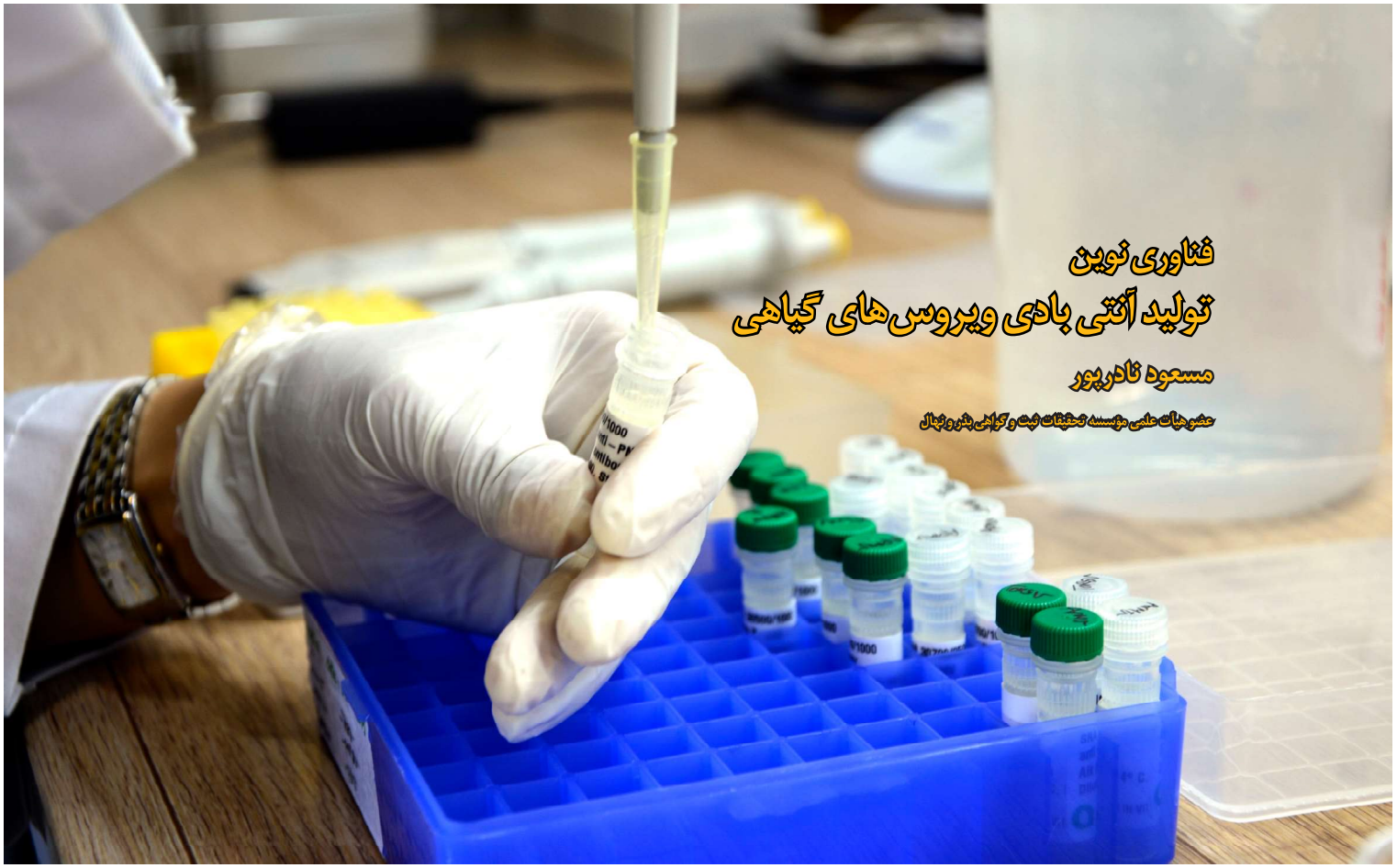


فناوری نوین
تولید آنتی بادی ویروس‌های گیاهی

مسعود نادرپور
عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

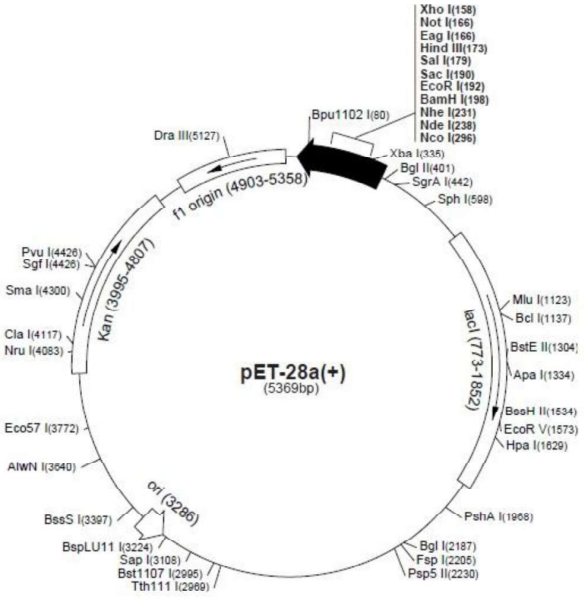
یکی از مهم‌ترین و حساس‌ترین روش‌های ردیابی عوامل بیماری زای ویروسی در گیاهان، روش های سرولوژیکی مبتنی بر آزمون Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی است. تولید تجاری این آنتی‌بادی‌ها در انحصار تعداد معدودی شرکت معتبر بیولوژیکی اروپایی و به ویژه آمریکایی است و تهیه آنها به دلیل بُعد مسافت و موانع ارزی اغلب گران، زمان بر و طاقت فرسا است و در عین حال با توجه به اینکه از طریق شرکت‌های ثالث تأمین می‌شوند، هزینه تمام شده آنها بسیار افزایش می‌یابد. بر اساس اطلاعات مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال که با توجه به ماهیت قسمتی از فعالیت‌ها بیشترین نیاز را به آنتی بادی‌های مذکور دارد، هزینه آنتی‌بادی برای انجام حدود ۷۵۰ آزمون بسته به نوع آنتی بادی، بین ۸۵-۳۵ میلیون ریال است. به علاوه، گاه مشکلاتی به وجود می‌آید که خرید آن حتی با قیمت‌های گزاف امکان پذیر می‌شود. میزان مصرف آنتی‌بادی‌های مختلف در سال با توجه به نوع ویروس و ماده تکثیری مورد مطالعه، ده‌ها هزار آزمون است.

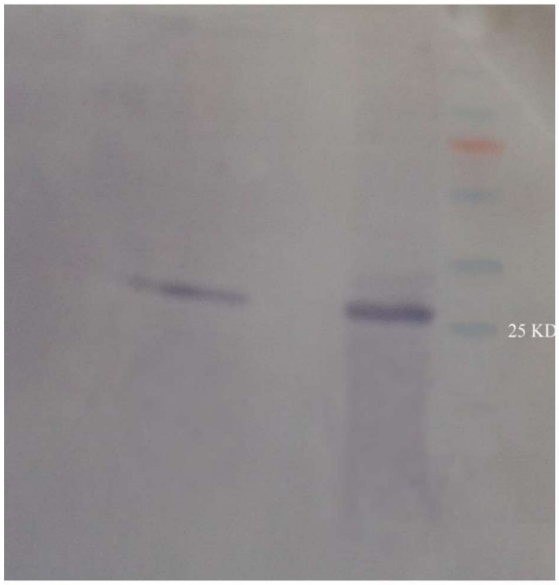
آنتی بادی‌های تجاری موجود معمولاً بر اساس پروتئین پوششی (Coat Protein, CP) ویروس‌ها تهیه می‌شوند. به این صورت که ابتدا ویروس مورد نظر پس از شناسایی و خالص سازی بیولوژیکی، در گیاه میزبان تکثیر شده و پس از عصاره‌گیری از بافت آلوده، با استفاده از دستگاه‌های اولترا سانتریفیوژ و سایر مراحل طاقت فرسا و زمان‌بر، خالص‌سازی و در نهایت در یک حیوان خونگرم، تزریق شده و آنتی بادی از سرم خون تهیه می شود. ویروس‌های گیاهی به دلیل اندازه کوچک ژنوم نسبت به سایر ریزسازواره ها (غیر از ویروئیدها) بسیار جهش زا بوده و معمولاً جدایه‌ها و نژادهای مختلفی از یک ویروس در طبیعت موجود است. این جدایه‌ها معمولاً نه تنها در داخل یک منطقه بیولوژیکی معین، متنوع هستند بلکه از یک منطقه به منطقه دیگر و به‌ویژه از یک قاره به قاره دیگر نیز بسیار متفاوت می باشند. از نظر فنی، آنتی بادی [های] تهیه شده بر اساس جدایه [های] هر منطقه/ قاره معمولاً قابلیت پیوستگی بیشتر با جدایه [های] همان منطقه/ قاره را داشته و با جدایه‌های دیگر یا پیوستگی کمتری داشته یا اساساً قادر به شناسایی جدایه‌های دیگر نمی باشد. نمونه بارز آن، عدم ردیابی برخی از ویروس‌های گیاهی بومی با آنتی بادی‌های تهیه شده از خارج از کشور است. در صورت تهیه آنتی‌بادی با استفاده از اطلاعات ژنومی جدایه [های] بومی، ردیابی ویروس بسیار دقیق‌تر و ارزان‌تر خواهد بود. به‌علاوه، در صورت تولید آنتی بادی با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، به دلیل نگهداری منبع اصلی ویروس در ناقل بیان، در هر زمان امکان تولید بسیار بالای پروتئین مورد نظر برای تزریق به حیوان خونگرم و تهیه آنتی‌بادی در حجم بالا وجود دارد.

به‌منظور حل چالش‌های اشاره شده و نیز کاهش معنی دار هزینه های انجام آزمون های سرولوژیکی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال به تولید بومی آنتی‌بادی با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب و با تکیه بر توان فنی موجود مبادرت کرده است. یکی از فعالیت های انجام شده تاکنون، تهیه آنتی‌بادی برای ردیابی ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (*Potato leafroll Polerovirus*, PLRV) در نمونه‌های بذر کشور بود که با همت متخصصین مؤسسه و همکاری دانشگاه شیراز پیگیری شد. هدف این پروژه، شناسایی جدایه غالب PLRV در کشور، تکثیر ژن پروتئین پوششی آن در سامانه باکتریایی و بیان آن در ناقل مناسب باکتریایی و در نهایت استفاده از پروتئین بیان شده برای تزریق به خرگوش و تهیه آنتی بادی اختصاصی چند همسانه بود. به منظور دسترسی به جدایه ای غالب از بین جدایه های مختلف PLRV در کشور، ابتدا نمونه های آلوده به این ویروس از مزارع تولید سیب زمینی جمع‌آوری شده و سپس ترادف ژنومی CP جدایه‌ها تعیین گردید. ترادف غالب پس از همسانه سازی در ناقل باکتریایی، به منظور بیان پروتئین مورد نظر وارد ناقل بیان (pET+28a-) در سیستم باکتری شد (شکل ۱-الف). پس از بهینه سازی شرایط رشدی باکتری برای بیان ژن مورد نظر، حضور پروتئین پوششی PLRV با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-PAGE و نیز آزمون لکه‌گذاری وسترن (Western-immunoblotting) (شکل ۱-ب) تأیید شد.

سازه pET-28a-PLRV-CP طوری مهندسی شده بود که پروتئین PLRV-CP با استفاده از رزین Ni-NTA Agarose قابل استخراج باشد. پروتئین بیان و خالص‌سازی شده، به مدت چهار بار در ماه به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق و سپس خونگیری انجام شد. آنتی‌بادی تولید شده از سرم خون جداسازی و با استفاده از کیسه دیالیز خالص‌سازی شده و از نظر پیوستگی با پروتئین پوششی PLRV بررسی شد. سپس آنتی‌بادی خالص‌سازی شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز پیوند داده شده و برای آزمون الایزا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این پروژه از مؤفقیت بالای این فناوری در تهیه آنتی‌بادی حکایت داشت.

با توجه به سیاست‌های مؤسسه و نیاز به آنتی بادی‌های بومی، از این فناوری در صورت امکان برای تهیه آنتی‌بادی بومی سایر ویروس‌ها استفاده خواهد شد. در حال حاضر علاوه بر PLRV، این مهم برای سایر ویروس‌های سیب زمینی ادامه داشته و تاکنون در بخش تحقیقات فناوری و بهبود کیفیت نهال مؤسسه، ژن پروتئین پوششی دو گروه از جدایه های کاملاً متفاوت ویروس *Potato virus Y Potyvirus* و یک جدایه غالب از ویروس *Potato virus S Carlavirus* با موفقیت بیان شده است. این پروتئین‌ها در حال استخراج نهایی و تزریق به خرگوش هستند.





(الف) (ب)

شکل (الف) نقشه مربوط به سازه بیان در ناقل مناسب باکتریایی (پلاسمید pET+28a-)
شکل (ب) شمایی از بیان مؤفقیت آمیز پروتئین ۲۸ کیلودالتونی PLRV-CP در آزمون لکه گذاری وسترن