

## انتقال ژن hrGFP به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> ماهی زبرا با استفاده از پروتئین‌های نوترکیب virD<sub>۲</sub> & virE<sub>۲</sub>

❖ ندا قوتی؛ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران  
❖ حمید فرحمند؛ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران  
❖ هوشنگ علیزاده؛ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران

### چکیده

یکی از چالش‌های فرایند انتقال ژن در ماهیان، توسعه سیستم‌هایی برای انتقال کارآمد DNA است. در این پژوهش از پروتئین‌های باکتریایی برای هدفمندسازی انتقال ژن به تیره سلولی ماهی زبرا استفاده شده است. آگروباکتریوم با نام علمی *Agrobacterium tumefaciens* قادر به انتقال کارآمد DNA خود به صورت یک مجموعه DNA-Protein به سلول‌های گیاهی است. پروتئین‌های آگروباکتریوم VirD<sub>۲</sub> و VirE<sub>۲</sub> در این فرایند نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در این مطالعه با ساخت یک مجموعه مشابه سیستم آگروباکتریوم، متشکل از DNA تک‌رشته‌ای و پروتئین‌های VirD<sub>۲</sub> و VirE<sub>۲</sub> به صورت *in vivo*، به بررسی پتانسیل این روش در افزایش کارایی فرایند انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> ماهی زبرا پرداختیم. نتایج نشان داد که VirE<sub>۲</sub> و VirD<sub>۲</sub> سبب بهبود کارایی انتقال DNA به ژنوم تیره سلولی ماهی زبرا شدند.

واژگان کلیدی: انتقال ژن، آگروباکتریوم، تیره سلولی، پروتئین نوترکیب، ژن hrGFP، ماهی زبرا.

## ۱. مقدمه

یکی از مسائل حائز اهمیت در فرایند انتقال ژن سرنوشت DNA و درصد نفوذ سازه ژنی به درون ژنوم است. به طور ایده آل سیستم انتقال ژنی باید، علاوه بر کارآمدی، از ورود نسخه های متعدد ژن مورد نظر به درون هسته سلول نیز جلوگیری کند، زیرا نسخه های متعدد سبب خاموش سازی ژن ها می شوند (Pelczar *et al.*, 2004). در حال حاضر، تمرکز اصلی مطالعات انتقال ژن در موجودات با اهداف متفاوت، جست و جو برای عناصری است که بتوانند احتمال نزدیک شدن و ادغام با ژنوم موجود هدف را افزایش دهند تا سبب افزایش کارآمدی عمل انتقال ژن شوند (Tzfira & Citovsky, 2008)، زیرا امروزه یکی از چالش های اساسی در مباحث انتقال ژن به موجودات مختلف افزایش بازدهی عملیات انتقال ژن است (Tzfira & Citovsky, 2005). در سال های اخیر، دانش فناوری زیستی در حوزه انتقال ژن بر جست و جو و ارائه سیستم های انتقال هدفمند انواع ژن ها به ژنوم موجودات مختلف متمرکز بوده است و بیشترین تأکید بر دسترسی کارآمد این مواد به هسته سلول و درون ژنوم است. در ادامه و با معرفی روش های جدید، مانند انواع پروتئین هایی که قابلیت نزدیک شدن به هسته سلول را فراهم می کنند، تلاش ها برای معرفی چنین سیستم هایی در انواع مختلف موجودات ادامه دارد (Guralnick *et al.*, 1994; Collas and Alestrom, 1998; Ziemienowicz *et al.*, 1993; Pelczar *et al.*, 2004; Ziemienowicz *et al.*, 2001).

تلاش برای تولید ماهیان انتقال ژن یافته چه با هدف افزایش تولید در آبی پروری و چه با هدف کاربرد آنها به منزله موجودات مدل در تولید پروتئین های نو ترکیب صنعتی یا دارویی و نیز کاربرد ماهیان انتقال ژن یافته در مطالعات پایه ای ژنوم در آبزیان همواره حائز اهمیت بوده است (Houdebine, 2009; Hwang *et al.*, 2004; Sin, 1997).

هر یک از روش های انتقال ژن در آبزیان معایب و مزایای خاص خود را دارد. در مجموع می توان گفت

هر چند انواع روش های انتقال ژن در تولید ماهیان انتقال ژن یافته به کار می رود، هیچ کدام از این روش ها کامل یا در همه موارد مناسب نیستند و در اکثر آنها بازدهی انتقال توالی ژنی به درون هسته سلول و ژنوم ماهی بسیار کم (به طور متوسط ۰/۵-۱ درصد) است (Maclean, 1994). بنابراین، بهینه سازی روش های موجود در انتقال ژن به منظور افزایش میزان نفوذ DNA خارجی به داخل ژنوم و متعاقباً افزایش کارایی عملیات انتقال ژن ضروری خواهد بود. به این ترتیب، به نظر می رسد کاربرد روش هایی که سبب نفوذ هدفمند DNA خارجی به داخل ژنوم شوند کمک شایانی به روند بهتر و مؤثرتر فرایند انتقال ژن خواهد کرد.

اخیراً مشخص شده است که از میان گروهی از باکتری های خاک، که به منزله آگروباکتریوم شناخته می شوند، چندین گونه وجود دارند که می توانند سبب انتقال قسمتی از DNA پلاسمیدی خود به کروموزوم گیاه شوند (Tzfira *et al.*, 2005). این پلاسمید شامل DNA انتقال یابنده (T-DNA) و همه ژن های ضروری برای عمل انتقال به سلول گیاهی است. در این میان ژن های vir از اهمیت ویژه ای در فرایند انتقال ژن برخوردارند و از بین آنها پروتئین های VirD<sub>2</sub> و VirE<sub>2</sub> نقشی حیاتی و کامل کننده در انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم بازی می کنند. این دو پروتئین به همراه رشته T، مجموعه ای به نام مجموعه T را تشکیل می دهند که شکل انتقال شونده T-DNA است. این دو پروتئین توالی پیام مکان یابی هسته ای (NLS) دارند که در هدایت آنها و T-DNA متصل به آنها به سوی هسته سلول گیاهی کمک می کند (Tzfira & Citovsky, 2000). توالی NLS در این پروتئین ها می تواند مجموعه های T ساخته شده در آزمایشگاه را، که شامل پروتئین های گزارشگرند، به هسته سلول های گیاه، جانور و مخمر هدایت کند (Tzfira & Citovsky, 2008).

در این پژوهش، امکان استفاده از این روش در انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>4</sub> ماهی زبرا (*Danio rerio*) بررسی

سانتی‌گراد برای VirD<sub>2</sub> و VirE<sub>2</sub> کشت داده شدند. پس از اتمام زمان بیان، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ با شرایط ۱۰,۰۰۰ X g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه از محیط کشت جدا شدند و پس از حل کردن رسوب در بافر EDTA, Potease ۱Mm Tris-HCl, ۲۰Mm inhibitor, tritonX۱۰۰, pH۸,۳ که روی یخ انجام گرفت، با اعمال نیروی فراصوت شکسته شدند. محلول رویی این عصاره سلولی که حاوی پروتئین محلول و فعال در فرم زیستی است، پس از سانتریفیوژ در شرایط ۱۰,۰۰۰ X g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه، به روش SDS-PAGE الکتورفورز و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و برای تأیید صحت پروتئین بیان‌شده از روش وسترن بلات<sup>۱</sup> استفاده شد. در مرحله بعد برای خالص‌سازی این پروتئین‌ها از ستون‌های کروماتوگرافی HisTrap این پروتئین‌ها از ستون‌های کروماتوگرافی HP (GE Healthcare) استفاده شد.

## ۲.۲. ساخت سازه ژنی

برای ساخت سازه ژنی که متشکل از مجموعه حاصل از اتصال DNA به دو پروتئین نوترکیب VirD<sub>2</sub> و VirE<sub>2</sub> است، از سازه ژنی (STRATAGEN) ۱-phrGFP استفاده شد. به منظور ایجاد شرایط لازم برای اتصال پروتئین VirD<sub>2</sub> به DNA، از پرایمرهای F: 5'ccaata و R: 5'ccaat و taccctgtcaaatgattagttataatagtt<sup>۳'</sup> استفاده شد. توالی مجاور سمت راست T-DNA در پلاسمید pTi (RB) در این توالی‌ها با کشیدن خط مشخص شده است. بقیه توالی پرایمر، توالی اختصاصی سازه ۱-phrGFP است. پس از تکثیر قطعه مورد نظر از این سازه به کمک این پرایمرها، باند حاصله به طول ۱/۹ کیلوباز به کمک کیت خالص‌سازی (QIAGEN) از روز ژل آگارز جداسازی شد و در مرحله بعد در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (GeneAmp PCR System) 2400 قرار گرفت تا DNA تک‌رشته‌ای تولید شود.

می‌شود تا تأثیرات این روش در میزان نفوذ هدفمند و مؤثر توالی DNA خارجی به درون ژنوم این تیره سلولی و افزایش کارایی عمل انتقال ژن در سطح in Vitro سنجش شود.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. تولید پروتئین‌های نوترکیب

برای تولید پروتئین‌های نوترکیب VirD<sub>2</sub> و VirE<sub>2</sub>، از باکتری *E. Coli* سویه BL۲۱(DE۳)PlysS استفاده شد. به این منظور توالی کدکننده این دو پروتئین از سایت NCBI جست‌وجو و برای سنتز به شرکت MWG فرستاده شد. پس از دریافت سازه‌های ژنی مربوطه از این شرکت، توالی کدکننده این دو پروتئین از طریق برش با آنزیم‌های برشی EcoRI و HindIII از این سازه‌ها جداسازی شد و از طریق واکنش اتصال آنزیمی در سازه ژنی pET۳۲a(+) درج شد که با آنزیم‌های مذکور برش داده شده بود. سپس، این سازه‌های ژنی نوترکیب از طریق واکنش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری *E. Coli* سویه BL۲۱(DE۳)PlysS منتقل شدند. کلونی‌های حامل ژن‌های جدید، پس از تأیید وجود قطعه درج‌شده، به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس پرایمرهای پیشرو و پسروی پرموتر TV، از روی پلت آگار جداسازی شدند و نخست به مدت ۱۶ ساعت در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از تهیه این کشت اولیه، سلول‌های باکتری به نسبت ۱:۵۰ به محیط کشت LB جدید تلقیح و تا رسیدن به درجه کدورت ۰/۷ کشت باکتریایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شرایط ۲۰۰ rpm کشت داده شدند. پس از طی این مدت با افزودن IPTG (با غلظت نهایی ۱mM) در محیط کشت LB تولید این پروتئین‌ها در این سویه القا شد و باکتری‌ها پس از افزودن IPTG، در همان محیط کشت به مدت ۶ ساعت به ترتیب در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه

به همراه ۱۰ درصد FCS با شرایط درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO<sub>۲</sub> استفاده شد.

### ۵.۲. انتقال سازه ژنی به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub>

۲۴ ساعت قبل از انتقال سازه ژنی، سلول‌ها از فلاسک به پلت‌های ۶ خانه‌ای با تراکم ۱×۱۰<sup>۶</sup> پاساژ داده شدند؛ برای انتقال سازه ژنی hrGFP به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub>، پس از رسیدن به تراکم مورد نظر، سازه‌های ژنی با Opti-MEM (invitrogen) رقیق و پس از اختلاط با لیپوفکتامین (invitrogen) به محیط کشت سلول‌ها انتقال داده شدند.

### ۶.۲. بررسی موفقیت انتقال ژن

برای بررسی میزان موفقیت انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> در هر یک از دو سازه ژنی انتقال‌یافته، محیط کشت تیره سلولی در فاصله زمانی ۴۸ ساعت پس از انتقال ژن برای بیان یا بیان‌نشدن ژن hrGFP از طریق میکروسکوپ MVX1۰-macro-zoom (Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. همچنین، برای تأیید نتایج داده‌های میکروسکوپی، DNA ژنومی از تیره سلولی با استفاده از کیت استخراج DNA (DNeasy blood and tissue miniprep kit, QIAGEN) شد (شکل ۱) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hrGFP شامل ۳'atgcattagtattataatagtt' و ۵' R: ۳'ttaagatacattgatgagtt' و به کمک واکنش زنجیره‌ای

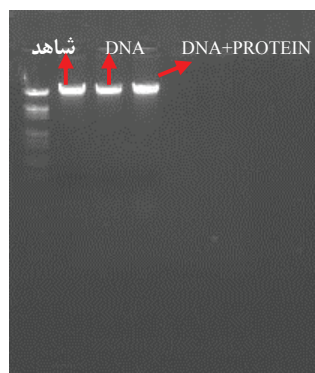
این توالی تکرار شده‌ای DNA که شامل ژن گزارشگر hrGFP، پروموتور CMV، توالی خاتمه‌دهنده SV۴۰ و توالی RB برای اتصال به پروتئین VirD۲ است نخست، در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ ساعت مورد واکنش با پروتئین VirD۲ قرار گرفت و در مرحله بعدی این توالی تکرار شده‌ای متصل به VirD۲، به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد در مجاورت پروتئین VirE۲ قرار گرفت تا سازه ژنی نهایی که ترکیبی از DNA تکرار شده‌ای و این دو پروتئین است ساخته شود.

### ۳.۲. ساخت سازه ژنی برای انتقال به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub>

برای بررسی و مقایسه تفاوت‌های احتمالی کاربرد این دو پروتئین نو ترکیب در انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> ماهی زبرا (*Danio rerio*) دو سازه ژنی مختلف به این تیره سلولی انتقال داده شد: سازه ژنی اول، DNA تکرار شده‌ای بدون حضور این دو پروتئین و سازه دوم، DNA تکرار شده‌ای متصل به پروتئین‌های VirE۲ و VirD۲.

### ۴.۲. کشت تیره سلولی ZF<sub>۴</sub>

تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> که از لارو یک روزه ماهی زبرا تهیه شده است، از لحاظ ریخت‌شناسی دارای شکل فیبروبلاستی و به صورت چسبیده به بستر محیط کشت است. برای کشت این تیره سلولی از محیط کشت DME (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)



شکل ۱. استخراج DNA. لاین‌ها از سمت مارکر: تیمار کنترل (بدون انتقال ژن). تیره سلولی که ssDNA به آن منتقل شده است. تیره سلولی که ssDNA+VirD۲+VirE۲ به آن منتقل شده است.

(MVX10-macrozoom (Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد (شکل ۲). داده‌های میکروسکوپی نشان داد درصد سلول‌هایی که بیان ژن hrGFP را نشان دادند برای سلول‌هایی که مجموعه تک‌رشته به همراه پروتئین‌های VirE2 و VirD2 به آنها منتقل شده بود، بیشتر از سلول‌هایی بود که فقط DNA تک‌رشته‌ای به آنها انتقال داده شده بود. این نتایج نشان‌دهنده افزایش درخور ملاحظه کارایی انتقال ژن با استفاده از این دو پروتئین در مقایسه با تیمار دیگر است.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نیز ساترن بلائینگ با استفاده از پروب طراحی شده برای ژن hrGFP، نشان‌دهنده تأیید نتایج قبلی بود (شکل ۳) و مشخص کرد که استفاده از این دو پروتئین با افزایش نرخ انتقال ژن، سبب افزایش کارایی فرایند انتقال ژن در این تیره سلولی ماهی زبرا شده است.

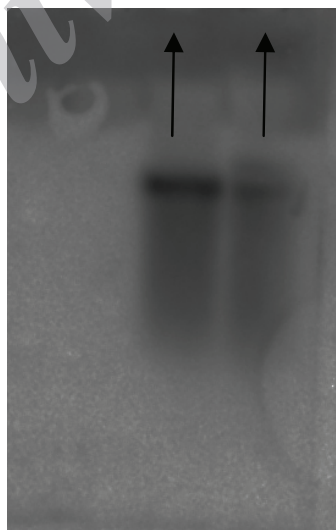
پلیمرز تکثیر شد. برای تأیید صحت نتایج، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر نمونه از DNA استخراج شده برای هر تیمار ۳ بار تکرار شد. همچنین، پس از طراحی پروب برای ژن hrGFP به طول ۵۵۰ جفت باز با استفاده از کیت PCR DIG prob synthesis (Roche)، DNA ژنومی استخراج شده از تیره‌های سلولی با ساترن بلائینگ بررسی شد تا از ورود ژن انتقال یافته به درون ژنوم اطمینان حاصل شود.

### ۳. نتایج

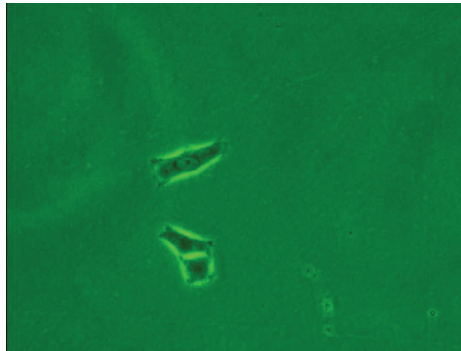
#### ۱.۳. بررسی موفقیت انتقال ژن

برای سنجش تأثیرات حاصل از کاربرد دو پروتئین نو ترکیب VirE2 و VirD2 در فرایند انتقال ژن به تیره سلولی ماهی زبرا، در فاصله زمانی ۴۸ ساعت پس از انتقال ژن، بیان یا بیان نشدن ژن hrGFP با میکروسکوپ

الف ب



شکل ۲. نتایج ساترن بلائینگ در دو تیمار مورد آزمایش. الف) ssDNA، ب) ssDNA+VirD2+VirE2



شکل ۳. بیان ژن hrGFP در تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> در تیمار ssDNA+VirD<sub>۲</sub>+VirE<sub>۲</sub>

پروتئین‌های گزارشگرند، به هسته سلول‌های گیاه، جانور و مخمر هدایت کند (همان).

یکی از مزایای آگروباکتریوم در فناوری انتقال ژن در مقایسه با سایر روش‌ها این است که می‌توان توالی DNA مورد نظر را به ژنوم میزبان انتقال داد، بدون اینکه در اثر نفوذ چندین کپی از آن توالی، ژن مورد نظر خاموش شود و یا بیان آن به شکل غیرمطلوبی صورت پذیرد (Pelczar *et al.*, 2004)؛ مطالعات انجام شده روی لاین سلولی انسانی نشان داده‌اند که استفاده از این پروتئین‌ها در انتقال ژن، سبب نفوذ یک نسخه از ژن مورد نظر به درون ژنوم میزبان می‌شود (Pelczar *et al.*, 2004). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که با استفاده از این روش، یک نسخه از ژن hrGFP وارد ژنوم ماهی زبرا شده است.

به طور خلاصه می‌توان گفت انتقال دو پروتئین VirE<sub>۲</sub> و VirD<sub>۲</sub> به سازه ژنی برای انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> در ماهی زبرا، به طور چشمگیری سبب افزایش کارایی انتقال ژن شد که این مسئله به علت افزایش نرخ ورود ژن انتقال‌یافته به درون ژنوم این تیره سلولی است.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر کاربرد دو پروتئین نو ترکیب VirE<sub>۲</sub> و VirD<sub>۲</sub> در سازه ژنی برای انتقال ژن به تیره سلولی ZF<sub>۴</sub> ماهی زبرا بررسی شد تا تأثیرات کاربرد این پروتئین‌ها در افزایش بازدهی فرایند انتقال ژن و افزایش درصد نفوذ DNA خارجی به درون ژنوم این تیره سلولی بررسی شود.

بر اساس نتایج این مطالعه، کاربرد این پروتئین‌ها به صورت درخور ملاحظه‌ای سبب افزایش راندمان فرایند انتقال ژن نسبت به تیمار مورد مقایسه (بدون کاربرد این دو پروتئین) شد. مطالعات انجام گرفته در لاین‌های سلولی در پستانداران و نیز دوزیستان نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (Guralnick *et al.*, 1994; Ziemienowicz *et al.*, 1993 & 2001; Pelczar *et al.*, 2004). این تأثیرات به علت حضور توالی مکان‌یابی هسته‌ای (NLS) در این دو پروتئین است که در هدایت این پروتئین‌ها و DNA متصل شده به آنها به سوی هسته سلول نقش دارد (Tzfira & Citovsky, 2008). توالی NLS در این پروتئین‌ها می‌تواند مجموعه‌های DNA-Protein ساخته شده در آزمایشگاه را، که شامل

## References

- [1]. Collas,C and Alestroè M,M.1998. Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish, *Transgenic Research* 7, 303-309.
- [2]. Houdebine,L.M.2009,production of pharmaceutical proteins by transgenic animals,comparative immunology,microbiology and infectious disease 32,107-121.
- [3]. Hwang,G., Muller,F., Rahman,M.A., Williams,D.W., Murdock,P.J., Pasi,K.J., Goldspink,G., Farahmand,H and Maclean,N,2004. Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos, *Mar. Biotechnol.* 6, 485-492.
- [4]. Guralnick,B.,Thomsen, G and Citovsky,V.1996. Transport of DNA into the Nuclei of Xenopus Oocytes by a Modified VirE2 Protein of Agrobacterium, *The Plant Cell*, Vol. 8, 363-373.
- [5]. Maclean,N,1994.Animal with novel genes, Cambridge University Press,NEW YORK,PP:255.
- [6]. Pelczar,P., Kalck,V., Gomez,D & Hohn,B.2004. Agrobacterium proteins VirD2 and VirE2 mediate precise integration of synthetic T-DNA complexes in mammalian cells, *EMBO reports* VOL 5, NO 6.
- [7]. Tzfira,T., Kunik,T., Gafni,Yand Citovsky,V.2000. Mammalian Cells, From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 344: *Agrobacterium Protocols*, 2/e, volume 2.
- [8]. Tzfira,T., Lacroix,B and Citovsky,V.2005. Nuclear Import and Export in Plants and Animals, edited by Tzvi Tzfira and Vitaly Citovsky, *Eurekah.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers*, Chapter 6,83-99.
- [9]. Tzfira,T AND Citovsky,V.2008. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer ,USA,PP: 737.
- [10]. Ziemienowicz,A., Rlich,D.G., Lanka,E., Hohn,B and Rossi,L. Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 96, pp. 3729-3733.
- [11]. Ziemienowicz,A.,Merkle,T.,Schoumacher,F., Hohn,B and Rossi,L.2001.Import of Agrobacterium T-DNA into Plant Nuclei: Two Distinct Function of VirD2 and VirE2 Proteins,*The Plant Cell*,Vol.13,369-383.