ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۵۰۰- ۴۹۳

# بیان پروتئین نوترکیب در بذر توتون

## Expression of recombinant protein in tobacco seeds

خدیجه باقری*[۱]، محمدرضا قزوینی[۱]، سید محمد حسینی[۱]

۱- به ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه زنجان

**Bagheri Kh*[1], Ghazvini MR[1], Hosseini SM[1]**

1. Assistant Professor, MSc Student, Graduated Student, University of Zanjan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۵- تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۹)

## چکیده

**از مهمترین عوامل محدودکننده تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، پایین بودن سطح بیان ژن انتقال یافته و همچنین خاموشی آن‌ها در نسل‌های متوالی است. انتخاب بافت مناسب گیاه و نیز بهبود تظاهر قطعه ژنی از روش-های افزایش بیان ژن منتقل شده به گیاه می‌باشد. در تحقیق حاضر، در راستای رسیدن به این هدف، با طراحی و ساخت سازه اختصاصی بذر و انتقال آن به گیاه توتون سعی شد تا ضمن بیان ژن *GUS* در بذر توتون، افزایش بیان این ژن را نیز شاهد باشیم. برای تهیه سازه، در بالادست ژن *GUS*، توالی‌های SS و KDEL به عنوان سیگنال نگهدارنده پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و در پایین دست ژن *GUS*، توالی MAR جهت جلوگیری از خاموشی ژن تعبیه شد و این قطعه تحت کنترل پیشبرنده اختصاصی بذر Napin قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگی توتون با سازه مذکور و با استفاده از اگروباکتریوم تراریخت شدند. تجزیه گیاهان باززایی شده در سطح DNA با PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *npt*II و *GUS* نشان‌دهنده انتقال این ژن‌ها به گیاهچه‌های باززایی شده بود. آزمون RT-PCR نیز جهت بررسی نسخه‌برداری از این ژن‌ها در بافت‌های برگی و بذری انجام و نتایج حاصل نشان داد که نسخه برداری از ژن *npt*II در هر دو بافت انجام شده در حالی‌که نسخه برداری از ژن *GUS* تنها در بذر صورت گرفت. این نتیجه با توجه به اینکه پیشبرنده NOS (کنترل کننده ژن *npt*II) یک پیشبرنده عمومی و Napin یک پیشبرنده اختصاصی بذر می‌باشد، مورد انتظار بود. در نهایت با استفاده از SDS-PAGE و آزمون هیستوشیمیایی GUS، بیان این ژن در بذر گیاهان گزینش شده مورد بررسی قرار گرفت. وجود باند تقریبا ۶۰kDa در گیاهان تراریخت و نیز نتایج حاصل از آزمون هیستوشیمیایی نشان‌دهنده بیان ژن *GUS* در بذور تراریخت توتون بود.**

**واژه‌های کلیدی**

**پیشبرنده**
**توالی القا کننده**
**ژن *GUS***
**پروتئین نوترکیب**
**توتون**

Archive of SID

## مقدمه

نیاز روز افزون به داروهای بیولوژیک و ارزش اقتصادی بالای آنها موجب شده استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورهای طبیعی در تولید داروهای بیولوژیک مورد توجه ویژه قرار گیرد. از مهمترین فواید و کاربردهای آن می‌توان به اقتصادی‌تر بودن آن 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 بیماری‌های مشترک انسان و دام و خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماری‌زای انسانی اشاره کرد (Daniell et al. 2001).

پایین بودن سطح بیان ژن منتقل‌شده و همچنین ناپایداری آن در نسل‌های متوالی از مهمترین عوامل محدودکننده مهندسی ژنتیک گیاهی است. برای رفع این محدودیت‌ها، استراتژی بیان پروتئین در بافت مناسب گیاه و نیز افزایش بیان و جلوگیری از خاموشی ژن منتقل شده با استفاده از توالی‌های تعبیه شده در سازه مورد توجه است. پروتئین‌های نوترکیب در اندام‌های مختلف گیاهی مثل برگ، بذر، بافت‌های ذخیره رویشی مثل غده تولید شده است. به چند دلیل بذور گیاهی برای تولید و ذخیره‌سازی پروتئین‌های نوترکیب بیشتر مورد توجه هستند. از جمله پایداری بیشتر پروتئین تولید شده و ذخیره‌سازی راحت‌تر آن نسبت به اندام‌های دیگر، محدود شدن تولید پروتئین نوترکیب به بذر و جلوگیری از اختلال در رشد اندام‌های دیگر، ایمنی زیستی بیشتر برای موجودات علف‌خوار و همچنین پایین بودن میزان ترکیبات فنولیک در بذر و نیز تخلیص راحت‌تر پروتئین از آنها موجب شده که به عنوان یک گزینه مناسب جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند (Bewley et al. 1994). تحقیقات گذشته نشان داده که در صورت استفاده از پیشبرنده بذری و سیگنال‌های نگهدارنده (SS[1] در ابتدای ژن و KDEL در انتهای ژن) پروتئین نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی بذر هدفگیری و بسته‌بندی می‌شود. بیان پروتئین نوترکیب را می‌توان با فرستادن آن به شبکه آندوپلاسمی تا ده برابر افزایش داد (Conrad and Fielder 1998).

یکی از مشکلات عمده در زمینه انتقال ژن، خاموشی ژن منتقل شده و ناپایداری آن در نسل‌های متوالی است. محققین به دنبال قطعاتی از DNA هستند که با قرار گرفتن در سازه ژنی، اطمینان از بیان آن را افزایش دهند. نواحی متصل شونده به ماتریکس داربست هسته که به اختصار S/MAR[2] خوانده می‌شوند از توالی های مطرح شده برای پذیرفتن این نقش هستند (Allen et al. 2000). حداقل دو مدل ارائه شده که از طریق آن MARها نقش خود را در جلوگیری از خاموشی ژن‌ها در مرحله نسخه‌برداری ایفا می کنند: ۱- از آنجاکه ژن‌های منتقل شده چندنسخه‌ای ممکن است انواع متفاوتی از برهمکنش‌های جفت شدگی DNA/DNA را متحمل شوند که می‌تواند منجر به خاموشی ژن شود، عناصر S/MAR با اتصال به ماتریکس هسته، از فعل و انفعالات جفت شدگی بین نسخه‌های ژن درج‌شده ممانعت می‌کنند (Allen et al. 2000) ۲- زمانی که چندین نسخه از ژن به حالت سیس در یک جایگاه وارد می‌شود، MARها به عنوان خاتمه‌دهنده رونویسی عمل کرده و از توسعه رونویسی از یک ژن به ژن دیگر جلوگیری می‌کند (Thompson et al. 2006).

هدف از این تحقیق افزایش بیان ژن *GUS* با استفاده از توالی‌های SS و KDEL و MAR در بذور گیاه توتون می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

ناقل‌های ژنی و سویه‌های باکتری

از باکتری *E.coli* سویه *Top10 F'* و ناقل pGEM®-T-Easy Vector برای همسانه‌سازی استفاده شد. برای تراریختی گیاهان از اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه *LBA4404* استفاده شد.

تکثیر سازه SS-*GUS*-KDEL-MAR و همسانه‌سازی آن در ناقل T- vector

برای تکثیر ژن *GUS* به همراه توالی SS در بالادست و KDEL و MAR در پایین دست (۱۸۱۲+۱۳۸:۱۹۵۰ bp) روش PCR با آغازگرهای اختصاصی (جدول۱) به کار گرفته شد. برای به دست آوردن دمای مناسب برای چسبیدن آغازگرها به الگو، در گرادیان دمایی ۵۸ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد امتحان شد.

[1] Signal peptide

[2] Matrix/scaffold attachment regions



Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن *GUS*

| توالی آغازگر پیشرو | | | |
|---|---|---|---|
| Forward:5-AT **TCTAGA ATG** GCTAACAAGTTGTTCTTGGTTTCTGCT<br>***Xba*I start codon Signal sequence**<br>ACTTTGGCTTTCTTCTTCTTGTTGACTAACGCT **TTACGTCCTGTAG**-3<br>*GUS* | | | |
| Tm: 81.8 | AT%= 60.7 | CG%=39.3 | ΔG=-146.8 |
| توالی آغازگر پس‌رو | | | |
| Reverse:5-T **GAGCTC** TTATTATCTCATTAAAA **TTA** TAGTTCATCCTT TTGTTTGCCTCCCTG-3<br>*Sac*I MAR Stop codon KDEL *GUS* | | | |
| Tm: 75.3 | AT%= 64.8 | CG%=35.2 | ΔG=-90.7 |

پس از تکثیر ژن *GUS*، واکنش اتصال به درون ناقل T- Easy Vector انجام، و محصول واکنش اتصال به *E.coli* سویه *TOP10F′* به روش شوک حرارتی منتقل شد. در نهایت باکتری‌های نوترکیب بر روی پلیت‌های LB حاوی X-Gal و IPTG و آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و تتراسایکلین انتقال یافت که کلونی‌های سفید و آبی رشد کردند. به منظور شناسایی کلنی‌های مثبت، بر روی کلنی‌های سفید رشد کرده در محیط انتخابی، Colony-PCR انجام گرفت. سپس کلون‌های مثبت انتخاب شده با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و تایید شدند. جهت اطمینان از صحیح بودن کلونی‌های شناسایی شده پس از توالی‌یابی قطعات DNA هدف، تجزیه‌های لازم با استفاده از نرم افزار BLAST و Clustal صورت پذیرفت.

تهیه سازه بیانی ژن *GUS* به همراه توالی‌های KDEL، MAR و SS ابتدا در ناقل بیانی pBI121، پیشبرنده اختصاصی بذر Napin جایگزین پیشبرنده CaMV35S شده و قطعه SS-*GUS*-KDEL-MAR با هضم آنزیمی از T-Vector جدا شده و واکنش اتصال قطعه جدا شده با ناقل pBI121 انجام شد و از PCR و هضم آنزیمی برای تایید صحیح بودن کلونینگ استفاده شد و سپس این سازه به اگروباکتریوم منتقل شد.

انتقال سازه ژنی و باززایی گیاهان تراریخت

ضدعفونی بذرهای توتون رقم *Xanthi* با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای جوانه زنی بذور از محیط MS در دمای ۲۶°C با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. بعد از تقریبا دو هفته، گیاهان رشد کرده و جوان‌ترین برگها با طول تقریبا ۴ سانتی‌متر برای تراریخت کردن انتخاب (که هرکدام از آن‌ها به ۸ تا ۱۰ قطعه تقسیم شدند) و جهت تلقیح آماده شدند. یک روز قبل از انجام آلودگی، تک کلنی‌های اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر در محیط ( + g/ml ۵۰ µLB) کانامایسین در دمای ۲۸°C و تاریکی کشت داده شد، وقتی که OD باکتری رشد کرده به ۱–۰/۵ رسید، در دمای ۴°C و دور $g \times$ ۳۵۰۰ به مدت ۸–۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خارج کردن محیط کشت باکتری (LB)، محیط تلقیح (MS مایع و هورمون‌های BAP با غلظت ۳ mg/l و NAA به مقدار ۰/۱ mg/l، به سلول‌های باکتری رسوب داده شده اضافه و سلول‌ها کاملا در آن حل شدند. بعد از آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰–۲۰ ثانیه در تماس با سوسپانسیون اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر (SS-*GUS*-KDEL-MAR) قرار گرفته و در پتری دیش‌های حاوی محیط هم کشتی (MS کامل و هورمون‌های BAP با غلظت ۳ mg/l و NAA به مقدار ۰/۱mg/l) به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۶°C در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعدی این ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت انتخابی (شامل محیط هم‌کشتی و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰–۲۵ µg/ml و سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ µg/ml) در دما و دوره نوری مشابه مرحله قبل به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. واکشت نمونه ها به فاصله هر ۱۵ روز یک‌بار انجام شد. برای طویل شدن نوساقه‌ها از محیط طویل شدن ساقه (MS کامل به‌همراه ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین) و برای ریشه‌زایی



Archive of SID
www.SID.ir

گیاهچه‌ها از محیط ریشه‌زایی (MS کامل به‌همراه ۰/۱ µg/ml هورمون NAA) استفاده شد. در مرحله آخر، گیاهان ریشه‌دار شده ابتدا به گلدان‌های حاوی پرلیت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) و سپس به خاک منتقل شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بذور جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخته جهت تجزیه‌های بعدی مورد استفاده قرارگرفت. بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح DNA از برگ‌های جوان گیاهان تراریخت و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، DNA ژنومی با روش Dellaporta et al. (1983) استخراج شد. سپس با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و ژن *GUS* واکنش PCR بر روی گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح RNA

برای بررسی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA از بافت‌های بذری و برگی با استفاده از محلول استخراج RNA (RNX-Plus – 25 ml RN7713C) تهیه شده از شرکت سیناژن، با کمی تغییر در زمان‌های نگهداری نمونه‌ها در محلول‌ها، انجام شد. ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، بوسیله کیت دو مرحله‌ای RT-PCR (Vivantis, RTPL12) انجام گرفت. قابل ذکر است که برای استخراج RNA، برداشت بذر از گیاهان PCR مثبت، ۲۰ روز پس از گلدهی انجام شد. همچنین برگ‌های مناسب نیز از گیاهان PCR مثبت انتخاب شدند. برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای مرحله قبل استفاده شد.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح پروتئین

برای بررسی بیان ژن در سطح پروتئین از روش SDS-PAGE استفاده شد و استخراج پروتئین کل از بذور گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) انجام گرفت.

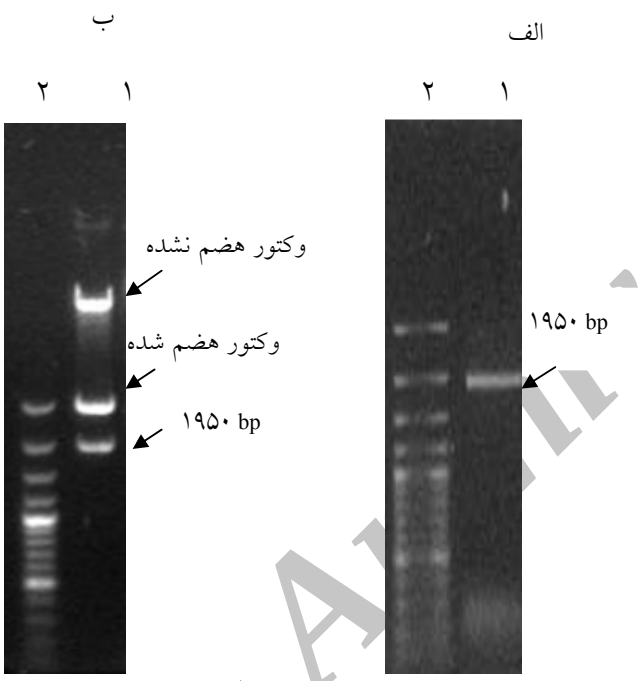
آزمون هیستوشیمیایی GUS

آزمون هیستوشیمیایی GUS نیز جهت تایید انتقال این ژن و بیان آن، برروی اگروباکتریوم، برگ و بذور گیاهان شاهد و تراریخت توتون، با روش Jefferson et al. (1987) صورت گرفت. آزمون مربوط به ریزنمونه‌های برگی به این شکل انجام شد که دو ریزنمونه از گیاهان شاهد و تراریخت تهیه شد و بعد از بین بردن کلروفیل‌ها، بیان این ژن توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای جدول ۱ انجام و نتیجه آن تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۹۵۰ bp بود. برای به دست آوردن دمای مناسب برای چسبیدن آغازگرها به الگو، در گرادیان دمایی ۵۸ تا ۶۵ درجه امتحان شد که مناسب‌ترین دما ۶۱/۹ درجه سانتی‌گراد بود.

بعد از تکثیر قطعه مدنظر، واکنش اتصال آن به T-Vector انجام شد و کلونینگ صحیح این قطعه با Colony PCR (شکل۱، الف) و هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد (شکل۱- ب).

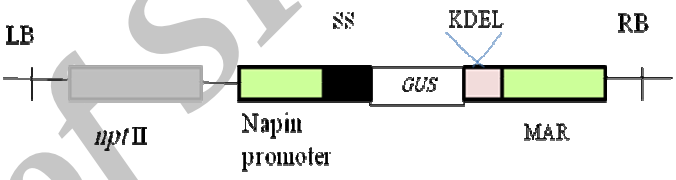



شکل۱- تایید کلونینگ با استفاده از PCR و هضم آنزیمی. الف: چاهک ۱) قطعه تکثیر یافته؛ چاهک ۲) DNA نشانگر؛ ب: چاهک ۱) قطعه جدا شده از پلاسمید با هضم آنزیمی؛ چاهک ۲) DNA نشانگر.

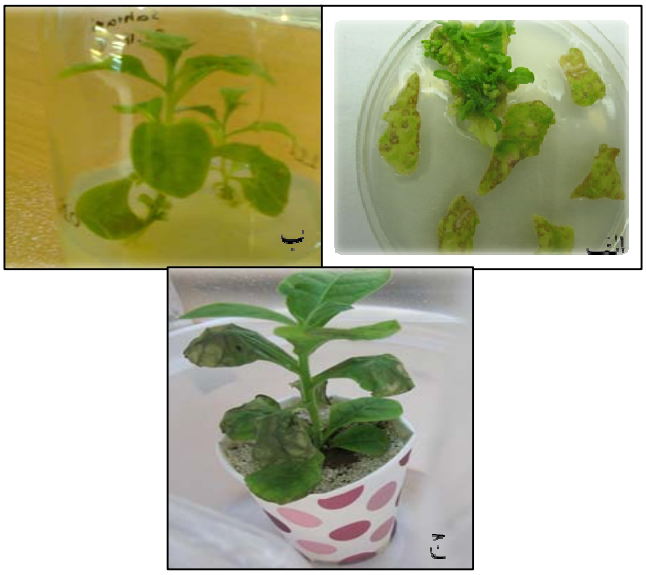
در مرحله بعد ساب کلونینگ این قطعه در ناقل بیانی pBI121 انجام شد و با PCR و هضم آنزیمی مشابه با مرحله قبل کلونینگ صحیح مورد تایید قرار گرفت و نهایتا سازه مدنظر ساخته شد (شکل۲).


Archive of SID
www.SID.ir

سازه تهیه شده (شکل۲) به روش انجماد و ذوب (Höfgen and Willmitzer (1988 به اگروباکتریوم منتقل و با روش Colony PCR تایید شد و از آن برای تراریختی ریزنمونه‌های برگی استفاده شد. جوانه های باززایی شده که در محیط انتخابی، سبز مانده بودند ابتدا به محیط رشد نوساقه (فاقد هورمون) منتقل و پس از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های حاوی پرلیت جهت سازگاری به شرایط محیط منتقل شدند. سپس گیاهان رشد یافته به گلدان‌های حاوی خاک، ماسه و خاک برگ منتقل شدند و تا زمان رسیدگی بذور در شرایط گلخانه نگهداری شدند (شکل۳). بذور گیاهان انتخاب شده حاصل از آنها (نسل T0) جمع‌آوری و جهت بررسی‌های بعد نگهداری شد.

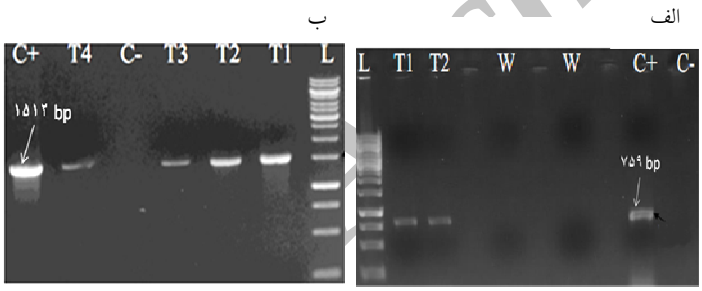



شکل۲- سازه حاوی پیشبرنده Napin، توالی Signal Sequence، ژن *GUS*، توالی KDEL و MAR که در ناقل pBI121 در بین دو ناحیه مرزی چپ (LB) و ناحیه مرزی راست(RB) قرار گرفته است.



شکل۳- باززائی و رشد نوساقه‌های گیاه توتون پس از تراریختی. الف) پیدایش و رشد جوانه‌های اولیه از ریزنمونه‌ها برروی محیط گزینشگر؛ ب) انتقال نوساقه به محیط طویل شدن ساقه؛ ج) انتقال گیاهچه به پرلایت و خاک.

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA و اطمینان از انتقال سازه هدف به گیاهان تراریخت، از DNA ژنومی برگ گیاهان نسل اول (T0) و شاهد (گیاه غیر تراریخت)، به عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی ژن *npt*II و ژن *GUS* در واکنش PCR استفاده شد و قطعه ۷۹۵ bp مربوط به ژن *npt*II و قطعه ۱۵۱۲ bp مربوط به ژن *GUS* در گیاهان تراریخت مشاهده شد در حالیکه در گیاهان شاهد باندی مشاهده نشد (شکل۴). لازم به ذکر است که اندازه ژن *GUS* برابر ۱۸۱۲ bp می‌باشد ولی از آنجا که دو آغازگر فوق در داخل ژن طراحی شده به همین دلیل اندازه قطعه تکثیر شده کوچکتر و برابر ۱۵۱۲ bp می‌باشد. قابل ذکر است که در تمام واکنش‌های PCR و RT-PCR برای کنترل مثبت از پلاسمید PBI121 حاوی سازه SS-*GUS*-KDEL-MAR به عنوان الگو و از حروف L و W به ترتیب برای نشان دادن نشانگر ۱ Kb و گیاه شاهد (غیرتراریخت) استفاده شده است. گیاهانی که نتیجه آزمون PCR آنها مثبت بود برای استخراج RNA از برگ و بذر انتخاب شدند. نتایج RT-PCR نشان داد که بیان ژن *npt*II به علت وجود پیشبرنده عمومی Nos در بذر (شکل۵- الف) و برگ (شکل ۵-ب) صورت می‌گیرد، ولی بیان ژن *GUS* به علت وجود پیشبرنده اختصاصی بذری Napin تنها در بذر گیاهان تراریخت مشاهده شد (شکل۶- الف) و در برگ گیاهان تراریخت مشاهده نشد (شکل۶- ب).



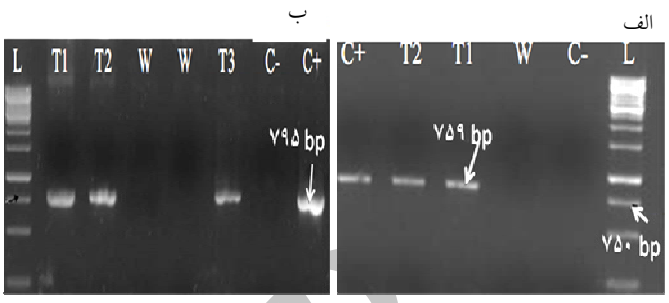

شکل۴- بررسی حضور ژن *npt*II (الف) و *GUS* (ب) در گیاهان باززائی شده با PCR. T1، T2، T3 و T4) گیاهان باززایی شده؛ C-) کنترل منفی؛ C+) کنترل مثبت؛ W) گیاهان شاهد.

تجزیه گیاهان تراریخت در سطح پروتئین و بررسی بیان ژن *GUS* نمونه پروتئین‌های استخراج شده از بذر گیاهان تراریخت و گیاه شاهد، با دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شدند. سپس نمونه‌های پروتئینی از نظر غلظت همتراز شده و برای تجزیه پروتئین مورد

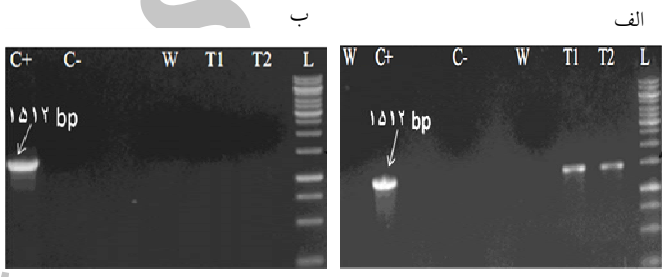


Archive of SID
www.SID.ir

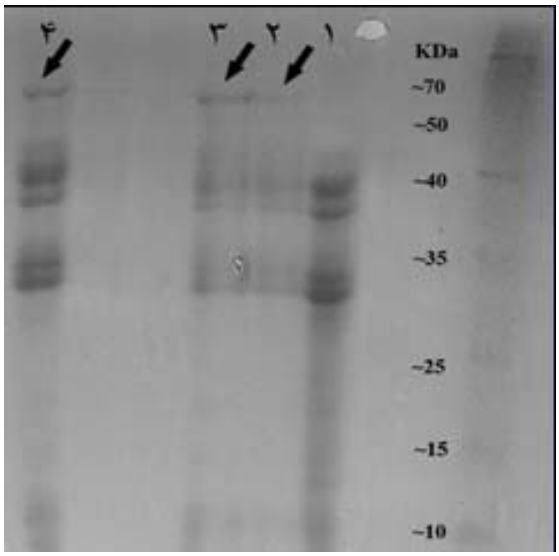
استفاده قرار گرفت. تجزیه SDS-PAGE بر روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت وجود یک قطعه اضافی مشخص با وزن ۶۰ kDa در مقایسه با گیاهان شاهد را نشان داد (شکل۷).




شکل۵- بررسی نسخه برداری از ژن *nptII* در بذر (الف) و در برگ (ب) گیاهان باززائی شده با RT-PCR. T1 ، T2 و T3) cDNA گیاهان باززایی شده؛ –C) کنترل منفی؛ +C) کنترل مثبت؛ W) گیاهان شاهد.

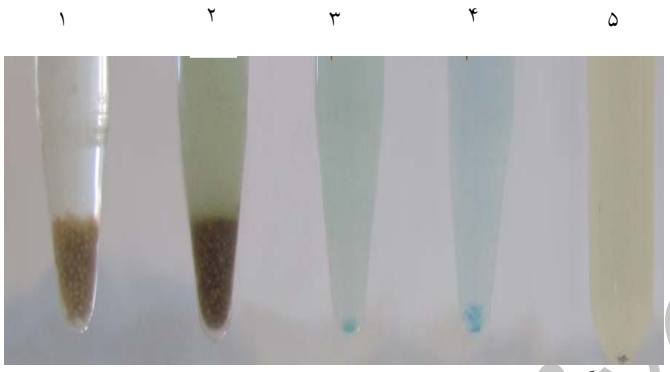



شکل۶- بررسی نسخه‌برداری از ژن *GUS* در بذر (الف) و در برگ (ب) گیاهان باززائی شده با RT-PCR. T1 و T2) cDNA گیاهان باززایی شده؛ – C) کنترل منفی؛ +C) کنترل مثبت؛ W) گیاهان شاهد.




شکل۷- الکتروفورز پروتئین‌های کل استخراج شده از بذر با SDS-PAGE؛ ۱) پروتئین استخراج شده از گیاه شاهد؛ ۲، ۳ و ۴) پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت.

آزمون هیستوشیمیایی GUS ابتدا با نمونه‌های اگروباکتریوم حاوی سازه SS-*GUS*-KDEL-MAR انجام شد. انجام این آزمون از این جهت حائز اهمیت بود که کارکرد صحیح محلول‌های مورد استفاده در آزمون هیستوشیمیایی و همچنین صحیح بودن مراحل انجام آزمون را به ما نشان داد. آزمون مربوط به بذر، بر روی نمونه‌های بذری شاهد و تراریخت صورت گرفت و بعد از ۲۴ ساعت نتایج مورد بررسی قرار گرفت. بذور تراریخت رنگ آبی را از خود نشان دادند ولی در بذور شاهد هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل۸). در نمونه‌های برگی هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد و این تایید دیگری بر بیان نشدن ژن *GUS* در برگ می‌باشد.




شکل۸- آزمون هیستوشیمیایی *GUS*. ۱) بذور گیاه شاهد؛ ۲) بذور گیاه تراریخت؛ ۳ و ۴) اگروباکتریوم حاوی سازه؛ ۵) اگروباکتریوم بدون سازه

ناقل بیانی PBI121 حامل ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی، پیش برنده CaMV 35S، توالی کد کننده آنزیم بتا-گلوکورونیداز (GUS) و ترمیناتور NOS می‌باشد. به منظور بیان ژن *GUS* در بذر گیاه، پیشبرنده ناپین (اختصاصی بذر) به جای پیشبرنده CaMV 35S جایگزین شد. این پیشبرنده علاوه بر اینکه بیان بالایی (۳۰–۲۰ درصد از پروتئین کل بذر) در بذر دارد، نتایج بدست آمده از تحقیقات قبلی نیز نشان می‌دهد که از این پیشبرنده می‌توان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در بذر گیاه استفاده کرد (Bagheri et al. 1389). قرارگیری توالی KDEL و SS در سازه به منظور هدفگیری محصول پروتئینی در شبکه آندوپلاسمی یکی دیگر از تدابیر انجام گرفته روی ناقل بیانی بود. پروتئین‌هایی که با استفاده از یک پروتئین نشانه جانوری یا گیاهی به یک مسیر ترشحی خاصی فرستاده می‌شوند، به میزان چند برابر بیشتر از


Archive of SID
www.SID.ir

پروتئین‌هایی که به سیتوپلاسم فرستاده می‌شوند تولید می‌شوند (Schouten et al. 2002). شبکه آندوپلاسمی یک محیط اکسید کننده برای پروتئین‌ها فراهم می‌کند. در این محل فراوانی بالایی از پروتئین‌های چپرونی مشاهده می‌شود و در عین حال میزان پروتئاز کمتری وجود دارد. این موارد از مهمترین عواملی است که بر روی پیچش و سرهم بندی پروتئین تاثیر می‌گذارند (Nuttall et al. 2002). همچنین از توالی MAR جهت جلوگیری از خاموشی ژن استفاده شد. نقش توالیهای MAR در جلوگیری از خاموشی ژن منتقل شده و همچنین افزایش بیان آن در مطالعات متعدد مورد بررسی و در برخی موارد تاثیر آن بسیار قابل توجه بوده است. در مطالعه‌ای که توسط Verma et al. (2005) انجام شده، ۷۷ برابر افزایش در بیان ژن خارجی مشاهده شد.

در گیاهان انتخاب شده بر سطح محیط کشت انتخابی، حضور ژن *GUS* و *npt*II با آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در گیاهان تراریخته اثبات شد. بررسی‌های تکمیلی و آزمون RT-PCR نسخه برداری از ژن *GUS* را در بذور گیاه توتون تایید کرد. نتایج حاصل از بررسی SDS-PAGE نشانگر بیان موفقیت آمیز پروتئین GUS در بذر گیاهان حاصل از سازه بود ولی گیاهان مختلف از نظر میزان بیان ژن متفاوت بودند. میزان بیان پروتئین یک ژن خارجی در گیاهان تراریخت بستگی کامل به تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده و جایگاه قرارگیری آن در ژنوم هسته‌ای دارد. در سلول گیاهی، این ژن درون ژنوم گیاه قرار گرفته و پس از تراریختی، امکان تکثیر ژن (افزایش تعداد نسخه‌ها) وجود ندارد، مگر اینکه در ابتدای تراریختی تعداد نسخه‌های کافی در جایگاه مناسب در درون کروموزوم قرار گیرند (Radke et al. 1992). لذا تفاوت در میزان بیان پروتئین GUS می‌تواند ناشی از تفاوت در جایگاه قرارگیری این ژن در ژنوم گیاه و یا تعداد متفاوت نسخه‌های ژن منتقل شده باشد. در مورد برخی از گیاهان تراریخت حاصل از سازه علی‌رغم اینکه نتایج PCR نشان دهنده تراریخت بودن آن‌ها بود ولی در نتایج SDS-PAGE تفاوتی با گیاه شاهد غیر تراریخت مشاهده نشد. این مسئله می‌تواند دلایل متعددی از جمله بیان بسیار پایین پروتئین GUS در گیاهان مذکور باشد به نحوی که توسط روش‌های مذکور قابل شناسایی نباشد (Esmaeili et al. 2006) و یا اینکه فقدان بیان ژن ناشی از نوترکیبی ممکن در ناحیه T-DNA باشد که منجر به تغییر ساختار ژن *GUS* شده باشد. با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS می‌توان به تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتر و تولید پروتئین فعال توسط ژن مربوطه، پرداخت (Jefferson et al. 1987). تغییر رنگ محلول حاوی بذور تراریخت و سویسترا، نشان دهنده بیان ژن و تولید موفق پروتئین مربوط به ژن *GUS* در سازه مربوطه می‌باشد. مجموعه آزمونهای انجام شده و نتایج حاصل نشان داد که ژن *GUS* به ژنوم گیاه توتون منتقل شده و نسخه برداری و ترجمه از آن صورت می پذیرد. امید است با تکمیل بررسی های بعدی در زمینه استخراج و استحصال، بتوان آن را با پروتئینی که از لحاظ پزشکی و غذایی با اهمیت است، جایگزین کرد و امکان تولید انبوه و ارزان یک پروتئین نوترکیب با ارزش را فراهم کرد.

## منابع

Allen GC, Spiker S, Thompson, WF (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. Plant Molecular Biology 43: 361-376.

Bagheri kh, Jalali javaran M, Mahboudi F, Moeini A, Zebarjadi A (1389) Designing and development of gamma interferon construct and expression of this protein in *brassica napus* seeds. Iranian Journal of Biology 2: 151-160. (In Farsi).

Bewley R, Black, M (1994) Seed: physiology of development and germination. Plenum Press, New York, USA.

Bhat SR, Srinivasan S (2002) Molecular and genetic analysis of transgenic plants: consideration and approaches. Plant Science 163: 673-81.

Conrad U, Fiedler, U (1998) Compartment-specific accumulation of recom binant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody product ion and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. Plant Molecular Biology 38: 101-109.

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. Journal of Molecular Biology 311: 1001-1009.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version III. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Esmaeili A, Jalali Javaran M, Rasaee M, Rahbarizadeh F, Rajabi Memari H (2006) Cloning and expression of recombinant camelid single-domain antibody in tobacco. Iranian Journal of Biotechnology 4: 162-168.



Archive of SID
www.SID.ir

Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Research 16: 9877.
Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW **(**1987**)** *GUS* fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. EMBO Journal 6: 3901-3907.
Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L, Ma JKC (2002) ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. European Journal of Biochemistry 269: 6042-6051.
Radke SE, Turner JC, Facciotti C (1992) Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 11: 499-505.
Schouten A, Roosien, J, Bakker J, Schots A (2002) Formation of disulfide bridges by a single-chain Fv antibody in the reducing ectopic environment of the plant cytosol. Journal of Biological Chemistry 277**:** 19339-19345.
Thompson WF, Spiker S, Allen GC (2006) Matrix attachment regions and transcriptional gene silencing. Annual Plant Reviews 29: 136-161.
Verma D, Verma M, Dey M, Jain RK, Wu R (2005) Molecular dissection of the tobacco Rb7 matrix attachment region (MAR): effect of 5′ half on gene expression in rice. Plant Science 169: 704-711.

Archive of SID


www.SID.ir