

استفاده از تشدیدکننده ترجمه ویروسی و سرکوبگر خاموشی ژن *2b* در ساخت ناقل دوتایی برای افزایش بیان پادگن حفاظتی و عامل کشنده باکتری مولد سیاه‌زخم

فریبا ابویی مهریزی^۱، علیرضا عباسی^۲، حسین هنری^۳ و هوشنگ علیزاده^{۴*}
 ۱، ۲ و ۴. دانشجوی دکترای اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشیار و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
 ۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۲)

چکیده

باکتری اسپورزای *Bacillus anthracis* عامل بیماری سیاه‌زخم (آنتراکس) است. سه جزء پروتئین شامل پادگن (آنتی‌ژن) حفاظتی (PA)، عامل کشنده (LF) و عامل آماس (EF) عامل‌های بیماری‌زای این باکتری به شمار می‌آیند. به منظور تولید واکسن بر پایه گیاه، پروتئین امتزاجی دمن چهار PA و دمن یک LF، با سایت برش فورینی به زیر واحد B سم *Vibrio cholera* (CTB) به‌عنوان محرک سامانه ایمنی متصل شد. همچنین در این تحقیق برای ساخت ناقل دوتایی از خاصیت ناحیه ۳' و ۵' غیرترجمه شونده ویروس موزاییک لوییا چشم‌بلبلی به‌عنوان تشدیدکننده ترجمه و از ژن بازدارنده خاموشی ویروس موزاییک خیار (*2b*) استفاده و ترکیب پادگن ساخته‌شده به گیاه منتقل شد. انتقال موقت سازه‌ها با کمک آگروباکتریوم به توتون و کاهو انجام و بیان موقت در سطح ترانسکریپتوم از روش RT-PCR و در سطح پروتئوم از روش آزمون الایزا تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، بیان موقت، CPMV، CMV.

The use of viral translation enhancer and suppressor of gene silencing 2b to construct binary vector for high expression of protective antigen and lethal factor of the bacteria that cause anthrax

Fariba Abooei Mehrizi¹, Alireza Abbasi², Hosein Honari³ and Houshang Alizadeh^{4*}

1. Ph.D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

(Received: Jan. 4, 2016 - Accepted: Jan. 12, 2016)

ABSTRACT

Bacillus anthracis as a spore-forming bacterium is the causative agent for anthrax. Three proteins from *B. anthracis* including protective antigen (PA), lethal factor (LF) and edema factor (EF) are causative factors of this bacteria. To produce plant-based vaccine, fusion protein of PA 4 domain and LF 1 domain via furin cleavage site joined to subunit B *Vibrio cholera* toxin (CTB) as an inducer of immune system. In this research we used 3' and modified 5' untranslated regions of cowpea mosaic virus (CPMV) as translation enhancer and silencing inhibitor gene 2b of cucumber mosaic virus (CMV) to construct binary vector and transfer gene. Transient expression of tobacco and lettuce performed via *agrobacterium* and transient expression was confirmed at the level of transcriptome and proteome through RT-PCR and ELISA assay, respectively.

Keywords: CMV, CPMV, ELISA, transient expression.

مقدمه

باکتری *Bacillus anthracis* مولد اسپور و عامل بیماری عفونی جانوری سیاه‌زخم (آنتراکس) است. این بیماری افزون بر دام که موجب همه‌گیری و در پی آن مرگ‌ومیر فراوان آن‌ها می‌شود در انسان نیز در اثر تماس با حیوانات آلوده یا فرآورده‌های آن‌ها ایجاد بیماری می‌کند (Edwards et al., 2006). افزون بر این سیاه‌زخم در رده A بیماری‌های خطرناک قرار دارد و امروزه به‌عنوان یک جنگ‌افزار قوی در قالب تهدیدگر زیستی (بیوتروریسم) مطرح است (Weller, 2006). این بیماری ممکن است به‌صورت سیاه‌زخم پوستی، گوارشی یا ریوی تظاهر کند، اما شایع‌ترین چهره بالینی آن را سیاه‌زخم پوستی تشکیل می‌دهد (Brey, 2005). سویه‌های کپسولدار بیماریزا دو سم متشکل از سه پروتئین را تولید می‌کنند. پادگن (آنتی‌ژن) حفاظتی (PA با ۸۳ کیلودالتون)، عامل کشنده LF با ۸۵ کیلودالتون) و عامل آماس (EF با ۸۹ کیلودالتون) که به ترتیب توسط ژن‌های *lef*, *pag* و *cya* موجود روی پلاسمید pXO1 باکتری کد می‌شوند (Brossier et al., 2000; Edwards et al., 2006). هیچ‌کدام از این پروتئین‌ها به‌تنهایی بیماریزا نیستند بلکه به‌صورت ترکیبی عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، سم کشنده LT ترکیبی از PA و LF بوده که موجب مرگ جانوران پس از تزریق وریدی می‌شود و سم آماس ET که ترکیب PA و EF است در محل تزریق سبب آماس می‌شود (Brossier et al., 2000; Mock & Fouet, 2001; Bhatnagar & Batra, 2001). در اغلب واکنش‌های تهیه شده، پادگن حفاظتی (PA) عامل اصلی ایمنی‌زایی به‌شمار می‌آید و در غیاب LF و EF به‌تنهایی قادر به ایجاد ایمنی‌زایی در موجودهای زنده است (Koya et al., 2005; Watson et al., 2004). باین‌وجود ارتقای قابلیت واکنش از راه افزودن دیگر اجزای باکتری بدون تأثیر کشندگی آن، گام مهمی در تکمیل واکنش سیاه‌زخم به‌شمار می‌آید. در مورد استفاده از ترکیب امتزاجی LFn-PA، Wu (2010) مطرح کرد که این ترکیب همچنان می‌تواند عملکرد خود را در تحریک سامانه ایمنی حفظ کند (Wu, 2010).

(2010). در تولید پروتئین‌هایی که خاصیت واکنش دارند، قابلیت تحریک سامانه ایمنی اهمیت دارد. زیر واحد B سم موجود در باکتری *Vibrio cholera* که به‌اختصار CTB نامیده می‌شود به‌عنوان یک جزء تأثیرگذار در تحریک سامانه مخاطی شناخته می‌شود. پروتئین امتزاج یافته با CTB پس از ورود به نظام گوارشی، امکان انتقال پروتئین همراه به یاخته را فراهم می‌سازد (Ruhlman et al., 2007). در سامانه‌های بیان هسته‌ای پروتئین‌های نوترکیب، میزان کم بیان پروتئین نوترکیب از نقاط ضعف به‌شمار می‌آید و اکنون تلاش زیادی برای افزایش سطح بیان پروتئین‌های تولیدشده در گیاه صورت گرفته است که بخشی از آن از روش افزایش کارایی سامانه سازه‌های بیانی همچون سازه‌های مبتنی بر ویروس‌ها بوده است (Marillonnet et al., 2005). همچنین می‌توان از سامانه‌های بهره برد که بدون استفاده از سامانه همانندساز ویروس به افزایش ترجمه پروتئین نوترکیب منجر شود (Sinsbury et al., 2009) از خاصیت UTRهای ۳' و ۵' RNA2 ویروس موزایک لوبیا چشم‌بلبلی (CPMV) برای ارائه یک سامانه بیانی استفاده کردند. ویروس CPMV از اعضای جنس *Comovirus* از خانواده *Comoviridae* است. این ویروس شماری از گونه‌های لگوم را آلوده می‌کند و به‌طور خاص تیترا بالایی در میزبان طبیعی خود لوبیا چشم‌بلبلی *Vigna unguiculata* دارد (Sinsbury et al., 2009). برای افزایش بیان پروتئین Sinsbury et al. (2009) از 5'UTR تغییر یافته‌ای در قالب ناقل pEAQ استفاده کردند که منجر به افزایش شایان توجهی در تولید پروتئین نوترکیب مورد بررسی در انتقال موقت شد (Sinsbury et al., 2009). بر همین پایه در این تحقیق از 3' و 5' mRNA UTR ویروس CPMV در قالب ناقل pVUT استفاده شد. افزون بر این یکی از عوامل مداخله‌کننده در مسیر افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب، سامانه RNAi¹ گیاه است که به‌عنوان یک راهکار دفاعی برای گیاه عمل می‌کند (Choi et al., 2008). در مقابل،

1. RNA interference (RNAi)

پروتئین نوترکیب با استفاده از بازدارنده خاموشی ژن 2b، از این بازدارنده در قالب یکی از سازه‌ها استفاده شد. سازه‌های ساخته شده به روش تزریق آگروباکتریوم (آگرواینفیلتراسیون) به توتون و کاهو انتقال یافت. بیان پروتئین نوترکیب یادشده در سطح RNA و پروتئین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گیاه توتون رقم سامسون و همچنین کاهوی تجاری برای انتقال موقت و بررسی بیان پادگن‌ها استفاده شد. بذره‌های توتون در محیط MS در دوره ۸/۱۶ روشنایی/ تاریکی قرار گرفتند. برای همسانه‌سازی از باکتری *Escherichia coli* سویه *DH5a* و برای انتقال سازه‌ها به گیاه از *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 استفاده شد. پادزی (آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کانامایسین و ریفامپیسین به ترتیب با غلظت ۱۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای همسانه‌سازی و ساخت سازه‌ها استفاده شدند. برای افزایش قطعه‌ها از آنزیم‌های *Taq DNA polymerase* (Sinaclon) و *Pfu DNA polymerase* (Fermentas) استفاده شد. آنزیم‌های برشی *BcuI*، *EcoRI*، *XhoI*، *BamHI*، *BstEII* و *NcoI* از شرکت فرمنتاز تهیه و بنا بر دستورکار شرکت به کار گرفته شدند. برای همسانه‌سازی اولیه قطعه‌های ژن از ناقل pBluescript (Stratagene) II SK و ناقل تی pTG19 (Vivantis) استفاده شد. توالی 3'UTR و 5'UTR ویروس CPMV (gi|257196392) در شرکت GeneRay چین و در قالب ناقل pVUT معرفی شد. ترکیب پادگن مورد نظر پس از قرار گرفتن در سازه حد واسط pVUT در دو حالت همراه با عامل بازدارنده 2b و بدون 2b به ناقل دوتایی pCambia1304 منتقل شد.

انتقال سازه ژنی به گیاه

سازه‌های ژنی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 منتقل شدند (Wang, 2015). برای انتقال به گیاه، محیط برای تزریق آگروباکتریوم توتون بنابر دستورکار Voinnet *et al.* (2003) و محیط برای

ویروس نیز ایزاری برای سرکوب این سامانه خاموشی در گیاه دارد (Qu & Morris, 2005). یکی از انواع این بازدارنده‌ها ژن 2b از ویروس موزاییک خیار است که می‌تواند عاملی در بررسی امکان افزایش بیان پروتئین نوترکیب به شمار آید (Qu & Morris, 2005; Choi *et al.*, 2008). عامل بازدارنده 2b به‌عنوان مهارکننده خاموشی ژن پس از رونویسی^۱ (PTGS) شناخته شده است و چون پدیده PTGS به‌عنوان یکی از محدودیت‌های تولید انبوه پروتئین نوترکیب شناخته شده است استفاده از بازدارنده‌هایی مانند 2b به‌عنوان عاملی در جهت غلبه بر این پدیده و کمک به افزایش بیان پروتئین نوترکیب در موارد چندی بررسی شده است (Choi *et al.*, 2008). در بررسی‌های اولیه‌ای که با استفاده از پروتئین بازدارنده 2b انجام شد از آن به‌عنوان بازدارنده ضعیف سامانه خاموشی یاد شد اما به تدریج بررسی‌ها نشان داد که توانایی بازدارنده 2b تا حد زیادی به سویه CMV که از آن به‌دست‌آمده وابسته است، همچنین سازوکار عمل 2b دقیق شناخته نشده اما به‌نظر می‌رسد که متفاوت از عملکرد بازدارنده‌هایی همچون p19 و P1/HcPro باشد (Goto *et al.*, 2007). با توجه به اینکه استفاده از سامانه‌های گیاهی اقتصادی‌تر از تولید پروتئین نوترکیب در دیگر سامانه‌هاست، می‌توان تولید پروتئین‌های نوترکیب را در گیاه به‌گونه‌ای مدیریت کرد که پروتئین‌های ساخت (سنتز) شده به اندامک‌های یاخته‌ای هدایت و یا حتی به‌طور مستقیم در اندامک‌های خاصی (مانند کلروپلاست) بیان شوند. همچنین می‌توان بافت یا اندام خاصی از گیاه را که حاوی پروتئین نوترکیب مورد نظر است، به‌صورت خوراکی مصرف کرد. به کمک تولید انبوه در گیاهان، خطرهای ناشی از آلودگی با عامل‌های بیماری‌زای انسان به‌ویژه بیماری‌های مشترک نیز کاهش می‌یابد (Daniell *et al.*, 2001). امروزه گیاهان به منظور تولید واکسن به‌صورت یک سامانه بیانی ژن مورد توجه محققان قرار دارند. در این تحقیق، پروتئینی شامل دمین چهار پادگن حفاظتی (PA) و دمین یک عامل کشنده (LF) از راه توالی برش فورینی به عامل CTB متصل شد. همچنین برای بررسی امکان افزایش

1. Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS)

استخراج پروتئین به منظور آزمون الایزا

از نمونه‌های انتقال موقت استخراج پروتئین انجام (Guy *et al.*, 1992) و بر پایه روش بردفورد تعیین غلظت پروتئین‌ها صورت گرفت (Bradford, 1976). آزمون الایزا با استفاده از پروتئین به دست آمده از نمونه‌های انتقال موقت کاهو و توتون در سه تکرار زیستی و همچنین دو تکرار فنی انجام شد. برای رسم نمودار استاندارد به منظور محاسبه کمی پادگن تولیدشده در بیان موقت توتون و کاهو، از پروتئین خالص FPL که در آن ترکیب امتزاجی PA::LF به واسطه سایت برش فورینی به CTB متصل است استفاده شد. در این آزمون نمونه‌های پروتئین کل با نگهداری شبانه در دمای ۴ درجه سلسیوس به همراه بافر پوشش‌دهنده کربنات در چاهک پلیت الایزا تثبیت شدند. برای مسدود کردن نواحی بدون پروتئین، از محلول بلوکه‌کننده ۳ درصد شیرخشک بدون چربی استفاده شد. پس از بلوکه کردن، آنتی‌سرم PA به نسبت ۱:۳۰۰ در محلول بلوکه‌کننده به چاهک‌ها اضافه و سه مرتبه مرحله شستشو هر بار به مدت سه دقیقه با بافر PBS-تویین انجام شد. اضافه کردن کانژوگه HRP در بافر بلوکه به پلیت انجام و سه مرتبه مرحله شستشو هر بار به مدت سه دقیقه با بافر PBS-توین صورت گرفت. سپس محلول بستره (سوبسترا) TMB به چاهک‌ها اضافه و پس از حدود ده دقیقه با اضافه کردن محلول 1N HCl، جذب نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Engvall & Perlmann, 1971).

تزریق آگروباکتریوم کاهو بنا بر دستورکار Kapila *et al.* (1997) آماده شد. پس از دو ساعت نگهداری آگروباکتریوم در محیط‌های آماده تزریق، انتقال به برگ‌های توتون و کاهو در خلأ انجام شد. از محیط‌های تزریق نمونه‌های برگ توتون و کاهو با آگروباکتریوم بدون سازه، به‌عنوان کنترل در این تحقیق استفاده شد. برگ‌ها به مدت سه روز در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از آن نمونه‌های گیاهی در نیتروژن مایع فریز و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند.

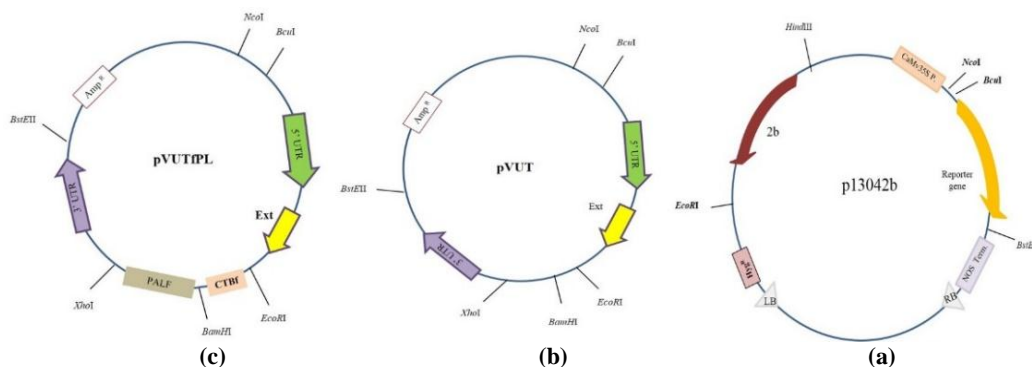
استخراج RNA، ساخت cDNA و شرایط واکنش PCR

برای همسانه‌سازی ژن بازدارنده خاموشی (2b) از توتون آلوده به ویروس موزاییک خیار CMV¹ استفاده شد. همچنین برای ارزیابی نمونه‌های انتقال موقت توتون و کاهو در سطح RNA، استخراج از نمونه‌های گیاهی در سه تکرار زیستی با استفاده از کیت استخراج RNA بنابر دستورکار شرکت توپاز انجام شد. تیمار با DNaseI و ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز و بنابر دستورکار آن شرکت انجام گرفت. برای کنترل نبود آلودگی RNA استخراجی با DNA، واکنش PCR روی RNA تیمار شده با DNaseI به‌عنوان الگو و با استفاده از آغازگرهای 2b انجام شد (شکل ۹-a). واکنش‌های PCR با غلظت نهایی 0.2 mM dNTP، 1.6 mM MgCl₂، 0.4 آغازگر مستقیم و معکوس و ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده بنا بر جدول ۱ بوده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در ساخت سازه و ارزیابی بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب پادگن حفاظتی و عامل کشنده باکتری مولد سیاه‌زخم.

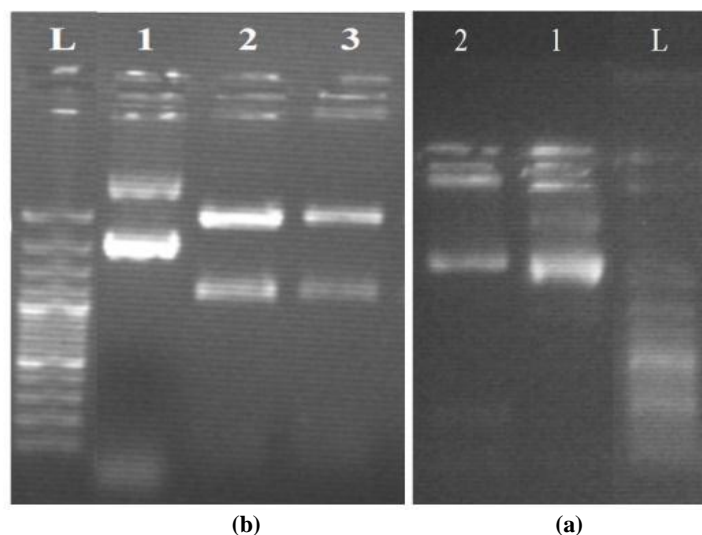
Table 1. Primer sequences used in vectors construction & transient expression analysis of Protective Antigen and Lethal Factor of *Bacillus anthracis* recombinant proteins.

Primer name	Primer sequence
CTB For	5'CCATGGGAATTCACCTCCTCAAAAATATTACTGATTTGTG
CTB furin Rev	5'AAGGATCCACGACGAGCAGGAGTACCATAGCCATAGAAATAGC
LFD01 Rev	5'CGGGTACCCTCGAGTAGATTTATTTCTTGTTCGTTAAAT
new2b For	5'AAGTCGACTAATCTAGATAAAACAATGGAATTGAACGTAGGTGCAAT
new2b Rev	5'AACTGCAGGAGCTCTTAGAAAGCACCTTCCGCCATT



شکل ۴. ناقل‌های مورد استفاده در این تحقیق. (a) ناقل p13042b که با اضافه کردن ژن 2b در ناقل دوتایی pCambia 1304 به دست آمد. (b) ناقل pVUT حاوی تشدیدکننده ترجمه UTR از CPMV. (c) سازه حد واسط pVUTfPL شامل پادگن PA::LF به همراه CTB که با قرار گرفتن بین UTRهای ناقل pVUT به دست آمد.

Figure 4. Vectors used in this study. a) p13042b vector derived by insertion of 2b gene into the MCS of pCambia 1304 binary vector. b) pVUT vector harboring elements of translational enhancer UTRs from CPMV. c) pVUTfPL intermediate construct containing PALF::furin cleavage site::CTB flanked by UTRs.



شکل ۵. درج پادگن PA::LF بین نواحی UTR در ناقل pVUT. (a) شماره ۱ پلاسمید pVUTfPA و شماره ۲ برش سازه حد واسط pVUTfPA با ترکیب آنزیم BamHI/XhoI که با هدف جداسازی ناقل از روی ژل انجام شد. (b) شماره ۱ ناقل تی حاوی پادگن PA::LF، شماره‌های ۲ و ۳ ناقل تی حاوی پادگن PA::LF که تحت برش آنزیمی BamHI/XhoI قرار گرفت و قطعه PA::LF به طول ۱۲۰۶ جفت باز از روی ژل جداسازی شد. L نشانگر اندازه مولکولی 100 bp Plus DNA Ladder Fermentas (نمایش روی ژل آگارز ۱ درصد).

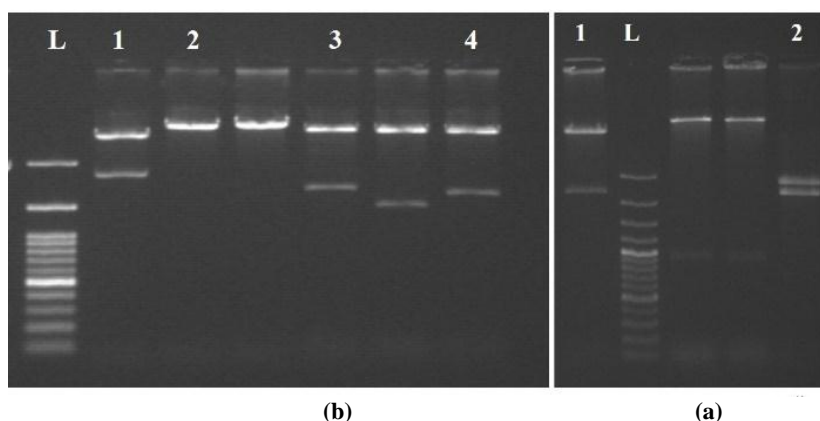
Figure 5. Insertion of PA::LF antigen between UTRs in pVUT. a) Lane 1, undigested pVUTfPA plasmid and lane 2 enzymatic digestion of pVUTfPA with BamHI/XhoI to linearize vector. b) Lane 1, T-Vector harboring PA::LF antigen (undigested plasmid as control), Lane 2 and 3 T-Vectors harboring PA::LF antigen digested with BamHI/XhoI to obtain a 1206 bp PA::LF fragment. L Molecular size marker (100 bp Plus DNA Ladder) Fermentas.

استفاده شد. به این منظور هر دو سازه pVUTfPL و p13042bfLF با ترکیب آنزیم‌های BamHI/BstEII هضم شدند (شکل ۷). در شکل ۸ الگوی ساختاری هر دو سازه p1304fPL و p13042bfPL ارائه شده است.

ساخت سازه p13042bfPL

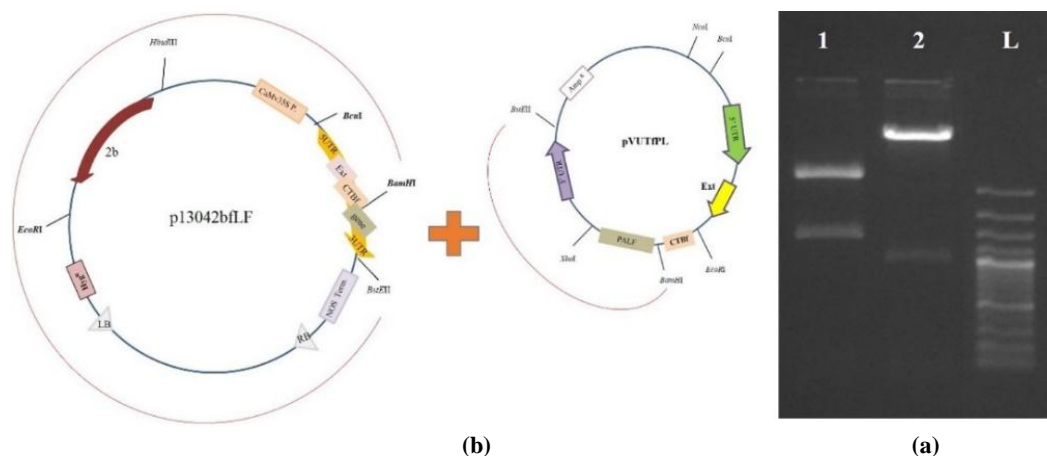
برای انتقال پادگن PA::LF به همراه UTRها به ناقل p13042b از سازه حد واسطی با نام p13042bfLF

۱. سازه p13042bfLF در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران ساخته شده است و به عنوان سازه حد واسط برای ایجاد امکان درج قطعه مورد نظر در این پژوهش استفاده شد.



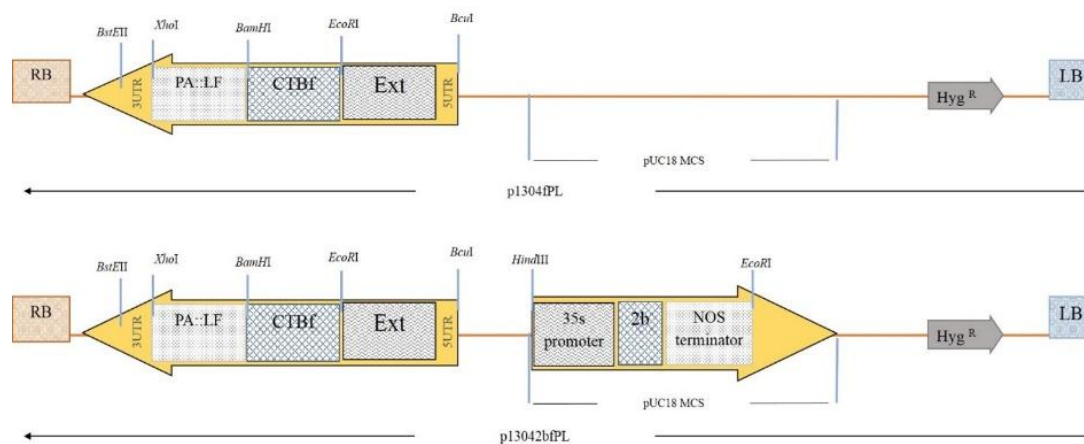
شکل ۶. تأیید سازه p1304fPL (a) شماره ۱ برش ناقل pCAMBIA1304 با آنزیمهای *NcoI/BstEII* برای جداسازی ناقل خطی شده و شماره ۲ برش سازه حد واسط pVUTfPL با آنزیمهای *NcoI/BstEII* برای جداسازی قطعه ۲۴۹۲ جفت بازی شامل پادگن PA::LF، CTB، پپتید راهنمای اکستنسین و UTRها. (b) تأیید سازه p1304fPL با هضم آنزیمی. شماره‌های ۱ و ۲ به ترتیب برش ناقل pCAMBIA1304 (به‌عنوان کنترل) و p1304fPL (سازه ساخته‌شده) با *NheI* است. شماره‌های ۳ و ۴ به ترتیب pCAMBIA1304 و p1304fPL با برش آنزیمهای *NcoI/BstEII* را نشان می‌دهد که به ترتیب قطعه ۲۵۷۸ و ۲۴۹۲ جفت بازی از ناقل جدا می‌شود. L نشانگر اندازه مولکولی 100 bp Plus DNA Ladder Fermentas. (نمایش روی ژل آگارز ۱ درصد)

Figure 6. confirmation of p1304fPL construct. a) Lane 1, Linearize of pCAMBIA 1304 binary vector through enzymatic digestion with *NcoI/BstEII* and lane 2, digestion of pVUTfPL with *NcoI/BstEII* to obtain a 2492 bp fragment of PA::LF, CTB, Extensin signal peptide and UTRs. b) Confirmation of p1304fPL construct by enzymatic digestion. Lane 1 and 2 represent pCAMBIA 1304 binary vector (as control) and p1304fPL digested with *NheI* enzyme, respectively. Lane 3 and 4 represent pCAMBIA 1304 binary vector and p1304fPL digested with *NcoI/BstEII* enzymes that leading to have a 2578 bp and 2492 bp fragments respectively. L Molecular size marker (100 bp Plus DNA Ladder) Fermentas.



شکل ۷. مراحل ساخت سازه p13042bfPL (a) شماره ۱ برش آنزیمی سازه حد واسط pVUTfPL با هضم آنزیمی با *BamHI/BstEII* با هدف جداسازی قطعه ۱۴۶۴ جفت بازی شامل پادگن PA::LF و 3'UTR. شماره ۲ هضم آنزیمی سازه p13042bfLF با *BamHI/BstEII* با هدف جداسازی ناقل از روی ژل. (b) تصویر نمای کلی برش با آنزیمهای *BamHI/BstEII* روی دو سازه pVUTfPL و p13042bfLF. L نشانگر اندازه مولکولی 100 bp plus DNA Ladder Fermentas. (نمایش روی ژل آگارز ۱ درصد).

Figure 7. Steps to construct p13042bfPL vector. a) Lane 1, enzymatic digestion of intermediate pVUTfPL construct with *BamHI/BstEII* to obtain a 1464 bp fragment of PA::LF plus 3'UTR. Lane 2, enzymatic digestion of p13042bfLF with *BamHI/BstEII* in order to linearize vector. b) Schematic representation of digestion of pVUTfPL and p13042bfLF with *BamHI/BstEII*. L Molecular size marker (100 bp plus DNA Ladder) Fermentas.



شکل ۸. الگوی سازه p1304fPL و p13042bfPL. ناحیه T-DNA سازه‌های p1304fPL و p13042bfPL شامل پادگن PA::LF و اجوان CTBf در ناحیه بین 3'UTR و 5'UTR قرار گرفته است. تنها تفاوت سازه p13042bfPL با سازه p1304fPL وجود بازدارنده خاموشی ژن 2b است. ترکیب ژنی هر دو سازه تحت راهانداز CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS قرار دارند.

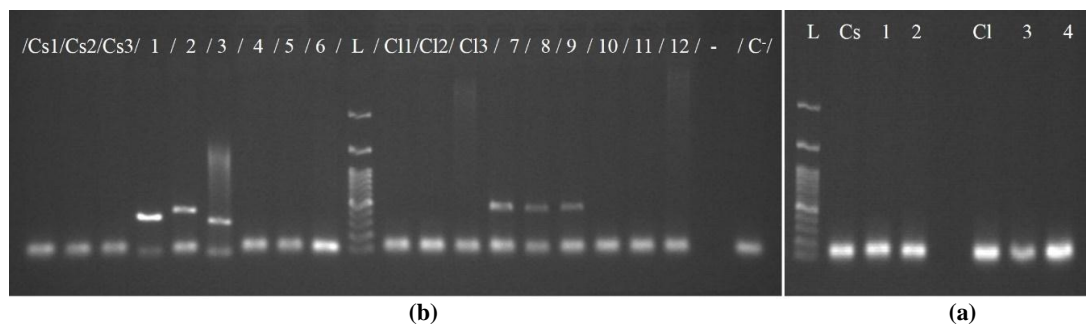
Figure 8. Schematic representation of p1304fPL and p13042bfPL. T-DNA regions of p1304fPL and p13042bfPL including Extensin signal peptide, PA::LF antigen and CTB adjuvant flanked by UTRs have been figured out. In both expression cassettes the gene is under the control of CaMV 35S promoter and NOS terminator.

۷۲°C بسته به طول قطعه از ۲۵ تا ۹۰ ثانیه و بسط نهایی DNA در دمای ۷۲°C به مدت ده دقیقه انجام شد.

برای بررسی بیشتر نمونه‌های انتقال موقت و مقایسه میزان پادگن تولیدی در انتقال موقت توتون و کاهو، آزمون الایزا انجام شد. بنا بر نتیجه به‌دست‌آمده از این آزمون، میزان پادگن تولیدشده در سازه‌های دارای 2b و سازه‌های بدون 2b در توتون و کاهو همانند بود، اما میزان تولید پادگن در توتون بیشتر از کاهو برآورد شد. شکل ۱۲ مقایسه بین میزان جذب و میزان پادگن در هر دو گیاه توتون و کاهو برای هر دو سازه و همچنین در نمونه شاهد ارائه شده است. هر چند بازدارنده 2b به‌عنوان عاملی در جهت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب مطرح شده است (Choi *et al.*, 2008)، اما نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش‌های مختلف همگی افزایش بیان پروتئین نوترکیب را در هنگام استفاده از بازدارنده سامانه خاموشی ژن در میزان تأیید نکرده‌اند. در بررسی Arzola *et al.* (2011) به منظور بررسی و مقایسه تأثیر بازدارنده‌های RNAi در هنگام انتقال موقت سازه‌های ژنی در گیاه، مشاهده شد که بازدارنده‌های مورد بررسی از جمله P1، P19 و 2b تأثیر یکسانی در میزان بیان پروتئین نوترکیب ندارند (Arzola *et al.*, 2011).

بررسی بیان ژن به‌دست‌آمده از دو سازه p1304fPL و p13042bfPL در سطح RNA

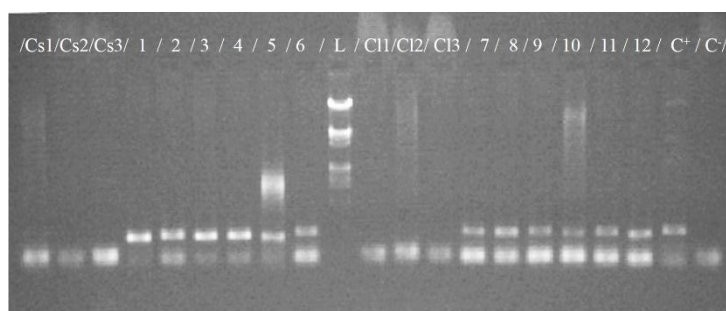
به منظور بررسی بیان ژن‌ها برای انتقال موقت دو سازه p1304fPL و p13042bfPL از RT-PCR استفاده شد. در شکل ۹-b واکنش PCR برای انتقال موقت هر دو سازه با استفاده از آغازگرهای 2b روی سه تکرار زیستی برای توتون، کاهو و نمونه‌های شاهد در کنار کنترل مثبت (سازه ژنی) و منفی (نمونه برگ‌های ناترازیخته) انجام شد. چنانچه در تصویر ژل مشاهده می‌شود باند مربوط به قطعه 2b تنها در سه تکرار زیستی توتون و سه تکرار زیستی کاهو مربوط به سازه p13042bfPL مشاهده می‌شود و کنترل منفی شامل نمونه‌های شاهد و نمونه بدون الگو، نواری (باندی) نشان ندادند. همچنین واکنش RT-PCR با آغازگرهای CTB و آغازگرهای CTBf و LF نیز روی نمونه‌های تکراردار توتون و کاهو انجام شد که نتیجه آن در شکل‌های ۱۰ و ۱۱ ارائه شده است. در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز انجام شده در این بخش، واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت سه دقیقه و ۳۴ چرخه (سیکل) گرمایی شامل مرحله واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت چهار ثانیه، دمای اتصال آغازگر با توجه به نوع آغازگر از ۵۸/۵°C- به مدت سی تا چهار ثانیه و بسط DNA در دمای



شکل ۹. نتیجه RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن 2b به منظور تأیید رونویسی از روی توالی کدکننده 2b روی نمونه‌های توتون و کاهو پس از تزریق آگروباکتریوم. (a) ژل آگارز ۱ درصد مربوط به واکنش PCR با آغازگرهای 2b روی RNAهای تیمار شده با *DNaseI* برای انتقال موقت شامل Cs شاهد توتون، شماره‌های ۱ و ۲ به ترتیب انتقال موقت توتون با سازه p13042bfPL و انتقال موقت با سازه p1304fPL، شماره‌های ۳ و ۴ به ترتیب انتقال موقت کاهو با سازه p13042bfPL و انتقال موقت با سازه p1304fPL. نمونه‌های شاهد شامل نمونه برگ‌گی تزریق شده با آگروباکتریوم بدون سازه است. (b) تصویر ژل آگارز مربوط به واکنش PCR با آغازگرهای 2b نشانه Cs شاهد توتون و Cl شاهد کاهو در سه تکرار زیستی، نشانه C⁻ کنترل منفی (بدون الگو)، شماره‌های ۳-۱ و ۹-۷ به ترتیب تکرارهای زیستی انتقال موقت توتون و کاهو با سازه p13042bfPL و شماره‌های ۶-۴ و ۱۲-۱۰ به ترتیب تکرارهای زیستی انتقال موقت توتون و کاهو با سازه p1304fPL هستند. قطعه مورد انتظار ۳۷۰ جفت باز است. L نشانگر اندازه مولکولی 100 bp Plus DNA Ladder Sinaclon.

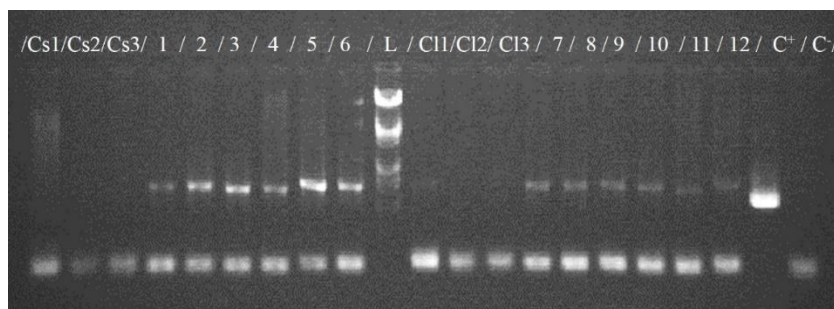
DNA Ladder Sinaclon

Figure 9. Transcriptional confirmation of 2b coding sequence by RT-PCR on the agro-infiltrated tobacco and lettuce leaves using specific 2b primers. a) PCR amplification on total RNA treated with *DNaseI* as template (to analysis DNA contamination of total RNA) using 2b primers. Cs infiltrated tobacco leaves (with *agrobacterium* without plasmid), lane 1 and 2, infiltrated tobacco leaves with p13042bfPL and p1304fPL, respectively. Cl infiltrated lettuce leaves (with *agrobacterium* without plasmid), lane 3 and 4, infiltrated lettuce leaves with p13042bfPL and p1304fPL, respectively. b) RT-PCR amplification of a 370 bp fragment with 2b primers. Cs infiltrated tobacco leaves (with *agrobacterium* without plasmid) and Cl infiltrated lettuce leaves (with *agrobacterium* without plasmid) in three biological replicates, C⁻ negative control (without template), lane 1-3 and 7-9 indicate three biological replicates of infiltrated leaves with p13042bfPL for tobacco and lettuce, respectively. Lane 4-6 and 10-12 indicate three biological replicates of infiltrated leaves with p1304fPL for tobacco and lettuce, respectively. The expected size of amplified fragment is 370 bp in length. L Molecular size marker (100 bp Plus DNA Ladder) Sinaclon.



شکل ۱۰. تأیید رونویسی از روی توالی کدکننده CTB به طول ۳۵۲ جفت باز از راه واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی CTB روی نمونه‌های برگ‌گی توتون و کاهو پس از تزریق آگروباکتریوم؛ Cs شاهد توتون (نمونه‌های برگ‌گی تزریق شده با آگروباکتریوم بدون سازه) و Cl شاهد کاهو (نمونه‌های برگ‌گی تزریق شده با آگروباکتریوم بدون سازه) در سه تکرار زیستی، C⁻ کنترل منفی (بدون الگو)، C⁺ کنترل مثبت (سازه pVUTfPL)، شماره‌های ۱ تا ۳ و ۴ تا ۶ به ترتیب نمونه‌های انتقال موقت توتون با سازه‌های p1304fPL و p13042bfPL و شماره‌های ۷ تا ۹ و ۱۰ تا ۱۲ به ترتیب نمونه‌های انتقال موقت کاهو با سازه‌های p1304fPL و p13042bfPL. L: نشانگر اندازه مولکولی Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker Fermentas (نمایش روی ژل آگارز ۱ درصد).

Figure 10. Transcriptional confirmation of CTB coding sequence of 352 bp fragment using specific CTB primers through RT-PCR amplification on agro-infiltrated tobacco and lettuce leaves. Cs infiltrated tobacco leaves (with *agrobacterium* without plasmid) and Cl infiltrated lettuce leaves (with *agrobacterium* without plasmid) in three replicates as control. C⁻ Negative control (without template), C⁺ Positive control (pVUTfPL as template), lane 1-3 and 4-6, three biological replicates of infiltrated tobacco leaves with p1304fPL and p13042bfPL, respectively. Lane 7-9 and 10-12, three biological replicates of infiltrated lettuce leaves with p1304fPL and p13042bfPL, respectively. L Molecular size marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker) Fermentas.



شکل ۱۱. تأیید رونویسی از روی توالی کدکننده CTB و قسمت LF از پادگن PA::LF به طول ۱۱۲۳ جفت باز با آغازگرهای مستقیم CTB و معکوس LF از راه RT-PCR روی نمونه‌های توتون و کاهو پس از تزریق آگروباکتریوم. نشانه Cs شاهد توتون و Cl شاهد کاهو در سه تکرار زیستی، نشانه C⁻ کنترل منفی (بدون الگو)، نشانه C⁺ کنترل مثبت (سازه pVUTfPL)، شماره‌های ۱ تا ۳ و ۴ تا ۶ سه تکرار زیستی از نمونه‌های انتقال موقت توتون به ترتیب با سازه‌های p1304fPL و p13042bfPL. شماره‌های ۷ تا ۹ و ۱۰ تا ۱۲ سه تکرار زیستی از نمونه‌های انتقال موقت کاهو به ترتیب با سازه‌های p1304fPL و p13042bfPL. L نشانگر اندازه مولکولی Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 Fermentas (نمایش روی ژل آگارز ۱ درصد).

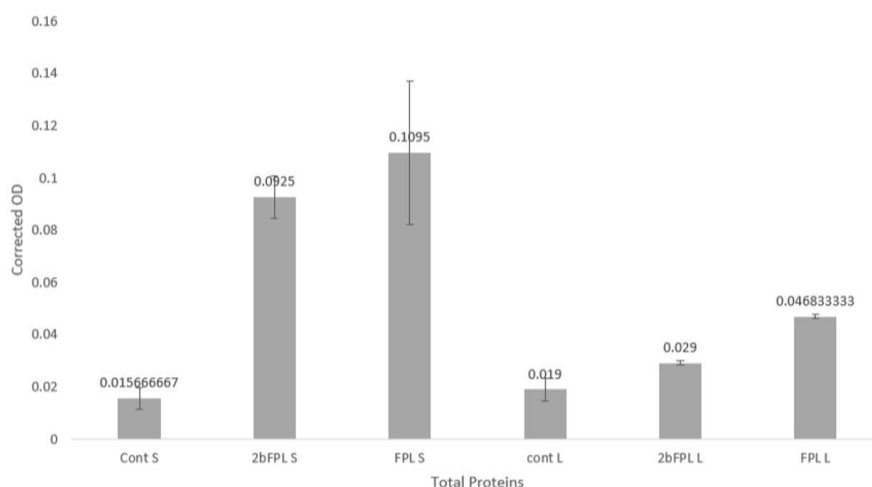
Figure 11. RT-PCR amplification of a 1123 bp of CTB coding sequence and LF fragment using CTB forward primer and LF reverse primer on agro-infiltrated tobacco and lettuce leaves. Cs tobacco control (infiltrated tobacco leaves with *agrobacterium* without plasmid) and Cl lettuce control (infiltrated lettuce leaves with *agrobacterium* without plasmid) each in three biological replicates. C⁻ Negative control (without template), C⁺ Positive control (pVUTfPL as template). Lane 1-3 and 4-6, three biological replicates of infiltrated tobacco leaves by p1304fPL and p13042bfPL, respectively. Lane 7-9 and 10-12, three biological replicates of infiltrated lettuce leaves by p1304fPL and p13042bfPL, respectively. L Molecular size marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3) Fermentas.

انجام انتقال موقت انجام شد تأثیر بازدارنده 2b روی تولید پروتئین نوترکیب آشکار نبود. بر پایه مرور منابع، چنین مطرح شده است سویه‌ای که ژن 2b از آن به دست آمده است در شدت بازدارندگی آن اثر دارد. به عبارت دیگر ژن‌های 2b سویه‌های مختلف ویروس، توانایی متفاوتی در بازدارندگی PTGS دارند (Goto *et al.*, 2007). افزون بر این در سازه‌های مورد استفاده در این پژوهش، از خاصیت عامل‌های تشدیدکننده ترجمه UTR از CPMV استفاده شد که انتظار می‌رود تأثیر مثبتی در میزان تولید پروتئین نوترکیب داشته باشد (Sinsbury *et al.*, 2009)، بنابراین این احتمال وجود دارد که تأثیر افزایشی تشدیدکننده‌های ترجمه سبب نمود نداشتن افزایش تولید پروتئین به دست آمده از وجود بازدارنده 2b شده باشد. در آزمون الایزای روی نمونه‌های برگی توتون و کاهو، درصد پادگن‌های تولیدشده با استفاده از نمودار استاندارد برآورد شد. به منظور ترسیم نمودار استاندارد از پروتئین خالص PA::LF متصل به CTB در غلظت‌های مختلف استفاده شد و بر پایه رابطه غلظت پادگن خالص و میزان جذب به دست آمده از نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر، نمودار استاندارد و معادله خط

در سامانه انتقال موقت عامل‌های مختلفی از جمله شمار روز پس از تزریق آگروباکتریوم تا زمان نمونه‌برداری بر میزان بیان پروتئین نوترکیب تأثیر دارد، بنابراین در دو تا سه روز پس از تزریق آگروباکتریوم بیشترین بیان پروتئین مشاهده شده و پس از آن کاهش می‌یابد (Choi *et al.*, 2008)، به همین دلیل استفاده از بازدارنده‌های PTGS می‌تواند سودمند باشد، اما در عین حال بررسی Arzola *et al.* (2011) نشان داد که تأثیر بازدارنده‌ها در روزهای پس از تزریق آگروباکتریوم همسان نیست، به عنوان مثال بازدارنده P19 چهارده روز پس از تزریق آگروباکتریوم بیشترین بیان را سبب شد که این میزان ۵ برابر حالتی است که در انتقال موقت از بازدارنده استفاده نشده بود. در این میان تأثیر بازدارنده 2b بر تولید پروتئین نوترکیب هرچند تا روز چهاردهم روند افزایشی داشت اما این افزایش مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (Arzola *et al.*, 2011). بنابراین به نظر می‌رسد که افزون بر نوع بازدارنده، عامل‌های مختلفی از جمله مدت زمان پس از انتقال موقت و نوع بازدارنده PTGS نیز بر بیان پروتئین نوترکیب نقش دارند. در این پژوهش که نمونه‌برداری سه روز پس از

پادگن تبدیل و میزان پروتئین نوترکیب به دست آمده از بیان موقت نمونه‌های برگ توتون و کاهو بر پایه درصد پادگن تولیدی نسبت به پروتئین کل (%TSP)^۱ محاسبه شد. بنابراین در تزریق اگروباکتریوم توتون با سازه p13042bfPL میزان درصد پادگن نسبت به پروتئین کل محلول حدود ۲/۱ و سازه p1304fPL حدود ۲/۷ درصد و این میزان در کاهو سازه p13042bfPL حدود ۰/۲۵ و در سازه p1304fPL حدود ۰/۵ درصد برآورد شد.

مربوط به آن به دست آمد. در شکل ۱۲ میزان جذب نمونه‌های بیان موقت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با هم مقایسه شده‌اند. تجزیه آماری آزمون الیزا به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد که نشان داد تفاوت میانگین جذب برای دو سازه در توتون معنی‌دار نیست اما در کاهو این تفاوت معنی‌دار شد. در ادامه به کمک معادله خط به دست آمده از نمودار استاندارد، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به میزان



شکل ۱۲. مقایسه نمونه‌های بیان موقت توتون و کاهو با دو سازه p1304fPL و p13042bfPL از نظر میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر به دست آمده از آزمون الیزا. محور عمودی میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور افقی نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. در محور افقی حرف S نشانه توتون و L نشانه کاهو است و FPL و 2bFPL به ترتیب نشانه سازه p1304fPL و p13042bfPL هستند. بین میانگین جذب نمونه‌های توتون برای دو سازه 2bFPL و FPL تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد، اما در کاهو، تفاوت بین دو سازه معنی‌دار بود.

Figure 12. Comparison of transient expression of recombinant protein in tobacco and lettuce leaves agro-infiltrated with p13042bfPL and p1304fPL constructs, according to amount of A₄₅₀ nm resulted by ELISA assay. Values correspond to means of three biological replicates of absorbance (optical density) at 450 nm for each sample. S indicate tobacco (samsun) and L indicate lettuce. FPL and 2bFPL represent p1304fPL and p13042bfPL constructs, respectively.

الیزا و مقایسه نمونه‌های بیان موقت با نمونه شاهد، پروتئین نوترکیب تولید شده است و تفاوت بین نمونه‌های بیان موقت به دست آمده از دو سازه در مقایسه با نمونه شاهد برای هر دو گیاه توتون و کاهو معنی‌دار بود اما تفاوت بین دو سازه دارای 2b و بدون 2b از نظر آماری در توتون معنی‌دار نشد، هر چند که در کاهو میزان تولید پروتئین تولیدی در مجموع کم بود اما بیان پروتئین بین دو سازه تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین با ترسیم

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده از انتقال موقت سازه‌های ساخته شده برای تولید پادگن PA::LF همراه با اجوان CTB که در سطح RNA با استفاده از RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون الیزا انجام شد، نشان داد که بیان در سطح رونویسی صورت گرفته و در بیان موقت به دست آمده از سازه p13042bfPL رونویسی از عامل 2b و پادگن و در سازه p1304fPL رونویسی از پادگن با موفقیت انجام شده است. همچنین بنابر نتایج آزمون

1. Total soluble protein (%TSP)

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح مصوب با اعتبار پرداختی صندوق حمایت از پژوهشگران اجرا شده است، که از مسئولان مربوط، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نمودار استاندارد با استفاده از پادگن خالص FPL و کمی کردن نتایج آزمون الایزا، در مجموع میزان تولید پروتئین نوترکیب از ۰/۲۵ تا ۲/۷ درصد بود که بیشترین تولید پروتئین از بیان موقت نمونه‌های برگ‌گی توتون با سازه بدون بازدارنده 2b به دست آمد.

REFERENCES

1. Arzola, L., Chen, J., Rattanaporn, K., Maclean, J.M & McDonald, K.A. (2011). Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased *in planta* expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *International Journal of Molecular Science*, 12, 4975-4990.
2. Brey, R.N. (2005). Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1266-1292.
3. Bhatnagar, R. & Batra, S. (2001). Anthrax toxin. *Critical Reviews in Microbiology*, 27, 167-200.
4. Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
5. Brossier, F., Levy, M., Mock, M. & Sirard, J.C. (2000). Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infection and Immunity*, 68(4), 1781-1786.
6. Choi, M.S., Yoon, I.S., Rhee, Y., C, S.K., Lim, S.H., Won, S.Y., Lee, Y.H., Choi, H.S., Lee, S.C., Kim, K.H., Lomonosoff, G. & Sohn, S.H. (2008). The effect of cucumber mosaic virus 2b protein to transient expression and transgene silencing mediated by agro-infiltration. *The Plant Pathology Journal*, 24, 296-304.
7. Daniell, H., Streatfield, S.J. & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6(5), 219-226.
8. Edwards, K.A., Clancy, H.A. & Baeumner, A.J. (2006). *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 73-84.
9. Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-875.
10. Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. & Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *The Plant Cell Physiology*, 48, 1050-1060.
11. Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. & Smelser, C. (1992). Hydration-state-responsive protein link cold and drought stress in spinach. *Planta*, 188, 265-270.
12. Kapila, J., Rycke, R.D., Montagu, M.V. & Angenon, G. (1997). An *agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122, 101-108.
13. Koya, V., Moayeri, M., Leppla, S.H., Daniell, H. (2005). Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infection and Immunity*, 8266-8274.
14. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. & Gleba, Y. (2005). Systemic *agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, 23 (6), 718-723.
15. Mock, M. & Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annual Review of Microbiology*, 55, 647-671.
16. Qu, F. & Morris, T. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *Virology Paper*, 579(26), 5958-5964.
17. Ruhlman, T., Ahangari, R., Devine, A., Samsam, M. & Daniell, H. (2007). Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts—oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal*, 5(4), 495-510.
18. Sainsbury, F., Thuenemann, E.C. & Lomonosoff, G.P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant biotechnology*, 7, 689-693.
19. Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
20. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 33(5), 949-56.
21. Wang, K. (2015). *Agrobacterium* protocol third edition, Methods in molecular biology 1223, Humana press.

22. Watson J., Koya, V., Leppla, S.H. & Daniell, H. (2004). Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop; *Vaccine*, 22, 4374-4384.
23. Weller, R.E. (2006). Risk of disease spread through bioterrorism. *Veterinaria Italiana*, 42(4), 351-367.
24. Wu, G. (2010). A chimeric protein that functions as both an anthrax dual-target antitoxin and a trivalent vaccine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4750-4757.