همسانه‌سازی و انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* به گیاه توتون

بابک لطیف[۱]، مختار جلالی جواران[۲]، حمید رجبی معماری[۳] و حامد اژدری[۴]

۱ -دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(m_jalali@modares.ac.ir)

۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات،دانشکده کشاورزی،دانشگاه شهید چمران

۴- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی،دانشکده کشاورزی،دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۵

چکیده

" کشاورزی مولکولی" به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی توسط گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب یکی از مهم ترین آنزیم‌های صنعتی است که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی بویژه در تشخیص میزان ATP به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، غربالگری داروها، زیست‌حسگرها، همچنین در بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی و توالی‌یابی DNA (Pyrosequencing) استفاده می‌شود. ژن لوسیفراز نیز به عنوان ژن گزارشگر ایده‌آل در مهندسی ژنتیک به منظور بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن، کاربرد فراوان دارد. تحقیق حاضر جهت همسانه‌سازی، انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *L. turkestanicus* (Heyden) و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت. برای این منظور آغازگرهای مناسب با توجه به توالی‌های دو انتهای ژن لوسیفراز (*luc*)، محل‌های برشی مناسب و توالی افزایش‌دهنده بیان گیاهی (Kozak sequence) طراحی و ژن مورد نظر پس از جداسازی، در ناقل بیانی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. این ژن تحت کنترل پیشبرنده CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS قرار دارد. به منظور اطمینان از همسانه‌سازی، سازه تهیه‌شده با استفاده از بررسی‌های Colony PCR، PCR، هضم آنزیمی، توالی‌یابی و همردیف‌سازی آن در بانک اطلاعاتی (GenBank)، مورد تایید قرار گرفت. سپس سازه تهیه‌شده به کمک باکتری آگروباکتریوم سویه *LBA4404* به گیاهان توتون منتقل گردید و گیاهان تراریخت بر روی محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم باززایی شدند. بررسی مولکولی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی DNA ژنومی گیاهان تراریخت و شاهد، انتقال ژن لوسیفراز را به گیاهان باززایی‌شده تایید نمود.

کلید واژه ها: لوسیفراز حشره شبتاب، همسانه‌سازی، انتقال ژن، توتون، کشاورزی مولکولی

مقدمه

تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی گویند. از مهمترین مزایای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به اقتصادی‌تر بودن تولید آنها نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد (۵). در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهان باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های ارزشمند بودند. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌ها می‌باشد (۲۴).

آنزیم لوسیفراز عامل اصلی پدیده بیولومینسانس[۱] یا نشر نور توسط موجودات زنده است. بیولومینسانس به فرآیند تبدیل انرژی شیمیایی به نور در سیستم‌های زیستی گفته می‌شود و به دو جزء اصلی یعنی آنزیم لوسیفراز[۲] و سوبسترای لوسیفرین[۳] بستگی دارد. این فرایند در دسته وسیعی از جانداران آبزی و خشکی‌زی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم‌های درگیر در این فرایند با نام کلی لوسیفراز نامگذاری شده‌اند. واکنش آنزیم‌ها عموماً منجر به تولید نور سبز- زرد می‌شود (۹). به دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز حشره شبتاب[۴]، بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. این آنزیم با استفاده از O_2، Mg^{2+} و ATP با انجام عمل اکسیداتیو[۵]، دکربوکسیلاسیون[۶] بر روی سوبسترای D-لوسیفرین، نور سبز- زرد و نیز آدنوزین مونوفسفات[۷] (AMP)، CO_2، اکسی‌لوسیفرین[۸] و پیروفسفات[۹] (PP_i) تولید می‌کند (۹). آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در زمینه‌های مختلف به ویژه در تشخیص مقدار ATP از طریق لومینومتری[۱۰] (که حساس‌ترین روش سنجش ATP است)، به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، اندازه‌گیری میزان حیات سلولی[۱۱]، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان و زیست‌حسگرها[۱۲]، همچنین در غربالگری داروها، بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی، توالی‌یابی DNA به روش Pyrosequencing و نیز ژن لوسیفراز به عنوان ژن گزارشگر بسیار حساس، کاربرد فراوان دارد (۱، ۳، ۱۰، ۱۲، ۱۴ ۲۱ و ۲۲). در دهه‌های اخیر گرایش زیادی برای تولید تجاری و در مقیاس وسیع این آنزیم به منظور توسعه تکنولوژی‌های مبتنی بر لوسیفراز و جایگزینی آنها به جای روش‌های قدیمی غربالگری به وجود آمده است. در ابتدا تنها راه تهیه آنزیم لوسیفراز، تخلیص آن از حشره شبتاب بود؛ اما در سال ۱۹۸۵ برای اولین بار cDNA ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه آمریکای شمالی *Photinus pyralis* (Linnaeus) جداسازی و با موفقیت در باکتری *Escherichia coli* (Migula) بیان شد و بدین ترتیب امکان تولید این پروتئین در مقادیر زیاد فراهم گشت (۶). به طور معمول، تولید لوسیفراز نوترکیب عمدتاً به سیستم‌های میکروبی وابسته است. لوسیفراز نوترکیبی که در این سیستم‌ها بیان می‌شود، به دلیل ماهیت پروکاریوتی[۱۳] سیستم بیانی باکتری‌ها، فاقد خصوصیات مطلوب آنزیمی و پایداری مناسب می‌باشد، اما فرآیندهایی نظیر تشکیل باندهای دی‌سولفیدی[۱۴]، تاخوردگی[۱۵] و گلیکوزیلاسیون[۱۶] در سیستم‌های بیان گیاهی به طرز صحیح صورت می‌گیرد. همچنین فرم‌های تجاری موجود این آنزیم، بسیار گران‌قیمت بوده و استفاده از آنها مقرون به صرفه نیست؛ با توجه به اهمیت روزافزون این آنزیم، تولید انبوه و کم‌هزینه آن در قالب کشاورزی مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

1- Bioluminescence
2- Luciferase
3- Luciferin
4- Firefly
5- Oxidative
6- Decarboxylation
7- Adenosine monophosphate
8- Oxyluciferin
9- Pyrophosphate
10- Luminometery
11- Viability
12- Biosensors
13- Prokaryotic
14- Disulphide bands
15- Folding
16- Glycosylation

Archive of SID

www.SID.ir

تا کنون بیشترین مطالعات در زمینه لوسیفراز حشره شبتاب بر روی گونه آمریکای شمالی *P. pyralis* انجام شده است، اما طی سال‌های اخیر در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، تحقیقات موفقیت‌آمیزی بر روی سیستم بیولومینسانس حشرات شبتاب گونه‌های ایرانی صورت گرفته و برای اولین بار جداسازی cDNA و بیان لوسیفراز حشره شبتاب از منشاء گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* در باکتری *E. coli* در گروه بیوشیمی این دانشکده انجام شده است. این ژن دارای ۱۶۴۴ جفت باز است که پروتئینی با ۵۴۷ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۶۲ KDa را کد می‌کند (شماره دستیابی GenBank: AY742225) (۲).

توتون زراعی *Nicotiana tabacum* (Linnaeus) بیشترین کاربرد را به عنوان میزبان گیاهی در کشاورزی مولکولی و تولید پروتئین‌های نوترکیب دارد. توتون یک محصول غیرغذایی و غیرعلوفه‌ای است که علاوه بر انعطاف‌پذیری بالا نسبت به دستورزی ژنتیکی، دارای مزایای متعددی از جمله تولید وزن تر بالا (حدود ۵۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار عملکرد برگ تازه طی چند برداشت در طول یک فصل کاشت) و تولید بذر زیاد (بیشتر از یک میلیون بذر در یک گیاه) می‌باشد (۴ و ۱۵). همچنین توتون یک محصول خودگرده‌افشان است و خویشاوندان زراعی یا وحشی کمی دارد؛ بنابراین امکان فرار ژن در این حالت بسیار اندک است. علاوه بر این هر دو تکنیک نرعقیمی و عقیمی بذر قبلاً در توتون ایجاد شده‌اند و تکنولوژی پیشرفته‌ای برای جلوگیری از انتقال و فرار ژن از طریق گرده یا بذر به گیاهان دیگر، به آسانی در دسترس است (۱۶).

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) از سال ۱۹۸۳ به منظور انتقال ژن به گیاهان به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله مزایای این روش انتقال ژن می‌توان به قرارگیری ژن مورد نظر از طریق T-DNA باکتری در ژنوم گیاه مورد نظر و همچنین بیان پایدار ژن منتقل‌شده اشاره نمود (۸).

با توجه به موارد کاربرد فراوان آنزیم لوسیفراز که به بخشی از آنها اشاره شد و با توجه به نیاز روزافزون تولید تجاری این آنزیم در شکل صحیح و مقیاس گسترده، در این تحقیق از گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید آنزیم لوسیفراز با منشا حشره شبتاب گونه ایرانی *L. turkestanicus* استفاده شده است.

مواد و روش ها

در این پژوهش ژن لوسیفراز حشره شبتاب (*luc*) پس از تکثیر از طریق PCR[1] با آغازگرهای اختصاصی، در ناقل pCAMBIA1304 و مابین پیشبرنده[2] CaMV35S و خاتمه‌دهنده[3] NOS با استفاده از آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BstEII* کلون[4] گردید و به باکتری *E. coli* انتقال یافت. سازه ژنی تهیه شده با استفاده از آزمون‌های Colony PCR، PCR، واکنش هضم آنزیمی و در نهایت توالی‌یابی و همردیف‌سازی آن در بانک‌های اطلاعاتی مورد تایید قرار گرفت. سپس سازه ژنی حاصل به اگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم به منظور تلقیح گیاهان توتون استفاده شد. گیاهان توتون حاوی ژن لوسیفراز با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی، باززایی شده و بر روی گیاهان تراریخت[5]، آزمون PCR انجام گرفت.

باکتری‌ها: در این تحقیق از دو باکتری *E. coli* سویه *DH5α* و *A. tumefaciens* سویه *LBA4404* استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه تهیه

1- Polymerase chain reaction
2- Promoter
3- Terminator
4- Clone
5- Transgenic

Archive of SID

www.SID.ir

شده و از باکتری *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن هدف به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها: آغازگرهای مناسب ژن لوسیفراز با توجه به توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *NcoI* و *BstEII* در ناقل pCAMBIA1304، توالی‌های کناری ژن لوسیفراز و توالی افزایش‌دهنده بیانی در سیستم‌های گیاهی[1] طراحی گردیدند. به منظور افزایش کارایی هضم توسط آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم، به دو طرف جایگاه برشی افزوده شد. توالی این آغازگرها عبارتند از:

آغازگر پیشرو[2]:

5′- CCC ***ATG*** GAA GAT GCA AAA AAT ATT ATG -3′

آغازگر معکوس[3]:

5′- GGG TCA CCA ***TTA*** CAA TTT GGA TTT TTT TCC -3'

ناقل‌ها: در مطالعه حاضر از دو ناقل استفاده شد. ناقل pQE30 حاوی cDNA ژن لوسیفراز که از علیپور و همکاران[4] دریافت گردید (۲) و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین[5] برای گزینش باکتریایی، ژن مقاومت به هیگرومایسین[6] جهت انتخاب در گیاه، محل‌های برشی *NcoI* و *BstEII*، پیشبرنده CaMV35S و توالی خاتمه‌دهنده NOS است.

مواد گیاهی: در این تحقیق از گیاه توتون *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi استفاده شد (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی‌ژنتیک و زیست‌فناوری). بذور استریل‌شده توتون در محیط کشت MS (۰/۵X) و بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک کشت شدند (۱۸). تکثیر مواد گیاهی نیز از طریق تقسیم ساقه گیاهان توتون رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای، به قطعاتی به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر که هر قطعه حاوی یک جوانه و یک برگ بود، و انتقال آنها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک انجام شد. بعد از دو هفته گیاهان رشد کرده و جهت تلقیح آماده شدند.

تکثیر ژن لوسیفراز با PCR و همسانه‌سازی آن در ناقل pCAMBIA1304: تکثیر قطعه DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[7] و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده انجام شد. مواد واکنش‌دهنده در PCR (در حجم ۲۵ µl) عبارت بودند از: ۰/۲ mM از هر کدام از dNTPها، ۲/۵ mM $MgCl_2$، ۱ mM از هر کدام از آغازگرها، ۱۰۰ ng DNA به عنوان الگو و یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase. شرایط PCR برای تکثیر ژن لوسیفراز شامل دمای واسرشت ºC ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ºC ۵۲ برای ۵۰ ثانیه و دمای طویل‌شدن ºC ۷۲ به مدت ۲ دقیقه، به تعداد ۳۵ دور بود. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص QIAGEN استفاده گردید. سپس محصول PCR تخلیص‌شده و همچنین ناقل pCAMBIA1304 با آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI* هضم گردیده و مجدداً خالص‌سازی شدند. در نهایت ژن لوسیفراز در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. سازه بدست آمده luc.1304 نامگذاری گردید.

ترانسفورماسیون *E. coli* با سازه‌های تهیه شده: برای تراریختی باکتری *E. coli* از روش شوک حرارتی استفاده شد (۲۳) به اینصورت که باکتری‌های مستعد شده همراه با محصول همسانه‌سازی به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ºC ۴۲ قرار

1- Kozak sequence
2- Forward primer
3- Backward primer
4- Alipour *et al.*
5- Kanamycin
6- Hygromycin
7- Thermal cycler

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتند و سپس مجدداً به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در مرحله بعد، پس از افزودن محیط LB مایع به میکروتیوب‌ها، به مدت یک ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ ºC قرار داده شدند. در نهایت محلول باکتری حاصل روی محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توزیع گردید و در دمای ۳۷ ºC به مدت ۱۵ ساعت نگهداری شد.

انتقال سازه‌های ایجاد شده به *A. tumefaciens*: برای تراریختی آگروباکتریوم، روش استاندارد انجماد و ذوب با استفاده از کلریدکلسیم به کار گرفته شد. سوسپانسیون آگروباکتریوم در محیط کشت LB مایع، با استفاده از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. به رسوب حاصل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر $CaCl_2$ (۲۰mM) استریل و سرد اضافه گردید. سپس سازه تخلیص شده به آن اضافه شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. در مرحله بعد میکروتیوب حاوی سازه و آگروباکتریوم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ ºC قرارگرفت و محیط LB مایع به آن اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در شیکرانکوباتور ۲۸ ºC قرار داده شد. محلول حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) گسترش داده شد و در دمای ۲۸ ºC به مدت ۲ روز نگهداری گردید.

تراریخت نمودن توتون با استفاده از *A. tumefaciens*: گیاهان توتون بر روی محیط کشت MS رشد داده شدند و جوان‌ترین برگ‌ها (با طول حدود ۴ سانتی‌متر) برای تلقیح انتخاب شدند. سوسپانسیون آگروباکتریوم (OD_{600nm} =۱) حاوی سازه مورد نظر تهیه گردید. هر یک از برگ‌ها به ۴ تا ۶ قطعه تقسیم و در داخل پتری‌دیش‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آگروباکتریوم، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس قطعات برگی بر روی محیط هم‌کشتی[1] (شامل محیط پایه MS + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل شده و در دمای ۲۶ ºC در تاریکی به مدت دو روز قرار داده شدند. در مرحله بعدی این قطعات برگی بر روی محیط نوساقه‌زایی (شامل محیط هم‌کشتی + ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) در دمای ۲۶ ºC با یک دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۴ هفته منتقل شدند. بعد از ساقه‌زایی، گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط ریشه‌زایی (شامل محیط پایه MS + ۲۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) انتقال یافته و در دمای ۲۶ ºC با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا ریشه‌زایی صورت گیرد. در نهایت پس از حدود ۲ تا ۳ هفته، گیاهان توتون به گلدان‌های حاوی ورمیکولایت منتقل شدند تا برای انتقال به خاک آماده گردند.

بررسی گیاهان تراریخت: برگ‌های جوان گیاهان باززایی‌شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (۱۹). آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد (شرایط ذکر شده) و گیاهان حاوی ژن لوسیفراز شناسایی و انتخاب شدند.

نتایج

تکثیر ژن لوسیفراز از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی: ژن لوسیفراز از پلاسمید pQE30 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی‌های انتهای ´۳ و ´۵ ژن لوسیفراز و محل‌های برشی *NcoI* (در آغازگر پیشرو) و

1- Co-cultivation

Archive of SID

www.SID.ir

BstEII (در آغازگر معکوس) و توالی افزایش‌دهنده بیانی Kozak طراحی شده بود، از طریق PCR تکثیر گردید (شکل ۱).

همسانه‌سازی ژن لوسیفراز در ناقل بیانی گیاهی (pCAMBIA1304): محصول PCR ژن لوسیفراز و همچنین ناقل با آنزیم‌های *NcoI* و *BstEII* برش داده شدند. پس از اطمینان از صحت برش‌ها، واکنش اتصال صورت پذیرفت و در نهایت ژن لوسیفراز در ناقل گیاهی pCAMBIA1304 کلون گردید. سازه ایجاد شده (luc.1304) (شکل ۴) به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد *DH5α* منتقل گردیدند. جهت تایید همسانه‌سازی از واکنش‌های PCR (شکل ۲)، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *NcoI* و *BstEII* و تعیین توالی (جدول ۱) استفاده شد. انتقال سازه luc.1304 به آگروباکتریوم با استفاده از روش ذوب و انجماد انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی ژن لوسیفراز روی محیط کشت LB دارای آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین رشد داده شد. آنالیز Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی، حضور قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی را در آگروباکتریوم تایید کرد (شکل ۳).

انتقال ژن لوسیفراز به گیاه توتون: عمل تراریخت نمودن گیاهان توتون با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد *LBA4404* صورت گرفت. برگ‌های توتون که با آگروباکتریوم (حاوی سازه luc.1304) تلقیح شدند، بر روی محیط‌کشت MS انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین (۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. پس از چند هفته ریزنمونه‌های تلقیح‌شده، تولید گیاهچه کردند (شکل ۵) در حالی که بر روی ریزنمونه‌های شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه luc.1304) هیچ‌گونه باززایی مشاهده نشد (شکل ۵).

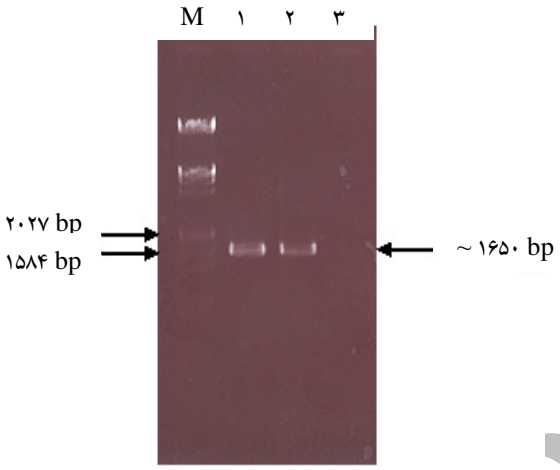
بررسی گیاهان تراریخت: گیاهان تراریخت احتمالی باززایی شده از محیط‌های کشت انتخابی حاوی هیگرومایسین، از طریق PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان باززایی شده انجام شد. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی را نشان داد؛ در حالی که در گیاهان شاهد هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد (شکل ۶).

جدول ۱- آنالیز BLAST برای ژن لوسیفراز کلون شده، مشابهت کاملی در توالی نوکلئوتیدی با توالی موجود این ژن در GenBank را نشان می‌دهد

درصد مشابهت	موجود زنده	کد مشخصه در بانک ژن
٪۱۰۰	*Lampyris turkestanicus*	AY742225.1
٪۹۸/۷	*Lampyris noctiluca*	X89479.1
٪۹۵/۸	*Pyrocoelia rufa*	AF328553.1
٪۸۵/۳	*Photinus pyralis*	EU684088

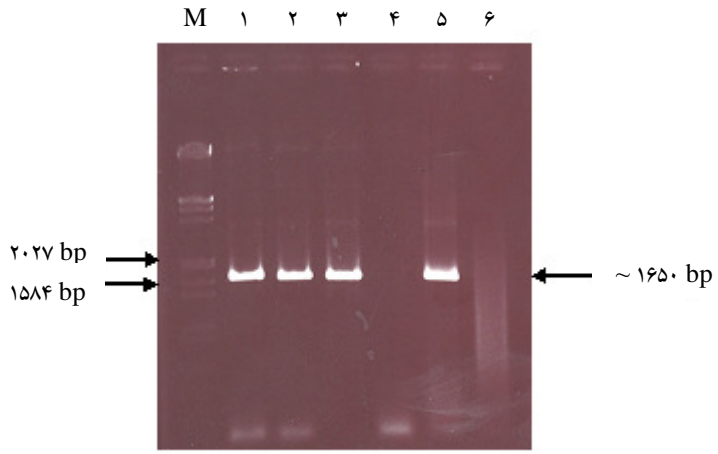
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- محصول PCR ژن luc بر روی ژل آگارز ۱٪

چاهک M: مارکر وزن مولکولی λ،
چاهک‌های ۱و ۲: محصول ناشی از تکثیر ژن *luc*، چاهک ۳: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)

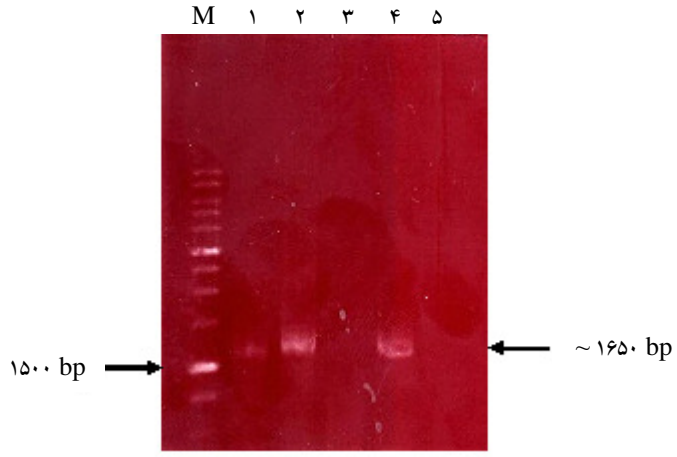


شکل ۲- تایید همسانه‌سازی با استفاده از تکنیک PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن luc

چاهک M: مارکر وزن مولکولی λ، چاهک‌های ۱ تا ۳: ناقل‌های استخراج شده از کلونی‌ها، چاهک ۴: ناقل غیرنوترکیب pCAMBIA1304 (فاقد ژن *luc*)، چاهک ۵: کنترل مثبت (ناقل pQE30 حاوی ژن *luc*)، چاهک ۶: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)

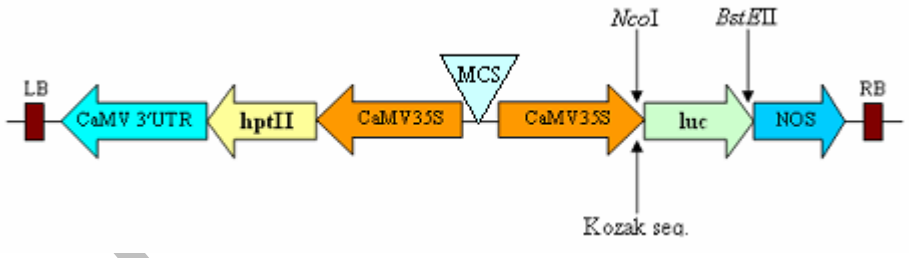
Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳- تایید حضور ژن luc (حدود ۱۶۵۰ bp) در آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک Colony PCR و آغازگرهای اختصاصی

چاهکM: مارکر وزن مولکولی ۱Kb، چاهک‌های۱و۲: آگروباکتریوم حاوی سازه luc.1304، چاهک۳: آگروباکتریوم بدون ناقل pCAMBIA1304 (و بدون *luc*)، چاهک۴: کنترل مثبت (باکتری *E. coli* حاوی سازه luc.1304)، چاهک۵: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA).

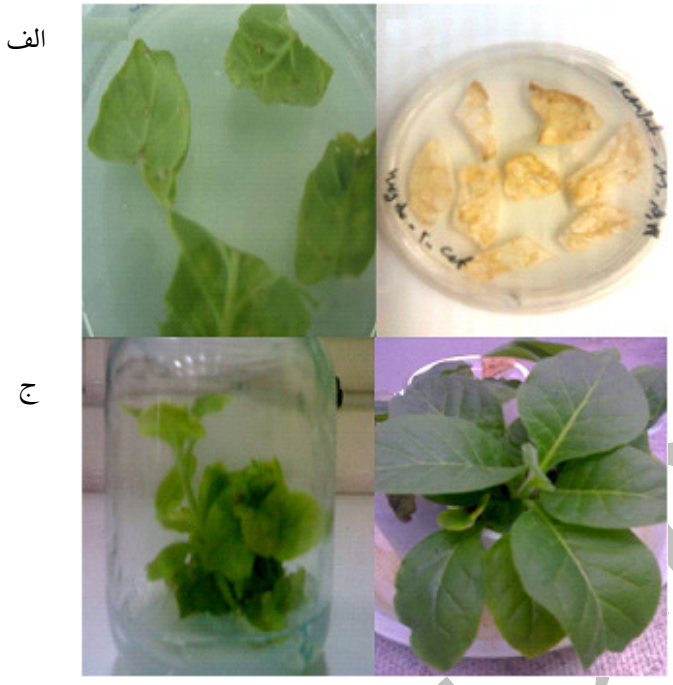


شکل ٤- طرح شماتیک سازه luc.1304

این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسن (*hptII*)، محل‌های برشی *NcoI* و *BstEII*، پیشبرنده CaMV35S، توالی خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری (NOS)، توالی افزایش‌دهنده بیانی (Kozak sequence)، توالی‌های مرزی چپ (LB) و راست (RB) و ژن *luc* می‌باشد.

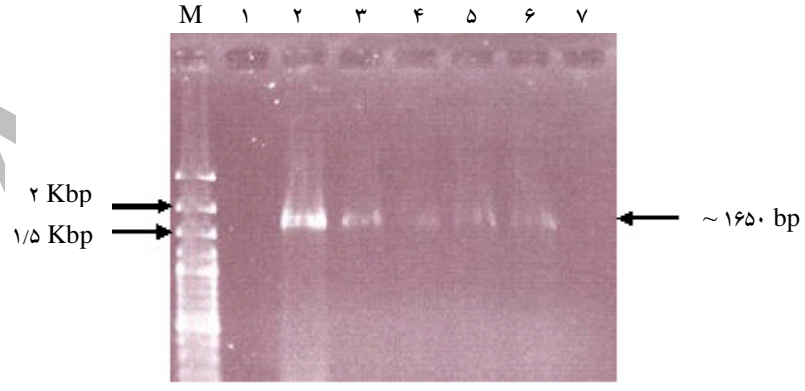
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- الف- ریزنمونه‌های برگی توتون (*Nicotiana tabacum*) تلقیح شده با آگروباکتریوم بر روی محیط

گزینش گر اولیه حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین ($mg.L^{-1}$ ۱۵) و سفوتاکسیم ($mg.L^{-1}$ ۲۰۰)، ب) هیچ‌گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های برگ‌های توتون شاهد بر روی محیط کشت انتخابی مشاهده نشد. ج) رشد گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت انتخابی حاوی $mg.L^{-1}$ ۲۵ هیگرومایسین و $mg.L^{-1}$ ۲۰۰ سفوتاکسیم. د) رشد گیاهان تراریخت در گلدان پس از انتقال به ورمیکولایت



شکل ٦- بررسی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهچه‌های باززایی‌شده و شاهد با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن لوسیفراز

چاهکM: مارکر وزن مولکولی bp ۱۰۰، چاهک۱: گیاه شاهد (غیرتراریخت)، چاهک۲: کنترل مثبت (سازه luc.1304 تخلیص شده)، چاهک‌های۳ تا ۶: گیاهان تراریخت، چاهک۷: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در زمینه‌های مختلف علوم پایه، پزشکی و صنعت، کاربردهای فراوان دارد. استفاده از لوسیفراز شبتاب، اساس گستره وسیعی از تکنیک‌های تشخیصی را تشکیل می‌دهد (۱۱، ۱۳ و ۱۷). در طی سال‌های اخیر گرایش اقتصادی و تجاری گسترده‌ای برای توسعه تکنولوژی‌های بر اساس بیولومینسانس به عنوان جایگزینی برای روش‌های قدیمی غربالگری به وجود آمده است. با توجه به کاربرد وسیع این آنزیم، تولید انبوه و کم‌هزینه آن از طریق کشاورزی مولکولی حائز اهمیت است.

از سوی دیگر امروزه ژن لوسیفراز حشره شبتاب (*luc*) به عنوان یکی از حساس‌ترین ژن‌های گزارشگر در سلول‌های زنده و بافت‌ها کاربرد دارد. از ویژگی‌های بارز ژن *luc* به عنوان گزارشگر می‌توان به حساسیت بالا، تنوع روش‌های ردیابی، امکان سنجش کمّی، عدم تداخل با فرآیندهای داخل سلول گیاهی، غیرتخریبی بودن آزمون و سنجش لحظه‌ای[1] بیان ژن به دلیل نیمه عمر کوتاه این آنزیم اشاره نمود.

گرچه گزارش‌هایی از تولید لوسیفراز حشره شبتاب گونه آمریکای شمالی *P. pyralis* در گیاه (۲۰) و نیز بیان لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *L. turkestanicus* در *E. coli* وجود داشت (۲)، اما این تحقیق اولین گزارش از انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی به گیاه می‌باشد.

در این پژوهش از ناقل بیانی دوتایی pCAMBIA1304 جهت همسانه‌سازی و انتقال ژن *luc* به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن ویژگی‌های مطلوب، به منظور انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت. ناقل بیانی pCAMBIA1304 حاوی ژن مقاومت به کانامایسین (جهت انتخاب باکتری حاوی ناقل) و ژن مقاومت به هیگرومایسین (جهت انتخاب گیاه تراریخت) به عنوان ژن‌های گزینشگر، پیشبرنده CaMV35S، خاتمه‌دهنده NOS و فیوژنی از دو ژن GFP و GUS به عنوان ژن گزارشگر می‌باشد. از سایر ویژگی‌های این ناقل می‌توان به اندازه کوچک آن، تعدد نسخه‌ها[2] و پایداری در آگروباکتریوم اشاره نمود. جهت افزایش بیان در سطح نسخه‌برداری ژن، پس از هضم ناقل بوسیله آنزیم‌های مربوطه و حذف ژن‌های بتا-گلوکورونیداز (GUS) و GFP از ناقل pCAMBIA1304، ژن *luc* به جای آنها و مابین پیشبرنده CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS جایگزین گردید. دو عامل مهم و موثر بر افزایش میزان نسخه‌برداری عبارتند از: پیشبرنده قوی و سیگنال پلی‌آدنیلاسیون[3]. در گیاهان دولپه‌ای مانند توتون، پیشبرنده CaMV35S یک انتخاب مناسب و عمومی می‌باشد، زیرا باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر، در بافت‌های مختلف گیاه هدف و در مراحل متفاوت رشد گیاه می‌شود. عامل مهم دیگر در بیان بالای ژن، سیگنال قوی پلی‌آدنیلاسیون می‌باشد که جهت پایداری نسخه‌های ساخته شده با پیشبرنده CaMV35S، خاتمه دهنده ژن NOS، مناسب و عمومی می‌باشد (۷ و ۲۵). همچنین از توالی افزایش‌دهنده سیستم بیان گیاهی، جهت افزایش بیان ژن استفاده شد. این توالی از بررسی توالی‌های قبل از کدون آغاز، در ژن‌هایی با بیان بالا در گیاهان بدست آمده است (۲۶)؛ توالی مورد توافق Kozak عبارت است از: Acc***AUG***G که به صورت همپوشان با توالی برشی *NcoI* و کدون آغاز در طراحی آغازگر پیشرو مد نظر قرار گرفت. این توالی در مولکول‌های mRNA یوکاریوتی توسط

1- Real time

2- High copy number

3- Polyadenylation signal

Archive of SID

www.SID.ir

ریبوزوم به عنوان جایگاه آغاز ترجمه شناخته می‌شود و هرچه مشابهت آن با توالی مورد توافق بیشتر باشد سیگنال قویتری برای ترجمه است (۲۷).

جهت انتقال ژن به گیاه توتون از روش آگروباکتریوم استفاده گردید که امروزه به طور گسترده‌ای جهت تراریختی گیاهان (خصوصاً دولپه‌ای‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تراریختی توتون، این روش مزایای متعددی نسبت به سایر روش‌های انتقال ژن دارد که از آن جمله می‌توان به مواردی اشاره نمود: گیاه توتون به تلقیح با نژاد آگروباکتریوم سویه *LBA4404* فوق‌العاده حساس است؛ گیاهچه‌ها مستقیماً و بدون نیاز به تشکیل کالوس، باززایی می‌شوند؛ گیاهچه‌ها به آسانی از محل لبه‌های بریده شده‌ی ریزنمونه (برگ)، پس از تلقیح بوسیله آگروباکتریوم حاوی ناقل، رشد می‌کنند و کارایی باززایی از بافت‌های گیاهی از این طریق نسبت به سایر روش‌ها بسیار بالا است (۷).

بررسی‌های مولکولی با تکنیک PCR بر روی گیاهان تراریخت، انتقال ژن لوسیفراز به گیاهان باززایی‌شده را تایید نمود (شکل ۶).

بررسی و تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخت در نسل‌های بعدی انجام خواهد شد و امید است با ادامه و تکمیل این کار تحقیقاتی، گامی دیگر در راه استقلال علمی و اقتصادی کشور برداشته شود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مادی و معنوی مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه این تحقیق را فراهم نموده‌اند، و همچنین از همکاری‌های ارزشمند آقای مهندس معصومی اصل، آقای مهندس محب‌الدینی، خانم مهندس آزموده و خانم مهندس رستم‌پور سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Aldo, R., Massimo, G., Patrizia, P., and Mara, M. 2003. Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening. Analytical Chemistry, 377: 826-833.

2. Alipour, B., Hosseinkhani, S., Nikkhah, M., Naderi-Manesh, H., Chaichi, M.J., and Kazempour, S. 2004. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 325: 215-222.

3. Chen, H., Zou, Y., Shang, Y., Lin, H., Wang, Y., Cai, R., Tang, X., and Zhou, J.M. 2008. Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants. Plant Physiology, 146: 368-376.

4. Daniell, H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. Ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp: 371-376.

5. Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T., and Wiebe, P.O. 2001. Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. Journal of Molecular Biology, 311: 1001–1009.

Archive of SID

www.SID.ir

6. De Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., and Deluca, M. 1985. Cloning of Firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7870-7873.

7. Fischer, R., and Schillberg, S. 2004. Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, 114 p.

8. Gelvin S. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 16–37.

9. Gomi, K., Hirokawa, K., and Kajiyama, N. 2002. Molecular cloning and expression of the cDNA encoding luciferin regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*. Gene, 294:157-166.

10. Harwood, W.A., Ross, S.M., Bulley, S.M., Travella, S., Busch, B., Harden, J. and Snape, J.W. 2002. Use of the Firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. Plant Cell Reports, 21: 320-326.

11. Hauke, H., and Mona, C.W. 2006. Whole-cell living biosensors - Are they ready for environmental application? Applied Microbiology and Biotechnology, 70: 273-280.

12. Koo, J., Kim, Y., Kim, J., Yeom, M., Lee, I.C., and Nam, H.G. 2007. A GUS/luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability. Plant Cell Physiology, 48: 1121-1131.

13. Kovalchuk, I., and Kovalchuk, O. 2008. Transgenic plants as sensors of environmental pollution genotoxicity. Sensors, 8: 1539-1558.

14. Leeuwen, W.V., Hagendoorn, M.J.M., Ruttink, T., Poecke, R.V., Vanderplas, L.H.W., and Vanderklor, A.R. 2000. The use of the luciferase reporter system for *in Planta* gene expression studies. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 143a-143t.

15. Leite, A., Kemper, E.L., Da Silva, J., Luchessi, A.D., Siloto, M.P., Bonaccorsi, E.D., El-Dorry, H.F., and Aruda, P. 2000. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. Molecular Breeding, 6: 47-53.

16. Ma, J.K.C., Drake, P.M.W. and Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics, 4: 794-805.

17. Milligan, M. 2004. Applications of bioluminescence and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 21: 397-405.

18. Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497.

19. Murray, M.G., and Thampson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research, 8: 4321-4325.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., De WET, J.R., Helinski, D.R., and Howell, S.H. 1986. Transient and stable expression of the Firefly luciferse gene in plant cells and transgenic plants. Science, 234: 856-859.

21. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Analytical Biochemistry, 242: 84–89.

22. Ruijter, N.C.A., Verhees, J., Leeuwen, W.V., and van der Krol, A.R. 2003. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. Plant Biology, 5: 103-115.

23. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 858 p.

24. Schillberg, S., Emans, N., and Fishcher, R. 2002. Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemical Reviews, 1: 45-54.

25. Sunil Kumar, G.B., Ganapathi, T.R., Revathi, C.J., Prasad, K.S., and Bapat, V.A. 2003. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. Protein Expression and Purification, 32: 7-10.

26. Taylor, J., Jones, J.D.G., Sandler, S., Muller, G.M., and Bedbrook, J. 2000. Optimizing of expression of chimeric genes in plant cells. Molecular Genetics, 210: 572-577.

27. Wang, X.Q., and Rothnagel J.A. 2004. 5' Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. Nucleic Acids Research, 32: 227-235.

Archive of SID

www.SID.ir