ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):627-633

Transient Expression of Recombinant PARS II Endonuclease Enzyme Using Agroinfiltration in Tobacco

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Farsi M.*[1] *PhD*,
Mirzaei M.[1] *MSc*,
Zolala J.[2] *PhD*

How to cite this article
Farsi M, Mirzaei M, Zolala J, Hamidoghli Y. Transient Expression of Recombinant PARS II Endonuclease Enzyme Using Agroinfiltration in Tobacco. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):627-633.

[1]Crop Biotechnology & Breeding Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Agricultural Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Correspondence
Address: Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Saqure, Mashhad, Iran. Postal Code: 9177948974
Phone: +98 (51) 38805777
Fax: +98 (51) 38807140
farsi@um.ac.ir

Article History
Received: December 13, 2016
Accepted: June 13, 2017
ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims The production of recombinant proteins in transgenic plants (molecular farming) is considered a functional aspect of genetic engineering. Unlike animal and bacterial cell-based production systems, proteins produced by plants are very safe and have low production costs due to the absence of common pathogens in humans and animals. The aim of this study was the transient expression of recombinant PARS II endonuclease enzyme using agroinfiltration in tobacco.

Materials & Methods In this experimental study, the possibility of producing a recombinant form of PARS II endonuclease was investigated, using transient expression system via Agrobacterium. The pBI-Pars expression construct (based on the binary vector pBI121) containing the full sequence of the PARS II encoder, upstream kozak, and a downstream 8x-His tag sequence, was infiltrated into *Nicotiana tabacum* leaves with Agroinfiltration method. After 72 hours, the expression of PARS II gene in agroinfiltrated leave samples was confirmed through Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and protein Dot-blot, using Anti-His antibody at the levels of mRNA and protein, respectively.

Findings The accuracy of the constructed expression construct was confirmed, and the results of Dot-blot by Anti-His antibody confirmed the expression of the recombinant PARS II protein, while no recombinant protein expression was observed in agroinfiltrated control plants with pBI121 construct. Significant amounts of recombinant PARS II nucleases were produced in tobacco leaves.

Conclusion Agroinfiltration is an effective and short-term method for mass production of pure recombinant PARS II nucleases in tobacco.

Keywords Single-Strand-Specific Nucleases; PARS II Endonuclease; Agroinfiltration; Tobacco

CITATION LINKS

[1] Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard ... [2] Enzymatic mutation detection ... [3] Screening human genes for small alterations ... [4] Development of a rapid, reliable genetic ... [5] Discovery of single-nucleotide mutations in ... [6] EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus ... [7] Plant comparative genetics ... [8] Detection of simple mutations and ... [9] Efficient discovery of DNA polymorphisms ... [10] TILLING: Practical single-nucleotide mutation ... [11] Differential integrity of TALE nuclease genes following ... [12] Efficient clinical scale gene modification ... [13] Single-strand-specific ... [14] Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm ... [15] Mutation detection using a novel ... [16] Characterization of Arabidopsis thaliana ... [17] Comparison of CEL I gene expression ... [18] Isolation, cloning and molecular characterization of genes ... [19] Overexpression of hydroperoxide lyase gene in Nicotiana ... [20] An Agrobacterium-mediated transient gene ... [21] pEAQ: Versatile expression vectors for easy ... [22] Optimization of transient Agrobacterium-mediated ... [23] Purification, cloning, and characterization ... [24] Appendix 1, Reagents and buffers. Molecular cloning: A laboratory ... [25] Identification and molecular mapping of a dwarfing gene in barley (Hordeam vulgare L.) and its correlation with ... [26] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye ... [27] Mutated nucleic acid of a CEL I-endonuclease and method for producing the ... [28] Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation ... [29] Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بیان موقت فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با روش آگروباینفیلتراسیون در گیاه توتون

محمد فارسی * PhD
گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
مهدیه میرزایی MSc
گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
جعفر ذوالعلی PhD
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده
اهداف: تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته (زراعت مولکولی)، یکی از جنبه‌های کاربردی مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود. پروتئین‌های تولیدشده توسط گیاهان بر خلاف سیستم‌های تولید مبتنی بر سلول‌های جانوری و باکتریایی به‌علت عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند و هزینه تولید پایینی دارند. هدف این پژوهش، بیان موقت فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با استفاده از روش آگروباینفیلتراسیون در گیاه توتون بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، امکان تولید فرم نوترکیب اندونوکلئاز PARS II با استفاده از سیستم بیان موقت به‌واسطه آگروباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت. سازه بیانی pBI-Pars (مبتنی بر ناقل دوگانه pBI121) حاوی توالی کامل رمزکننده PARS II، توالی کوتاه *کوزاک* در بالادست و توالی رمزکننده هشت آمینواسید هیستیدین در پایین‌دست ژن، ساخته و با روش آگروباینفیلتراسیون به برگ‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) تزریق شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، بیان ژن مورد نظر در نمونه‌های آگروباینفیلتره‌شده با واکنش RT-PCR و بلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضدهیستیدین به‌ترتیب در سطح mRNA و پروتئین انجام شد.
یافته‌ها: صحت سازه بیانی ساخته‌شده تایید شد و نتایج بلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضدهیستیدین، بیان پروتئین نوترکیب PARS II را مورد تایید قرار داد، در حالی که هیچ نشانی از بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان شاهد آگروباینفیلتره‌شده با سازه pBI121 مشاهده نشد. مقادیر قابل توجهی از نوکلئاز نوترکیب PARS II در برگ‌های توتون تولید شد.
نتیجه‌گیری: روش آگروباینفیلتراسیون یک روش موثر و کوتاه‌مدت برای تولید انبوه نوکلئاز خالص نوترکیب PARS II در گیاه توتون است.
کلیدواژه‌ها: نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته، اندونوکلئاز PARS II، آگروباینفیلتراسیون، توتون

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۳
*نویسنده مسئول: farsi@um.ac.ir

مقدمه

شناسایی تغییرات ناشناخته DNA اعم از چندشکلی‌ها و جهش‌ها، در بسیاری از عرصه‌های تحقیقات ژنتیک از جنبه‌های مختلف حایز اهمیت است. تکنیک‌های غربالگری متعددی همچون تعیین توالی قطعات DNA، آزمون Taq-man، استفاده از شعاع نور مولکولی (molecular beacons) در Real time-PCR، آزمون اتصال الیگونوکلئوتید، چیپ‌های DNA و ریزآرایه‌ها برای آشکارسازی جهش‌های ژنتیکی محدود ابداع شده است، ولی هیچ یک از این روش‌ها نتوانسته‌اند هم از بُعد سادگی و هم از نقطه‌نظر حساسیت، انتظارات غربالگر را برآورده سازند[1]. با این حال، تکنیک هضم آنزیمی به‌واسطه جفت‌شدگی ناجوربازها (EMC) توانسته است تمام معیارهای یک روش غربالگری ایده‌آل را به‌صورت بالقوه برآورده سازد. این روش بسیار انعطاف‌پذیر و با قابلیت استفاده گسترده بوده و مبتنی بر فعالیت گروهی از نوکلئازهای خانواده S1/P1 تحت عنوان نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته (SSS) است. این آنزیم‌ها قادر به برش مولکول‌های DNA جهش‌یافته در محل لوپ هترودوپلکس هستند و با عملکرد بسیار مطلوب در شرایط آزمایشگاه، محققان را قادر می‌سازند که ضمن کشف یک جهش یک یا چندنوکلئوتیدی به مکان آن نیز در قطعه DNA مورد نظر پی ببرند[2].

در حال حاضر، محققان از این تکنیک برای تشخیص جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی و درج و حذف‌های کوچک در جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک پزشکی شامل پیداکردن آلل‌های جهش‌یافته مرتبط با بیماری‌های لاعلاج نظیر سرطان[3]، تفسیر وقایع مولکولی عامل ناهنجاری‌های ژنتیکی[4]، شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کیفی[5, 6]، اصلاح مبتنی بر نشانگرهای مولکولی[7]، تعیین تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیک[8]، پروژه‌های هدف‌قراردادن آسیب‌های موضعی القاشده در ژنوم‌ها (TILLING)، اکوتیلینگ[9, 10] و ردیابی جهش‌های القاشده توسط نوکلئازهای مهندسی‌شده‌ای همچون زینک‌فینگر نوکلئازها (ZFNs)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs) و تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (CRISPR/Cas) [11, 12] استفاده می‌نمایند.

نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از منابع متعددی شامل میکروارگانیزم‌ها، گیاهان و جانوران جداسازی شده‌اند. خصوصیات برخی از این آنزیم‌ها از قبیل نوکلئاز S1 *آسپرژیلوس اوریزا* (*Aspergillus oryzae*)، نوکلئاز P1 *پنیسیلیوم سیترینوم* (*Penicillium citrinum*)، نوکلئاز BAL31 *آلتروموناس اسپژیانا* (*Alteromonas espejiana*)، نوکلئاز مانگ‌بین و نوکلئاز میکروکوکسال *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) به‌خوبی مورد بررسی قرار گرفته است و اکنون به‌صورت تجاری در دسترس هستند[13]. البته فعالیت این نوکلئازها در شناسایی لوپ‌های کوچک روی ژل آکریل‌آمید قابل ردیابی نیست[14]. در تکنیک EMC، اندونوکلئازهای گیاهی اختصاصی تک‌رشته از قبیل نوکلئازهای CEL و ENDO تاکنون بیش از بقیه مورد توجه و استفاده قرار گرفته‌اند. نوکلئازهای CEL I و CEL II (نام تجاری ®Surveyor ؛ IDT؛ ایالات متحده) و ENDO1 روی DNA و RNA تک‌رشته‌ای فعال هستند. این نوکلئازها تشکیل دایمر نمی‌دهند و تنها یک رشته DNA در انتهای سه لوپ هترودوپلکس را برش می‌دهند[5, 15, 16].

شناسایی فعالیت‌های آنزیمی جدید در عصاره‌های مختلف گیاهی و توصیف آنزیم‌های متناظر، دانش موجود در مورد ساختار و مکانیزم عمل این گروه آنزیمی را افزایش داده است و ابزارهای جدید با ویژگی‌های عملکردی جدید را به خزانه آنزیمی مورد استفاده در تحقیقات غربال جهش اضافه می‌نماید. در این راستا، *ذوالعلی* و همکاران فعالیت اندونوکلئازی قوی‌تر عصاره آنزیمی گیاه جعفری را در مقایسه با گیاه کرفس (منبع دو آنزیم CEL I و CEL II) در برش DNA هترودوپلکس گزارش نموده‌اند[17]. پس از آن، *میرزایی* و همکاران، توالی‌های ژنی مربوط به دو اندونوکلئاز PARS I و PARS II را از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*) جداسازی نموده‌اند. میان کلیه نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته، نوکلئاز PARS II با داشتن ۹۵% همولوژی، بیشترین شباهت ترادف را نسبت به نوکلئاز CEL II نشان داده است. مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ساختار مولکولی نشان داده است که

Archive of SID
www.SID.ir

این نوکلئاز می‌تواند به‌عنوان رقیبی ارزشمند برای اندونوکلئاز CEL II مطرح باشد[18].

تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته (زراعت مولکولی)، یکی از جنبه‌های کاربردی مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود. پروتئین‌های تولیدشده توسط گیاهان بر خلاف سیستم‌های تولید مبتنی بر سلول‌های جانوری و باکتریایی، به‌علت عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند و هزینه تولید پایینی دارند[19]. استفاده از *آگروباکتریوم تومفاسینس* (*Agrobacterium tumefaciens*) برای بیان اپی‌کروموزومی پروتئین‌های هترولوگ از طریق تزریق سوسپانسیون باکتریایی در بافت‌های برگی تازه، اصطلاحاً آگروایانفیلتراسیون نامیده می‌شود. این روش، نوعی سیستم بیان موقت است که می‌توان با استفاده از آن، پروتئین خارجی را در مدت کوتاه چند روز پس از ورود آگروباکتریوم به بافت گیاهی تولید نمود[20, 21]. در این روش نیازی به باززایی گیاهان تراریخته از کالوس نیست و از آنجایی که ژن مورد نظر در ژنوم درج نخواهد شد، بیان تحت تاثیر اثر مکانی قرار نخواهد گرفت. همچنین این روش، برای ایجاد امکان بیان ژن در گونه‌هایی کاربرد دارد که دستورالعمل باززایی گیاه یا ترانسفورماسیون پایدار در آنها استقرار پیدا نکرده یا مواردی که هدف، بیان یک پروتئین سمی است[20, 22].

تعیین مکانیزم فعالیت و ترجیح سوبسترایی نوکلئاز PARS II مستلزم بررسی فعالیت نمونه خالص طبیعی یا نوترکیب آن روی سوبسترای DNA هترودوپلکس است. با توجه به بازده پایین روش‌های خالص‌سازی موجود[15, 23]، این پژوهش به‌منظور زمینه‌سازی برای تولید فرم نوترکیب این نوکلئاز انجام گرفت. بنابر مطالب ذکرشده، هدف پژوهش حاضر بیان موقت فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با استفاده از روش آگروایانفیلتراسیون در گیاه توتون بود.

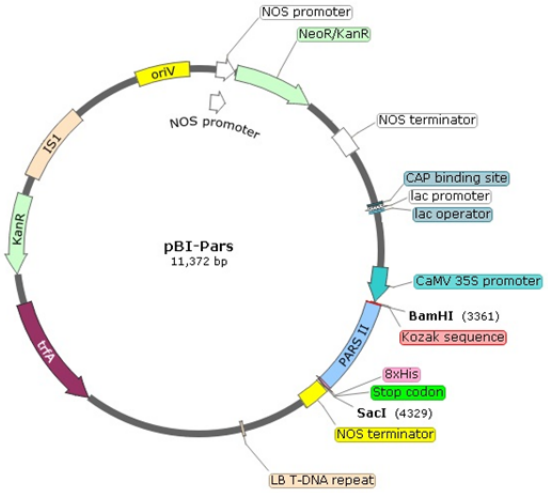
مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، به‌منظور ساخت سازه بیانی pBI-Pars مبتنی بر پلاسمید ناقل دوگانه pBI121، توالی کامل رمزکننده نوکلئاز PARS II (شماره دستیابی JN974459 در بانک ژن) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PII-F و PII-R-full (جدول ۱)، آنزیم پلیمراز Pfu (Bioron؛ آلمان) و پلاسمید نوترکیب pTZ-ParsII به‌عنوان الگو[18] تکثیر شد. آغازگر رفت به‌نحوی طراحی شد که دارای جایگاه برشی *BamHI* و توالی *کوزاک*[24] درست قبل از کدون شروع باشد. همچنین به‌ترتیب، توالی رمزکننده ۸ آمینواسید هیستیدین برای تسهیل خالص‌سازی آنزیم نوترکیب از طریق کروماتوگرافی تمایلی، کدون خاتمه و جایگاه برشی *SacI* در آغازگر برگشت تعبیه شد و شماتیک بیان ساخته‌شده با استفاده از نرم‌افزار SnapGene 3.3.2 رسم شد (شکل ۱). طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 3.5 انجام شد. با توجه به حضور توالی سیگنال پپتید (۲۲ آمینواسید) در انتهای آمینی نوکلئاز PARS II، نیازی به اضافه‌کردن سیگنال ترشحی نبود. قطعه تکثیرشده (۹۶۸ نوکلئوتید) پس از هضم آنزیمی و انجام واکنش اتصال، جایگزین توالی رمزکننده آنزیم بتاگلوکورونیداز (*GUS*) شد. با انتقال پلاسمید ناقل به سلول‌های باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویه DH5-α، صحت سازه بیانی با استفاده از واکنش‌های هضم آنزیمی و PCR با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای طراحی‌شده از نواحی پروموتور CaMV-35s (pBI-F) و ترمیناتور نوپالین‌سنتاز (pBI-R؛ جدول ۱) مورد تایید قرار گرفت. نهایتاً با تایید صحت سازه بیانی ساخته‌شده از طریق توالی‌یابی، پلاسمید نوترکیب pBI-Pars با استفاده از روش انجماد- ذوب به سلول‌های آگروباکتریوم در سویه GV3101 انتقال داده شد.

جدول ۱) توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	طول قطعه مورد نظر (جفت‌باز)	توالی ´۵ به ´۳
PII-F	۹۶۸	TAT CGT GGA TCC GGG AAT GGG TAT GTT GAC TTA TAC
PII-R-full	۹۶۸	GGT GGT GAG CTC TTA ATG GTG ATG GTG GTG ATG GTG ATG CAC TAT TTC AAT ATT GTT AC
pBI-F	۱۱۶۵	GAT GTG ATA TCT CCA CTG AC
pBI-R	۱۱۶۵	TGA TAA TCA TCG CAA GAC CG

جایگاه آنزیم‌های برشی با خط مشخص شده است



شکل ۱) تصویر شماتیک از سازه بیانی ساخته‌شده با استفاده از نرم‌افزار SnapGene Nos promoter: پروموتر ژن نوپالین‌سنتاز، Nos terminator: ترمیناتور ژن نوپالین‌سنتاز، CaMV 35s: پروموتر ویروس موزاییک گل‌کلم، Kozak sequence: توالی افزایش‌دهنده بیان (GCAACA)، 8xHis: برچسب هیستیدین و Stop codon: کدون خاتمه TAA است

تهیه مایه تلقیح و انجام آگروایانفیلتراسیون: کلونی آگروباکتریوم واجد ناقل نوترکیب در محیط کشت لیزوژنی‌براث (LB) مایع (۱۰گرم در لیتر تریپتون، ۱۰گرم در لیتر سدیم‌کلرید و ۵گرم در لیتر عصاره مخمر) [25] حاوی ۵۰میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین، کشت و در شیکر انکوباتور با شرایط ۱۸۰دور در دقیقه و دمای ۲۸°C به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ ۲۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۱۲دقیقه رسوب داده شدند و بلافاصله در محلول اینفیلتراسیون شامل ۱۰میلی‌مولار کلریدمنیزیم ($MgCl_2$)، ۱۰میلی‌مولار مورفولینواتان سولفونیک‌اسید (MES) با pH برابر با ۵/۶ و ۱۵۰میکرومولار استوسرینگون تا رسیدن به ۰/۵ در دانسیته نوری ۶۰۰ رقیق شدند. سلول‌های آگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی ناقل pBI121 نیز به‌صورت جداگانه برای تزریق به گیاهان شاهد به روش ذکرشده آماده شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی حاصل پس از ۲ ساعت قرارگرفتن در دمای اتاق، با استفاده از سرنگ یک‌میلی‌لیتری فاقد سوزن به پشت برگ‌های توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) در سن ۶هفتگی تزریق شدند (شکل ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

سپس گیاهان با محفظه پلاستیکی پوشانده و در اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۳±۲°C و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. روز بعد محفظه پلاستیکی حذف شد و گیاهان به‌مدت حداقل دو روز دیگر در همان محیط باقی ماندند.

تعیین مکانیزم فعالیت و ترجیح سوبسترایی نوکلئاز PARS II مستلزم تولید فرم خالص نوترکیب و تعیین مکانیزم فعالیت آن روی سوبسترای DNA هترودوپلکس است. لذا در این مطالعه با استفاده از سیستم بیان موقت مبتنی بر آگروباینفیلتراسیون، امکان تولید فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II در سیستم گیاهی بررسی شد. در ابتدا به‌منظور ساخت سازه بیانی pBI-Pars، توالی کامل رمزکننده *PARS II* به‌همراه توالی کوتاه *کوزاک* در بالادست و توالی رمزکننده ۸ آمینواسید هیستیدین در پایین‌دست ژن، جایگزین توالی *GUS* در ناقل دوگانه pBI121 شد (شکل ۱). برای اطمینان از صحت توالی، سازه ژنی به‌دست‌آمده براساس آغازگرهای pBI-F/pBI-R توالی‌یابی شد.

شکل ۲) اگروباینفیلتراسیون برگ‌های توتون با استفاده از سرنگ بدون سوزن؛ a) ایجاد خراش کوچک با سوزن در پشت برگ، b, c) تزریق سوسپانسیون باکتریایی در محل خراش به درون بافت پارانشیم برگ

استخراج RNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR): پس از گذشت ۷۲ ساعت از آگروباینفیلتراسیون و اطمینان از بیان ژن، RNA کل با استفاده از کیت استخراج ستونی (دنازیست؛ ایران) از نمونه‌های بافت برگی، استخراج و پس از تیمار با DNaseI (Thermo Scientific؛ ایالات متحده)، رشته اول cDNA با استفاده از یک‌میکروگرم RNA کل و کیت سنتز cDNA رشته اول معکوس (Thermo Scientific؛ ایالات متحده)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. سپس واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و تمام واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل T1 (Biometra؛ آلمان) انجام گرفت.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش بلات نقطه‌ای: از آنجایی که نسخه‌برداری از یک ژن همواره به‌معنی ترجمه و تولید پروتئین متناظر آن نیست، از آزمون بلات نقطه‌ای برای تایید ترجمه ژن *PARS II* استفاده شد. نمونه‌های یک‌گرمی از برگ‌های اینفیلتره‌شده در ازت مایع پودر شدند و پس از اضافه‌کردن ۳میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۱۰۰میلی‌مولار تریس هیدروکلراید با pH برابر با ۸، ۱۰میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید (EDTA) با pH برابر با ۸، ۰/۵% بتامرکاپتواتانول و ۱۵۰میکرومولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF) و سپس سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴°C، فاز رویی برداشته شد. غلظت کل پروتئین خالص‌شده با آزمون *بردفورد*[26] و با استفاده از پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد تخمین زده شد.

مقادیر یکسان جرمی از نمونه‌های پروتئینی استخراج‌شده روی کاغذ نیتروسلولزی لکه‌گذاری شدند. پس از خشک‌شدن در دمای اتاق، کاغذ به‌مدت یک ساعت در محلول BSA ۱% و در دمای ۳۷°C، به‌منظور بلوکه‌کردن نواحی غیراختصاصی قرار داده شد. با انجام سه مرحله شست‌وشوی ۵دقیقه‌ای با بافر نمکی فسفات-توئین (PBS-T)، آنتی‌بادی مونوکلونال ضدهیستیدین متصل به آنزیم هورس‌رادیش‌پراکسیداز (HRP؛ Sigma؛ ایالات متحده) با غلظت ۱:۱۰۰۰ به کاغذ نیتروسلولزی اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. مجدداً سه مرحله شست‌وشوی ۵دقیقه‌ای انجام گرفت و نهایتاً در حضور سوبسترای رنگی دی‌آمینوبنزیدین (DAB) و پراکسیدهیدروژن، بیان پروتئین مورد نظر بررسی شد. از نمونه پروتئین پوششی ویروس موزاییک توتون یا تنباکو (TMV) خالص‌شده از ستون کروماتوگرافی نیکل (مقاله منتشرنشده) و پروتئین استخراج‌شده از برگ گیاه شاهد، به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

یافته‌ها

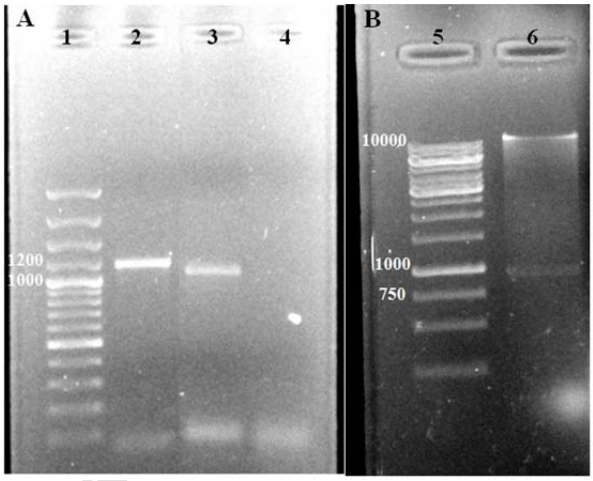
با استخراج پلاسمید از باکتری‌های ترانسفورم‌شده و انجام آزمایشات PCR با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱)، تکثیر باندهای منطبق بر اندازه مورد نظر، صحت سازه بیانی ساخته‌شده را مورد تایید قرار داد (شکل A-۳). همچنین واکنش هضم با استفاده از ترکیب دو آنزیم برشی *Sac*I و *Bam*HI روی نمونه‌های پلاسمید تاییدشده در واکنش PCR انجام و قطعات برش‌یافته منطبق بر اندازه مورد نظر مشاهده شدند (شکل B-۳). نتایج توالی‌یابی، میزان ۱۰۰% همولوژی با توالی ژن *PARS II* (شماره دستیابی JN974459 در بانک ژن) را نشان داد.

با تکثیر قطعه ۹۶۸جفت‌بازی از cDNA حاصل از mRNA

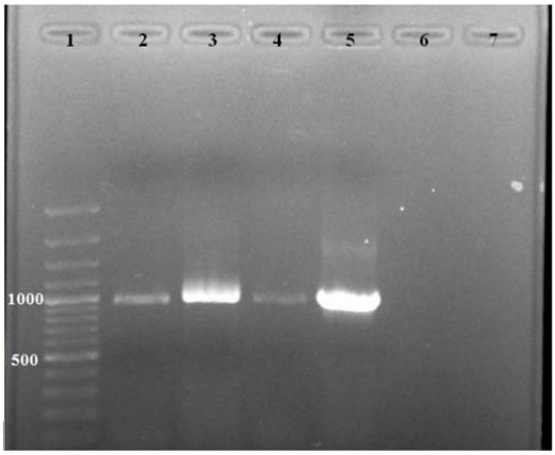
Archive of SID
www.SID.ir

نمونه‌های آگروواینفیلتره‌شده با سازه pBI-Pars، رونوشت‌برداری از ژن به اثبات رسید (شکل ۴).

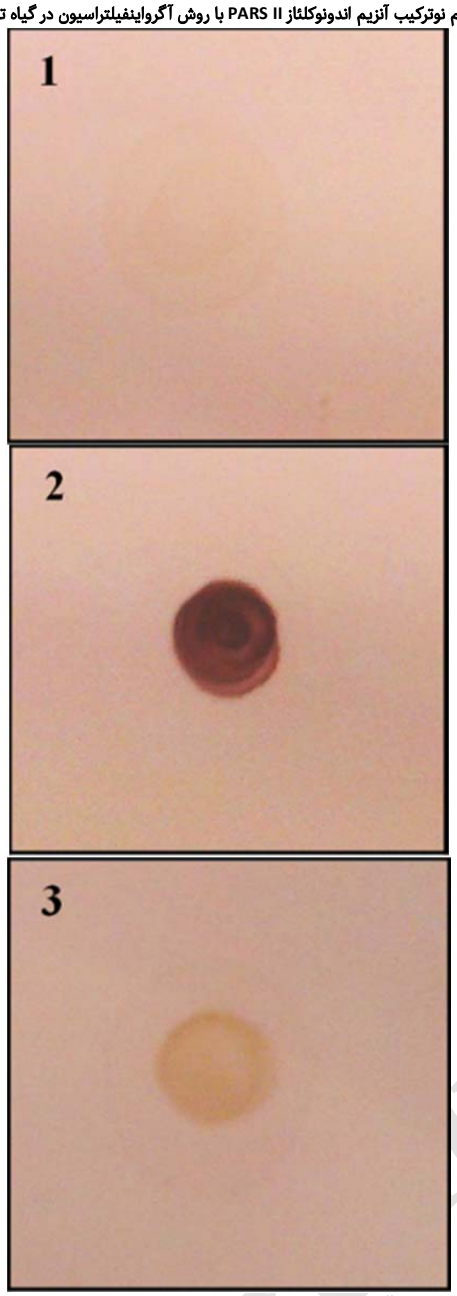
نتایج بلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضدهیستیدین، بیان پروتئین نوترکیب PARS II را مورد تایید قرار داد، در حالی که هیچ نشانی از بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان شاهد آگروواینفیلتره‌شده با سازه pBI121 مشاهده نشد (شکل ۵). مقادیر قابل توجهی از نوکلئاز نوترکیب PARS II در برگ‌های توتون تولید شد که نشان‌دهنده صحت سازه بیانی ساخته‌شده و موفقیت روش آگروواینفیلتراسیون برای بیان کارآمد و سریع نوکلئاز بود.



شکل ۳) الکتروفورز محصولات واکنش PCR و هضم آنزیمی نمونه‌های پلاسمید با آنزیم‌های *Sac*I و *Bam*HI به‌منظور تایید پلاسمیدهای ناقل (A) الکتروفورز محصولات واکنش PCR؛ تکثیر قطعه منطبق بر اندازه مورد نظر (۱۱۶۵جفت‌باز) در چاهک ۲ با استفاده از آغازگرهای pBI-F/pBI-R و قطعه منطبق بر اندازه مورد نظر (۱۰۸۵جفت‌باز) با استفاده از آغازگرهای PII-R-pBI-F/full در چاهک ۳ مبین حضور قطعه مورد نظر در پلاسمید ناقل pBI-Pars بود؛ چاهک ۱ نشانگر مولکولی ۱۰۰جفت‌بازی (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) و چاهک ۴ نشانگر کنترل منفی است؛ B) هضم آنزیمی نمونه‌های پلاسمید با آنزیم‌های *Sac*I و *Bam*HI به‌منظور تایید پلاسمیدهای ناقل، چاهک ۵ نشانگر مولکولی یک‌کیلوبازی (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) است؛ قطعات برش‌یافته منطبق بر اندازه‌های مورد نظر (۹۶۸جفت‌بازی+۱۰۴۰۰جفت‌بازی) در چاهک ۶، حضور پلاسمید ناقل را مورد تایید قرار داد)



شکل ۴) تایید رونویسی ژن *parsII* در برگ‌های اگروواینفیلتره‌شده توتون با واکنش RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PII-F/PII-R-full؛ چاهک ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰جفت‌بازی، چاهک ۴-۲: سطح نسبی بیان در نمونه‌های اگروواینفیلتره‌شده با سازه pBI-Pars، چاهک ۵: کنترل مثبت (پلاسمید خالص‌شده pBI-Pars به‌عنوان الگو)، چاهک ۶: گیاه شاهد و چاهک ۷: کنترل منفی (بدون الگو)



شکل ۵) نتیجه آزمون بلات نقطه‌ای به‌منظور ردیابی بیان پروتئین نوترکیب PARS II؛ ۱: گیاه شاهد، ۲: کنترل مثبت (نمونه خالص‌شده پروتئین پوششی ویروس TMV دارای برچسب هیستیدین)،۳: گیاه آگروواینفیلتره‌شده با سازه بیانی pBI-Pars

بحث

پژوهش حاضر با هدف بیان موقت فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با استفاده از روش آگروواینفیلتراسیون در گیاه توتون انجام شد. دستیابی به آنزیم‌های نوترکیب با قابلیت خالص‌سازی آسان، گامی بزرگ در راستای تولید آنزیم‌های ارزشمند و ایجاد امکان تولید تجاری آنها است. تاکنون تلاش‌های زیادی در زمینه تولید نوترکیب مهم‌ترین نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس انجام گرفته است. از جمله می‌توان به تولید نوکلئاز CEL I نوترکیب در سیستم‌های بیان مخمر[27]، سیستم باکولوویروس[28]، و آگروواینفیلتراسیون[29]، تولید نوکلئاز SPI نوترکیب در سیستم باکولوویروس[28]، تولید نوکلئاز ENDO1 نوترکیب از طریق آگروواینفیلتراسیون[16] و تولید نوکلئاز CEL II نوترکیب در لارو کرم ابریشم[14] اشاره کرد.

Archive of SID
www.SID.ir

علی‌رغم پُرطرفداربودن سیستم‌های باکتریایی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، به‌دلیل ماهیت گلیکوپروتئینی اغلب نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته در حالت فعال، تولید این نوکلئازها در سیستم‌های پروکاریوتی با موفقیت همراه نبوده است. به‌عنوان مثال، تلاش‌های اولیه *تریکوز* و همکاران به‌منظور بیان ENDO1 و CEL I در سیستم پروکاریوتی *اشریشیا کلی* با موفقیت همراه نبوده و حتی پس از موفقیت نیز، پروتئین به‌دست‌آمده، فعالیت نوکلئازی نشان نداده است[16]. همچنین *پیمکین* و همکاران، در تولید CEL I نوترکیب در سیستم‌های بیان پروکاریوتی موفق نبوده‌اند[28]. از سوی دیگر، تلاش‌های انجام‌شده برای تولید فرم نوترکیب از طریق بیان پایدار به‌دلیل سمی‌بودن این نوکلئازها برای گیاه با موفقیت همراه نبوده است. لذا در حال حاضر، تکنیک‌های بیان موقت به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای بررسی و ارزیابی فرم نوترکیب اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته و تولید تجاری آنها محسوب می‌شوند.

مطالعات متعددی مبنی بر کارآمدبودن روش آگروانفیلتراسیون برای تولید نوترکیب اندونوکلئازهای خانواده S1/P1 گزارش شده است. به‌عنوان مثال، *تریکوز* و همکاران با آگروانفیلتراسیون توام ENDO1 و p19 (نوعی پروتئین ویروسی به‌منظور ممانعت از خاموشی ژن) در برگ‌های توتون *نیکوتیانا بنتامیانا* (*Nicotiana benthamiana*) به حد بالایی از بیان دست یافته‌اند. از ۱۰گرم ماده گیاهی، آنزیم کافی برای انجام بیش از میلیون‌ها آزمایش تشخیص جهش به دست آمده است. ENDO1 خالص‌شده خام از ثبات بالایی برخوردار بوده است و توانسته‌اند آن را به‌مدت حداقل چهار ماه در دمای ۲۰°C- نگهداری نمایند. به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت، این محققان توصیه کرده‌اند که آنزیم نشاندارشده با هیستیدین با استفاده از ستون دارای نیکل (Ni-NTA) خالص‌سازی شود. آنزیم ENDO1 خالص‌شده و نشاندار با هیستیدین، بسیار باثبات بوده است و می‌توان آن را به‌مدت دو سال در دمای ۸۰°C-، یک سال در دمای ۲۰°C- یا بیش از چهار ماه در دمای ۴°C نگهداری نمود. ENDO1 تولیدشده به‌طور موفقیت‌آمیزی در تشخیص جهش‌ها در ژنوم‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته و از ENDO1 نوترکیب حاصل به‌منظور تشخیص جهش ژنتیکی شناخته‌شده G1691A در ژن فاکتور V که اغلب همراه با فعال‌شدن مقاومت پروتئین C به‌عنوان نوعی فاکتور خطر در بیماری ترومبوز وریدی است، با موفقیت استفاده شده است[16].

همچنین با استفاده از روش آگروانفیلتراسیون، آنزیم CEL I نوترکیب توسط *بندامان* و همکاران در برگ‌های *نیکوتیانا بنتامیانا* بیان و آنزیم نوترکیب تولیدشده با استفاده از روش رسوب‌دهی سولفات‌آمونیوم از عصاره برگ‌های توتون خالص‌سازی شده است. این محققان اظهار داشته‌اند که CEL I نوترکیب به‌دست‌آمده، کمیت و کیفیت بسیار بالاتری نسبت به CEL I غیرنوترکیب داشته و سنجش ترجیح سوبسترایی نوکلئاز نوترکیب به‌دست‌آمده نشان داده است که این آنزیم می‌تواند تمام انواع لوپ‌های جفت‌شدگی ناجور را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالاتر نسبت به CEL I خالص‌شده از ساقه کرفس شناسایی کند و برش دهد. همچنین این آنزیم توانست لوپ‌های T/T را که به‌ندرت توسط CEL I غیرنوترکیب شناسایی می‌شوند، تشخیص دهد[29].

بررسی فعالیت نوکلئازهای تولیدشده نشان داده است که روش‌های نوترکیب، علاوه بر تولید مقادیر زیاد آنزیم در مدت‌زمان کم، نوکلئازهایی با خواص آنزیمی بهتر تولید می‌کنند. لذا روش‌های تولید نوترکیب، جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های خالص‌سازی موجود خواهند بود. از آنجایی که نوکلئاز PARS II، شباهت بالایی به آنزیم اصلی کیت‌های Surveyor® برای تشخیص جهش آنزیم CEL II (IDT؛ ایالات متحده) نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که فرم نوترکیب این آنزیم نیز بتواند به‌طور موثری لوپ‌های DNA هترودوپلکس را شناسایی کند و برش دهد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به کمیت پایین پروتیین تخلیص‌شده به‌منظور استفاده در مقیاس تجاری اشاره نمود. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای به حداقل‌رساندن تاثیر خاموشی ژن و بالابردن میزان بیان در این سیستم، از بیان توام بازدارنده‌های ویروسی خاموشی ژن استفاده شود.

نتیجه‌گیری

روش آگروانفیلتراسیون یک روش موثر و کوتاه‌مدت برای تولید انبوه نوکلئاز خالص نوترکیب PARS II در گیاه توتون است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد اعلام می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: محمد فارسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ مهدیه میرزایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰%)؛ جعفر ذوالعلی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)

منابع مالی: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی به شماره ۲/۲۹۶۵۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

منابع

1- Tsuji T, Niida Y. Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories. Electrophoresis. 2008;29(7):1473-83.

2- Yeung AT, Hattangadi D, Blakesley L, Nicolas E. Enzymatic mutation detection technologies. Biotechniques. 2005;38(5):749-58.

3- Vogiatzakis N, Kekou K, Sophocleous C, Kitsiou S, Mavrou A, Bakoula C, et al. Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol. Mol Biotechnol. 2013;55(1):1-9.

4- Shi Y, Terry SF, Terry PF, Bercovitch LG, Gerard GF. Development of a rapid, reliable genetic test for pseudoxanthoma elasticum. J Mol Diagn. 2007;9(1):105-12.

5- Wang GX, Tan MK, Rakshit S, Saitoh H, Terauchi R, Imaizumi T, et al. Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase genes by Ecotilling. Pestic Biochem Physiol. 2007;88(2):143-8.

6- Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco CF, Moriones E, Gómez-Guillamón ML, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. BMC Plant Biol. 2007;7:34.

7- Brady SM, Provart NJ. Extreme breeding: Leveraging

Archive of SID

www.SID.ir

2015;7(1):201-15. [Persian]
19- Huang FC, Studart-Witkowski C, Schwab W. Overexpression of hydroperoxide lyase gene in Nicotiana benthamiana using a viral vector system. Plant Biotechnol J. 2010;8(7):783-95.
20- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 1997;122(1):101-8.
21- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP. pEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. Plant Biotechnol J. 2009;7(7):682-93.
22- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P. Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of Nicotiana benthamiana. Acta Biochim Pol. 2006;53(2):289-98.
23- Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, et al. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. Biochemistry. 2000;39(13):3533-41.
24- Kozak M. The scanning model for translation: An update. J Cell Biol. 1989;108(2):229-41.
25- Sambrook J, Green MR. Appendix 1, Reagents and buffers. Molecular cloning: A laboratory manual. 1st Volume. 4th Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. p. A2.2.
26- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.
27- Baron U, Imhoff U, Koch J, Leuer M, Weber J, Olek K, inventors; Biopsytec Analytik Gmbh, assignee. Mutated nucleic acid of a CEL I-endonuclease and method for producing the recombinant, full-length CEL I-protein. WO2004035771. 2003 Oct 9.
28- Pimkin M, Caretti E, Canutescu A, Yeung JB, Cohn H, Chen Y, et al. Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection. BMC Biotechnol. 2007;7:29.
29- Bendahmane A, Sturbois B, Triques K, Caboche M, inventors; Genoplante-Valor, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), assignees. Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases and uses thereof. US20120009583A1. 2004 Jul 30.

genomics for crop improvement. J Sci Food Agric. 2007;87(6):925-9.
8- Sokurenko EV, Tchesnokova V, Yeung AT, Oleykowski CA, Trintchina E, Hughes KT, et al. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. Nucleic Acids Res. 2001;29(22):e111.
9- Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. Plant J. 2004;37(5):778-86.
10- Comai L, Henikoff S. TILLING: Practical single-nucleotide mutation discovery. Plant J. 2006;45(4):684-94.
11- Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic Acids Res. 2013;41(5):e63.
12- Maier DA, Brennan AL, Jiang S, Binder-Scholl GK, Lee G, Plesa G, et al. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. Hum Gene Ther. 2013;24(3):245-58.
13- Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. FEMS Microbiol Rev. 2003;26(5):457-91.
14- Mon H, Lee J, Fukushima M, Nagata Y, Fujii M, Xu J, et al. Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm expression system. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(15):6813-22.
15- Oleykowski CA, Mullins CRB, Godwin AK, Yeung AT. Mutation detection using a novel plant endonuclease. Nucleic Acids Res. 1998;26(20):4597-602.
16- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, et al. Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: Application to mutation discovery by TILLING in pea. Plant J. 2007;51(6):1116-25.
17- Zolala J, Bahrami AR, Farsi M, Matin MM, Yassaee VR. Comparison of CEL I gene expression and mismatch-cleavage activity in some Apiaceae plants. Mol Breed. 2009;24(1):17-24.
18- Mirzaei M, Zolala J, Shalouzad A. Isolation, cloning and molecular characterization of genes encoding single-strand specific endonucleases from Parsley (Petroselinum crispum L.). J Agric Biotechnol.

Archive of SID

www.SID.ir