بیان و خالص سازی پروتئین حرکتی ویروس موزائیک پیسک سبز خیار با استفاده از سامانه حامل ویروس گیاهی

سید محسن نساج حسینی[۱]، مسعود شمس بخش[۲*]، علی هاتف سلمانیان[۳]، شای دونگ یه[٤]

[۱]دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳]دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران، ایران
[٤]استاد دانشگاه ملی چونگ شینگ، تایچونگ، تایوان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/٦/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲٤

چکیده

به منظور تولید و خالص‌سازی پروتئین حرکتی ویروس موزائیک پیسک سبز خیار (*Cucumber green mosaic mottle virus*, CGMMV)، از یک حامل ویروس گیاهی که از همسانه‌ی آلوده کننده ویروس موزائیک زرد کدو به دست آمده است، استفاده شد. قاب خواندنی رمز کننده پروتئین حرکتی ویروس (CGMMV MP) میان قاب‌های P1 و HC-Pro در حامل ZYMV قرار داده شد. توانایی آلوده کنندگی حامل نوترکیب با مالیدن پلاسمید روی گیاه سلمه تره و بروز لکه‌های موضعی تایید شد. سپس یک لکه منفرد برای انتقال مکانیکی ویروس نوترکیب به کدو در مرحله دو برگی استفاده شد. پایداری بیان پروتئین نوترکیب با انتقال پی در پی ویروس نوترکیب از گیاهان مایه زنی شده به گیاه سالم و نیز در طول یک دوره‌ی ۳۰ روزه پس از مایه زنی ارزیابی شد. برگ گیاهان مایه زنی شده به وسیله RT-PCR و آزمون وسترن بلات بررسی شد. پروتئین نوترکیب به روش رسوب در شیب غلظت سوکروز و سپس استخراج از ژل خالص سازی شد و از هر مرحله نمونه گیری به عمل آمد و با آزمون وسترن بلات و SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که دو هفته پس از مایه زنی ۱/۸ تا ۲/۲ گرم پروتئین نوترکیب از هر صد گرم برگ کدو قابل دستیابی است. همچنین حامل نوترکیب پس از ۱۰ بار انتقال متوالی و پس از یک دوره ۳۰ روزه پایدار بود. این پژوهش روشی سریع و آسان برای تولید فراوان پروتئین حرکتی ویروس موزائیک پیسک سبز خیار در گیاه ارایه می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *بیان موقت، پروتئین نوترکیب، ZYMV.*

* نویسنده مسئول: مسعود شمس بخش تلفن: ۰۲۱٤۸۲۹۲۲۷٤ Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

ویروس موزائیک پیسک سبز خیار *Cucumber green mottle mosaic virus*; (CGMMV) گونه‌ای از جنس *Tobamovirus* و خانواده‌ی *Virgaviridae* بیمارگر بذرزاد بوده و باعث خسارتی در حدود ۱۵ درصدی در بسیاری از کدوئیان می‌شود (Antignus et al., 2001; Shang et al., 2011). پیکره‌ی CGMMV میله‌ای شکل و طول و قطر آن به ترتیب ۳۰۰ و ۱۸ نانومتر است (Tan et al., 2000)، ژنوم آن یک قطعه آر اِن اِی تک رشته‌ای مثبت، به طول حدود ٦٤٥٠ نوکلئوتید می باشد (Ugaki et al., 1991). ژنوم ویروس حاوی چهار قاب خواندنی باز است که در نتیجه چهار پروتئین را رمزگذاری می‌کند: دو پروتئین همانندسازی (۱۳۰ و ۱۸۰ کیلو دالتون) که با راهبرد پیوسته خوانی کدون خاتمه‌ی ضعیف بیان می‌شوند، پروتئین حرکتی (MP، ۳۰ کیلو دالتون) و پروتئین پوششی (CP، ۱۷ کیلودالتون) که هر دو از طریق آر اِن اِی زیرژنومی بیان می‌شوند و حدود ۲۵ نوکلئوتید همپوشانی دارند (Ugaki et al., 1991; Tan et al., 2000; King et al., 2012). انتهای ′۵ ژنوم ویروس دارای کلاهک متیله شده و انتهای ′۳ ساختار شبه tRNA دارد (King et al., 2012). علایم بارز این بیماری در کدوئیان، موزائیک سیستمیک، ایجاد تاول روی میوه و لهیدگی مغز میوه است (Shang et al., 2011). انتقال ویروس به سادگی با روش مکانیکی انجام می‌شود و ناقل دیگری برای آن شناخته نشده است. این ویروس نخستین بار در سال ۱۹۳۵ از انگلیس گزارش شد (Ainworth, 1935) و سپس از کشورهای آلمان، فنلاند، فلسطین، عربستان، هند، پاکستان، کره، ژاپن و ایران گزارش شده است (Komuro, 1965; Rahimian & Izadpanah, 1977; Francki et al., 1986; Lee et al., 1990).

در مورد پروتئین حرکتی CGMMV اطلاعات زیادی در دسترس نیست؛ نشان داده شده که این پروتئین در حرکت ژنوم ویروسی به سلول‌های مجاور از راه پلاسمودسماتا دخالت دارد؛ این پروتئین از خانواده پروتئین‌های حرکتی توباموویروس‌ها و پروتئین متصل شونده به آر اِن اِی است (Saito et al., 1988). جزئیات دقیق حرکت سلول به سلول و حرکت سیستمیک ویروس هنوز مشخص نشده است. تعیین ویژگی‌های پروتئین حرکتی و تولید آنتی بادی علیه آن می‌تواند به شناخت بیشتر حرکت ویروس کمک نماید. با توجه به این که بیان و پردازش طبیعی این پروتئین در گیاه انجام می‌شود و به دلیل این که عملکرد آن تحت تاثیر ساختار قرار دارد، تولید و خالص سازی آن در گیاه به شناخت عملکرد و ساختار پروتئین کمک می‌کند. به این منظور، می‌توان ژن پروتئین حرکتی ویروس را به عنوان ژن بیگانه در گیاه تراریخته یا با استفاده از حامل‌های ویروسی بیان نمود. استفاده از گیاه تراریخته وقت-گیر و پرهزینه بوده و نگرانی‌های زیست محیطی همواره در مورد آنها وجود دارد در حالی که استفاده از حامل‌های ویروسی سریع‌تر، ارزان‌تر،

دارای یکنواختی، با ثبات‌تر، تولید پروتئین بیشتر و نگرانی زیست محیطی در مورد ابزار به کار گرفته شده کمتر است (Gleba et al., 2004; Mett et al., 2008; Egelkrout et al., 2012). معرفی حامل‌های ویروس گیاهی به عنوان سامانه‌ی بیان ژن‌های بیگانه در گیاه به همراه فرایند خالص سازی موثر پروتئین‌های بیان شده، جایگزین خوبی برای روش‌های پیشین در بیان پروتیئن شده است (Gopinath et al., 2000; Alamillo et al., 2006; Gleba et al., 2007). به کار بردن حامل‌های ویروس گیاهی برای بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب، ابزار مفیدی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مهم مانند تولید ایمنوژن برای تولید آنتی بادی، بخش متغیر تک زنجیره‌ای مولکول‌های آنتی بادی (scFv)، پروتئین‌های دارویی، واکسن‌های خوراکی و صنعتی در مقیاس زیاد می‌باشد (Chen et al., 2005; Gleba et al., 2008).

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus;* ZYMV) یکی از بیمارگرهای کدوییان شامل خیار، کدو، خربزه و هندوانه است (Desbiez et al., 1997). ژنوم ZYMV مانند همه‌ی گونه‌های جنس *Potyvirus*، یک RNAی تک رشته‌ای مثبت به طول ۹/۶ کیلو باز است که در پیکره‌ی رشته‌ای کپسید پوشی می‌شود و به یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه شده و با شکست پروتئولیتیکی توسط سه پروتئاز ویروسی شامل P1، HC-Pro و NIa به ۱۰ پروتئین فعال پردازش می‌شود (Riechmann et al., 1992; Revers et al., 1999; King et al., 2012). پروتئازهای P1 و HC-Pro در انتهای آمینی پلی پروتئین هستند و انتهای کربوکسیلی خود را با شکست اتوپروتئولیتیک جدا می‌کنند (Oh & Carrington, 1989; Verchot et al., 1991). پروتئاز NIa نیز مسئول شکست پروتئینی باقیمانده‌ی پلی پروتئین هستند (Carrington & Dougherty, 1988; Riechmann et al., 1992). همسانه‌ی آلوده کننده‌ی ZYMV با cDNAی کامل ZYMV TW-TN3 (ZTN3) جدایه‌ی جمع آوری شده از جنوب تایوان) توسط Lin et al. (2002) ساخته شده و پروتئین GFP (green fluorescent protein) در انتهای آمینی ناحیه‌ی HC-Pro قرار داده شده است (Lin *et al.*, 2002). در این تحقیق، به منظور بیان و خالص سازی پروتئین حرکتی CGMMV قاب خواندنی باز CGMMV MP جایگزین قاب خواندنی GFP در حامل مذکور شد. پس از مایه زنی با ویروس نوترکیب، میزان تولید پروتئین، پایداری آن، اثر آن بر علائم و خالص سازی پروتئین نوترکیب از عصاره‌ی گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و نسخه برداری معکوس (RT)

برای تکثیر ژن رمز کننده پروتئین حرکتی CGMMV، آغازگرهای اختصاصی بر اساس ترادف MP طراحی و جایگاه‌های برشی *Sph*I و *Kpn*I به ترتیب در ابتدای آغازگرهای پیش بر و معکوس قرار داده شد، همچنین رمز ژنتیکی خاتمه از انتهای آغازگر معکوس حذف شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پنج میکرولیتر بافر (۱۰X)، پنج واحد آنزیم KOD plus (ShineGene Molecular Biotech, Inc., China)، دو میکرولیتر $MgSO_4$ با غلظت ۲۵ میلی مولار، پنج میکرولیتر مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر آغازگرهای پیش سو و پس سو با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۳ میکرولیتر دی اِن اِی الگو در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenePro^{TM}, China) به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ºC ۹٤، اتصال ۳۰ ثانیه در ºC ۵۵ و بسط ۵۰ ثانیه در ºC ٦٨ برای ۳۵ سیکل. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ºC ۹٤ برای ۳ دقیقه و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ºC ٦٨ نیز انجام گردید. برای غربال کردن کلنی‌های نوترکیب، از روش colony PCR استفاده شد. در این روش ابتدا کلنی‌ها به صورت تصادفی انتخاب و به لوله‌ی ۰/۲ میلی لیتری منتقل شدند. سپس به هر لوله محلول پایه‌ی PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، دو میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر از آغازگرها (mZ1155 و pCgMP، ۱۰ میلی مولار) و یک واحد *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) افزوده و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی مشابه برنامه ذکرشده بود با این تفاوت که از دمای ºC ۷۲ برای بسط و بسط نهایی استفاده شد. برای انجام RT-PCR، آر اِن اِی کل با استفاده از کیت TRIzol (Invitrogen, USA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده از برگهای کدوی آلوده استخراج شد. به منظور ساخت دی اِن اِی مکمل (cDNA)، یک میکرولیتر آر اِن اِی کل استخراجی با ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشتی mZ1155 ۱۰ میلی مولار (طراحی شده بر اساس ترادف حامل) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و در دمای ºC ۷۵ به مدت پنج دقیقه قرار گرفتند. پس از سرد نمودن لوله‌ها روی یخ، ۲/۵ میکرولیتر بافر RT (۱۰x)، پنج میکرولیتر مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر DTT با غلظت ۰/۱ مولار و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس (MMuLV, Invitrogen, USA) اضافه و به مدت یک ساعت در درون دستگاه بن ماری، در دمای ºC ٤٢ قرار داده شدند. تکثیر قطعه ژن CGMMV MP مشابه شرایط colony PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (pCgMP-BNS و

mCgMP-KN، جدول ۱) و با اضافه کردن یک میکرولیتر cDNA انجام گرفت. قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد از نظر وجود باند مربوطه بررسی شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر CGMMV MP، کلنی PCR و RT-PCR.

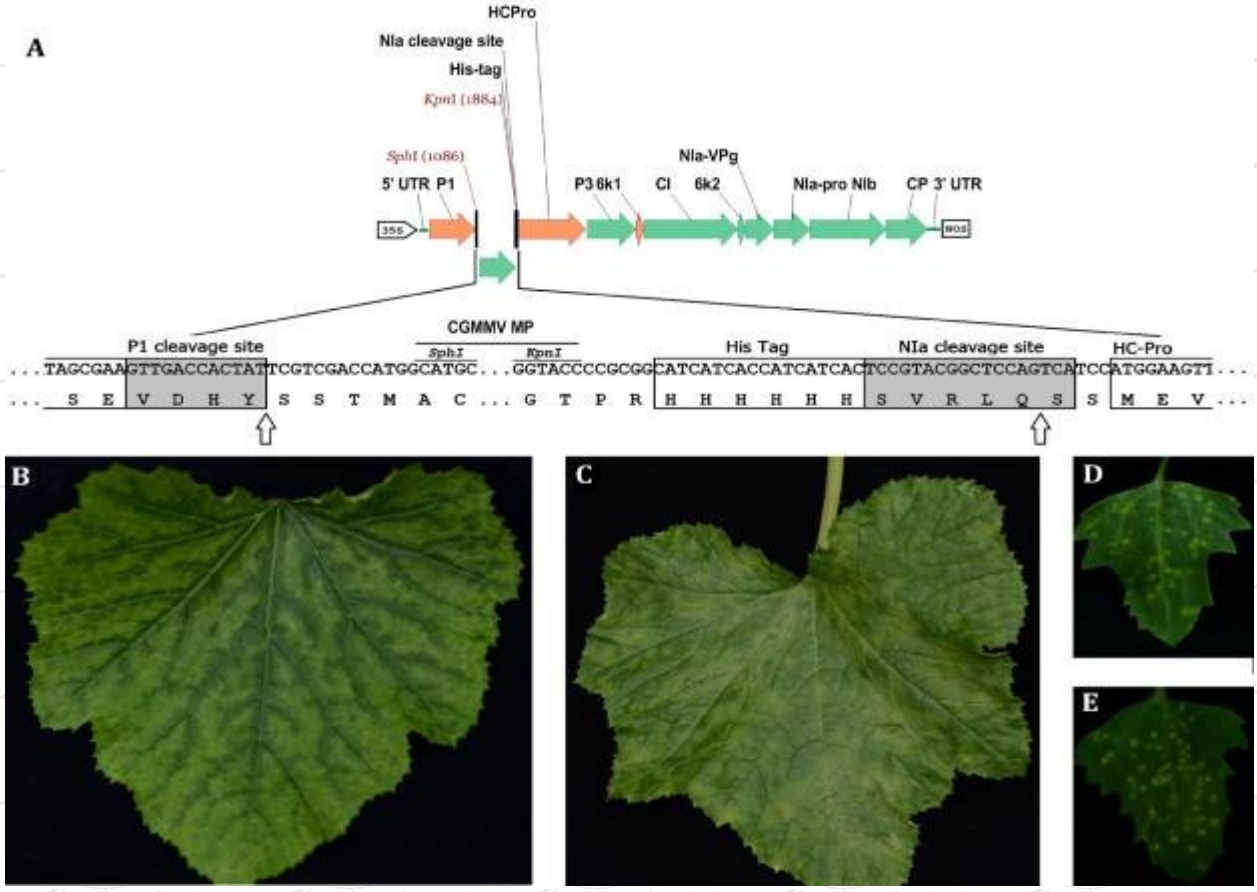
Table 1-The primers used for amplification of CGMMV MP, colony PCR and RT-PCR.

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence	جایگاه برشی (زیرخط دار) Restriction site (underlined)	طول آغازگر Length (bp)
pCgMP-BNS	CCGGATCCCCATGGGCATGCATGTCTCTAAGTAAGGTG TCAGT	*Sph*I	43
mCgMP-KN	GGGCTAGCGGTACCGGTGTGATCGGATTGTAAGC	*Kpn*I	34
mZ1155	ACTTTGCACACATGATCTGG	-	20

تهیه ویروس نوترکیب

همسانه‌ی آلوده کننده‌ی p35SZYMVGFPhis3 (ZGFP)، با cDNAی کامل ZYMV TW-TN3 (جدایه تایوان) که بعد از پروموتر 35S ویروس موزائیک گل گلم (*Cauliflower mosaic virus;* CaMV) قرار گرفته به عنوان حامل ویروسی برای بیان CGMMV MP در گیاه کدو به کار گرفته شد. در این همسانه ژن گزارشگر GFP بین ژنهای HC-Pro و P1 قرار داده شد و شش اسید امینه‌ی هیستیدین و یک سایت هضم پروتئینی مربوط به NIa در انتهای آمینی HC-Pro، به ترتیب برای تسهیل ردیابی و تولید شکل آزاد پروتئین قرار داده شده است (Hsu *et al*., 2004). پس از تکثیر ژن CGMMV MP، محصول PCR با استفاده از کیت تصفیه (PCR Clean up kit, GeneMark, Taiwan) خالص سازی شد و در واکنش برش آنزیمی دوگانه با آنزیمهای *Sph*I و *Kpn*I (Invitrogen, USA) برش داده شد. آنزیمهای برشی مشابه برای خارج کردن ژن GFP از حامل ZYMV به کار رفت و محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز هشت درصد تفکیک شد و باند حاصل از ژل جدا شده و با استفاده از کیت استخراج GeneMark خالص سازی شد. حامل و قطعه مورد نظر (insert) به نسبت یک به هشت در واکنش اتصال(400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP [pH 7.8 at 25°C], 1% T4 DNA ligase, [Fermentas, USA]) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. محصول واکنش اتصال به روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد *E. coli* XLI ترانسفورم گردید (Sambrook & Russell, 2001). کلنی‌های حاصل با استفاده از colony PCR و آغازگرهای اختصاصی حامل (mz1155) و MP (pCgMP-BNS) غربال شدند. دو نمونه از کلنی‌های مثبت

برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. برای اطمینان از صحت کلنی‌ها، پلاسمیدهای نوترکیب با برش آنزیمی *Eco*RI به همراه بافر و شرایط پیشنهادی شرکت سازنده (Fermentas, USA) و سپس توالی‌یابی (ABI 3730, Applied Biosystem, CA) بررسی شدند. پلاسمید نوترکیب pZCgMP نامیده شد (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار ژنتیکی حامل pZCgMP؛ نام قاب‌های خواندنی و جایگاه قرار گرفتن CGMMV MP مشخص شده است. جایگاه‌های شناسایی محل برش و محل برش پروتئین به ترتیب به صورت سایه دار و با پیکان نشان داده شده است (A). علایم pZCgMP روی برگ کدو به صورت رگبرگ نواری (B) و روی سلمه تره به صورت لکه موضعی (D) در مقایسه با علایم ZYMV TW TN3 به صورت موزائیک زرد روی برگ کدو (C) و روی سلمه تره (E).

Figure 1 -Genetic organization of pZCgMP vector; the name of ORFs and CGMMV MP insertion site were shown. The cleavage recognition sites and the protein cleavage sites were shown as shadowy and with arrows (A). The symptoms of pZCgMP on squash leaf as vein banding (B) and on chenopodium as local lesion (D) compare to the symptoms of pZYMV TW TN3 as yellow mosaic on squash leaf (C) and on chenopodium (E).

بررسی بیماری‌زایی ویروس نوترکیب

پلاسمید نوترکیب (pZCgMP) با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شده (Mini-prep plasmid purification kit, GeneMark) و به صورت مکانیکی با یک گوش پاک کن روی برگ میزبان لکه موضعی (*Chenopodium quinoa*) پوشیده از پودر کربوراندوم، مالیده شد. بعد از ظهور لکه‌های موضعی، عصاره‌ی یک لکه‌ی منفرد به صورت مکانیکی روی برگ کدو در مرحله دو برگی مالیده شد. گیاهان مایه زنی شده با pZYMV TW-TN3 به عنوان شاهد منفی استفاده شدند.

بررسی پایداری ویروس نوترکیب

پایداری سازه‌ی pZCgMP با انتقال پی در پی عصاره‌ی گیاه آلوده به گیاه سالم و طی یک دوره‌ی ۳۰ روزه در یک گیاه بررسی شد. عصاره گیاه کدوی آلوده به ویروس نوترکیب، ۱۰ روز پس از مایه زنی به برگ گیاه سالم مالیده شد. پس از ۱۰ بار انتقال متوالی، از بافت برگ نمونه برداری شد و توسط RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی CGMMV MP (pCgMP-BNS, mCgMP-KN) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). برای بررسی امکان جهش در ژن بیگانه، پس از ۱۰ بار انتقال متوالی و ۳۰ روز پس از مایه زنی در یک گیاه، قطعه‌ی تکثیر شده توالی یابی شد و ترادف امینواسیدی حاصل از آن توسط برنامه Vector NTI Advance 9.0 (Lu & Moriyama, 2004) بررسی شد.

آزمون‌های سرولوژیک

آزمونهای وسترن و الایزا برای ردیابی CGMMV MP نوترکیب و نیز پروتئین پوششی ZYMV در گیاهان کدو آلوده به کار رفت. برای انجام وسترن بلات، ۵۰ میلی گرم بافت برگ آلوده به ویروس نوترکیب ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از آلودگی برداشت شد و با ازت مایع و ساییدن به صورت پودر درآمد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر (100 mM Tris–HCl [pH 7.2], 2% β-mercaptoethanol, 10% sucrose, 0.005% bromophenol blue, 10 mM EDTA) افزوده شد و پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس، پروتئین‌ها واسرشت شدند. پس از سانتریفیوژ کوتاه، محلول رویی در ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید (SDS–PAGE) جداسازی شد و با استفاده از بافر (Tris base, glycine, Methanol) و تانک انتقال (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad, CA) به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ ولت به غشای نیتروسلولزی PVDF (Amersham, USA) منتقل گردید. غشا با بافر شیر خشک بدون چربی هفت درصد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد. پس از افزودن آنتی‌بادی اولیه، غشاء سه بار، هر دفعه به مدت پنج دقیقه با بافر PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8m M Na_2HPO_4, 1.46 mM KH_2PO_4, 0.05% Tween 20) شستشو داده شد. سپس آنتی-

بادی ثانویه افزوده شد و غشای نیتروسلولزی پس از تیمار به مدت ۳۰ دقیقه و دو بار شستشو، با محلول سوبسترا (nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3- indolyl phosphate paratoluidine salt in 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris–HCl, pH 9.5) تیمار شد. برای آزمون الایزا، بافت گیاه آلوده به نسبت ۴۰ برابر با بافر پوششی (50 mM sodium carbonate, pH 9.6, 0.01% sodium azide) مخلوط شد و ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک بشقابک پلی استرن (Greiner Bio-One, Germany) افزوده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ºC قرار داده شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBST (هر بار سه دقیقه)، چاهک‌ها با صد میکرولیتر آلبومین دو درصد (حل شده در بافر PBS) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شدند. صد میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه به چاهک‌ها افزوده و به مدت یک ساعت در دمای ºC ۳۷ قرار داده شد. پس از تکرار شستشو، صد میکرولیتر آنتی بادی ثانویه افزوده و دوباره یک ساعت در دمای ºC ۳۷ 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 چاهک‌های الایزا افزوده شد میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر یک ساعت بعد از افزودن سوبسترا با دستگاه الایزا ریدر (Bio-Tek instrument, USA) ثبت شد. در مورد هر دو آزمون، آنتی بادی تک همسانه‌ای علیه هیستیدین (His-MAb, Amersham Pharmacia Biotech, England) و آنتی سرم چند همسانه‌ای علیه پروتئین پوششی ZYMV با غلظت یک به ۵۰۰۰ به ترتیب برای ردیابی MP دارای His-tag و پروتئین پوششی ZYMV استفاده شد. آنتی بادی ثانویه goat anti-mouse و goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) با غلظت یک به ۵۰۰۰ به ترتیب برای واکنش با His-MAb و آنتی سرم چند همسانه‌ای علیه پروتئین پوششی ZYMV استفاده شدند.

خالص سازی پروتئین نوترکیب

به منظور خالص سازی پروتئین مورد نظر، نخست حلالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. برگهای آلوده به ویروس نوترکیب ۱۵ روز بعد از آلودگی برداشت شد و به نسبت یک به سه وزنی–حجمی با بافر A (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 15 mM $MgCl_2$, 10m M KCl, 20% [v/v] glycerol, 0.05% β-mercaptoethanol, 0.1 mM (phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) ساییده شد. مخلوط حاصل از صافی (Miracloth, Calbiochem, CA) عبور داده شد و پس از تیمار با عوامل مختلف مانند 1% Triton X-100، 1% SDS، 0.1% 2ME، 0.25 mM DTT همراه با Urea 8 M به مدت یک ساعت در دمای اطاق، سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و از محلول رویی و ته نشین نمونه برداری انجام و در آزمون وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. برای خالص سازی پروتئین نوترکیب، روش سانتریفوژ و استخراج از ژل به کار رفت. برگ‌های

آلوده‌ی کدو به نسبت دو برابر وزنی–حجمی با بافر استخراج (100mM Tris–HCl [pH 8.0], 10mM EDTA, 0.25% sodium sulfite) در مخلوط کن به مدت یک تا سه دقیقه هموژنیزه شدند و با سانتریفوژ ۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه ذرات بزرگ جدا شده و عصاره‌ی حاصل از صافی (Calbiochem) عبور داده شد و با Triton X-100 دو درصد در چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد، سپس با سانتریفوژ ۲۵۰۰۰×g به مدت یک ساعت از ستون سوکروز ٤٠ درصد (محلول سوکروز در بافر استخراج، ۱۰ میلی لیتر برای هر لوله) عبور داده شد. ته نشین جدا شده و در یک تا دو میلی لیتر بافر استخراج حل شد و با روش استخراج از ژل خالص سازی بیشتر انجام شد (Yeh & Gonsalves, 1984). پروتئین‌ها در ژل اکریل آمید ۱۵ درصد جدا شدند؛ سپس با KCl ۰/۲۵ مولار سرد در کمتر از ۳۰ ثانیه تیمار شد و باند مربوطه از ژل جدا و با دستگاه استخراج پروتئین (Electro-Eluter 422, Bio-Rad, USA)، پروتئین نوترکیب استخراج شد. حجم برابر (پنج میکرولیتر در هر چاهک) از هر قسمت از فرایند خالص سازی، با استفاده از His-MAb در وسترن بلات و SDS-PAGE بررسی شد. میزان پروتئین خالص شده با مقایسه با BSA (bovine serum albumin) در SDS-PAGE و با نرم افزار Spot Density of AlphaInnotech IS2000 (Alpha Innotech Corporation, CA) محاسبه شد.

نتایج

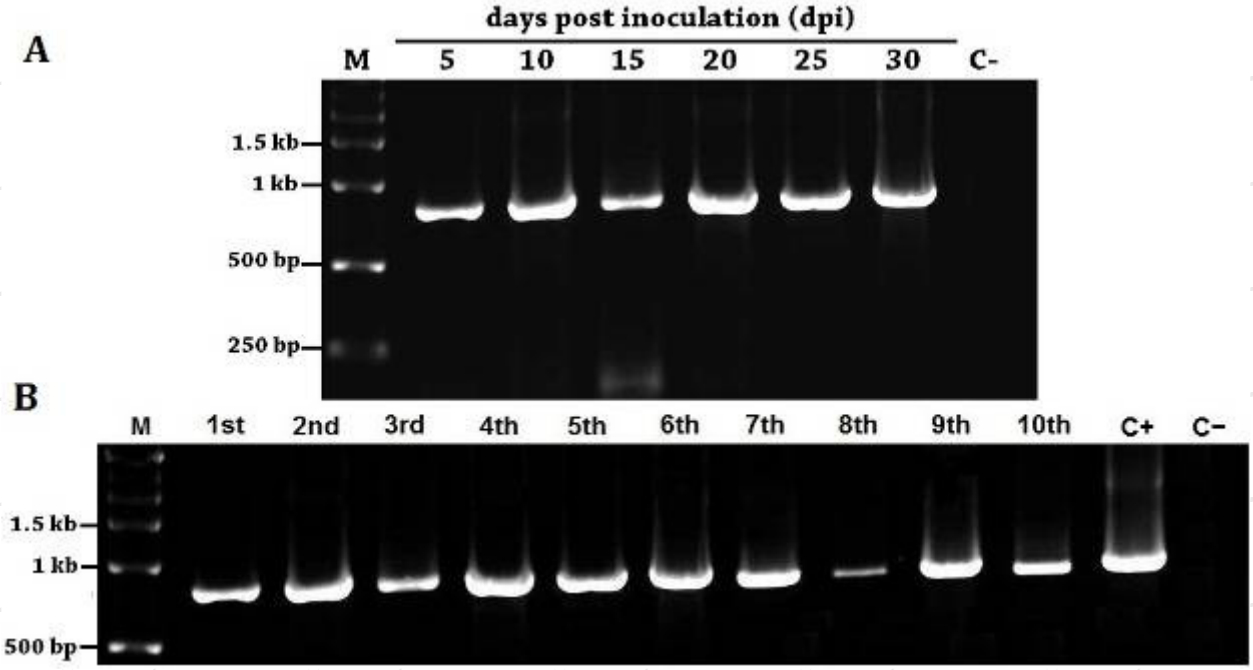
بیماری‌زایی و علایم ویروس نوترکیب

لکه‌های موضعی کلروتیک مشابه آنچه توسط pZYMV TW-TN3 القا می‌شود، هفت تا نه روز پس از مایه زنی ویروس نوترکیب (pZCgMP) روی برگهای *C. quinoa* مشاهده گردید (شکل ۱–D). یک هفته بعد از مایه زنی روی کدو، علائم رگبرگ نواری (vein banding) مشاهده گردید که با علائم موزائیک زرد ویروس طبیعی متفاوت بود (شکل ۱–B و ۱–C). حضور ویروس نوترکیب در گیاهان آلوده با RT-PCR و آزمون‌های سرولوژیک تأیید شد. آغازگرهای اختصاصی CGMMV MP برای تکثیر ژن بیگانه از آر اِن اِی کل استخراج شده از گیاهان مایه زنی شده به کار رفت. قطعه‌ی دی اِن ایِ با طول حدود ۸۲٦ جفت باز مربوط به قطعه‌ی وارد شده به پلاسمید تکثیر شد (شکل ۲).

بررسی پایداری ویروس نوترکیب و بیان پروتئین نوترکیب

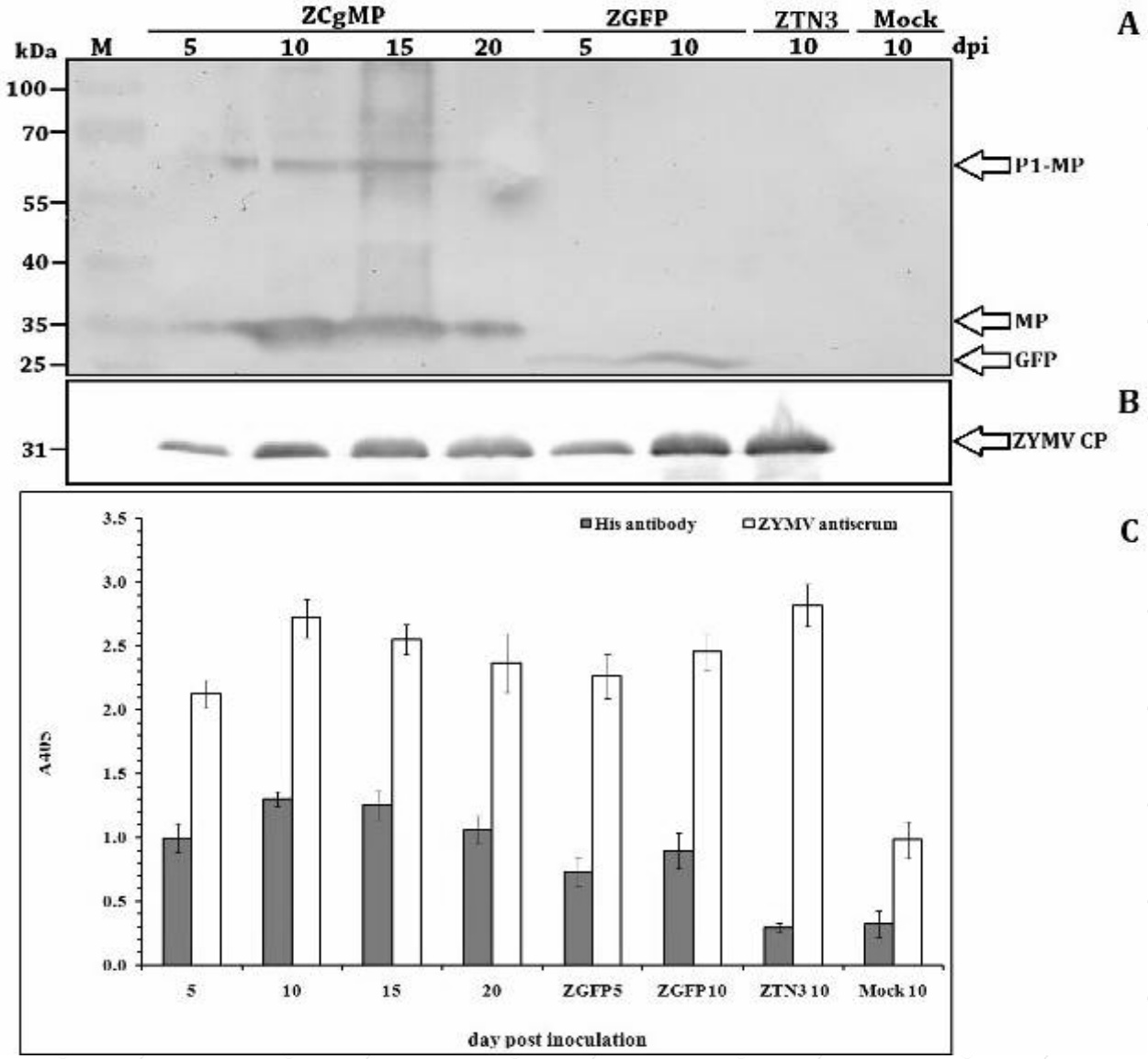
پایداری بیان CGMMV MP توسط حامل ZYMV در کدو ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز پس از آلودگی اولیه و بعد از انتقال پی در پی به گیاهان جدید با RT-PCR نشان داده شد (شکل ۲). بنابراین بیان پایدار CGMMV MP در گیاه سیستمیک در طول دوره‌ی ۳۰ روزه پس از مایه

زنی و بعد از ۱۰ بار انتقال مشاهده شد. توالی یابی محصولات RT-PCR مربوط به آزمون پایداری تغییری در توالی اسیدآمینه‌ای نشان نداد. پروتئین حرکتی نوترکیب بیان شده با ZYMV با وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادی تک همسانه‌ای علیه His ردیابی شد (شکل ۳). پروتئین ۳۳ کیلو دالتونی در عصاره گیاه کدو تا ۲۰ روز پس از مایه زنی با ZYMV نوترکیب ردیابی شد (شکل ۳). پروتئین حرکتی نوترکیب تولید شده ٤ کیلودالتون بزرگ‌تر از پروتئین طبیعی بود که احتمالا به علت افزودن جایگاه‌های برشی و His-tag می‌باشد. افزون بر آن، دو باند پروتئینی ٦٧ و ٨٣ کیلودالتونی نیز مشاهده شد. هیچ واکنش سرولوژیکی در عصاره‌ی گیاه مایه زنی شده با pZYMV TW-TN3 با استفاده از His-MAb مشاهده نگردید. آزمون کمی الایزا بالاترین میزان بیان CGMMV MP را در ۱۵ روز پس از مایه زنی نشان داد. وسترن بلات با استفاده از آنتی سرم ZYMV CP وجود پروتئین حدود ۳۱ کیلودالتونی را در گیاهان آلوده با pZCgMP و pZYMV TW-TN3 نشان داد (شکل ۳).



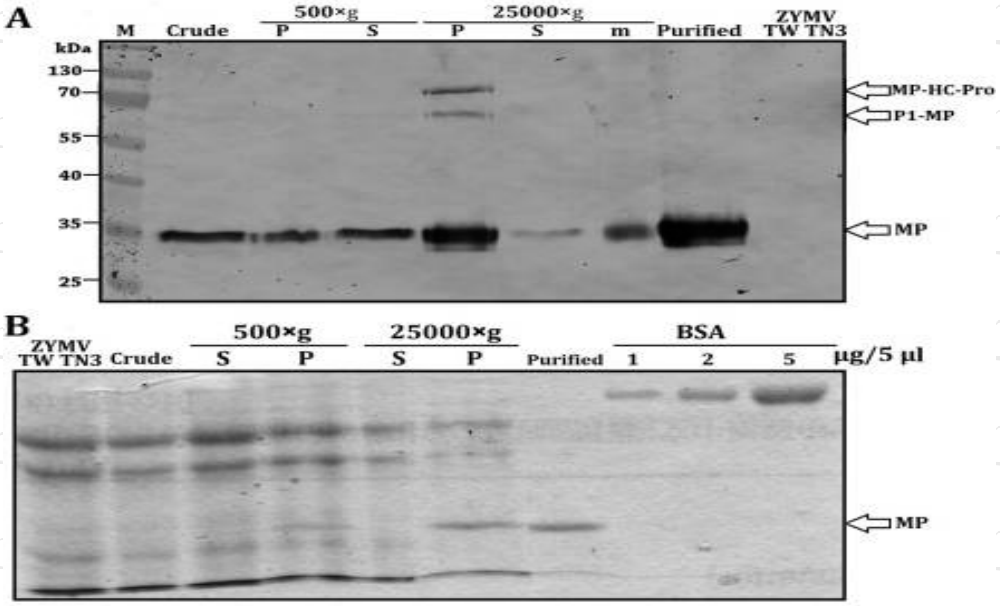
شکل ۲- روش RT-PCR برای آزمون پایداری CGMMV MP در حامل ZYMV تا ۳۰ روز پس از مایه زنی در گیاه کدو (A) و پس از ۱۰ بار انتقال پی در پی (B).

Figure 2- Stability assay of CGMMV MP in ZYMV vector till 30 days post inoculation on squash using RT-PCR (A) and after 10 serial passages (B).



شکل ۳- وسترن بلات برای ردیابی پروتئین نوترکیب ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از مایه زنی با استفاده از His-MAb (A) و ردیابی پروتئین پوششی ZYMV با آنتی سرم علیه آن (B)؛ گیاهان مایه زنی شده با ZGFP به عنوان کنترل مثبت و گیاه مایه زنی شده با ZTN3 و بافر (Mock) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. آزمون الایزای متناظر وسترن بلات (C).

Figure 3- Detection of recombinant protein at 5, 10, 15 and 20 days post inoculation using His-MAb (A) and detection of ZYMV CP using its antiserum (B); plants inoculated with ZGFP were considered as positive control and plants inoculated with ZTN3 and buffer (Mock) were considered as negative control. (C), ELISA test corresponds to western blot treatments.



شکل ٤- مراحل خالص سازی پروتئین نوترکیب در وسترن بلات (A) و SDS-PAGE (B)؛ M، مارکر پروتئین (PageRuller^{TM}Prestained, Fermentas, USA)؛ crude، عصاره گیاه پس از ساییده شدن با بافر استخراج؛ P، ته نشین؛ S، محلول رویی؛ m، فاز میانی؛ Purified، پروتئین خالص شده از ژل؛ ZYMV TW TN3، کنترل منفی؛ BSA، پروتئین آلبومین سرم.

Figure 4- Western blot (A) and SDS-PAGE (B) analysis of purification procedure of the recombinant protein; M, Protein ladder (PageRuller^{TM}Prestained, Fermentas, USA); crude, plant extraction after homogenizing with association buffer; S, supernatant; m, middle phase; Purified, purified protein from gel; ZYMV TW TN3, negative control; BSA, bovine serum albumin.

خالص سازی پروتئین نوترکیب

بررسی حلالیت پروتئین حرکتی نوترکیب نشان داد این پروتئین همواره در ته نشین ردیابی شد (شکل ٤) بنابراین امکان استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی برای خالص سازی آن مناسب نبود. در نتیجه با استفاده از روش سانتریفیوژ ستون سوکروز، پروتئین نوترکیب در ته نشین ردیابی شد و روی ژل پلی اکریل آمید جداسازی شد و با Electro-Eluter (Bio-Rad, USA)، پروتئین نوترکیب از ژل استخراج گردید. بررسی SDS-PAGE مربوط به مراحل خالص سازی نشان داد پروتئین حرکتی نوترکیب به اندازه ۱/۸ تا ۲/۲ میلی گرم از هر ۱۰۰ گرم بافت برگی گیاه کدو مایه زنی شده با ZYMV نوترکیب خالص سازی شد (شکل ٤).

بحث

از ابتدای دهه ۱۹۸۰ میلادی، به منظور بهبود صفات زراعی، گیاهان تراریخت مهندسی شدند ولی به تازگی، بیشتر به عنوان ابزاری برای تولید پروتئین مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Karg & Kallio, 2009). به کار بردن گیاهان به عنوان میزبان هایی برای بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب هنوز

در حال گسترش است. امروزه، سامانه‌های دارای بیشترین میزان بیان از حامل‌های ویروس گیاهی استفاده می‌کنند (Egelkrout et al., 2012). این تحقیق به منظور امکان بیان موفق CGMMV MP در سامانه‌ی بیانی ویروس گیاهی طراحی شد. به دلیل اهمیت تاخورگی صحیح و پردازش یوکاریوتی پروتئین نوترکیب، سامانه‌ی بیانی شامل ZYMV و گیاه کدو برای بیان پروتئین حرکتی CGMMV انتخاب گردید. در این تحقیق، نخست ژن CGMMV MP بین P1 و HC-Pro در حامل ZYMV همسانه سازی شد و پس از مایه زنی گیاه با ویروس نوترکیب، بیان پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. هر چند از نظر تئوری، ژن بیگانه را می‌توان میان هر کدام از ۱۰ قاب خواندنی پوتی ویروس‌ها قرار داد (Masuta et al., 2000)، برخی مطالعات نشان داده‌اند که بیشترین کارایی بیان مربوط به جایگاه میان P1 و HC-Pro است (Chen et al., 2007). با این حال، برخی پروتئین‌ها که در این جایگاه قرار داده شدند با ایمنوبلات ردیابی نشدند یا به میزان بسیار کم ردیابی شدند مانند CGMMV CP یا *Cucumber mosaic virus*-CP (داده‌های منتشر نشده). قرار دادن CGMMV MP در حامل ZYMV، علایم موزائیک زرد را به رگبرگ نواری بدون ایجاد تاخیر تغییر داد که نشان دهنده‌ی اثر بر چرخه زندگی ویروس است. همچنین وارد کردن ژن رمز کننده GFP به ژنوم ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus*, TMV) منجر به از دست رفتن توانایی حرکت سیستمیک در میزبان شده و شدت علایم را نیز در *N. benthamiana* تغییر داده است (Shivprasad et al., 1999). همچنین ویروس موزائیک نواری گندم (*Wheat stripe mosaic virus*; WSMV) دارای GUS قدرت آلوده سازی برخی لاین‌های ذرت را از دست داده است (Choi et al., 2000) در حالی که WSMV-GFP همه‌ی گیاهان غلات را با یک تا پنج روز تاخیر آلوده کرده و علایمی همانند ویروس طبیعی ایجاد می‌کند (Tatineni et al., 2011). این نتایج نشان می‌دهد که قرار دادن ژن بیگانه در ویروس‌ها می‌تواند اثرات قابل توجهی بر زیست شناسی، همانندسازی و حرکت ویروس در گیاهان مختلف داشته باشد. بر اساس نتایج این پژوهش، CGMMV MP در زمانی حدود دو هفته به بالاترین میزان تولید رسید بدون این که عوارض جانبی مربوط به تولید گیاهان تراریخت را داشته باشد. همچنین آزمون پایداری بیان CGMMV MP نشان داد که قاب خواندنی آن در طول یک دوره‌ی ۳۰ روزه پس از آلودگی و نیز پس از ۱۰ بار مایه زنی به گیاه دیگر پایدار است و گیاهان آلوده را می‌توان برای مایه زنی گیاهان سالم به کار برد. هرچند پروتئین نوترکیب تا ۳۰ روز پس از مایه زنی قابل ردیابی بود ولی نتایج الایزا نشان داد که بیشترین میزان بیان پروتئین حرکتی در ۱۵

روز پس از مایه زنی به دست آمد و این زمان بهترین زمان برای برداشت برگها بود؛ زیرا علاوه بر این که بیشترین میزان پروتئین در این زمان به دست می‌آید برگهای حاوی پروتئین نوترکیب نیز هنوز پلاسیده نشده‌اند. همچنین، آزمون پایداری با RT-PCR نشان داد جهش و نوترکیبی در طول آلودگی و پس از ۱۰ بار انتقال رخ نداده است؛ ممکن است دلیل آن عدم تمایل به نوترکیبی در نواحی مجاور جایگاه همسانه سازی باشد یا شاید اندازه‌ی کوچک قاب خواندنی بیگانه به نوترکیبی حساس نیست همان طور که در مورد پوتی ویروس‌های دیگر نشان داده شده است (Gal-On et al., 1998). نتایج آزمون پایداری در این تحقیق با نتایج مطالعه بر ویروس تریستیزای مرکبات (*Citrus tristiza virus*; CTV) و ویروس موزائیک نواری گندم (WSMV) مشابه بود که حامل‌های نوترکیب حاوی GFP به ترتیب ۵ سال و ۱۲۰ روز در مرکبات و گندم پایدار بودند (Folimonov et al., 2007; Tatineni et al., 2011). در مقابل، قرار دادن ژن رمز کننده GUS در جایگاه برشی NIb/CP در WSMV تنها تا ۱۲ روز پس از مایه زنی توسط RT-PCR ردیابی شد (Choi et al., 2000). همچنین در مطالعه‌ی پایداری بیان ژن بیگانه در ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*)، نشان داده شد. پایداری و بیان ژن بیگانه در گیاه *C. quinoa* و *Brassica campestris* به ترتیب به عنوان میزبان‌های لکه موضعی و سیستمیک بیشتر از گیاهان دیگر بوده است (Chen et al., 2007). بنابراین هم جایگاه (بین P1 و HC-Pro یا بین NIb و CP) و هم اندازه ژن بیگانه (GUS، GFP و MP به ترتیب ۱۸۰۰، ۷۲۰ و ۷۹۲ نوکلئوتید) و هم گیاه میزبان نقش مهمی در پایداری ژن‌های بیگانه در حامل‌های ویروسی دارند. نتایج آزمون الایزا با استفاده از آنتی سرم ZYMV نشان داد که بیشترین غلظت ویروس در ۱۵ روز پس از مایه زنی است و میزان بیان نوترکیب تابعی از غلظت ویروس است؛ با توجه به این که پروتئین نوترکیب در پلی پروتئین بیان می‌شود و سپس با جایگاه‌های برشی P1 و NIb به ترتیب در انتهای آمینی و کربوکسیلی آزاد می‌شود، میزان بیان آن به غلظت ویروس بستگی دارد. دو پروتئین بزرگ‌تر به اندازه‌ی حدود ٦٧ و ٨٣ کیلودالتون نیز در ایمنوبلات با His-MAb ردیابی شد که با توجه به آنالیزهای انجام شده به نظر می‌رسد این پروتئین‌ها به ترتیب شکل تلفیقی P1-MP و MP-HC-Pro باشد. وجود این پروتئین‌ها نشان دهنده‌ی عدم برش پلی پروتئین به صورت ۱۰۰٪ است هر چند در این تحقیق کارایی برش کافی بوده است. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که جایگاه برشی NIa برای برش پروتئین نوترکیب کارایی کافی دارد (Seo & Britt, 2008). از طرف دیگر، نشان داده شده که توالی‌های مجاور این جایگاه برشی بر کارایی آن تاثیر دارد و حذف یک اسید آمینه از ابتدای HC-Pro یا افزودن یک یا دو اسید آمینه در دو سمت

این جایگاه کارایی برش را افزایش می‌دهد (Tatineni et al., 2011). در فرایند خالص سازی مشاهده شد که پروتئین نوترکیب نامحلول است و پس از تیمار آن با شوینده‌های مختلف همواره در ته نشین وجود داشت هر چند پس از تیمار با SDS 1%+2ME 0.1% پروتئین در بخش محلول قابل ردیابی بود ولی کارایی آن پایین بوده و نیز این شوینده‌ها به نوبه خود می‌توانند بر فرایند خالص سازی به روش کروماتوگرافی تاثیر منفی داشته باشند. بنابراین از روش سانتریفیوژ و ستون سوکروز و استخراج از ژل برای خالص سازی پروتئین نوترکیب استفاده شد. نتایج ردیابی پروتئین در مراحل مختلف خالص سازی نشان داد پروتئین پس از عبور از ستون سوکروز ٤٠ درصد به صورت ته نشین در می‌آید و تغلیظ و خالص سازی بیشتر آن با تفکیک ته نشین در SDS-PAGE و جداسازی باند مربوطه انجام شد. هر چند پروتئین نوترکیب در تمام مراحل خالص سازی ردیابی شد ولی به علت بیان و پایداری بالای آن در گیاه، نزدیک به ۱/۸ تا ۲/۲ میلی گرم پروتئین در هر صد گرم بافت برگ کدو قابل تخلیص بود که این مقدار پروتئین برای هدف‌های مختلف از جمله تولید آنتی بادی مناسب است و نیز به راحتی با افزایش تعداد گیاهان مایه زنی شده می‌توان پروتئین بیشتری به دست آورد. استفاده از سامانه‌ی حامل ویروسی برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاه در مقایسه با سامانه‌ی بیان باکتریایی برتری هایی دارد از جمله این که تفاوت میان سامانه‌ی سلولی یوکاریوتی و پروکاریوتی بر تغییرات و شکل فضایی پروتئین اثر دارد که به نوبه خود در مراحل بعدی برای شناسایی عملکرد و ساختار پروتئین نوترکیب و نیز تولید آنتی سرم با کیفیت موثر است. همچنین تولید پروتئین نوترکیب در این سامانه، یک روش موثر و کم هزینه‌تر از سامانه‌ی تولید باکتریایی است. از طرفی ظرفیت تولید در مقیاس بالا و عدم وجود اندوتوکسین‌ها و مواد زاید، پایداری پلاسمید، تشکیل اتصال‌های دی سولفیدی و گلیکوزاسیون طبیعی از مزایای دیگر این سامانه می‌باشد (Rai & Padh, 2001). از طرفی، هزینه‌ی تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان، بسته به نوع گیاه، ۱۰ تا ۵۰ برابر کمتر از تولید همان پروتئین در *E. coli* محاسبه شده است (Giddings et al., 2000). استفاده از گیاهان تراریخت در مقایسه با سامانه‌ی تولید پروتئین بر اساس حامل‌های ویروسی، بسیار وقت گیر و هزینه بر است در حالی که نتیجه بستگی به جایگاه انتقال ژن دارد؛ علاوه بر این، میزان بالای بیان پروتئین، یکنواخت بودن و پایداری نوترکیب، نگرانی زیستی کمتر نسبت به مواد دخیل در فرایند تراریخت سازی از مزایای دیگر این 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، به واسطه‌ی *C. quinoa* 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 نمود، در حالی که باززایی گیاهان تراریخت و انتقال آنها به گلخانه مشکل، زمان بر، هزینه بر و با کارایی کم است. مزیت دیگر سامانه‌ی مورد استفاده در این تحقیق، 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 نگرانی هایی نیز وجود دارد که باید به آن‌ها پاسخ داده شود: نخست این که افزودن ژن پروتئین حرکتی یک توباموویروس به ژنوم یک پوتی ویروس می‌تواند منجر به بروز ویروس جدید شده که در صورت فرار به طبیعت باعث خسارت فراوان شود؛ بنابراین ضروری است احتیاط لازم در پرورش گیاهان مایه زنی شده در شرایط کنترل شده صورت پذیرد. علاوه بر این تغییر، علایم از موزائیک زرد به رگ نواری نشاندهنده‌ی اثر CGMMV MP بر نحوه بیماریزایی ZYMV می‌باشد به طوری که علایم رگ نواری در هیچکدام از ویروس‌های فوق به صورت طبیعی دیده نمی-شود و این موضوع از دیدگاه ویروس شناسی می‌تواند جالب باشد و مطالعات بیشتری برای درک چگونگی تغییر علائم و نقش پروتئین نوترکیب لازم است. به طور خلاصه در این تحقیق، امکان استفاده از ZYMV به عنوان حامل بیانی در کدوئیان اثبات شد. اکنون ابزاری در اختیار داریم که می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را در میزان بالا تولید کرد. امکان استفاده از حامل‌های ویروسی به عنوان ابزاری برای تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی بسیار امیدوار کننده است.

منابع

Ainworth GC (1935). Mosaic disease of cucumber. Annals of Applied Biology 22: 55-67.

Alamillo JM, Monger W, Sola I, Garcia B, Perrin Y, Bestagno M, Burrone OR, Sabella P, Plana-Duran J, Enjuanes L, Lomonossoff GP, Garcia JA (2006). Use of virus vectors for the expression in plants of active full-length and single chain anti-coronavirus antibodies. Biotechnology journal 1: 1103-1111.

Antignus Y, Wang Y, Pearlsman M, Lachman O, Lavi N, Gal-On A (2001). Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting Tobamovirus. Phytopathology 91: 565-571.

Carrington JC , Dougherty WG (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 3391-5.

Chen CC, Chen TC, Raja JAJ, Chang CA, Chen LW, Lin SS, Yeh SD (2007). Effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by Turnip mosaic virus vector at five different insertion sites. Virus Research 130: 210-227

Chen TC, Hsu HT, Jain RK, Huang CW, Lin CH, Liu FL, Yeh SD (2005). Purification and serological analyses of tospoviral nucleocapsid proteins expressed by Zucchini yellow mosaic virus vector in squash. Journal of Virological Methods 129: 113-24.

Choi IR, Stenger DC, Morris TJ, French R (2000). A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. Plant Journal 23: 547-555.

Desbiez C, Gal-On A, Raccah B, Lecoq H (1997). Characterization of epitopes on Zucchini yellow mosaic potyvirus coat protein permits studies on the interactions between strains. Journal of General Virology 78: 2073-6.

Egelkrout E, Rajan V, Howard JA (2012). Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Science 184: 83-101.

Folimonov AS, Folimonov SY, Bar-Joseph M, Dawson WO (2007). A stable RNA virus-based vector for citrus trees. Virology 205-216: 368.

Francki RI, Hu J, Palukaitis P (1986). Taxonomy of cucurbit-infecting tobamoviruses as determined by serological and molecular hybridization analyses. Intervirology 26: 156-163.

Gal-On A, Meiri E, Raccah B, Gaba V (1998). Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. Journal of Virology 72: 5268-70.

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. National Biotechnology 18: 1151-1155.

Gleba Y, Marillonnet S, 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.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. Current Opinion in Biotechnology 18: 134-141.

Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V, Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (2008). Plant Virus Vectors (Gene Expression Systems). Oxford Academic Press, UK.

Gopinath K, Wellink J, Porta C, Taylor KM, Lomonossoff GP, Van Kammen A (2000). Engineering Cowpea Mosaic Virus RNA-2 into a Vector to Express Heterologous Proteins in Plants. Virology 267: 159-173.

Hsu CH, Lin SS, Liu FL, Su WC, Yeh SD (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: 1079-85.

Karg SR , Kallio PT (2009). The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology Advances 27: 879-94.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012). Virus Taxonomi: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA.

Komuro B (1965). [on Diffusion of Lincomycin into Eye Tissues, with Special Reference to a Sensitivity Test for Pathogenic Staphylococci]. J Antibiot B 18: 152-5.

Lee KW, Lee BC, Park HC, Lee YS (1990). Occurrence of cucumber green mottlemosaic virus disease of watermelon in Korea. Korean Journal of Plant Pathology 6: 250- 255.

Lin SS, Hou RF, Yeh SD (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.

Lu G , Moriyama EN (2004). Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. Brief Bioinform 5: 378-88.

Masuta C, Yamana T, Tacahashi Y, Uyeda I, Sato M, Ueda S, Matsumura T (2000). Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. Plant Journal 23: 539-46.

Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V (2008). Plants as biofactories. Biologicals 36: 354-358.

Oh CS , Carrington JC (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. Virology 173: 692-9.

Rai M, Padh H (2001). Expression systems for production of heterologous proteins Current Science 80: 1121-1128.

Rahimian H, Izadpanah K (1977). A new strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* from Iran. Iranian Journal of Agricultural Research 5(1): 25-34.

Revers F, Van Der Vlugt RA, Souche S, Lanneau M, Lot H, Candresse T , Le Gall O (1999). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the genome of four lettuce mosaic virus isolates from Greece and Yemen. Archives of Virology 144: 1619-26.

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73 (Pt 1): 1-16.

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J Gen Virol 73: 1-16.

Saito T, Imai Y, Meshi T, Okada Y (1988). Interviral homologies of the 30K proteins of tobamoviruses. Virology 167: 653-6.

Sambrook J, Russell MDW (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

Seo JY, Britt WJ (2008). Multimerization of tegument protein p28 within the assembly compartment is required for cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus. Journal of Virology 82: 6272-6287.

Shang H, Xie Y, Zhou X, Qian Y, Wu J (2011). Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. Virology Journal 8: 228

Shivprasad S, Pogue GP, Lewandowski DJ, Hidalgo J, Donson J, Grill LK, Dawson WO (1999). Heterologous Sequences Greatly Affect Foreign Gene Expression in Tobacco Mosaic Virus-Based Vectors. Virology 255: 312-323.

Tan SH, Nishiguchi M, Murata M, Motoyoshi F (2000). The genome structure of kyuri green mottle mosaic tobamovirus and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. Archives of Virology 145: 1067-79.

Tatineni S, Mcmechan AJ, Hein GL, French R (2011). Efficient and stable expression of GFP through Wheat streak mosaic virus-based vectors in cereal hosts using a range of cleavage sites: Formation of dense fluorescent aggregates for sensitive virus tracking. Virology 410: 268-281.

Ugaki M, Tomiyama M, Kakutani T, Hidaka S, Kiguchi T, Nagata R, Sato Motoyoshi TF, Nishiguchi M (1991). The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. Journal of General Virology 72: 1487-1495.

Verchot J, Koonin EV, Carrington JC (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. Virology 185: 527-35.

Yeh SD, Gonsalves D (1984). Purification and immunological analysis of cylindrical-inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. Phytopathology 74: 1273-1278.

Expression and purification of movement protein of *Cucumber green mottle mosaic virus* using a plant-virus expression system

Nassaj Hosseini S.M.[1], Shams-Bakhsh M.*[2], Salamanian A.H.[3], Yeh S.D.[4]

[1]Ph.D. Student of Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor of Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Associate Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[4]Professor of National Cheng Hsing University, Taichnug, Taiwan.

Abstract

To produce and purify movement protein of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV MP), a plant viral vector engineered from an *in vivo* infectious clone of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) was used. The CGMMV MP ORF was in frame inserted between the P1 and HC-Pro ORFs of the ZYMV vector. The infectious activity of the vector was approved by rubbing the plasmid on *Chenopodium quinoa* leaves and observing local lesions. Individual lesions were mechanically transferred to the systemic host plant zucchini squash at the stage of two-cotyledon. The stability of recombinant protein expression was assessed by successive passages of recombinant from infected plant and throughout the period of 30 days after inoculation in a single plant and after 10 serial passages. Then, the leaves tissues of inoculated plant were analyzed by RT-PCR and western blot analysis. Recombinant protein was purified using centrifuge method combine with gel extraction; each step was sampled and analyzed by western blotting and SDS-PAGE. The results showed approximately 1.8–2.2 mg recombinant MP per 100 g tissues were purified from leaves two weeks post inoculation. Also, the vector was remarkably stable in squash after 10 serial passages and 30 days. The procedure provides a convenient and fast method for production of large quantities of pure CGMMV MP in planta.

Keywords: *transient expression, recombinant protein, ZYMV*.

* Corresponding author: Shams-Bakhsh M. Tel: 02148292274 Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir