

مهندسی ژنتیک ژنوم هسته‌ای گیاه برای اختصاصی کردن بیان ژن در کلروپلاست با طراحی و تراریزش سیگما فاکتور هیبرید

مطهره محسن‌پور^{۱*} و مسعود توحیدفر^۲

۱، دکتری اصلاح نباتات، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۲، استادیار و عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

سیستمی با قراردادن پیشبر شوک حرارتی *E. coli* (*groE*) در ناقل پلاستییدی و ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه-باکتری تحت یک پیشبر مختص بافت طراحی گردید تا بتوان بر مشکل کاهش رشد و یا باروری گیاه در انتقال ژن به پلاستید که اغلب به دلیل اثرات تولید دائمی محصول تراژن ایجاد می‌گردد، غلبه نمود. به‌طوری‌که با ترکیب موتیف‌های قسمت انتهایی آمین شبه‌سیگما فاکتور توتون که دارای توالی نشانه برای ورود به کلروپلاست و موتیف برهمکنش با پلیمراز کلروپلاستی می‌باشد با موتیف‌های قسمت C-ترمینال فاکتور سیگما ۳۲ *E. coli* که قدرت تشخیص و اتصال به پیشبر *groE* را دارد، یک فاکتور سیگمای هیبرید گیاه *E. coli* طراحی گردید. این ژن هیبرید موسوم به HSi_g طی مراحل با افزودن نواحی تنظیمی در وکتور آگروباکتریومی کلون‌سازی شد. از وکتور نو ترکیب حاصل برای انتقال ژن به رقم ایرانی توتون استفاده گردید و ردیابی گیاهان تراریخته حاصل توسط آنالیز PCR، سادرن بلات و رونویسی معکوس اثبات گردید. گیاهان تراریخته HSi_g حاصل با استفاده از ناقل pFNGi به روش تفنگ ژنی مورد تراریختی مجدد پلاستید قرار گرفتند و بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت پیشبر *groE* در کلروپلاست، بیان HSi_g در بافت سبز گیاه تراریخته و هدف‌گیری آن به پلاستید با استفاده از پتید نشانه را اثبات نمود. سیستمی که برای بیان GFP در ژنوم کلروپلاستی طراحی و ساخته شد، این قابلیت را خواهد داشت که با جایگزینی هر ژن دلخواه دیگری به جای GFP استفاده و برای اختصاصی کردن بیان ژن در کلروپلاست در کشاورزی ملکولی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، بیان اختصاصی، توتون، سیگما فاکتور هیبرید،

مهندسی ژنتیک پلاستوم

مقدمه

مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصر به فرد را ارائه می‌دهد که شامل: بیان بالای تراژن (Daniell et al. 2002)، مهندسی چندژنی در یک رویداد انتقال ژن (Daniell et al. 2002, De Cosa et al. 2001, Ruiz et al. 2003)، محدود نگاه داشتن تراژن از طریق وراثت مادری^۱ (Daniell 2002)، فقدان خاموشی ژن (De Cosa et al. 2001, Lee et al. 2003)، فقدان اثرات مکانی (Daniell et al. 2002) و پلیوتروپیک (Lee et al. 2003) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد. استفاده از تکنولوژی انتقال ژن به پلاستید به خاطر مشکلاتی نظیر مشکل بودن دستیابی به بیان تنظیمی و انتخابی تراژن‌ها محدود شده است. به استثنای پیشبر *psbD* که توسط نور آبی القا می‌شود، دیگر هیچ پیشبر داخلی که بتواند به طور اختصاصی در پلاستید القا شود، در دسترس نمی‌باشد. بنابراین تراژن‌ها به صورت دائمی در تمامی مراحل رشد و نمو گیاه بیان می‌شوند. در نتیجه رشد گیاه اغلب به خاطر اثرات مضر تولید محصول تراژن مختل می‌گردد (Buhot et al. 2006).

به منظور تلاش برای حل این مشکل Lossi et al. (2005)، یک ژن RNA پلیمراز فاژ T7 که در هسته کد و به پلاستید هدف‌گیری می‌شد را به توتون وارد کردند و ژن مورد نظر را تحت کنترل پیشبر هسته‌ای قابل القا قرار دادند. اما در این سیستم با وجود تجمع mRNA تراژن در سطوح زیاد، پروتئین مربوط به آن ردیابی نمی‌شود و گیاهان به کندی رشد کرده و پس از جوانه زدن سریع از بین می‌روند. در تحقیق دیگری Muhlbaier and Koop (2005) برای کنترل بیان در کلروپلاست‌ها از پیشبر *Lac* باکتریایی استفاده کردند که از

رونویسی تراژن جلوگیری می‌کند. این بازدارندگی تنها پس از اسپری کردن گیاه با ایزوپروپیل بتا-تیو گالاکتوپیرانوزید (IPTG)^۲ رفع می‌شود. به دلیل استفاده از اسپری، این تکنیک محدود به گیاهان گلخانه‌ای و نیز تنظیم تظاهر در بافت‌های هوایی گیاه می‌باشد. در تحقیق دیگری Buhot et al. (2006) روشی بر اساس اصلاح یک فاکتور رونویسی داخلی و اختصاصی کردن آن برای پیشبر خارجی که روی ژنوم پلاستییدی وجود ندارد، به کار بردند. اختصاصی بودن تشخیص پیشبر در باکتری‌ها توسط فاکتورهای آغازکننده رونویسی که فاکتورهای سیگما نامیده می‌شوند، صورت می‌گیرد. اختصاصی بودن تشخیص پیشبر توسط فاکتورهای شبه‌سیگما نیز ایجاد می‌شود. شش فاکتور شبه‌سیگما در ژنوم هسته آراییدوپسیس تالینا^۳ وجود دارند و تمامی آن‌ها ویژگی‌های خانواده سیگما ۷۰ باکتری *E. coli* را دارا می‌باشد. آن‌ها همچنین از یک دامین انتهایی کربوکسیل که DNA را تشخیص می‌دهد و دامین انتهایی آمین که با RNA پلیمراز برهم‌کنش می‌کند، تشکیل شده‌اند. قسمت‌های انتهایی کربوکسیل پروتئین‌های شبه‌سیگمای گیاهی که نواحی پیشبر را تشخیص می‌دهند، به‌خوبی حفاظت شده‌اند (Buhot et al. 2006). براساس این نتیجه می‌توان یک سیستم رونویسی هیبرید (گیاه-*E. coli*) ایجاد نمود و تراژن پلاستییدی را تحت کنترل پیشبر شوک حرارتی *E. coli* یعنی پیشبر *groE* قرار داد و رونویسی از تراژن را با استفاده از یک فاکتور رونویسی شیمیری که ترکیبی از قسمت انتهایی آمین فاکتور سیگما ۱ گیاهی (SLG1) و قسمت انتهایی کربوکسیل فاکتور رونویسی سیگما ۳۲ شوک حرارتی *E. coli* می‌باشد، به‌دست آورد. زیرا

2. Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG)

3. *Arabidopsis thaliana*

1. Transgene containment

AB023572 از پایگاه داده‌ای NCBI¹ دریافت شد. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی مذکور به توالی اسیدآمینه ترجمه گردید و در پایگاه‌های داده پروتئین برای مشخص نمودن محدوده‌ی موتیف‌های فعال پروتئینی مورد آنالیز قرار گرفت.

ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری

قسمت انتهایی کربوکسیل از Sig32 و قسمت انتهایی آمین از NtSig1B به ترتیب با استفاده از الگوی DNA ژنومی *E. coli* و توتون، با استفاده از آنزیم پلیمرز دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی (شرکت Fermentas) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (با استفاده از نرم افزار Vector NTI)، تکثیر شدند. پرایمرهای اختصاصی با افزودن دنباله آزاد به صورت هم‌پوشان بایکدیگر طوری طراحی شدند که امکان اتصال دو قسمت، توسط SOEing PCR² با حفظ ORF اصلی فراهم شود (جدول ۱).

باند حاصل از تکثیر با پرایمرهای sig32-F و sig32-R و نیز باند حاصل از تکثیر با پرایمرهای sigA-F و sigA-R، از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. محصول خالص شده‌ی این دو قطعه با هم به نسبت مولی مساوی مخلوط شدند و به عنوان الگو برای اتصال آن‌ها و ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه/باکتری در SOEing PCR با استفاده از پرایمرهای sigA-F و sig32-R، مورد استفاده قرار گرفتند و قطعه‌ی مربوط به سیگما فاکتور هیبرید موسوم به HSig تکثیر گردید.

کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی

باند مربوط به HSig، پس از خالص‌سازی از روی ژل آگارز (با استفاده از High Pure PCR Product

قسمت انتهایی کربوکسیل فاکتور رونویسی هیبرید شده SLG1/ سیگما ۳۲ باید فقط ژن تحت کنترل پیشبر *groE* را روی ژنوم پلاستیدی تشخیص دهد و قسمت انتهایی آمین آن باید قادر باشد تا با پلیمرز کدشده در پلاستید (PEP) برهم‌کنش نماید. پیشبرهای شوک حرارتی *E. coli* توالی‌های بسیار متفاوتی از پیشبرهای سیگما ۷۰ دارند و فاکتور سیگما ۳۲، RNA پلیمرز را قادر می‌کند تا رونویسی را منحصراً در ژن‌های شوک حرارتی آغاز کند. هولوآنزیم سیگما ۳۲، قادر به تشخیص پیشبرهایی نیست که توسط هولوآنزیم سیگما ۷۰ رونویسی می‌شوند و هولوآنزیم سیگما ۷۰ نیز قادر نیست پیشبرهای شوک حرارتی را تشخیص دهد. مهم اینکه پیشبرهای سیگما ۳۲ در ژنوم کلروپلاستی وجود ندارد یعنی وارد کردن تراژن تحت کنترل پیشبر سیگما ۳۲، بیان بسیار اختصاصی آن را در پی خواهد داشت.

هدف از این تحقیق مهندسی ژنتیک گیاه برای ایجاد سیستمی با استفاده از پیشبر شوک حرارتی *E. coli* و ساخت سیگما فاکتور هیبرید برای بیان اختصاصی و یا قابل القای ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی بود تا مشکل کاهش رشد احتمالی در اثر بیان دائمی و بالای تراژن در گیاهان ترانس‌پلاستومی، برطرف گردد.

مواد و روش‌ها

آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-باکتری

توالی ژن کدکننده‌ی سیگما فاکتور ۳۲ باکتری *E. coli* (*rpoH*) با شماره‌ی دسترسی AY616608 و نیز توالی mRNA کدکننده‌ی سیگما فاکتور گیاه توتون NtSig1B (*sigA*) با شماره‌ی دسترسی

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2. Splicing by Overlap Extension

و *HindIII*، از وکتور pCIB-Hsig خارج و در ناحیه‌ی T-DNA ی ناقل دوگانه‌ی pBI(-k) که قبلاً توسط نویسندگان ساخته شده بود، کلون‌سازی مجدد گردید و در نهایت وکتور حاصل موسوم به pBI(-k)-Hsig به‌دست آمد. این پلاسمید به روش *An et al.* (1986) به آگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل گردید. کلیه مراحل کلون‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های Sambrook and Russel (2001) انجام گرفت.

مواد گیاهی

در این تحقیق از بذر توتون رقم ایرانی جعفرآبادی دریافتی از مرکز تحقیقات توتون تبریز استفاده گردید. بذرها پس از ضدعفونی روی محیط Murashige and Skoog (1962) (MS) حاوی ویتامین‌های MS، کشت شدند.

Purification Kit شرکت Roche)، در حامل اولیه‌ی pTZ57R/T (شرکت Fermentas) کلون‌سازی شد. کلونی‌های *E. coli* سویه XLI-Blue که پلاسمید نو ترکیب را به همراه سیگما فاکتور هیبرید (HSig) دریافت کرده بودند، روی محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین رشد کردند، کلونی PCR به طور اولیه حضور قطعه موردنظر را تأیید کرد و پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های مثبت، آنالیزهای هضم آنزیمی صحت قطعات را اثبات نمود. قطعه‌ی HSig در مرحله‌ی بعد با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* جداسازی و در ناقل pCIB4421 (Ghareyazie et al. 1997) تحت پیشبر اختصاصی بیان در بافت‌سبز PEPC و ترمیناتور 35S قرار گرفت. کاست HSig در مرحله‌ی بعد با هضم آنزیمی ناقص توسط آنزیم‌های *EcoRI*

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق

پرایمر	توالی
sigA-F	5'- CCGTGTAGTAGTCTTGGCTTTTAG -3'
sigA-R	5'- GGTGAGACATCGCAAGTTTTTCTCTAG -3'
sig32-F	5'- CTTGCGATGTCTCACCTGCGG -3'
sig32-R	5'- CTCATCTAGGGTTCTCTGCTTAATAG -3'

قسمت‌هایی از توالی که زیر آن خط کشیده شده نشان دهنده قسمت‌های مکمل همپوشان است.

بالغ توتون به صورت قطعات مربعی شکل به اندازه $1-5 \text{ cm}^2$ بریده شدند و با آگروباکتریوم با $\text{OD}_{600\text{nm}}$ برابر با 0.6 ، آلوده‌سازی شدند. سپس به مدت ۳ روز، در تاریکی و دمای 28°C درجه سانتی‌گراد، روی محیط MS به همراه ویتامین‌های MS و 0.1 میلی‌گرم در لیتر NAA، 1 میلی‌گرم در لیتر BAP، 3 درصد سوکروز، با $\text{pH } 5.7$ و 0.2 درصد ژلرایت که پس از اتوکلاو به آن 100 میکرومولار استوسرینگون اضافه شده بود، قرار گرفتند. پس از همکشتی، ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی که ترکیبات آن مانند محیط ذکر شده در بالا بود، با این تفاوت که به جای استوسرینگون حاوی 250 میلی‌گرم در لیتر

همکشتی با آگروباکتریوم و باززایی گیاهان

یک کلونی از باکتری آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 در 5 میلی‌لیتر از LB مایع همراه با آنتی‌بیوتیک‌های لازم (50 mg l^{-1} کانامایسین و 75 mg l^{-1} ریف‌آمپی‌سین) در دمای 28°C درجه سانتی‌گراد و با دور 200 rpm قرار داده شد. پس از رشد، یک میلی‌لیتر از کشت باکتری در 50 میلی‌لیتر، LB مایع رقیق‌سازی شد و پس از 3 ساعت قراردادن در دور و دمای مذکور، استوسرینگون به غلظت 100 میکرومولار به کشت باکتری‌ها اضافه گردید و تا رسیدن $\text{OD}_{600\text{nm}}$ به 0.6 ، باکتری‌ها دوباره در دور و دمای مذکور قرار گرفتند. برگ‌های

آنالیز سادرن بلات^۲

آنالیز سادرن بلات غیر رادیواکتیو بر اساس دستورالعمل راهنمای استفاده از Dig (DIG Application Manual (Roche Diagnostics GmbH)) انجام شد. یک پروب اختصاصی برای قسمت Sig32 از سیگما فاکتور هیبرید نو ترکیب (HSig) نشاندار شده با Dig توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای sig32-F و sig32-R و با الگو قراردادن قطعه DNA خالص شده HSig، تهیه شد. کل DNA ژنومی توتون با استفاده از DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) استخراج شد و ۱۰ میکروگرم DNA توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI برای لاین تولید شده توسط حامل نو ترکیب pBI(-k)HSig مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. DNA هضم شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید و پس از انجام مراحل انتقال به کاغذ نیتروسولوزی (Blotting) با پروب تهیه شده نشاندار با Dig-dUTP هیبرید شد و سرانجام واکنش رنگی برای مشاهده نتایج سادرن بلات انجام گرفت.

استخراج RNA و آنالیز cDNA تراژن

RNA کل از گیاه تراریخته HSig و گیاه شاهد با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) استخراج شد و به عنوان الگو برای سنتز cDNA با استفاده از cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. قسمت *sigA* نیز علاوه بر HSig در گیاه شاهد و تراریخته برای اثبات رونویسی و اسپیلیاسینگ^۳ مورد آنالیز قرار گرفت.

تراریزش پلاستید و بیان GFP

حامل پلاستییدی pFNGi ساخته شده توسط

سفوتاکسیم^۱ بود، منتقل شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۸ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. واکشت هر ۱۰ روز یک بار، انجام گرفت.

آنالیز گیاهان باززا شده از لحاظ تراریختی

استخراج DNA از گیاهان توتون باززا شده در مراحل اولیه رشد با استفاده از روش Ahmed *et al.* (2009) با اعمال تغییراتی انجام گرفت. در این روش که به خرد کردن بافت گیاهی با استفاده از هاون چینی نیاز نمی‌باشد، مستقیماً از تکه‌ی کوچکی از بافت گیاه در حدود یک سانتی‌متر مربع برای استخراج DNA استفاده شد. واکنش PCR برای ردیابی حضور ژن مورد نظر در گیاهان باززا شده انجام گرفت. در این واکنش از پرایمرهای sigA-F و sig32-R برای ردیابی گیاهانی که HSig (۲۳۰۰ bp) را دریافت کرده بودند، استفاده گردید. علاوه بر این برای آنالیز آسان‌تر گیاهان تراریخته از پرایمرهای sig32-F و sig32-R نیز استفاده گردید. از آنجایی که طول باند مورد انتظار با این پرایمرها کوتاه‌تر است، لذا به راحتی می‌تواند توسط آنزیم پلیمرز Taq تکثیر گردد. جفت پرایمرهای دیگری که برای تأیید صحت تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند M13-F و sig32-F بودند که باند مورد انتظار آن‌ها ۱۰۶۱bp بود.

انتقال به محیط ریشه‌زایی

گیاهانی که به واکنش PCR جواب مثبت دادند، به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. ترکیبات محیط ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS به همراه ویتامین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳ درصد سوکروز، با pH ۵/۷ و ۰/۲ درصد ژلرایت بود که پس از اتوکلاو به آن ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم اضافه شد.

2. Southern blot analysis

3. Splicing

1. Cefotaxime

نویسندگان برای تراریزش پلاستید گیاهان تراریخته HSig با استفاده از تفنگ ژنی به روش Verma *et al.* (2008) مورد استفاده قرار گرفت. ذرات طلا با پلاسمید pFNGi پوشیده شدند و برای بمباران ریزنمونه‌های برگ با استفاده از دستگاه بیولیستیک PDS-1000/He ساخت شرکت Bio-Rad مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان تراپلاستی احتمالی در محیط محتوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین^۱ رشد داده شدند. ترکیبات محیط باززایی همانند قبل بود. برای ردیابی بیان GFP قطعات بافت روی لام شیشه‌ای قرار داده شدند، آب به سطح رویی بافت اضافه شد و سپس با لامل پوشیده شد و زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت^۲ براساس روش Menand *et al.* (1998) مشاهده گردید. علاوه بر گیاهان بمباران شده با GFP، گیاه شاهد بمباران نشده نیز زیر میکروسکوپ به عنوان کنترل منفی مورد مشاهده قرار گرفت.

نتایج و بحث

آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-باکتری

در این تحقیق برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید، ناحیه کدکنده‌ی ۲۶۵ اسیدآمین به انتهای آمین سیگما فاکتور گیاهی (SigA) به ناحیه کدکنده‌ی ۲۳۰ اسیدآمین از انتهای کربوکسیل سیگما فاکتور ۳۲ باکتریایی متصل گردید. بنابراین به ترتیب با قرارگرفتن اسیدآمین‌های ۱ تا ۲۶۵ از سیگما فاکتور گیاهی و سپس اسیدهای آمینه‌ی ۵۴ تا ۲۸۴ باکتریایی، سیگمافاکتور هیبرید گیاه/ باکتری ساخته شد. آنالیز توالی اسیدآمین‌های سیگما فاکتور هیبرید ساخته شده در این تحقیق از نظر حضور دامین‌های

فعال نشان داد که اسیدهای آمینه‌ی ۱۸۰ تا ۳۳۳ هم در آنالیز SigA و هم در آنالیز HSig به عنوان دامین سیگما فاکتور $r2^3$ تشخیص داده شده‌اند (شکل ۱-ب). این در حالی است که اسیدآمین‌های بخش مذکور در HSig از ۱۸۰ الی ۲۶۵ مربوط به گیاه بوده و اسیدآمین‌های ۲۶۵ تا ۳۳۲ از باکتری منشأ گرفته‌اند. بنابراین نیمی از بخش (دامین) $r2$ از سیگما فاکتور گیاهی و نیمی از آن از سیگما فاکتور باکتریایی ساخته شده است. این آنالیز به خوبی نشان داد که سیگما فاکتور هیبرید حاصل به طور بالقوه دارای عملکرد بوده و دامین قسمت ترکیبی از ناحیه‌ی دوم آن همچنان حفظ شده است.

ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری

آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی صحت ساخت فاکتور سیگمای هیبرید و کلون‌سازی آن را تأیید نمودند. مشاهده‌ی باند مورد انتظار ۷۳۱bp حاصل از تکثیر با پرایمرهای sig32-F و sig32-R و باند حدود ۱۵۰۰bp حاصل از تکثیر با پرایمرهای sigA-F و sigA-R، به ترتیب صحت قطعات انتهای آمین سیگما فاکتور توتون و انتهای کربوکسیل از سیگما فاکتور باکتری را تأیید نمود (شکل ۱-د). در نهایت صحت سیگما فاکتور هیبرید حاصل توسط توالی‌یابی تعیین و قسمت مربوط به *sigA* سی توتون پس از آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی از جمله بررسی توالی توسط Blast نوکلئوتیدی و پروتئینی در بانک ژن با شماره دسترسی JF738023.1 ثبت گردید.

کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی

صحت پلاسمیدهای نوترکیب pTZ-Hsig و pCIB-HSig با هضم آنزیمی اثبات شد. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ-HSig با آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* باند مورد انتظار ۲۲۰۰ و ۲۸۰۰

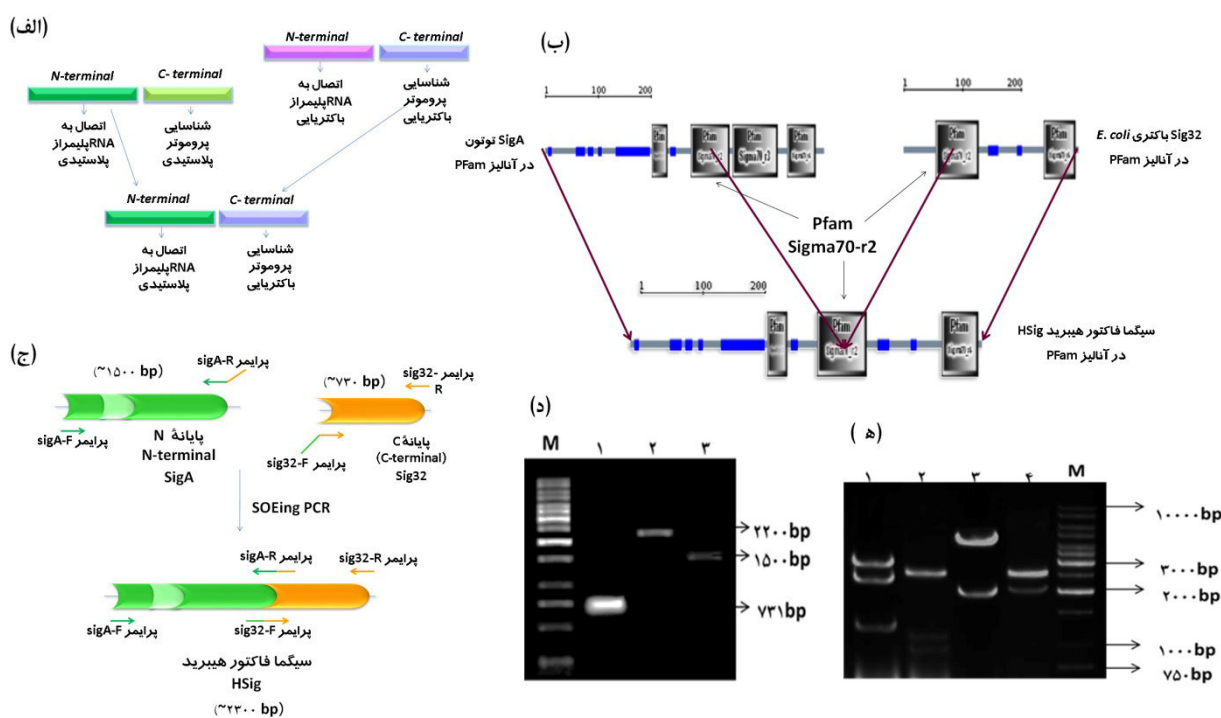
1. Kanamycin

2. Epifluorescence

3. Sigma factor $r2$

متناظر در پلاسمید نو ترکیب pBI(-k) کلون سازی گردید. وکتور حاصل موسوم به pBI(-k)-Hsig (شکل ۲- الف) برای انتقال ژن به هسته‌ی گیاه از طریق آگروباکتریوم برای هدف گیری فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری به پلاستیدها مورد استفاده قرار داده شد.

جفت باز را نشان داد. هضم آنزیمی pCIB-HSig نیز با آنزیم‌های مذکور باند ۲۲۰۰ و ۵۱۴۲ جفت باز را ظاهر نمود (شکل ۱- ه). از هضم ناقص آنزیمی *HindIII* و *EcoRI* برای جداسازی قطعه حدود ۴۶۰۰bp کاست HSig از پلاسمید نو ترکیب pCIB-HSig استفاده گردید. کاست HSig در جایگاه



شکل ۱- نمای شماتیک ساخت، آنالیز دامین‌ها و آنالیز ملکولی تکثیر و کلون سازی سیگما فاکتور هیبرید.

(الف) نمای شماتیک ساخت سیگما فاکتور هیبرید؛ (ب) نمای گرافیکی آنالیز دامین‌ها برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید؛ (ج) نمای شماتیک محل اتصال پرایمرها برای ساخت سیگما فاکتور هیبرید با استفاده از SOEing PCR؛ (د) جداسازی ژن‌های *sig32* باکتریایی (۱) و *sigA* گیاهی (۳) و اتصال آن‌ها توسط SOEing PCR برای تولید سیگما فاکتور هیبرید (۲)، یک میکرولیتر از محصول PCR خالص شده از هر کدام (۱، ۲ و ۳) روی ژل برده شده است؛ (ه) هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pCIB-HSig (۱ و ۳) و pTZ-HSig (۲ و ۴) به منظور اثبات صحت ورود ژن هیبرید HSig، چاهک‌های ۱ و ۲ با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI*، چاهک‌های ۳ و ۴ با آنزیم‌های *BamHI* و *SacI*.

M. نشانگر اندازه‌ی وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas)

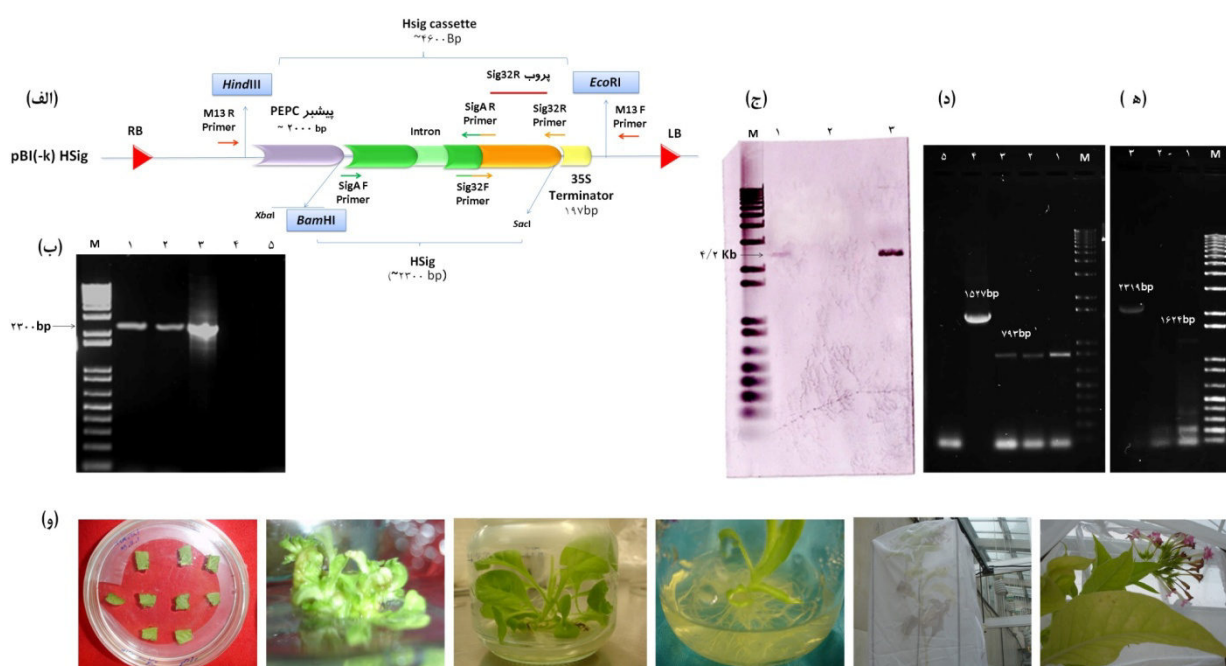
آنالیز گیاهان تراریخته

(شکل ۲-ب) واکنش PCR را با استفاده از پرایمرهای sigA-F و sig32-R نشان می‌دهد. در آنالیز PCR گیاهان باززاشده، تعداد زیادی از آن‌ها به واکنش PCR جواب مثبت دادند. این در حالی بود که در نمونه‌ی شاهد هیچ بانندی مشاهده نگردید. از

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مختلف ورود ژن هیبرید HSig را به گیاهان به اثبات رسانید واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مختلف ورود ژن هیبرید HSig را به گیاهان به اثبات رسانید

تراریخته HSig بود با دستیابی به حتی یک گیاه نیز تأمین می‌گردید. لذا یکی از گیاهان تراریخته حاصل (شکل ۲- و) برای سایر آنالیزهای ملکولی نظیر اثبات الحاق ژن توسط سادرن بلات (شکل ۲- ج) و اثبات رونویسی توسط ساخت cDNA (شکل ۲- د، شکل ۲- ه) مورد آنالیز قرار گرفت.

آنجایی که تشخیص گیاهان باززاشده‌ی مجزا بسیار مشکل بود، این احتمال وجود دارد که این میزان بالای تراریختی مربوط به کلون‌های تراریخته‌ی یکسان بوده باشد. اثبات این قضیه نیاز به آنالیزهای ملکولی بیشتری خواهد داشت که به تحقیقات بعدی موکول شد و نیاز این تحقیق که دستیابی به گیاه



شکل ۲- نمای شماتیک پلاسمید نو ترکیب pBI(-k)HSig (الف)، آنالیز ملکولی گیاهان تراریخته HSig (ب، ج، د، ه) و مراحل تولید گیاه تراریخته حاوی سیگما فاکتور هیبرید (و).

(ب) واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی سیگما فاکتور هیبرید (sigA-F و sig32-R) برای دو نمونه گیاه توتون تراریخته (۱ و ۲)؛ پلاسمید pBI(-K) HSig به عنوان کنترل مثبت (۳)؛ گیاه شاهد (۴) و واکنش PCR بدون الگو یا کنترل منفی (۵). (ج) آنالیز سادرن بلات گیاه تراریخته HSig برای تست الحاق تراژن برای توتون تراریخته‌ی HSig (۱)؛ گیاه شاهد غیر تراریخته (۲)؛ پلاسمید pBI(-k)HSig (۳). (د و ه) اثبات رونویسی و اسپیلیسینگ ناحیه *sigA* (د) و ژن HSig (ه) با استفاده از cDNA کل به عنوان الگو؛ (د): (۱) و (۲) گیاه تراریخته؛ (۳) گیاه شاهد؛ (۴) پلاسمید pBI(-k)HSig؛ (۵) کنترل منفی (واکنش PCR بدون استفاده از الگو). (ه) (۱) تراریخته، (۲) شاهد و (۳) پلاسمید pBI(-k)HSig. نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb plus DNA ladder) (Invitrogen). (و) مراحل تولید گیاهان توتون تراریخته با سیگما فاکتور هیبرید؛ از چپ به راست ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با آگروباکتریوم، باززایی نمونه‌ی برگی در محیط شاخه‌زایی، گیاه توتون باززاشده در محیط ریشه‌زایی، انتقال به گلدان و نگهداری در شرایط گلخانه تراریخته و در نهایت گلدهی توتون تراریخته را نشان می‌دهد. (و) مراحل تولید گیاهان توتون تراریخته با سیگما فاکتور هیبرید؛ ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده با آگروباکتریوم، باززایی نمونه‌ی برگی در محیط شاخه‌زایی، گیاه توتون باززاشده در محیط ریشه‌زایی، انتقال به گلدان و نگهداری در شرایط گلخانه تراریخته و در نهایت گلدهی توتون تراریخته را نشان می‌دهد.

کربوکسیل فاکتور سیگما ۳۲ *E. coli* که قدرت تشخیص و اتصال به پیشبر *groE* را دارد، فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-*E. coli* طراحی شد. محل اتصال قسمت انتهایی آمین گیاهی و انتهایی کربوکسیل باکتریایی در HSig ساخته شده در این تحقیق، در حدود مرکز ناحیه ۲ قرار گرفته است، بنابراین نیمی از بخش (دامین) ۲ از سیگما فاکتور گیاهی و نیمی از آن از سیگما فاکتور باکتریایی تشکیل شده است.

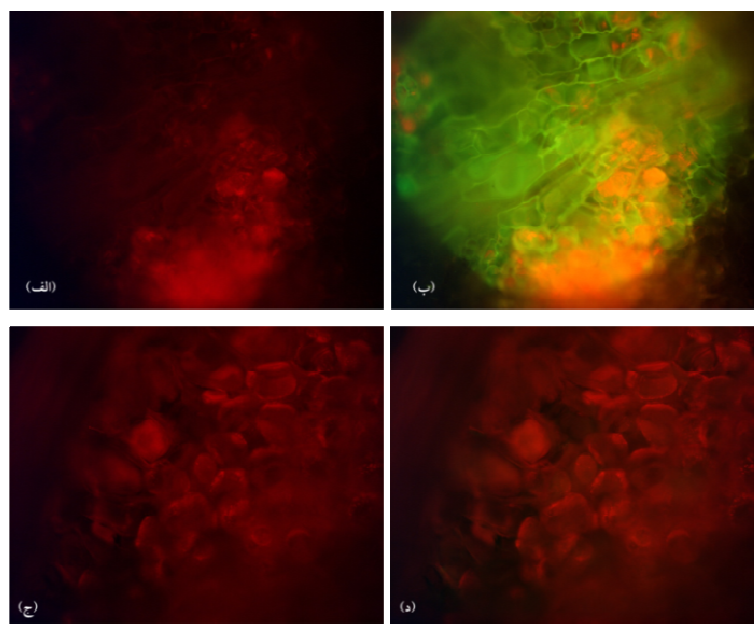
ناحیه ۲ از سیگما فاکتور ۷۰ حفاظت‌شده‌ترین ناحیه‌ی پروتئین کامل است. تمامی اعضای این کلاس از سیگما فاکتور، ناحیه ۲ را شامل می‌شوند. حفاظت‌شدگی بالای این ناحیه به این علت است که ناحیه ۲ هم دارای ماریپج^۱ تشخیص‌دهنده‌ی ناحیه ۱۰- پیشبر و هم دارای ماریپج متصل‌شونده به مرکز RNA پلیمراز می‌باشد. ماریپج متصل‌شونده به مرکز آنزیم^۲، با دامین گیره‌مانند^۳ بزرگترین زیرواحد پلیمراز یعنی β' برهم‌کنش می‌کند (Campbell *et al.* 2006). جزء آروماتیک ماریپجی که در انتهایی کربوکسیل از این دامین قرار دارد، باعث جداشدن دو رشته شده و باعث آغاز رونویسی می‌گردد.

ناحیه ۲ سیگما فاکتورهای نوع سیگما ۷۰ را می‌توان به ۴ قسمت تقسیم نمود: ۲/۱، ۲/۲، ۲/۳ و ۲/۴. از آنجایی که نواحی ۲/۱ و ۲/۲ در اتصال به آنزیم RNA پلیمراز نقش مهمی دارند (Murakami *et al.* 2002; Vassilyev *et al.* 2002; Lysenko. 2007)، لذا در این تحقیق قسمت گیاهی توالی سیگما فاکتور هیبرید، طوری انتخاب و جداسازی گردید که این دو ناحیه را دربرداشته باشد، زیرا سیگما فاکتور هیبرید حاصل می‌بایست قادر به تشخیص RNA پلیمراز پلاستییدی (PEP) باشد.

cDNA کل برای گیاهان تراریخته و شاهد به منظور آنالیز رونویسی و اسپیلیاسینگ ژن سیگما فاکتور هیبرید (HSig) ساخته شد. انتظار بر این بود که ناحیه‌ی *sigA* دربردارنده‌ی یک اینترون باشد. ظهور قطعه تکثیری ۷۹۳bp توسط پرایمرهای *sigA*، حذف اینترون و صحت اسپیلیاسینگ آن را تایید نمود. از آنجایی که گیاه نوع وحشی نیز ژن *sigA* را دارا بود لذا باند ۷۹۳bp هم در گیاه شاهد و هم در تراریخت مشاهده گردید. این در حالی بود که ظهور باند ۱۶۴۲bp به جای باند ۲۳۱۹bp که توسط پرایمرهای *sigA-F* و *sig32-R* در گیاه تراریخته مشاهده شد و در گیاه شاهد حضور نداشت، حضور تراژن HSig را فقط در گیاه تراریخته به اثبات رسانید (شکل ۲-د، شکل ۲-ه). از سویی دیگر امکان ردیابی وجود پروتئین حاصل از بیان پروتئین HSig با استفاده از آنالیز وسترن‌بلات به علت وجود پروتئین‌های داخلی مشابه، منطقی به نظر نمی‌رسید. لذا اثبات بیان پروتئین هیبرید HSig، پس از انتقال ژن تحت پیشبر *groE* به پلاستوم گیاه، میسر می‌شد. بهترین راه برای اثبات عملگرا بودن این سیستم القایی بیان HSig و نیز اثبات انتقال پروتئین آن به کلروپلاست، فرستادن یک ژن گزارشگر تحت پیشبر *groE* به کلروپلاست بود. بیان ژن گزارشگر به صورت مختص بافت در بافت‌های سبز، عملگرا بودن این سیستم القایی انتقال ژن به کلروپلاست را اثبات می‌نمود. بیان پروتئین فلورسنت سبز با استفاده از یک میکروسکوپ اپی-فلورسنت (Nikon Eclipse E1000) بررسی گردید (شکل ۳). برگ‌های بمباران‌شده با پلاسمید نوترکیب pFNGi بیان GFP را با مشاهده فلورسنت سبز نشان دادند (شکل ۳-ب).

با ترکیب موتیف‌های قسمت انتهایی آمین شبه‌سیگما فاکتور توتون که علاوه بر توالی نشانه برای ورود به کلروپلاست (Kosuke *et al.* 2000) دارای موتیف برهمکنش با RNA پلیمراز پلاستییدی (PEP) می‌باشد با بخش‌های قسمت انتهایی

1. Helix
2. Core Enzyme
3. Clamp



شکل ۳- آنالیز بیان GFP برای گیاهان توتون تراریخته و شاهد (غیرتراریخته).

فلورسنت با استفاده از یک میکروسکوپ اپی-فلورسنت (Nikon Eclipse E1000) با بزرگنمایی ۱۰ مشاهده گردید: (الف) فلورسنت قرمز مربوط به کلروفیل در برگ توتون تراریخته با استفاده از G-2A filter set مشاهده گردید؛ (ب) فلورسنت GFP در برگ توتون تراریخته با استفاده از B-2A filter set مشاهده شد؛ (ج) و (د) برگ گیاه شاهد را به ترتیب با استفاده از G-2A و B-2A نشان می‌دهد.

کلروپلاست هدف‌گیری نماید و بیان ژن گزارشگر GFP که پس از دستیابی به گیاهان تراریخته‌ی HSiG به کلروپلاست این گیاهان منتقل گردید، می‌تواند دلیل محکمی بر انتقال سیگما فاکتور هیبرید توسط پپتید نشانه به کلروپلاست باشد، زیرا ژن GFP که تحت پیشبر *groE* به کلروپلاست منتقل گردید، بدون حضور سیگما فاکتور هیبرید قادر به بیان نمی‌باشد.

در دامین δ_2 ، نواحی ۲/۱ و ۲/۲ به ماریپچ " β " آنزیم RNA پلیماز متصل می‌شوند، در حالی که ناحیه ۲/۳ و ۲/۴ به DNA در محل پیشبر متصل می‌گردند (Wilson *et al.* 1997, Hsu *et al.* 2004, Lysenko 2007). ناحیه ۲/۳ در جدا شدن دو رشته در محل پیشبر شرکت دارد و ناحیه ۲/۴ به رشته الگو نزدیک ناحیه ۱۰- پیشبر متصل می‌شود. در این تحقیق قسمت‌های سیگما فاکتور گیاهی و باکتریایی طوری به یکدیگر متصل شد که نواحی

نواحی ۲/۳ و ۲/۴ که در تشخیص پیشبر و اتصال به DNA در ناحیه‌ی پیشبر نقش دارند، از باکتری جداسازی شد. اتصالات با طراحی پرایمرهای هم‌پوشان به گونه‌ای صورت گرفت که ORF اصلی حفظ گردد. حذف جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* در محل اتصال دو جزء هیبرید، تنها با تغییر یک نوکلئوتید و بدون تغییر در اسیدآمین، انجام گرفت. قسمت کوچکی از انتهای آمین شامل پپتید نشانه^۱ است. این پپتید نشانه انتقال پروتئین را از سیتوسول به کلروپلاست فراهم نموده و پس از اینکه پلی‌پپتید به اندامک رسید بریده می‌شود. لذا در این تحقیق انتهای آمین سیگما فاکتور *SigA*ی توتون که در ابتدای ناحیه‌ی کدکننده ژن هیبرید قرار داده شده، توانست ژن هیبرید سیگما فاکتور (HSiG) را به

1. Transit peptide

(محصولات) ژنی یا تغییرات متابولیکی ایجاد شده توسط محصولات ژنی جدید، در صورتی که بیان ژن به صورت دائمی^۱ باشد، ممکن است مشکل ساز گردد (Lossl *et al.* 2003, Herz *et al.* 2005, Chakrabarti *et al.* 2006). بنابراین اگر بتوان بیان ژن در پلاستید را در زمان یا بافت دلخواه، روشن و خاموش نمود، در پژوهش‌های بنیادی می‌تواند بسیار با ارزش باشد. بیان ژن‌های پلاستییدی در سطح رونویسی و توسط پیشبرهای تنظیمی که باعث بیان متفاوت ژن در پاسخ به پارامترهای فیزیولوژیکی، نموی یا مختص بافت می‌شوند، کنترل نمی‌گردد. بنابراین بیان القایی در پلاستیدها نمی‌تواند با استفاده از عناصر کنترلی درون‌زاد پلاستییدی، حاصل گردد (Clarke and Daniell. 2011). لذا در این تحقیق با ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه/باکتری (Hsig) تلاش شد تا بر این مشکل غلبه گردد.

در گزارشات قبلی، اولین کنترل خارجی بیان ژن در پلاستید با استفاده از قراردادن تراژن پلاستییدی تحت پیشبر فاژی T7 و با استفاده از یک پلیمرز T7 که توسط هسته گیاه تراریخت رمز شده و به اندامک منتقل می‌شد، انجام گرفت (McBride *et al.* 1994) و تا حدودی بیان کنترل شده حاصل گردید (Magee *et al.* 2004a). هنگامی که همان ژن‌ها توسط پلیمرز T7 قابل القاء توسط اتانول، بیان شدند، اثرات منفی مشاهده شده در هنگام بیان دائمی آن‌ها دیگر وجود نداشت (Lossl *et al.* 2005). با این حال این سیستم چندان مطلوب نبود و علت آن را می‌توان این‌چنین بیان نمود که پیشبر T7 در شرایط آزمایشگاهی توسط RNA پلیمرز کدشونده توسط هسته شناخته می‌شود و در این صورت در شرایط طبیعی و بیرون از آزمایشگاه نیز باعث بیان غیرالقایی

۲/۱ و ۲/۲ دامین ۲ از سیگما فاکتور گیاهی یعنی اسیدآمینوهای انتهایی آمین از SigA و نواحی ۲/۳ و ۲/۴ از توالی Sig32 باکتریایی گرفته شوند. محدوده دامین‌های فعال که پس از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مشخص شده بود و اتصال صحیح دامین‌ها که از طریق طراحی پرایمر و انجام PCR هم‌پوشان صورت گرفته بود، پس از آنالیزهای ملکولی مختلف و نیز بررسی نتیجه توالی‌یابی به طور کامل تأیید گردید. سیگما فاکتور هیبرید طراحی شده در این تحقیق، با فعال نمودن بیان ژن GFP هدف‌گیری شده توسط pFNPI به کلروپلاست، نشان داد که دارای هر دو عملکرد مورد انتظار یعنی برهم‌کنش با RNA پلیمرز پلاستییدی و تشخیص پیشبر باکتریایی *groE* می‌باشد.

به دو دلیل در این تحقیق از سیگما ۳۲ باکتریایی برای ساخت هیبرید سیگما استفاده گردید: اول استفاده از پیشبر *groE* بوده که سیگما فاکتور ۳۲ قادر است اختصاصاً آن را شناسایی کند و دوم اینکه پیشبر *groE* توسط RNA پلیمرز پلاستییدی در حالت طبیعی شناسایی نمی‌شود (Buhot *et al.* 2006). در صورتی می‌توان از سایر سیگما فاکتورها به جای سیگما ۳۲ استفاده کرد که به جای *groE* در وکتور پلاستییدی از پیشبرهایی که به طور اختصاصی تنها توسط همان فاکتورها شناسایی می‌شوند، استفاده گردد و نیز از این موضوع اطمینان حاصل شود که RNA پلیمرز پلاستییدی نمی‌تواند آن پیشبرها را در حالت عادی شناسایی کند که در غیر این صورت بیان اختصاصی با مشکل مواجه خواهد گردید.

در این تحقیق بیان القایی ژن در پلاستید با استفاده از سیگما فاکتور هیبرید مدنظر قرار داده شد. بیان القایی ژن در پلاستید به چند دلیل بسیار مورد علاقه محققین قرار گرفته است. اگر نوعی القاء ژن، قبل یا بعد از برداشت میسر شود که اقتصادی نیز باشد، می‌توان از بار متابولیکی اضافی در طول رشد و نمو اجتناب نمود. علاوه بر این، اثرات منفی محصول

خواهد شد. علاوه بر این، بیان بعضی از ژن‌های پلاستییدی در حضور پلیمراز T7 تغییر می‌کند حتی اگر آن ژن‌ها پیشبر T7 نداشته باشند (Magee et al. 2007) Buhot et al. (2006) استفاده از پیشبر *groE* باکتری *E. coli* را گزارش دادند که توسط تشکیلات رونویسی پلاستییدی قابل تشخیص نمی‌باشد. کنترل بیان ژن در این مورد توسط بیان موقت^۱ یک کاست بیانی هسته‌ای برای سیگما فاکتور شیمر حاصل می‌شود که برهمکنش RNA پلیمراز کدشده در پلاستید (PEP) و پیشبر باکتریایی را واسطه‌گری می‌کند.

در این تحقیق ما از یک سیگما فاکتور هیبرید توتون *E. coli* / برای تولید یک زمینه پایدار گیاهی به منظور بیان غیردائمی ژن در گیاه تراریخته استفاده نمودیم. تمامی روش‌هایی که در بالا ذکر شدند نیازمند یک تراژن القاکننده بیان هستند که در هسته کد شده و به پلاستید منتقل می‌شود. در گزارشات قبلی لاین‌های تراپلاستی اولیه، دارای یک ژن غیرفعال بودند که با تراریزش ثانویه به هسته، بیان آن‌ها امکان‌پذیر می‌گردید. در این تحقیق یک گیاه تراریخته پایه تولید گردید که عامل القاءکننده را دربرداشته باشد و سپس این گیاه تراریخته برای تراریزش ژن دلخواه به پلاستید مورد استفاده قرار گرفت. این سیستم امکان بیان مختص بافت را برای ژن دلخواهی که به ژنوم پلاستییدی هدف‌گیری می‌گردد، فراهم می‌نماید. الحاق GFP در پلاستوم و رسیدن به هموپلاسمی در این تحقیق مورد مطالعه قرار نگرفت زیرا هدف از انتقال GFP به کلروپلاست تنها اثبات بیان آن تحت پیشبر *groE* و توسط سیگما فاکتور هیبرید بود. از آنجایی که پیشبر *groE* توسط پلیمرازهای گیاهی شناسایی نمی‌شود، تنها سیگما فاکتور هیبرید هدف‌گیری شده به کلروپلاست

قادر است با برهم‌کنش با RNA پلیمراز کلروپلاستی ژن GFP تحت این پیشبر را بیان نماید. گیاه تراریخته توتون حاوی HSig که در این تحقیق تولید شد را می‌توان برای بیان ژن دلخواه در بافت‌های سبز مورد استفاده قرار داد. ژن دلخواه می‌بایست جایگزین ژن GFP در ناقل پلاستییدی گردد. استفاده از پیشبرهای مختص بافت و القایی دیگری برای ژن HSig منتقل شده به هسته، می‌تواند منجر به تنظیم دلخواه بیان ژن در ژنوم پلاستید گردد. در این تحقیق از پیشبر PEPC استفاده گردید که بیان ژن را تنها در بافت‌های سبز منجر می‌گردد، علت استفاده از این پیشبر، عدم بیان آن در اندام‌های زایشی و در نتیجه کاهش اثرات منفی بیان تراژن در باروری گیاه بود. ولی در مواردی که بیان تراژن اثرات منفی در مراحل تراریزش ریزنمونه‌های سبز داشته باشد، استفاده از پیشبرهای مختص بافت و یا القایی دیگر، توصیه می‌گردد. هر پیشبر القایی یا مختص بافت دیگری که به جای پیشبر PEPC در این سیستم قرار گیرد می‌تواند بیان القایی یا مختص بافت ژن هدف موردنظر که قرار است به ژنوم کلروپلاستی منتقل شود را تحت کنترل خود درآورد. امید است گیاهان تراریخته‌ی HSig پایه‌ی اولیه‌ی مناسبی به عنوان کارخانه‌های سبز زیستی یا بیوراکتورهایی برای بیان مواد با ارزش در گیاهان باشند، بدون اینکه بار متابولیکی اضافه در تمام قسمت‌های گیاه یا در تمام مدت عمر گیاهی ایجاد نمایند و بدین ترتیب روی رشد و باروری گیاه اثر سویی ایجاد نگردد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmad W, Mirza B (2009) High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *J Appl Genet.* 50 (2): 05–107.
- An G, Wastson BD and Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol.* 81: 301-305.
- Buhot L, Horvath E, Medgyesy P, Lerbs-Mache S (2006) Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression. *Plant J.* 46: 700-7007.
- Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell.* 9 (3): 527-39.
- Chakrabarti SK, Lutz KA, Lertwiriawong B, Svab Z, Maliga P (2006) Expression of the *cry9Aa2* B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. *Transgenic Res.* 15: 481-488.
- Clarke JL, Daniell H (2011). Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.* 77 (1-2): 203.
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20: 581–586.
- Daniell H, Khan M, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7(2): 84–91.
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* 19: 71–74.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, Palma GM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS and Bennett J (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA(b)* gene. *Mol. Breed.* 3: 401–414.
- Herz S, Fussl M, Steiger S, Koop HU (2005) Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. *Transgenic Res.* 14: 969-982.
- Hsu HH, Huang WC, Chen JP, Huang LY, Wu CF, Chang BY (2004) Properties of *Bacillus subtilis* sigma A factors with region 1.1 and the conserved Arg-103 at the N terminus of region 1.2 deleted. *J. Bacteriol.* 186: 2366–2375.
- Kosuke O, Makoto F, Emi N, Kan T, Hideo T (2000) Characterization of two plastid factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene.* 261: 221-228.
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breed.* 11: 1–13.
- Lossl A, Bohmert K, Harloff H, Eibl C, Mu-hlbauer S, Koop HU (2005) Inducible trans-activation of plastid transgenes: Expression of the *R. eutropha* ph6 operon in transplastomic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 46: 1462–1471.
- Lossl A, Eibl C, Harloff H, Jung C, Koop HU (2003) Polyester in transplastomic tobacco: significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.* 21: 891–899.
- Lysenko EA (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Rep.* 26: 845–859.
- Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesy P, Kavanagh TA (2004a) T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. *Transgenic Res.* 13: 325-337.
- Magee AM, MacLean D, Gray JC, Kavanagh TA (2007) Disruption of essential plastid

- gene expression caused by T7 RNA polymerase-mediated transcription of plastid transgenes during early seedling development. *Transgenic Res.* 16:415–428.
- McBride KE, Schaaf DJ, Daley M, Stalker DM (1994) Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7301-7305.
- Menand B, Marechal-Drouard L, Sakamoto W, Dietrich A, Wintz H (1998) A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11014-11019.
- Muhlbauer SK, Koop HU (2005) External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor. *Plant J.* 43: 941-946.
- Murakami KS, Masuda S, Darst SA (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science.* 296: 1280–1284.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3): 473-497.
- Ruiz ON, Hussein H, Terry N, Daniell H (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.* 132: 1344–1352.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Vassilyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassilyeva MN, Borukhov S, Yokoyama S (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature.* 417: 712–719.
- Verma D, Samson NP, Koya V, Daniell H (2008) A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat. Protoc.* 3: 739–758.
- Wilson C, Dombroski AJ (1997) Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 267: 60–74.

Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific Gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor

M. MOHSENPOUR^{1*} AND M. TOHIDFAR²

1, Ph. D. of plant Breeding, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII),

2, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

(Received: Nov. 2, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

A system was designed using *E. coli* heat shock promoter (*groE*) in plastid vector and a hybrid plant/bacteria sigma factor was constructed under control of a tissue specific promoter. This system was designed for overcome to deleterious effects on plant growth and fertility that may be caused by transgene overexpression. So that hybrid sigma factors contained N-terminal motives of tobacco sigma factors including chloroplast signal peptide and RNA polymerase interaction domains, composed by C-terminal motif of *E. coli* sigma32 that able to recognition and binding to *groE* promoter. Then this gene, Hsig, was cloned in *Agrobacterium* vector after adding regulatory elements. The result vector was used for transformation of an Iranian variety of tobacco. Detection of transgenic plants was performed by PCR, southern blot and RT-PCR analysis. The Hsig gene expression and its targeting to plastid was confirmed after transformation of tobacco chloroplast using gene gun technique for targeting of green florescent protein (GFP) under control of *groE* promoter using pFNGi vector into transgenic Hsig explants. We hope that the system that was designed and constructed in this study for GFP expression in chloroplast genome, be able to apply in molecular farming for expression of any other desired genes instead of GFP for specific gene expression in chloroplast.

Keywords: Hybrid sigma factor, Plastome genetic engineering, Specific gene expression, Tobacco, Transformation

* Corresponding author: M. Mohsenpour

E-mail: mthrh@yahoo.com