مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

بیان آنزیم فعال بتا-گلوکورونیداز در بذر گیاه توتون

خدیجه باقری Ph.D.*، بهرام ملکی زنجانی Ph.D. ، مهسا مکانیک M.Sc.

- دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، زنجان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷

چکیده

هدف: طراحی و تهیه سازه ژنی مناسب و انتقال آن به گیاه توتون و بررسی گیاهان تراریخت حاصله بوده است.

مواد و روش‌ها: سازه اختصاصی بذر حاوی پیشبرنده Napin، توالی Ω ، ژن GUS و توالی SAR در پلاسمید pBI121 طراحی و تهیه و در باکتری E. coli تکثیر شد. ریزنمونه‌های برگی توتون با آگروباکتریوم سویه LBA4404 به‌روش استاندارد تلقیح شدند. گزینش جوانه‌های باززایی شده در محیط انتخابی (شامل MS، ۰/۱ mg/l NAA، ۳ mg/l BAP، ۲۵ mg/L کانامایسین، mg/L ۲۰۰ سفوتاکسیم) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت با PCR، RT-PCR و آزمون هیستوشیمیایی انجام شد.

نتایج: بررسی مولکولی گیاهان باززایی شده با PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های nptII و GUS نشان‌دهنده انتقال این ژن‌ها به گیاه‌چه‌های باززایی شده بود. نتایج RT-PCR نشان داد که نسخه‌برداری از ژن nptII در هر دو بافت برگ و بذر صورت می‌گیرد در حالیکه نسخه‌برداری از ژن GUS تنها در بذر صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه پیشبرنده NOS (کنترل‌کننده ژن nptII) عمومی و Napin (کنترل‌کننده ژن GUS) یک پیشبرنده اختصاصی بذر می‌باشد، این نتیجه مورد انتظار بود. در نهایت با استفاده از SDS-PAGE و آزمون هیستوشیمیایی، تولید و فعالیت آنزیم بتا-گلوکورونیداز در بذر گیاهان تراریخت تائید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مناسب بودن سازه ژنی طراحی شده را نشان داد، چرا که پیشبرنده Napin به خوبی موجب بیان اختصاصی ژن GUS در بذر شده و توالی امگا نیز در افزایش بیان تراژن موثر بوده است. در ادامه کار می‌توان این سازه را با جایگزینی ژن‌های ارزشمند با ژن GUS برای تولید پروتئینهای نوترکیب استفاده نمود.

واژگان کلیدی: توالی Ω (امگا) ، SAR ، پیشبرنده Napin، ژن GUS، توتون

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تولید پروتئین‌های نوترکیب در بذرهای تراریخته یک جایگزین جذاب و از لحاظ اقتصادی به صرفه برای سیستم‌های سنتی است که بر پایه سلول‌های باکتریایی و جانوری می‌باشد. تجمع پایدار پروتئین نوترکیب در یک غلظت نسبتا بالا در یک بیوماس فشرده برای استخراج و فرآیندهای بعدی بسیار مفید است (۱). موفقیت در تولید پروتئین‌های نوترکیب درون بذر به‌وسیله‌ی فاکتورهای متعددی از جمله استفاده از پیشبرنده مناسب اختصاصی بذر، افزایش بیان ژن، پایداری بیان ژن و ... تعیین می‌شود. از طرف دیگر بیان موفقیت‌آمیز تراژن در گیاه، نیازمند آماده کردن سازه ژنی مناسب قبل از انتقال به گیاه است. در این تحقیق سازه ژنی حاوی پیشبرنده Napin، توالی Ω (امگا) در بالادست ژن GUS، ژن GUS و توالی SAR (Scaffold attachment region) در پایین‌دست ژن GUS طراحی و تهیه شد. پیشبرنده قوی و اختصاصی بذرNapin از گیاه کلزا جداسازی شده و موجب بیان ژن تحت کنترل خود در بذر می‌شود. با توجه به اینکه بیان نهائی پروتئین نوترکیب تحت تاثیر دو مرحله‌ی اساسی رونویسی و ترجمه قرار می گیرد، بنابراین استفاده از عناصری که اثر افزایندگی آن‌ها در مرحله‌ی ترجمه نمود می‌یابد، راه‌کاری است که می‌تواند برای بهبود بیان پروتئین نوترکیب مدنظر قرار گیرد. توالی Ω از RNA ویروس موزائیک توتون به‌دست آمده که به‌طور اختصاصی به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ترجمه عمل می‌کند و میزان ترجمه را هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها افزایش می‌دهد. (۲). یکی از مشکلاتی که در زمینه‌ی انتقال ژن وجود دارد، ناپایداری تراژن درنسل‌های متوالی است که به‌طور کلی به آن خاموشی ژن اطلاق می‌شود. توالی دیگری که در طراحی سازه ژنی مورد نظر، استفاده شد، به اختصار SAR گفته می‌شود و حداقل از دو طریق نقش خود را در جلوگیری از خاموشی ژن‌ها در مرحله نسخه‌برداری ایفا می‌کنند: ۱- از آنجا که تراژن‌های چند نسخه‌ای ممکن است انواع متفاوتی از برهمکنش‌های جفت‌شدگی را متحمل شوند که می‌تواند منجر به خاموشی ژن شود، عناصر SAR با اتصال به ماتریکس هسته از جفت‌شدگی بین نسخه‌های تراژن ممانعت به‌عمل می‌آورند (۳) . ۲- زمانی که چندین نسخه از تراژن به حالت سیس در یک لوکوس وارد می‌شود SARها به‌عنوان خاتمه‌دهنده رونویسی عمل کرده و از توسعه رونویسی از یک تراژن به تراژن دیگر جلوگیری کرده و پتانسیل رونوشت‌های تکراری معکوس را کاهش می‌دهند (۴). نواک و همکاران (۵) یک SAR سنتزی را در مجاورت ژن GUS تحت پیشبرنده 35S به کار بردند و گیاهان توتون را توسط اگروباکتریوم تراریخت کردند که اثرش بر سطح بیان ۳/۸ تا ۲/۳ برابر بود. در مطالعه‌ای که توسط ورما و همکاران (۶) انجام شد، برگ‌های برنج با استفاده از تفنگ ژنی تحت تراریختی با 35S-GUS در مجاورت RB7 (نوعی توالی SAR) قرار گرفتند و ۷۷ برابر افزایش در بیان ژن خارجی گزارش شد. در این تحقیق فرض بر این بوده که سازه ژنی تهیه شده ضمن بیان ژن GUS در بذر گیاه، موجب افزایش بیان و نیز پایداری آن خواهد شد برای بررسی این موضوع سازه مدنظر به توتون منتقل شد که یک گیاه رایج در بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری E. coli سویه TOP10F´ (مقاوم به تتراسایکلین)، اگروباکتریوم سویه LBA4404، پلاسمید دوگانه pBI121 حاوی پیشبرنده Napin و ژن nptII به‌عنوان نشانگر انتخابی، ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T حاوی ژن lacz و ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (شرکت Fermentase) استفاده شد.

طراحی آغازگرها: از آغازگرهای اختصاصی شماره ۱ و۲ برای تکثیر ژن GUS به همراه قطعه‌ی امگا و آغازگرهای ۳ و ۴ برای جداسازی قطعه SAR از ژنوم توتون (جدول ۱) استفاده شد. قابل ذکر است که آغازگرهای قطعه

Archive of SID
www.SID.ir

SAR با استفاده از توالی pS206-1 با شماره دسترسی AF065883.1 طراحی شد. آغازگر شماره ۱ از سمت '۵ شامل جایگاه آنزیم برشی XbaI، توالی امگا، کد آغاز ترجمه و ۱۳ نوکلئوتید ابتدایی ژن GUS است. آغازگر شماره ۲ از سمت '۵ شامل ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی SAR، کد پایان ترجمه و ۱۸ نوکلئوتید انتهایی GUS می‌باشد. آغازگر شماره ۳ از سمت '۵ شامل ۱۸ نوکلئوتید انتهایی GUS، کد پایان و ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی SAR است. آغازگر شماره ۴ از سمت '۵ شامل جایگاه آنزیم برشی SacI و انتهای توالی SAR می‌باشد.

جدول۱: آغازگرهای طراحی‌شده برای جداسازی و تکثیر قطعات Ω-GUS و SAR

1) F:5'ATTCTAGAGTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACAACAACAAACAACAA ATGTTACGTCCTGTAG-3'
2) R: 5' CTATAATAATAGCTGGATCTTTACTGTTTACCTCCCTGCTG-3'
3) F: 5'CAGCAGGGAGGTAAACAGTAAAGATCCAGCTATTATTATAG-3'
4) R: 5' TGAGCTCGAGCTTCTATTGCTTGCTTAATAAAACTACTAATTATAAG-3'

تکثیر قطعه‌ی Ω-GUS و جداسازی SAR. به‌منظور قرار دادن قطعه‌ی امگا در ابتدای ژن GUS، در هنگام طراحی آغازگرها توالی این افزاینده (۵۵ نوکلئوتید) در ابتدای آغازگر مستقیم (شماره ۱) قرار گرفت و واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای شماره‌ی ۱ و ۲ انجام شد. مواد واکنش PCR مطابق با غلظت‌های استاندارد و برنامه واکنش نیز برنامه استاندارد برای ۲۵ سیکل واکنش، دمای اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه در نظر گرفته شد. از پلاسمید pBI121 حاوی ژن GUS به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد.

از برگ گیاه‌چه‌های توتون (در مرحله‌ی ۳ تا ۴ برگی) استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۷) انجام شد. سپس قطعه‌ی SAR با استفاده از آغازگرهای شماره ۳ و ۴، از ژنوم توتون جداسازی و تکثیر شد. مواد واکنش PCR به استثناء MgCl2 (۲/۷۵mM) مطابق با PCR استاندارد و دمای اتصال آغازگرها در این واکنش، ۵۵/۷ درجه ساتی‌گراد می‌باشد. به‌منظور استفاده از محصولات PCR در مراحل بعدی، خالص‌سازی آن‌ها از روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت Qiagene) و مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد.

اتصال قطعات Ω-GUS و SAR با استفاده از SOEingPCR: برای انجام واکنش SOEingPCR، ابتدا مقادیر مناسبی از محصولات خالص‌سازی شده‌ی دو قطعه Ω-GUS و SAR حاصل از PCR اول و دوم به صورت مخلوط، تحت تیمار با آنزیم Taq polymerase (بدون استفاده از آغازگرها) به تعداد ۵ چرخه قرار گرفتند؛ سپس با افزودن آغازگرهای شماره ۱ و ۴، قطعه‌ی نهایی (Ω-GUS-SAR) تکثیر شد. مراحل و شرایط انجام این واکنش در جدول ۲ آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: شرایط چرخه دمایی-زمانی SOEing PCR

مرحله۱				مرحله۲			
تعداد چرخه‌ها	نام مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه‌ها	نام مرحله	دما	زمان
1x	Initial denaturation	95 0C	2 ´	1x	Initial denaturation	95 0C	2 ´
	Denaturation	95 0C	1 ´		Denaturation	95 0C	1 ´
5x	Annealing (overlapping parts)	58 0C	1 ´	25 x	Annealing (overlapping parts)	57 0C	1 ´
	Extension (overlapping parts)	72 0C	1 ´		Extension (overlapping parts)	72 0C	1´:30´´
	Extension (overlapping parts)	72 0C	2´		Final Extension	72 0C	2´
	Add primers		Pause				

تهیه قطعه Ω-GUS-SAR در ناقل‌های همسانه‌سازی و بیانی بعد از تهیه قطعه‌ی نهایی (Ω-GUS-SAR) برای تعیین توالی و نیز تسهیل کلونینگ آن در ناقل pBI121، ابتدا این قطعه مطابق با پروتوکل کیت در ناقل pTZ57R/T کلون و انتخاب اولیه کلونی‌های سفید در محیط حاوی X-Gal و IPTG صورت گرفت شد. ناقل pTZ57R/T حاوی قطعه‌ی موردنظر، جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogen کشور کره ارسال شد. برای انتقال قطعه‌ی Ω-GUS-SAR به ناقل بیانی pBI121 ابتدا هر دو ناقل pTZ57R/T (حاوی قطعه موردنظر) و pBI121 با آنزیم‌های SacI و XbaI برش داده شد و پس از خالص‌سازی قطعه‌ی Ω-GUS-SAR و پلاسمید pBI121 فاقد GUS اولیه از ژل آگاروز ۱ درصد، با توجه به غلظت باندهای مشاهده‌شده، واکنش اتصال بین آن‌ها انجام گرفت و پلاسمید نوترکیب pBI121-N-Ω-GUS-SAR به سلول‌های مستعد باکتری E.coli سویه TOP10F′ انتقال داده شد. به‌منظور اطمینان از کلون‌شدن قطعه‌ی موردنظر، PCR بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی تتراسایکلین و کاناماسین انجام شد و جهت اطمینان از صحت طول قطعه‌ی کلون‌شده، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی XbaI و SacI انجام شد. در ادامه پلاسمید pBI121-N-Ω-GUS-SAR با روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال داده شد (۸).

انتقال سازه ژنی به ریزنمونه‌های برگی توتون و باززایی گیاهان تراریخت ضدعفونی بذرهای توتون رقم Xanthi با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای جوانه زنی بذور از محیط MS در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. بعد از تقریبا ۲ هفته، گیاهان رشد کرده و جوان‌ترین برگ‌ها با طول تقریبا ۴ سانتی‌متر برای تراریخت نمودن انتخاب (که هرکدام از آن‌ها به ۸ تا ۱۰ قطعه تقسیم شدند) و جهت تلقیح آماده شدند. یک روز قبل از انجام آلودگی، تک کلنی‌های اگروباکتریوم حاوی سازه موردنظر در محیط (LB + ۵۰ µg/ml) کاناماسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کشت داده شد، وقتی که OD باکتری رشد کرده به ۰/۵ تا ۱ رسید، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور g× ۳۵۰۰ به‌مدت ۵ تا ۸ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت باکتری (LB)، محیط تلقیح (MS مایع و هورمون‌های BAP با غلظت mg/l ۳ و NAA به مقدار mg/l ۰/۱، به سلول‌های باکتری اضافه و سلول‌ها کاملا در آن حل شدند. بعد ازآماده کردن سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه‌ها به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه در تماس با سوسپانسیون

Archive of SID

www.SID.ir

اگروباکتریوم قرار گرفته و در محیط هم‌کشتی (MS کامل و هورمون‌های BAP با غلظت mg/l ۳ و NAA به‌مقدار ۰/۱mg/l) به‌مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعدی این ریزنمونه‌ها در محیط کشت انتخابی (شامل محیط هم‌کشتی و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰-۲۵µg/ml و سفوتاکسیم با غلظت µg/ml ۲۰۰) در دما و دوره نوری مشابه مرحله قبل به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. واکشت نمونه‌ها به‌فاصله هر ۱۵ روز یک‌بار انجام شد. برای طویل شدن نوساقه‌ها از محیط طویل شدن ساقه (MS کامل به‌همراه µg/ml ۱۰۰ آنتی‌بیوتیک کانامایسین) و برای ریشه‌زایی گیاهچه‌ها از محیط ریشه زایی (MS کامل به‌همراه µg/ml ۰/۱ هورمون NAA) استفاده شد. گیاهان ریشه دار شده ابتدا به گلدان‌های حاوی پرلیت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) سپس به خاک منتقل شده و تا زمان جمع‌آوری بذور در شرایط گلخانه نگه‌داری شدند (۹).

بررسی مولکولی گیاهان تراریخت: بررسی در سطح DNA: از برگ‌های جوان گیاهچه‌های رشد کرده در محیط انتخابی و گیاهان شاهد (گیاه غیرتراریخت)، DNA ژنومی به‌روش دلاپورتا استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن nptII F: 5'ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC AG -3') و R: 5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATA G-3') و آغازگرهای ژن GUS (F: 5'-GTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATC -3' و R: 5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGAT AG-3') واکنش PCR انجام شد.

بررسی در سطح RNA: برای بررسی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA از بافتهای بذری و برگی با استفاده از محلول استخراج RNA (RNX-Plus - 25ml RN7713C) تهیه شده از شرکت سیناژن انجام شد. ساخت cDNA از روی RNAی استخراج شده، به‌وسیله کیت دومرحله‌ای RT-PCR (vivantis,RTPL12) انجام گرفت. برای استخراج RNA از بذر، برداشت بذور نارس از گیاهان PCR مثبت، ۲۰ روز پس از گل‌دهی انجام شد. قابل ذکر است که زمان مناسب برای فعالیت پیشبرنده Napin، حدود ۲۰ روز پس از گل‌دهی است (۱۰) به‌همین دلیل این زمان برای نمونه‌برداری انتخاب شده است. همچنین برگ‌های مناسب نیز از گیاهان PCR مثبت انتخاب شدند. برای انجام واکنش RT-PCR از آغازگرهای مرحله قبل استفاده شد.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح پروتئین: آزمون هیستوشیمیایی جهت تایید بیان ژن GUS، بر روی برگ و بذور گیاهان شاهد و تراریخت توتون، با روش جفرسون و همکاران (۱۱) صورت گرفت. سوبسترای مورد استفاده برای این آنزیم X-gluc (شرکت Fermentas) بود. برای از بین بردن رنگ کلروفیل برگ‌ها از اتانول استفاده شد. در مورد نمونه‌های بذری، ابتدا بذور با استفاده از ازت مایع خرد و سپس آزمون هیستوشیمیایی انجام شد. برای بررسی بیان ژن در سطح پروتئین، ابتدا استخراج پروتئین کل از بذرهای گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) انجام گرفت و سپس از تکنیک SDS-PAGE به‌روش Laemmli (۱۲) استفاده شد.

نتایج

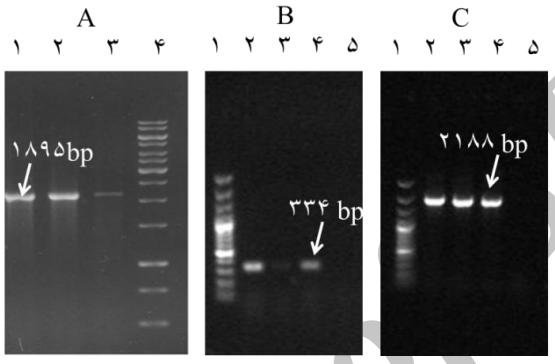
تهیه قطعات Ω-GUS، SAR و Ω-GUS-SAR و کلونینگ در پلاسمیدها

محصول اولین واکنش PCR، قطعه‌ای به‌طول ۱۸۹۵ جفت باز است که این قطعه شامل قطعه‌ی Ω (۶۳ bp)، ژن GUS (۱۸۱۲bp) و ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی قطعه‌ی SAR می‌باشد (شکل 1A). تعبیه‌کردن ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی SAR در سمت '۵ آغازگر شماره ۲ منجر به قرارگرفتن این ۲۰ نوکلئوتید در انتهای ژن GUS می‌شود. هدف از این کار ایجاد همپوشانی لازم (به‌طول۴۱

Archive of SID

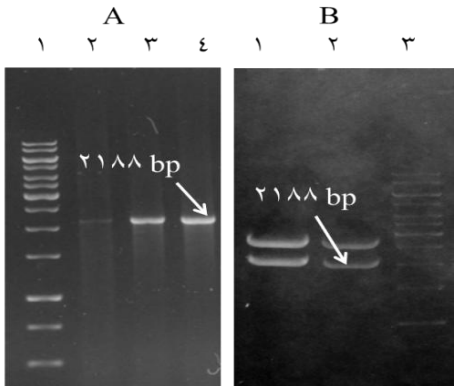
www.SID.ir

نوکلئوتید) بین محصولات PCR اول و دوم بود که در واکنش SOEing PCR از قسمت همپوشان به‌هم وصل شوند. محصول واکنش دوم PCR به‌طول ۳۳۴bp است، که به‌ترتیب از سمت '۵ شامل ۲۱ نوکلئوتید انتهایی ژن *GUS* و قطعه‌ی SAR به طول ۳۰۶bp (شکل ۱B). در زمان طراحی آغازگرها، ۲۱ نوکلئوتید انتهایی ژن *GUS* در ابتدای آغازگر شماره ۳ قرار گرفت تا بدین ترتیب همپوشانی لازم بین محصولات PCR اول و دوم در هنگام SOEingPCR برقرار شود. با توجه به وجود توالیهای همپوشان درانتهای '۳ قطعه‌ی Ω-GUS و انتهای '۵ قطعه SAR، این دو قطعه در دمای اتصال مناسب از ناحیه همپوشان به‌هم وصل شده و هریک به‌عنوان آغازگر برای رشته‌ی دیگر عمل کرده و بدین ترتیب ضمن وصل شدن دو قطعه‌ی مورد نظر، یک قطعه کامل دو رشته‌ای (Ω-GUS-SAR) نیز تولید شد. در مرحله‌ی بعدی واکنش و پس از افزودن آغازگرهای ۱و۴، قطعه‌ی مورد نظر به‌عنوان الگوی این آغازگرها قرار گرفت و بدین ترتیب قطعه نهایی با طول ۲۱۸۸ جفت‌باز، در حجم بالا تکثیر شد (شکل ۱C).



شکل ۱: تکثیر قطعات Ω-GUS (A) ، SAR (B) و Ω-GUS-SAR (C) با PCR. A) ۱، ۲ و ۳: قطعه Ω-GUS تکثیریافته ۴: نشانگر ۱kb. B) ۱: نشانگر bp ۱۰۰، ۳۰۲ و ۴ : قطعات تکثیریافته SAR ۵: کنترل منفی C) ۱: نشانگر bp ۱۰۰، ۳۰۲ و ۴ : قطعات تکثیریافته

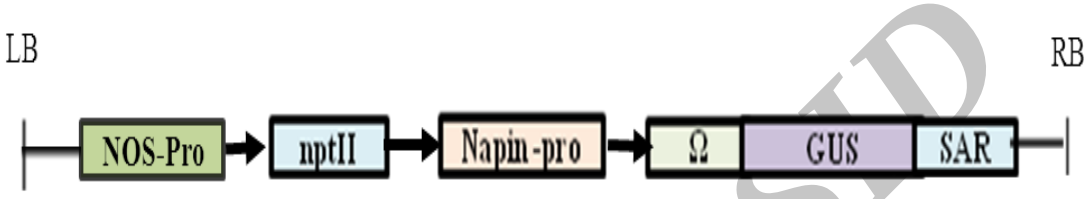
بعد از تهیه Ω-GUS-SAR، واکنش اتصال این قطعه با ناقل pTZ57R/T انجام و محصول واکنش اتصال به سلول‌های مستعد باکتری *E.coli* منتقل شد. کلونی PCR بر روی کلونی‌های سفید انجام شد. کلونی‌هایی که محصول PCR آنها قطعه‌ای به اندازه ۲۱۸۸ جفت‌باز بود (شکل۲A)، به‌عنوان کلونی‌های حاوی قطعه‌ی موردنظر انتخاب شدند و واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I انجام شد. با خروج قطعه‌ای به‌طول ۲۱۸۸ جفت‌باز، صحت انجام کلونینگ مورد تایید نهایی قرار گرفت (شکل۲B) و نتیجه‌ی توالی‌یابی، صحت توالی قطعه‌ی موردنظر را تایید کرد.



شکل ۲: محصول کلونی PCR (A) و هضم آنزیمی (B) با ناقل نوترکیب pTZ57R/T-Ω-GUS-SAR. A) ۱: نشانگر ۱kb ۲، ۳ و ۴ : قطعه تکثیر شده Ω-GUS-SAR با کلونی PCR B) ۱ و ۲: قطعه bp ۲۱۸۸ حاصل از هضم آنزیمی ناقل نوترکیب pTZ57R/T-Ω-GUS-SAR ۳: نشانگر ۱kb

www.SID.ir
Archive of SID

برای ساب کلونینگ قطعه Ω-GUS-SAR در ناقل pBI121، واکنش‌های هضم آنزیمی، اتصال و انتقال به سلول‌های باکتری مجددا انجام شد. کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱ و ۴ بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط تتراسایکلین و کانامایسین، قطعاتی به طول ۲۱۸۸ جفت‌باز تولید شد که تاییدکننده‌ی کلون‌شدن قطعه‌ی مورد نظر در کلونی‌های به‌دست آمده بود. به‌منظور تایید نهایی سازه‌ی مورد نظر، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I به‌طور هم‌زمان بر روی ناقل‌های نوترکیب pTZ57R/T-Ω-GUS-SAR و pBI121-N-Ω-GUS-SAR و ناقل pBI121 اولیه (حاوی ژن *GUS* بدون توالیهای Ω و SAR) انجام شد. با آزادشدن قطعه‌ی ۱۸۱۲جفت‌باز از ناقل pBI121 اولیه و قطعه‌ی ۲۱۸۸جفت‌باز از ناقل‌های نوترکیب pTZ57R/T-Ω-*GUS-SAR* و pBI121-N-Ω-GUS-SAR، سازه‌ی ساخته شده مورد تایید نهایی قرار گرفت (شکل ۳).



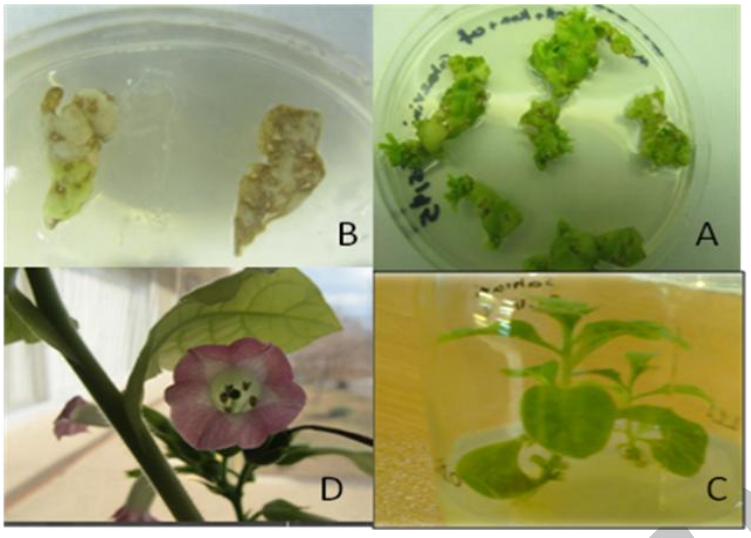
شکل ۳: سازه نهایی تهیه شده در ناقل pBI121. از چپ به راست به ترتیب پیشبرنده NOS (پیشبرنده عمومی)، ژن nptII، پیشبرنده Napin (اختصاصی بذر)، توالی

تراریزش ریزنمونه‌ها و باززایی گیاهان تراریخت

با توجه به نتایج تحقیقات قبلی از سویه *LBA4404* اگروباکتریوم و همچنین مدت زمان هم کشتی ۴۸ ساعت و تاریکی برای تلقیح ریزنمونه‌های توتون استفاده شد. حداقل زمان لازم برای فعالیت پروتئین‌های Vir و انتقال T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی، ۱۶ ساعت می باشد ، زمان‌های کمتر از ۴۸ ساعت باعث کاهش کارایی تراریختی می‌شود و موجب مرگ ریز نمونه‌ها می‌شود. حضور نور فعالیت سلول‌ها را درجهت تمایز هدایت می کند و تاریکی موجب افزایش تقسیم سلولی و تشکیل کالوس می‌شود (۱۳) لذا هم‌کشتی در شرایط تاریکی انجام شد.در خصوص مصرف کانامایسین به‌عنوان عامل انتخابگر نوساقه‌ها باید توجه داشت که برای توتون محدوده بین mg/lit ۱۰۰ –۲۵ مناسب است و افزایش این افزایش زمان، باعث افزایش آلودگی باکتریایی می‌شود که آلودگی زیاد موجب انهدام ریزنمونه‌ها می‌شود. مرحله هم کشتی در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انجام شد. دمای کمتر موجب کاهش فعالیت اگروباکتریوم و موجب اختلال در روند انتقال T-DNA می‌شود. دمای بالاتر در حدود ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه رشد اگروباکتریوم است به‌علت رشد بیش از اندازه اگروباکتریوم مقدار حتی ممکن است موجب حذف گیاهان تراریخت نیز شود. گیاهچه‌های سبز و رشدیافته در محیط انتخابی به‌منظور طویل‌شدن ساقه و ریشه‌زایی به محیط طویل شدن ساقه و ریشه‌زایی انتقال یافتند. ریزنمونه‌هایی که تراریخت نشدند در محیط انتخابی به رنگ سفید در آمدند همچنین ریز نمونه‌هایی که باززایی نشدند پس از مدتی نکروزه شدند (شکل ۴).

Archive of SID

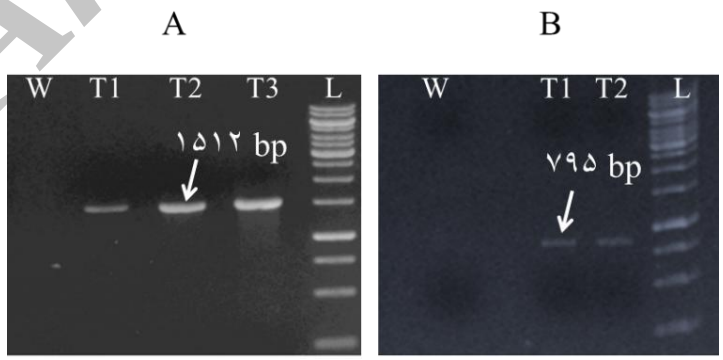
www.SID.ir



شکل۴: گیاهان باززائی شده در مراحل مختلف رشد. A: پیدایش و رشد جوانه‌های اولیه از ریزنمونه‌های برگی B : نکروزه شدن ریز نمونه‌های تراریخت نشده ۲ تا ۳ هفته بعد از تلقیح C: انتقال نوساقه به محیط طویل شدن ساقه D: گل‌دهی گیاهان منتقل شده به پرلایت و خاک.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخت

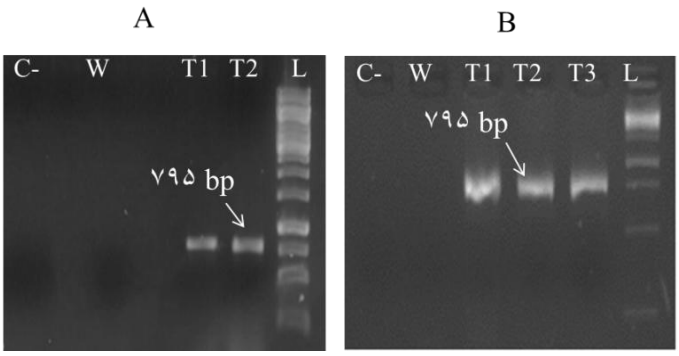
به‌منظور بررسی مولکولی گیاهان، DNA ژنومی گیاهان نسل اول (T0) و شاهد، به‌عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و ژن *GUS* در واکنش PCR استفاده شد و قطعه ۷۹۵ bp مربوط به ژن *npt*II و قطعه ۱۵۱۲ bp مربوط به ژن *GUS* در گیاهان تراریخت مشاهده شد در حالی‌که در گیاهان شاهد باندی مشاهده نشد (شکل۵). لازم به ذکر است که اندازه ژن *GUS* برابر ۱۸۱۲ bp می‌باشد ولی چون دو آغازگر فوق در داخل ژن طراحی شده بود اندازه قطعه تکثیر شده کوچک‌تر و برابر ۱۵۱۲ bp می‌باشد. گیاهانی که نتیجه PCR آن‌ها مثبت بود برای استخراج RNA از برگ و بذر انتخاب شدند. نتایج RT-PCR نشان داد که بیان ژن *npt*II به‌علت وجود پیشبرنده عمومی Nos در بذر و برگ صورت می‌گیرد (شکل ۶)، ولی بیان ژن *GUS* به‌علت وجود پیشبرنده اختصاصی بذری Napin تنها در بذر گیاهان تراریخت مشاهده شد و در برگ گیاهان تراریخت مشاهده نشد (شکل۷).



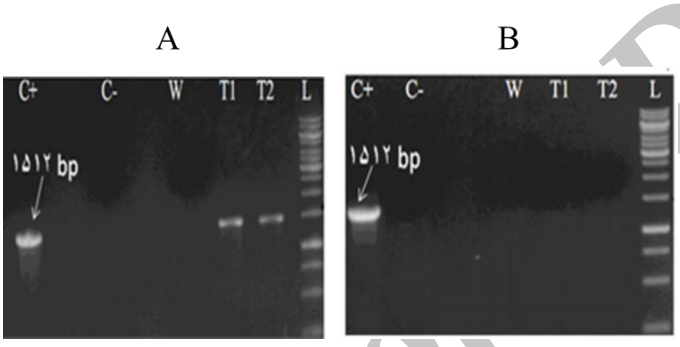
شکل۵: بررسی حضور ژن GUS (A) و nptII (B) در گیاهان باززائی شده با PCR . W: گیاه شاهد T3, T2,T1: قطعات تکثیر شده (گیاهان تراریخت متفاوت) L: نشانگر ۱kb.

Archive of SID

www.SID.ir



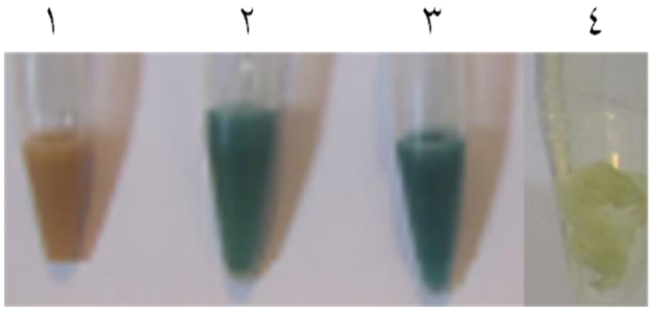
شکل ۶: تایید سنتز mRNA ژن nptII با واکنش RT-PCR در برگ (A) و در بذر (B) گیاهان توتون تراریخت. –C: کنترل منفی W : گیاهان شاهد T1 ، T2 و T3 : ژن تکثیر شده nptII (گیاهان تراریخت متفاوت).



شکل ۷: بررسی نسخه برداری از ژن GUS در بذر (A) و در برگ (B) گیاهان باززائی شده با RT-PCR. T1 و T2: cDNA گیاهان باززایی شده –C: کنترل منفی +C: کنترل مثبت W: گیاهان شاهد.

بررسی گیاهان تراریخت در سطح پروتئین

نمونه پروتئین‌های استخراج‌شده از بذر گیاهان تراریخت و گیاه شاهد، تعیین غلظت و از نظر غلظت همتراز شده و برای آنالیز پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه SDS-PAGE با پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت وجود یک قطعه اضافی مشخص با وزن ۶۰ kDa در مقایسه با گیاهان شاهد را نشان داد. آزمون هیستوشیمیایی GUS مربوط به بذر، بر روی نمونه‌های بذری شاهد و تراریخت صورت گرفت و بعد از ۲۴ ساعت نتایج مورد بررسی قرار گرفت. بذور تراریخت رنگ آبی را از خود نشان دادند ولی در بذور شاهد هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل۸). نتیجه این آزمون نشان داد که آنزیم بتا گلوکلورونیداز تولید شده بر سوبسترا اثر کرده و فعالیت لازم را دارد. در نمونه‌های برگی هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد و این تایید دیگری بر بیان نشدن ژن *GUS* در برگ می‌باشد.



شکل ۸: آزمون هیستوشیمیایی GUS. ۱: بذور گیاه شاهد ۲ و۳: بذر گیاه تراریخت ۴: برگ گیاه تراریخت

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

مزیت عمده استفاده از Soeing PCR برای اتصال چند قطعه DNA این است که نیاز به استفاده مکرر از آنزیم‌های برشی و جایگاه‌های برش وجود ندارد. همچنین این روش نسبت به سنتز مصنوعی توالی‌ها نیز از نظر صرفه‌جویی در هزینه‌ها برتری دارد. بنابراینSoeing PCR یک تکنیک مناسب برای ساختن سازه‌های شیمری است. استفاده از پیشبرنده‌های اختصاصی بافت موجب جلوگیری از فرار ژن از طریق گرده، کاهش آلرژی و مقبولیت بیشتر گیاهان تراریخته می‌شود. همچنین احتمال نوترکیبی بین DNA گیاه میزبان و DNA ویروسی (اغلب پیشبرنده‌های عمومی که در انتقال ژن به گیاهان استفاده می‌شود، منشا ویروسی دارند) نیز وجود نخواهد داشت. ضمن این‌که پیشبرنده‌های اختصاصی مثل پیشبرنده‌های عمومی رشد طبیعی گیاه میزبان را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند (۱۴). بنا به‌دلایل ذکر شده، در این تحقیق به‌منظور بیان ژن GUS در بذر گیاه، پیشبرنده Napin به‌جای پیشبرنده عمومی CaMV 35S جایگزین شد. این پیشبرنده علاوه بر اینکه بیان بالایی (۲۰ تا ۳۰ درصد از پروتئین کل بذر) دارد، نتایج تحقیقات قبلی نیز نشان می‌دهد که از این پیشبرنده می‌توان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در بذر گیاه استفاده کرد (۱۵). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که این پیشبرنده موجب بیان ژن تحت کنترل خود در بذر توتون می‌شود. در مورد اهمیت توالی Ω به این نکته اشاره شود که در وکتورهای Gateway که به‌صورت تجاری به فروش می‌رسند، توالی Ω در بالادست ژن کدشونده تعبیه شده و ترجمه‌ی موثر ناحیه کدشونده را تضمین می‌کند (۱۶). همچنین از توالی SAR جهت جلوگیری از خاموشی ژن استفاده شد. نقش توالی‌های SAR در جلوگیری از خاموشی تراژن و همچنین افزایش بیان آن در مطالعات متعدد مورد بررسی و در برخی موارد تاثیر آن تا ۷۷ برابر افزایش در بیان تراژن گزارش شده است (۶). نتایج حاصل از بررسی SDS-PAGE نشانگر بیان موفقیت‌آمیز پروتئین GUS در بذر گیاهان تراریخت بود ولی گیاهان مختلف از نظر میزان بیان ژن متفاوت بودند. میزان بیان پروتئین یک ژن خارجی در گیاهان تراریخت بستگی کامل به تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده و جایگاه قرارگیری آن در ژنوم هسته‌ای دارد. در سلول گیاهی، این ژن درون ژنوم گیاه قرار گرفته و پس از تراریختی، امکان تکثیر ژن (افزایش تعداد نسخه‌ها) وجود ندارد، مگر اینکه در ابتدای تراریختی تعداد نسخه‌های کافی در جایگاه مناسب در درون کروموزوم قرار گیرند (۱۷). لذا تفاوت در میزان بیان پروتئین GUS می‌تواند ناشی از تفاوت در جایگاه قرارگیری این ژن در ژنوم گیاه و یا تعداد متفاوت نسخه‌های ژن منتقل شده باشد. در مورد برخی از گیاهان تراریخت علی‌رغم اینکه نتایج PCR نشان‌دهنده تراریخت بودن آن‌ها بود ولی در نتایج SDS-PAGE تفاوتی با گیاه شاهد غیرتراریخت مشاهده نشد. این مسئله می‌تواند دلایل متعددی از جمله بیان بسیار پایین پروتئین GUS در گیاهان مذکور باشد به نحوی که توسط تکنیک SDS-PAGE قابل شناسایی نباشد و یا اینکه فقدان بیان ژن ناشی از نوترکیبی ممکن در ناحیه T-DNA باشد که منجر به تغییر ساختار ژن GUS شده باشد (۱۸). با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS می‌توان به تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتر و همچنین فعالیت پروتئین تولید شده پرداخت (۱۱). تغییر رنگ محلول حاوی بذور تراریخت و سوبسترا، نشان‌دهنده بیان ژن و فعالیت پروتئین مربوط به ژن GUS می‌باشد.

مجموعه آزمون‌های انجام شده و نتایج نشان داد که سازه ژنی طراحی شده، مناسب بوده چرا که پیشبرنده Napin به‌خوبی موجب بیان اختصاصی ژن تحت کنترل خود در بذر شده و توالی امگا نیز در افزایش بیان تراژن موثر بوده است. در ادامه کار می‌توان این سازه را با جایگزینی ژن‌های ارزشمند با ژن GUS برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده نمود و امکان تولید انبوه و ارزان یک پروتئین نوترکیب باارزش را فراهم کرد .

نتیجه گیری

مجموعه آزمون‌های انجام شده و نتایج نشان داد که سازه ژنی طراحی شده، مناسب بوده چرا که پیشبرنده Napin به‌خوبی موجب بیان اختصاصی ژن تحت کنترل خود در بذر شده و توالی امگا نیز در افزایش بیان تراژن موثر بوده است. در ادامه کار می‌توان این سازه را با جایگزینی ژن‌های ارزشمند با ژن GUS برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده نمود و امکان تولید انبوه و ارزان یک پروتئین نوترکیب باارزش را فراهم کرد

منابع

Archive of SID

www.SID.ir

1. Droogenbroeck BV, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, et al. Aberrant localization and under glycosylation of high accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104(4): 1430-1435.
2. Gallie DR, Walbot V. Identification of the motifs within the tobacco Mosaic virus 5' – leader responsible for enhancing translation. Nucleic Acids Res. 1992; 20(17): 4631-4638.
3. Allen GC, Spiker S, Thompson WF. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. Plant Mol. Biol. 2000; 43(2-3): 361-376.
4. Thompson WF, Spiker S, Allen GC. Matrix attachment regions and transcriptional gene silencing, In: Grasser KD, Regulation of transcription in plants. Aalborg: Blackwell Publishing Ltd; 2006; 136-161.
5. Nowak W, Gawlowska M, Jarmolowski A, Augustyniak J. Effect of nuclear matrix attachment regions on transgene expression in tobacco plants. Acta Biochimica Polonica. 2001; 48(3): 637–646.
6. Verma D, Verma M, Dey M, Jain RK, Wu R. Molecular dissection of the tobacco Rb7 matrix attachment region (MAR): effect of 5' half on gene expression in rice. Plant Science. 2005; 169(4): 704–711.
7. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JD. A plant DNA mini preparation.Version II. Plant Mol. Biol. Report. 1983; 1(4):19-21.
8. Sambrook J, Russell, DW. Molecular Cloning, A laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
9. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, et al. *A simple and general method for transferring genes into plants.* Science. 1985; 227: 1229-1231.
10. De Lisle AJ, Crouch ML. Seed storage protein transcription and mRNA levels in brassica napus during development and in response to exogenous abscisic acid. Plant Physiol. 1989; 91, 617-623.
11. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan, MW. GUS fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. The EMBO Journal. 1987; 6(13): 3901-3907.
12. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T3. Nature. 1970; 227: 680-685.
13. Zupan JR, Zambryski PC. Transfer of T-DNA from Agrobacterium to plant cell. Plant Physiol. 1995; 107(4): 1041-1047.
14. Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan CH. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2004; 40(1): 1–22.
15. Bagheri Kh, Jalali javaran M, Mahboudi F, Moeini A, et al. Designing and development of gamma interferon construct and expression of this protein in brassica napus seeds. Iran J. Biol. 1389; 2: 151-160.
16. Karimi, M, Inze D, Depicker A. Gateway vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. Trends Plant Sci. 2002; 7(5): 193-195.
17. Radke SE, Turner JC, Facciotti C. Transformation and regeneration of Brassica rapa using Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell Rep. 1992; 11(10): 499-505.
18. Prasad V, Satyavathi VV, Sanjaya VKM, Abha K, et al. Expression of biologically active Hemagglutinin-neuraminidase protein of Peste des petits ruminants virus in transgenic pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp]. Plant Sci. 2003; 35: 102-107.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2018; 8(3)

Original Article

Expression of active beta-glucuronidases enzyme in tobacco plant seed

Bagheri Kh, Ph.D. *, Maleki Zanjani B, Ph.D, Mekanik M, M.Sc.

- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* Email corresponding author: Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

Received: 26 Jul. 2017 Accepted: 7 Jan. 2018

Abstract

Aim: The purpose of this research was to design and prepare a suitable gene construct and transfer it to the tobacco plant and analysis of transgenic plants.

Material and methods: Seed-specific construct that containing Napin promoter, Ω sequence, GUS gene, and SAR sequence was prepared in pBI121 plasmid and proliferated in *E.coli*.. Then tobacco leaf explants were inoculated with LBA4404 agrobacterium strain by standard protocol. Selection of regenerated shoots also were performed in a selection media (co-culture medias + 25 mg/L Kan + 200 mg/L Cef). Transgenic plants were analyzed by PCR, RT-PCR and histochemical assay.

Results: Analysis of regenerated plantlets by using PCR and specific primers of nptII and GUS indicated that transfer of these genes to plantlets was successful. RT-PCR reaction results showed that nptII is transcribed in both tissues while GUS is transcribed only in the seed tissue. This finding was expected because Nos promoter (which controls the nptII transcription) is a constitutive and Napin is a seed specific promoter.. Expression and activity of Beta-glucuronidase enzyme in seeds of selected plants was confirmed by SDS-PAGE and histochemical assay.

Conclusion: The result of this research showed that designed gene construct was appropriate, because Napin promotes the expression of GUS gene in the seeds and Omega sequences have also been effective in increasing of transgene expression. In the fallowing, this construct can be used for the production of recombinant proteins by replacing valuable genes with *GUS*..

Key words: Ω sequence, SAR sequence, Napin promoter, GUS, Tobacco.

Archive of SID

www.SID.ir