Crop Biotech.
Winter (2016) 16: 1-12.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال ششم، شماره شانزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۱۲-۱)

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

مریم جمشیدنیا[۱]، سیدکمال کاظمی‌تبار[۲*]، کریستین لایندرمایر[۳]، حمید نجفی زرینی[٤]
۱. دانشجوی دکتری گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲. دانشیار گروه اصلاح‌نباتات 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، نوهربرگ، ۸۵۷٦٤، آلمان
٤. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٦/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۰)

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

Maryam Jamshidnia[1], Sayed Kamal Kazemitabar[2*], Christian Lindermayr[3], Hamid Najafi Zarini[4]
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 پروتیین در مقایسه با روش وقت گیر و پرهزینه تراریختی پایدار گیاهان گسترش یافته است. مطالعه حاضر بیان موقت پروتیین HDA19 را در دو گونه از گیاه tobacco (*Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana*) نشان می‌دهد. برای این منظور پرایمرهای اختصاصی برای واکنش زنجیره ای پلی مراز طراحی و برای همسانه سازی ژن HDA19 در وکتور بیانی pB2GW7 به‌کار رفتند. سازه نوترکیب به *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 انتقال یافت سپس برای تراریختی موقت گیاهان tobacco از طریق اگروباکتریوم استفاده شد. در نهایت وجود ژن هدف در لاین‌های تراریخت اگروباکتریوم از طریق کلونی PCR تأیید گردید. از طرفی بیان پروتیین 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 پروتیین نوترکیب در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* را تایید کرد که ٤۰۰ میکروگرم در گرم وزن بافت تر برگ گیاه بود. با توجه به یافته‌های فوق این گیاه میزبان مناسبی برای تولید HDA19 نوترکیب، نماینده‌ای از پروتیین‌های هیستون داستیلاز، نسبت به *Nicotiana bentamiana* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: HDA19، Tobacco، پروتیین نوترکیب، *Nicotiana tabacum*، *Nicotiana bentamiana*

* نویسنده مسئول: سیدکمال کاظمی تبار
E-mail: sdklkr@ymail.com

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 شیوه‌ی 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. ازجمله‌ی این سیستم‌ها که امروزه برای تولید تجاری ده‌ها پپتید نوترکیب نیز مورد استفاده است سیستم بیانی گیاهان می‌باشد. گیاهان سیستم‌های مناسبی جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب 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 پروتیین‌های 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 پروتیین‌های 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 اگروباکتریوم 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 تنظیم گر کلیدی در رشد گیاه، نمو و پاسخ های تنش های زنده و غیر زنده را بازی می‌کنند. AtHDA19 هیستون داستیلاز از نوع RPD3 می‌باشد که در پاسخ های پاتوژن درگیر است. رونویسی AtHDA19 در آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس 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

می‌کند (Zhou *et al.,* 2005). HDA19 در سرکوب پاسخ‌های دفاعی از طریق سالیسیلیک اسید در آرابیدوپسیس 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 PR[1] افزایش می‌دهد، و نتیجه‌اش افزایش مقاومت به *Pseudomonas syringae* است (Choi *et al.,* 2012). در پروژه حاضر بیان موقت HDA19 در *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* 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 tabacum* و *Nicotiana bentamiana* به‌کار رفتند.

پرایمرها

پرایمرهای مناسب با در نظرگرفتن توالی کوزاک، توالی کدکننده ژن *HDA19* آرابیدوپسیس تالیانا، توالی برچسب His و جداکننده (spacer) به‌منظور شناسایی توالی کدکننده ژن *HDA19* درلاین‌های تراریخت طراحی شدند. این پرایمرها برای تکثیر ژن *HDA19* به‌کار 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 BASTA برای انتخاب لاین‌های تراریخت و CaMV35s (راه انداز ویروس موزاییک گل کلم) می‌باشد.

مواد گیاهی

برگ‌های جوان گیاهان ۵ هفته‌ای *Nicotiana tabacum cv. xanthi* و *Nicotiana bentamiana* 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; Jamshidnia *et al.,* 2017). توالی کدکننده برچسب‌دار 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 اگروباکتریوم و سپس به گیاه انتقال یافتند.

تراریختی *A. tumefaciens* با روش ذوب و انجماد

A. tumefaciens strain GV3101 به‌مدت یک شبانه روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع LB با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپسین کشت داده شد. اگروباکتریوم 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/ HDA19-6xHis) 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

1. Pathogenesis related (PR) genes

شیکر برای ۳ ساعت در ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تراریخت روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسپکتینومایسین کشت داده شدند. پتری دیش ها برای دو روز در ۲۸ درجه سانتی‌گرد انکوبه شدند.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده به هدف شناسایی توالی کدکننده *HDA19* در لاین‌های تراریخت

نام	Sequence 5'-3'	آغازگر
nH6-HDA19fw1	5′AACAATG**CACCATCACCACCATCAC**GGTGGTGGTTCTGATACTGGCGGCAATT CGCTG3′	
nH6-HDA19rew1	5′TTATGTTTTAGGAGGAAACGCCTGCTC3	
cHDA19-H6fw1	5′AACAATGGATACTGGCGGCAATAGGG3′	
cHDA19-H6rew1	5′TTA**GTGATGGTGGTGATGGTG**AGAACCACCACCTGTTTTAGGAGGAAACGCCTGCTG3′	

شکل ۱. طراحی شماتیک از وکتور بیانی pB2GW7. این ساختمان محتوی ژن مقاومت BASTA، راه‌انداز و پایان‌دهنده CaMV35S، توالی کوزاک و توالی کدکننده His-HDA19 می‌باشد.

تراریختی موقت گیاه

بیان موقت دارای مزایای متعددی برای کاربردهای خاص است و قابل رقابت با روش‌های سنتی تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد. بیان موقت بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته قابل انجام و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است. از مزایای برتر این سامانه این است که بیان سازه حاوی ژن مورد نظر قبل از تراریختی دائمی گیاهان مشخص می‌شود. به‌منظور تراریختی موقت *A. tumefaciens* strain GV3101 حامل وکتورهای pDEST نوترکیب به برگ‌های *Nicotiana tabacum* تزریق گردید. برای این کار باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB با آنتی بیوتیک‌ها برای دو روز در ۲۸ درجه سانتی گرادکشت شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط کشت به ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB با آنتی بیوتیک‌ها اضافه گردید و به صورت شبانه روزی در ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا جذب نوری (OD: Optical Density) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ رسید و سپس با دور ۵۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه سلول‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تزریق (۵ گرم در لیتر نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر سوکروز، ۱۰ میلی‌مولار MES pH ۵/۷ و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون) مجدداً در ۵۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و در محیط تزریق تعلیق گردیدند. محلول باکتری به‌دست آمده با استفاده از سرنگ یک میلی‌لیتری در برگ‌های جوان بالایی گیاهان ۵ هفته‌ای و از هرگیاه سه برگ تزریق گردید و این گیاهان تحت شرایط نور طبیعی قرار گرفتند و برگ‌ها در فاصله زمانی ۴-۹ روز برای آزمایشات بعدی چیده و جمع‌آوری شدند (Ma *et al.*, 2012).

بررسی ژن *HDA19* در برگ‌های تراریخت شده

DNA گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از روش CTAB استخراج شدند (Murray and Thompson, 1980). به‌منظور تشخیص وجود ژن‌های HDA19-His و His-HDA19 با استفاده از

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 Tetra Acetic Acid (EDTA)، ۵ میلی‌مولار DTT، ۰/۱ درصد Nonidet P-40، ۱۰ 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 غشاءPVDF 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 ضدموش horseradish peroxidase (Bio Rad) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه به نسبت (۱:۳۰۰۰) به مدت یک ساعت انکوبه گردید. پس از دور ریخت محلول غشاء ۳ مرتبه با TBS-T برای ۵ دقیقه شستشو و در نهایت از TMB[1] 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 در۹۵ درجه سانتی گراد 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 Russell, 2006; Laemmli, 1970).

آنالیز میزان بیان پروتئین 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 نوترکیب 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[2]. در مرحله بعد با یک درصد BSA در محلول نمکی PBS به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور 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

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

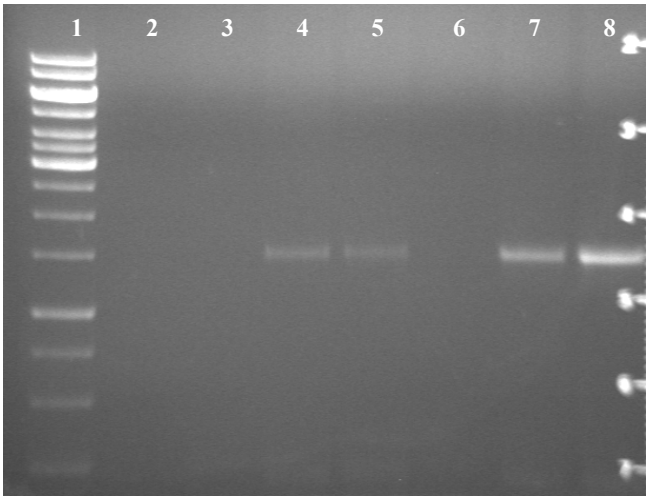
انجام گرفت. پس از رنگ‌آمیزی با TMB محلول یک نرمال اسید سولفوریک برای توقف واکنش اضافه گردید و پلیت‌ها در ۴۵۰ نانومتر و توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد. از پروتیین محلول تام برگ گیاه غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی واکنش استفاده شد وآزمایش در سه تکرار مستقل انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق برگ‌های گیاه *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* به‌عنوان یک سیستم بیان‌کننده و تولید برای پروتیین نوترکیب HDA19 با استفاده از روش بیان موقت مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان از مزایای متعددی به‌عنوان منبع تولید کننده انواع پروتیین‌ها و مواد دارویی، نظیر آنتی‌بادی و واکسن‌ها برخوردارند که به‌عنوان مثال می توان به تولید بالا، توانایی سلول‌های یوکاریوت در تولید و پردازش صحیح پروتیین‌های نوترکیب و عدم آلودگی با انکوژن یا اندوتوکسین‌های باکتریایی اشاره کرد (Julian *et al.,* 2003). توانایی تولید پروتیین‌های دارویی شامل آنتی بادی‌ها، آنزیم‌های صنعتی و پروتیین‌ها با هزینه کم‌تر از دیگر استراتژی‌های تولید می‌تواند بازار جدیدی برای پروتیین‌های تراریخت باز نماید (Lauren *et al.,* 2005). بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می باشد. 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 پروتیین یا فراورده موردنظر در گیاه است. در این تحقیق، گیاه Tobacco به‌عنوان یک گیاه مدل از انتقال ژن نهادینه شده و روش‌های باززایی و همچنین فراهمی سازه‌های بیان برای کنترل بیان ژن سود می برد. تراریختی از طریق اگروباکتریوم روشی برای انتقال ژن‌های هدف به گیاه است (Bergman, 1960). در 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 تزریق اگروباکتریوم برای تولید پروتیین‌های نوترکیب توسط محققان متعددی در دنیا انجام شده و نتایج مطلوبی در سال‌های اخیر داشته است (Krenek *et al.,* 2015). اگرچه بیان پروتیین‌های هیستون داستیلاز در باکتری عمدتاً با شکست مواجه یا پروتیین تولید شده فعالیت کمی را نشان می‌دهد (Fong *et al.,* 2006)، اما از طرفی دیگر بیان پروتیین در گیاه Tobacco احتمال مؤفقیت آن را به میزان قابل توجهی افزایش داد. در این تحقیق پروتیین HDA19 برای بیان انتخاب شد. این پروتیین از ۵۰۱ اسیدآمینه 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 اگروباکتریوم 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 پروتیین پوشش FMDV در tobacco به روش تزریق اگروباکتریومی انجام دادند و میزان بالایی از بیان پروتیین 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 bentamiana* و *Nicotiana glutinosa*) انجام گرفت (Curtis and Andrews, 2005).

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

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت پرایمرهای اختصاصی ژن به‌منظور آزمون وجود ژن *HDA19* داخل ژنوم 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 باندی را در PCR نشان ندادند.

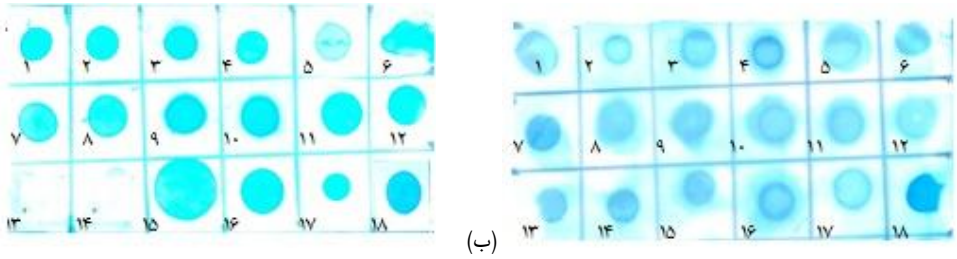


شکل ۲. تأیید توالی کدکننده HDA19 در برگ‌های گیاهان تراریخت. ۱: مارکر ۱ Kb ۲: کنترل منفی (آب) ۳: DNA گیاه غیرتراریخت *Nicotiana tabacum* ۴ و ۵: به ترتیب His-HDA19 و HDA19-His استخراج شده از برگ *Nicotiana tabacum* ۶: DNA گیاه غیر تراریخت *Nicotiana bentamiana*۷ و ۸: به ترتیب His-HDA19 و HDA19-His استخراج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

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، به‌عنوان نشانگر استفاده شد. حضور نقطه‌های رنگ شده بر روی غشاء PVDF تأیید حضور پروتئین نوترکیب تولید شده می‌باشد. بیان HDA19 توسط آنتی‌بادی anti His tag peroxidase و تغییر رنگ سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت در حالی که پروتیین استخراج شده از گیاه غیرتراریخت هیچ تغییر رنگی در سنجش دات بلات نشان نداد. همانگونه که از نتایج دات بلات دیده می‌شود، نمونه پروتیین به‌دست 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 به‌دست آمده از برگ‌های تراریخت *Nicotiana tabacum* سیگنال قوی‌تری را در مقایسه با پروتیین به‌دست آمده از برگ‌های تراریخت *Nicotiana bentamiana* نتیجه داد. پژوهشگران دیگری نیز برای تأیید بیان پروتیین در tobacco از روش دات‌بلات استفاده نمودند. در تحقیقی Ahangarzadeh و همکاران (۲۰۱۲) بیان پروتیین اینترفرون انسانی α2b را در *Nicotiana tabacum*

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



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 ۱۳و ۱۴: پروتیین گیاه غیرتراریخت ۱۸- کنترل مثبت (۵۰ نانوگرم پروتیین خالص دارای برچسب His). ب) بیان پروتیین در برگ‌های گیاه *Nicotiana bentamiana* ۱-۶: بیان HDA19-His ۷-۱۶: بیانHis-HDA19 ۱۷: پروتیین گیاه غیرتراریخت ۱۸- کنترل مثبت (۵۰ نانوگرم پروتیین خالص دارای برچسب His).

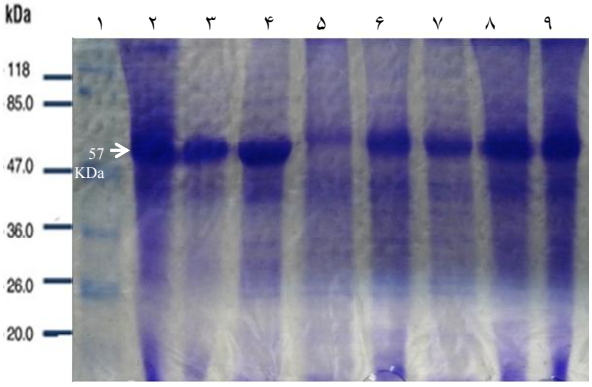
تأیید بیان پروتیین HDA19 با استفاده از SDS-PAGE

برای مشاهده بیان پروتیین‌های تراریخت از ژل SDS-PAGE ۱۲درصد استفاده شد. برای تشخیص پروتئین تراریخت از مقایسه‌ی الگوی باندی پروتئین‌های 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 کیلودالتون) در گیاه تراریخت و غیرتراریخت موجب شد که آنالیز داده‌ها را از روی نتایج SDS-PAGE غیرممکن بسازد.

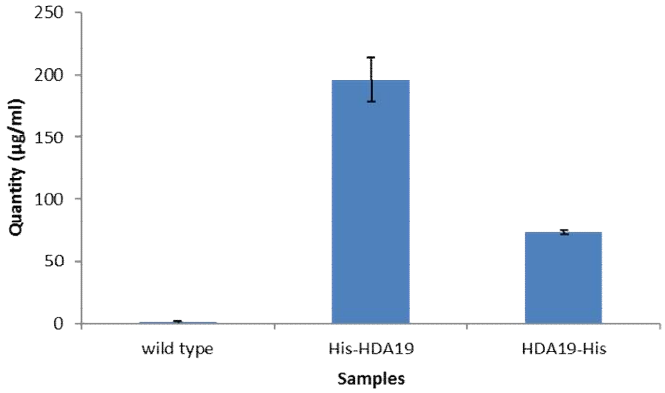
بررسی بیان پروتیین HDA19 با استفاده از الایزا

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

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 به‌کار 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 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.



شکل ۴. بررسی بیان پروتیین HDA19 با استفاده از SDS-PAG. ۱: مارکر پروتیینی ۲: گیاه غیرتراریخت ۳–۵: 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 اگروباکتریوم. 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.

در این تحقیق مشابه با گزارشات قبلی (Streatfield *et al.,* 2001; Kang *et al.,* 2004; Sala *et al.,* 2000; Gil *et al.,* 2001) راه‌انداز CaMV 35S و توالی کوزاک استفاده شدند و کدون‌ها به‌منظور افزایش بیان ژن اپتیمایز شدند. در مطالعه حاضر، باینری وکتور pB2GW7 در تراریختی گیاه به‌کار رفت. این وکتور راه انداز CaMV 35S را حمل می‌کند. در گیاهان دولپه،

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). برچسب His برای شناسایی و خالص سازی پروتیین هدف از پروتیین‌های 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 پروتیین نوترکیب His-HDA19 بیشتر از HDA19-His در برگ‌های گیاه تراریخت به‌دست آمد. اگرچه در SDS-PAGE باند حدود ۵۷ کیلودالتون، معادل باند موردنظر پروتیین HDA19 در گیاهان تراریخت *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana bentamiana* مشاهده گردید ولی روش الایزا تولید پروتیین نوترکیب در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* را تایید کرد. با توجه به یافته‌ها می‌توانیم اظهار کنیم که این گیاه میزبان مناسبی برای تولید HDA19 نوترکیب، نماینده‌ای از پروتیین‌های 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 پروتیین نوترکیب برتری دارد. در تحقیق حاضر برای اولین بار بیان موقت پروتیین 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، نماینده ای از پروتیین‌های هیستون داستیلاز، نسبت به *Nicotiana bentamiana* می‌باشد. همچنین برای اولین بار این تحقیق نشان داد که His-tag الایزا روش مناسبی برای تأیید بیان پروتیین نوترکیب HDA19 در گیاه tobacco است.

REFERENCES

Ahangarzadeh S, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied Kh (2012) Cloning, Transformation and Expression of Human Interfron α2b 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. Biotechn. 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-Torrecuadrada 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-Pirkoohi M, Malekzadeh-Shafaroudi S, Marashi H, Moshtaghi N, Nassiri M, Zibaee S (2014) Transient Expression of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Coat Protein in Tobacco (*Nicotiana tabacom*) 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, Doskocilova 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-α2b. 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 (*Lycopersicum 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.