Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۳ ، پاییز ۱۳۸۷
صفحه۵۷-۴۹

طراحی و ساخت سازه ترکیبی اولئوسین – اینترفرون گاما و انتقال آن به گیاه کلزا

خدیجه باقری[۱]، مختار جلالی جواران*[۱]، فریدون مهبودی[۲]، احمد معینی[۱]، علیرضا زبرجدی[۳]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار بخش بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران

۳- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک : m_jalali@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۸ – تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵)

چکیده

استفاده از ژن اولئوسین گیاهی یک روش مطلوب به منظور تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد و همچنین استخراج راحت تر و ارزان‌تر است. اتصال اولئوسین به ژن مدنظر و استفاده از پیشبرنده اختصاصی بذر، موجب هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی بذر می شود. در این تحقیق، سازه ترکیبی اینترفرون گاما- اولئوسین برای تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی در بذر گیاه کلزا طراحی و ساخته شد. برای این منظور ابتدا ژن اولئوسین از ژنوم گیاه کلزا جدا و در ناقل بیانی گیاهی pBI121 همسانه سازی شد. سپس ژن اینترفرون گاما در پائین دست ژن اولئوسین همسانه سازی شد و بین این دو ژن توالی برشی پروتئولایتیکی جهت جداسازی دو پروتئین تعبیه شد. مجموعه این دو ژن تحت کنترل پیشبرنده بذری Napin قرار گرفت. ناقل pBI121 حاوی سازه مورد نظر به اگروباکتریوم سویه LBA4404 معرفی و برای تراریختی گیاه کلزا از ریزنمونه های کوتیلدون استفاده شد. گزینش نوساقه های باززایی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین انجام شد. آنالیز بذور تراریخته نسل اول (T0) با PCR بیانگر انتقال ژن IFN γ و آزمون RT-PCR نشان دهنده بیان ژن IFN γ بود.

واژه های کلیدی

**سازه ژنی فیوژن ،
اینترفرون گاما ،
اولئوسین ،
اجسام روغنی ،
پروتئین نوترکیب ،
کلزای تراریخته**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیستمهای رایج برای تولید داروهای بیولوژیکی استفاده از میکروارگانیسم هایی مثل باکتری *E. coli* و سلولهای جانوری است. اما معایب عمده این روش ها، هزینه بالا و نیز متفاوت بودن پروتئین‌های تولید شده با فرم طبیعی آنها است. با استفاده از میزبان های گیاهی می توان مواد زیستی فعال، مطمئن و با هزینه پائین تولید کرد. مزیت عمده گیاهان نسبت به میکروارگانیسم ها این است که تغییرات پس از ترجمه که برای فعالیت پروتئین های نوترکیب لازم است در گیاهان بهتر و مطلوبتر انجام می‌شود. همچنین هزینه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می تواند حداکثر یک دهم سیستم تخمیری و یک هزارم سلول جانوری باشد. به علاوه در این روش خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماریزای انسانی یا بیماری های مشترک انسان و دام به حداقل می رسد(۲).

پروتئین های نوترکیب در اندامهای مختلف گیاهی مثل برگ، بذر، بافتهای ذخیره رویشی مثل غده تولید شده است. به چند دلیل بذور گیاهی برای تولید و ذخیره سازی پروتئین‌های نوترکیب بیشتر مورد توجه هستند. از جمله اینکه پروتئین تولید شده و ذخیره شده در بذر نسبت به اندامهای دیگر گیاه پایداری بیشتری دارد، همچنین پائین بودن مقدار ترکیبات فنولیک در بذر و نیز تخلیص راحت تر پروتئین از آنها موجب شده که به عنوان یک گزینه مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند (۳).

با وجود اینکه گیاهان در بیشتر موارد پروتئین های انسانی را تولید می کنند ولی به دلیل بالا بودن هزینه های تخلیص، استفاده از این فناوری محدود شده است. یادآوری این نکته ضروری است که حدود ۸۸٪ هزینه های تولید پروتئین های نوترکیب در سیستم های مختلف مربوط به خالص سازی آنها است (٤). چنانچه بتوان پروتئین نوترکیب تولید شده را به اجسام روغنی بذر هدف گیری کرد، استخراج پروتئین تولید شده با سهولت بیشتر و هزینه کمتری انجام خواهد شد.

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده که در صورت استفاده از پیشبرنده بذری و همچنین اتصال ژن مورد نظر به ژن اولئوسین گیاهی (اولئوسین پروتئینی است که در ساختار اجسام روغنی بذر وجود دارد و در دانه های روغنی مثل کلزا مقدار آن تا ۲۰٪ پروتئین کل بذر را تشکیل می دهد)، هدف‌گیری صحیح پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی صورت می گیرد (۵). با توجه به مقدار بالای تری اسیل گلیسروئید (TAGs) در اجسام روغنی، این بخش به راحتی با استفاده از سانتریفوژ از دیگر پروتئین های بذر و اجزای سلولی جدا می‌شود (٦). در ارزیابی کارآیی این روش مشخص شده که بیش از ۹۰٪ از پروتئین های بذری حذف می‌شوند. به این ترتیب خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با هزینه کمتر و سهولت بیشتری صورت می‌گیرد(۳).

هدف از این تحقیق، تولید اینترفرون گامای (IFNγ) انسانی با استفاده از فناوری کشاورزی مولکولی در بذر گیاه کلزا است. پروتئین IFNγ برای درمان بیماران با نقص مادرزادی و همچنین عوامل عفونی درون سلولی مانند لیشمانیا (۷) و سالمونلا تیفوموریوم (۸) و غیره کاربرد دارد. استفاده از آن در درمان سرطان های مختلف از جمله نوروبلاستوما (۹) و ملانوما (۱۰) نیز کاربرد گسترده ای دارد.

به دلیل ارزش درمانی بالای IFN γ، تلاش های زیادی در جهت تولید انبوه آنها صورت گرفته اما در اغلب موارد پروتئین تولید شده ساختار فضایی مناسب نداشته و یا اینکه برخلاف انواع طبیعی گلیکوزیله نمی‌شوند (۱۱). استفاده از سلول های یوکاریوتی جهت تولید آنها نیز هزینه بسیار بالایی دارد. بنابراین به نظر می رسد که استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از جمله IFNγ یک روش جایگزین مناسب کم هزینه و سریع باشد.

مواد و روش‌ها

ناقل های ژنی و سویه های باکتری

از باکتری *E.coli* سویه *Top10 F'* و ناقل pGEM®-T Easy Vector برای همسانه سازی استفاده شد. برای تراریختی گیاهان از باکتری اگروباکتریوم (*Agrobacterum tumefaciens*) سویه LBA4404 و پلاسمید pBI121 (Novagen) حاوی پیشبرنده بذری Napin (این پیشبرنده از خارج از کشور تهیه شد) استفاده گردید.

Archive of SID

تکثیر ژن های IFNγ و اولئوسین و همسانه سازی آنها در ناقل T Easy Vector

ژن IFNγ انسانی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. mRNA این ژن توسط معین رضاخانلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ جدا و تعیین توالی شد و در بانک ژن با شماره دسترسی AF506749 به ثبت رسیده است (۱۲). براساس توالی موجود γ IFN در بانک ژن، دو آغازگر اختصاصی (شماره ۳ و ٤) برای تکثیر آن طراحی شد (جدول۱). در آغازگر پیش بر توالی برشی پروتئولایتیکی در انتهای ´۵ (که زیر آن خط کشیده شده است) تعبیه شد. جایگاه برشی آنزیمهای *Sma*I و *Sac*I به ترتیب در آغازگر پیش بر وآغازگر معکوس قرارداده شد.

برای تکثیر ژن اولئوسین دو آغازگر اختصاصی براساس توالی موجود در بانک ژن (شماره دسترسی X61937) طراحی شد. جایگاه های برشی *Bam*HI و *Sma*I به ترتیب در ابتدای آغازگر پیش بر و آغازگر معکوس قرار داده شد (جدول ۱، آغازگر شماره ۱ و ۲). لازم به ذکر است که آغازگر معکوس ژن اولئوسین طوری طراحی شد تا رمز ژنتیکی خاتمه از انتهای آن حذف شود. استخراج دی.ان.ای ژنومی از برگ های جوان گیاه کلزا به روش CTAB انجام شد (۱۳). سپس ژن اولئوسین با بهره گیری از تکنیک PCR از دی.ان.ای ژنومی کلزا جدا و تکثیر شد.

پس از تکثیر و تخلیص، ژنهای مورد نظر در ناقل T Easy Vector (Promaga) همسانه سازی شدند. سازه تهیه شده به سلولهای مستعد *E. coli* منتقل گردید. به منظور شناسایی کلنی های مثبت، بر روی کلنی های سفید رشد کرده در محیط انتخابی (حاوی آمپی سیلین، تتراسیکلین، IPTG و X-Gal)، کلنی-PCR انجام شد. سپس کلون های مثبت انتخاب شده با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و تائید شدند. جهت حصول اطمینان از صحیح بودن کلون های شناسایی شده پس از توالی یابی قطعات DNA هدف، آنالیزهای لازم با استفاده از نرم افزار (١٤) BLAST و برنامه (١٥) Clustalw صورت پذیرفت.

جدول۱. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژنهای اولئوسین و IFNγ

شماره آغازگر	توالی
۱	۵´ TTGGATCCATGACGGATACAGCTAGAAC ۳´
۲	۵´ TACCCGGGGGTAGTGTGCTGGGTTCCAC ۳´
۳	۵´ TTCCCGGGATCGAAGGTCGTATGCAGGACCCATATG ۳´
٤	۵´ CTGAGCTCTTACTGGGATGCTCTTC ۳´

تهیه سازه ترکیبی اینترفرون گاما- اولئوسین

ابتدا در ناقل بیانی pBI121، پیشبرنده اختصاصی بذر Napin جایگزین پیشبرنده CaMV 35S شد. پیشبرنده مذکور مربوط به پروتئین ذخیره ای Napin در بذر گیاه کلزا است. در بذور رسیده کلزا مقدار این پروتئین ۳۰-۲۰٪ پروتئین کل بذر را تشکیل می دهد (١٦). برای حذف پیشبرنده CaMV 35S از آنزیم های برشی *Bam*HI و *Hind*III که در دو طرف آن قرار دارند، استفاده شد. سپس با همان آنزیم ها، پیشبرنده Napin جایگزین شد. در مرحله بعد ژن *gus* با آنزیمهای برشی *Sac*I و *Sma*I حذف و به جای آن، ژن IFNγ در همان مکان های برشی قرار داده شد. سپس ژن اولئوسین با استفاده از آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sma*I در بالادست ژن IFNγ همسانه سازی گردید (شکل ٤).

www.SID.ir

Archive of SID

انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخته:

ضدعفونی بذور کلزا (رقم PF) با استفاده از هیپوکلریت ۲/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای جوانه زنی بذور از محیط MS (۱۷) در دمای°C ۲٦ با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. تراریختی و باززائی گیاهان مطابق با روش Molony و همکاران (۱۸) با اندکی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که ٦-٤ روز پس از جوانه زنی بذر، برگهای کوتیلدونی (با طول دمبرگ تقریبا mm ۳) با دقت از انتهایی ترین محل دمبرگ (با حذف جوانه انتهایی) بریده شدند. یک روز قبل از انجام آلودگی، تک کلنی های اگرباکتریوم حاوی سازه مورد نظر در محیط LB + µg/ml 50 کانامایسین در دمای ۲۸°C و تاریکی کشت داده شد، وقتی که OD باکتری رشد کرده به ۱-۰/۷ رسید، در دمای ٤°C و دور rpm ۳۵۰۰ به مدت ۸-۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت باکتری (LB)، محیط تلقیح (شامل MS +gl^{-1}۵۰ گلوکز) به سلولهای باکتری رسوب داده شده اضافه و سلول ها کاملا در آن حل شدند. بعد از آماده کردن سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه ها به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه در تماس با سوسپانسیون اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر (اینترفرون گاما- اولئوسین) قرار گرفته و در پتری دیش های حاوی محیط هم کشتی (شامل MS + BAP mgl^{-1} 4/5) به مدت ٤٨ الی ۷۲ ساعت در دمای °C ۲٦ در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعدی این ریزنمونه ها بر روی محیط کشت انتخابی شامل محیط هم کشتی به اضافه mgl^{-1} ۱۰ کانامایسین (به منظور گزینش گیاهچه های تراریخته) وmgl^{-1} ۲۰۰ سفاتوکسیم (برای کنترل اگروباکتریوم) در دما و دوره نوری مشابه مرحله قبل به مدت ٤ هفته نگهداری شدند. واکشت نمونه ها به فاصله هر ۱۵ روز یک بار انجام شد. برای طویل شدن ساقه از محیط MS ۱/۲ حاوی mgl^{-1}۲۵ کانامایسین به اضافه mgl^{-1} ۲۰۰ سفاتوکسیم و برای ریشه زائی نوساقه های بدست آمده از محیط MS ۱/۲+mgl^{-1}۱۰۰ سفاتوکسیم استفاده شد. در مرحله آخر، گیاهان ریشه دار شده ابتدا به گلدان های حاوی پرلیت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) و سپس به خاک منتقل شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. در مرحله گلدهی، گیاهان تراریخته با پاکت گذاری از یکدیگر جدا شدند تا از دگرگشنی آنها جلوگیری شود. بذور جمع آوری شده از گیاهان تراریخته جهت آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح دی. ان. ای. و آر. ان. ای:

از برگ های جوان گیاهان تراریخت و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، DNA ژنومی با روش CTAB استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و ژن IFNγ واکنش PCR بر روی گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد.

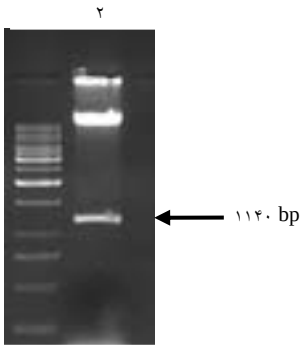
بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح آر. ان. ای:

برای بررسی بیان ژن در سطح آر.ان.ای از روش RT-PCR استفاده شد. نمونه برداری از بذور تراریخته حدود ۲۵ روز بعد از گلدهی انجام شد. آر.ان.ای از بذر گیاهان شاهد و تراریخته با استفاده از کیت تخلیص آر.ان.ای (QIAGEN) انجام و سپس نمونه با اسپکتروفتومتر تعیین غلظت شد. به منظور تأیید حذف آلودگی DNA بر روی آر.ان.ای PCR انجام شد. مراحل ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits شرکت Fermentas و مطابق با پروتوکل با استفاده از آغازگرهای oligodT و Hexamer انجام شد. PCR بر روی cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی IFNγ انجام شد.

نتایج

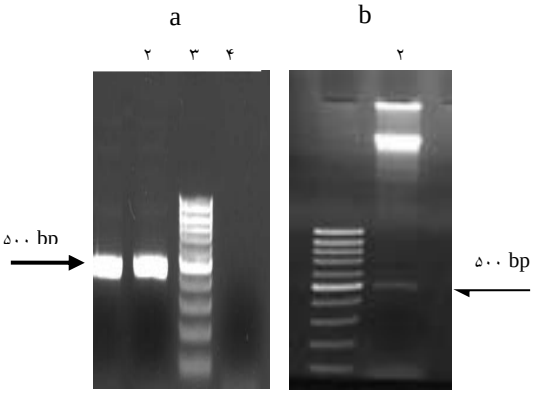
جایگزینی پیشبرنده Napin بجای CaMV 35S با هضم آنزیمی تایید شد به این ترتیب که قطعه ۱۱٤۰bp (مربوط به Napin) بجای قطعه ۸۳۵ bp (مربوط به CaMV 35S) قرار گرفت (شکل ۱).

Archive of SID



شکل۱: تائید جایگزینی پیشبرنده CaMV 35S با پیشبرنده Napin، خط ۱: نشانگر وزنی ۱kb خط ۲: ناقل pBI121 برش داده شده با آنزیمهای *Hind*III و *Bam*HI که قطعه bp ۱۱٤۰ (مربوط به پیشبرنده Napin) آزاد شده است.

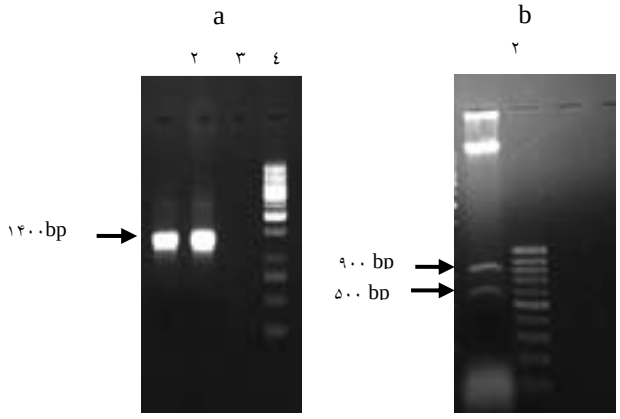
قطعه ۵۰۰bp مربوط به ژن IFNγ بعد از همسانه سازی در ناقل TA و تائید توالی، در ناقل بیانی گیاهی pBI121 مجددا کلون شد سپس با استفاده از روشهای کلنی-PCR و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل۲).



شکل۲: تکثیر ژن INFγ و تائید همسانه سازی آن با هضم آنزیمی در ناقل pBI121؛ شکل a) خط ۱ و ۲: قطعه ۵۰۰bp تکثیر شده (مربوط به INFγ)، خط ۳: نشانگر ۱۰۰bp و خط ٤: کنترل منفی. شکل b) خط ۱: نشانگر وزنی ۱۰۰bp، خط ۲: ناقل pBI121 برش داده شده و قطعه ۵۰۰bp (ژن INFγ) آزاد شده.

تکثیر ژن اولئوسین با استفاده از روش PCR و دی.ان.ای ژنومی کلزا به عنوان الگو، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، یک قطعه تقریبا ۹۰۰bp تولید کرد. این قطعه نیز ابتدا در ناقل TA همسانه سازی و توالی یابی شد. پس از اطمینان از صحت قطعه ژن اولئوسین جداسازی شده، در محل های برشی *Sma*I و *Bam*HIدر ناقل pBI121 در بالادست ژن IFNγ کلون شد. بررسی نتایج توالی یابی میزان مشابهت ۹۹٪ را با توالی موجود در بانک ژن نشان داد.

سازه ترکیبی اینترفرون گاما- اولئوسین با استفاده از آغازگر پیش بر ژن اولئوسین و آغازگر معکوس IFNγ (آغازگر شماره ۱ و ٤) با کلونی-PCR و هضم آنزیمی تائید شد. همانطور که انتظار می رفت محصول PCR یک قطعه ۱٤۰۰bp بود که با هضم آنزیمی دو قطعه bp ۵۰۰ وbp ۹۰۰ تولید شد (شکل۳).

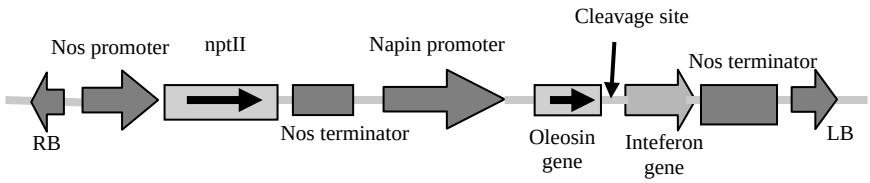


شکل۳: تائید همسانه سازی ژن های INFγ و اولئوسین با کلونی-PCR و هضم آنزیمی؛ a) خط ۱ و ۲ قطعه ۱٤۰۰bp تکثیر شده (مربوط به ژنهای INFγ و اولئوسین) ، خط ۳: کنترل منفی، خط٤: نشانگر وزنی ۱kb. شکل b) خط ۱: ناقل pBI121 برش داده شده و قطعه ۵۰۰ و ۹۰۰bp آزاد شده، خط ۲ : نشانگر وزنی ۱۰۰bp

به این ترتیب سازه حاصله ترکیبی از پیشبرنده بذری Napin، ژن اولئوسین و IFNγ و توالی برشی در بین دو ژن بدست آمد (شکل٤).

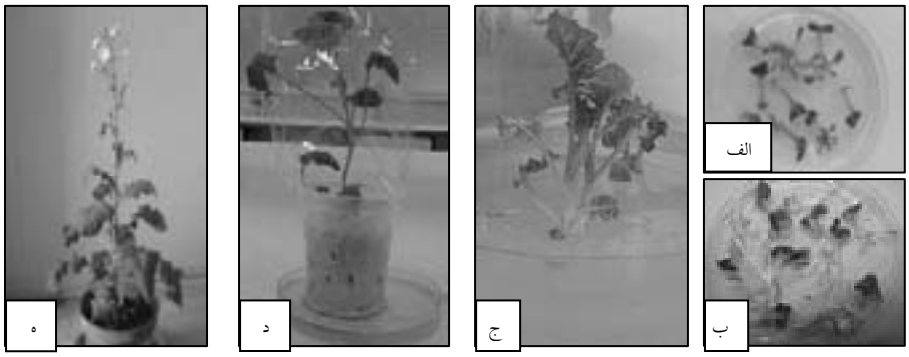
www.SID.ir

Archive of SID



شکل٤: نمودار سازه حاوی ژن *npt*II (مقاومت به کانامایسین)، پیشبرنده Napin، ژن INFγ ، جایگاه برشی پروتئولایتیکی و ژن اولئوسین که در ناقل بیانی pBI121 در بین دو ناحیه مرزی چپ (LB) و ناحیه مرزی راست (RB) قرار گرفته است.

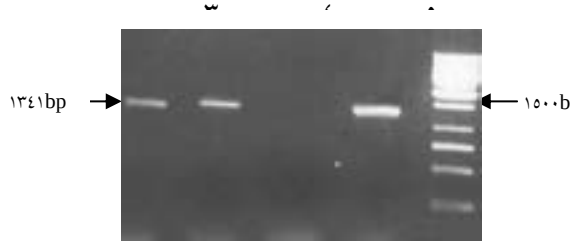
سازه تهیه شده به روش انجماد و ذوب (۱۹) به اگروباکتریوم منتقل و با روش کلونی- PCR تایید شد و از آن برای تراریختی ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده شد. جوانه های باززایی شده که در محیط انتخابی، سبز مانده بودند ابتدا به محیط رشد نوساقه (فاقد هورمون) منتقل و پس از ریشه دار شدن به گلدان های حاوی پرلیت جهت سازگاری به شرایط محیط منتقل شدند. سپس گیاهان رشد یافته به گلدان های حاوی خاک، ماسه و ورمیکولیت منتقل شدند و تا زمان رسیدگی بذور در شرایط گلخانه نگهداری شدند (شکل ۵). گیاهان انتخاب شده در مرحله گلدهی پاکت گذاری شدند تا از دگرگرده افشانی جلوگیری شود و بذور حاصل از آنها (نسل T0) جمع آوری و جهت بررسی های بعد نگهداری شد.



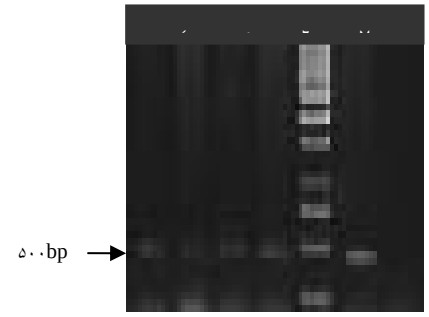
شکل۵: باززائی و رشد نوساقه های گیاه کلزا پس از تراریختی، الف) باززائی نوساقه ها از ریزنمونه کوتیلدونی در محیط انتخابی، ب) باززائی نوساقه های سفید از ریزنمونه های غیرتراریخت (شاهد) در محیط انتخابی، ج) رشد نوساقه ها در محیط طویل شدن ساقه، د) گیاه تراریخت ریشه دار شده در گلدان حاوی پرلیت، ه) گیاه تراریخت در مرحله گلدهی در گلدان حاوی خاک

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح دی.ان.ای و اطمینان از انتقال سازه هدف به گیاهان تراریخت، پس از استخراج دی.ان.ای ژنومی از برگ گیاهان نسل اول (T0) و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و ژن IFNγ انجام شد و قطعه ۱۳٤۱bp مربوط به ژن *npt*II و قطعه ۵۰۰bp مربوط به ژن IFNγ در گیاهان تراریخت مشاهده شد در حالیکه در گیاهان شاهد باندی مشاهده نشد (شکل٦ و ۷). لازم به ذکر است که اندازه ژن *npt*II برابر ۷۹۵ bp است ولی چون دو آغازگر فوق در بالادست و پائین دست ژن *npt*II طراحی شده بود به همین دلیل اندازه قطعه تکثیر شده بزرگتر و برابر ۱۳٤۱bp است.

Archive of SID

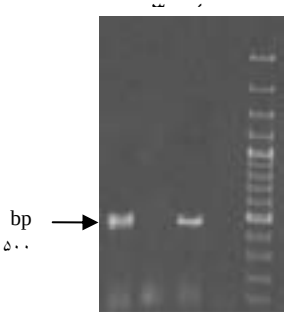


شکل ٦: اثبات حضور ژن *npt*II در گیاهان تراریخت از طریق آزمون PCR. چاهک ۱ و ۲: گیاهان تراریخت که باند ۱۳٤۱ جفت بازی را نشان می‌دهند، ۳: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت)، ٤: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121) و ٥: مارکر ۱kb



شکل ۷: آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی IFNγ؛ خط۱، ۲، ۳، ٤، گیاهان تراریخت شده، خط۵: نشانگر وزنی kb ۱ ، خط٦: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی سازه)؛ خط۷: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)

گیاهانی که نتیجه آزمون PCR آنها مثبت بود برای استخراج RNA از بذر انتخاب شدند. نتایج RT-PCR هم نشان داد که بیان ژن IFNγ در سطح آر.ان.ای در تعدادی از گیاهان تراریخته صورت می گیرد (شکل ۸).



شکل ۸: آنالیز گیاهان تراریخت با RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی IFNγ؛ خط۱: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی سازه ترکیبی)؛ خط ۲ و ۳ گیاهان تراریخت ، خط٤: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت) ،خط۵: نشانگر ۱۰۰bp

بحث

اتصال ژن اولئوسین به ژن مدنظر یک روش بسیار مناسب برای ذخیره پروتئین نوترکیب در اجسام روغنی بذر و در نتیجه تخلیص راحت تر پروتئین ارائه می‌کند (۵). بیان پروتئین نوترکیب به همراه اولئوسین تمام مزایای بیان در بذر از جمله ظرفیت بالای تولید، کاهش قیمت تمام شده محصول، افزایش پایداری پروتئین و... را دارد. تا به حال پروتئین های مختلفی به صورت ترکیبی با اولئوسین بیان شده اند و در تمام موارد ارزیابی فعالیت پروتئین مثبت بوده است (۲۱،۲۰، ۲۲). در بیشتر موارد حتی پروتئین متصل به اجسام روغنی هم فعال بوده که نشان می دهد اتصال به اولئوسین بسته بندی پروتئین نوترکیب را مختل نمی کند (۳). این تحقیق با هدف استفاده از ظرفیت بالای این فناوری جهت تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی که دارای کاربردهای وسیع در پزشکی می باشد، طراحی و اجرا شد.

از عوامل مهم در انتقال ژن به گیاه کلزا، نوع ریزنمونه، رقم کلزا، سویه اگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح است که در بالا بودن فراوانی باززائی و تراریختی بسیار موثر هستند. در این تحقیق بر اساس نتایج کار زبرجدی و همکاران (۱) ریز نمونه کوتیلدون، رقم PF، سویه LBA4404 و مدت زمان تلقیح ۲۰-۱۰ ثانیه انتخاب شد. نکته قابل توجه در به کارگیری کوتیلدون به عنوان ریزنمونه، وجود جوانه انتهایی در بین برگهای اولیه است در صورتی که این بخش کاملاً حذف نشود، پس از آلوده سازی با اگروباکتریوم و کشت ریزنمونه بر روی محیط‌های کشت، جوانه انتهایی که غیرتراریخته است سریعاً رشد کرده و محقق دچار اشتباه می‌شود. از سوی دیگر حذف سلول های قاعده دمبرگ که از توان تراریختی و باززایی بالایی برخوردار هستند نیز باعث عدم شاخه زایی و کاهش میزان تراریختی می‌شود. بنابراین در تهیه ریزنمونه ها و برش دمبرگ کوتیلدونی باید دقت کافی اعمال شود تا نتیجه مطلوب حاصل گردد.

در خصوص مصرف کانامایسین به عنوان عامل انتخابگر سلول ها و جوانه های تراریخته باید توجه داشت که محدوده بین $mg\ l^{-1}$ ۳۰-۱۵، برای کلزا کافی است. میزان بالای کانامایسین موجب

www.SID.ir

Archive of SID

حذف نوساقه های تراریخته نیز می‌شود. از طرف دیگر، به علت مرگ سلول های گیاهی غیرتراریخته که در اثر آنتی بیوتیک کانامایسین روی می‌دهد، ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئل ها به محیط بیرون سلولی منتقل می‌شود که این ترکیبات نیز می‌توانند بر روی سلول های دیگر و حتی سلول های تراریخته اثرات منفی بگذارند. لذا، مرگ بسیاری از سلول های گیاهی (از جمله سلولهای تراریخته) نه به واسطه ماده انتخابگر (کانامایسین) است، بلکه به علت آزاد شدن ترکیبات نامطلوب و مواد سمی از سلولهای مرده است (۲۳).

در گیاهان انتخاب شده بر سطح محیط کشت (حاوی کانامایسین)، حضور ژن IFNγ و *npt*II با آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در گیاهان تراریخته اثبات گردید. بررسی های تکمیلی و آزمون RT-PCR، نسخه برداری از ژن IFNγ را در بذور گیاه کلزا تائید کرد. مجموعه آزمونهای انجام شده و نتایج حاصل نشان داد که ژن IFNγ به ژنوم گیاه کلزا منتقل شده و نسخه برداری از آن صورت می پذیرد. امید است با تکمیل بررسی های بعدی در زمینه استخراج و استحصال این پروتئین نوترکیب ارزشمند امکان تولید انبوه و ارزان آن را فراهم کرد.

منابع

۱-زبرجدی ع، جلالی جواران م، سلمانیان ع ه،کریم زاده ق(۱۳۸٤). بررسی تاثیر ساختارهای (سنس و آنتی سنس) انتقال یافته ژن کدکننده آنزیم β-ketoacyl-CoA synthase برمیزان تولید اسید اورسیک در کلزا. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۸۳ ص.

2- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends in Biotechnology, 21(12): 570-578.

3- Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA (1997) "Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. Drug Development Research, 42(3-4): 172-181.

4- Evangelista RL, Kusnadi AR, Howard JA, Nikolov ZL (1998) Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. Biotechnology Progress, 14(4): 607-14.

5- Vanrooijen GJH, Moloney MM (1995) Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. Bio-Technology, 13(1): 72-77.

6- Murphy DJ (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. Progress in Lipid Research, 29(4): 299-324.

7- Assreury J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. Eur.J.Immunol., 24(3):672-6.

8- Nauciel C, Espinasse-Maes F(1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. Infect Immun, 60(2): 450–454.

9- Seeger RC, Rosenblatt JD, Duerst RE, Reynolds CP, Villablanca JG, Hasenauer B, Feig SA (1998) A Phase I Study of Human Gamma Interferon Gene-Transduced Tumor Cells in Patients with Neuroblastoma. Human Gene Therapy, 9(3): 379-390.

10- Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF (1997) A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-γ gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. Cancer, 80: 401-12.

11- Baron E, Narula, S (1990) From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. Critical Reviews in Biotechnology, 10(3): 179-90.

12- Moeenrezakhanlou A, Maghsoudi N, Mahboudi F (2002). Homo sapiens interferon-gamma mRNA, complete cds.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=20805895.

13- Murray MG, Thampson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.

14- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

15- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.

16- Crouch ML and Sussex IM.(1981). Development and storage- protein synthesis in *Brassica nap*us L. embryos invivo and invitro. Planta, 153:64-74.

17- Murashige S, Skoog M (1962) Arevised medium for rapid grawth and bioassays with obacco tissue cultures. Plant Physiol, 15: 473-497.

Archive of SID

18- Moloney MM, Walker JM, Sharma, KK (1989) High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors. Plant Cell Reports, 8:238-242.
19- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Research, 16: 9877.
20- Parmenter DL, Boothe JG, Rooijen GJ, Yeung EC (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. Plant Molecular Biology, 29(6): 1167-80.
21- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from Arabidopsis thaliana seeds. Plant Biotechnol. J, 4: 77–85.
22- Peng CC, Chen JC, Shyu DJ, Chen MJ, Tzen JT(2004). A system for purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* via artificial oil bodies constituted with their oleosin-fused polypeptides. J. Biotechnol., 111: 51–57.
23-Chawla HS (2000). Introduction to plant Biotechnology. Chapters: 8,9,13,18,22.

www.SID.ir