تولید نیمه صنعتی آنتی‌بادی های نوترکیب ویروس های مندرج در استاندارد برای گواهی سلامت بذور سیب زمینی کشور

مسعود نادرپور[1]، محمدحسن عصاره[1]
عضو هیأت علمی مؤسسه

اندازه بسیار کوچک ویروس ها نسبت به اکثر بیمارگرهای شناخته شده در طبیعت، ماهیت پیچیده آن‌ها در آلوده کردن میزبان، تکثیر موضعی و انتشار حیرت انگیز آن ها در بافت های میزبان و بالاخره استفاده از روش‌های مختلف در انتقال از میزبان آلوده به سالم، ویروس‌ها را به بیمارگرهایی بسیار مهاجم در طبیعت تبدیل کرده‌است. به دلایل اشاره شده، تاکنون روش مؤثری برای کنترل آنها در سطح کاربردی شناخته نشده و «پیشگیری» از ورود ویروس ها به میزبان، مهم‌ترین روش مبارزه بوده است. به هر حال، به خاطر اندازه نانومتریک ویروس‌ها، پیشگیری از شیوع و گسترش آنها در طبیعت بر پایه ردیابی و شناسایی اولیه آن‌ها استوار است. در بین روش‌های مختلف برای ردیابی ویروس ها به ویژه در برنامه‌های گواهی سلامت، روش‌های سرولوژیکی به دلایل مختلف، از جمله هزینه پایین تر، قابلیت استفاده بیشتر در بررسی تعداد زیاد نمونه‌ها در زمان واحد و مدت زمان کمتر برای اعلام نتایج آزمون، اهمیت زیادی پیدا نموده است. با این وجود، بزرگترین چالش در موفقیت این روش، دسترسی به آنتی‌بادی اختصاصی و دقیق ویروس مورد نظر و شاهدهای آزمون است. به دلیل اهمیت موضوع در صنعت بذر و نهال به‌عنوان یکی از نهاده‌های اساسی در بهبود و توسعه بخش کشاورزی و به‌ویژه، وظایف سنگین مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در گواهی سلامت بخش بزرگی از مواد تکثیری کشور، چالش اشاره شده با راه اندازی تولید آنتی‌بادی نوترکیب برای ردیابی شش ویروس مهم آلوده کننده سیب زمینی و ارتقای آن به سطح نیمه صنعتی، به فرصتی بزرگ برای تأمین این مواد بیولوژیک ارزشمند تبدیل شده است.

بر اساس مطالعات انجام شده، مسائل مرتبط با گیاه پزشکی (آفات، بیماری ها و علف‌های هرز) مسئول ۲۶ تا ۴۰ درصد خسارت سالیانه به محصولات استراتژیک کشاورزی در دنیا هستند و ممکن است میزان خسارت در برخی شرایط به حدود ۸۰ درصد کل محصولات

نیز برسـد. در این بین، خسـارت مسـتقیم سالیانه ناشـی از بیمارگرهای ویروسی گیاهـی بیـش از ۳۰ میلیارد دلار برآورد شـده اسـت، در صورتی‌که خسـارت‌های غیر مستقیم آنها در شرایط نهفتگی[۱] و بدون علائم بیماری، هزینه‌های مرتبط باکنتـرل ناقـلان بیولوژیکـی، لـزوم رعایت فاصله ایزولاسـیون از منابـع آلوده برای تولید بذر و نهال سـالم، بررسـی‌های آزمایشگاهی سلامت مواد تکثیری بـه‌ویـژه برای تجارت منطقـه‌ای و جهانی، آموزش، تحقیق و توسـعه و ... مقولـه‌هایـی مجزا بـوده و در تخمیـن فوق گنجانده نشـده‌اند.

مکانیسـم‌هـای بیمـاری‌زایی ویروس‌هـا، دارا بودن انـواع ژنوم (RNA یا DNA تک رشـته ای یا دو رشـته ای، مثبت یا منفی، اسـید نوکلئیک‌های زیر ژنومـی، ناقـص و ماهواره ای[۲])، نحوه انتقال از میزبان‌های آلوده به سـالم از طریق حشـرات (در فـرم هـای مختلف ناپایـا[۳]، پایا[۴]، نیمـه پایـا [۵] و تکثیر تعـدادی از ویـروس هـا در حشـرات ناقل و انتقـال به تخم و نتاج[۶])، دانـه گرده، مواد تکثیـری (بـذر، نهـال، پایه، پیونـدک، قلمه، پاجـوش، غده، پیـاز، ریزوم) و انتقـال مکانیکـی و بالاخـره انـدازه نانومتریـک ویـروس‌هـا و جهش‌های سـریع و نوترکیبـی در ژنـوم کـه موجـب ایجـاد نژادهـای مهاجـم‌تـر و یا ویـروس‌هـای جدیـد می‌شـوند، عملاً مبـارزه با ایـن عوامـل را (برخلاف سـایر بیمارگرهـا) بـا روش‌های شـناخته شـده غیر ممکن سـاخته اسـت. بنابرایـن، تنهـا روش باقیمانـده و مؤثـر برای مواجهه با ایـن عوامل بر پایه «پیشـگیری از آلودگی» اسـتوار است.

بـا اینکـه همـه روش‌هـای اشـاره شـده فوق، بسـته بـه ویـروس/ نژاد ویـروس، میزبـان (و رقـم آن) و شـرایط محیطـی در موفقیـت و کارایـی انتقـال ویـروس‌هـا از میزبـان‌هـای آلـوده بـه سـالم نقـش مهمـی دارند، ولـی انتقـال از طریـق بذر و نهال و سـایر انـدام‌های تکثیـری گیاه، نقش اساسـی در ورود اولیـه آلودگـی بـه مـزارع و باغات و در نتیجه در شـیوع و گسـترش ویـروس‌هـا در مناطق جدید دارد. سـایر روش‌های اشـاره‌شـده در انتقـال ویـروس‌هـا بـه‌ویژه میزبـان‌های غیـر زراعی که یکـی از منابع اولیـه برای گسـترش بیماری‌های ویروسـی محسـوب می‌شـوند، معمولاً در کشـاورزی و باغـداری مـدرن از طریـق فنـون علمی زراعـی و باغی قابل مدیریـت هسـتند. بنابرایـن، انتقـال ویروس هـا در بـذر و نهـال، مهم ترین روش انتقـال آن‌هـا بـه زراعـت و باغداری جدیـد به‌ویژه در سـطوح ملی، منطقـه ای و جهانـی تبدیـل شـده و باعـث سـختگیری‌هـای قرنطینه‌ای شـدید، بـه خصـوص در مبـادی ورودی بذر و نهال شـده اسـت. اسـتفاده از مـواد تکثیـری سـالم بـا پیشـرفت علوم دیگـر به ویـژه علـوم مرتبط با سـلامت غـذا، لـزوم دسترسـی عمومی به غـذای سـالم و ارگانیـک و نیز ضـرورت حفاظـت از محیـط زیسـت، اهمیت بیشـتری پیدا نموده اسـت.

شناسـایی دقیـق ویروس‌ها در صنعـت تولید مواد تکثیـری، کلیدی‌ترین نقـش را در پیشـگیری از انتقـال بیمـاری های ویروسـی بازی مـی‌کند. در صورت شناسـایی دقیق، امکان سـالم سـازی بـذر و نهال از ویـروس‌ها با روش‌هـای مختلف، میسـر شـده و تولید انبوه مـواد تکثیری اولیه سـالم با فنـون مبتنـی بر کشـت بافت، باعث خواهد شـد تا ضمن دسترسـی فعالین بخـش کشـاورزی به مواد سـالم، مدیریت بیمـاری های ویروسـی، راحت تر انجـام و محصـول سـالم به وفـور در اختیار عموم قـرار گیرد.

بـه هـر حـال، ماهیت پیچیده ویـروس ها، شناسـایی و ردیابی دقیـق آن‌ها را بـا چالـش‌هایی مواجه نموده اسـت. اهمیـت موضوع ردیابـی ویروس‌های گیاهی و سـایر بیمارگرهای آوندی در تولید غذای سـالم و کافی برای جمعیت رو به رشـد جهان از یک طرف و تغییرات اقلیمی مرتبط با گرم شـدن هوا و افزایش جهانـی دی اکسـید کربن و نقش این تغییـرات در فیزیولوژی گیاهـان و افزایش حساسـیت آنهـا به بیمـاری ها به خصـوص بیمـاری‌هـای ویروسـی از طرف دیگـر، باعـث شـده اسـت کـه تعـدادی از نهادهـای تحقیقاتی مطـرح در تولیـد علـوم مـرز دانش در ایـن حوزه، تحقیقات خود را به سـمت توسـعه تکنولـوژی هـای دقیق تـر در ردیابی بیمارگرها بـه‌ویژه ویروس هـا متمرکز نماینـد. حتـی سـال گذشـته میـلادی از طرف سـازمان ملل متحـد به نام سـال « سـلامت گیاه[۷] » نامگذاری شـد ولی متأسفانه شـیوع پاندمی جدید، انتشـار فعالیـت‌هـا و برگزاری همایش‌هـای جهانی را در این مـورد همانند سـایر علوم، به شـدت تحـت تأثیر قـرار داد.

همچنان که اشـاره شـد، بـه‌دلیل حضور سـاختارهای پروتئینی و اسـید نوکلئیکـی در پیکـره ویـروس‌هـا، هر نـوع روش در شناسـایی آنهـا، بر پایه ردیابـی پروتئیـن و اسـیدنوکلئیک یا ترکیبی از هـر دو (آزمـون‌های عفونت زایـی) اسـتوار اسـت. هر یک از روش های اشـاره شـده، مزیت هـا و معایبی دارنـد کـه در مقـالات علمی مختلف به آنها اشـاره شـده و از ذکر جزئیات آنهـا در ایـن نـگارش خودداری می‌شـود.

یکـی از روش‌های دقیق، سـریع، نسـبتاً ارزان و کاربـردی برای ردیابی ویـروس‌هـای گیاهـی و جانـوری بـا تعـداد زیاد نمونـه‌ها بـه خصوص در آزمایشـگاه‌هـای پاتولوژیکـی انسـانی و جانوری، پسـت‌هـای قرنطینه ای و نهادهـای گواهـی سـلامت مـواد تکثیـری گیاهی دنیـا (مانند مؤسسـه تحقیقـات ثبـت و گواهـی بـذر و نهـال در ایـران)، بـر اسـاس شناسـایی پروتئیـن پوششـی یـا سـایر پروتئیـن ویـروس‌هـا بـا آنتـی‌بـادی‌هـای اختصاصـی تهیـه شـده علیـه پروتئین (یـا پروتئین‌هـای) همـان ویروس اسـتوار اسـت. مرسـوم تریـن روش، آزمـون هایی به نـام الایـزا[۸] (ELISA) هسـتند کـه در سـال ۱۹۷۷ بـرای ردیابـی بیمـاری‌هـای ویروسـی گیاهان توسـعه یافـت. ایـن آزمـون‌هـا علیرغـم مزایای اشـاره شـده، با چالشـی بسـیار بـزرگ به نام « وابسـتگی کامل تجـاری به آنتی بـادی اختصاصی ویـروس‌هـا» بـرای انجـام آزمون‌ها مواجه اسـت. بـه طوری کـه عملاً با نبـود آنتـی بـادی اختصاصی هـر ویروس، علیرغـم وجود همـه امکانات و مـواد بیولوژیکـی دیگر، امکان ردیابـی آن با این روش وجود نـدارد. تقریباً تمـام نهادهای فعال در ردیابی بیمارگرهای ویروسـی در سـطوح کاربردی

دنیـا و حتـی مراکـز آموزشـی و تحقیقاتـی، آنتـی‌بـادی‌هـای اختصاصـی مـورد نیـاز خـود را از شـرکت‌های بزرگ غربی کـه در اکثر مـوارد از دقت خوبـی هم برخـوردار هسـتند، تهیه مـی نمایند.

از جملـه ایـن نهادهـا در کشـور، مؤسسـه تحقیقـات ثبـت و گواهـی بـذر و نهـال اسـت کـه سـالیانه درصـد قابـل توجهـی از بذور سـیب زمینی تولیـدی کشـور را از نظـر عـدم آلودگـی به شـش بیمـاری ویروسـی موجود در اسـتانداردهای ملـی این محصول بنـام ویروس هـای وای[۹] (PVY)، ای[۱۰] (PVA)، ام[۱۱] (PVM)، اس[۱۲] (PVS) ، ایکـس[۱۳] (PVX) و بـرگ قاشـقی سـیب زمینـی[۱۴] (PLRV) برای صدور گواهی سـلامت به صـورت میدانی و آزمایشـگاهی بررسـی می کند (جدول ۱). مؤسسـه تحقیقات ثبت و گواهی بـذر و نهـال قبلاً آنتی بـادی‌های مورد نیـاز برای ردیابی هر شـش ویروس را هماننـد سـایر مراکـز و سـازمان‌ها، از شـرکت‌هـای غربی و بـا همکاری شـرکت هـای ثالـث خارجی و داخلـی، تأمین مـی کرد.

واردات مواد بیولوژیکی مانند آنتی بادی های اشـاره شـده و کنترل های مثبت و منفـی آزمـون هـا، عـلاوه بر خـروج ارز از کشـور، معمولاً با چالـش هایی نظیر دسترسـی دیرهنـگام، دقت پایین یا عـدم توانایی آنتی بادی‌هـای غیربومی در ردیابـی برخـی ویروس ها یا جدایه های ویروسـی، نوسـانات شـدید ارزی و بالاخـره برخـی چالـش‌هـای دیگـر که اشـاره بـه آن هـا از حوصله این مقالـه خـارج اسـت، باعث بروز مشـکلاتی در ارائـه به موقع نتایـج آزمون ها بـرای صـدور یـا عدم صـدور گواهی سـلامت بذور سـیب زمینی می شـد.

مشـکلات اشـاره شـده همـواره قریـن گواهـی سـلامت سـیب زمینی بـذری و سـایر مـواد تکثیری کشـور در مؤسسـه تحقیقات ثبـت و گواهی بـذر و نهـال از زمـان تأسـیس آن در سـال ۱۳۸۲ بـوده اسـت. بـه علاوه، افزایـش رو بـه رشـد تقاضـای گواهی سـلامت از طرف تولیـد کنندگان و مصـرف کننـدگان بـذر و نهال در راسـتای بهبـود بازدهی تولیـد و نیز امکان صـادرات نهـاده هـای تکثیری در صورت داشـتن «گواهی سـلامت»، باعث شـده تـا نیـاز مؤسسـه بـه مـواد بیولوژیـک به خصـوص آنتـی بـادی‌های اختصاصـی همـواره رشـد صعـودی داشـته باشـد (جـدول ۱). از طـرف دیگـر درخواسـت همکاری از برخی مؤسسـات تحقیقاتی بـرای تولید آنتی بـادی‌هـا، بنا بـه دلایلی به سـرانجام نرسـید. بنابرایـن، برای رفـع نهایی ایـن معضـل در گواهـی سـلامت بذر سـیب زمینـی و گام نهـادن در افق دیگـری از پیشـرفت علمی، مؤسسـه تصمیـم گرفت با تکیه بـر توان فنی کارشناسـان خـود و بـا جـذب حمایـت مالـی از معاونـت علمـی و فناوری ریاسـت جمهـوری، فعالیتـی تحقیقاتـی بـا عنـوان « بیـان ژن نوترکیـب پروتئیـن پوششـی[۱۵] ویروس های مندرج در اسـتانداردهای ملی سـلامت بـذر سـیب زمینی به منظـور تولید آنتی بـادی‌های چند همسـانه‌ای علیه ویـروس هـا» را در سـازمان تحقیقات، آمـوزش و ترویج کشـاورزی آغاز و بـا تولیـد آنتی بـادی‌های بومـی بـرای اسـتفاده در ردیابی شـش ویروس فـوق در گواهـی سـلامت بـذور سـیب زمینـی بـا آزمـون هـای اِلایـزا به نتیجه برسـاند.

اهداف طرح

طراحـی و اجـرای تحقیـق اشـاره شـده، دو هـدف عمـده تحقیقاتـی و کاربـردی را دنبـال مـی کـرد: هـدف تحقیقاتـی طـرح «بومـی سـازی تولیـد آنتـی بـادی هـای اختصاصی با تکیـه بر مهندسـی ژنتیـک و فناوری DNA نوترکیب[۱۶]» و گسـترش این فعالیت ها برای ردیابی سـایر بیماری های ویروسـی بـذر و نهـال بود. هدف کاربـردی آن «ارتقـاء قابلیت های علمی و تحقیقاتـی بـه سـطوح اجرایـی» مـورد نیـاز بـرای گواهی سـلامت بذر سـیب زمینـی بـود. بـرای موفقیـت طرح تلاش شـد تـا آنتی بـادی های تولیـد شـده طوری طراحی شـوند تا ضمن داشـتن قـدرت رقابت بـا انواع تجـاری موجـود، از کارایی بالاتـری برخوردار بوده و چالش های همیشـگی در تأمیـن آن هـا مرتفـع گردد.

فعالیت‌های تحقیقاتی- اجرایی و نتایج طرح

شـرط لازم بـرای موفقیـت هر نوع طـرح تحقیقاتـی کاربـردی محور، مطالعـه جامـع تمـام زوایـای ممکـن، قبـل از شـروع و ادامـه مطالعـه در ضمـن انجـام آن مـی باشـد. همچنان که اشـاره شـد، ویـروس هـا از توان بالایـی برای جهـش ژنومی به منظور تطابق با شـرایط موجود و جدیـد برخوردار هسـتند. بنابرایـن، امکان حضور سـویه هـای مختلف ویروس هـای مطالعه شـده در ایـن تحقیـق کـه احتمـالاً روابـط سـرولوژیک آنهـا را نیـز تحت تأثیـر قـرار مـی‌دهد، وجـود داشـت. از طرف دیگـر، ماهیت بیوشـیمیایی و فیزیکوشـیمیایی پروتئین های مورد مطالعه ویروس ها به عنوان اهداف نهایی آنتـی بـادی هـای تولید شـده، در ردیابـی ویروس مـورد نظر تأثیر گذار اسـت. به عـلاوه، پروتئیـن هـای خارجی بیان شـده در سـویه هـای مختلف باکتـری‌ها، معمـولاً بـرای باکتری سـمی بـوده و عملاً بیـان پروتئین اتفـاق نمی‌افتد. بـا علـم بـه ایـن فرضیه‌ها سـعی شـد طراحـی تحقیق بـه گونه‌ای باشـد کـه نخسـت، اطلاعات جامعـی از تمام جدایه‌هـای PVM، PVA، PVY، PVX، PVS و PLRV در همـه مناطـق تولیـد سـیب زمینـی در کشـور بـه‌ویـژه از نظـر تـرادف پروتئیـن پوششـی به‌دسـت آیـد تا ضمـن تجمیع و تفسـیر درسـت اطلاعـات، جدایه (جدایـه های) غالـب هر ویـروس برای ادامه مطالعه شناسـایی شـوند. دوم، ژنوم جدایه های منتخب در سـویه‌های متفاوت در سیسـتم های باکتریایی، همسـانه سـازی و بیان شـده و کیفیت و کمیـت پروتئیـن‌های بیان شـده بررسـی شـود. سـوم، پروتئین‌هـای بیان شـده به هر دو فرم طبیعی و واسرشـته اسـتخراج و خالص سـازی شـوند. در آخـر، پروتئیـن هـا در دو شـکل فوق و بـه‌صورت ترکیبـی در خرگوش تزریـق شـده و آنتـی‌بادی‌هـای حاصل از نظـر کارایی در ردیابـی ویروس‌ها

بررسی شوند. برای دستیابی به فرضیه های فوق، فعالیت های میدانی و آزمایشگاهی به‌طور جداگانه برای هر ویروس و به‌ترتیب زیر انجام شد :

۱- جدایه‌های مختلف ویروس‌ها از مناطق عمده کشت سیب زمینی بذری و خوراکی کشور (استان‌های خراسان رضوی، همدان، اردبیل، هرمزگان، کرمان،کرمانشاه، مرکزی و اصفهان) جمع آوری گردید و آلودگی آنها به ویروس (ها) با آزمون‌های الایزا بررسی شد.

۲- آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ترادف کامل ژن پروتئین پوششی[۱۷] (CP) ویروس‌ها با استفاده از داده‌های ژنومی موجود در مورد ویروس‌ها در بانک‌های ژنومی مانند NCBI[۱۸] طراحی شد.

۳- RNA تعدادی از جدایه‌های مربوط به هر ویروس بر اساس مناطق نمونه‌برداری به‌طور تصادفی، استخراج شده و پس از تهیه DNA مکمل[۱۹] ، ژنوم کامل مربوط به نواحی پروتئین پوششی ویروس‌ها، تکثیر و ترادف یابی شد.

۴- پس از تعیین ترادف ژن CP جدایه های ویروس‌ها، ترادف‌های غالب بر اساس زیر همچینی ترادف‌ها با نرم‌افزارهایی ژنتیکی مشخص شده و ادامه فعالیت روی ترادف جدایه های غالب به شرح زیر انجام شد.

۵-ترادف ها به طور مجزا در ناقل مناسب همسانه‌سازی[۲۰] شد . پس از استخراج پلاسمید از باکتری‌ها، قطعات ژنومی مورد نظر دوباره ترادف یابی و تأیید شد.

۶-آغازگرهایی دارای دنباله‌هایی متصل به آنزیم های برشی با ترادف مناسب جهت همسانه سازی در ناقل باکتریایی بیان، طراحی شده و سپس ناحیه CP جدایه ها با این آغازگرها از پلاسمید انتخاب شده

جدول ۱- مقایسه میزان و هزینه سالیانه آنتی بادی‌ها و کنترل های مثبت و منفی خریداری شده از خارج کشور توسط موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای استفاده در گواهی سلامت سیب زمینی بذری قبل و بعد از تولید آنتی بادی‌های بومی.

مقادیر آنتی‌بادی به هزار آزمون درسال و هزینه واردات به میلیون ریال است.

	قبل از تولید آنتی بادی های بومی				بعد از تولید آنتی بادی های بومی			
ردیف	آنتی بادی	مقدار مورد نیاز	هزینه واردات (هزار آزمون)	کل هزینه	مقدار مورد نیاز	هزینه واردات (هزار آزمون)	کل هزینه
۱	PVY	۱۵	۲۵	۳۷۵	۳۰	۲۷۵	۸۲۵۰
۲	PVA	۱۰	۲۵	۲۵۰	۱۵	۲۷۵	۴۱۲۵
۳	PVM	۱۰	۲۵	۲۵۰	۱۵	۲۷۵	۴۱۲۵
٤	PVS	۱۰	۲۵	۲۵۰	۱۵	۲۷۵	۴۱۲۵
٥	PVX	۱۰	۲۵	۲۵۰	۱۵	۲۷۵	۴۱۲۵
٦	PLRV	۱۵	۲۵	۳۷۵	۳۰	۲۷۵	۸۲۵۰
۷	کنترل مثبت	۷۰ تیوب	۲/۵	۱۷۵	۱۴۰	۳۵	۴۹۰۰
۸	کنترل منفی	۲۰۰ تیوب	۳/۵	۷۰۰	۴۰۰	۴۵	۱۸۰۰۰
مجموع				۲۶۲۵			۵۵۹۰۰

دربند ۵ تکثیر شد. پس از همسانه سازی در سویه مناسب باکتریایی، دوباره برای تأیید صحت ترادف و حضور آنزیم های برشی مهندسی شده، ترادف یابی انجام شد.

۷- قطعات ژنومی مهندسی شده ویروس‌ها و ناقل های بیان باکتریایی با آنزیم های برشی مورد نظر هضم و پس از خالص‌سازی در هم الحاق شدند. سازه های ژنومی[۲۱] حاصل با شوک حرارتی که باعث ایجاد مجراهایی در دیواره سلولی باکتری می شود، در سلول های باکتری وارد شده و باکتری‌های حامل رشد داده شدند. حضور قطعات ژنومی پروتئین پوششی ویروس ها در ناقل های بیان با آزمون های واکنش زنجیره ای پلیمراز[۲۲] و غربالگری با آنتی بیوتیک های اختصاصی تأیید شد .

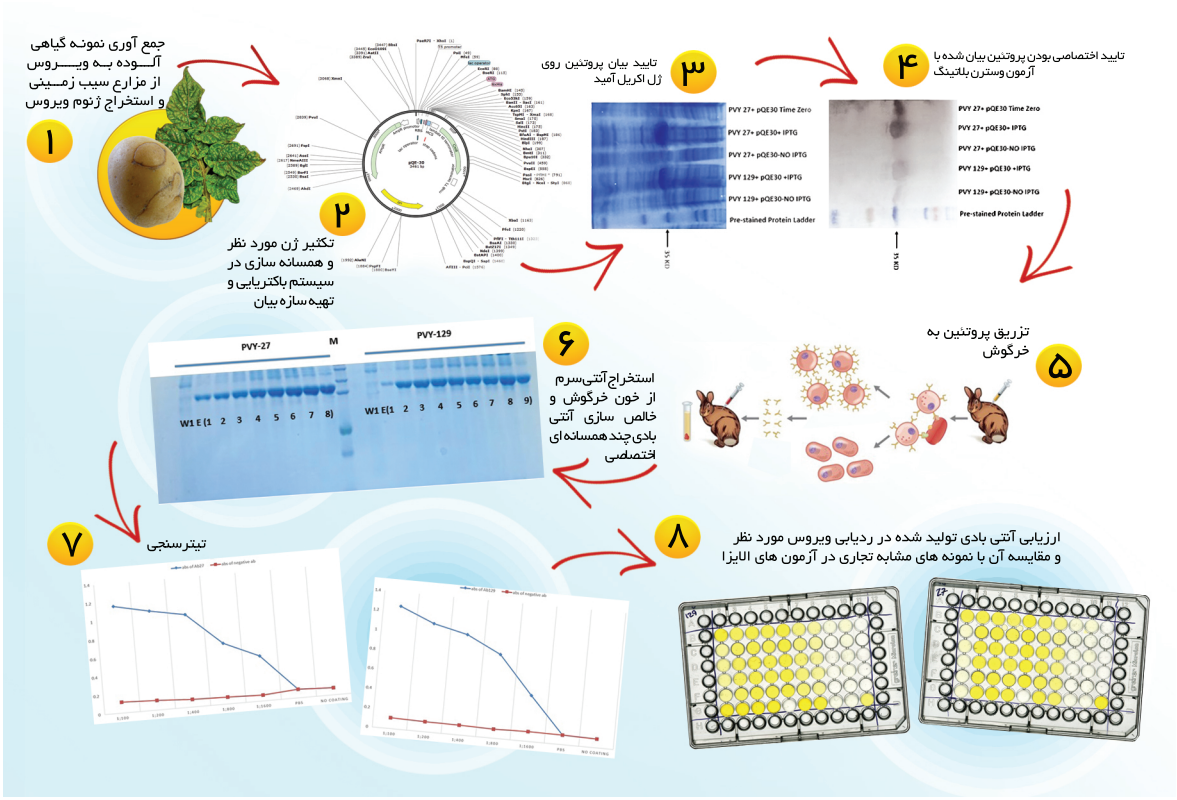
۸- واکنش های القاء بیان پروتئین پوششی جدایه های منتخب ویروس ها در باکتری همسانه سازی شده، انجام و شرایط مناسب برای بیان ژن ها بهینه سازی شد. القاء موفق بیان پروتئین ها با الکتروفورز آنها روی ژل پلی اکریل آمید[۲۳] بررسی شد.

۹- پس از القاء ابتدایی موفق، بیان پروتئین ها در حجم بالا در باکتری انجام و خالص‌سازی پروتئین‌ها به دو صورت طبیعی[۲۴] و واسرشته[۲۵] با طراحی ستون های کروماتوگرافی و استفاده از رزین نیکل[۲۶] انجام شد .

۱۰- هر یک از پروتئین ویروسی بیان شده در حجم بالا، قبل از ادامه آزمون ها و برای تایید بیشتر، با آزمون های مختلف (الکتروفورز روی ژل اکریل آمید، وسترن بلاتینگ[۲۷] ، دیبا[۲۸] و الایزا با آنتی بادی‌های تجاری) بررسی شد.

۱۱- هر کدام از پروتئین های ویروسی خالص شده به طور طبیعی و واسرشته یا ترکیبی از هر دو به طور جداگانه، چهار تا پنج نوبت و با استفاده از ادجوانت[۲۹] به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد.

شکل ۱) خلاصه ای از مراحل مختلف تولید آنتی بادی نوترکیب علیه ویروس Y سیب زمینی.



۱۲- پس از خون گیری مختصر از خرگوش‌ها و جداسازی سرم خون، آنتی سرم‌های موجود برای ردیابی پروتئین های خالص شده یا پیکره های ویروس ها بررسی شد. پس از تایید کامل، خون از قلب خرگوش‌ها استخراج و آنتی سرم ها تهیه شدند.

۱۳- ایمیونوگلوبولین های IgG[۳۰] موجود در آنتی سرم‌ها برای هر ویروس به‌طور جداگانه رسوب داده شده و با استفاده از کیسه دیالیز خالص سازی شدند.

۱۴- غلظت مناسب گاماگلوبولین با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین و تنظیم شد.

۱۵- واکنش اتصال گاماگلوبولین به آنزیم آلکالین فسفاتاز[۳۱] (IgG-AP) با استفاده از گلوتارآلدهید انجام شد.

۱۶- عیار مناسب گاماگلوبولین و گاماگلوبولین متصل به آنزیم AP در آزمون‌های الایزا برای ردیابی هر ویروس بهینه سازی شد.

۱۷- آنتی بادی و کانجوگیت[۳۲] تهیه شده با نمونه‌های مشابه خارجی در ردیابی جدایه های جمع آوری شده از کشور برای هر ویروس در چندین آزمون به‌طور جداگانه مقایسه شد.

خلاصه مراحل مختلف تولید آنتی بادی های چند همسانه ای برای ردیابی ویروس وای سیب زمینی به صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتیجه گیری نهایی

پیشرفت های علوم تجربی در اواخر قرن بیستم در نتیجه زحمات طاقت فرسای پژوهشگران این رشته از علوم، افقی نو برای زندگی بهتر را به آیندگان باز کرد. بدون شک فناوری های ژنتیکی به ویژه فناوری‌های DNA نوترکیب، یکی از بزرگترین و کاربردی‌ترین دست آوردها در علوم سلولی- مولکولی و یکی دیگر از نشانه های نبوغ بشری از اواخر قرن گذشته بوده است. این فناوری در حال حاضر نه تنها توسط پژوهشگران عرصه های مختلف در مراکز آموزشی و تحقیقاتی دنیا برای کشف بیشتر حقایق طبیعت برای زندگی بهتر استفاده می شود، بلکه امکان کاربردی نمودن DNA موجودات مختلف در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری‌های انسانی را فراهم آورده و نقش مهمی در کارآفرینی داشته است. نمونه های بارز آن، شرکت های بزرگی مانند فایزر[۳۳]، نووو نوردیسک[۳۴] و سایر کمپانی‌های بزرگی هستند که در زمینه تولید انواع پروتئین ها، آنتی بیوتیک‌ها، داروها و سایر مواد بیولوژیک نقش جهانی پیدا کرده اند.

هـر چنـد که تهیـه آنتی بـادی با روش های سـنتی نیز برای شناسـایی بیمارگرها امکان پذیر اسـت، ولی طاقت فرسـا بـودن، هزینه بالا، امکانات گران قیمت آزمایشـگاهی، نیاز بیشـتر به نیروی انسـانی و از همه مهمتر، دقـت پاییـن در نتیجه اختلال در خـواص ایمنی‌زایی پروتئیـن ویروس در حیـوان خونگـرم و تشـخیص سـایر پروتئیـن‌هـای میزبان‌هـای تکثیری بیمارگرهـا، از معایـب روش‌هـای سـنتی بـه حسـاب مـی‌آیـد. بـه علاوه، تولیـد آنتـی‌بـادی بـا روش‌هـای کلاسـیک، بـرای اسـتفاده هـای عملی بـه ویـژه در مراکـز پاتولوژیکـی کـه با تعـداد فـراوان نمونه ها سـر و کار داشـته و بـه حجـم بـالای آنتی بـادی ها نیـاز دارنـد، جوابگو نمی باشـد. همچنـان‌کـه اشـاره شـد، تهیـه آنتی‌بـادی‌ها از شـرکت‌هـای خارجی نیز عـلاوه بر دسترسـی ناکافـی و چالش برانگیـز بودن در شـرایط متفاوت، با صـرف هزینـه های هنگفـت و دقت ناکافـی در برخی موارد مواجه اسـت.

مؤسسـه تحقیقـات ثبـت و گواهی بذر و نهـال با اسـتفاده از تکنولوژی DNA نوترکیـب، آنتـی‌بـادی‌های مـورد نیاز خـود برای گواهی سـلامت بـذور سـیب زمینـی را در راسـتای انجـام بخشـی از رسـالت‌هـای قانونی و ملـی خـود در گواهـی سـلامت مـواد تکثیـری کشـاورزی کشـور تهیه نمـود. بـا توجـه بـه اینکه آنتـی‌بادی هـای تهیه شـده ضمن راسـتی آزمایـی بـا نمونـه‌هـای مشـابه تجـاری، در ردیابـی ویـروس هـای سـیب زمینـی در بیـش از یکصـد هـزار نمونـه گیاهـی آلوده و سـالم بررسـی و بـا آزمـون هـای مولکولی (در صـورت نیاز) تأیید شـده‌اند، مـی‌تـوان ادعـا کرد که ایـن مؤسسـه، اولین نهـاد در بین مؤسسـات تحقیقاتـی کشـور اسـت کـه توانسـت اسـتفاده از ایـن تکنولـوژی را در تولیـد آنتـی‌بـادی‌هـای نوترکیـب، بـه مرحلـه نیمـه صنعتـی برسـاند و سـالیانه بالـغ بـر ۱۸۰ هـزار دلار صرفـه‌جویـی ارزی نمایـد. بـه عـلاوه، وارد شـدن در مسـیر تولیـد ایـن مـواد بیولوژیـک حیاتی بـرای بررسـی سـلامت بذور سـیب‌زمینـی، تجربیـات ارزشـمندی را بـرای انجـام فعالیـت‌هـای مشـابه در مـورد سـایر بیمارگرها بـه‌ویژه بیمارگرهـای ویروسـی درختـان میـوه در راسـتای گواهـی سـلامت نهـال فراهـم نموده اسـت.

بررسـی‌هـای اولیـه مؤسسـه در بـه کارگیـری فنـاوری نانو[35] بـر پایه آنتـی‌بـادی‌هـای تولیدشـده، امیدهای زیـادی را بـرای کاربـردی نمودن اسـتفاده از آنتـی‌بـادی‌هـا در بررسـی‌هـای میدانـی گواهـی بـذر سـیب زمینـی ایجـاد نمـوده اسـت. امیـد مـی رود ایـن یافتـه اخیـر افـق جدیـد دیگـری در پیشـبرد گواهی سـلامت بـذر و نهـال در آینده نزدیک باشـد.

تشکر و قدردانی

مجـری مسـئول و مجریـان طـرح از معاونـت علمـی و فنـاوری ریاسـت جمهـوری بـه دلیـل حمایت هـای مالی تشـکر مـی نمایند. موفقیـت طرح مرهـون امکانات و حمایت های معنوی سـازمان تحقیقـات، آموزش و ترویج کشـاورزی و مجموعـه همـکاران زحمـت کش و صدیق مؤسسـه تحقیقات ثبـت و گواهـی بـذر و نهـال اسـت کـه بدینوسـیله مراتـب سپاسـگزاری و قدردانـی نثارشـان می شـود.

پی نوشت

1- latency
2- Subgenomic, defective and satellite nucleic acids
3- Non-persistent
4- Persistent
5- Semi-persistent
6- Circulative and propagative
7- Plant Health
8- Enzyme-linked immunosorbent assay
9- *Potato virus Y, Potyvirus*
10- *Potato virus A Potyvirus*
11- *Potato virus M Carlavirus*
12- *Potato virus S Carlavirus*
13- *Potato virus X Potexvirus*
14- *Potato leafroll Poleovirus*
15- Recombinant coat protein
16- Recombinant DNA
17- Coat protein
18- National Center for Biotechnology Information
19- Complementary DNA
20- Cloning
21- Genomic constructs
22- Polymerase chain reaction
23- SDS-PAGE
24- Native
25- Denatured
26- Ni-NTA Agarose
27- Western blotting
28- Dot blot immunoassay (DIBA)
29- Adjuvant
30- Immunoglobulin G
31- Alkaline phosphatase
32- Conjugate
33- Pfizer
34-Novo Nordisk
35- Nanotechnology

منابع

- Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses . Journal of General Virology 34: 475-485.
- Jeong, J.-J., Ju, H.-J., and Nuh, J. 2014. A review of detection methods for the plant viruses. Research in Plant Diseases 20: 173-181.
- Naderpour, M. 2020. Challenges facing the detection of systemic pathogens in certification programs. Acta Horticulturae 1269:12.
- Oerke, E.–C., and Dehne, H.-W. 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. Crop Protection 23: 275-285.
- Rubio, L., Galipienso, L., and Ferriol, I. 2020. Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. Frontires in Plant Science 11: 1092.
- Sambrook, J. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. CSH, USA.
- Sastry, S. K., and Zitter, T. A. 2014. Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. In: Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics, vol. 2, Epidemiology and Management. Dordrecht, Springer, 149-480.