مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز ۱۳۹۰ (۴۸-۳۵)

مهندسی ژنتیک ژنوم هسته‌ای گیاه برای اختصاصی کردن بیان ژن در کلروپلاست با طراحی و تراریزش سیگما فاکتور هیبرید

مطهره محسن‌پور[۱]* و مسعود توحیدفر[۲]
۱، دکتری اصلاح نباتات، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲، استادیار و عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۱- تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

سیستمی با قراردادن پیشبر شوک حرارتی *E. coli* (*groE*) در ناقل پلاستیدی و ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه- باکتری تحت یک پیشبر مختص بافت طراحی گردید تا بتوان بر مشکل کاهش رشد و یا باروری گیاه در انتقال ژن به پلاستید که اغلب به دلیل اثرات تولید دائمی محصول تراژن ایجاد می‌گردد، غلبه نمود. به‌طوری‌که با ترکیب موتیف‌های قسمت انتهای آمین شبه‌سیگما فاکتور توتون که دارای توالی نشانه برای ورود به کلروپلاست و موتیف برهمکنش با پلیمراز کلروپلاستی می‌باشد با موتیف‌های قسمت C-ترمینال فاکتور سیگما ۳۲ی *E. coli* که قدرت تشخیص و اتصال به پیشبر *groE* را دارد، یک فاکتور سیگمای هیبرید گیاه *E. coli* طراحی گردید. این ژن هیبرید موسوم به HSig طی مراحلی با افزودن نواحی تنظیمی در وکتور آگروباکتریومی کلون‌سازی شد. از وکتور نوترکیب حاصل برای انتقال ژن به رقم ایرانی توتون استفاده گردید و ردیابی گیاهان تراریخته حاصل توسط آنالیز PCR، سادرن بلات و رونویسی معکوس اثبات گردید. گیاهان تراریخته HSig حاصل با استفاده از ناقل pFNGi به روش تفنگ ژنی مورد تراریختی مجدد پلاستید قرار گرفتند و بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت پیشبر *groE* در کلروپلاست، بیان HSig در بافت سبز گیاه تراریخته و هدف‌گیری آن به پلاستید با استفاده از پپتید نشانه را اثبات نمود. سیستمی که برای بیان GFP در ژنوم کلروپلاستی طراحی و ساخته شد، این قابلیت را خواهد داشت که با جایگزینی هر ژن دلخواه دیگری به جای GFP استفاده و برای اختصاصی‌کردن بیان ژن در کلروپلاست در کشاورزی ملکولی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، بیان اختصاصی، توتون، سیگما فاکتور هیبرید، مهندسی ژنتیک پلاستوم

* نویسنده مسئول: مطهره محسن پور
E-mail: mthrhm@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصر به فرد را ارائه می‌دهد که شامل: بیان بالای تراژن (Daniell *et al*. 2002)، مهندسی چندژنی در یک رویداد انتقال ژن (Daniell *et al*. 2002, De Cosa *et al*. 2001, Ruiz *et al*. 2003)، محدود نگه‌داشتن تراژن از طریق وراثت مادری[1] (Daniell 2002)، فقدان خاموشی ژن (De Cosa *et al*. 2001, Lee *et al*. 2003)، فقدان اثرات مکانی (Daniell *et al*. 2002) و پلیوتروپیک (Lee *et al*. 2003) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد. استفاده از تکنولوژی انتقال ژن به پلاستید به خاطر مشکلاتی نظیر مشکل‌بودن دستیابی به بیان تنظیمی و انتخابی تراژن‌ها محدود شده است. به استثنای پیشبر *psbD* که توسط نور آبی القا می‌شود، دیگر هیچ پیشبر داخلی که بتواند به طور اختصاصی در پلاستید القا شود، در دسترس نمی‌باشد. بنابراین تراژن‌ها به صورت دائمی در تمامی مراحل رشد و نموی گیاه بیان می‌شوند. در نتیجه رشد گیاه اغلب به خاطر اثرات مضر تولید محصول تراژن مختل می‌گردد (Buhot *et al*. 2006).

به منظور تلاش برای حل این مشکل Lossl *et al*. (2005)، یک ژن RNA پلیمراز فاژ *T7* که در هسته کد و به پلاستید هدف‌گیری می‌شد را به توتون وارد کردند و ژن مورد نظر را تحت کنترل پیشبر هسته‌ای قابل القا قرار داده دادند. اما در این سیستم با وجود تجمع mRNAی تراژن در سطوح زیاد، پروتئین مربوط به آن ردیابی نمی‌شود و گیاهان به کندی رشدکرده و پس از جوانه‌زدن سریع از بین می‌روند. در تحقیق دیگری Muhlbauer and Koop (2005) برای کنترل بیان در کلروپلاست‌ها از پیشبر *Lac* باکتریایی استفاده کردند که از رونویسی تراژن جلوگیری می‌کند. این بازدارندگی تنها پس از اسپری‌کردن گیاه با ایزوپروپیل بتا-تیو گالاکتوپیرانوزید (IPTG)[2] رفع می‌شود. به دلیل استفاده از اسپری، این تکنیک محدود به گیاهان گلخانه‌ای و نیز تنظیم تظاهر در بافت‌های هوایی گیاه می‌باشد. در تحقیق دیگری Buhot *et al*. (2006) روشی بر اساس اصلاح یک فاکتور رونویسی داخلی و اختصاصی‌کردن آن برای پیشبر خارجی که روی ژنوم پلاستیدی وجود ندارد، به کار بردند. اختصاصی‌بودن تشخیص پیشبر در باکتری‌ها توسط فاکتورهای آغازکننده رونویسی که فاکتورهای سیگما نامیده می‌شوند، صورت می‌گیرد. اختصاصی‌بودن تشخیص پیشبر توسط فاکتورهای شبه‌سیگما نیز ایجاد می‌شود. شش فاکتور شبه‌سیگما در ژنوم هسته آرابیدوپسیس تالیانا[3] وجود دارند و تمامی‌آن‌ها ویژگی‌های خانواده سیگما ۷۰ باکتری *E. coli* را دارا می‌باشد. آن‌ها همچنین از یک دامین انتهای کربوکسیل که DNA را تشخیص می‌دهد و دامین انتهای آمین که باRNA پلیمراز برهم‌کنش می‌کند، تشکیل شده‌اند. قسمت‌های انتهای کربوکسیل پروتئین‌های شبه‌سیگمای گیاهی که نواحی پیشبر را تشخیص می‌دهند، به‌خوبی حفاظت شده‌اند (Buhot *et al*. 2006). براساس این نتیجه می‌توان یک سیستم رونویسی هیبرید (گیاه-*E. coli*) ایجاد نمود و تراژن پلاستیدی را تحت کنترل پیشبر شوک حرارتی *E. coli* یعنی پیشبر *groE* قرار داد و رونویسی از تراژن را با استفاده از یک فاکتور رونویسی شیمری که ترکیبی از قسمت انتهای آمین فاکتور سیگما۱ گیاهی (SLG1) و قسمت انتهای کربوکسیل فاکتور رونویسی سیگما ۳۲ شوک حرارتی *E. coli* می‌باشد، به‌دست آورد. زیرا

1. Transgene containment

2. Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG)

3. *Arabidopsis thaliana*

Archive of SID

www.SID.ir

قسمت انتهای کربوکسیل فاکتور رونویسی هیبریدشده SLG1/ سیگما۳۲ باید فقط ژن تحت کنترل پیشبر *groE* را روی ژنوم پلاستیدی تشخیص دهد و قسمت انتهای آمین آن باید قادر باشد تا با پلیمراز کدشده در پلاستید (PEP) برهم‌کنش نماید. پیشبرهای شوک حرارتی *E. coli* توالی‌های بسیار متفاوتی از پیشبرهای سیگما۷۰ دارند و فاکتور سیگما۳۲، RNA پلیمراز را قادر می‌کند تا رونویسی را منحصراً در ژن‌های شوک حرارتی آغاز کند. هولوآنزیم سیگما۳۲، قادر به تشخیص پیشبرهایی نیست که توسط هولوآنزیم سیگما۷۰ رونویسی می‌شوند و هولوآنزیم سیگما۷۰ نیز قادر نیست پیشبرهای شوک حرارتی را تشخیص دهد. مهم اینکه پیشبرهای سیگما۳۲ در ژنوم کلروپلاستی وجود ندارد یعنی واردکردن تراژن تحت کنترل پیشبر سیگما۳۲، بیان بسیار اختصاصی آن را در پی خواهد داشت.

هدف از این تحقیق مهندسی ژنتیک گیاه برای ایجاد سیستمی با استفاده از پیشبر شوک حرارتی *E. coli* و ساخت سیگما فاکتور هیبرید برای بیان اختصاصی و یا قابل القای ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی بود تا مشکل کاهش رشد احتمالی در اثر بیان دائمی و بالای تراژن در گیاهان ترانس‌پلاستومی، برطرف گردد.

مواد و روش‌ها

آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه- باکتری

توالی ژن کدکننده‌ی سیگما فاکتور ۳۲ باکتری *E. coli* (*rpoH*) با شماره‌ی دسترسی AY616608 و نیز توالی mRNAی کدکننده‌ی سیگما فاکتور گیاه توتون NtSig1B (*sigA*) با شماره‌ی دسترسی AB023572 از پایگاه داده‌ای NCBI[1] دریافت شد. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی مذکور به توالی اسیدآمینه ترجمه گردید و در پایگاه‌های داده پروتئین برای مشخص‌نمودن محدوده‌ی موتیف‌های فعال پروتئینی مورد آنالیز قرار گرفت.

ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری

قسمت انتهای کربوکسیل از Sig32 و قسمت انتهای آمین از NtSig1B به ترتیب با استفاده از الگوی DNAی ژنومی *E. coli* و توتون، با استفاده از آنزیم پلیمراز دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی (شرکت Fermentas) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده (با استفاده از نرم افزار Vector NTI)، تکثیر شدند. پرایمرهای اختصاصی با افزودن دنباله آزاد به صورت هم‌پوشان بایکدیگر طوری طراحی شدند که امکان اتصال دو قسمت، توسط SOEing PCR[2] با حفظ ORF اصلی فراهم شود (جدول ۱).

باند حاصل از تکثیر با پرایمرهای sig32-F و sig32-R و نیز باند حاصل از تکثیر با پرایمرهای sigA-F و sigA-R، از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. محصول خالص شده‌ی این دو قطعه با هم به نسبت مولی مساوی مخلوط شدند و به عنوان الگو برای اتصال آن‌ها و ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه/باکتری در SOEing PCR با استفاده از پرایمرهای sigA-F و sig32-R، مورد استفاده قرار گرفتند و قطعه‌ی مربوط به سیگما فاکتور هیبرید موسوم به HSig تکثیر گردید.

کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی

باند مربوط به HSig، پس از خالص‌سازی از روی ژل آگارز (با استفاده از High Pure PCR Product

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov
2. Splicing by Overlap Extension

Archive of SID

www.SID.ir

Purification Kit شرکت Roche)، در حامل اولیه‌ی pTZ57R/T (شرکت Fermentas) کلون‌سازی شد. کلونی‌های *E. coli* سویه XLI-Blue که پلاسمید نوترکیب را به همراه سیگما فاکتور هیبرید (HSig) دریافت کرده بودند، روی محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین رشد کردند، کلونی PCR به طور اولیه حضور قطعه موردنظر را تأیید کرد و پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های مثبت، آنالیزهای هضم آنزیمی صحت قطعات را اثبات نمود. قطعه‌ی HSig در مرحله‌ی بعد با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I جداسازی و در ناقل pCIB4421 (Ghareyazie *et al*. 1997) تحت پیشبر اختصاصی بیان در بافت‌سبز PEPC و ترمیناتور 35S قرار گرفت. کاست HSig در مرحله‌ی بعد با هضم آنزیمی ناقص توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III، از وکتور pCIB-Hsig خارج و در ناحیه‌ی T-DNA‌ی ناقل دوگانه‌ی pBI(-k) که قبلاً توسط نویسندگان ساخته شده بود، کلون‌سازی مجدد گردید و در نهایت وکتور حاصل موسوم به pBI(-k)-Hsig به‌دست آمد. این پلاسمید به روش An *et al.* (1986) به آگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل گردید. کلیه مراحل کلون‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های Sambrook and Russel (2001) انجام گرفت.

مواد گیاهی

در این تحقیق از بذر توتون رقم ایرانی جعفرآبادی دریافتی از مرکز تحقیقات توتون تیرتاش استفاده گردید. بذرها پس از ضدعفونی روی محیط Murashige and Skoog (1962) (MS) حاوی ویتامین‌های MS، کشت شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی‌شده در این تحقیق

پرایمر	توالی
sigA-F	5'- CCGTGTAGTAGTCTTGGCTTTTAG -3'
sigA-R	5'- GGTGAGACATCGCAAGTTTTTCTCTAG -3'
sig32-F	5'- CTTGCGATGTCTCACCTGCGG -3'
sig32-R	5'- CTCATCTAGGGTTCTCTGCTTAATAG -3'

قسمت‌هایی از توالی که زیر آن خط کشیده شده نشان دهندهٔ قسمت‌های مکمل همپوشان است.

همکشتی با آگروباکتریوم و باززایی گیاهان

یک کلونی از باکتری آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 در ۵ میلی‌لیتر از LB مایع همراه با آنتی‌بیوتیک‌های لازم (mgl^{-1} ۵۰ کانامایسین و mgl^{-1} ۷۵ ریف‌آمپی‌سین) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۰۰ rpm قرار داده شد. پس از رشد، یک میلی‌لیتر از کشت باکتری در ۵۰ میلی‌لیتر، LB مایع رقیق‌سازی شد و پس از ۳ ساعت قراردادن در دور و دمای مذکور، استوسرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار به کشت باکتری‌ها اضافه گردید و تا رسیدن OD_{600nm} به ۰/۶، باکتری‌ها دوباره در دور و دمای مذکور قرار گرفتند. برگ‌های بالغ توتون به صورت قطعات مربعی شکل به اندازهٔ cm^2 ۱-۰/۵ بریده شدند و با آگروباکتریوم با OD_{600nm} برابر با ۰/۶، آلوده‌سازی شدند. سپس به مدت ۳ روز، در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، روی محیط MS به همراه ویتامین‌های MS و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ درصد سوکروز، با pH ۵/۷ و ۰/۲ درصد ژلرایت که پس از اتوکلاو به آن ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون اضافه‌شده بود، قرار گرفتند. پس از همکشتی، ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی که ترکیبات آن مانند محیط ذکر شده در بالا بود، با این تفاوت که به جای استوسرینگون حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

سفوتاکسیم[1] بود، منتقل شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۸ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. واکشت هر ۱۰ روز یک بار، انجام گرفت.

آنالیز گیاهان باززا شده از لحاظ تراریختی

استخراج DNA از گیاهان توتون باززاشده در مراحل اولیه رشد با استفاده از روش Ahmed *et al.* (2009) با اعمال تغییراتی انجام گرفت. در این روش که به خردکردن بافت گیاهی با استفاده از هاون چینی نیاز نمی‌باشد، مستقیماً از تکه‌ی کوچکی از بافت گیاه در حدود یک سانتی‌متر مربع برای استخراج DNA استفاده شد. واکنش PCR برای ردیابی حضور ژن مورد نظر در گیاهان باززاشده انجام گرفت. در این واکنش از پرایمرهای sigA-F و sig32-R برای ردیابی گیاهانی که HSig (۲۳۰۰ bp) را دریافت کرده بودند، استفاده گردید. علاوه بر این برای آنالیز آسان‌تر گیاهان تراریخته از پرایمرهای sig32-F و sig32-R نیز استفاده گردید. از آنجایی که طول باند مورد انتظار با این پرایمرها کوتاه‌تر است، لذا به راحتی می‌تواند توسط آنزیم پلیمراز Taq تکثیر گردد. جفت پرایمرهای دیگری که برای تأیید صحت تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند M13-F و sig32-F بودند که باند مورد انتظار آن‌ها ۱۰۶۱bp بود.

انتقال به محیط ریشه‌زایی

گیاهانی که به واکنش PCR جواب مثبت دادند، به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. ترکیبات محیط ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS به همراه ویتامین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳ درصد سوکروز، با pH ۵/۷ و ۰/۲ درصد ژلرایت بود که پس از اتوکلاو به آن ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم اضافه شد..

آنالیز سادرن بلات[2]

آنالیز سادرن بلات غیر رادیواکتیو بر اساس دستورالعمل راهنمای استفاده از Dig، (DIG Application Manual (Roche Diagnostics GmbH)) انجام شد. یک پروب اختصاصی برای قسمت Sig32 از سیگما فاکتور هیبرید نوترکیب (HSig) نشاندارشده با Dig توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای sig32-F و sig32-R و با الگو قراردادن قطعه DNAی خالص‌شده HSig، تهیه شد. کل DNAی ژنومی توتون با استفاده از DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) استخراج شد و ۱۰ میکروگرم DNA توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI برای لاین تولیدشده توسط حامل نوترکیب pBI(-k)HSig مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. DNAی هضم شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید و پس از انجام مراحل انتقال به کاغذ نیتروسلولزی (Blotting) با پروب تهیه‌شده نشاندار با Dig-dUTP هیبرید شد و سرانجام واکنش رنگی برای مشاهده نتایج سادرن بلات انجام گرفت.

استخراج RNA و آنالیز cDNAی تراژن

RNAی کل از گیاه تراریخته HSig و گیاه شاهد با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) استخراج شد و به عنوان الگو برای سنتز cDNA با استفاده از cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. قسمت *sigA* نیز علاوه بر HSig در گیاه شاهد و تراریخته برای اثبات رونویسی و اسپیلایسینگ[3] مورد آنالیز قرار گرفت.

تراریزش پلاستید و بیان GFP

حامل پلاستیدی pFNGi ساخته‌شده توسط

1. Cefotaxime

2. Southern blot analysis
3. Splising

Archive of SID

www.SID.ir

نویسندگان برای تراریزش پلاستید گیاهان تراریخته HSig با استفاده از تفنگ ژنی به روش Verma *et al.* (2008) مورد استفاده قرار گرفت. ذرات طلا با پلاسمید pFNGi پوشیده شدند و برای بمباران ریزنمونه‌های برگی با استفاده از دستگاه بیولیستیک PDS-1000/He ساخت شرکت Bio-Rad مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان تراپلاستی احتمالی در محیط محتوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین[1] رشد داده شدند. ترکیبات محیط باززایی همانند قبل بود. برای ردیابی بیان GFP قطعات بافت روی لام شیشه‌ای قرار داده شدند، آب به سطح رویی بافت اضافه شد و سپس با لامل پوشیده شد و زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت[2] براساس روش Menand *et al.* (1998) مشاهده گردید. علاوه بر گیاهان بمباران‌شده با GFP، گیاه شاهد بمباران نشده نیز زیر میکروسکوپ به‌عنوان کنترل منفی مورد مشاهده قرار گرفت.

نتایج و بحث

آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-باکتری

در این تحقیق برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید، ناحیه کدکننده‌ی ۲۶۵ اسیدآمینه از انتهای آمین سیگما فاکتور گیاهی (SigA) به ناحیه کدکننده‌ی ۲۳۰ اسیدآمینه از انتهای کربوکسیل سیگما فاکتور ۳۲ باکتریایی متصل گردید. بنابراین به ترتیب با قرارگرفتن اسیدآمینه‌های ۱ تا ۲۶۵ از سیگما فاکتور گیاهی و سپس اسیدهای آمینه‌ی ۵۴ تا ۲۸۴ باکتریایی، سیگمافاکتور هیبرید گیاه/ باکتری ساخته شد. آنالیز توالی اسیدآمینه‌ای سیگما فاکتور هیبرید ساخته‌شده در این تحقیق از نظر حضور دامین‌های فعال نشان داد که اسیدهای آمینه‌ی ۱۸۰ تا ۳۳۳ هم در آنالیز SigA و هم در آنالیز HSig به عنوان دامین سیگما فاکتور r2[3] تشخیص داده شده‌اند (شکل ۱- ب). این در حالی است که اسیدآمینه‌های بخش مذکور در HSig از ۱۸۰ الی۲۶۵ مربوط به گیاه بوده و اسیدآمینه‌های ۲۶۵ تا ۳۳۲ از باکتری منشأ گرفته‌اند. بنابراین نیمی از بخش (دامین) r2 از سیگما فاکتور گیاهی و نیمی از آن از سیگما فاکتور باکتریایی ساخته شده است. این آنالیز به‌خوبی نشان داد که سیگما فاکتور هیبرید حاصل به طور بالقوه دارای عملکرد بوده و دامین قسمت ترکیبی از ناحیه‌ی دوم آن همچنان حفظ شده است.

ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری

آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی صحت ساخت فاکتور سیگمای هیبرید و کلون‌سازی آن را تائید نمودند. مشاهده‌ی باند مورد انتظار ۷۳۱bp حاصل از تکثیر با پرایمرهای sig32-F و sig32-R و باند حدود ۱۵۰۰bp حاصل از تکثیر با پرایمرهایsigA-F و sigA-R، به ترتیب صحت قطعات انتهای آمین سیگما فاکتور توتون و انتهای کربوکسیل از سیگما فاکتور باکتری را تأیید نمود (شکل ۱- د). در نهایت صحت سیگما فاکتور هیبرید حاصل توسط توالی‌یابی تعیین و قسمت مربوط به *sigA*ی توتون پس از آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی از جمله بررسی توالی توسط Blast نوکلئوتیدی و پروتئینی در بانک ژن با شماره دسترسی JF738023.1 ثبت گردید.

کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی

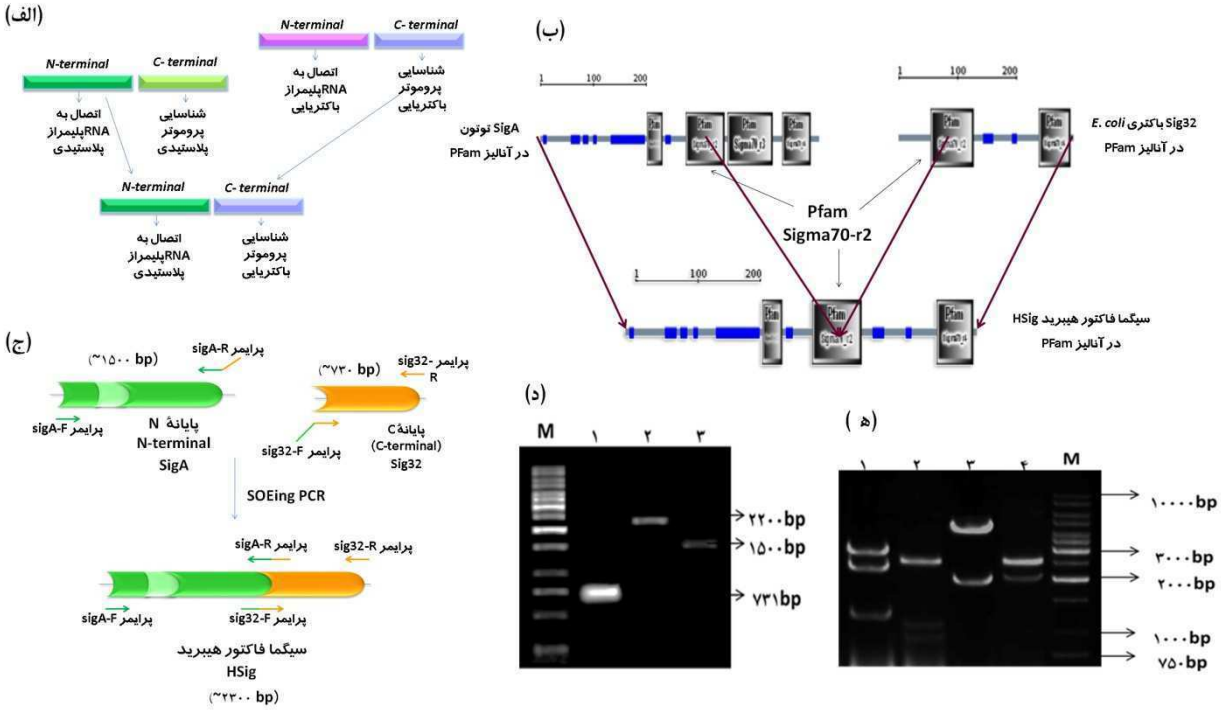
صحت پلاسمیدهای نوترکیب pTZ-Hsig و pCIB-HSig با هضم آنزیمی اثبات شد. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ-HSig با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I باند مورد انتظار ۲۲۰۰ و ۲۸۰۰

1. Kanamycin
2. Epifluorescence
3. Sigma factor r2

Archive of SID

www.SID.ir

جفت باز را نشان داد. هضم آنزیمی pCIB-HSig نیز با آنزیم‌های مذکور باند ۲۲۰۰ و ۵۱۴۲ جفت باز را ظاهر نمود (شکل ۱- ه). از هضم ناقص آنزیمی *Hind*III و *Eco*RI برای جداسازی قطعهٔ حدود ۴۶۰۰bp کاست HSig از پلاسمید نوترکیب pCIB-HSig استفاده گردید. کاست HSig در جایگاه متناظر در پلاسمید نوترکیب pBI(-k) کلون‌سازی گردید. وکتور حاصل موسوم به pBI(-k)-Hsig (شکل ۲- الف) برای انتقال ژن به هسته‌ی گیاه از طریق آگروباکتریوم برای هدف‌گیری فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری به پلاستیدها مورد استفاده قرار داده شد.



شکل ۱- نمای شماتیک ساخت، آنالیز دامین‌ها و آنالیز ملکولی تکثیر و کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید.

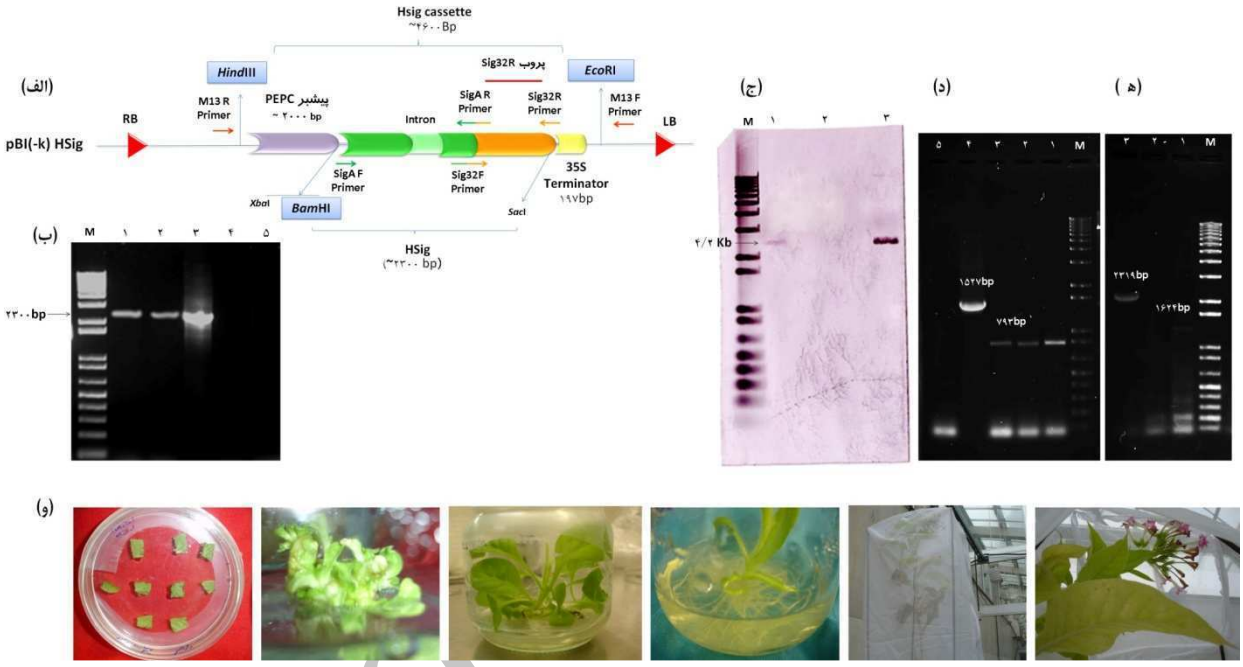
(الف) نمای شماتیک ساخت سیگما فاکتور هیبرید؛ (ب) نمای گرافیکی آنالیز دامین‌ها برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید؛ (ج) نمای شماتیک محل اتصال پرایمرها برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید با استفاده از SOEing PCR؛ (د) جداسازی ژن‌های *sig32* باکتریایی (۱) و *sigA*ی گیاهی (۳) و اتصال آن‌ها توسط SOEing PCR برای تولید سیگما فاکتور هیبرید (۲)، یک میکرولیتر از محصول PCR خالص شده از هر کدام (۱، ۲ و ۳) روی ژل برده شده است؛ (ه) هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pCIB-HSig (۱ و ۳) و pTZ-HSig (۲ و ۴) به منظور اثبات صحت ورود ژن هیبرید HSig، چاهک های ۱ و ۲ با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI، چاهک های ۳ و ۴ با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I.
M. نشانگر اندازه‌ی وزن ملکولی DNA (Fermentas شرکت 1kb ladder)

آنالیز گیاهان تراریخته

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مختلف ورود ژن هیبرید HSig را به گیاهان به اثبات رسانید واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مختلف ورود ژن هیبرید HSig را به گیاهان به اثبات رسانید (شکل ۲-ب واکنش PCR را با استفاده از پرایمرهای sigA-F و sig32-R نشان می‌دهد). در آنالیز PCR گیاهان باززاشده، تعداد زیادی از آن‌ها به واکنش PCR جواب مثبت دادند. این در حالی بود که در نمونه‌ی شاهد هیچ باندی مشاهده نگردید. از

www.SID.ir

آنجایی که تشخیص گیاهان باززاشده‌ی مجزا بسیار مشکل بود، این احتمال وجود دارد که این میزان بالای تراریختی مربوط به کلون‌های تراریخته‌ی یکسان بوده باشد. اثبات این قضیه نیاز به آنالیزهای ملکولی بیشتری خواهد داشت که به تحقیقات بعدی موکول شد و نیاز این تحقیق که دستیابی به گیاه تراریخته HSig بود با دستیابی به حتی یک گیاه نیز تأمین می‌گردید. لذا یکی از گیاهان تراریخته حاصل (شکل ۲- و) برای سایر آنالیزهای ملکولی نظیر اثبات الحاق ژن توسط سادرن‌بلات (شکل ۲- ج) و اثبات رونویسی توسط ساخت cDNA (شکل ۲- د، شکل ۲- ه) مورد آنالیز قرار گرفت.



شکل ۲- نمای شماتیک پلاسمید نوترکیب pBI(-k)Hsig (الف)، آنالیز ملکولی گیاهان تراریخته HSig (ب، ج، د، ه) و مراحل تولید گیاه تراریخته حاوی سیگما فاکتورهیبرید (و).

(ب) واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی سیگما فاکتور هیبرید (sigA-F و sig32-R) برای دو نمونه گیاه توتون تراریخته (۱ و ۲)؛ پلاسمید pBI(-K) HSig به عنوان کنترل مثبت (۳)؛ گیاه شاهد (۴) و واکنش PCR بدون الگو یا کنترل منفی (۵). (ج) آنالیز سادرن بلات گیاه تراریخته HSig برای تست الحاق تراژن برای توتون تراریخته‌ی HSig (۱)؛ گیاه شاهد غیر تراریخته (۲)؛ پلاسمید pBI(-k)HSig (۳). (د و ه) اثبات رونویسی و اسپیلایسینگ ناحیه *sigA* (د) و ژن HSig (ه) با استفاده از cDNAی کل به عنوان الگو؛ (د): (۱) و(۲) گیاه تراریخته؛ (۳) گیاه شاهد؛ (۴) پلاسمید pBI(-k)HSig؛ (۵) کنترل منفی (واکنش PCR بدون استفاده از الگو). (ه) (۱) تراریخته، (۲) شاهد و (۳) پلاسمید pBI(-k)HSig. M نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb plus DNA ladder (Invitrogen)). (و) مراحل تولید گیاهان توتون تراریخته با سیگما فاکتور هیبرید؛ از چپ به راست ریزنمونه‌های برگی تلقیح‌شده با آگروباکتریوم، باززایی نمونه‌ی برگی در محیط شاخه‌زایی، گیاه توتون باززاشده در محیط ریشه‌زایی، انتقال به گلدان و نگهداری در شرایط گلخانه تراریخته و در نهایت گلدهی توتون تراریخته را نشان می‌دهد.

(و) مراحل تولید گیاهان توتون تراریخته با سیگما فاکتور هیبرید؛ ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با اگروباکتریوم، باززایی نمونهٔ برگی در محیط شاخه‌زایی، گیاه توتون باززاشده در محیط ریشه‌زایی، انتقال به گلدان و نگهداری در شرایط گلخانه تراریخته و در نهایت گلدهی توتون تراریخته را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

cDNAی کل برای گیاهان تراریخته و شاهد به منظور آنالیز رونویسی و اسپیلایسینگ ژن سیگما فاکتور هیبرید (HSig) ساخته شد. انتظار بر این بود که ناحیه‌ی *sigA* دربردارنده‌ی یک اینترون باشد. ظهور قطعه تکثیری ۷۹۳bp توسط پرایمرهای sigA، حذف اینترون و صحت اسپیلایسینگ آن را تایید نمود. از آنجایی که گیاه نوع وحشی نیز ژن *sigA* را دارا بود لذا باند ۷۹۳bp هم در گیاه شاهد و هم در تراریخت مشاهده گردید. این در حالی بود که ظهور باند ۱۶۴۲bp به جای باند ۲۳۱۹bp که توسط پرایمرهای sigA-F و sig32-R در گیاه تراریخته مشاهده شد و در گیاه شاهد حضور نداشت، حضور تراژن HSig را فقط در گیاه تراریخته به اثبات رسانید (شکل ۲–د، شکل۲–هـ). از سویی دیگر امکان ردیابی وجود پروتئین حاصل از بیان پروتئین HSig با استفاده از آنالیز وسترن‌بلات به علت وجود پروتئین‌های داخلی مشابه، منطقی به نظر نمی‌رسید. لذا اثبات بیان پروتئین هیبرید HSig، پس از انتقال ژن تحت پیشبر *groE* به پلاستوم گیاه، میسر می‌شد. بهترین راه برای اثبات عملگرا بودن این سیستم القاییِ بیان HSig و نیز اثبات انتقال پروتئین آن به کلروپلاست، فرستادن یک ژن گزارشگر تحت پیشبر *groE* به کلروپلاست بود. بیان ژن گزارشگر به صورت مختص بافت در بافت‌های سبز، عملگرا بودن این سیستم القایی انتقال ژن به کلروپلاست را اثبات می‌نمود. بیان پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از یک میکروسکوپ اپی–فلورسنت (Nikon Eclipse E1000) بررسی گردید (شکل۳). برگ‌های بمباران‌شده با پلاسمید نوترکیب pFNGi بیان GFP را با مشاهده فلورسنت سبز نشان دادند (شکل ۳– ب).

با ترکیب موتیف‌های قسمت انتهای آمین شبه‌سیگما فاکتور توتون که علاوه بر توالی نشانه برای ورود به کلروپلاست (Kosuke *et al*. 2000) دارای موتیف برهمکنش با RNA پلیمراز پلاستیدی (PEP) می‌باشد با بخش‌های قسمت انتهای کربوکسیل فاکتور سیگما ۳۲ی *E. coli* که قدرت تشخیص و اتصال به پیشبر *groE* را دارد، فاکتور سیگمای هیبرید گیاه–*E. coli* طراحی شد. محل اتصال قسمت انتهای آمین گیاهی و انتهای کربوکسیل باکتریایی در HSig ساخته شده در این تحقیق، در حدود مرکز ناحیهٔ r2 قرار گرفته است، بنابراین نیمی از بخش (دامین) r2 از سیگما فاکتور گیاهی و نیمی از آن از سیگما فاکتور باکتریایی تشکیل شده است.

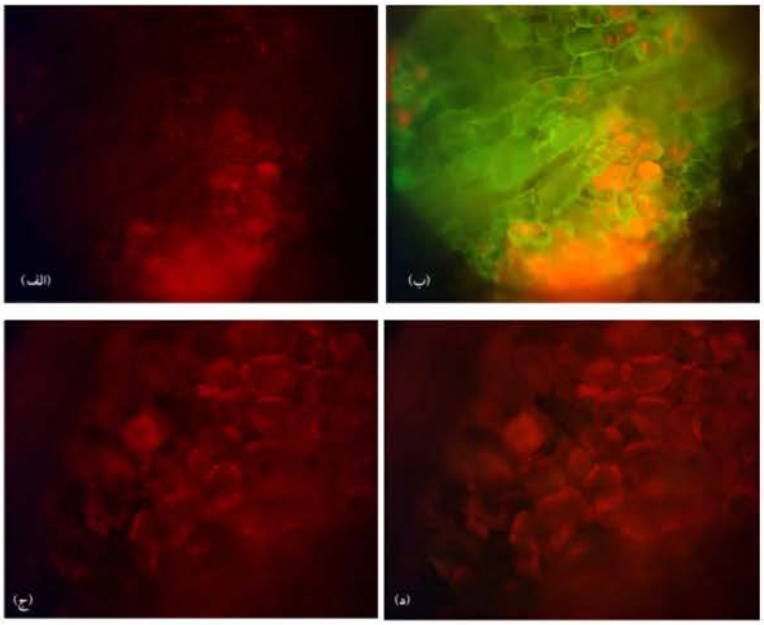
ناحیه‌ی ۲ از سیگما فاکتور ۷۰ حفاظت‌شده‌ترین ناحیه‌ی پروتئین کامل است. تمامی اعضای این کلاس از سیگما فاکتور، ناحیه‌ی ۲ را شامل می‌شوند. حفاظت‌شدگی بالای این ناحیه به این علت است که ناحیه‌ی ۲ هم دارای مارپیچ[1] تشخیص‌دهنده‌ی ناحیهٔ ۱۰– پیشبر و هم دارای مارپیچ متصل‌شونده به مرکز RNA پلیمراز می‌باشد. مارپیچ متصل‌شونده به مرکز آنزیم[2]، با دامین گیره‌مانند[3] بزرگترین زیرواحد پلیمراز یعنی β′ برهم‌کنش می‌کند (Campbell *et al*. 2006). جزء آروماتیک مارپیچی که در انتهای کربوکسیل از این دامین قرار دارد، باعث جداشدن دو رشته شده و باعث آغاز رونویسی می‌گردد.

ناحیه‌ی ۲ی سیگما فاکتورهای نوع سیگما ۷۰ را می‌توان به ۴ قسمت تقسیم نمود: ۲/۱، ۲/۲، ۲/۳ و ۲/۴. از آنجایی که نواحی ۲/۱ و ۲/۲ در اتصال به آنزیم RNAپلیمراز نقش مهمی دارند (Murakami *et al*. 2002; Vassylyev *et al*. 2002; Lysenko. 2007)، لذا در این تحقیق قسمت گیاهی توالی سیگما فاکتور هیبرید، طوری انتخاب و جداسازی گردید که این دو ناحیه را دربرداشته باشد، زیرا سیگما فاکتور هیبرید حاصل می‌بایست قادر به تشخیص RNAپلیمراز پلاستیدی (PEP) باشد.

1. Helix
2. Core Enzyme
3. Clamp

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- آنالیز بیان GFP برای گیاهان توتون تراریخته و شاهد (غیرتراریخته).

فلورسنت با استفاده از یک میکروسکوپ اپی-فلورسنت (Nikon Eclipse E1000) با بزرگنمایی ۱۰ مشاهده گردید: (الف) فلورسنت قرمز مربوط به کلروفیل در برگ توتون تراریخته با استفاده از G-2A filter set مشاهده گردید؛ (ب) فلورسنت GFP در برگ توتون تراریخته با استفاده از B-2A filter set مشاهده شد؛ (ج) و (د) برگ گیاه شاهد را به ترتیب با استفاده از G-2A و B-2A نشان می‌دهد.

نواحی ۲/۳ و ۲/۴ که در تشخیص پیشبر و اتصال به DNA در ناحیه‌ی پیشبر نقش دارند، از باکتری جداسازی شد. اتصالات با طراحی پرایمرهای هم‌پوشان به گونه‌ای صورت گرفت که ORF اصلی حفظ گردد. حذف جایگاه شناسایی آنزیم *Hind*III در محل اتصال دو جزء هیبرید، تنها با تغییر یک نوکلئوتید و بدون تغییر در اسیدآمینه، انجام گرفت. قسمت کوچکی از انتهای آمین شامل پپتید نشانه[1] است. این پپتید نشانه انتقال پروتئین را از سیتوسول به کلروپلاست فراهم نموده و پس از اینکه پلی‌پپتید به اندامک رسید بریده می‌شود. لذا در این تحقیق انتهای آمین سیگما فاکتور SigAی توتون که در ابتدای ناحیه‌ی کدکننده ژن هیبرید قرار داده شده، توانست ژن هیبرید سیگما فاکتور (HSig) را به کلروپلاست هدف‌گیری نماید و بیان ژن گزارشگر GFP که پس از دستیابی به گیاهان تراریخته‌ی HSig به کلروپلاست این گیاهان منتقل گردید، می‌تواند دلیل محکمی بر انتقال سیگما فاکتور هیبرید توسط پپتید نشانه به کلروپلاست باشد، زیرا ژن GFP که تحت پیشبر *groE* به کلروپلاست منتقل گردید، بدون حضور سیگما فاکتور هیبرید قادر به بیان نمی‌باشد.

در دامین δ_2، نواحی ۲/۱ و ۲/۲ به مارپیچ "β آنزیم RNA پلیمراز متصل می‌شوند، در حالی که ناحیه ۲/۳ و ۲/۴ به DNA در محل پیشبر متصل می‌گردند (Wilson *et al*. 1997, Hsu *et al*. 2004, Lysenko 2007). ناحیه ۲/۳ در جدا شدن دو رشته در محل پیشبر شرکت دارد و ناحیه ۲/۴ به رشته الگو نزدیک ناحیه ۱۰- پیشبر متصل می‌شود. در این تحقیق قسمت‌های سیگما فاکتور گیاهی و باکتریایی طوری به یکدیگر متصل شد که نواحی

1. Transit peptide

www.SID.ir

۲/۱ و ۲/۲ دامین۲ از سیگما فاکتور گیاهی یعنی اسیدآمینه‌های انتهای آمین از SigA و نواحی ۲/۳ و ۲/۴ از توالی Sig32ی باکتریایی گرفته شوند. محدوده دامین‌های فعال که پس از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مشخص شده بود و اتصال صحیح دامین‌ها که از طریق طراحی پرایمر و انجام PCR هم‌پوشان صورت گرفته بود، پس از آنالیزهای ملکولی مختلف و نیز بررسی نتیجه توالی‌یابی به طور کامل تأیید گردید. سیگما فاکتور هیبرید طراحی‌شده در این تحقیق، با فعال‌نمودن بیان ژن GFPی هدف‌گیری شده توسط pFNPi به کلروپلاست، نشان داد که دارای هر دو عملکرد مورد انتظار یعنی برهم‌کنش با RNA پلیمراز پلاستیدی و تشخیص پیشبر باکتریایی *groE* می باشد.

به دو دلیل در این تحقیق از سیگما ۳۲ باکتریایی برای ساخت هیبرید سیگما استفاده گردید: اول استفاده از پیشبر *groE* بوده که سیگما فاکتور ۳۲ قادر است اختصاصاً آن را شناسایی کند و دوم اینکه پیشبر *groE* توسط RNA پلیمراز پلاستیدی در حالت طبیعی شناسایی نمی‌شود (Buhot *et al*. 2006). در صورتی می‌توان از سایر سیگما فاکتورها به جای سیگما ۳۲ استفاده کرد که به جای *groE* در وکتور پلاستیدی از پیشبرهایی که به طور اختصاصی تنها توسط همان فاکتورها شناسایی می‌شوند، استفاده گردد و نیز از این موضوع اطمینان حاصل شود که RNA پلیمراز پلاستیدی نمی‌تواند آن پیشبرها را در حالت عادی شناسایی کند که در غیر این صورت بیان اختصاصی با مشکل مواجه خواهد گردید.

در این تحقیق بیان القایی ژن در پلاستید با استفاده از سیگما فاکتور هیبرید مدنظر قرار داده شد. بیان القایی ژن در پلاستید به چند دلیل بسیار مورد علاقه محققین قرار گرفته است. اگر نوعی القاء ژن، قبل یا بعد از برداشت میسر شود که اقتصادی نیز باشد، می‌توان از بار متابولیکی اضافی در طول رشد و نمو اجتناب نمود. علاوه بر این، اثرات منفی محصول (محصولات) ژنی یا تغییرات متابولیکی ایجادشده توسط محصولات ژنی جدید، در صورتی که بیان ژن به صورت دائمی[1] باشد، ممکن است مشکل‌ساز گردد (Lossl *et al*. 2003, Herz *et al*. 2005, Chakrabarti *et al*. 2006). بنابراین اگر بتوان بیان ژن در پلاستید را در زمان یا بافت دلخواه، روشن و خاموش نمود، در پژوهش‌های بنیادی می‌تواند بسیار با ارزش باشد. بیان ژن‌های پلاستیدی در سطح رونویسی و توسط پیشبرهای تنظیمی که باعث بیان متفاوت ژن در پاسخ به پارامترهای فیزیولوژیکی، نموی یا مختص بافت می‌شوند، کنترل نمی‌گردد. بنابراین بیان القایی در پلاستیدها نمی‌تواند با استفاده از عناصر کنترلی درون‌زاد پلاستیدی، حاصل گردد (Clarke and Daniell. 2011). لذا در این تحقیق با ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه/باکتری (Hsig) تلاش شد تا بر این مشکل غلبه گردد.

در گزارشات قبلی، اولین کنترل خارجی بیان ژن در پلاستید با استفاده از قراردادن تراژن پلاستیدی تحت پیشبر فاژی T7 و با استفاده ازیک پلیمراز T7 که توسط هسته گیاه تراریخت رمزشده و به اندامک منتقل می‌شد، انجام گرفت (McBride *et al*. 1994) و تا حدودی بیان کنترل‌شده حاصل گردید (Magee *et al*. 2004a). هنگامی که همان ژن‌ها توسط پلیمراز T7 قابل القاء توسط اتانول، بیان شدند، اثرات منفی مشاهده‌شده در هنگام بیان دائمی آن‌ها دیگر وجود نداشت (Lossl *et al*. 2005). با این حال این سیستم چندان مطلوب نبود و علت آن را می‌توان این‌چنین بیان نمود که پیشبر T7 در شرایط آزمایشگاهی توسط RNA پلیمراز کدشونده توسط هسته شناخته می‌شود و در این صورت در شرایط طبیعی و بیرون از آزمایشگاه نیز باعث بیان غیرالقایی

1. Constitutive

Archive of SID

www.SID.ir

خواهد شد. علاوه بر این، بیان بعضی از ژن‌های پلاستیدی در حضور پلیمراز T7 تغییر می‌کند حتی اگر آن ژن‌ها پیشبر T7 نداشته باشند (Magee *et al.* 2007) (Buhot *et al.* 2006) استفاده از پیشبر *groE* باکتری *E. coli* را گزارش دادند که توسط تشکیلات رونویسی پلاستیدی قابل تشخیص نمی‌باشد. کنترل بیان ژن در این مورد توسط بیان موقت[1] یک کاست بیانی هسته‌ای برای سیگما فاکتور شیمر حاصل می‌شود که برهمکنش RNA پلیمراز کدشده در پلاستید (PEP) و پیشبر باکتریایی را واسطه‌گری می‌کند.

در این تحقیق ما از یک سیگما فاکتور هیبرید توتون / *E. coli* برای تولید یک زمینه پایدار گیاهی به منظور بیان غیردائمی ژن در گیاه تراریخته استفاده نمودیم. تمامی روش‌هایی که در بالا ذکر شدند نیازمند یک تراژن القاکننده بیان هستند که در هسته کد شده و به پلاستید منتقل می‌شود. در گزارشات قبلی لاین‌های تراپلاستی اولیه، دارای یک ژن غیرفعال بودند که با تراریزش ثانویه به هسته، بیان آن‌ها امکان‌پذیر می‌گردید. در این تحقیق یک گیاه تراریخته پایه تولید گردید که عامل القاءکننده را دربرداشته باشد و سپس این گیاه تراریخته برای تراریزش ژن دلخواه به پلاستید مورد استفاده قرار گرفت. این سیستم امکان بیان مختص بافت را برای ژن دلخواهی که به ژنوم پلاستیدی هدف‌گیری می‌گردد، فراهم می‌نماید. الحاق GFP در پلاستوم و رسیدن به هموپلاسمی در این تحقیق مورد مطالعه قرار نگرفت زیرا هدف از انتقال GFP به کلروپلاست تنها اثبات بیان آن تحت پیشبر *groE* و توسط سیگما فاکتور هیبرید بود. از آنجایی که پیشبر *groE* توسط پلیمرازهای گیاهی شناسایی نمی‌شود، تنها سیگما فاکتور هیبرید هدف‌گیری شده به کلروپلاست قادر است با برهم‌کنش با RNAپلیمراز کلروپلاستی ژن GFPی تحت این پیشبر را بیان نماید.

گیاه تراریخته توتون حاوی HSig که در این تحقیق تولید شد را می‌توان برای بیان ژن دلخواه در بافت‌های سبز مورد استفاده قرار داد. ژن دلخواه می‌بایست جایگزین ژن GFP در ناقل پلاستیدی گردد. استفاده از پیشبرهای مختص بافت و القایی دیگری برای ژن HSig منتقل شده به هسته، می‌تواند منجر به تنظیم دلخواه بیان ژن در ژنوم پلاستید گردد. در این تحقیق از پیشبر PEPC استفاده گردید که بیان ژن را تنها در بافت‌های سبز منجر می‌گردد، علت استفاده از این پیشبر، عدم بیان آن در اندام‌های زایشی و درنتیجه کاهش اثرات منفی بیان تراژن در باروری گیاه بود. ولی در مواردی که بیان تراژن اثرات منفی در مراحل تراریزش ریزنمونه‌های سبز داشته باشد، استفاده از پیشبرهای مختص بافت و یا القایی دیگر، توصیه می‌گردد.

هر پیشبر القایی یا مختص بافت دیگری که به جای پیشبر PEPC در این سیستم قرار گیرد می‌تواند بیان القایی یا مختص بافت ژن هدف موردنظر که قرار است به ژنوم کلروپلاستی منتقل شود را تحت کنترل خود درآورد. امید است گیاهان تراریخته‌ی HSig پایه‌ی اولیه‌ی مناسبی به عنوان کارخانه‌های سبز زیستی یا بیوراکتورهایی برای بیان مواد با ارزش در گیاهان باشند، بدون اینکه بار متابولیکی اضافه در تمام قسمت‌های گیاه یا در تمام مدت عمر گیاهی ایجاد نمایند و بدین ترتیب روی رشد و باروری گیاه اثر سویی ایجاد نگردد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Transient

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmad W, Mirza B (2009) High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. J Appl Genet. 50 (2): 05–107.

An G, Wastson BD and Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. Plant Physiol. 81: 301-305.

Buhot L, Horvath E, Medgyesy P, Lerbs-Mache S (2006) Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression. Plant J. 46: 700-7007.

Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. Mol. Cell. 9 (3): 527-39.

Chakrabarti SK, Lutz KA, Lertwiriyawong B, Svab Z, Maliga P (2006) Expression of the *cry9Aa2* B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. Transgenic Res. 15: 481-488.

Clarke JL, Daniell H (2011). Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. Plant Mol. Biol. 77 (1-2): 203.

Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat. Biotechnol. 20: 581–586.

Daniell H, Khan M, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci. 7(2): 84–91.

De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat. Biotechnol. 19: 71–74.

Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, Palma GM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS and Bennett J (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA*(b) gene. Mol. Breed. 3: 401–414.

Herz S, Fussl M, Steiger S, Koop HU (2005) Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. Transgenic Res. 14: 969-982.

Hsu HH, Huang WC, Chen JP, Huang LY, Wu CF, Chang BY (2004) Properties of Bacillus subtilis sigma A factors with region 1.1 and the conserved Arg-103 at the N terminus of region 1.2 deleted. J. Bacteriol. 186: 2366–2375.

Kosuke O, Makoto F, Emi N, Kan T, Hideo T (2000) Characterization of two plastid factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. Gene. 261: 221-228.

Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. Mol. Breed. 11: 1–13.

Lossl A, Bohmert K, Harloff H, Eibl C, Mu-hlbauer S, Koop HU (2005) Inducible trans-activation of plastid transgenes: Expression of the *R. eutropha* ph6 operon in transplastomic tobacco. Plant Cell Physiol. 46: 1462–1471.

Lossl A, Eibl C, Harloff H, Jung C, Koop HU (2003) Polyester in transplastomic tobacco: significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. Plant Cell Rep. 21: 891–899.

Lysenko EA (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. Plant Cell Rep. 26: 845–859.

Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesy P, Kavanagh TA (2004a) T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. Transgenic Res. 13: 325-337.

Magee AM, MacLean D, Gray JC, Kavanagh TA (2007) Disruption of essential plastid

Archive of SID

www.SID.ir

gene expression caused by T7 RNA polymerase-mediated transcription of plastid transgenes during early seedling development. Transgenic Res. 16:415–428.

McBride KE, Schaaf DJ, Daley M, Stalker DM (1994) Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 7301-7305.

Menand B, Marechal-Drouard L, Sakamoto W, Dietrich A, Wintz H (1998) A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 11014-11019.

Muhlbauer SK, Koop HU (2005) External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor. Plant J. 43: 941-946.

Murakami KS, Masuda S, Darst SA (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 A° resolution. Science. 296: 1280–1284.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 (3): 473-497.

Ruiz ON, Hussein H, Terry N, Daniell H (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. Plant Physiol. 132: 1344–1352.

Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Vassylyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassylyeva MN, Borukhov S, Yokoyama S (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 A° resolution. Nature. 417: 712–719.

Verma D, Samson NP, Koya V, Daniell H (2008) A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. Nat. Protoc. 3: 739–758.

Wilson C, Dombroski AJ (1997) Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Mol. Biol. 267: 60–74.

Archive of SID

www.SID.ir

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2011

Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific Gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor

M. MOHSENPOUR[1]* AND M. TOHIDFAR[2]

1, Ph. D. of plant Breeding, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), 2, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

(Received: Nov. 2, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

A system was designed using *E. coli* heat shock promoter (*groE*) in plastid vector and a hybrid plant/bacteria sigma factor was constructed under control of a tissue specific promoter. This system was designed for overcome to deleterious effects on plant growth and fertility that may be caused by transgene overexpression. So that hybrid sigma factors contained N-terminal motives of tobacco sigma factors including chloroplast signal peptide and RNA polymerase interaction domains, composed by C-terminal motif of *E. coli* sigma32 that able to recognition and binding to *groE* promoter. Then this gene, HSig, was cloned in *Agrobacterium* vector after adding regulatory elements. The result vector was used for transformation of an Iranian variety of tobacco. Detection of transgenic plants was performed by PCR, southern blot and RT-PCR analysis. The Hsig gene expression and its targeting to plastid was confirmed after transformation of tobacco chloroplast using gene gun technique for targeting of green florescent protein (GFP) under control of *groE* promoter usingpFNGi vector into transgenic HSig explants. We hope that the system that was designed and constructed in this study for GFP expression in chloroplast genome, be able to apply in molecular farmingfor expression of any other desired genes instead of GFPfor specific gene expression in chloroplast.

Keywords: Hybrid sigma factor, Plastomegenetic engineering, Specific gene expression, Tobacco, Transformation

* Corresponding author: M. Mohsenpour E-mail: mthrhm@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir