

بیان موقت پروتئین نو ترکیب Anti-VEGF مبتنی بر ناقل ویروسی (ZYMV) در گیاه سلمک (*Chenopodium album*)

مژگان سلیمانی زاده^{۱*}، مختار جلالی جواران^۲، عبدالرضا باقری^۳ و مهدی بهدانی^۴

^۱ ایران، بندرعباس، دانشگاه هرمزگان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و مهندسی باغبانی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

^۳ ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

^۴ ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰



چکیده

بیان موقت از طریق ناقل‌های ویروسی به‌عنوان روشی ممتاز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب گیاهی ظهور کرده است. بازده کوتاه مدت این روش نسبت به تولید زمان‌بر گیاهان تراریخته، تولید ارزان‌تر و آسان‌تر و غیره می‌تواند راه را برای تولید تجاری پروتئین‌های نو ترکیب هموارتر کند. در این تحقیق پروتئین Anti-Vascular endothelial growth factor (Anti-VEGF) در گیاه *Chenopodium album* با استفاده از روش بیان موقت مبتنی بر ویروس Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) تولید شد. در ابتدا گیاهان هدف با استفاده از ناقل ویروسی حاوی ژن گزارشگر GFP (pZYMVGFP) آلوده شدند تا از توانایی آلوده کردن گیاهان با کمک این ناقل اطمینان حاصل شود. پس از ظهور علائم ویروسی روی برگ گیاهان و همچنین تأیید آلودگی گیاهان با روش‌های RT-PCR و Dot blot، همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل ویروسی pZYMVGFP انجام شد. در مرحله بعد گیاهان هدف با استفاده از ناقل ویروسی نو ترکیب (pZYMVAntiVEGF) مایه‌کوبی شده و بیان ژن هدف در سطح رونویسی با آزمون RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های Dot blot، Western blot و ELISA مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای مولکولی انجام شده بیان موقت پروتئین نو ترکیب AntiVEGF را در این گیاه نشان دادند. بنابراین سیستم بیان مبتنی بر ویروس ZYMV می‌تواند یک پلتفرم مناسب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب دیگر در گیاه سلمک باشد.

واژه های کلیدی: پلتفرم بیان موقت، گیاه سلمک، بیوراکتورهای گیاهی، زراعت مولکولی، رگزایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۰۷۳۸۲۰۲، پست الکترونیکی: m.soleimani380@gmail.com

مقدمه

معمولاً با فرآیند تخمیر در باکتری، مخمر یا سلول‌های حیوانی تولید می‌شوند. محدودیت‌های موجود در استفاده از سیستم‌های بیانی مبتنی بر کشت سلولی مرسوم (قیمت بالای تولید، کارایی و عملکرد پایین و ...) و همچنین نیاز روز افزون دنیا به مقادیر زیاد پروتئین‌های دارویی ایمن و اقتصادی منجر شده تا در سه دهه‌ی اخیر، زراعت مولکولی (Molecular farming) به‌عنوان یک استراتژی جایگزین و

گیاهان هزاران سال است که نیازهای غذایی، ساختاری و شیمیایی انسان را فراهم می‌کنند. با اینحال از اوایل دهه ۱۹۹۰ با تولید موفق اولین آنتی‌بادی مشتق از گیاه در گیاه توتون، آن‌ها همچنین به‌عنوان پلتفرم‌های تولید (عمدتاً برای تولید مولکول‌های کوچک و پروتئین‌های نو ترکیب) به‌کار گرفته شده‌اند (۱ و ۹). پروتئین‌های نو ترکیب نقش مهمی را در بسیاری از جنبه‌های زندگی ما ایفا می‌کنند و

اختصاصیت بالا)، محدودیت‌هایی از قبیل اندازه بزرگ، ایمنی‌زایی، قیمت بالای تولید و ... را دارند. کلاس جدیدی از آنتی‌بادی‌ها به نام نانوبادی‌ها در تحقیقات معرفی شده که مزایای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مولکول‌های کوچک را با هم دارا می‌باشند (۱۲ و ۱۶). نانوبادی AntiVEGF در سال ۲۰۱۶ با استفاده از تکنیک Phage display از شتر جداسازی شد (۱۲). در این تحقیق نانوبادی AntiVEGF در گیاه سلمک (به‌عنوان میزبان لکه موضعی) با استفاده از روش بیان موقت مبتنی بر ویروس ZYMV تولید شد. در ابتدا گیاهان هدف با استفاده از ناقل ویروسی حاوی ژن گزارشگر GFP (pZYMVGFP) آلوده شدند تا از توانایی آلوده کردن گیاهان با کمک این ناقل اطمینان حاصل شود. پس از ظهور علائم ویروسی روی برگ گیاهان و همچنین تأیید آلودگی گیاهان با روش‌های RT-PCR و Dot blot، همسانه‌سازی ژن هدف (ژن رمز کننده نانوبادی AntiVEGF) در ناقل ویروسی pZYMVGFP انجام شد. در مرحله بعد گیاهان هدف با استفاده از ناقل ویروسی نوترکیب (pZYMVAntiVEGF) مایه‌کوبی شده و بیان ژن هدف در سطح رونویسی با آزمون RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های Dot blot، Western blot و ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن هدف از ناقل pHEN6c-AntiVEGF و همسانه‌سازی در ناقل pJET جهت تکثیر ژن هدف از روی ناقل pHEN6c-AntiVEGF (تهیه شده توسط دکتر بهدانی و همکاران، انیستوپاستور ایران)، با استفاده از واکنش PCR، آغازگرهای اختصاصی مناسب طراحی شد. در طراحی آغازگر رفت جایگاه برش آنزیم *SphI* و در طراحی آغازگر برگشت جایگاه برش آنزیم *KpnI* در نظر گرفته شد. برای انجام واکنش PCR از High fidelity PCR master mix (توپاز، ایران) استفاده شد. انجام واکنش PCR با

مقرون به‌صرفه برای تولید فرآورده‌های دارویی زیستی از قبیل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و ... در مقیاس بالا ظهور نماید (۴، ۲۰ و ۲۴). مزایای استفاده از گیاهان به‌عنوان یک سیستم تولیدی، شامل توسعه و مقیاس‌پذیری بالا، تولید مقرون به‌صرفه، ذخیره‌سازی آسان مواد اولیه و همینطور نگرانی کمتر نسبت به عوامل بیماری‌زای انسانی یا حیوانی در طول فرآیند تجاری شدن می‌باشد (۱۵). تاکنون تعداد کثیری از پروتئین‌های نوترکیب مختلف در بیوراکتوهای گیاهی با موفقیت تولید شده که برخی از آن‌ها به مرحله تجاری رسیده است و برخی نیز آزمایشات بالینی را طی می‌نماید (۱۷، ۱۸ و ۱۹).

بیان موقت از طریق ناقل‌های ویروسی به‌عنوان روشی ممتاز برای بیان پروتئین‌های نوترکیب گیاهی ظهور کرده است. بازده کوتاه مدت این روش نسبت به تولید زمانبر گیاهان تراریخته، تولید ارزان‌تر و آسانتر و عدم قرار گرفتن بیان ژن تحت تاثیر اثرات مکانی می‌تواند راه را برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب هموارتر کند (۱۳ و ۲۵).

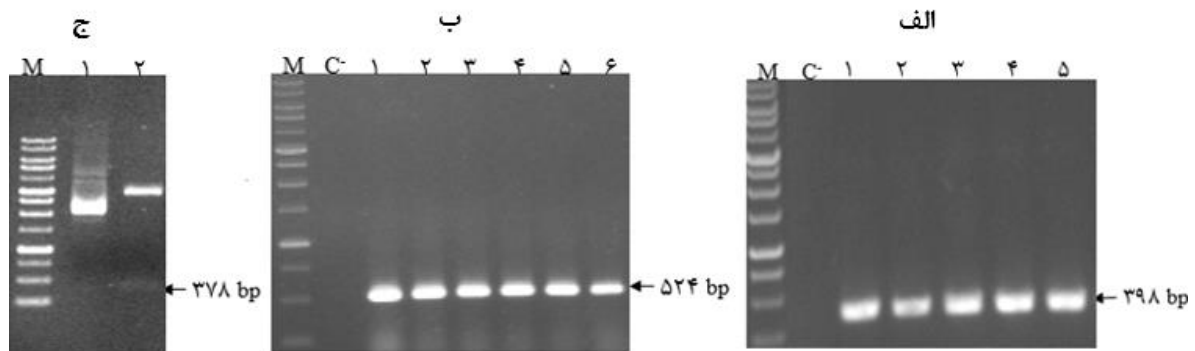
رگزایی یک فرآیند چند مرحله‌ای بسیار کنترل شده شامل تکثیر سلول‌های اندوتلیال، سازماندهی سلول‌ها به ساختارهای لوله‌ای و بلوغ ساختارهای لوله‌ای به شکل رگ‌های پایدار می‌باشد. در شرایط ایجاد تومور رگزایی منجر به رشد، تهاجم و گسترش سرطان می‌گردد. بنابراین مهار رگزایی می‌تواند یک هدف جذاب برای درمان سرطان باشد (۱۲). فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی VEGF (Vascular endothelial growth factor) مهم‌ترین فاکتور در توسعه و رگزایی تومور سرطانی محسوب می‌شود. اتصال این فاکتور به گیرنده‌های منجر به تکثیر و رگزایی سلول‌های اندوتلیال می‌شود. برخی از محققان روی مهار این فاکتور با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مولکول‌های کوچک تمرکز نمودند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علی‌رغم داشتن یکسری مزایا (تمایل و

آنزیمی (شکل ۱-ج) برای تأیید همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل مذکور انجام شد. همانگونه که انتظار می‌رفت، پس از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pJETF و pJETR (موجود در کیت K1232)، یک قطعه ۵۲۴ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱-ب). همچنین نتیجه هضم آنزیمی ناقل pJET-AntiVEGF (دربردارنده ژن AntiVEGF) با آنزیم‌های *SphI* و *KpnI* ایجاد یک قطعه ۳۷۸ جفت بازی مربوط به ژن هدف بود (شکل ۱-ج).

آغازگرهای اختصاصی ژن هدف (AntiVEGF) منجر به تکثیر یک قطعه با اندازه ۳۹۸ جفت باز شد (شکل ۱-الف). درج فرآورده‌ی تکثیر شده PCR (شکل ۱-الف) در ناقل pJET در حضور آنزیم لیگاز و مطابق با دستورالعمل کیت K1232 (شرکت فرمنتاز) انجام گرفت. سپس محصول واکنش اتصال (ناقل نو ترکیب pJET-AntiVEGF) به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انتقال یافت. در نهایت آزمون‌های PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pJETF و pJETR (شکل ۱-ب) و هضم

AntiVEGF: 5'-ATGCGCATGCATGCAGGTCCAGCTGCAGGAGTCT-3'

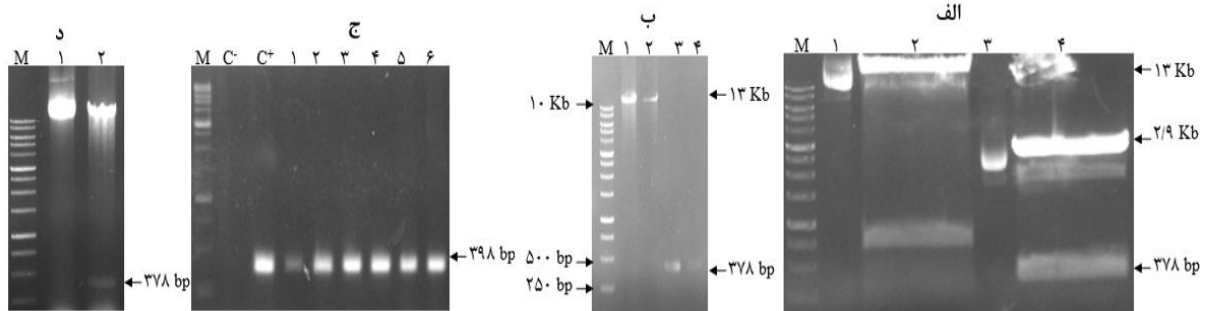
AntiVEGFR: 5'-TCGAGGTACCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCC-3'



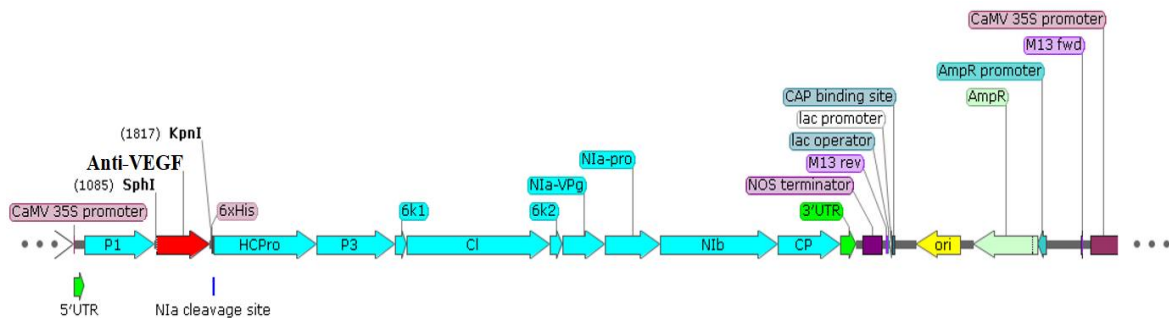
شکل ۱-الف) تکثیر ژن AntiVEGF از روی ناقل pHEN6c-AntiVEGF با استفاده از آغازگرهای اختصاصی: M- نشانگر اندازه مولکولی ۱Kb، C- کنترل منفی (آب به‌عنوان کنترل)، ۱ تا ۵- ناقل pHEN6c-AntiVEGF دربردارنده‌ی ژن هدف (ب) جداسازی محصول PCR ژن AntiVEGF تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی: M- نشانگر اندازه مولکولی ۱Kb، C- کنترل منفی (آب به‌عنوان کنترل)، ۱ تا ۶- کلونی‌های رشد یافته روی محیط انتخابگر (ج) جداسازی محصول هضم آنزیمی ناقل pJET-AntiVEGF-M نشانگر اندازه مولکولی ۱Kb، ۱- ناقل pJET-AntiVEGF برش نخورده، ۲- ناقل pJET-AntiVEGF برش خورده

قطعات تخلیص شده انجام گرفت و محصول واکنش به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* منتقل شد. تأیید همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل ویروسی pZYMVGFP با استفاده از واکنش‌های PCR (شکل ۲-ج) و هضم آنزیمی (شکل ۲-د) انجام شد. مطابق با آنچه انتظار می‌رفت، اندازه محصول PCR ژن هدف و فرآورده حاصل از هضم آنزیمی ناقل نو ترکیب به ترتیب برابر با ۳۹۸ و ۳۷۸ جفت باز به دست آمد. ناقل نو ترکیب ویروسی حاصل ناقل pZYMVAntiVEGF نامیده شد (شکل ۳).

همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل ویروسی pZYMVGFP پس از تکثیر ژن هدف و همسانه‌سازی آن در ناقل pJET، ناقل‌های pJET-AntiVEGF (۲/۹ کیلو جفت باز) و pZYMVGFP (۱۳ کیلو جفت باز) در واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *SphI* و *KpnI* برش داده شدند (شکل ۲-الف). محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز جداسازی و با استفاده از کیت تخلیص ژل (شرکت GeneAll، ساخت کشور کره جنوبی) خالص‌سازی شد (شکل ۲-ب). سپس واکنش اتصال بین



شکل ۲- همسانه‌سازی ژن AntiVEGF در ناقل ویروسی pZYMVGFP (الف) جداسازی محصول هضم آنزیمی ناقل pZYMVGFP و pJET-AntiVEGF-M نشانگر اندازه مولکولی ۱ Kb، ۱- ناقل pZYMVGFP برش نخورده، ۲- ناقل pZYMVGFP برش خورده، ۳- ناقل pJET-AntiVEGF برش نخورده، ۴- ناقل pJET-AntiVEGF برش خورده (ب) جداسازی محصول تخلیص شده: M- نشانگر اندازه مولکولی ۱ Kb، ۱ و ۲- ناقل ویروسی، ۳ و ۴- ژن AntiVEGF (ج) جداسازی محصول PCR: M- نشانگر اندازه مولکولی ۱ Kb، C- کنترل منفی (آب به عنوان کنترل)، C⁺- کنترل مثبت (ناقل pHEN6c- AntiVEGF) ۱ تا ۶- کلونی‌های رشد یافته روی محیط انتخابگر (د) جداسازی محصول هضم آنزیمی ناقل pZYMVAntiVEGF-M نشانگر اندازه مولکولی ۱ Kb، ۱- ناقل pZYMVAntiVEGF برش نخورده، ۲- ناقل pZYMVAntiVEGF برش خورده



شکل ۳- نمایش شماتیک از ناقل نو ترکیب ویروسی pZYMVAntiVEGF

برگ گیاهان خراشده‌ی شده با پودر کربوراندوم، مالیده شد. پیش از مایه‌زنی سطح برگ با پنبه آغشته به اتانول ۷۰ درصد تمیز و ضدعفونی گردید. به ازای هر گیاه، ۱۰ میکروگرم پلاسمید مایه‌زنی شد. در نهایت نمونه‌برداری از برگ گیاهان در روز چهاردهم پس از مایه‌زنی انجام شد.

ارزیابی مولکولی گیاهان مایه‌زنی شده در سطح RNA: بدین منظور، ابتدا RNA کل از برگ گیاهان مایه‌زنی شده و شاهد با استفاده از کیت استخراج RNA (Ribospin Plant, GeneAll) و مطابق با دستورالعمل کیت استخراج گردید. پس از تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪، ساخت cDNA با استفاده از کیت

مایه‌زنی مواد گیاهی با ناقل‌های pZYMVGFP و pZYMVAntiVEGF جهت آلوده‌سازی گیاه هدف، ابتدا بذور این گیاه از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (گروه بیماری‌شناسی) تهیه شد. جهت کاشت بذور، از کمپوست به همراه ورمیکولیت در ترکیب با خاک استریل به نسبت حجمی ۲۵ : ۲۵ : ۵۰ استفاده شد. گیاهان در اتاقک رشد در ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از استخراج ناقل‌های هدف با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Plasmid purification kit, GeneAll)، ناقل‌های استخراج شده به صورت مکانیکی و با استفاده از یک گوش پاک‌کن روی

PBS-T، لکه‌های حاوی پروتئین در حضور سوبسترای DAB (4-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) ظاهر شدند.

آزمون لکه‌گذاری وسترن (Western blot): برای انجام این آزمون از روش توپین و همکاران استفاده شد (۲۳). پس از انجام آزمون SDS-PAGE، ژل و غشاء PVDF به مدت ۳۰ دقیقه در بافر انتقال (گلیسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۱/۳ میلی‌مولار و متانول ۲۰٪) خیسانده شد. برای انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء، از دستگاه Trans-Blot semi-dry (BioRad، آمریکا) و دستورالعمل مربوطه استفاده شد. پس از اتصال دستگاه به منبع توان با جریان ثابت ۲۰۰ mA، عمل انتقال به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس غشاء به مدت ۳ ساعت در محلول بلوکه کننده (شیر خشک بدون چربی ۵٪ در محلول PBS-T) قرار گرفت. پس از آن غشاء ۳ بار (هر بار به مدت ۵ دقیقه) توسط محلول PBS-T شستشو داده شد. در مرحله بعد، محلول آنتی بادی اولیه (به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به غشاء اضافه شد. پس از شستشوی مجدد با محلول PBS-T، غشاء به محلول آنتی بادی ثانویه (به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) انتقال یافت. در نهایت غشاء پس از ۳ بار شستشو با محلول PBS-T به محلول رنگ آمیزی DAB منتقل شد و بلافاصله پس از ظهور باندها، شستشو با آب مقطر انجام شد. آنتی بادی‌های مورد استفاده برای این آزمون مشابه با آزمون Dot-blot بودند.

آزمون الیزا (ELISA): هدف از انجام آزمون الیزا، تعیین میزان کمی پروتئین هدف بود. آزمون الیزا به روش غیر مستقیم انجام شد (۳). به این صورت که ابتدا نمونه‌های پروتئینی استخراج شده به همراه بافر پوشش‌دهنده (Coating buffer) درون چاهک‌های پلیت الیزا اضافه و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۳ بار شستشوی چاهک‌های مربوطه (هر

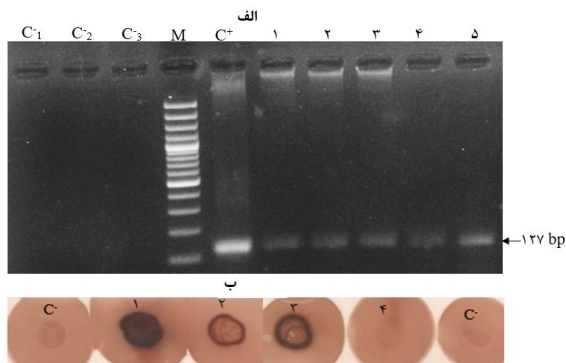
First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) انجام شد. در نهایت، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از روی ژن هدف انجام شد.

ارزیابی مولکولی گیاهان مایه‌زنی شده در سطح پروتئین

استخراج پروتئین محلول کل (TSP) (Total soluble protein): به منظور بررسی بیان پروتئین هدف، ابتدا استخراج TSP مطابق با روش گای و همکاران انجام شد (۷). بدین منظور، ابتدا ۰/۲ گرم از برگ گیاهان هدف در داخل هاون و با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر شد و به ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج پروتئین سرد (تریس ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۲ میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۰/۰۴٪ و بازدارنده پروتئاز PMSF ۱ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ورتکس و پس از آن ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با شتاب ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد. فاز رویی حاوی پروتئین به تیوب جدید منتقل و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای اندازه‌گیری میزان TSP از روش برادفورد و مقایسه با پروتئین استاندارد BSA (Bovine serum albumin) استفاده شد.

آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای (Dot-blot): این آزمون به روش هوانگ و همکاران انجام شد (۱۱). ابتدا پروتئین‌های استخراج شده به صورت نقطه‌ای روی غشاء نیتروسولوزی بارگذاری شدند. پس از خشک شدن در دمای اتاق، غشاء نیتروسولوزی به مدت یک ساعت در دمای اتاق در محلول بلوکه کننده (۱٪ BSA) قرار گرفت. پس از سه بار شستشو (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در محلول PBS-T، آنتی بادی اولیه (polyclonal rabbit anti-camel IgGs) به مدت ۱ ساعت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به کاغذ اضافه شد. پس از تکرار شستشو با محلول PBS-T، آنتی بادی ثانویه (Goat anti-rabbit IgG-HRP) به مدت یک ساعت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به غشاء نیتروسولوزی اضافه گردید. در نهایت پس از شستشوی غشاء نیتروسولوزی با محلول

مایه‌زنی شده با ناقل pZYMVAntiVEGF به همراه گیاه شاهد استخراج شد.



شکل ۴- الف) جداسازی محصول RT-PCR ژن گزارشگر GFP: C⁻₁ - کنترل منفی (آب به عنوان کنترل)، C⁻₂ - کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNase I)، C⁻₃ - کنترل منفی (گیاه شاهد)، M - نشانگر اندازه مولکولی ۱ Kb، C⁺ - کنترل مثبت (ناقل pZYMVGFP)، ۱ تا ۵ - گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZYMVGFP (آزمون Dot-blot گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل ویروسی هدف و شاهد: C - کنترل منفی (نمونه پروتئینی گیاه شاهد)، لکه‌های ۱ تا ۴ - نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده GFP

سپس واکنش RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی صورت پذیرفت. تکثیر قطعه‌ی ۳۹۸ جفت‌بازی مربوط به ژن AntiVEGF در گیاهان مایه‌زنی شده و عدم تکثیر آن در گیاه شاهد و کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNase I) بیانگر انجام رونویسی موفق از ژن هدف در گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب pZYMVAntiVEGF بود. به منظور تعیین بهترین زمان برای نمونه‌برداری از برگ گیاهان جهت آنالیزهای ژن هدف، آزمون qRT-PCR روی ژن هدف انجام شد و نتیجه‌ی این آزمون نشان داد که بالاترین سطح بیان این ژن در روز چهاردهم پس از مایه‌زنی می‌باشد (نتایج نشان داده نشده).

بررسی بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده هدف: به منظور بررسی انجام ترجمه از رونوشت‌های ژن هدف و بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده در

بار ۵ دقیقه) با محلول PBS-T، بلوکه کردن چاهک‌ها با محلول BSA ۱٪ (یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. بعد از شستشوی مجدد با محلول PBS-T، آنتی‌بادی اولیه polyclonal rabbit anti-camel IgGs (یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به هر چاهک اضافه شد. در نهایت پس از افزودن آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti-rabbit IgG-HRP)، محلول TMB (Tetramethyl benzidine) به هر چاهک افزوده شد. در نهایت، میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Microplate reader (BioTek، آمریکا) و پس از توقف واکنش آنزیمی خوانده شد.

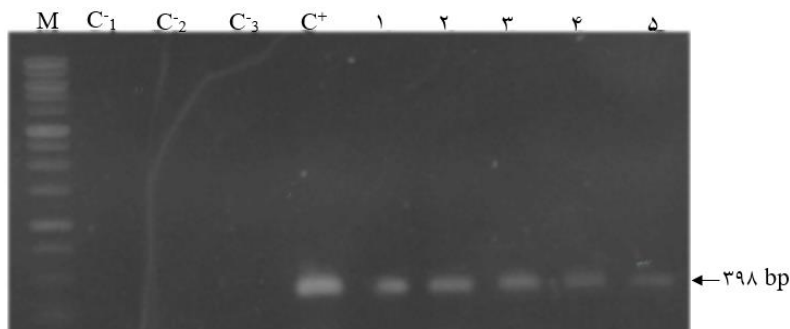
نرم‌افزارها: برای طراحی آغازگرهای اختصاصی از نرم‌افزار آنلاین OligoAnalyzer و برای رسم نقشه ناقل از نرم‌افزار SnapGene Viewer استفاده شد.

نتایج

تائید توانایی ناقل ویروسی pZYMVGFP در آلوده‌سازی گیاهان با مشاهده بیان ژن گزارشگر GFP در گیاهان هدف: قبل از استفاده از ناقل ویروسی pZYMVGFP برای بیان موقت پروتئین AntiVEGF، توانایی این ناقل در آلوده‌سازی گیاه سلمک با استفاده از ژن GFP مورد ارزیابی قرار گرفت. تلقیح برگ‌های گیاه هدف با ناقل pZYMVGFP سبب آلودگی لکه موضعی گیاه شد که با آزمون‌های RT-PCR (شکل ۴-الف) و Dot-blot (شکل ۴-ب) به آسانی قابل تشخیص بود. این در حالی بود که در برگ گیاه آلوده شده با ویروس وحشی ZYMV، بیان ژن گزارشگر GFP مشاهده نشد. آزمون RT-PCR منجر به تکثیر قطعه ۱۲۷ جفت‌بازی ژن GFP شد.

بررسی رونویسی از ژن خارجی هدف (AntiVEGF) در گیاهان مایه‌زنی شده هدف: جهت تایید بیان ژن هدف در سطح رونویسی (RNA)، ابتدا RNA کل از گیاهان

گام اول، آزمون Dot-blot روی پروتئین‌های استخراجی انجام شد.



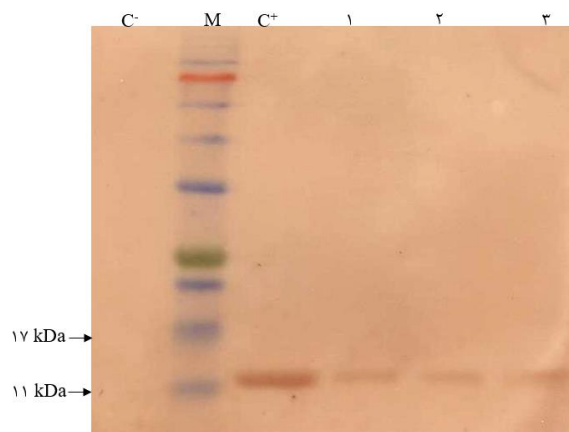
شکل ۵- الف) جداسازی محصول RT-PCR ژن AntiVEGF: M- نشانگر اندازه مولکولی 1 Kb، C⁺- کنترل منفی (آب به عنوان کنترل)، C⁻- کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNase I)، C⁻۳- کنترل منفی (گیاه شاهد)، C⁺- کنترل مثبت (ناقل pZYMVAntiVEGF)، ۱ تا ۵- گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل pZYMVAntiVEGF

استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل هدف و عدم تغییر رنگ در نمونه پروتئینی گیاه شاهد بیان این پروتئین نوترکیب را تأیید نمود (شکل ۶).

نتایج آزمون Dot-blot حضور پروتئین نوترکیب را در عصاره استخراج شده از برگ گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب pZYMVAntiVEGF در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل ۶). مشاهده تغییر رنگ در نمونه‌های پروتئینی



شکل ۶- نتایج حاصل از آزمون Dot-blot با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین هدف: C⁺- کنترل مثبت (پروتئین AntiVEGF خالص شده از باکتری)، C⁻- کنترل منفی (نمونه پروتئینی گیاه شاهد)، لکه‌های ۱ تا ۳- نمونه‌های پروتئینی گیاهان بیان‌کننده پروتئین هدف (AntiVEGF)



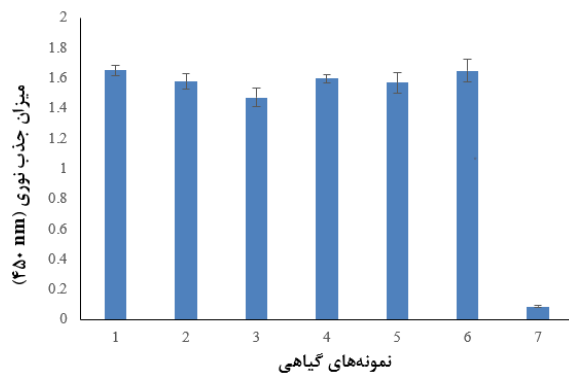
شکل ۷- نتایج آنالیز Western-blot برای گیاهان هدف با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین AntiVEGF: C⁻- کنترل منفی (گیاه شاهد)، کنترل مثبت (پروتئین AntiVEGF خالص شده از باکتری)،

به‌منظور بررسی دقیق‌تر بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل هدف از روش Western-blot استفاده شد. پس از انجام این آزمون روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب pZYMVAntiVEGF، باند پروتئینی مشخصی (۱۵ kDa) در محدوده باند کنترل مثبت در این گیاهان مشاهده شد. هیچ گونه باند مشابهی در پروتئین استخراج شده از گیاه شاهد مشاهده نگردید.

مثال بیان موقت با استفاده از ناقل‌های ویروسی بازسازی شده تولید مقادیر بالای ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی مونوکلونال را در هر گرم وزن برگ تازه در طی دو هفته امکان‌پذیر می‌سازد (۱۴ و ۱۸). ویروس‌های گیاهی چندین ویژگی منحصر به فرد دارند که برای توسعه ناقل‌های بیانی مفید می‌باشند. از جمله اینکه دارای ژنوم کوچک بوده و به آسانی قابل دستورزی می‌باشند، سرعت همانندسازی ویروسی بالاست و توانایی آلودگی گیاهان به‌طور سیستمیک در مدت زمان کوتاه را دارا می‌باشند (۱۳). در این تحقیق پروتئین نوترکیب AntiVEGF با موفقیت با استفاده از یک ناقل مبتنی بر ویروس ZYMV (*Chenopodium album*) (pZYMVGFP) به شکل موقت در گیاه *Chenopodium album* بیان شد. ناقل pZYMVGFP دربردارنده cDNA تمام طول جدایه تایوان ZYMV (TW-TN3) است. در این ناقل ژن گزارشگر GFP بین ژن‌های HC-Pro و P1 و تحت کنترل پیشبرنده ویروسی 35S ویروس موزائیک کلم گل (Cauliflower mosaic virus) (CaMV) قرار دارد و یک جایگاه هضم پروتئینی مربوط به NIa در انتهای آمینی پروتئین HC-Pro برای تولید شکل آزاد پروتئین قرار داده شده است. یکی از عملکردهای پروتئین HC-Pro سرکوب نمودن خاموشی RNA است، لذا می‌تواند نقش مهمی در بهبود بیان پروتئین نوترکیب داشته باشد (۱۰). ناقل pZYMVGFP تاکنون برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دیگری از جمله پروتئین پلاسمینوژن فعال‌کننده بافتی (tPA)، اینترفرون گاما و آلرژن 5 Der p 5 (*Dermatophagoides pteronyssinus* group 5 allergen) در گیاهان به‌کار گرفته شده است (۱۰). در سطوح رونویسی، عناصر پیشبرنده می‌توانند اثر چشمگیری روی سطح mRNA ژن خارجی داشته باشند و به‌نوبه خود سطوح تجمع فرآورده‌ی پروتئین را تحت تاثیر قرار دهند. بنابراین بالا بردن سرعت شروع رونویسی با استفاده از یک پیشبرنده قوی می‌تواند باعث افزایش عملکرد پروتئین نوترکیب شود (۵). در این رابطه پیشبرنده 35S اغلب برای

M- نشانگر پروتئینی (شرکت سیناژن)، ۱ تا ۳- گیاهان هدف مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب pZYMV AntiVEGF

آزمون الیزا: از آزمون الیزا برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب حاوی ژن هدف و گیاه شاهد و همچنین برآورد کمی پروتئین AntiVEGF استفاده شد. همانطور که در شکل مشاهده می‌کنید با استفاده از این آزمون، اختلاف معنی‌داری بین گیاهان مایه‌زنی شده با شاهد مشاهده شد.



شکل ۸- میانگین میزان جذب پروتئین گیاهان مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب (pZYMV AntiVEGF) و گیاه شاهد: ستون ۱ تا ۶، نمونه‌های گیاهی مایه‌زنی شده با ناقل نوترکیب، ستون ۷، گیاه شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

مصرف آنتی‌بادی‌ها با اهداف تشخیصی و درمانی (به‌ویژه برای درمان سرطان) روز به روز در حال افزایش می‌باشد. بنابراین ایجاد یک سیستم کارا به‌منظور تولید انبوه و ارزان آن‌ها امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است (۴ و ۸). زراعت مولکولی پتانسیل تبدیل شدن به یک روش جایگزین جدید برای تولید ارزان و ایمن پروتئین‌های دارویی را دارد (۱۵). این تکنولوژی در طول چند دهه‌ی گذشته پیشرفت چشمگیری داشته است (۱۹ و ۲۶). بیان موقت با استفاده از ناقل‌های ویروسی تا حد زیادی به توسعه زراعت مولکولی کمک نموده است و در چند سال گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در این زمینه صورت گرفته است (۸ و ۲۲). این تکنولوژی تولید مقادیر بالای پروتئین هدف را در مدت زمان کم مهیا می‌کند. به‌طور

هدف (AntiVEGF) در ناقل ویروسی همسانه‌سازی شد و بیان موفق ژن هدف با آنالیزهای مولکولی تأیید شد. لذا گیاه سلمک می‌تواند یک میزبان مناسب برای بیان سایر پروتئین‌های دارویی نو ترکیب با استفاده از این ناقل ویروسی و سایر ناقل‌های ویروسی باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش (گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس) به‌خاطر در اختیار قرار دادن ناقل ویروسی، از جناب آقای دکتر مهدی بهدانی و سرکار خانم دکتر فاطمه کاظمی لمعه‌دشت به‌خاطر در اختیار قرار دادن ژن هدف و آنتی‌بادی‌های مورد استفاده و از جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران به‌خاطر حمایت مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارم.

بیان ژن خارجی در گیاهان تراریخته و همچنین سیستم‌های بیان موقت استفاده می‌شود. زیرا یک پیشبرنده قوی است که در همه یا اکثر سلول‌های گونه‌های گیاهی بویژه دولپه‌ها فعال می‌باشد. با استفاده از پیشبرنده 35S تعدادی از پروتئین‌های دارویی از قبیل آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و فاکتورهای رشد در سطوح نسبتاً بالا در گیاهان تولید شده‌اند (۶). میزان بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از سیستم بیان موقت مبتنی بر ناقل ویروسی در گزارشات مختلف متفاوت بوده و بسته به نوع ناقل ویروسی، قدرت پیشبرنده ویروسی، توانایی حرکت سیستماتیک ناقل ویروسی، ثبات ژن هدف در ناقل و تناسب بین قطعه درجی و اندازه ژنوم ویروس متفاوت خواهد بود (۲۳). در این تحقیق ابتدا ژن گزارشگر GFP با استفاده از ناقل مبتنی بر ویروس ZYMV در گیاه سلمک بیان شد. با مشاهده بیان ژن گزارشگر در این گیاه با استفاده از مشاهدات میکروسکوپی و آنالیزهای مولکولی، در مرحله بعد ژن

منابع

- Buyel, J.F., E. Stöger, and L. Bortesi, 2021. Targeted genome editing of plants and plant cells for biomanufacturing. *Transgenic Research*, 30(4): p. 401-426.
- Dirisala, V.R., et al., 2017. Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. *Acta physiologiae plantarum*, 39(1): p. 1-9.
- Engvall, E. and P. Perlmann, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9): p. 871-874.
- Gecchele, E., et al., 2015. A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 97.
- Gerasimova, S., et al., 2016. Production of recombinant proteins in plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(1): p. 26-37.
- Gleba, Y., V. Klimyuk, and S. Marillonnet, 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current opinion in biotechnology*, 18(2): p. 134-141.
- Guy, C., et al., 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, 188(2): p. 265-270.
- Hefferon, K., 2017. Plant virus expression vectors: a powerhouse for global health. *Biomedicines*, 5(3): p. 44.
- Hiatt, A., R. Cafferkey, and K. Bowdish, 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342(6245): p. 76-78.
- Hsu, C.-H., et al., 2004. Oral administration of a mite allergen expressed by zucchini yellow mosaic virus in cucurbit species downregulates allergen-induced airway inflammation and IgE synthesis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 11: p. 1079-1085.
- Huang, Z., et al., 2006. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 24(14): p. 2506-2513.

- 12- Kazemi-Lomedasht, F., et al., 2015. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. *Molecular Immunology*, 65(1): p. 58-67.
- 13- Kopertekh, L. and J. Schiemann, 2019. Transient production of recombinant pharmaceutical proteins in plants: evolution and perspectives. *Current medicinal chemistry*, 26(3): p. 365-380.
- 14- Lai, H., et al., 2010. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6): p. 2419-2424.
- 15- Ma, S. and A. Wang, 2012. Molecular farming in plants: an overview. *Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects*, p. 1-20.
- 16- Muyldermans, S., et al., 2009. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary immunology and immunopathology*, 128(1-3): p. 178-183.
- 17- Obembe, O.O., et al., 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology advances*, 29(2): p. 210-222.
- 18- Park, K.Y. and S.J. Wi, 2016. Potential of plants to produce recombinant protein products. *Journal of Plant Biology*, 59(6): p. 559-568.
- 19- Sack, M., et al., 2015. The increasing value of plant-made proteins. *Current opinion in biotechnology*, 32: p. 163-170.
- 20- Schillberg, S. and R. Finern, 2021. Plant molecular farming for the production of valuable proteins-Critical evaluation of achievements and future challenges. *Journal of plant physiology*, 258: p. 153359.
- 21- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences*, 76(9): p. 4350-4354.
- 22- Tran, H.H., 2017. Developing a plant virus-based expression system for the expression of vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
- 23- Tremblay, R., et al., 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, 28(2): p. 214-221.
- 24- Tusé, D., T. Tu, and K.A. McDonald, 2014. Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *BioMed Research International*, 2014.
- 25- Xu, J., M. Towler, and P.J. Weathers, 2018. Platforms for plant-based protein production. *Bioprocessing of plant in vitro systems*, p. 509.
- 26- Yao, J., et al., 2015. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges. *International journal of molecular sciences*, 16(12): p. 28549-28565.

Transient expression of recombinant anti-VEGF protein based on viral vector (ZYMV) in *Chenopodium album*

Soleimanizadeh M.^{1*}, Jalali Javaran M.², Bagheri A.³ and Behdani⁴ A.

¹Dept. of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, I.R. of Iran.

²Dept. of Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

³Dept. of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

⁴Venom & Biotherapeutics Molecules Lab, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Transient expression through viral vectors has emerged as a preferred method for the production of plant recombinant protein. The short-term production of recombinant protein in this method, compared to time-consuming production of stable transgenic plants along with being cheaper and easier strategy pave the way for commercial production of recombinant proteins. In this research, Anti-Vascular endothelial growth factor (AntiVEGF) protein was produced in *Chenopodium album* plant using Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) virus-based transient expression method. Target plants were initially infected using a viral vector containing the GFP reporter gene (pZYMVGFP) to ensure the transgene expression. After the appearance of viral symptoms on plant leaves and also confirmation of plant infection by RT-PCR and dot blot methods, target gene cloning was performed in the pZYMVGFP virus vector. In the next step, the target plants were inoculated using a recombinant viral vector (pZYMVAntiVEGF) and the target gene expression was examined by RT-PCR at the transcription level and by Dot blot, Western blot and ELISA tests at translation level. Various molecular analysis confirms the recombinant AntiVEGF expression in this plant. Therefore, ZYMV viral-based transient expression system would be a suitable platform for recombinant proteins production in *Chenopodium album* plants.

Key words: Transient expression platform, *Chenopodium album* plant, Plant bioreactors, Molecular pharming, Angiogenesis