



## مقاله پژوهشی

## بیان و هدف گیری درون سلولی پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از سازه مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو

سید محسن نساج حسینی<sup>۱\*</sup>، مسعود شمس بخش<sup>۲</sup> و شی دونگ یه<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

## چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی امکان بیان پروتئین فلورسنت سبز (Green fluorescent protein, GFP) به طور موقت و هدفمند در یک سامانه بیان ویروسی، انجام شد. بدین منظور، ویروس موزاییک زرد کدو، (zucchini yellow mosaic virus; ZYMV)، برای بیان ژن *gfp* در گیاهان کدو (میزبان سیستمیک ZYMV) استفاده شد. ژن رمز کننده GFP بین چارچوب‌های ژنی P1 و HC-Pro در ZYMV به عنوان حامل وارد شد. پپتید سیگنال کلروپلاستی و توالی SEKDEL برای هدف‌گیری GFP به ترتیب در کلروپلاست و شبکه اندوپلاسمی اضافه شدند. عفونت‌زایی حامل‌های نوترکیب با مایه‌زنی گیاه سلمه تره (*Chenopodium quinoa*)، میزبان لکه موضعی ویروس ارزیابی شد. لکه‌های موضعی کلروتیک روی برگ‌های سلمه تره ایجاد شد. عصاره یک لکه موضعی روی برگ‌های گیاهان کدو مایه‌زنی شد. از این گیاهان ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی نمونه‌برداری شدند. حضور ZYMV در گیاهان مایه‌زنی شده توسط RT-PCR و آزمون الیزای غیرمستقیم تأیید شد. همچنین پروتئین بیان شده توسط ZYMV با استفاده از آزمون‌های الیزا، ریزنگاره فلورسانس و تصویربرداری کونفوکال ردیابی شد. واکاوی داده‌های آزمون الیزای گیاهان مایه‌زنی شده نشان داد که GFP در برگ‌های کدو بیان شد و سیگنال SEKDEL به طور قابل توجهی سطح بیان پروتئین نوترکیب را افزایش داد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از گیاهان به عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب همچنان یک زمینه‌ی در حال توسعه است و این راهکار روشی سریع برای تولید مقادیر بالای پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ارائه می‌دهد.

واژگان کلیدی: بیان موقت، پروتئین نوترکیب، حامل ویروس گیاهی

\* بخشی از رساله دکتری نویسنده اول می باشد

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [nassaj@acecr.ac.ir](mailto:nassaj@acecr.ac.ir)

<sup>۱</sup> استادیار گروه محیط زیست طبیعی، پژوهشکده محیط زیست جهاد دانشگاهی، رشت، ایران

<sup>۲</sup> استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاد گروه بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملی چنگ شون، تایچونگ، تایوان



DOI: 10.22034/ijpp.2025.2021812.474

**Research Article**  
**Expression and subcellular targeting of green fluorescent protein using a zucchini yellow mosaic virus-based vector**

**Sayed Mohsen Nassaj Hosseini<sup>1\*\*</sup>, Masoud Shams-bakhsh<sup>2</sup> and Shyi Dong Yeh<sup>3</sup>**

(Received: 11.01.2025; Accepted: 17.03.2025)

**Abstract**

The present study investigated the feasibility of transient expression and successful subcellular targeting of Green Fluorescent Protein (GFP) using a plant viral expression system. For this purpose, zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, *Potyvirus cucurbitaflaviteselati*) was employed to express GFP in cucurbit plants as the systemic host for ZYMV. The GFP-encoding gene was inserted between the P1 and HC-Pro open reading frames in the ZYMV vector. Additionally, a chloroplast signal peptide and the SEKDEL sequence were incorporated to direct GFP to the chloroplast and endoplasmic reticulum, respectively. The infectivity of the recombinant vectors was evaluated by inoculating *Chenopodium quinoa*, a local lesion host for ZYMV. Chlorotic local lesions developed on the inoculated leaves of *C. quinoa*. An extract from a single local lesion was used to inoculate squash plants, which were then sampled at 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation. The samples were analyzed using indirect ELISA, RT-PCR, fluorescence microscopy, and confocal imaging. The presence of ZYMV recombinants in the inoculated plants was confirmed by RT-PCR. ZYMV-expressed GFP was detected using ELISA, fluorescence microscopy, and confocal imaging. Data analysis revealed that GFP was successfully expressed in squash leaves, and the SEKDEL sequence significantly enhanced the expression levels of the recombinant protein. Overall, the findings of this study demonstrate that the use of plants as hosts for the expression of foreign proteins remains a rapidly evolving field, and this approach offers a rapid and efficient method for producing high quantities of recombinant proteins in plants.

**Keywords:** transient expression, recombinant protein, plant viral vector

---

\* A part of the first author's PhD dissertation.

\*\*Corresponding author's E-mail address: [nassaj@acecr.ac.ir](mailto:nassaj@acecr.ac.ir)

<sup>1</sup> Associated Professor, Department of Natural Environment, Environmental Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Rasht, Iran

<sup>2</sup> Professor, Plant Pathology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Plant Virology Department, National Chun Hsing University, Taichung, Taiwan

## مقدمه

بودن تولید گیاهان تراریخت، خطر بالای انتقال و بیان صحیح ژن و محدودیت‌های دیگر آن منجر به جست و جوی روش‌های دیگری برای بیان پروتئین در گیاه شده است. یکی از این روش‌ها به کار بردن سامانه‌های بیان موقت یا گذرای ویروس‌های گیاهی است (Hefferon 2012). حامل‌های مبتنی بر ویروس‌های گیاهی بسیاری از محدودیت‌های یادشده را ندارند. سامانه‌های ویروسی از نظر دست‌کاری ژنتیکی و انتقال ژن هدف به ژنوم ویروس بسیار سریع بوده و عملکرد بالایی در تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس وسیع دارند (Feng et al. 2022).

نتایج به دست آمده از پژوهش‌های مختلف نشان داده است که عوامل بسیاری می‌توانند بر بیان و عملکرد پروتئین بیگانه اثر بگذارند (Coates et al. 2022). با ترکیب عناصر مختلف شامل پپتید نشانه، نواحی اتصال، قطعات رمزکننده پروتئین، نواحی خالص‌سازی و جایگاه‌های برش، سرهم‌بندی سریع و بیان پروتئین ممکن می‌شود و نتیجه‌ی نهایی عملکرد بالای پروتئین مورد نظر است (Marillonnet et al. 2005). در مورد چند پروتئین، ثابت شده است که افزودن موتیف‌هایی مانند SEKDEL باعث تجمع پروتئین در شبکه‌ی اندوپلاسمی و افزایش پایداری شده است. اتصال به پروتئین دیگر نیز می‌تواند پایداری را افزایش دهد (Bulaon et al. 2020, Fidani & Secgin 2024). این مورد در اتصال با GFP ( $\beta$ -glucuronidase (GUS) و green fluorescent protein مشاهده شده است و همچنین برای ارزیابی بیان فرایندهای بعدی مانند خالص‌سازی می‌تواند مفید باشد (Soetens et al. 2020, Ramos-Vega et al. 2021).

معرفی حامل‌های ویروس گیاهی به عنوان سامانه‌ی بیان ژن‌های خارجی در گیاه به همراه فرایند خالص‌سازی موثر پروتئین‌های بیان شده، جایگزین خوبی برای روش‌های پیشین شده است (Naseri et al. 2019, Abd-Abd-Aziz

فناوری دی‌ان‌ا نوترکیب اثر شگرفی بر توسعه‌ی علم و فناوری گذاشته است به طوری که منجر به دستکاری ژنتیکی موجودات زنده شده و ظرفیت نوینی برای صنایع کشاورزی و زیست فناوری ایجاد کرده است. هرچند تنها نزدیک به سه دهه از تولید اولین گیاه تراریخت گذشته است ولی در بسیاری کشورها، با وجود نگرانی‌های افکار عمومی، محصولات به دست آمده از گیاهان تراریخت در حال عرضه به بازار مصرف هستند (Sivamani et al. 2024). همچنین، به واسطه‌ی فناوری دی‌ان‌ا نوترکیب، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه‌های دیگر به ویژه صنایع دارویی انجام گرفته است. این فناوری، تولید پروتئین‌های موجودات مختلف در کشت‌های انبوه سلول‌های باکتری‌ها، مخمرها، گیاهان و پستانداران را ممکن کرده است (Schillberg & Spiegel 2022).

بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، روش جذابی است که برتری‌های متعددی نسبت به روش‌های رایج مورد استفاده در سایر سامانه‌های بیان ژن دارد. هزینه کم تولید و کاهش خطر آلودگی به بیمارگرهای انسانی برخی از این برتری‌ها است (Burnett & Burnett 2020). با وجود برتری‌های اقتصادی و ظرفیت‌های بیشتر محصولات نوترکیب مبتنی بر گیاهان، هنوز چالش‌های مهمی در تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان از طریق تراریخت‌سازی پایدار وجود دارد. یکی از این محدودیت‌ها میزان بیان پروتئین نوترکیب در گیاه است که در بسیاری موارد به قدری کم است که برای تولید تجاری یا برای استفاده به عنوان واکسن خوراکی مناسب نیست (Park & Wi 2016). از طرفی تراریخت‌سازی پایدار گیاه به عنوان روشی که برای تولید واکسن و پروتئین‌های درمانی و صنعتی به کار می‌رود، مشکلات متعددی مانند وقت‌گیر

مسئول شکست پروتئینی باقیمانده‌ی پلی پروتئین است (Goh & Hahn 2021). در این مطالعه پپتیدهای نشانه برای هدف‌گیری و افزایش بیان GFP در شبکه اندوپلاسمی و کلروپلاست در سامانه‌ی ویروسی مورد استفاده قرار گرفت تا میزان افزایش بیان مورد بررسی قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و شرایط رشد آن‌ها

گیاهچه‌های کدو (*Cucurbita pepo* L.) و سلمه تره (*Chenopodium quinoa* L.) در شرایط کنترل شده‌ی گلخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، به ترتیب به عنوان میزبان سیستمیک و لکه موضعی ویروس موزائیک زرد کدو در گلدان کشت شدند. از کمپوست به همراه ورمیکولیت در ترکیب با خاک استریل به نسبت مساوی برای بستر گلدان‌ها استفاده شد.

#### منبع ویروس‌ها و همسانه‌های ژنی مورد استفاده

همسانه‌ی آلوده کننده‌ی p35SZYMVTW-TN3، که در آن دی‌ان‌اِی (cDNA) مکمل تمام طول جدایی‌ی تایوان ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV TW-TN3) بعد از پیش برنده‌ی 35S-CaMV قرار گرفته بود (Lin et al. 2004, Hsu et al. 2002) به عنوان حامل ویروسی برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاه کدو به کار گرفته شد. در این همسانه ژن گزارشگر GFP بین ژن‌های HC-Pro و P1 قرار داده شده و یک جایگاه هضم پروتئینی مربوط به N1a در انتهای آمینی HC-Pro، به ترتیب برای تسهیل ردیابی و تولید شکل آزاد پروتئین قرار داده شد (شکل ۱).

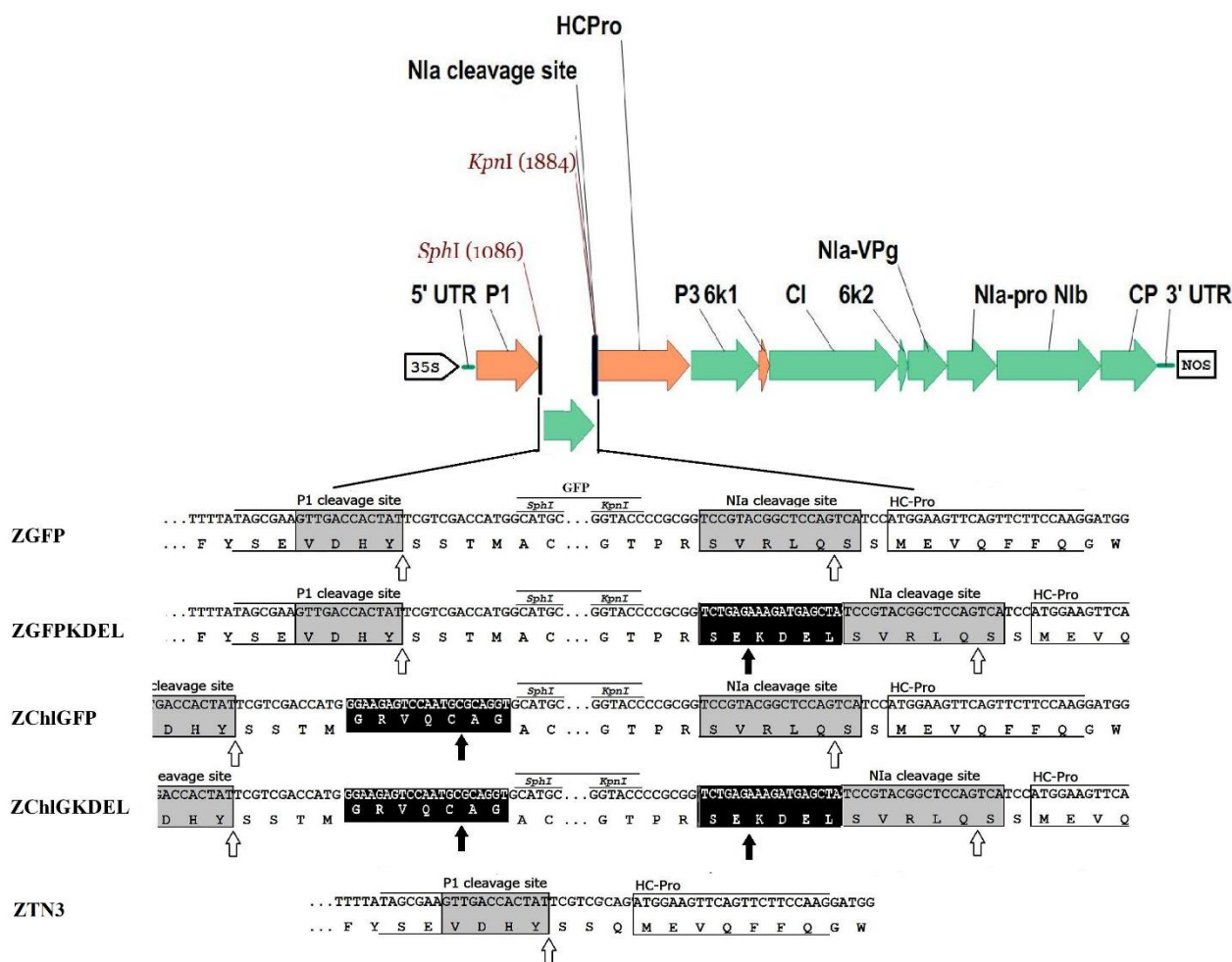
تیمارها شامل گیاهان مایه‌زنی شده با حامل‌های ویروسی مبتنی بر موزائیک زرد کدو هستند که از نظر

(et al. 2020). به کار بردن حامل‌های ویروس گیاهی برای بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب، ابزار مفیدی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مهم مانند تولید ایمونوزن برای تولید آنتی بادی، بخش متغیر تک زنجیره‌ای مولکول‌های آنتی بادی (single-chain variable fragment (scFv)، پروتئین‌های دارویی، واکسن‌های خوراکی و صنعتی در مقیاس زیاد است (Sethi et al. 2021). تا کنون تعدادی از ویروس‌های گیاهی مانند ویروس موزائیک توتون (*tobacco mosaic virus; Tobamovirus tabaci*) و ویروس ایکس سیب زمینی (*potato virus X; Potexvirus*) به عنوان حامل بیانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که این سیستم‌ها قادر به تولید پروتئین‌های عملکردی با خواص بیولوژیکی مشابه با پروتئین‌های طبیعی هستند و در زمینه‌های مختلفی از جمله تولید واکسن، آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌ها کاربرد دارند (Gleba et al. 2007; Peyret & Lomonossoff 2015).

در این تحقیق ویروس موزائیک زرد کدو (*zucchini yellow mosaic virus; Potyvirus cucurbitaflavivessellati*) که یکی از بیمارگرهای کدو بیان شامل خیار، کدو، خربزه و هندوانه است (Ahsan et al. 2023)، به عنوان یک سامانه بیان موقت، به کار گرفته شد. ژنوم ویروس موزائیک زرد کدو مانند بیشتر گونه‌های جنس *Potyvirus*، از آر‌ان‌اِی تک لای مثبت به طول ۹/۶ کیلو باز تشکیل شده است که در یک پیکره‌ی رشته‌ای کپسید پوشی می‌شود و به یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه می‌شود. سپس با پردازش‌های cis و trans سه پروتئاز ویروس شامل P1، HC-Pro و N1a این پلی پروتئین را با شکست پروتئولیتیکی به ده پروتئین فعال شامل سه پروتئاز ویروس تبدیل می‌کنند (Adams et al. 2012). پروتئازهای P1 و HC-Pro در انتهای آمینی پلی پروتئین هستند و انتهای کربوکسیلی خود را با شکست اتوپروتئولیتیک جدا می‌کنند. پروتئاز N1a به عنوان پروتئاز اصلی

در انتهای کربوکسیلی؛ ZChIGKDEL، همسانه آلوده کننده حاوی پپتید انتقال کلروپلاستی و SEKDEL به ترتیب در دو انتهای کربوکسیلی و آمینی. تیمار ZChIGFP+ZGFPPKDEL شامل گیاهان مایه‌زنی شده با ZChIGFP و ZGFPPKDEL به طور همزمان بوده است. ساختار حامل‌های نو ترکیب و نوع پپتید انتقال آن‌ها در شکل ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است.

قرار گرفتن پپتیدهای نشانه متفاوتند؛ این حامل‌ها عبارتند از: ZTN3، همسانه آلوده کننده ویروس موزاییک کدو ایزوله TW TN3 به عنوان شاهد؛ ZGFP، همسانه آلوده کننده شاهد که GFP بین P1 و HC-Pro قرار داده شده؛ ZGFPPKDEL، همسانه آلوده کننده حاوی GFP و پپتید نشانه SEKDEL در انتهای آمینی آن؛ ZChIGFP، همسانه آلوده کننده حاوی GFP و پپتید انتقال کلروپلاستی



شکل ۱. شمای کلی سازمان ژنومی سازه‌های مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل مورد استفاده در این مطالعه به همراه نقشه‌ی برش آنزیمی آن.

**Figure 1.** The schematic overview of the genomic organization of zucchini yellow mosaic virus-based constructs used as vectors in this study, along with their restriction enzyme map.

جدول ۱. نام اختصاری همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل‌های ویروسی مورد استفاده در این مطالعه به همراه نوع ژن بیگانه و نوع و موقعیت پپتید انتقال داده شده و دنباله (tag) به کار رفته شده.

**Table 1. Abbreviated names of viral clones based on zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) as viral vectors used in this study along with the type of foreign gene and the types and positions of the transferred signal peptide and the tag used.**

Abbreviate names of ZYMV vectors	Foreign gene	Signal peptide type and its position
ZGFP	GFP	-
ZChlGFP	GFP	Chloroplast signal peptide at the N-termini
ZChlGKDEL	GFP	Chloroplast signal peptide at the N-termini and SEKDEL at the C-termini
ZGFPKDEL	GFP	SEKDEL at the C-termini
ZTN3*	-	-

\*ZYMV TW TN3

و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از برگ‌های کدوی آلوده استخراج شد. به منظور ساخت دی‌ان‌ای مکمل، یک میکرولیتر آر ان اکل استخراج شده (غلظت ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر) با ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس mZ1155 (با غلظت ۱۰ میلی مولار، طراحی شده بر اساس توالی حامل (جدول ۲) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها روی یخ، ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) RT، پنج میکرولیتر مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر دی تیوتریتول ۰/۱ مولار و یک واحد آنزیم نسخه برداری معکوس (MMuLV, Invitrogen, USA) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۴۲ °C قرار داده شدند. تکثیر قطعه ژن‌های بیگانه مشابه شرایط PCR colony با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) و با اضافه کردن یک میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل انجام گرفت. قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد از نظر وجود باند مربوطه بررسی شدند.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و نسخه برداری معکوس (RT)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پنج میکرولیتر بافر 10X، پنج واحد آنزیم ShineGene (KOD plus (Molecular Biotech, Inc., China)، دو میکرولیتر سولفات منیزیم (MgSO<sub>4</sub>) با غلظت ۲۵ میلی مولار، پنج میکرولیتر مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۳ میکرولیتر دی‌ان‌ای الگو (۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر GenePro™, (China) به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۵ تا ۶۰ °C (جدول ۲) و گسترش با توجه به طول ژن مورد نظر و با در نظر گرفتن سرعت آنزیم (یک کیلو جفت باز در دقیقه) در ۶۸ °C برای ۳۵ چرخه بهینه سازی شد. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C برای ۳ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۶۸ °C نیز انجام شد برای انجام RT-PCR. آر ان‌ای کل با استفاده از کیت TRIzol (Invitrogen, USA)

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه به همراه موارد کاربرد و جایگاه‌های برشی.

**Table 2. Characteristics of primers used in this study along with their applications and cleavage sites.**

Primer name	Sequence (5'-3', restriction site has been underlined)	Primer length	Restriction site	Annealing temperature (°C)	Application	Manufacturing company and country
mz1155	ACTTTGCACACATGATCTGG	20	-	55	To produce complementary DNA	MDBio
pZ629	AGAAAGTGGTGAAAAGCAAAC	22	-	55	To run RT-PCR	MDBio
pGFPSphI	TGGCATGCGGGCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG	32	<i>SphI</i>	55	To amplify GFP	MDBio
mGFPKpnI	ATGGGTACCACGCGTCTTGTACAGCTCGTCCAT		<i>KpnI</i>	55	To amplify GFP	MDBio
mzp1Chltag	ATGCATGCACCTGCGCATTGGACTCTCCATAGTGGTCAACTTCGCTA	48	<i>SphI</i>	60	To add chloroplast signal peptide	Genomics
pChltag	GGAAGAGTCCAATGCGCAGGT	21	-	55	To screen recombinants with chloroplast signal peptide	Genomics
mKDELnss	TTTTCCATGGAAGACTGGTGAAACACATGTAGCTCATCTTTCTCAGA	47	<i>NcoI</i>	60	To add and screen SEKDEL signal peptide	MDBio

نگه‌داری شد. سپس کلنی‌ها به صورت تصادفی انتخاب و به تیوب ۰/۲ میلی لیتری منتقل شدند. سپس به هر تیوب، ترکیب واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (X1۰)، دو میکرولیتر مخلوط 10 dNTPs میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (با توجه به ژن وارد شده، با غلظت ۱۰ میلی مولار (جدول ۲) و یک واحد (Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) افزوده و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه‌ی حرارتی مشابه برنامه‌ی یاد شده بود با این تفاوت که از دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای گسترش و گسترش نهایی استفاده شد. دو نمونه از کلنی‌های مثبت برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. برای اطمینان از صحت کلنی‌ها، پلاسمیدهای نوترکیب (جدول ۱) با برش آنزیمی (*SphI*, *KpnI*) به همراه بافر و شرایط پیشنهادی شرکت سازنده (BioEngland Biolab, UK) و سپس تعیین توالی (ABI 3730, Applied Biosystem, CA) بررسی شدند. به منظور افزودن ژن مربوط به پپتید کلروپلاستی آغازگرهای pZ629 و mzp1Chltag و برای افزودن ژن پپتید انتقال اندوپلاسمی از آغازگرهای pGFPSphI و mKDELnss و الگوی ZGFP در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد و محصولات این واکنش‌ها پس از خالص‌سازی به همراه ZGFP به ترتیب در واکنش هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *SphI/NcoI* و *NheI/SphI* (BioEngland Biolab, UK) برش داده شدند و پس از تفکیک، استخراج و واکنش اتصال (مشابه شرایط بالا) بررسی شدند. محصول واکنش اتصال به ترتیب ZChlGFP و ZChlGKDEL بودند. برای تهیه ZChlGKDEL آغازگرها و شرایط مشابه افزودن پپتید کلروپلاستی بود با این تفاوت که از ZGFPKDEL به عنوان الگو استفاده شد.

#### مایه زنی گیاه لکه موضعی و سیستمیک

پلاسمیدهای نوترکیب (جدول ۱) با استفاده از کیت و

برای تکثیر ژن‌های مربوط به GFP و افزونه‌های مورد نظر شامل سایت برشی و پپتید انتقال، آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی مورد نظر استفاده شد و برای قرار دادن در حامل ویروسی به کار رفت. برای تکثیر *gfp* توالی جایگاه‌های برشی *SphI* و *KpnI* به ترتیب ابتدای آغازگر مستقیم (pGFPSphI) و معکوس (mGFPKpnI) قرار داده شد (جدول ۲). همچنین آغازگر معکوس به گونه‌ای طراحی شد که رمز ژنتیکی خاتمه از انتهای آن حذف شد.

#### واکنش هضم آنزیمی، اتصال و تراریخت سازی

پس از تکثیر ژن *gfp*، محصول PCR با استفاده از کیت تصفیه (PCR Clean up kit, GeneMark, Taiwan) خالص‌سازی شد و در واکنش هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *SphI* و *KpnI* (BioEngland Biolab, UK) برای وارد کردن ژن *gfp* به حامل ZYMV برش داده شد. محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و باند حاصل از ژل جدا و با استفاده از کیت استخراج GeneMark خالص‌سازی شد. حامل و قطعه‌ی مورد نظر به نسبت یک به هشت در واکنش اتصال [400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25 °C), T4 DNA ligase 0.5 unit (Fermentas, USA)] به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. محصول واکنش اتصال (ZGFP) به روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد *Escherichia coli* XLI منتقل شد (Sambrook et al. 1989). کلنی‌های حاصل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) غربال شدند. برای غربال کردن کلنی‌های نوترکیب، از روش colony PCR استفاده شد. در این روش، کلنی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید مورد نظر از تشتک آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و روی تشتک تازه کشت شد. کلنی‌ها به مدت ۱۲-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس



افزوده و به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از شستشو، صد میکرولیتر آنتی بادی ثانویه به هر یک از چاهک‌ها افزوده و به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. عمل شستشو تکرار و ۸۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (AP tablet 0.5 mg/ml, 9.7% diethanolamine, 0.02% sodium azide, pH 9.8) به هر یک از چاهک‌های پلیت الیزا افزوده شد. یک ساعت پس از افزودن سوبسترا، میزان جذب هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Bio-Tek instrument, USA) ثبت شد.

آنتی سرم چند همسانه‌ای علیه GFP (Amersham Pharmacia Biotech, England) با غلظت یک به ۵۰۰۰ برای ردیابی پروتئین‌های GFP استفاده شد. آنتی بادی ثانویه goat anti-rabbit (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA) با غلظت یک به ۵۰۰۰ برای واکنش با آنتی سرم چندهمسانه‌ای استفاده شد.

#### تصویربرداری و ریزنگاره‌ی فلورسنت

به منظور بررسی بیان GFP در برگ‌های کدو و سلمه تره از دستگاه تصویر بردار فلورسنت (Kodak image station 2000 MM, USA) استفاده شد و تصاویر مربوط به بیان GFP در برگ‌ها با زمینه‌های مختلف تهیه شد. میزان تراکم فلورسنت در برگ‌ها با استفاده از نرم افزار Kodak 1D Image Analysis software (Kodak Digital Science) اندازه گیری شد. برای تصویربرداری به وسیله‌ی ریزنگاره فلورسنت (Ziess Pascal Exite, Germany)، از برگ‌های مورد نظر قطعاتی به اندازه‌ی سه میلی متر مربع برش داده شده و هر قطعه برگ روی یک قطره آب روی لام قرار داده شد. سپس به مدت کوتاهی، به آرامی حرارت داده شد و برای مشاهده‌ی میزان فلورسنت در بافت‌های مختلف برگ در ریزنگاره‌ی فلورسنت استفاده شد. برای مقایسه کمی داده‌ها از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. با استفاده از

بر اساس روش کار شرکت سازنده، (mini-prep plasmid purification kit, GeneMark) از سلول‌های باکتری استخراج شده و به صورت مکانیکی و با استفاده از یک گوش پاک کن روی برگ میزبان لکه موضعی *C. quinoa* پوشیده از پودر کاربوراندوم، مالیده شد و پس از چند دقیقه به آرامی شستشو شد. پیش از مایه‌زنی سطح برگ با پنبه آغشته به اتانول ۷۰ درصد تمیز و ضدعفونی گردید و به ازای هر گیاه، ۱۰ میکروگرم پلاسמיד با حجم حدود ۵۰ میکرولیتر مایه‌زنی شد. بعد از پیدایش لکه‌های موضعی، عصاره‌ی یک لکه‌ی منفرد با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای یا دسته‌هاون و به صورت مکانیکی روی برگ کدوی پوشیده از پودر کاربوراندوم بعنوان میزبان سیستمیک در مرحله دو تا چهار برگی مالیده شد. گیاهان مایه‌زنی شده با پلاسמיד حاوی جدایه‌ی تایوان ویروس موزائیک زرد کدو (pZYMV TW-TN3, ZTN3) به عنوان شاهد منفی استفاده شدند.

#### آزمون سرولوژیک (الیزا)

به منظور ردیابی پروتئین نوترکیب در گیاهان کدو از آزمون الیزای غیرمستقیم طبق روش وانگ و کانسالوس (1990) استفاده شد (Wang & Gonsalves 1990). بدین منظور، بافت گیاه آلوده به نسبت ۴۰ برابر با بافر پوششی (Coating buffer: 50 mM sodium carbonate, pH 9.6, 0.01% sodium azide) مخلوط شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک (Greiner Bio-One, Germany) به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBST (0.01M phosphate buffered saline, 0.01 M NaCl, 0.1% Triton x-100, pH 7.4) و هر بار سه دقیقه، چاهک‌ها با صد میکرولیتر آلبومین دو درصد حل شده در بافر PBS (0.01M phosphate buffered saline, 0.01 M NaCl, pH 7.4) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شدند. سپس صد میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه به هر یک از چاهک‌ها

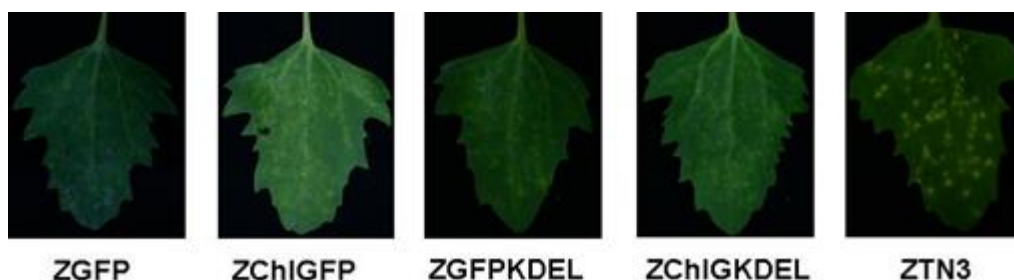
سبز بود. در تیمار ZGFP موزاییک ملایم و زردی مشاهده شد در حالی که در تیمار مایه زنی شده با ZGFPKDEL، علائم رگبرگ نواری مشخص (نوار سبز در اطراف رگبرگ‌ها) به همراه ضخیم شدن برگ و عمیق شدن برخی بریدگی‌های برگ مشاهده شد. در گیاهان مایه زنی شده با ZChIGFP، علائم رگبرگ نواری بدون مرز مشخص دیده شد. در تیمار ZChIGFPKDEL، کوچک شدن، بدشکلی و بریدگی عمیق برگ به همراه زردی مشاهده شد و در تیماری که گیاهان آن با دو ویروس ZChIGFP+ZGFPKDEL مایه زنی شده بود، علائم شامل زردی و لکه‌های سبز پراکنده در پهنک برگ مشاهده شد. خلاصه علائم مشاهده شده در گیاهان کدوی مایه زنی شده با حامل‌های نوترکیب در جدول ۳ آمده است (شکل ۳ و جدول ۳).

آزمون دانکن میانگین‌ها نرمال شده و با استفاده از نرم افزار Excel آنالیزهای آماری و هیستوگرام مربوطه ترسیم گردید.

## نتایج

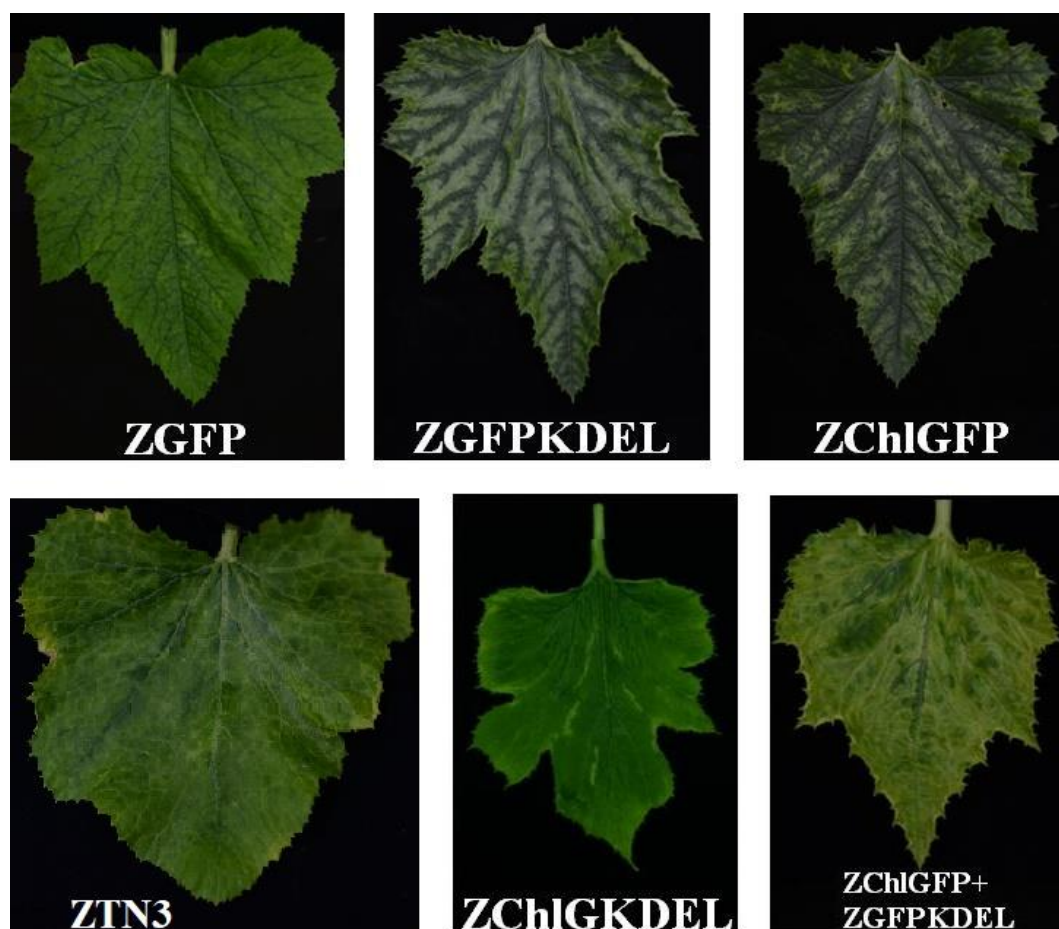
### عفونت‌زایی و علائم ناشی از حامل‌های نوترکیب

عفونت‌زایی حامل‌های نوترکیب با ایجاد لکه موضعی روی برگ سلمه تره تایید شد و همه حامل‌های نوترکیب روی برگ سلمه تره علائم لکه‌های موضعی ایجاد کردند (شکل ۲). در گیاهان کدو که در مرحله دو برگگی توسط حامل‌های نوترکیب مایه زنی شدند نیز علائم سیستمیک مشاهده شد (شکل ۳). علائم تیمارهای مختلف در مقایسه با هم و با شاهد متفاوت بود. علائم در گیاهان شاهد (مایه زنی شده با سازه ZTN3) شامل موزاییک با لکه‌های



شکل ۲. اثبات عفونت‌زایی همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل‌های نوترکیب ویروس مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۲) با پیدایش علائم لکه موضعی روی برگ گیاه سلمه تره. نام هر همسانه (تیمار) زیر تصویر مربوطه نشان داده شده است.

**Figure 2. Evidence of infectivity of viral clones based on zucchini yellow mosaic virus as viral recombinant vectors used in this study (Table 2) infection by the appearance of local lesion symptoms on the leaves of *Chenopodium quinoa*. The name of each clone (treatment) is shown below the corresponding image.**



شکل ۳. علائم سیستمیک برگ‌های گیاه کدو ۱۰ روز پس از مایه زنی با همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزایک زرد کدو به عنوان حامل‌های نو ترکیب ویروس مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۲)؛ نام حامل ویروسی مایه زنی شده بر برگ کدو زیر تصویر مربوطه آورده شده است.

**Figure 3.** Systemic symptoms of squash leave 10 days post-inoculation with viral clones based on zucchini yellow mosaic virus as vial recombinant vectors used in this study (Table 2). The name of the viral vector inoculated on squash leaves is given below the corresponding image.

جدول ۳. علائم برگ گیاهان کدو به عنوان میزبان سیستمیک ویروس موزایک زرد کدو پس از مایه زنی با حامل‌های ویروسی مختلف مبتنی بر این ویروس (جدول ۲).

**Table 3.** Leaf symptoms of squash plants as systemic host of zucchini yellow mosaic virus after inoculation with different vectors based on this virus (Table 2).

Treatments	Symptoms
ZTN3	Yellow mosaic with yellow-green spots
ZGFP	Yellow mosaic
ZGFPKDEL	Dark green vein banding, green spots or mosaic on interveinal tissue, clearly defined border between the vein banding and the interveinal tissue
ZChIGFP	Severe mosaic of interveinal tissue with indistinct dark greening around the veins
ZChIGKDEL	Mild mosaic without vein banding or green spots, sometimes with yellow veins and yellow-margin of leaves
ZChIGFP+ZGFPKDEL	Yellow mosaic with green spots and sometimes with incomplete vein banding

## نتایج تصویربرداری کونفوکال، الیزا و ریزنگاره فلورسنت

میزان بیان GFP با استفاده از تصویربرداری کونفوکال نشان داد بیشترین میزان تشعشع فلورسنت در گیاه سلمه تره، در تیمار مایه زنی شده با ZGFPKDEL بود در حالی که کمترین میزان آن، پس از شاهد منفی، در تیمارهای مایه زنی شده با ZChlGFP مشاهده شد (شکل ۴، قسمت A). نتایج بررسی میزان فلورسنت با تصویربرداری از گیاهان کدوی مایه زنی شده با ویروس‌های نوترکیب نیز نشان داد بیشترین و کمترین تشعشع فلورسنت به ترتیب مربوط به تیمارهای ZGFPKDEL و ZChlGFP (پس از شاهد منفی) بود (شکل ۴، قسمت B). نتایج بررسی کمی تراکم فلورسنتی با استفاده از داده‌های به دست آمده از تصویربرداری نیز نتایج مشابهی داشت (شکل ۵). بررسی تصاویر فلورسنت نشان داد که آوندهای گیاهان تیمار ZGFP به صورت تیره (فاقد تشعشع فلورسنت) دیده می‌شوند و آوندها به صورت خطوط باریک تیره دیده می‌شوند. در مورد تیمار ZGFPKDEL آوندها به همراه نوار اطراف آنها به رنگ کاملاً تیره دیده می‌شوند (مشابه تیمار ZChlGFP) (شکل ۴ و ۷). در تیمار ZChlGFP+ZGFPKDEL تنها لکه‌های پراکنده به صورت تیره دیده می‌شود و رگبرگ‌ها هم تشعشع فلورسنت دارند (شکل ۴).

بررسی آماری میزان تراکم فلورسنت حاصل از بیان GFP در گیاه کدو با استفاده از حامل‌های نوترکیب در این تحقیق نشان داد تیمارهای ZGFPKDEL، ZGFP و ZChlGFP+ZGFPKDEL در یک گروه آماری، تیمار ZChlGFP در گروه آماری جداگانه و تیمارهای ZChlGKDEL و ZTN3 (شاهد) نیز در گروه آماری مجزا قرار گرفتند (شکل ۵).

نتایج آزمون الیزا نشان داد که بیشترین و کمترین میزان بیان GFP، به ترتیب مربوط به تیمارهای ZGFPKDEL و

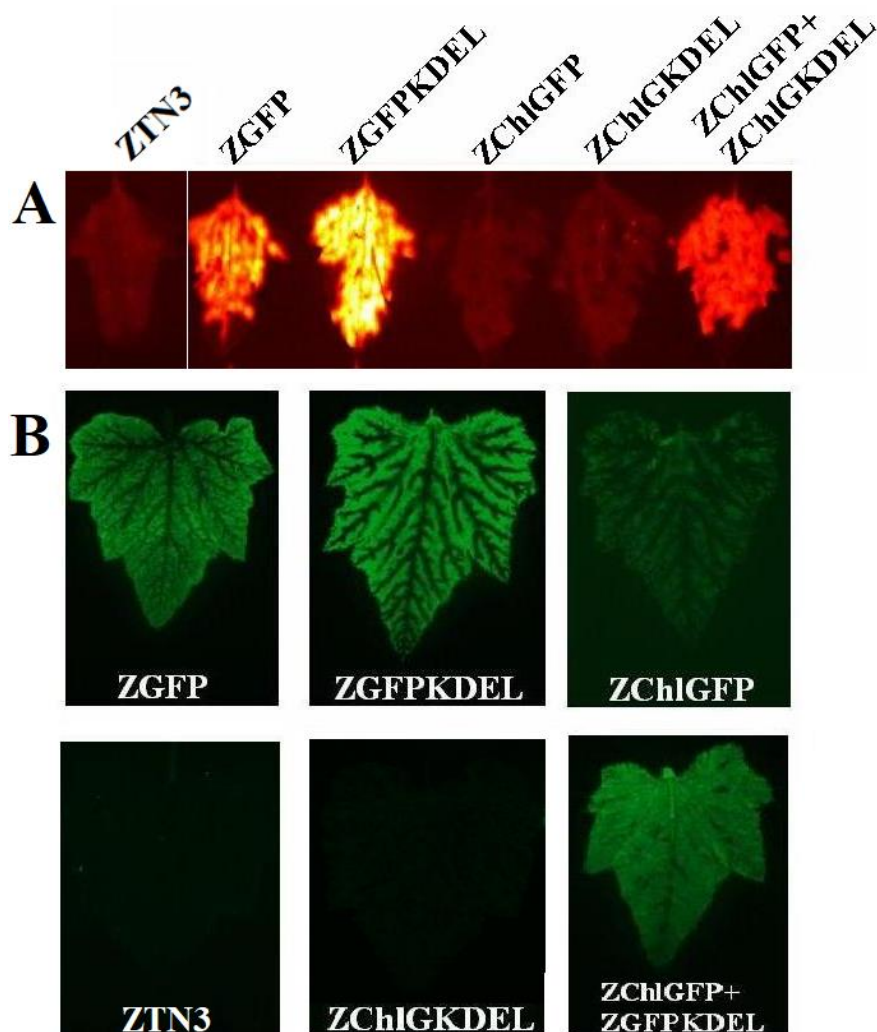
ZTN3 بود. افزودن پپتید SEKDEL منجر به افزایش بیان GFP شد. همچنین بیشترین میزان بیان مربوط به تیمار ZGFPKDEL، ۲۰ روز پس از مایه زنی به دست آمد (شکل ۶).

نتایج بررسی ریزنگاره فلورسنت نشان داد بیشترین تشعشع فلورسنتی مربوط به تیمارهای ZGFPKDEL و ZGFP و کمترین تشعشع در تیمار ZChlGFP دیده می‌شود (شکل ۷).

نتایج نشان داد پپتید انتقال به شبکه اندوپلاسمی بر افزایش بیان و تجمع GFP در شبکه اندوپلاسمی تأثیر مثبت داشت. بررسی‌های تجربی اعم از عفونت‌زایی و تجزیه و تحلیل‌های تصویربرداری کونفوکال و آزمون الیزا، میزان بیان GFP را در گیاهان مدل سلمه تره و کدو ارزیابی کرد. یافته‌ها نشان داد که افزودن پپتید SEKDEL باعث شد که تیمار ZGFPKDEL بیشترین میزان تشعشع و تراکم فلورسنت را داشت. از طرفی، تیمارهای ZTN3 و ZChlGFP کمترین میزان فلورسنت و همچنین بیان GFP را نشان دادند.

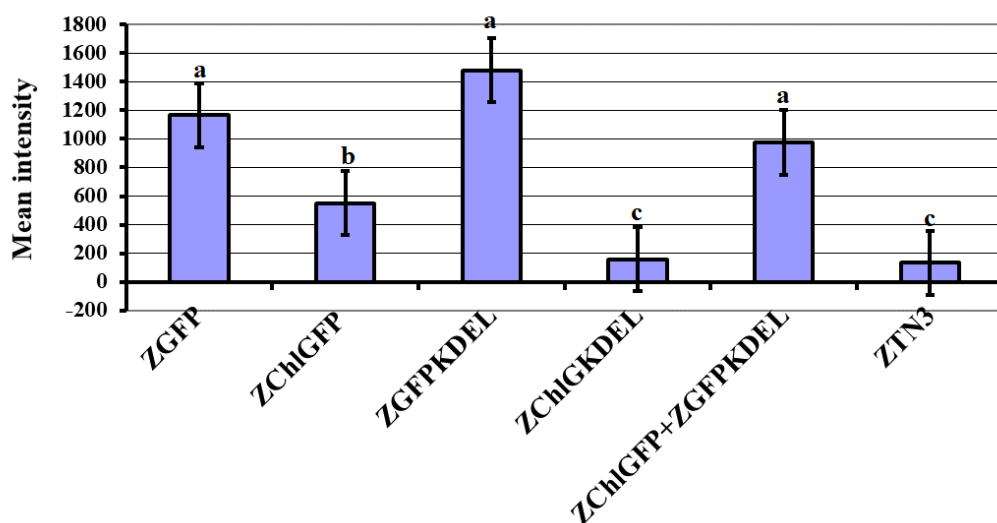
### بحث

این مطالعه به بررسی هدف‌گیری درون سلولی پروتئین بیگانه GFP با استفاده از حامل ZYMV و توالی‌های انتقال به منظور افزایش انباشته شدن در شبکه‌ی اندوپلاسمی و کلروپلاست پرداخت. به دلیل اثر مهم گلیکوزیلاسیون روی پایداری، تاخوردگی مناسب و عملکرد زیستی مناسب پروتئین نوترکیب، GFP با افزودن پپتید SEKDEL به درون شبکه‌ی اندوپلاسمی هدایت شد. گزارش‌های متعددی نشان دادند که افزودن پپتید انتقال به شبکه اندوپلاسمی به پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت می‌تواند باعث انباشته شدن این پروتئین‌ها در شبکه‌ی اندوپلاسمی شود. این پدیده به دلیل نقش توالی پپتید انتقال در بازگشت پروتئین‌ها به شبکه‌ی اندوپلاسمی



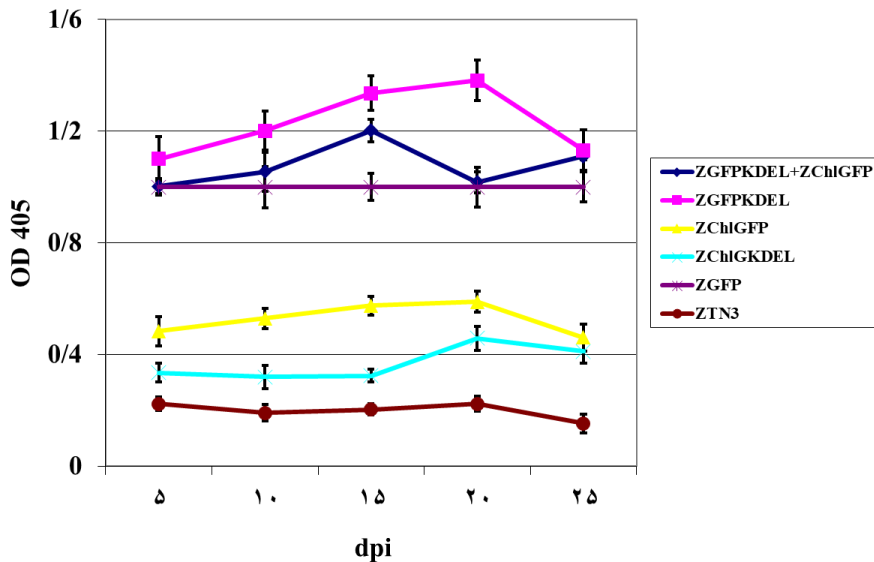
شکل ۴. تصویر برداری کونفوکال از میزان فلورسنت ناشی از بیان GFP در گیاهان سلمه تره (A) و کدوی حلوائی (B) مایه زنی شده با همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل‌های نو ترکیب ویروس مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۲)؛ نام حامل ویروسی مایه زنی شده بر برگ کدو به ترتیب در قسمت‌های A و B بالا و زیر تصویر مربوطه آورده شده است.

**Figure 4. Confocal imaging of the fluorescence intensity resulting from GFP expression in quinoa (A) and squash (B) plants inoculated with viral clones based on zucchini yellow mosaic virus as vial recombinant vectors used in this study (Table 2); the name of the viral vector inoculated on the squash leaf is listed in parts A and B above and below the corresponding image, respectively.**



شکل ۵. نمودار شدت فلورسنت ناشی از بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) در گیاهان کدو آلوده شده با همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو (ZYMV) که به عنوان حامل‌های نو ترکیب ویروسی در این مطالعه استفاده شدند (جدول ۲). نام هر حامل ویروسی زیر ستون مربوطه درج شده است. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین تیمارهاست ( $P < 0.05$ ).

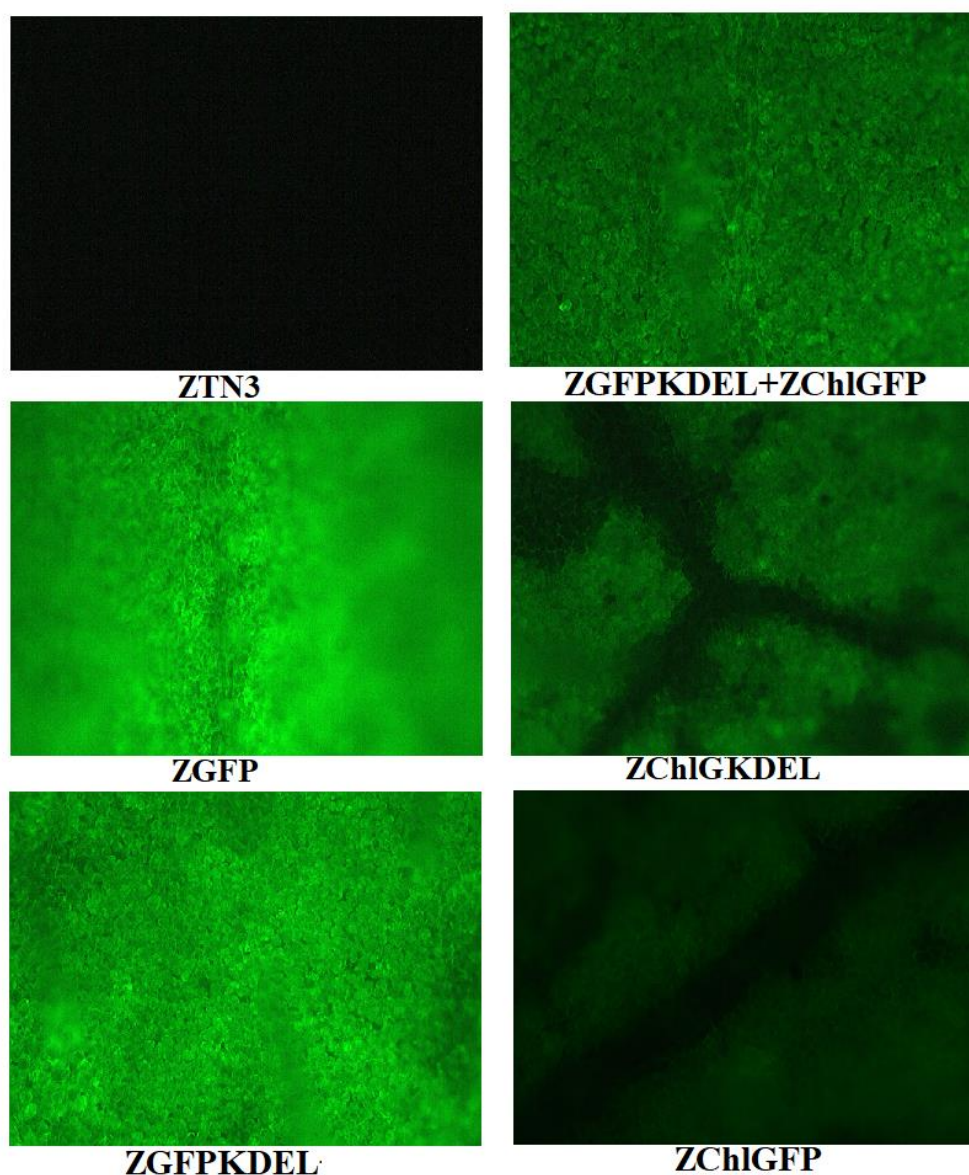
**Figure 5.** Fluorescence intensity resulting from the expression of green fluorescent protein (GFP) in squash plants inoculated with viral clones based on Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) used as recombinant viral vectors in this study (Table 2). The name of each viral vector is indicated below the corresponding column. Different letters above the columns indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶. نتایج الیزا با استفاده از آنتی سرم علیه GFP برای هر کدام از تیمارها در یک دوره ۲۵ روزه پس از مایه زنی با همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل‌های نو ترکیب ویروس مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۲): نام حامل ویروسی مایه زنی شده بر برگ کدو در کادر مربوطه آورده شده است.

**Figure 6.** ELISA results using antiserum against GFP for each treatment over a period of 25 days after inoculating with viral clones based on zucchini yellow mosaic virus as viral recombinant vectors used in this study (Table 2); the name of the viral vector inoculated on squash leaves is given in the corresponding box.





شکل ۷. تصاویر ریزنگاره فلورسنت در مقیاس 100X از گیاهان کدوی مایه زنی شده با همسانه‌های ویروسی مبتنی بر ویروس موزاییک زرد کدو به عنوان حامل‌های نو ترکیب ویروس مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۲)؛ نام حامل ویروسی مایه زنی شده بر برگ کدو در زیر تصویر مربوطه آورده شده است.

**Figure 7. Fluorescent micrographs at 100X scale of the squash plant after inoculating with viral clones based on zucchini yellow mosaic virus as viral recombinant vectors used in this study (Table 2); the name of the viral vector inoculated on squash leaves is given below the corresponding image.**

می‌رسد در چنین گیاهانی افزایش چند برابری میزان پروتئین نو ترکیب، به دلیل انتقال پروتئین از محیط سیتوزولی به شبکه‌ی اندوپلاسمی است که در نتیجه

است، که به عنوان یک سیگنال نگه‌دارنده عمل می‌کند و از انتقال پروتئین‌ها به دیگر بخش‌های سلول جلوگیری می‌کند (Qin *et al.* 2020, Kermod 2021). به نظر

سبزینه و مانع انباشتن پروتئین‌هایی با پپتید SEKDEL شود ولی این که افزودن تنها چند اسید آمینه فیزیولوژی بیماری را تغییر می‌دهد می‌تواند موضوع تحقیقات بعدی قرار گیرد تا ساز و کار مولکولی آن یافت شود. گذشته از تغییر علائم، نتایج نشان داد میزان بیان GFP در گیاهان مایه زنی شده با ZGFPKDEL، 20 روز پس از مایه زنی به بیشترین مقدار خود رسید و نسبت به ZGFP افزایش معنی دار در بیان پروتئین نوترکیب داشت. این نتایج با استفاده از تصویربرداری کونفوکال مورد تایید قرار گرفت و میزان پرتوی فلورسنت در برگ تیمار ZGFPKDEL نسبت به شاهد قویتر بود (شکل ۴) که نشان دهنده‌ی افزایش بیان GFP است و این یافته با سایر گزارش‌ها مبنی بر افزایش بیان ژن بیگانه با هدایت به شبکه اندوپلاسمی مطابقت دارد (Goojani *et al.* 2013, Rozov & Deineko 2022, Song *et al.* 2024).

استفاده از پپتید انتقال نیز برای هدایت پروتئین نوترکیب به کلروپلاست به کار رفت. گزارش‌های متعددی وجود دارد که از پپتیدهای انتقال مختلف برای این منظور در گیاهان تراریخت (Muthamilselvan *et al.* 2019, Rozov & Deineko 2022) و به ندرت در حامل‌های ویروسی (Marillonnet *et al.* 2004) استفاده شده است. ولی به کار بردن پپتید انتقال کلروپلاستی در این پژوهش نه تنها باعث افزایش میزان پروتئین نوترکیب نشد بلکه نسبت به تیمار شاهد هم در آزمون الیزا و هم در تصویربرداری کونفوکال، کاهش ردیابی پروتئین گزارشگر مشاهده شد. این کاهش علاوه بر تیمار ZChIGFP، در تیمار ZChIGKDEL که هر دو پپتید انتقال را به همراه داشت مشاهده شد. بنابر این نتایج، احتمال داده می‌شود که پپتید انتقال کلروپلاستی هنگام فرایند شکست پروتئولیتیکی یا فرایندهای دیگر دچار تغییر شده و کارایی مورد انتظار را نداشته باشد. همچنین در مورد مایه زنی همزمان دو حامل ZGFPKDEL و ZChIGFP، انتظار این

پروتئین را از فعالیت‌های پروتئولیتیک حفظ می‌کند. مکانیزم عملکرد SEKDEL به این صورت است که پروتئین‌هایی که این توالی را دارند، توسط گیرنده‌های موجود در دستگاه گلژی شناسایی می‌شوند و به شبکه اندوپلاسمی بازگردانده می‌شوند. این فرآیند به حفظ و انباشته شدن پروتئین‌های نوترکیب در این شبکه کمک می‌کند و در بسیاری از پژوهش‌ها برای افزایش تولید و پایداری پروتئین‌های مورد نظر استفاده می‌شود. این راهبرد همچنین می‌تواند به بهبود تاشدگی و پردازش پروتئین‌ها کمک کند، زیرا شبکه اندوپلاسمی محیط مناسبی برای این فرآیندها فراهم می‌کند (Samy *et al.* 2020, Cela *et al.* 2022). از طرفی، یک راهکار برای جلوگیری از تغییرات پس از ترجمه‌ی ناخواسته در مورد برخی پروتئین‌ها مانند scFv، ذخیره‌ی پروتئین نوترکیب (بیشتر در مورد پروتئین‌های دارویی) به درون شبکه‌ی اندوپلاسمی است (Mark *et al.* 2022). گزارش‌های معدودی درباره‌ی افزودن SEKDEL به پروتئین نوترکیب در سامانه‌ی بیانی مبتنی بر ویروس گیاهی وجود دارد که نشان داده‌اند که هدایت پروتئین نوترکیب بیان شده از یک حامل ویروسی مانند ویروس ایکس سیب‌زمینی و ویروس موزائیک توتون باعث افزایش بیان پروتئین نوترکیب شده است (Bulaon *et al.* 2020). بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی بیان و هدایت GFP به شبکه اندوپلاسمی، با افزودن SEKDEL به انتهای کربوکسیلی پروتئین نوترکیب، بیان آن افزایش یافت و علاوه بر این علائم حامل ویروسی نسبت به شاهد (ویروس دارای GFP بدون پپتیدهای نشانه) تغییر کرد و از موزائیک زرد به رگبرگ نواری تغییر یافت که این پدیده می‌تواند از نظر بیماری شناسی مهم باشد. هر چند بیان پروتئین‌های مختلف با حامل ویروسی می‌تواند باعث تغییر در علائم شود، ولی گزارشی مبنی بر تغییر علائم با افزودن پپتید نشانه یافت نشده است. ممکن است بافت اطراف آوندها ساز و کاری داشته باشد که باعث متراکم شدن



سامانه است (Mett et al. 2008). بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان همسانه‌ی ویروسی حاوی ژن نوترکیب را به طور مستقیم روی برگ گیاه کدو یا به طور غیر مستقیم، توسط عصاره گیاه سلمه‌تره تیمار شده، مایه زنی کرده و در فاصله زمانی دو تا سه هفته پس از مایه زنی و ظهور علائم می‌توان اقدام به برداشت برگ‌ها و استخراج پروتئین کرد، در حالی که باززایی گیاهان تراریخت و انتقال آنها به گلخانه مشکل، زمان بر، هزینه بر و دارای کارایی کم است. مزیت دیگر سامانه‌ی مورد استفاده در این پژوهش، استفاده از گیاه کدو به عنوان میزبان ویروس می‌باشد که گیاهی با رشد سریع است و در زمان کوتاه می‌تواند توده‌ی برگ‌ی مناسبی تولید نماید و به آسانی با مالش مکانیکی عصاره یا همسانه آلوده کننده مایه زنی با کارایی زیاد انجام می‌شود. در کنار این مزیت‌ها نگرانی‌هایی نیز وجود دارد که باید به آنها پاسخ داده شود؛ نخست این که افزودن ژن پروتئین بیگانه به ژنوم یک ویروس می‌تواند منجر به بروز ویروس جدید شده که در صورت فرار به طبیعت باعث خسارت فراوان شود، بنابراین لازم است احتیاط لازم در پرورش گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط کنترل شده صورت پذیرد. به طور خلاصه، در این پژوهش، امکان استفاده از ZYMV به عنوان حامل بیانی در کدوئیان بررسی شد. اکنون ابزاری در اختیار داریم که می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را به میزان بالا تولید کرد. امید است که بتوان از حامل‌های ویروسی به عنوان ابزاری برای تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی استفاده کرد. همچنین حامل‌های ویروسی می‌توانند ابزاری برای بیان ژن‌های مختلف باشند که استفاده از آنها را در مطالعات ژنومی درون گیاه، به خصوص در زمینه خاموشی ژن امکان پذیر می‌نماید. تنوع زیاد در گیاهان و حامل‌های ویروس گیاهی وجود گزینه‌های مختلف در این سامانه می‌تواند احتمال یافتن روش‌های بهتر و دارای کارایی بیشتر برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مختلف را افزایش دهد. هنوز

بود که میزان افزایش بیان نوترکیب دست کم به اندازه تیمار مایه زنی با ZGFPKDEL به تنهایی باشد ولی نتایج الیزا، تصاویر کونفوکال و فلورسنت نشان داد که میزان بیان GFP در تیمار توام کمتر از تیمار ZGFPKDEL و حتی ZGFP است. در این مورد احتمال دارد مایه زنی حامل ویروسی در دو مرحله موجب فعال شدن فرایند خاموشی شده و بخشی از سامانه تکثیر ویروسی توسط آن یا فرایندهای دیگر دفاعی گیاه مختل شده باشد.

تصاویر ریزنگاره‌ی فلورسنت نشان داد که در حامل‌هایی که GFP دارای پپتید نشانه کلروپلاستی بود، پروتئین گزارشگر در داخل آوندها ردیابی نشد و نشان می‌دهد که وارد آوندها نشده است. این که چرا افزودن این پپتید باعث جلوگیری از ورود پروتئین نوترکیب به رگبرگ‌ها و حتی سلول‌های کناری می‌شود، بدون جواب باقی مانده و مطالعات بیشتری برای پاسخ به آن نیاز می‌باشد.

از ابتدای دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی، به منظور بهبود صفات زراعی، گیاهان تراریخت مهندسی شدند و به عنوان ابزاری برای تولید پروتئین هم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Karg & Kallio 2009). به کار بردن گیاهان به عنوان میزبان‌هایی برای بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب هنوز در حال گسترش است. علاوه بر گیاهان تراریخت، روش‌های مختلفی مانند Agroinfiltration (Li et al. 2007) و استفاده از حامل‌های ویروس گیاهی برای استفاده از گیاهان به عنوان بیورآکتور به کار رفته است که در این بین حامل‌های ویروسی از نظر کمی و کیفی عملکرد مناسبی در بیان نوترکیب داشته‌اند (Egelkrou et al. 2012).

استفاده از گیاهان تراریخت در مقایسه با سامانه‌ی تولید پروتئین بر اساس حامل‌های ویروسی، بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر است در حالی که نتیجه بستگی به جایگاه انتقال ژن دارد؛ علاوه بر این، میزان بالای بیان پروتئین، بکنواخت بودن و پایداری نوترکیب، نگرانی زیستی کمتر نسبت به مواد دخیل در فرایند تراریخت سازی از مزایای دیگر این

کاربردهای بیوتکنولوژی مهم باشد. در نتیجه، استفاده از توالی SEKDEL در طراحی حامل‌های پروتئینی نوترکیب پیشنهاد می‌شود تا وضعیت هدف‌گیری درون سلولی مطلوب‌تر شود. آینده‌پژوهی در این حوزه می‌تواند شامل بررسی کارایی و پایداری طولانی‌مدت پروتئین‌های مختلف نوترکیب و همچنین مطالعه‌ی بیشتر مکانیسم‌های مولکولی مؤثر بر هدف‌گیری و انباشته‌شدن پروتئین‌ها باشد.

محدودیت‌های سامانه فوق در بیان پروتئین نوترکیب در سلول گیاهی مشخص نیست اما تلاش برای استفاده از آنها به منظور افزایش هر چه بیشتر سطح تولید پروتئین همچنان ادامه دارد. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن پپتید SEKDEL به انتهای کربوکسیلی پروتئین GFP به طور مؤثری می‌تواند سبب تجمع بیشتر پروتئین در شبکه‌ی اندوپلاسمی شود. این افزایش انباشته‌شدن و بیان GFP می‌تواند برای بهبود بیان پروتئین‌های نوترکیب و سایر

## References

## منابع

- Abd-Aziz N., Tan B. C., Rejab N.A., Othman R.Y. and Khalid N. 2020. A new plant expression system for producing pharmaceutical proteins. *Molecular Biotechnology* 62: 240-251. 10.1007/s12033-020-00242-2
- Ahsan M., Ashfaq M., Amer M. A., Shakeel M. T., Mehmood M. A., Umar M. and Al-Saleh M. A. 2023. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) as a serious biotic stress to cucurbits: prevalence, diversity, and its implications for crop sustainability. *Plants* 12: 3503. 10.3390/plants12193503
- Bulaon C. J. I., Shanmugaraj B., Oo Y., Rattanapisit K., Chuanasa T., Chaotham, C. and Phoolcharoen, W. 2020. Rapid transient expression of functional human vascular endothelial growth factor in *Nicotiana benthamiana* and characterization of its biological activity. *Biotechnology Reports* 27: e00514. 10.1016/j.btre.2020.e00514
- Burnett M. J. and Burnett A. C. 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet* 2: 121-132. 10.1002/ppp3.10073
- Cela I., Dufresne B., Rossi C., Luini A., De Laurenzi V., Federici L. and Sallese M. 2022. KDEL receptors: Pathophysiological functions, therapeutic options, and biotechnological opportunities. *Biomedicines* 10: 1234. 10.3390/biomedicines10061234
- Coates R. J., Young M. T. and Scofield S. 2022. Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants. *Frontiers in Plant Science* 13: 1074531. 10.3389/fpls.2022.1074531
- Egelkrou E., Rajan V. and Howard J.A. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science* 184: 83-101. 10.1016/j.plantsci.2011.12.005
- Feng Z., Li X., Fan B., Zhu C. and Chen Z. 2022. Maximizing the production of recombinant proteins in plants: from transcription to protein stability. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 13516. 10.3390/ijms232113516
- Fidan O. and Secgin Z. 2024. Molecular Farming for the Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Applications of Plant Molecular Farming*. Springer, pp. 235-258. 10.1007/978-981-97-0176-6\_9
- Gleba Y., Marillonnet S. and Klimyuk V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 182-188. 10.1016/j.pbi.2004.01.003
- Gleba Y., Klimyuk V., and Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 159-165. doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002
- Goh C. J. and Hahn Y. 2021. Analysis of proteolytic processing sites in potyvirus polyproteins revealed differential amino acid preferences of NIa-Pro protease in each of seven cleavage sites. *PLoS One* 16: e0245853. 10.1371/journal.pone.0245853
- Goojani H. G., Javaran M. J., Nasiri J., Goojani E. G. and Alizadeh H. 2013. Expression and large-scale production of human tissue plasminogen activator (t-PA) in transgenic tobacco plants using different signal peptides. *Applied biochemistry and biotechnology* 169: 1940-1951. 10.1007/s12010-013-0115-4

- Hefferon K. L. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* 433: 1-6. 10.1016/j.virol.2012.06.012
- Hsu C. H., Lin S. S., Liu F. L., Su W. C. and Yeh S. D. 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* 113: 1079-1085. 10.1016/j.jaci.2004.02.047
- Karg S. R. and Kallio P. T. 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology advances* 27: 879-894. 10.1016/j.biotechadv.2009.07.002
- Kermode A. R. 2021. Regulation of plant gene expression at the posttranslational level: applications to genetic engineering. *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity Modern Approaches*. CRC Press, pp. 317-390. 10.1201/9781003210252-10
- Adams M. J., Zerbini F. M., French R., Rabenstein F., Stenger D. C. and Valkonen J. P. T. .2012. Family Potyviridae, pp. 1069-1089. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (Eds). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, USA
- Li J., Chen M., Liu X. W., Zhang H. C., Shen F. F. and Wang G. P. 2007. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce. *Scientia Horticulturae* 112: 258-265. 10.1016/j.scienta.2006.12.047
- Lin S. S., Hou R. F. and Yeh S. D. 2002. Construction of in vitro and in vivo infectious transcripts of a Taiwan strain of Zucchini yellow mosaic virus. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 43: 261-269
- Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V. and Gleba Y. 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 6852-6857. 10.1073/pnas.0400149101
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V. and Gleba Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *National Biotechnology* 23: 718-723. 10.1038/nbt1094
- Mark J. K. K., Lim C. S. Y., Nordin F. and Tye G. J. 2022. Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. *Molecular Biology Reports* 49: 10593-10608. 10.1007/s11033-022-07651-3
- Mett V. Farrance C. E, Green B. J. and Yusibov V. 2008. Plants as biofactories. *Biologicals*, 36: 354-358
- Muthamilselvan T., Kim J. S., Cheong G. and Hwang I. 2019. Production of recombinant proteins through sequestration in chloroplasts: a strategy based on nuclear transformation and post-translational protein import. *Plant Cell Reports* 38: 825-833. 10.1007/s00299-019-02431-z
- Naseri Z., Khezri G., Davarpanah S. J. and Ofoghi H. 2019. Virus-based vectors: A new approach for the production of recombinant proteins. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 6: 6-14. 10.29252/jabr.06.01.02
- Park K. Y. and Wi S. J. 2016. Potential of plants to produce recombinant protein products.. *Journal of Plant Biology* 59: 559-568. s12374-016-0482-9
- Peyret H. and Lomonosoff G. P. 2015. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal* 13: 1121-1135. doi.org/10.1111/pbi.12412
- Qin Q., Zhao T., Zou W., Shen K. and Wang X. 2020. An endoplasmic reticulum ATPase safeguards endoplasmic reticulum identity by removing ectopically localized mitochondrial proteins. *Cell Reports* 33. 10.1101/2020.09.27.316026
- Ramos-Vega A., Angulo C., Bañuelos-Hernández B. and Monreal-Escalante E. 2021. Microalgae-made vaccines against infectious diseases. *Algal Research* 58: 102408. 10.1016/j.algal.2021.102408
- Rozov S. M. and Deineko E. V. 2022. Increasing the efficiency of the accumulation of recombinant proteins in plant cells: the role of transport signal peptides. *Plants* 11: 2561. 10.3390/plants11192561
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>th</sup>ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1546 p
- Samy A., Kaneyoshi K. and Omasa T. 2020. Improvement of intracellular traffic system by overexpression of KDEL receptor 1 in antibody-producing CHO cells. *Biotechnology Journal* 15: 1900352.

10.1002/biot.201900352

- Schillberg S. and Spiegel H. 2022. Recombinant protein production in plants: A brief overview of strengths and challenges. *Recombinant Proteins in Plants: Methods and Protocols*, 1-13. 10.1007/978-1-0716-2241-4\_1
- Sethi L., Kumari K. and Dey N. 2021. Engineering of plants for efficient production of therapeutics. *Molecular Biotechnology* 63: 1125-1137. 10.1007/s12033-021-00381-0
- Sivamani Y., Hegde S., Bhat A. R., Sajal H. and Elayaperumal S. 2024. Recombinant DNA technology and gene therapy. *Biochemical and Molecular Pharmacology in Drug Discovery*. Elsevier, pp. 353-376. 10.1016/b978-0-443-16013-4.00017-8
- Soetens E., Ballegeer M. and Saelens X. 2020. An inside job: applications of intracellular single domain antibodies. *Biomolecules* 10: 1663. 10.3390/biom10121663
- Song S. J., Diao H. P., Guo Y. F. and Hwang I. 2024. Advances in Subcellular Accumulation Design for Recombinant Protein Production in Tobacco. *BioDesign Research* 6: 0047. 10.34133/bdr.0047
- Wang M. and Gonsalves D. 1990. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Disease* 74:154-158. 10.1094/PD-74-0154