

مقایسه بیان موقت پروتئین HDA19 در برگ‌های *Nicotiana bentamiana* و *Nicotiana tabacum*

مریم جمشیدنیا^۱، سیدکمال کاظمی تبار^{۲*}، کریستین لایندرمایر^۳، حمید نجفی زربینی^۴

۱. دانشجوی دکتری گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳. موسسه بیوشیمی بیماری‌های گیاهی، مرکز هلم هولتز مونیخ، مرکز تحقیق آلمان برای سلامت محیطی، نوهبرگ، ۸۵۷۶۴ آلمان

۴. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۰)

Comparison of Transient HDA19 Protein Expression in Leaves of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana bentamiana*

Maryam Jamshidnia¹, Sayed Kamal Kazemitabar^{2*}, Christian Lindermayr³,
Hamid Najafi Zarini⁴

1. Ph.D. Student, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

3. Institute of Biochemical Plant Pathology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, 85764, Germany

4. Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

(Received: Aug. 30, 2016 - Accepted: Dec. 11, 2016)

Abstract

Recently, transient gene expression has been developed to provide a more rapid means of assessing plant tissues as a protein production platform without the labor-intensive and time-consuming process of generating stably transformed transgenic plants. This study reports the expression of *HDA19* gene in two species of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* and *Nicotiana bentamiana*) by means of transient transformation. Specific primers were designed and used for PCR amplification and cloning of *HDA19* gene in the plant expression vector pB2GW7. The recombinant construct was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, and was used for *Agrobacterium* mediated transformation of tobacco plants. The presence of the desired gene in transgenic lines was confirmed through colony PCR. The expression of the protein in transgenic lines was confirmed by immune-dot blot assay and ELISA. Although the transformation of the two species was confirmed by immune-dot blot assay and SDS-PAGE, recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* plants was confirmed by ELISA and it was estimated 400 µg per gram wet weight of tobacco leaves. According to the results, this species is the appropriate host for the production of recombinant HDA19, one of the histone deacetylases, rather than *Nicotiana bentamiana*.

Keywords: HDA19, Tobacco, Recombinant protein, *Nicotiana tabacum*, *N. bentamiana*

چکیده

اخیراً بیان موقت ژن به‌منظور فراهم سازی روش‌های بسیار سریع ارزیابی بافت‌های گیاهی به‌عنوان یک منبع تولید پروتئین در مقایسه با روش وقت گیر و پرهزینه تراریختی پایدار گیاهان گسترش یافته است. مطالعه حاضر بیان موقت پروتئین HDA19 را در دو گونه از گیاه *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* (tobacco) نشان می‌دهد. برای این منظور پرایمرهای اختصاصی برای واکنش زنجیره ای پلی مرز طراحی و برای همسانه سازی ژن HDA19 در وکتور بیانی pB2GW7 به‌کار رفتند. سازه نو ترکیب به *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 انتقال یافت سپس برای تراریختی موقت گیاهان tobacco از طریق آگروباکتریوم استفاده شد. در نهایت وجود ژن هدف در لاین‌های تراریخت آگروباکتریوم از طریق کلونی PCR تأیید گردید. از طرفی بیان پروتئین در لاین‌های تراریخت توسط روش دات بلات و الایزا تأیید شد. اگرچه روش دات بلات و SDS-PAGE حاکی از تراریختی هر دو رقم بود ولی روش الایزا تولید پروتئین نو ترکیب در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* را تأیید کرد که ۴۰۰ میکروگرم در گرم وزن بافت تر برگ گیاه بود. با توجه به یافته‌های فوق این گیاه میزبان مناسبی برای تولید HDA19 نو ترکیب، نماینده‌ای از پروتئین‌های هیستون داستیلاز، نسبت به *Nicotiana bentamiana* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: HDA19، Tobacco، پروتئین نو ترکیب، *Nicotiana tabacum*، *Nicotiana bentamiana*

مقدمه

اهمیت علمی، تجاری و دارویی برخی از مولکول‌های پپتیدی موجب شده است که جهت تولید مقادیر زیاد و با خلوص بالایی از آنها روش‌های مختلفی توسعه پیدا کند. به طور کلی پپتیدهای مورد نظر برای مطالعات *in vitro* کنترل فیزیولوژی سلولی و پپتیدهای با خاصیت دارویی به دو شیوه سنتز شیمیایی و بیان تراریختی تولید می‌شوند. معمولاً هزینه‌ی تولید پپتیدها با استفاده از روش‌های شیمیایی نسبتاً بالا می‌باشد و همچنین زنجیره‌های پپتیدی ناقص و آلودگی‌های شیمیایی در محصول نهایی از کیفیت آن‌ها می‌کاهند. این مشکلات در برخی موارد استفاده از سیستم‌های سنتتیک جهت تولید پپتیدها در مقادیر زیاد را محدود می‌کند و در عوض از سیستم‌های اقتصادی‌تری مبتنی بر بیان تراریختی سود می‌جوید. از جمله‌ی این سیستم‌ها که امروزه برای تولید تجاری ده‌ها پپتید نو ترکیب نیز مورد استفاده است سیستم بیانی گیاهان می‌باشد. گیاهان سیستم‌های مناسبی جهت بیان پروتئین‌های نو ترکیب می‌باشند و دارای مزایایی از قبیل ایمنی، محصول زیاد و قیمت کم می‌باشند. (Fischer et al., 1999). برای مدت دو دهه است که Tobacco را به‌عنوان یک گیاه مدل برای تولید پروتئین‌های دارویی انتخاب کردند. بدلیل اینکه مزایای زیادی در مقایسه با گیاهان دیگر از قبیل کشت بافت و انتقال ژن آسان، تولید دانه زیاد (Lund and Dunsmuir, 1992)، و وجود وکتورهای بیانی مناسب برای افزایش بیان ژن‌های هدف دارد. عملکرد بالا (تولید یکصدتن در هکتار برگ) و فراهمی روش‌های بیانی مختلف در Tobacco مانند پلاستید، سیستم‌های بیان هسته‌ای پایدار و موقت این گیاه را کاندیدای خوبی برای تحقیقات تولید پروتئین‌های دارویی ساخته است. درحالی‌که این گیاه مصرف غذایی نداشته و از طرفی امکان آلودگی‌های محیطی توسط لاین‌های Tobacco تراریخت کاهش می‌یابد

(Fischer et al., 1999). انتقال ژن‌های خارجی به گیاهان از طریق *Agrobacterium tumefaciens* یک تکنیک استاندارد در بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک گیاهی است (Bergmann, 1960). برای گونه‌های گیاهی مختلف، تولید گیاهان تراریخت بعد از انتقال DNA از طریق آگروباکتریوم امکان‌پذیر است (De La Riva et al., 1998). هیستون داستیلازها از جمله آنزیم‌هایی هستند که همسانه‌سازی و بیان آن‌ها در دو دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است. اطلاعات به‌دست آمده نشان می‌دهد که هیستون داستیلازها نقش تنظیم‌گر کلیدی در رشد گیاه، نمو و پاسخ‌های تنش‌های زنده و غیر زنده را بازی می‌کنند. AtHDA19 هیستون داستیلاز از نوع RPD3 می‌باشد که در پاسخ‌های پاتوژن درگیر است. رونویسی AtHDA19 در آراییدوپسیس توسط هورمون‌های مربوط به پاتوژن (یعنی جاسمونیک اسید و اتیلن) و پاتوژن قارچی *Alternaria brassicicola* القا می‌شود (Zhou et al., 2005). بیان فراوان AtHDA19 در آراییدوپسیس بیان ERF1 را افزایش داده است. از طرفی ERF1 عنصری کلیدی در پاسخ دفاعی است و مقاومت گیاهان تراریخت به پاتوژن *Alternaria brassicicola* را افزایش می‌دهد. همچنین گونه پاتوژن باکتریایی دیگری *Pseudomonas syringae* می‌تواند AtHDA19 را القاء نماید (Kim et al., 2008). AtHDA19 در کلاس یک هیستون داستیلازها قرار دارد (Alinsug et al., 2009). HDA19 طول سلول اپیدرمی را کنترل می‌کند (Chen et al., 2015) و برنامه‌های وابسته به نور را تنظیم می‌کند و بیان ژن را در مسیرهای سیگنالینگ اتیلن و جاسمونیک اسید همانند تنش‌های زنده از قبیل زخم و آلودگی پاتوژن را تنظیم می‌کند. در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شد دریافتند که AtHDA19 پاسخ پایه گیاه از طریق اثر متقابل با فاکتورهای رونویسی WRKY را تنظیم

BASTA برای انتخاب لاین‌های تراریخت و CaMV35s (راه انداز ویروس موزاییک گل کلم) می‌باشد.

مواد گیاهی

برگ‌های جوان گیاهان ۵ هفته‌ای *Nicotiana glauca* و *Nicotiana glauca* cv. *xanthi* برای تراریختی استفاده شدند. این ارقام به‌عنوان مدل برای مطالعات انتقال ژن استفاده شده و کشت و کار نمی‌گردند.

کلونینگ ژن HDA19 در وکتور pDONR221 و وکتور pB2GW7

توالی کدکننده His-HDA19 و HDA19-His در وکتور pDONR221 از طریق واکنش BP و سپس در وکتور pB2GW7 با استفاده از واکنش LR گیت وی کلون گردید (Jamshidnia et al., 2016;) توالی کدکننده برجسب‌دار با His از وکتورهای Entry به وکتور Destination باینری گیاهی با استفاده از واکنش گیت وی LR منتقل شدند (شکل ۱). در نهایت این سازه‌ها به آگروباکتریوم و سپس به گیاه انتقال یافتند.

تراریختی *A. tumefaciens* با روش ذوب و انجماد *A. tumefaciens* strain GV3101 به مدت یک شبانه روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع LB با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپسین کشت داده شد. آگروباکتریوم در ۳۵۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس در ۱۰۰ میکرولیتر CaCl₂ ۲۰ میلی‌مولار تعلیق گردید. ۵ میکرولیتر وکتور (pB2GW7/6xHis-HDA19) و pB2GW7/6xHis-HDA19) به سوسپانسیون اضافه شد و این مخلوط کشت در نیتروژن مایع و سپس در حمام بنماری برای ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد غوطه ور گردید. یک میلی‌لیتر از LB به آن اضافه و در

می‌کند (Zhou et al., 2005). HDA19 در سرکوب پاسخ‌های دفاعی از طریق سالیسیلیک اسید در آرآیدوپسیس درگیر است. فقدان فعالیت HDA19 محتوای سالیسیلیک اسید را افزایش می‌دهد و بیان یک گروه از ژن‌ها که برای تجمع سالیسیلیک اسید احتیاج است همانند ژن‌های PR¹ افزایش می‌دهد، و نتیجه‌اش افزایش مقاومت به *Pseudomonas syringae* است (Choi et al., 2012). در پروژه حاضر بیان موقت HDA19 در *Nicotiana glauca* و *Nicotiana glauca* cv. *xanthi* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری

Escherichia coli strain DH5α به‌عنوان یک میزبان برای نگهداری و ازدیاد دستواره ژن و *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 برای انتقال ژن HDA19 به *Nicotiana glauca* و *Nicotiana glauca* cv. *xanthi* به کار رفتند.

پرایمرها

پرایمرهای مناسب با در نظر گرفتن توالی کوزاک، توالی کدکننده ژن HDA19 آرآیدوپسیس تالیانا، توالی برجسب His و جداکننده (spacer) به‌منظور شناسایی توالی کدکننده ژن HDA19 در لاین‌های تراریخت طراحی شدند. این پرایمرها برای تکثیر ژن HDA19 به کار رفتند (جدول ۱).

وکتور

در این مطالعه وکتور بیان گیاهی pB2GW7 استفاده شد که حامل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین برای انتخاب کلونی‌های باکتری‌ها و ژن مقاومت

دور ریخت محلول غشاء ۳ مرتبه با TBS-T برای ۵ دقیقه شستشو و در نهایت از TMB^۱ برای رنگ‌آمیزی غشاء استفاده گردید.

الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE)

جداسازی نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل آمید با Mini-PROTEAN Three Cell system (Bio-Rad, Germany) انجام گرفت. پروتیین‌ها براساس وزن مولکولی باژل پایین ۱۲ درصد جدا شدند. نمونه‌های پروتیین به نسبت ۱:۵ با بافر بارگذاری ۵x مخلوط و در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه قبل از ران شدن روی ژل جوشانده شدند. نمونه‌ها پس از تزریق در چاهک‌ها بلافاصله با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت الکتروفورز گردیدند (Sambrook and Laemmli, 1970; Russell, 2006).

آنالیز میزان بیان پروتیین با استفاده از الایزا

بیان کمی ژن تراریخت توسط الایزا اندازه‌گیری شد. در روش His-tag الایزا که برای اولین بار توسط Jamshidnia و همکاران (۲۰۱۷) برای شناسایی پروتیین نو ترکیب HDA19 در پروتیین‌های محلول تام انجام گرفت، پلیت الایزا با پروتیین‌های محلول تام استخراج شده از گیاه غیرتراریخت و گیاهان تراریخت و به عنوان کنترل مثبت His یک پروتیین دارای برچسب به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بافر کربنات-بی‌کربنات پوشانده شد. در مرحله بعد با یک درصد BSA در محلول نمکی PBS به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور حذف باندهای غیراختصاصی انکوبه گردیدند. شستشو با PBS انجام شد و انکوبه‌کردن با آنتی‌بادی کانژوگه شده با-His HRP در غلظت (۱:۵۰۰۰) به مدت یک شبانه روز

PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن (جدول ۱) انجام شد. DNA گیاهان غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR برای ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، همراه با ۳۵ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه پایانی برای ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد اجرا شد.

آنالیزهای دات‌بلات

۵۰۰ میلی‌گرم برگ‌های جوان برای استخراج پروتیین محلول تام (TSP) استفاده شد. برگ‌ها در نیتروژن مایع کوبیده شدند تا به حالت پودر درآمدند. پروتیین‌ها با استفاده از ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲۵ میلی‌مولار Tris HCl، ۱ میلی‌مولار Ethylene Diamine، ۵ میلی‌مولار Tetra Acetic Acid (EDTA)، ۰/۱ درصد DTT، ۱۰ درصد Nonidet P-40، ۲ درصد گلیسرول و ۲ درصد Polyvinylpyrrolidone) حاوی protease inhibitor استخراج شدند. سپس در ۱۴۰۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی برای آنالیز دات‌بلات و برطبق دستورالعمل کارخانه Biolegend استفاده گردید. در ادامه ۵۰ نانوگرم از پروتیین مستقیماً روی غشاء PVDF قرار گرفت و پس از خشک شدن با یک درصد BSA برای مدت یک ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس محلول دور ریخته شد و در نهایت با TBS-T برای ۵ دقیقه شستشو و این مرحله ۳ بار تکرار شد. سپس آنتی‌بادی اولیه (Biolegend, Inc.) اضافه و برای یک ساعت انکوبه گردید. پس از دور ریختن محلول، غشاء ۳ مرتبه با TBS-T برای ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس غشاء در آنتی‌بادی کانژوگه ضد موش horseradish peroxidase (Bio Rad) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه به نسبت (۱:۳۰۰۰) به مدت یک ساعت انکوبه گردید. پس از

1. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
2. Coated

چندین سال اخیر روش‌های مختلف انتقال ژن به گیاهان گسترش یافته‌اند که انتقال ژن به واسطه *Agrobacterium* به دلیل برتری الگوی الحاق ژن، سادگی و کم هزینه بودن آن به‌طور متداول‌ترین برای انتقال ژن به گیاهان به ویژه گیاهان دو لپه مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از روش تریپک اگر باکتریوم برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب توسط محققان متعددی در دنیا انجام شده و نتایج مطلوبی در سال‌های اخیر داشته است (Krenek et al., 2015). اگرچه بیان پروتئین‌های هیستون داستیلاز در باکتری عمدتاً با شکست مواجهه یا پروتئین تولید شده فعالیت کمی را نشان می‌دهد (Fong et al., 2006)، اما از طرفی دیگر بیان پروتئین در گیاه Tobacco احتمال مؤفقت آن را به میزان قابل توجهی افزایش داد. در این تحقیق پروتئین HDA19 برای بیان انتخاب شد. این پروتئین از ۵۰۱ اسید آمینه تشکیل شده (Fong et al., 2006) و همولوگ HDAC1 انسان است که از عوامل مؤثر در ایجاد و پیشرفت سرطان در انسان می‌باشد (Golzak and Seto, 2007). بنابراین با استفاده از روش‌های سنتز ژن و مهندسی ژنتیک اگر باکتریوم حاوی پلاسمیدهای بیانی (-pB2GW7/6xHis) HDA19 و (pB2GW7/HDA19-6xHis) به‌منظور مقایسه بیان پروتئین‌های تراریختی، به گیاهان *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* به روش موقتی منتقل گردید. در تحقیقات انجام گرفته قبلی، پژوهشگران بیان موقت پروتئین پوشش FMDV در tobacco به روش تریپک اگر باکتریومی انجام دادند و میزان بالایی از بیان پروتئین را به‌دست آوردند (Habibi-Pirkoohi et al., 2014). همچنین در تحقیقی دیگر بیان موقت ژن گزارشگر اینترون gus در سه رقم مختلف tobacco (*Nicotiana tabacum*، *Nicotiana glutinosa* و *Nicotiana bentamiana*) انجام گرفت (Curtis and Andrews, 2005).

انجام گرفت. پس از رنگ‌آمیزی با TMB محلول یک نرمال اسید سولفوریک برای توقف واکنش اضافه گردید و پلیت‌ها در ۴۵۰ نانومتر و توسط دستگاه الیزابیدر خوانده شد. از پروتئین محلول تام برگ گیاه غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی واکنش استفاده شد و آزمایش در سه تکرار مستقل انجام گرفت.

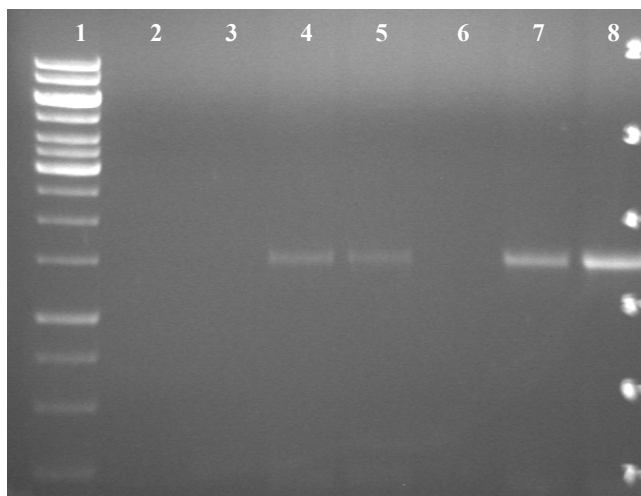
نتایج و بحث

در این تحقیق برگ‌های گیاه *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* به‌عنوان یک سیستم بیان‌کننده و تولید برای پروتئین نو ترکیب HDA19 با استفاده از روش بیان موقت مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان از مزایای متعددی به‌عنوان منبع تولید کننده انواع پروتئین‌ها و مواد دارویی، نظیر آنتی‌بادی و واکسن‌ها برخوردارند که به‌عنوان مثال می‌توان به تولید بالابا، توانایی سلول‌های یوکاریوت در تولید و پردازش صحیح پروتئین‌های نو ترکیب و عدم آلودگی با انکوژن یا اندوتوکسین‌های باکتریایی اشاره کرد (Julian et al., 2003). توانایی تولید پروتئین‌های دارویی شامل آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌های صنعتی و پروتئین‌ها با هزینه کم‌تر از دیگر استراتژی‌های تولید می‌تواند بازار جدیدی برای پروتئین‌های تراریخت باز نماید (Lauren et al., 2005). بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده و در بافت‌های تمایز یافته قابل اجرا است. به همین دلیل در سال‌های اخیر به‌نظر می‌رسد که بیان موقت ژن در گیاه، روش مناسبی برای تولید پروتئین یا فراورده موردنظر در گیاه است. در این تحقیق، گیاه Tobacco به‌عنوان یک گیاه مدل از انتقال ژن نهاده شده و روش‌های باززایی و همچنین فراهمی سازه‌های بیان برای کنترل بیان ژن سود می‌برد. تراریختی از طریق اگر باکتریوم روشی برای انتقال ژن‌های هدف به گیاه است (Bergman, 1960). در

گیاه اجرا شد. وجود باند ۱۵۰۰ bp در لاین‌های تراریخت احتمالی تراریختی موفق ژن داخل گیاهان باززا شده را نشان داد (شکل ۲). گیاهان غیرتراریخت (کنترل منفی) هیچ باندهایی را در PCR نشان ندادند.

تأیید حضور ژن HDA19 در گیاه Tobacco با استفاده از واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت پرایمرهای اختصاصی ژن به منظور آزمون وجود ژن HDA19 داخل ژنوم



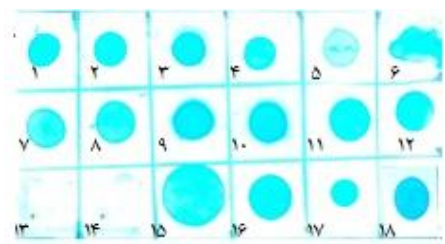
شکل ۲. تأیید توالی کدکننده HDA19 در برگ‌های گیاهان تراریخت. ۱: مارکر ۱ Kb ۲: کنترل منفی (آب) ۳: DNA گیاه غیرتراریخت *Nicotiana tabacum* ۴ و ۵: به ترتیب His-HDA19 و HDA19-His استخراج شده از برگ *Nicotiana tabacum* ۶: DNA گیاه غیر تراریخت *Nicotiana bentamiana* ۷ و ۸: به ترتیب His-HDA19 و HDA19-His استخراج شده از برگ *Nicotiana bentamiana*

نشان نداد. همانگونه که از نتایج دات بلات دیده می‌شود، نمونه پروتیین به دست آمده از برگ‌های تراریخت در مقایسه با کنترل مثبت سیگنال قوی ایجاد کرد، درحالی که پروتیین گیاه غیرتراریخت هیچ سیگنالی نداشت. همچنین نتایج دات بلات بیان پروتیین His-HDA19 و HDA19-His را در هر دو رقم *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* نشان داد ولی پروتیین به دست آمده از برگ‌های تراریخت *Nicotiana tabacum* سیگنال قوی‌تری را در مقایسه با پروتیین به دست آمده از برگ‌های تراریخت *Nicotiana bentamiana* نتیجه داد. پژوهشگران دیگری نیز برای تأیید بیان پروتیین در tobacco از روش دات بلات استفاده نمودند. در تحقیقی Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۱۲) بیان پروتیین اینترفرون انسانی $\alpha 2b$ را در *Nicotiana tabacum*

تأیید بیان پروتیین HDA19 با استفاده از دات بلات

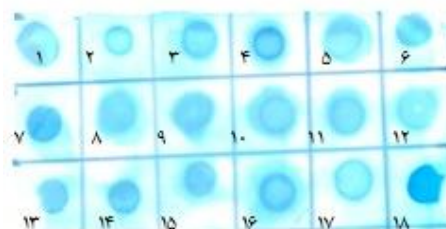
جهت تأیید تولید پروتیین نوترکیب در گیاهان از روش دات بلاتینگ استفاده شد. شکل ۳ (الف و ب) نتایج سنجش دات بلات را نشان می‌دهد که بیان ژن را در گیاه تراریخت تأیید می‌کند. گیاهان غیرتراریخت و لاین‌های تراریخت برای آزمون دات بلات استفاده شدند. حضور شش اسید آمینه هیستیدین که به ابتدا و انتهای ژن هدف اضافه گردیده، به عنوان نشانگر استفاده شد. حضور نقطه‌های رنگ شده بر روی غشاء PVDF تأیید حضور پروتیین نوترکیب تولید شده می‌باشد. بیان HDA19 توسط آنتی‌بادی anti His tag توسط peroxidase و تغییر رنگ سوپسترا مورد سنجش قرار گرفت در حالی که پروتیین استخراج شده از گیاه غیرتراریخت هیچ تغییر رنگی در سنجش دات بلات

pHCVcp پروتیین استخراج شده از برگ تراریخت tobacco توسط سنجش دات بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز دات بلات نشان داد که HCV در پروتیین استخراجی از برگ‌های tobacco تراریخت شده با وکتورهای (pBI-core و PVX-core) در مقایسه با کنترل منفی با همان مقدار پروتیین محلول تام وجود دارد. پژوهشگران اظهار داشتند که بیان PVX-core در مقایسه با سازه pBI-core بسیار بالاتر بود (Mohammadzadeh *et al.*, 2014).



(الف)

توسط دات بلات نشان دادند. در پژوهشی دیگر Soltanmohammadi و همکاران (۲۰۱۴) از دات بلات برای تأیید بیان پروتیین پروانسولین در گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) استفاده نمودند. همچنین روش دات بلات برای تأیید بیان پروتیین FMDV در *Nicotiana tabacum* به کار رفت که از طریق تزریق آگروباکتریومی تراریخت شده بودند (Habibi-Pirkoohi *et al.*, 2014). در پژوهشی دیگر به منظور شناسایی و آنالیز



(ب)

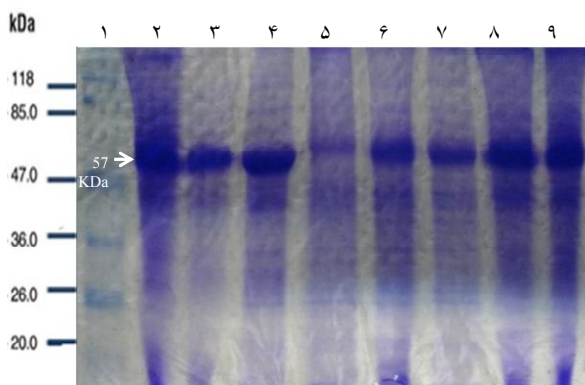
شکل ۳. تأیید بیان پروتیین با دات بلات. (الف) بیان پروتیین در برگ‌های گیاه *Nicotiana tabacum* ۱-۶: بیان HDA19-His ۷-۱۲ و ۱۵-۱۷: بیان His-HDA19 ۱۳ و ۱۴: پروتیین گیاه غیرتراریخت ۱۸- کنترل مثبت (۵۰ نانوگرم پروتیین خالص دارای برچسب His). (ب) بیان پروتیین در برگ‌های گیاه *Nicotiana benthamiana* ۱-۶: بیان HDA19-His ۷-۱۶: بیان His-HDA19 ۱۷: پروتیین گیاه غیرتراریخت ۱۸- کنترل مثبت (۵۰ نانوگرم پروتیین خالص دارای برچسب His).

بررسی بیان پروتیین HDA19 با استفاده از الایزا
بیان پروتیین نوترکیب به طور کمی با الایزا اندازه گیری شد (شکل ۵). تکنیک سنجش الایزا روش ساده و آسانی برای سنجش کمی میزان‌های بسیار اندک پروتیین هدف (۱۰۰ پیکوگرم) در پروتیین محلول تام است. مزیت عمده این روش توانایی سنجش سریع و تکرارپذیر تعداد زیادی از نمونه‌ها با نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی اندک است (Steffany *et al.*, 2003). نتایج نشان داد که تولید پروتیین نوترکیب در برگ‌های تراریخت *Nicotiana tabacum* نسبت به شاهد غیرتراریخت کاملاً بالا بود. Habibi-Pirkoohi و همکاران (۲۰۱۴) اظهار داشتند که بیان فراوان VP1 در برگ‌های *Nicotiana tabacum* با روش الایزا به وضوح قابل مشاهده است که به طور کمی بیان واکسن

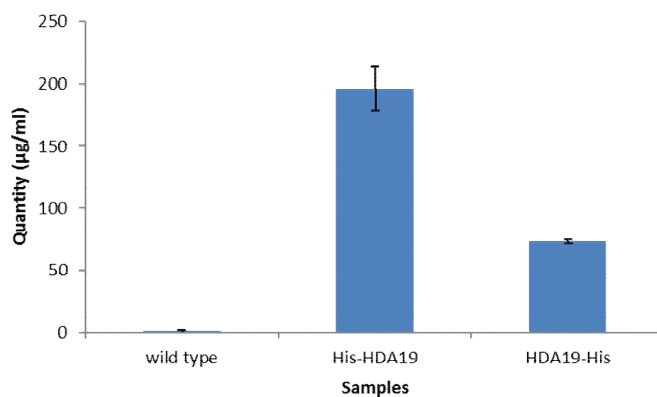
تأیید بیان پروتیین HDA19 با استفاده از SDS-PAGE
برای مشاهده بیان پروتیین‌های تراریخت از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده شد. برای تشخیص پروتیین تراریخت از مقایسه‌ی الگوی باندهای پروتیین‌های تراریخت با نمونه‌ی شاهد منفی استفاده شد. نمونه‌ی شاهد گیاه غیرتراریختی بود که تحت شرایط مشابه همراه با نمونه‌های اصلی مورد کشت قرار گرفته بودند. شکل ۴ نتیجه بیان کلونی‌های نوترکیب در مقایسه با نمونه شاهد در پی آنالیز بر روی ژل SDS-PAGE را نشان می‌دهد. همانگونه که در این تصویر مشاهده می‌شود وجود یک باند هم اندازه با باند پروتیینی مورد انتظار (۵۷ کیلو دالتون) در گیاه تراریخت و غیرتراریخت موجب شد که آنالیز داده‌ها را از روی نتایج SDS-PAGE غیرممکن بسازد.

نوترکیب دارای برچسب هیستیدین در انتهای آمین (His-HDA19) بیشتر از پروتیین دارای برچسب هیستیدین در انتهای کربوکسیل (HDA19-His) در برگ‌های گیاهان تراریخت بود (شکل ۵). اگرچه روش دات بلات و SDS-PAGE حاکی از تراریختی هر دو رقم بود ولی روش الایزا تولید پروتیین نوترکیب در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* را تایید کرد.

نوترکیب را اندازه گیری می‌کند. آن‌ها در مقابل هیچ سیگنال قوی برای گیاهان غیرتراریخت مشاهده نکردند. در پژوهشی دیگر الایزا برای شناسایی پروتیین Cry1Ac در بافت‌های پنبه-Bt به کار رفت و با این روش تا ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر پروتیین شناسایی گردید (Wang et al., 2007). نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش نشان داد که تولید پروتیین



شکل ۴. بررسی بیان پروتیین HDA19 با استفاده از SDS-PAGE. ۱: مارکر پروتیینی ۵۷: بیان پروتیین در گیاه تراریخت *Nicotiana bentamiana* ۶-۹: بیان پروتیین در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum*. باند پروتیین ۵۷ کیلو دالتون هم اندازه با پروتیین HDA19 مشاهده می‌شود.



شکل ۵. بررسی بیان پروتیین HDA19 با استفاده از الایزا ۵ روز پس از تزریق آگروباکتریوم. بیان پروتیین His-HDA19 بیشتر از HDA19-His در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* است در حالی که بیان پروتیین در گیاه تراریخت *Nicotiana bentamiana* با استفاده از الایزا مشاهده نگردید.

و کدون‌ها به‌منظور افزایش بیان ژن اپتیمایز شدند. در مطالعه حاضر، باینری وکتور pB2GW7 در تراریختی گیاه به کار رفت. این وکتور راه انداز CaMV 35S را حمل می‌کند. در گیاهان دولپه،

در این تحقیق مشابه با گزارشات قبلی (Streatfield et al., 2001; Kang et al., 2001; Sala et al., 2000; Gil et al., 2004) و توالی کوزاک استفاده شدند

تراریخت *Nicotiana tabacum* را تأیید کرد. با توجه به یافته‌ها می‌توانیم اظهار کنیم که این گیاه میزبان مناسبی برای تولید HDA19 نوترکیب، نماینده‌ای از پروتئین‌های هیستون داستیلاز، نسبت به *Nicotiana bentamiana* می‌باشد و روش الایزا نسبت به دو روش دیگر، دات بلات و SDS-PAGE، برای شناسایی لاین‌های تراریخت تولیدکننده پروتئین نوترکیب برتری دارد. در تحقیق حاضر برای اولین بار بیان موقت پروتئین HDA19 در برگ‌های *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که *Nicotiana tabacum* گیاه میزبان مناسبی برای تولید HDA19 نوترکیب، نماینده‌ای از پروتئین‌های هیستون داستیلاز، نسبت به *Nicotiana bentamiana* می‌باشد. همچنین برای اولین بار این تحقیق نشان داد که His-tag الایزا روش مناسبی برای تأیید بیان پروتئین نوترکیب HDA19 در گیاه tobacco است.

CaMV 35S یک راه‌انداز مناسب است زیرا قوی و دائمی است و می‌تواند میزان بالایی از بیان تراریختی را در برگ‌ها، میوه‌ها، غده‌ها، ریشه‌ها و ارگان‌های دیگر موجب گردد (Kumar *et al.*, 2007). توالی کوزاک به‌منظور افزایش بیان ژن HDA19 استفاده شد (Rajabi Memari *et al.*, 2010). برجسب His برای شناسایی و خالص‌سازی پروتئین هدف از پروتئین‌های دیگر گیاه تراریخت به کار رفت (Leelavathi *et al.*, 2003).

در این آزمایش سطح خوبی از بیان ژن در گیاه *Nicotiana tabacum* نسبت به گیاه *Nicotiana bentamiana* مشاهده گردید. تولید پروتئین نوترکیب His-HDA19 بیشتر از HDA19-His در برگ‌های گیاه تراریخت به‌دست آمد. اگرچه در SDS-PAGE باند حدود ۵۷ کیلودالتون، معادل باند موردنظر پروتئین HDA19 در گیاهان تراریخت *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* مشاهده گردید ولی روش الایزا تولید پروتئین نوترکیب در گیاه

REFERENCES

- Ahangarzadeh S, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied Kh (2012) Cloning, Transformation and Expression of Human Interfron $\alpha 2b$ gene in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv.xanthi). *Jundishapur. J. Nat. Pharm. Prod.* 7(3): 111-116.
- Bergmann L (1960) Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. *J. Gen. Physiol.* 43(4):841-51.
- Chen CY, Wu K, Schmidt W (2015) The histone deacetylase HDA19 controls root cell elongation and modulates a subset of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 28(5)15708.
- Choi SM, Song HR, Han SK, Han M, Kim CY, Park J, Lee YH, Jeon JS, Noh YS, Noh B (2012) HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 71(1): 135-146.
- De La Riva GA, González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron. J. Biotechnol.* 1(3):24-25.
- Fischer R, Vaquero C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U (1999) Toward Molecular Farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:113-116.
- Fischer R, Schillberg S (2004) Molecular farming: Plant-made pH pharmaceuticals and technical proteins. Weinheim: Wiley-VCH verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fong MP, Tian L, Chen ZJ (2006) *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 1 (AtHD1) is localized in

- euchromatic regions and demonstrates histone deacetylase activity *in vitro*. *Cell Res.* 16(5): 479–488.
- Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catala R, Martinez-Torrecedrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM (2001) High yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett.* 488:13-17.
- Glozak MA, Seto E (2007) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26:5420–5432.
- Habibi-Pirkoochi M, Malekzadeh-Shafaroudi S, Marashi H, Moshtaghi N, Nassiri M, Zibae S (2014) Transient Expression of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Coat Protein in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) via Agroinfiltration. *Iranian J. Biotech.* 12(3): e1015.
- Jamshidnia M, Kazemitabar SK, Lindermayr C, Najafi Zarini H (2016) Designing and construction pB2GW7 vector encoding *HDA19* gene of *Arabidopsis thaliana*. In: Proceeding of the 2nd International and 14th Iranian Genetics Congress. Iran.
- Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS (2004) Enhanced expression of B-subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117(3): 175-187.
- Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z (2008) Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell.* 20: 2357-2371.
- Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Duskocilova A, Komis G, Samaj J (2015) Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol. Adv.* 33 (6): 1024-1042.
- Kumar G, Ganapathi T, Bapat V (2007) Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: an update. *Biotechnol. Prog.* 23(3):532-539.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lauren B, Curtis R.A, Curtis R.W (2005) Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 21: 946-952.
- Leelavathi S, Reddy VS (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol. Breeding.* 11(1): 49-58.
- Lund P, Dunsmuir P (1992) A plant signal sequence enhances the secretion of bacterial ChiA in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 18(1): 47-53.
- Ma L, Lukasik E, Gawhnes F, Takken FLW (2012) The use of Agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. Melvin D, Bolton and Bart P.H.J. Thomma (eds.) *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 835, Springer Science+Business Media.
- Mohammadzadeh S, Khabiri A, Roohvand F, Memarnejadian A, Salmanian AH, Ajdary S, Ehsani P (2014) Enhanced-Transient Expression of Hepatitis C Virus Core Protein in *Nicotiana tabacum*, a Protein With Potential Clinical Applications. *Hepat. Mon.* 14(11): e20524.
- Rajabi Memari H, Ramanan RN, Ariff AB (2010) Comparison of expression systems for the production of human interferon- α 2b. *Cent. Eur. J. Biol.* 5(4): 446-455.
- Sala F, Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S (2000)

- Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*. 21:803-808.
- Sambrook J, Russell DW (2006) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protoc*.
- Soltanmohammadi B, Jalali-Javaran M, Rajabi-Memari H, Mohebodini M (2014) Cloning, Transformation and Expression of Proinsulin Gene in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jundishapur. J. Nat. Pharm. Prod.* 9(1): 9-15.
- Steffany A, Bennett L, Roberts DCS (2003) Analysis of protein expression in brain tissue by ELISA. *Series Methods in Molecular Medicine*. Vol. 79, *Drugs of Abuse: Neurological Reviews and Protocols*. Wang JQ, (eds.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 283-295.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*. 19(17-19): 2742-2748.
- Wang S, Guo AY, Zheng WJ, Zhang Y, Qiao H, Kennedy IR (2007) Development of ELISA for the determination of transgenic Bt-cottons antibodies against Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Eng. Life Sci.* 7(2): 1-7.
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K (2005) histone deacetylase 19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. *Plant Cell*. 17: 1196-1204.