو با توجه به قابلیت تولید برگ فراوان در طول سال، و امکان استفاده مستقیم در جیره غذائی طیور و توانائی نسبتا خوب تولید پروتئین انتخاب گردیدند (۸). به منظور بیان ژن VP2 ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از سویه ایرانی در برگ این گیاهان، ژن فوق به طول حدود ۱۳۵۶ جفت باز (۲۲) در پلاسمید بیانی pBI۱۲۱ تحت کنترل پروموتر CaMV35S همسانه سازی گردید. نتایج حاصل از آزمایش PCR توسط جفت پرایمر طراحی شده برای ژن VP2 حاکی از حضور این ژن در پلاسمید pBI121 و حضورآن درآگروباکتریوم بود (شکل ۱).

برای بررسی حضور پروتئین نوترکیب در پروتئین تام استخراج شده از برگ‌های گیاهان تراریخت و شاهد، ازآنتی بادی سرم تولید شده استفاده شد. در روش لکه‌گذاری وسترن واکنش مناسبی بین پادتن سرم تولید شده و پروتئین استخراج شده مشاهده نگردید و نتایج Ture و همکاران (۱۹۹۳) و Dybing و Jackwood (۱۹۹۷) را تائید نمود. این مسئله می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله طبیعت آب گریز این پروتئین و تغییر ساختار نهائی آن در شرایط دناتوره کننده SDS-PAGE به دلیل تخریب اپی توپ‌های فضائی این پروتئین باشد که عامل اصلی اتصال آنتی ژن به آنتی بادی هستند (۲۵،۶،۵). از طرف دیگر تولید میزان کم پروتئین نوترکیب در میزبان‌های گیاهی سبب شده است که راه کارهائی از جمله استفاده از پروموتورهای مختلف، توالی‌های کوزاک و هدفمند سازی به اندامک‌ها به منظور افزایش میزان بیان پروتئین استفاده شود (۱۳،۱۱). با این حال در بسیاری موارد سنجش میزان پروتئین نوترکیب به دلیل میزان کم تولید آن با روش‌هائی از جمله لکه‌گذاری وسترن به خوبی میسر نمی‌گردد.

به همین دلیل در این تحقیق برای سهولت در امر جداسازی پروتئین، در مرحله همسانه سازی با استفاده از روش PCR یک قطعه ۶ تائی کدون هیستیدین به انتهای '۵ ژن مورد نظر اضافه گردید. استفاده از پادتن Anti-Histag توانست حضور پروتئین فوق را بر روی غشاء PVDF در آزمایش لکه‌گذاری وسترن نشان دهد. این نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب فوق با باند حدود ۴۱ کیلو دالتون در برگ های توتون و یونجه بیان شده و نتایج بیان این ژن در مخمر تائید گردید (۲۹)، در حالی که درگیاهان توتون شاهد، یونجه شاهد و همچنین کاهوی تراریخت، چنین باند پروتئینی وجود نداشت (شکل ۲).

همانطور که قبلا اشاره شد ازآنجا که کیت تجاری الایزا برای سنجش میزان آنتی ژن VP2 به صورت تجاری عرضه نمی‌گردد و یکی از اهداف این تحقیق در گام‌های بعدی است، برای تائید حضور این پروتئین و مقایسه بیان آن در برگ‌های تراریخت با برگ‌های گیاهان غیر تراریخت یا شاهد نظیرشان با استفاده از پادتن سرم ساخته شده فوق، آزمایشی با استفاده از پلت الایزا انجام شد که در بخش مواد و روش‌ها تشریح گردید. نتایج حاکی از آن بود که بیان پروتئین VP2 در برگ‌های


www.SID.ir

Archive of SID



تراریخت یونجه، توتـون و کاهو به ترتیب ۳/۸، ۲/۵ و ۱/۶ برابر گیاهان شـاهد نظیرشـان بوده اسـت (نمودار ۱) به عبارت دیگر دناتوره نشدن پروتئین در این روش شـرایط مناسب‌تری نسـبت به روش لکه گذاری وسـترن برای سـنجش میزان پروتئین و مقایسـه آن در برگ گیاهان ترآریخت با گیاهان شـاهد فراهم نموده اسـت و نتایج Shamsara و Ghoreshi (۱۳۸۵) را تائید می‌کند (۲۹).

بـه طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشـانگر آن اسـت که با توجه بـه رفتار بیانی خاص هر پروتئین در محیط سـلول، اسـتفاده از روش آگروباکتریوم تحت خلاء می‌تواند یکی از روش‌های مناسب برای بررسی سـازه‌های بیانی و میزان بیان ژن در گیاهان باشـد (۱۱،۸). با توجه به این نتایج گیاه یونجه پتانسیل خوبی برای تولید پروتئین VP2 دارد در حالی‌که میزان تولید در گیاه توتون کمتر و در کاهو بسیار کم است. به نظر می‌رسـد تولید این پروتئین با غلظت بالاتر درگیاه یونجه و پایداری آن در محیط سـیتوزولی، سـبب شده اسـت که میزان بیشتری از این پروتئیـن تولید گرددکه نظـر Schilberg و همکاران (۲۰۰۴) را تائید می‌نمایـد. تولید پروتئین VP2 نوترکیب در گیاه یونجه با قابلیت تولید پروتئین بالا، قابلیت کشـت مناسب، چند چین برداشت و تولید ۳۰ تن برگ در سال در هر هکتار به سهولت دست یافتنی است (۹،۸). با توجه بـه خوراکی بودن ایـن پروتئین نوترکیب برای طیور و اسـتفاده از این گیاهان علوفه ای به ویژه یونجه در خوراک مرغ، به نظر می‌رسد با انجام بررسی‌هائی بتوان برگ‌های حاوی این پروتئین نوترکیب را مستقیماً در جیره غذائی جوجه‌ها مصرف کرد.

علـی رغم ایـن مزیت‌ها، با توجه به اینکه تکنولـوژی انتقال ژن در این گیاه به خوبی توتون قابل اجرا نیسـت، بسـیاری از پژو هشگران تلاش می‌کنند از سیستم‌های بیانی دیگر از جمله آگروباینفیلتراسیون برگ‌ها یا سوسپانسیون سلولی استفاده نمایند (۸). در برگ‌های گیاه توتون وجود ترکیبات آلکالوئیدی و نوع محیط سـیتوزولی می‌توانند بر این پروتئین تاثیر گذاشته و با توجه به ناپایداری این پروتئین و اپی توپ‌های سطحی آن، احتمـالاً مقادیری از پروتئین یا اپی توپ‌های آن در اثر پروتئولیز از بین رفته باشند. گیاه کاهو اگرچه عملکرد بیوماس بیشتری حتی نسبت به یونجه دارد و به حدود ۳۰ تن در هکتار می‌رسد ولی حضور بافت‌های برگـی پر آب که حدود ۹۸ درصد آن‌ها را آب تشـکیل می‌دهد، عاملی برای کاهش عملکرد پروتئین و پایداری آن اسـت و در مقایسه با یونجه و توتون قابلیت کمتری برای تولید این پروتئین دارد و نتایج Fischer و Schilberg (۲۰۰۴) و Hashemi و همـکاران (۲۰۰۵) را تائیـد می‌نماید (۱۱،۸).

از طـرف دیگـر با توجه به مشـکلات تولید پروتئین‌هـای نوترکیب در گیاهـان تراریخت دائم از جمله خاموشـی ژن پـس از انتقال، تغییرات نامطلـوب درترکیب کربوهیدرات‌های مرکب و بـزرگ قندی، وقت‌گیر بـودن تولید یک رده تراریخت دائم بـا قابلیت تولید مطلوب پروتئین و مهم تر از همه مشـکلات زیسـت محیطی و احتمال فرار ژن و خطرات ناشـی از آن (۲۴،۱۴،۱۳) سـبب شـده است که در سـال‌های اخیر از روش‌هـای بیان موقـت ژن در گیاه به عنوان روش‌هائی مناسـب برای تولید پروتئین‌ها یا فرآورده‌های نوترکیب دیگر اسـتفاده شود (۱۸،۱۱). هم اکنون شـرکت مدیکاگوی کانادا پروتئین‌های نوترکیب درخواستی را با روش بیان موقت در برگ‌های گیاه یونجه تولید و در سـطح تجاری عرضـه می‌نماید (۱۲) بنا براین با توجه به اهمیت تولید پادتن‌ها و مزایا و معایب سیستم بیان ژن در گیاهان می توان با این روش پادتن‌ها مورد نیاز را تولید کرده و پس از خالص‌سازی استفاده نمود (۱۱).

اگرچه با توجه بـه حضور آگروباکتریوم در خاک و میزان تلقیح آن (۸) دور از ذهن نیسـت که بتوان بافت سـبز تراریخت را مستقیما در جیره غذائـی طیور مصرف کرد که در حال بررسـی اسـت. ایـن مقاله اولین گـزارش مبنی براسـتفاده از روش آگروباینفیلتراسـیون به منظور تولید پروتئین نوترکیب VP2 از سـویه‌های ایرانی و بخشی از طرح پژوهشی انتقال این ژن به گیاه سیب زمینی است.

## سپاسگزاری

بدینوسـیله از آقایـان دکتـر دلیری مدیر محتـرم گـروه دام وآبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری برای همکاری در تهیه پادتن سرم و دکتر مهدی شمس آرا برای در اختیار قرار دادن ژن VP2 و راهنمائی‌های ارزشمند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده

۱- شـمس آرا م.، سـید علی قرشـی. (۱۳۸۵)، بیان پروتئیـن VP2 ویروس بیمـاری بورس عفونی و بررسـی ایمنی زائـی آن در مخمر. پژوهشـگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری. تهران.

2- Arakawa T, Yu D.K, Chong J, Hough PC, Engen WH Landrige, (1998). A plant based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autommune diabete. *Nat. biotechnol.*, 16:934-938.

3- Azad A. A., Barrett, S. A. and Fahey, K. J. (1985). The characterization and molecular cloning of the double-stranded dsRNA genome of an Australian strain of infectious bursal *Disease Virus. Virology*, 143: 35-44.

4- Becht, H., Müller, H. and Müller, H. K. (1988). Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 69: 631-640.

5- Bevan, M. , 1984. Binary vectors for plant transformation. Nucl. Acids. Res. 12: 8711-8721.

6- Dybing, J. K. and Jackwood, D. J. (1997). Expression of MD infectious bursal disease viral proteins in baculovirus. *Avian Dis*., 41: 617-626.

7- Fahey, K. J., Erny, K. and Crooks, J. (1989). A conformationa l immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J. Gen. Virol*., 70: 1473-1481.

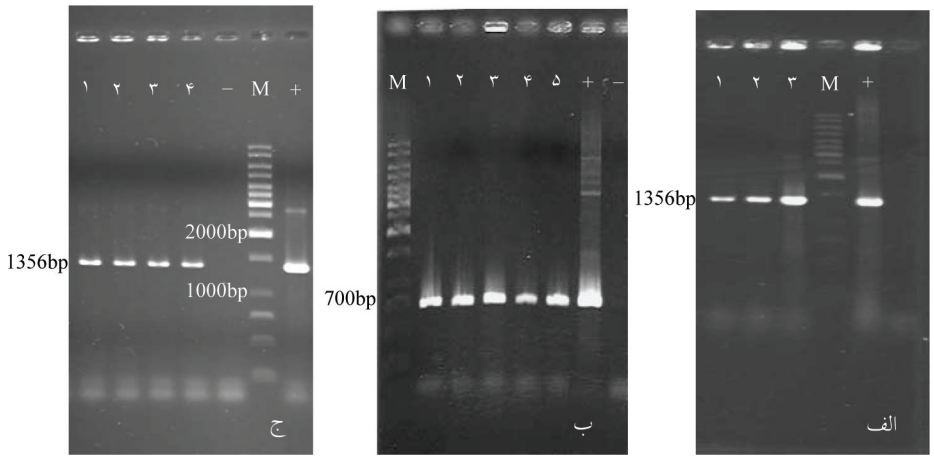
8- Fieler U , Artsaenko O , Conrad U. (1997). Optimisation of Scfv antibody production in transgenic plant. *Immunology*, 3: 205-216.



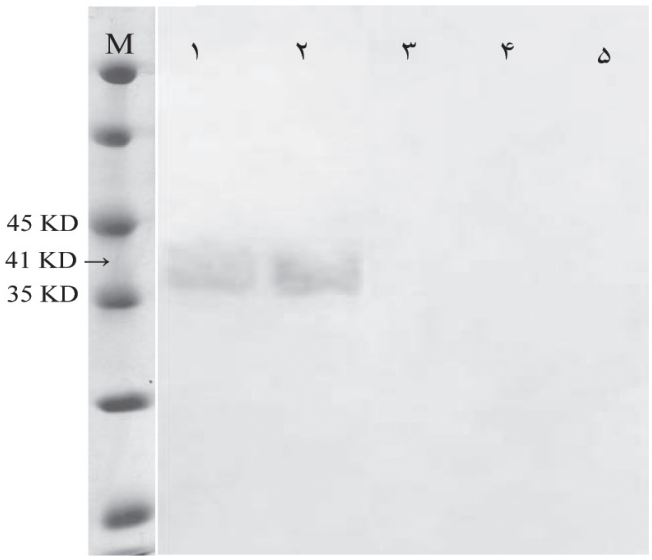
www.SID.ir

Archive of SID






**شـکل ۱- تائیـد (الـف) حضـور قطعـه ژن ۱۳۵۶ جفـت بـاز در *E.coli* از چـپ بـه راسـت: کلونی‌هـای باکتریائـی (شـماره‌های ۱، ۲ و۳)، مارکـر یک کیلو باز (M)، کنترل مثبت (+) و کنترل منفـی (−)، (ب) قطعه درون ژن ۷۰۰ جفت باز در *E.coli* از چپ به راست: مارکر یک کیلو باز (M)، کلونی‌های باکتریائی (شماره‌های ۱، ۲،۳،۴ و۵)، کنترل مثبت (+) و کنترل منفی (−) و (ج) قطعه ژن ۱۳۵۶ جفت باز در آگروباکتریوم از چپ به راسـت: کلونی‌های باکتریائی (شـماره‌های ۱، ۲،۳ و۴)، کنترل منفی (−) مارکر یک کیلو باز و کنترل مثبت (+)**

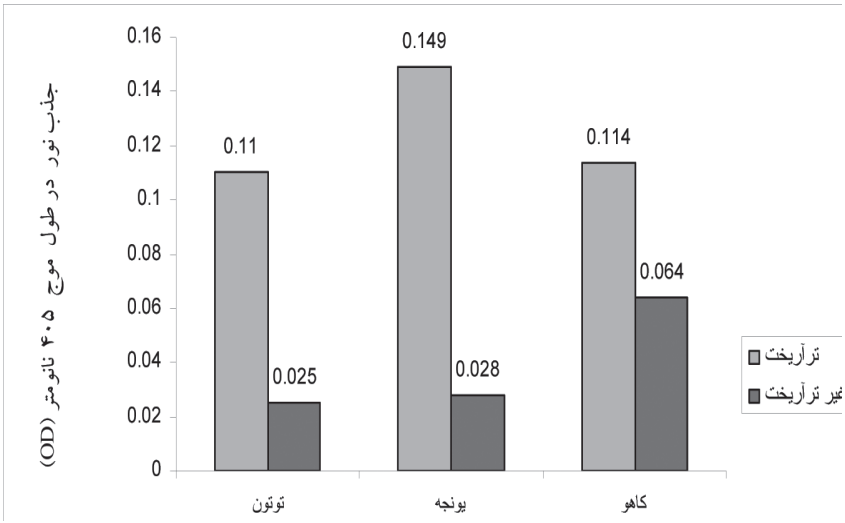



**شـکل ۲- باندهای حاصل از وسترن بلاتینگ با استفاده از پادتن مونوکلونال علیه برچسب هیسـتیدینی از چپ به راسـت به ترتیب: مارکر پروتئین (M)، توتون تراریخت (۱)، یونجه تراریخت (۲)، کاهوتراریخت (۳)، توتون شاهد (۴)، یونجه شاهد (۵).**


www.SID.ir

Archive of SID






**شـکل ۳- مقایسـه جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر در روش الایزا بر روی برگ‌های تراریخت و غیرتراریخت توتون، یونجه و کاهو**


17- Macreadie, I. G., Vaughan, P. R., Chapman, A. J., Mckern N. M., Jagadish, M. N., Heine, H. G., Ward, C. W., Fahey, K. J. and Azad, A. A., (1990). Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine*, 8: 549-552.

18- Martinez-Torrecuadrada, J. L., Saubi N., Pages-Mante A., Caston J. R., Espuna, E. and Casal, J. I.,(2003). Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine*, 21: 3342-3350.

19- Miele L., (1997). Plants as Bioreactor for biopharmaceuticals. *Trends in Biotech*., 15:45-50.

20- Pitcovski. J., Gutter, B., Gallila, G., Goldway, M., Perelman, B., Gross, G., Krispel, S., Barbakov, M. and Michael, A., (2003). Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 21: 4736-4743.

21- Raskin I., Ribnicky D. M., Komarnytsky S., IIic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D. A., Ripoll C., Yakoby N., O´Neal J. M., Cornwell T., Pastor I. And Fridlender B., (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in biotechnology*, 20(12):522-531.

22- Sambrook J., Fritsch F. F., Maniatis T., (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Second edition, Cold spring Hrrbor laboratory press.

23- Shamsara M., Ghorashi SA, Ahmadian G., (2006). Cloning and nucleotide analysis of the VP2 gene of a very virulent infectious bursal disease virus isolate from Iran. *Acta virol*, 50(4):229-234.

9- Fischer R. and Schilberg S. (2004). *Molecular Farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA.

10- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and Twyman R. (2004). Plant based production of Biopharmaceuticals. *Current Opinion in plant Biology,* 7:152-158.

11- Gidding G., Allison G., Brooks D, Carter A. (2000). Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*., 18:1151-1155.

12- 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*, l2(3): 109-114.

13- Jianxiang Wu, Lian Yu, Long Li, Jinqiang Hu, Jiyong Zhou and Xueping Zhou, (2007). Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 570–578

14- Julian K.-C. M., Pascal M. W. Drake and P. Christou, (2003). The production of recombinant biopharmaceuticals in plants. *Nature Review Genetic*, 4: 790-796.

15- Kapila J, De Rycke R, Van Montague M, Angenon G., (1997). An Agrobacterium –mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci,* 122 :101-108.

16- Lameli UK, (1970). Cleavage of structural protein in during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.




www.SID.ir

Archive of SID


bursal disease viruses. *Avian Dis*., 37: 647-654.

27- Waugh D. S., (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology,* 23(6) 316-320.

28- Wroblewski T, Tomczak A, and Richard Michelmore, (2005). Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3(2):259-275.

29- Wu H, Singh NK, Locy RD, Scissum-Gunn K, Giambrone, (2004). Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in Arabidopsis thaliana. *Biotechnology letters*, 26(10):787-792.

24- Spies U., Müller H. and Becht H., (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res*., 8: 127-140.

25- Streatfield S. J., Joseph M. Jilka, Elizabeth E. Hood, Debra D. Turner, Michele R. Bailey, Jocelyne M. Mayor a, Susan L. Woodard a, Katherine K. Beifuss a, Michael E. Horn a, Donna E. Delaney a, Ian R. Tizard b, Howard J. A., (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19: 2742-2748.

26- Ture, O., Tsai, H. J. and Saif, Y. M., (1993). Studies on antigenic relatedness of classic and variant strains of infectious


www.SID.ir