

## هدفمند سازی بیان آنتی ژن سطحی هپاتیت ب (HBsAg) به وسیله پیش بر اختصاصی Pat1 در غده‌های سیب زمینی با روش بیان موقت

حسن رهنما <sup>\*</sup>Ph.D.، لیلا هلالی M.Sc.، ناهید احمدی M.Sc.

- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [hrahnama@abrii.ac.ir](mailto:hrahnama@abrii.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۸

### چکیده

**هدف:** به منظور بررسی کارایی پیش بر اختصاصی غده (Patatin1)، بیان آنتی ژن HBsAg واکسن هپاتیت ب در گیاه سیب زمینی با استفاده از روش بیان موقت (اگرواینفیلتریشن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** پیش بر اختصاصی غده (Pat1) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش واکنش زنجیری پلیمرز (PCR) از گیاه سیب زمینی جدا شد. این پیش بر در بالادست ژن بهینه سازی شده سنتزی HBsAg در ناقل دوگانه pBI121 همسانه سازی شد. به منظور مقایسه کارایی پیش بر اختصاصی Pat1، ژن HBsAg تحت کنترل پیش بر دایمی CaMV35S هم قرار داده شد. سازه‌های تهیه شده پس از انتقال به اگروباکتریوم با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن به غده‌ها و برگ‌های گیاه سیب زمینی انتقال یافتند. بیان موقت آنتی ژن HBsAg با استفاده از روش الیزا اندازه گیری شد.

**نتایج:** بررسی بیان آنتی ژن HBsAg در برگ‌ها و غده‌های گیاه سیب زمینی نشان داد که پیش بر Pat1 به طور اختصاصی باعث بیان بالای آن در بافت‌های غده‌ای می‌شود. بیان اندک این آنتی ژن تحت کنترل پیش بر Pat1 در بافت‌های برگ‌ها هم گزارش شده و می‌تواند تاحدی به عوامل القاکننده در محیط تلقیح بستگی داشته باشند. در حالی که بیان آنتی ژن تحت پیش بر دایمی CaMV35S در تمامی بافت‌های برگ‌ها و غده‌ای اتفاق می‌افتد. همچنین نتایج حاصل نشان داد که ژن HBsAg بهینه شده کدنی برای گیاه سیب زمینی به خوبی عمل کرده و آنتی ژن مربوط را بیان می‌کند.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که از پیش بر اختصاصی غده سیب زمینی Pat1 همسانه سازی شده می‌توان به طور موثری برای بیان دایمی آنتی ژن سنتزی بهینه سازی شده کدنی HBsAg در گیاهان تراریخت سیب زمینی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** بیان موقت، پیش بر غده Pat1، سیب زمینی، هپاتیت ب، HBsAg

## مقدمه

در طی ۲۰ سال گذشته سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان تراریخت به‌عنوان یک سیستم جایگزین ارزان، ایمن و موثر برای تولید مقادیر بالای پروتئین‌های نو ترکیب توجه فراوانی را به خود جلب کرده‌اند (۱ و ۲). پیش بینی شده است که این سیستم بتواند جایگزین سیستم‌های موجود مبتنی بر میکروارگانیسم‌ها، کشت سلول‌های حیوانی و یا حیوانات تراریخت شود (۳ و ۴). بنابراین، گیاهان می‌توانند به‌عنوان بیوراکتوری برای تولید انواع پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار گیرند (۵) و (۶). امروزه برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده در گیاهان به مرحله تجاری رسیده‌اند که از آن جمله می‌توان به کلاژن نوع ۱ انسانی تولید شده در توتون (۷)، تریپسین گاوی تولید شده در ذرت (TrypZean, Sigma-Aldrich) (۵)، لیزوزیم و لاکتوفرین انسانی تولید شده در برنج (۸ و ۹) و ... اشاره کرد (۵).

امروزه تولید واکسن‌های خوراکی در سیستم‌های تولید مبتنی بر گیاهان اهمیت پیدا کرده است (۲ و ۱۰-۱۵). بیان آنتی‌ژن‌ها در بافت‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین مهمی برای برآوردن نیازهای جهانی به واکسن‌های ارزان‌تر، ایمن‌تر و با کیفیت‌تر مطرح شده‌اند. تعداد زیادی واکسن مبتنی بر گیاهان تولید شده‌اند که برخی از آن‌ها در مراحل آزمایش‌های بالینی قرار دارند. به‌منظور تولید واکسن‌های نو ترکیب خوراکی در گیاهان انتخاب گیاه میزبان و نوع پیش‌بر برای بیان کارآمد آنتی‌ژن در گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است (۶). در بین گیاهانی که به‌عنوان بیوراکتور برای تولید واکسن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به توتون، سیب زمینی، گوجه فرنگی، ذرت، برنج، موز، سیب، کاهو و... اشاره نمود. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک از این گیاهان برای تولید انواع واکسن‌های باکتریایی، ویروسی، انگلی و سیستم ایمنی استفاده شده است (۴). در اغلب این گیاهان آنتی‌ژن‌ها به‌طور هدفمند در بافت‌های خوراکی بیان شده‌اند. انتخاب نوع پیش‌بر در بیان هدفمند و بالای

آنتی‌ژن در بافت‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). انتخاب پیش‌بر در میزان رونویسی و بیان تراژن موثر بوده و علاوه بر آن بر مرحله بیان، و محل بیان (نوع بافت) هم تاثیر دارد. پیش‌بر عمومی ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) به دلیل قدرت بالا و بیان دائمی کاربرد زیادی در روش‌های مهندسی ژنتیک دارد. اگرچه بیان بالای یک پروتئین نو ترکیب از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد ولی بیان پروتئین در بافت‌های غیرهدف گیاهان از نظر کاربردی چندان مطلوب نیست. بنابراین انتخاب پیش‌بری با کارایی بالا و همچنین بیان هدفمند در بافت‌ها می‌تواند در کارایی تولید واکسن‌های نو ترکیب در سیستم‌های گیاهی بسیار موثر باشد (۱۶ و ۱۷).

سیب زمینی به‌عنوان یکی از گیاهانی است که در تولید واکسن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفته است (۳ و ۵ و ۱۸). انتخاب پیش‌بر مناسب برای بیان آنتی‌ژن در غده‌های خوراکی گیاه سیب‌زمینی می‌تواند در تولید واکسن بسیار کارآمد باشد. پاتاتین یکی از پروتئین‌های مهم ذخیره‌ای در غده‌های سیب‌زمینی است. پیش‌بر پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذرها و اندام‌های تولید مثلی رویشی (مانند غده‌ها) گیاهان، پیش‌برهای قدرتمندی هستند که باعث سنتز فراوان پروتئین مربوط در آن بافت یا اندام خاص می‌شوند (۱۹ و ۲۰). ژن‌های رمز کننده پروتئین پاتاتین به دو دسته تقسیم می‌شوند: دسته اول (Class I) آن‌هایی هستند که در غده‌های در حال تشکیل بیان می‌شوند. بیان این دسته از ژن‌های پاتاتین در برگ‌ها هم توسط سوکروز القا می‌شود. دسته دوم ژن‌های پاتاتین (Class II) نه تنها در غده‌ها بلکه در ریشه‌ها هم بیان می‌شوند. بیان این دسته از ژن‌ها توسط سوکروز القا نمی‌شود (۲۰). بنابراین، استفاده از پیش‌بر ژن‌های پاتاتین دسته اول (Class I) می‌تواند در بیان اختصاصی پروتئین‌های نو ترکیب در غده‌ها موثر باشد.

قبل از انتقال دائمی یک تراژن به گیاه ارزیابی اجزای سازه ژنی و کارایی بیان آن می‌تواند شانس موفقیت تولید گیاه تراریخت و در نتیجه تولید محصول نهایی (واکسن)

شده و جایگزین پیش‌بر CaMV35 در ناقل دوگانه pBI121 شدند. سازه حاصل pBI-Pat1-Gus نامیده شد.

سنتز توالی اختصاصی HBsAg برای سیب زمینی و ساخت سازه‌های pBI-Pat-HBP و pBI-35S-HBP توالی نوکلئوتیدی آنتی‌ژن HBsAg از سایت NCBI برای سیب‌زمینی با استفاده از نرم افزار OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>) بهینه‌سازی کدنی شد. به منظور افزایش کارایی بیان ژن و هدف‌گیری در شبکه اندوپلاسمی توالی قطعات KOZAK و SEKDEL به آن اضافه شد. همچنین جایگاه‌های اختصاصی برای آنزیم‌های BamHI و SacI در ابتدا و انتهای توالی اضافه شد (شکل ۱). توالی‌های طراحی شده توسط شرکت Millgene فرانسه سنتز شده و به صورت کلون‌شده در وکتورهای pMAT تحویل گرفته شد (شکل ۱).

به منظور ساخت سازه‌های ژنی pBI-PatHBP و pBI-35SHBP که به ترتیب در آن‌ها ژن بهینه‌سازی شده HBsAg برای سیب‌زمینی تحت کنترل پیش‌بر اختصاصی غده (Pat1) و پیش‌بر دایمی CaMV35S قرار دارند ژن HBsAg جایگزین ژن gus در سازه‌های pBI-Pat1-Gus و 35S-Gus (pBI121) بدین‌منظور ژن gus توسط آنزیم‌های BamHI و SacI از سازه‌های فوق خارج و سپس قطعه ۷۲۰ جفت بازی HBP در همان جایگاه برشی وارد شد. سازه‌ها با روش هضم اختصاصی با آنزیم‌های برشی و همچنین PCR تایید شدند. سازه‌های نهایی با استفاده از روش انجماد-ذوب به اگروباکتریوم *A. tumefaciens* LBA4404 منتقل شدند.

را افزایش دهد. بدین منظور از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که معمول‌ترین آن‌ها استفاده از بیان موقت با روش اگرواینفیلتریشن است. از این روش برای آنالیز کارکردی ژن‌ها و پیش‌برهای مختلف در زمان کوتاه استفاده می‌شود (۲۴-۲۱). اگرواینفیلتریشن روشی بسیار ساده و ارزان است و با استفاده از آن می‌توان فعالیت ژن را در بافت‌های گیاهان مختلف غربالگری کرد (۲۵). در این پژوهش کارایی پیش‌بر اختصاصی غده سیب زمینی (پاتاتین - Pat1) در مقایسه با پیش‌بر دایمی CaMV35S با بیان زیرواحد کوچک آنتی‌ژن هپاتیت ب HBsAg در برگ و غده‌های گیاه سیب زمینی با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**همسانه‌سازی پیش‌بر Pat** جهت جداسازی پیش‌بر اختصاصی پاتاتین (Pat1) از گیاه سیب‌زمینی (رقم مارفونا)، ابتدا غده‌های گیاه سیب‌زمینی در شرایط گلخانه کشت شدند. از نمونه‌های برگ برای استخراج DNA ژنومی با روش اصلاح شده دلاپورتا استفاده شد (۲۶). برای جدا کردن پیش‌بر Pat1 از DNA استخراج شده از واکنش زنجیری پلیمرز (PCR) با استفاده از آنزیم Pfu پلیمرز و آغازگرهای اختصاصی (F-Pat1: 5'-cggaagcttgagctagaaatcataatgtt-3'; R-Pat1: 5'-cgcgatcctttgtgtgctttgagcatataac-3') استفاده شد. شرایط و چرخه‌های PCR عبارت بودند از: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و اسرشت‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه [ ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه] و دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه. آغازگرها بر اساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI شماره دسترسی A0825.1 و با استفاده از نرم افزار Oligo نسخه ۶ طراحی شد.

این پیش‌بر بعد از جداسازی و توالی‌یابی و تایید نهایی با استفاده از آنزیم‌های برشی HindIII و BamHI بریده

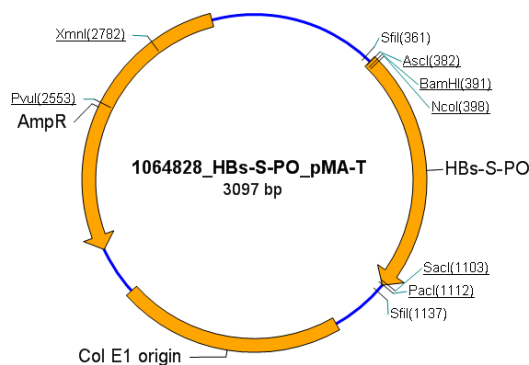
HBs-PO

*Bam*HI      *Kozak*

gcgga tcc acc atg gaa aat att act tct gga ttt ctt gga cct ctt ctt gtt ttg caa gct gga tct ttt ttg ttg act aga atc ctt act att cca caa agt ctt gat tgc tgg tgg  
act tct ctt aat ttt ctt gga gga act act gtt tgt ctt gga caa aat tgc caa tct cca act tct aat cat tct cca act tct tgt cct cca act tgt cct gga tat cgt tgg atg tgt  
ctt cgt cgt ttt att ttt ctt ttt att ctt ctt tgt ctt att ttt ttg ttg gtt ctt ctt gat tat caa gga atg ttg cct gtt tgt cct ctt att cca gga tct tct act act agt act  
gga cca tgt aga act tgt act cct gct caa gga act tct atg tat cct tct tgt tgt act aaa cct tgc gga aat tgt act tct att cca tct tct tgg gct ttt  
gga aaa ttt ctt tgg gaa tgg gct tct gct cgt ttt tct tgg ctt agt ttg ctt gtt cca ttt gtt cca ttt gtt cca ttt gtt gga ctt tct cct act gtt tct gtt att tgg atg atg  
tgg tat tgg gga cca agt ctt tat agt att ttg agt cct ttt ttg cca ctt ttg cca att ttt ttt tgt ctt tgg gtt tat att tct gaa aaa gat gaa ctt taa gag ctc acc

*Sac*I

SEKDE



شکل ۱: توالی نوکلئوتیدی اصلاح شده آنتی ژن HBsAg برای گیاه سیبزمینی (HBs-PO) (بالا) و ناقل پلاسمیدی حاوی قطعه سنتز شده (پایین)

از ۴ میلی‌مول (and 4mM PMSF) ساییده شده و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. روش‌ناور حاوی پروتئین جهت اندازه‌گیری مقدار آنتی ژن HBsAg در آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفت. آزمون الایزا با استفاده از کیت HBsAg ONE شرکت DIA-PRO ایتالیا و دستورالعمل مربوط انجام شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار تولید آنتی ژن HBsAg براساس کنترل مثبت و منفی کیت الایزا محاسبه شد.

#### آنالیز آماری

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS صورت گرفت. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

#### ارزیابی بیان موقت و سنجش آنتی ژن HBsAg

برگ‌ها و غده‌های گیاه سیبزمینی به قطعات کوچک ۱ سانتی‌متری برش خورده و در سوسپانسیون آگروباکتريوم حاوی سازه‌های pBI-Pat-HBP و pBI-35S-HBP به‌طور جداگانه غوطه‌ور شدند. علاوه بر محیط LB از محیط Infection (محیط MS ½) هم به‌عنوان محیط سوسپانسیون باکتریایی برای تیمار استفاده شد. بدین‌منظور کشت شبانه باکتریایی در محیط LB با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شد و سپس در حجم برابری از محیط MS ½ حل شد. به‌منظور نفوذ بهتر باکتری‌ها در نمونه‌های گیاهی از دسیکاتور تحت خلا به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. این کار ۳ بار انجام شد. نمونه‌ها به ظروف پتری حاوی سه لایه کاغذ صافی استریل منتقل شده و به مدت ۴ روز در تاریکی قرار گرفتند.

نمونه‌های تیمار شده لیوفیلایز شده و سپس در بافر استخراج پروتئین ( 0.05M NaHPO<sub>4</sub> PH 7.5, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, 0.3% Tween 20,

### نتایج

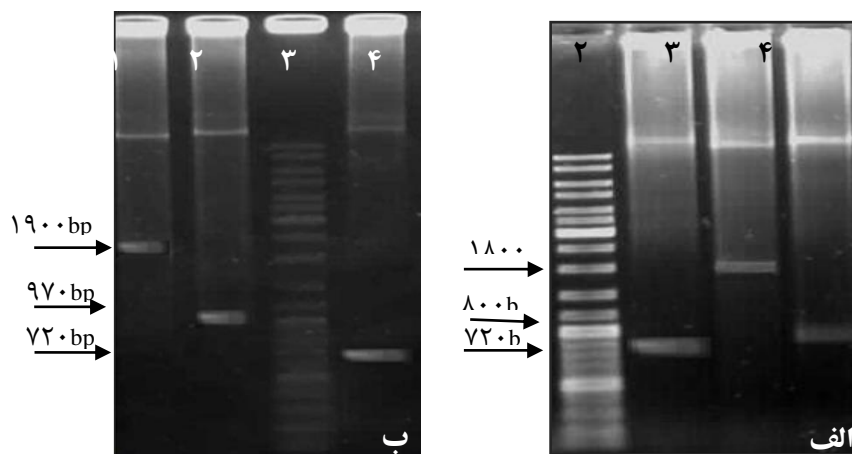
یکی از مزایای سیستم بیان موقت اگرواینفلیکشن در مقایسه با تولید گیاهان تراریخت، بیان بالای پروتئین‌های نو ترکیب در آنها است (۲۷). این امر به دلیل حذف "اثرات مکانی" در سیستم بیان موقت است چون در این سیستم تراژن به طور تصادفی وارد مناطقی از ژنوم هسته‌ای که دارای فعالیت‌های رونویسی نامعلومی هستند نمی‌شود. زمان کوتا‌تر و سطوح بالای انباشت پروتئین‌های نو ترکیب، سیستم بیان موقت را پلتفرمی برای تولید ترکیبات دارویی در گیاهان تبدیل کرده است. علاوه بر آن سیستم‌های بیان موقت روشی سریع و ارزان برای بررسی کارایی اجزای ژن‌ها به حساب می‌آیند (۲۷).

دستیابی به بیان بالای پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان تراریخت به عوامل مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به ترجیح کدونی، بیان پایدار و کارآمد ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این وجود، چگونگی، زمان و محل بیان ژن به وسیله مجموعه‌ای از مکانیسم‌های کنترلی تنظیم می‌شود. پیش‌برها به عنوان یکی از عوامل تنظیمی اصلی

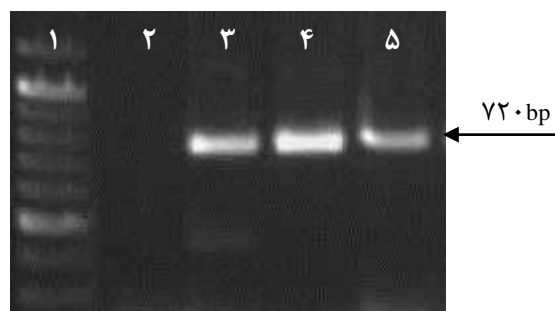
نقش مهمی در بیان ژن دارند. بنابراین، قبل از انتقال دائمی یک سازه ژنی به گیاهان، بررسی کارایی اجزای سازه به‌ویژه پیش‌برها و ژن هدف بسیار اهمیت دارد. در این مطالعه کارایی پیش‌بر اختصاصی غده پاتاتین و ژن اصلاح کدون شده HBsAg برای سیب‌زمینی در سیستم بیان موقت مورد بررسی قرار گرفته است.

### سازه‌های ژنی

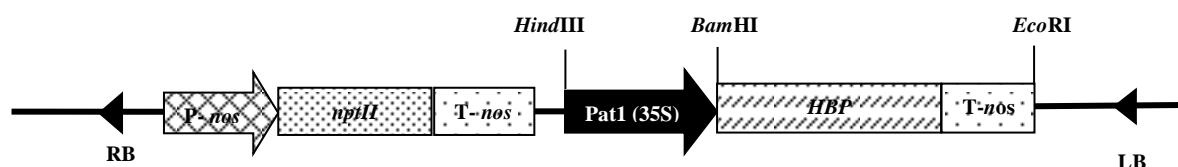
ژن سنتزی اصلاح شده HBsAg برای سیب‌زمینی با هضم توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از پلاسمیدهای pMA-T حاوی HBsAg (شکل ۱) جدا شده و در جایگاه‌های برشی مناسب خود در ناقل‌های دوگانه *pBI121*، *pBIPat1GUS* جایگزین ژن *Gus* شدند. به منظور درستی همسانه‌سازی، سازه‌های جدید با روش‌های هضم آنزیمی و PCR با پرایمرهای اختصاصی تایید شدند (شکل ۲ و ۳). سازه‌های جدید به ترتیب *pBI35S-HBP* و *pBIPat-HBP* نامیده شدند (شکل ۴).



شکل ۲: تایید سازه *pBI-35S-HBT* (الف) و *pBI-Pat1-HBP* (ب) با هضم آنزیمی. ۱ (الف) و ۳ (ب) نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (*GeneRuler DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific)، ۲ (الف) و ۴ (ب) هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I؛ ۳ (الف) و ۱ (ب) هضم آنزیمی سازه با دو آنزیم *Hind*III و *Eco*RI، ۴ (الف) و ۲ (ب) - هضم آنزیمی با دو آنزیم *Hind*III و *Bam*HI.



شکل ۳. تائید سازه‌های پلاسمیدی با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HBsAg ۱- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA  
 (GeneRuler DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)، ۲- کنترل منفی آب، ۳- کنترل مثبت (سازه pMA-T)، ۴- pBI-35S-HBP و  
 ۵- pBI-Pat1-HBP

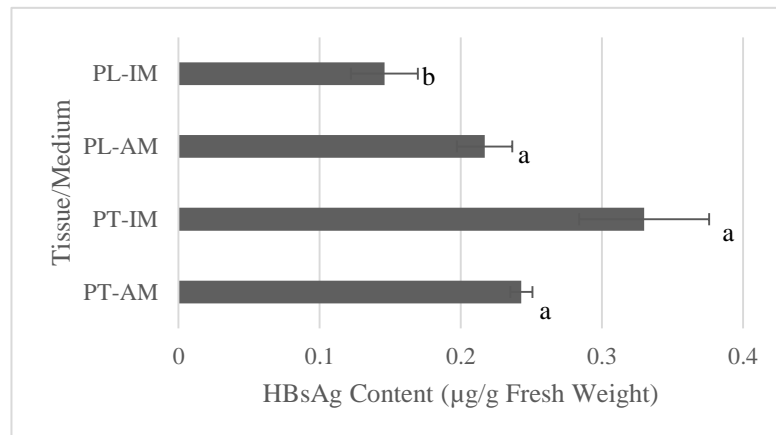


شکل ۴: نقشه سازه‌های pBI-35S-HBP و pBI-Pat-HBP. RB و LB - به ترتیب ناحیه سرحد مرزی راست و چپ، P-nos - پیشبر نوپالین  
 سنتاز، npII - ژن مقاومت به کانامایسین، T-nos - پایانبر نوپالین سنتاز، Pat1 و 35S - به ترتیب پیشبر Patatin و CaMV35S، HBP - توالی  
 آنتی ژن HBsAg و HindIII، BamHI و EcoRI آنزیم‌های برشی.

### بیان HBsAg

محیط تلقیح مختلف یکسان است که این وضعیت در برگ‌ها هم قابل مشاهده بود. با توجه به غیر اختصاصی بودن پیشبر CaMV35S این نتیجه دور از انتظار نیست. پیشبر CaMV35S یک پیشبر دایمی است که ژن‌های تحت کنترل آن در همه بافت‌ها و در همه شرایط بیان می‌شوند (۲۸).

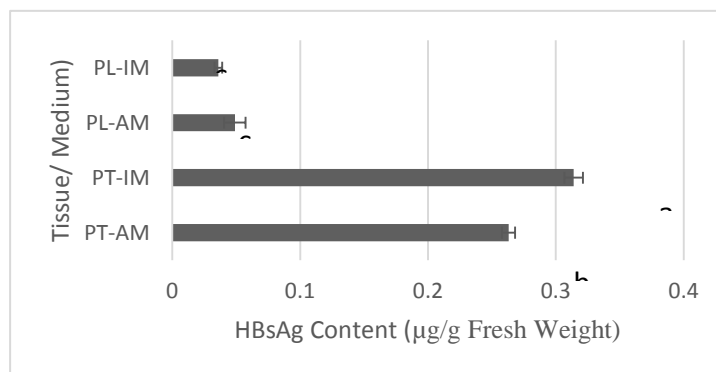
سنجش میزان بیان آنتی‌ژن پروتئینی HBsAg در بافت‌های برگگی و غده‌ای سیب زمینی نشان داد که بیان این آنتی‌ژن تحت کنترل پیشبر CaMV35S در همه بافت‌های برگگی و غده‌ای اتفاق می‌افتد (شکل ۵) و از این جهت تفاوت معنی‌داری بین بافت‌های مختلف مشاهده نمی‌شود. میزان بیان آنتی‌ژن در بافت‌های غده در دو



شکل ۵: میزان بیان آنتی ژن HBsAg تحت کنترل پیشبر CaMV35s در سازه ژنی pBI-35S-HBP با استفاده از اگرواینفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف. PT- غده سیب زمینی، PL- برگ سیب زمینی. AM- محیط تلقیح اگروباکتریوم، IM، محیط تلقیح آلوده‌سازی. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی دار بودن میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

برگ‌های گیاهان سیب‌زمینی هم القا می‌نماید، هر چند میزان بیان در برگ‌ها بسیار کمتر از غده‌ها است. براساس گزارش‌های موجود پیش‌بر پاتاتین کلاس I به‌عنوان یک پیش‌بر اختصاصی غده شناخته شده است اما در سایر اندام‌های گیاه سیب زمینی مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها هم تا حدی باعث بیان ژن‌ها می‌شود (۲۹-۳۱). از طرف دیگر گزارش شده است که ساکارز باعث القای پیش‌بر پاتاتین نوع I در برگ‌ها می‌شود (۲۰).

بررسی بیان آنتی ژن واکسنی HBsAg تحت کنترل پیش‌بر اختصاصی غده پاتاتین نشان داد که این پیش‌بر باعث بیان آنتی ژن در غده‌های سیب زمینی می‌شود (شکل ۶). کارایی بیان این پیش‌بر مشابه پیش‌بر عمومی CaMV35S است چون میزان بیان آنتی ژن توسط هر دو پیش‌بر حدود ۳ میکروگرم/گرم وزن تر غده‌ها است. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود پیش‌بر پاتاتین با وجود اختصاصی بودن، بیان آنتی ژن HBsAg را در



شکل ۶: میزان بیان آنتی ژن HBsAg تحت کنترل پیشبر Pat1 در سازه ژنی pBI-Pat1-HBP با استفاده از اگرواینفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف. PT- غده سیب زمینی، PL- برگ سیب زمینی، AM- محیط تلقیح اگروباکتریوم، IM، محیط تلقیح آلوده‌سازی. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد است.

## بحث

سیستم بیان موقت به کار رفته در محدوده مقدار گزارش شده توسط سایر محققان است. بدیهی است با بهینه‌سازی روش انتقال موقت بتوان میزان بیان آن را افزایش داد. نتایج این پژوهش کارایی سازه ژنی در بیان هدفمند آنتی‌ژن HBsAg تحت کنترل پیش‌بر Pat1 را نشان می‌دهد. با انتقال دائمی این سازه ژنی به گیاهان سیب‌زمینی می‌توان گیاهان تراریختی ایجاد کرد که قادر به تولید واکسن هپاتیت ب در خود هستند.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پروژه شماره ۷-۰۵-۰۵-۰۸-۹۰۰۸ پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشگاه به‌جهت فراهم کردن امکانات و تجهیزات لازم اعلام می‌دارند.

## منابع

- Desai PN, Padh H. Expression of erythropoietin in Indian tetraploid potato variety. F1000Research 2012, 1:26 Last updated: 27 DEC. doi: 10.3410/f1000research.2012; 1(6): 26.v1
- Ledl K, Luthar Z. Production of vaccines for treatment of infectious diseases by transgenic plants. Acta agric Slov. 2016; 107: 191- 217.
- Rukavtsova EB, Rudenko NV, Puchko EN, Zakharchenko NS, et al. Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety. J Biotechnol. 2015; 10(203): 84-88.
- Laere E, Ling APK, Wong YP, Koh RY, et al. Plant-Based Vaccines: Production and Challenges. J Bot. Volume 2016, Article ID 4928637, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4928637>.
- Takeyama N, Kiyono H, Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent

بعد از گیاه توتون، سیب‌زمینی به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب برای تولید واکسن‌های خوراکی شناخته شده است (۳۲). در سال ۱۹۹۵ ژن رمز کننده HBsAg تحت کنترل پیش‌بر CaMV35S به گیاهان سیب‌زمینی منتقل شد که در این مطالعه میزان بیان آنتی‌ژن در ریشه‌های گیاه ۵-۱۰ برابر بیش از بافت‌های برگ‌ی بود. بعد از آن زیر واحدهای M و S آنتی ژن HBsAg هم به‌طور موفقیت آمیزی به سیب‌زمینی انتقال یافت (۳۳). در تحقیقی دیگر Richter و همکاران (۳۴) توانستند با انتقال آنتی‌ژن HBsAg به گیاه سیب زمینی میزان تولید آن را به حدود ۱/۱ میکروگرم/گرم وزن تر غده برسانند. اخیراً Rukavtsova و همکاران (۳) هم تولید آنتی‌ژن HBsAg با استفاده پیش‌بر CaMV35S را در غده‌های سیب‌زمینی تراریخت تا حدود ۱ میکروگرم/گرم وزن تر گزارش کرده‌اند.

پیش‌بر پاتاتین (Pat1) برای بیان هدفمند ژن سنتز اکسین (tms1) و ژن ترابرنده سوکروز OsSUT برای القای تولید غده در گیاهان سیب‌زمینی به‌کار گرفته شده است (۳۱ و ۳۵). از این پیش‌بر برای تولید کارتنوئید (۳۶)، تولید سرم آلبومین انسانی (۳۷)، تولید اریتروپویتین (۱)، تولید آنتی ژن HBsAg (۱۹ و ۳۴ و ۳۸) و تولید واکسن اسهال (LTB) (۳۹) در غده‌های سیب‌زمینی هم استفاده شده است.

بیان آنتی‌ژن HBsAg در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی تحت کنترل پیش‌بر Pat1 نشان داده است که مقدار این آنتی ژن از ۰/۲۵ تا حدود ۱ میکروگرم/گرم وزن تر رسیده است و از این نظر مشابه پیش‌بر CaMV35S است (۱۹).

## نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر هم میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg در سیستم بیان موقت در گیاه سیب‌زمینی حدود ۰/۳۲ میکروگرم/گرم وزن تر گزارش شد که با توجه به روش و



- Ther Adv Vaccines. 2015; 3(5-6): 139- 154.
6. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(4): 449-467.
  7. Shoseyov O, Posen Y, Grynspan F. Human collagen produced in plants, More than just another molecule. *Bioengineered.* 2014; 5(1): 49-52.
  8. Hennegan K, Yang D, Nguyen D, Wu L, et al. Improvement of human lysozyme expression in transgenic rice grain by combining wheat (*Triticum aestivum*) puroindoline b and rice (*Oryza sativa*) Gt1 promoters and signal peptides. *Transgenic Res.* 2005; 14: 583-592.
  9. Yang D, Guo F, Liu B, Huang N, et al. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta.* 2002; 216(4): 597-603.
  10. Ma JK-C, Drake PMW, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(10): 794-805.
  11. Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, et al. Molecular farming for new drugs and vaccines. *Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants.* *EMBO Rep.* 2005; 6(7): 593-9.
  12. Koprowski H. Vaccines and sera through plant biotechnology. *Vaccine.* 2005; 23(15): 1757-63.
  13. Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. Edible vaccines: current status and future. *Ind J Med Microbiol.* 2007; 25(2): 93-102.
  14. Mishra N, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, et al. Edible vaccines: a new approach to oral immunization. *Ind J Biotechnol,* 2008; 7: 283-94.
  15. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009; 32(2): 107-21.
  16. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, et al. Plant-based production of advances in technology and clinical trials. *biopharmaceuticals.* *Curr Opin Plant Biol.* 2004; 7(2): 152-8.
  17. Stoger E, Ma JK-C, Fischer R, Christou P. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16(2): 167-73.
  18. Kumar BV, Raja TK, Wani MR, Sheikh SA, et al. Transgenic plants as green factories for vaccine production. *Afr J Biotechnol.* 2013; 12: 6147-6158.
  19. Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, et al. Expression and Characterization of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Potato Plants. *Biochem. (Moscow),* 2004; 69(10): 1158-1164.
  20. Naumkina EM, Bolyakina YP, Romanov GA. Organ-Specificity and Inducibility of Patatin Class I Promoter from Potato in Transgenic Arabidopsis Plants. *Russ J Plant Physiol.,* 2007; 54(3): 350-359.
  21. Figueiredo J, Ro`mer P, Lahaye T, Graham J, et al. Agrobacterium-mediated transient expression in citrus leaves: a rapid tool for gene expression and functional gene assay. *Plant Cell Rep.* 2011; 30(7): 1339-1345.
  22. Bertazzon N, Raiola A, Castiglioni C, Gardiman M, et al. Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference. *Plant Cell Rep.* 2012; 31(1): 133-143.
  23. Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* 2006; 48: 818-826.
  24. Leckie B, Neal Stewart C. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Rep.* 2011; 30(3): 325-334.
  25. Faizal A, Geelen D. Agroinfiltration of intact leaves as a method for the transient and stable transformation of saponin producing *Maesa lanceolata*. *Plant Cell Rep.* 2012; 31(8): 1517-26.

26. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II, *Plant Mol Biol Rep.* 1983; 1: 19-21.
27. Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, et al. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol. Med.*, 2013; 1: doi:10.4172/atbm.1000103.
28. He ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ. Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica.* 2008; 133: 207-214.
29. Deryabin AN, Trunova TI, Dubinina IM, Burakhanova EA, et al. Chilling tolerance of potato plants transformed with a yeast-derived invertase gene under the control of the B33 patatin. *Russ J Plant Physiol.* 2003; 50(4): 449-454.
30. Romanov GA, Naumkina EM, Ashapkin VV, Vanyushin BF. Methylation of GCGG sites of the patatin promoter is organspecific and inversely correlates with its activity. *Dokl Biochem Biophys.* 2007; 417(1): 327-330.
31. Kolachevskaya OO, Alekseeva VV, Sergeeva LI, Rukavtsova EB, et al. Expression of auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization in vitro. *J Integr Plant Biol.* 2015; 57(9): 734-44. doi: 10.1111/jipb.12314.
32. Guan ZJ, Guo B, Huo YI, Guan ZP, et al. Overview of expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Vaccine.* 2010; 28(46): 7351-7362.
33. Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN. Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. *Gene.* 1997; 190(1): 107-11.
34. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol.* 2000; 18:1167-71.
35. Sun A, Dai Y, Zhang X, Li C, et al. A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes *OsSUT5Z* and *OsSUT2M*. *J Integr Plant Biol.* 2011; 53(7): 586-595.
36. Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, et al. Metabolic Engineering of Potato Carotenoid Content through Tuber-Specific Overexpression of a Bacterial Mini-Pathway. *PLoS ONE.* 2007; 2(4): e350. doi:10.1371/journal.pone.0000350.
37. Farran I, Sánchez-Serrano JJ, Medina JF, Prieto J, et al. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Res.* 2002; 11(4): 337-346.
38. Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, et al. Expression of the hepatitis B Surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 2004; 22: 925-30.
39. Lauterslager TGM, Florack DEA, van derWal TJ, Molthoff JW, et al. Oral immunization of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine.* 2001; 19(17-19): 2749-55.

## Targeted expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by tissue specific promoter Pat1 in potato tubers using transient expression system

Rahnama H. Ph.D.\*, Helali L. M.Sc., Ahmadi N. M.Sc.

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension  
Organization (AREEO), Karaj, Iran

\* Email corresponding author: hrahnama@abrii.ac.ir

Received: 19 Dec. 2017

Accepted: 11 Sep. 2018

### Abstract

**Aim:** In order to study the efficiency of the tuber specific promoter (Patatin1), the expression of the HBsAg antigen of the hepatitis B vaccine was evaluated using a transient expression method (AgroInfiltration) in the tubers and leaves of potato plants.

**Material and Methods:** A tuber specific promoter (Pat1) was isolated from the potato plant using a specific primer pairs by Polymerase Chain Reaction (PCR). It was cloned in the upstream of a synthetic optimized codon of the HBsAg gene in the binary plant vector pBI121. In order to compare the tissue specificity of Pat1, the HBsAg gene also was used under the control of a consultative CaMV35S promoter. The genetic constructs were transferred to the tubers and leaves of potato plants using the Agroinfiltration method. An HBsAg antigen content was measured using ELISA method.

**Results:** The level of HBsAg antigens in the leaves and tubers of potato plants indicated that Pat1 promoter specifically induced HBsAg high expression in the tuber tissues. Very low expression by the Pat1 promoter in the leaf tissues has been also reported and can be partly dependent on the presence of inducing factors in the inoculation media. However, the expression of HBsAg antigen occurs in both leaf and tuber tissues under the consultative promoter CaMV35S. The results showed that the codon optimized HBsAg gene for potato plant was expressed properly in plant tissues.

**Conclusion:** findings indicate that potato tuber specific promoter Pat1 can be used effectively to express the synthetic optimized HBsAg antigen in the transgenic potato plants.

**Keywords:** HbsAg, Hepatitis B, Potato, Transient expression, Tuber specific promoter Pat1