Crop Biotech.
Autumn (2014) 7: 49-58.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هفتم، پاییز ۱۳۹۳ (۶۹-۵۹)

ساخت و بررسی کارآیی ناقل بیانی گیاهی pBI105، با هدف سهولت همسانه‌سازی و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

کسری اصفهانی[1]* و علی هاتف سلمانیان[2]
۱. استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۱۱)

Construction and functional analysis of pBI105, a plant expression vector to facilitate cloning and recombinant protein purification

K. ESFAHANI[1]* AND A. H. SALMANIAN[2]
1. Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
2. Associated Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
(Received: Sep. 18, 2014 -Accepted: Dec. 2, 2014)

چکیده

ناقلین دوتایی مرسوم مثل pBI121 که هنوز به طور گسترده‌ای در انتقال ژن به گیاه به واسطه آگروباکتریوم استفاده می‌شوند، عمدتاً تعداد محدودی جایگاه منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی در جایگاه همسانه‌سازی خود دارند. همچنین این ناقل‌ها فاقد بسیاری از عناصر و توالی‌های مفید مثل توالی‌های مورد استفاده در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب هستند. در این مقاله یک ناقل بیانی جدید گیاهی با جایگاه همسانه‌سازی توسعه‌یافته شامل توالی شناسایی منحصر به فرد ۱۳ آنزیم برشی، توالی رمز کننده His-Tag با تکرار هشت اسید آمینه هیستیدین برای خالص‌سازی پروتئین نوترکیب و توالی مورد شناسایی آغازگر عمومی M13، معرفی می‌شود. پس از طراحی و ساخت این ناقل، صحت ساخت آن با روش‌های مولکولی مانند PCR، بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. برای بررسی کارآیی ناقل جدید، ژن گزارشگر β-galactosidase در آن همسانه‌سازی شده و سازه حاصل و همچنین ناقل pBI121 به عنوان کنترل، به *آگروباکتریوم تومی فاشینس* سویه LBA4404 منتقل و در نهایت به گیاه توتون، رقم سامسون منتقل شدند. پس از انجام مراحل باززایی، انتقال ناحیه T-DNA این ناقل به گیاهچه‌های توتون با روش PCR بررسی و تایید شد. سنجش فعالیت GUS در گیاهان تراریخت حاکی از بیان مؤثر ژن گزارشگر و کارآیی این ناقل جدید در تراریختی گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ناقل بیانی گیاهی، انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، تراریختی گیاه، pBI105.

Abstract

Binary vectors such as pBI121 are widely used for introducing genes of interest into plants via Agrobacteriun-mediated transformation method. These vectors usually have low number of unique recognition sites of restriction enzymes in their multiple cloning sites. They also lack elements such as sequences necessary for protein purification. In this article, a new plant expression vector with a developed multiple cloning site including recognition sites of 13 restriction enzymes, a sequence for coding 8xHis-Tag to purify recombinant proteins and the sequence of M13 reverse sequencing primer, is introduced. Construction of new vector was confirmed by PCR, digestion pattern analysis, and sequencing. The T-DNA regions of the new vector and pBI121 as a control sample were transformed to *Nicotiana tabbacum* L. cv. Samsun by using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Integration of T-DNA of the vector to the genome of plantlets, which were regenerated on selective culture, was analyzed by PCR. GUS assay also confirmed expression of the transgene in transgenic seedlings. These evidences indicated that the new plant expression vector, pBI105, is efficient for plant transformation.

Keywords: Plant expression vector, Agrobacteriun-mediated transformation, Plant transformation, pBI105.

* نویسنده مسئول: کسری اصفهانی
E-mail: kasra13@nigeb.ac.ir

مقدمه

ناقلین دوتایی[1] به طور گسترده‌ای در انتقال ژن به گیاه به واسطه آگروباکتریوم به کار می‌روند (Gelvin, 2003). سهولت دست‌ورزی ژنتیکی با استفاده از ناقلین دوتایی، باعث فراگیری آنها در آزمایشگاه‌های زیست مولکولی شده است (Lee and Gelvin, 2008). نکته کلیدی در طراحی این ناقلین کشف این موضوع بود که امکان جدا ساختن ناحیه منتقل شونده به ژنوم گیاه (T-DNA) و عوامل ژنتیکی مسئول این انتقال (*vir* genes) و قرار دادن آنها بر روی رپلیکون‌های مجزا وجود دارد. این کشف منجر به کوچک‌تر شدن ناقلینی شد که توسط دانشمندان مورد دست‌ورزی قرار می‌گرفت و کار را برای انتقال ژن به گیاه نیز تسهیل نمود (Lee and Gelvin 2008; Komori et al., 2007).

در سال‌های اخیر ناقلین دوتایی فراوانی جهت انتقال ژن به گیاهان بهینه‌سازی شده‌اند (Karimi *et al*., 2013; Sripriya *et al*., 2011; Tanaka *et al*., 2011; Lin *et al*., 2011; Nakamura *et al*., 2010) (مقالات مروری: Lee & Gelvin, 2008; Hellens *et al*., 2000). از جمله خصوصیات و مزایای ناقلین جدید، وجود جایگاه‌های تشخیصی آنزیم‌های برشی متعدد و متنوع خصوصاً جایگاه تشخیصی آنزیم‌هایی که توالی‌های نادر را شناسایی کرده و برش می‌دهند، تعداد نسخه‌های تکثیرشده بالا (High copy number) در *E. coli*، امکان همسانه‌سازی قطعاتی با طول زیاد در آنها، سازگاری بهتر با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، داشتن نشانگرهای انتخابی متنوع و کارآیی و فراوانی بالاتر جهت تراریختی گیاه می‌باشد. فناوری GATEWAY ارایه شده توسط شرکت Invitrogen و ناقلین مبتنی بر آن، تحولی در همسانه‌سازی ژن‌ها در ناقلین بیانی گیاهی بر اساس نوترکیبی ایجاد نموده است (Karimi *et al*., 2002). آخرین سری ناقلین معرفی شده از این مجموعه در انتقال ژن به گیاهان تک لپه استفاده می‌شوند (Karimi *et al*., 2013).

در ایران نیز گزارش‌های مختلفی در زمینه معرفی و ساخت ناقلین دوتایی جدید که در مهندسی ژنتیک گیاهی استفاده می‌شوند، ارایه شده است. طراحی و ساخت ناقل‌های بیانی گیاهی با نشانگر مقاومت به گلایفوسیت (Akbarzade *et al*., 2010)، ناقلین مجموعه $pBI121^{GUS-}$ (Esfahani, 2012a)، سایر ناقلین مبتنی بر pBI121 (Esfahani, 2012b; Esfahani & Salmanian, 2013)، ناقل‌های بیانی مبتنی بر ناقل دوتایی pAM194 برای تولید و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب (Zamani *et al*., 2008) و سازه‌های با نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز (BADH) گیاه اسفناج (Tohidfar *et al*., 2014) نمونه‌هایی از ناقلین معرفی شده هستند.

علی‌رغم دستاوردهای ارزنده در ساخت و تولید انواع ناقلین بهینه‌سازی شده و تنوع آنها برای کاربردهای متفاوت و گاه معرفی ناقل‌های چند منظوره، هنوز معدود ناقل‌های قدیمی مورد توجه ویژه محققان می‌باشند. یکی از این ناقل‌های کلاسیک، pBI121 است که مشتق از یکی از اولین ناقل‌های دوتایی یعنی pBin19 می‌باشد. این ناقل بلافاصله پس از معرفی، بین محققان زیست‌شناسی مولکولی محبوبیت یافت. بر اساس مطالعه انجام شده روی ۱۸۰ مقاله مرتبط به مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاهان مختلف به واسطه آگروباکتریوم، حدود ۴۰ درصد از پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان با استفاده از ناقل pBI121 و سایر ناقل‌های مشتق از pBin19 انجام پذیرفته بود (Komori *et al*., 2007).

با وجود محبوبیت و گستردگی استفاده از pBI121، این ناقل دارای معایبی نیز می‌باشد. کمبود

1. Binary Vectors

تعداد جایگاه‌های همسانه‌سازی پایین دست پیشبر CaMV 35S (سه جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی *Xba*I، *Bam*HI و *Sma*I) و وجود تنها یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Sac*I در بالادست خاتمه‌دهنده NOS، مهم‌ترین مشکل این پلاسمید است.

برای رفع این مشکل و با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی، در این مقاله ناقلی که دارای ۱۳ جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی (*Xba*I، *Bam*HI، *Bsp*1407I، *Kpn*I، *Sal*I، *Xho*I، *Bcu*I، *Pac*I، *Alw*44I، *Asi*SI، *Bsu*15I، *Sgs*I و *Sac*I) می‌باشد، معرفی می‌شود. همچنین توالی رمز کننده His-Tag با تکرار هشت اسید آمینه هیستیدین در انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب برای خالص‌سازی آن و توالی مورد شناسایی آغازگر عمومی M13، به عنوان آغازگر معکوس توالی‌یابی، در انتهای MSC جدید این ناقل افزوده شد. در این مطالعه، ضمن تایید مولکولی این سازه با روش PCR، بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی، کارآیی این ناقل در همسانه‌سازی یک ژن گزارشگر (*gus*) و انتقال آن به گیاه مدل نیز بررسی شد. برای این منظور پس از انجام مراحل باززایی گیاهچه‌های تراریخت، انتقال ناحیه T-DNA این ناقل به گیاهچه‌های توتون با روش مولکولی PCR و بیان ژن گزارشگر GUS در گیاهان تراریخت با روش شیمیایی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

طراحی قطعه جایگاه همسانه سازی

برای ساخت ناقل جدید، با استفاده از نرم‌افزار MapDraw از مجموعه نرم‌افزارهای DNASTAR و نرم‌افزار اینترنتی NEBcutter V2.0 (به نشانی http://tools.neb.com/NEBcutter2)، آنزیم‌های برشی که جایگاه شناسایی آنها در ناقل پایه (pBI121) وجود نداشت، شناسایی شدند. بر اساس قیمت و سهولت دسترسی، ۱۳ آنزیم از بین مجموعه آنزیم‌هایی که توالی بدنه ناقل را هضم نمی‌کردند، انتخاب شدند. توالی قطعه بر اساس توالی جایگاه شناسایی این ۱۳ آنزیم و دو توالی دیگر یعنی توالی رمزکننده His-Tag با تکرار هشت اسید آمینه هیستیدین برای خالص‌سازی پروتئین نوترکیب و توالی مورد شناسایی آغازگر عمومی M13 (M13/pUC reverse sequencing primer (-26))، به عنوان آغازگر معکوس توالی‌یابی در بخش انتهایی قطعه، طراحی شد. شکل شماتیک و چگونگی قرارگیری این ترادف‌ها نسبت به یکدیگر در شکل ۱ ارایه شده است.

*Xba*I-*Bam*HI -*Bsp*1407I-*Kpn*I-*Sal*I-*Xho*I-*Bcu*I-*Pac*I-*Alw*44I-HisTaq-*Asi*SI-*Bsu*15I-M13R-*Sgs*I-*Sac*I

شکل ۱- جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی، توالی رمز کننده His-Tag و توالی آغازگر معکوس M13 در قطعه طراحی شده مشخص شده‌اند.

ساخت ناقل

پس از طراحی قطعه، توالی آن برای ساخت به شرکت (ShineGene http://www.synthesisgene.com) سفارش داده شد. قطعه مذکور پس از هضم توسط آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I، جایگزین ژن β- galactosidase در ناقل pBI121 شد. مراحل مختلف همسانه‌سازی و تراریختی سلول‌های مستعد[1] *E. coli* سویه DH5α با روش‌های استاندارد (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. باکتری‌های *E. coli* رشد کرده بر روی محیط واجد کانامایسین (نشانگر آنتی بیوتیکی موجود روی ناقل) با استفاده از روش Colony PCR بررسی شدند.

1. Competent Cells

برای تکمیل اطلاعات از کلنی‌های مثبت، کشت شبانه تهیه شده و پس از استخراج پلاسمید (کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت Roche)، صحت ساخت ناقل جدید با روش PCR، بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. این ناقل pBI105 نام گذاری شد.

در مرحله بعد، برای بررسی امکان همسانه‌سازی ژن خارجی در ناقل جدید، ژن *gus* از ناقل pBI121 با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I خارج شده و ضمن هضم هر دو ناقل با آنزیم‌های مذکور، این ژن در ناقل جدید (pBI105) همسانه‌سازی شد.

انتقال ناقل به سلول های آگروباکتریوم مستعد

برای انتقال سازه‌های مورد نظر از *A. tumefaciens* سویه LBA4404 و روش انجماد و ذوب با کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار و ازت مایع استفاده شد (Holsters *et al*., 1978). پس از رشد باکتری‌ها بر روی محیط گزینش‌گر حاوی کانامایسین، حضور پلاسمید نوترکیب در اگروباکتریوم توسط آزمون Colony-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناقل (35SF 5'-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT) و gusR 5'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCATG)) بررسی گردید.

تراریختی گیاهان

تراریختی گیاهان با استفاده از روش بهینه شده برای گیاه توتون توسط Gallois and Marinho (۱۹۹۶) و با اعمال تغییراتی انجام شد. باکتری آگروباکتریوم حامل سازه مورد نظر در محیط LB مایع (pH=۷) واجد غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک (۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت شدند. هنگامی که OD_{600} محیط کشت به ۰/۵ رسید، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح (محیط کشت MS، ۵ درصد ساکارز، pH=5) مجدداً به صورت سوسپانسیون در آمد. برگ‌های برش خرده گیاه توتون، رقم سامسون با ابعاد حدود یک سانتی‌متر مربع به عنوان جداکشت، به مدت حداکثر یک دقیقه در محیط تلقیح قرار گرفته و سپس بر روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. برگ‌های برش‌خورده بر روی محیط هم‌کشتی (محیط کشت MS، ۳ درصد ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر NAA، pH=5.8) بدون آنتی‌بیوتیک به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار گرفتند.

پس از این مدت، قطعات جداکشت با محلول حاوی نمک‌های MS و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دو بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه و سپس با آب مقطر با همین غلظت آنتی‌بیوتیک به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. در مرحله آخر شستشو با آب مقطر استریل انجام شده و جدا کشت‌ها بر روی کاغذ صافی استریل خشک شدند.

قطعات برگی بر روی محیط باززایی (محیط کشت MS، ۳ درصد ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر NAA، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، pH=۵/۸) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. محیط‌ها هر ۲ هفته یک بار تعویض شده و غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین به تدریج به ۶۵ و در نهایت به ۸۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. پس از دو ماه، گیاهچه‌های حاصل به محیط ریشه‌زایی (محیط کشت MS، ۳ درصد ساکارز، ۲۰۰ میکروگرم در لیتر BAP، ۱۰ میکروگرم در لیتر NAA، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، pH=5.8) منتقل شدند و برگ‌های آنها جهت استخراج DNA برای آنالیز PCR و سنجش بیان ژن گزارشگر استفاده شدند.

آنالیز گیاهان تراریخت

برای استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های تراریخته،

از روش استخراج سریع استفاده شد. برای این منظور بافت کوچکی از برگ گیاه بین دو اسلاید شیشه‌ای ساییده شده و با ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ میکرولیتر کلرید لیتیم ۲ مولار، ۲۵ میکرولیتر EDTA ۵۰۰ میلی‌مولار (pH=۸)، ۱۰۰ میکرولیتر Tris-HCl یک مولار (pH=۸) و ۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد با ۲۲۵ میکرولیتر آب مقطر)، بافت له‌شده شسته و به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شده و ۳۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به ویال جدیدی حاوی ۳۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول منتقل شد. محلول به خوبی مخلوط شده و ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شده و رسوب خشک شده در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر TE یا آب مقطر با تکان دادن ملایم حل شد.

برای تایید انتقال ناحیه T-DNA، آنالیز PCR با آغازگرهای ژن *gus* (gusF (5'-GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG) و gusR (5'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCATG)) انجام شد. با توجه به احتمال تکثیر باندهای مورد نظر به دلیل آلودگی باقیمانده از آگروباکتریوم، آنالیز PCR محصول استخراج DNA ژنومی با آغازگرهای مربوط به آگروباکتریوم انجام شد. برای این منظور از آغازگرهای VirGF (5'-ATGATTGTACATCCTTCACG) و VirGR (5'-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG) استفاده شد که در صورت آلودگی احتمالی گیاهان تراریخته به آگروباکتریوم، قطعه‌ای ۷۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *Vir*G را تکثیر خواهند کرد.

سنجش فعالیت GUS

سنجش فعالیت GUS با استفاده از روش هیستوشیمیایی ارایه شده توسط Jefferson (۱۹۸۷) با برخی تغییرات انجام شد. بدین منظور، بخشی از برگ یا ساقه گیاهچه‌های مورد بررسی به مدت ۲۴ ساعت در محلول واکنش (بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار) pH=۷، یک در هزار حجمی/حجمی Triton X-100، Na_2EDTA (۱ میلی مولار)، بتامرکاپتواتانول (۰/۷۸ میکرو لیتر در یک لیتر) و سه در هزار وزنی/حجمی 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid به‌عنوان سوبسترای اختصاصی آنزیم) نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها در طول ۴۸ ساعت، ۵ بار با اتانول ۶۰ درجه کلروفیل‌زدایی گردیدند. برای بررسی فعالیت GUS و رنگ آبی حاصل، نمونه‌ها زیر میکروسکپ مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت.

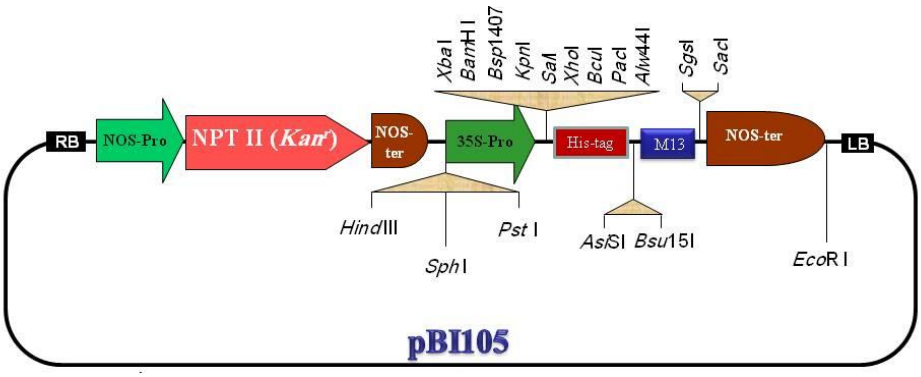
نتایج

ساخت ناقلین

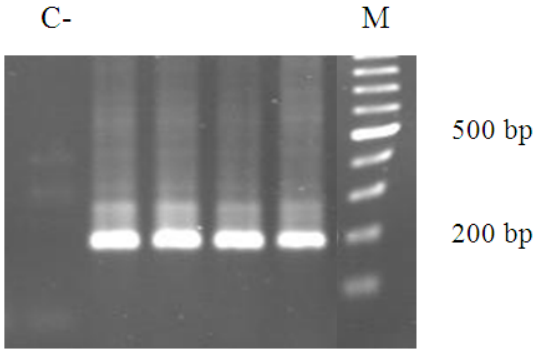
پس از جایگزینی قطعه مورد نظر (شکل ۱) به جای ژن β-galactosidase در ناقل pBI121، نتیجه Colony-PCR با آغازگر انتهای پیشبر CaMV 35S و M13-Reverse موجود در قطعه همسانه‌سازی شده مشخص کرد که چندین کلونی ناقل pBI105 (شکل۲) را دریافت کرده‌اند (شکل ۳).

نمونه‌های مثبت، مجدداً کشت شده و پس از استخراج پلاسمید، صحت ساخت ناقل جدید با بررسی الگوی هضم تمامی آنزیم‌های جایگاه همسانه‌سازی ناقل جدید (شکل ۴) و تعیین توالی تایید شد.

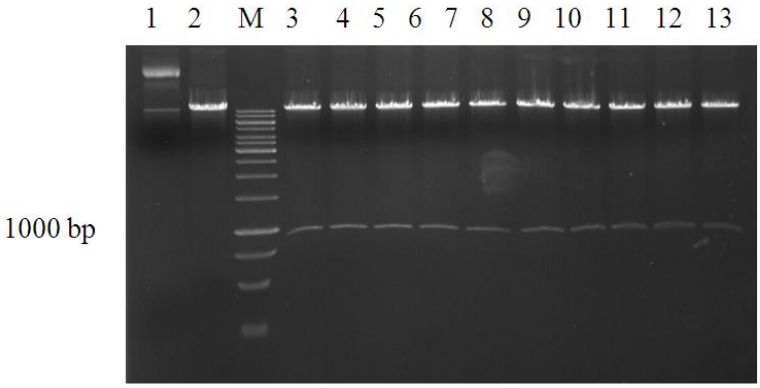
برای بررسی امکان همسانه‌سازی ژن خارجی در ناقل جدید، ژن *gus* از ناقل pBI121 با آنزیم های *Xba*I و *Sac*I جدا سازی شده و در ناقل جدید همسانه‌سازی شد. این ناقل جدید که برای انتقال ژن به گیاه توتون مورد استفاده قرار گرفت، $pBI105^{+GUS}$ نام‌گذاری شد. نتیجه PCR با آغازگرهای مرتبط با ژن *gus* و هضم آنزیمی صحت ساخت این سازه را تایید کرد (شکل۵).



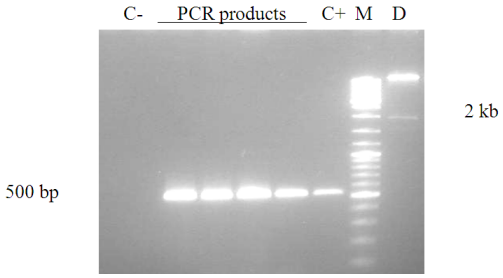
شکل ۲- شکل شماتیک ناقل pBI105



شکل ۳- نتایج PCR با آغازگر 35S(-55) (انتهای پیشبر CaMV 35S) و M13-Reverse؛ تکثیر قطعه حدوداً ۲۰۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار. در این حالت نمونه کنترل مثبت فراهم نیست. -C: pBI121، M: نشانگر وزن مولکولی Ladder Mix (Fermentas).



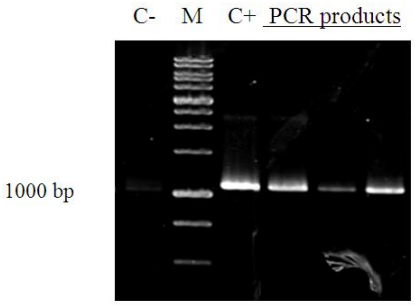
شکل ۴- نتیجه هضم توام ناقل pBI105 با آنزیم *Hin*dIII و آنزیم‌های MCS جهت تایید کارآیی جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی ستون ۱: پلاسمید هضم نشده pBI105، ستون ۲: پلاسمید هضم شده با *Hin*dIII به تنهایی، ستون ۳: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas) و ستون‌های ۳ تا ۱۳ به ترتیب هضم توام با *Hin*dIII و آنزیم‌های *Xba*I، *Bam*HI، *Bsp*1407I، *Kpn*I، *Sal*I، *Xho*I، *Pac*I، *Alw*44I، *Sgs*I و *Sac*I. همان‌طور که مشاهده می‌شود، طی هضم توام ناقل pBI105 توسط آنزیم‌های موجود در MCS به همراه *Hin*dIII، قطعه حدوداً ۹۰۰ جفت بازی پیشبر CaMV 35S جدا شده که نشان‌دهنده کارآیی همه این جایگاه‌ها است.



شکل ۵- نتایج هضم آنزیمی ناقل $pBI105^{+GUS}$ با *Xba*I و *Sac*I (سمت راست) و PCR (سمت چپ) با آغازگرهای مرتبط با ژن *gus* (تکثیر قطعه ۵۲۱ جفت بازی)؛ D: قطعه ۱۸۲۱ نوکلئوتیدی ژن از ناقل جداسازی شده است. -C: ناقل pBI105، +C: ناقل pBI121، M: نشانگر وزن مولکولی Ladder Mix (Fermentas).

انتقال ناقل به آگروباکتریوم

در مرحله بعد ناقل $pBI105^{+GUS}$ به *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شد و نتیجه Colony-PCR کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط آنتی‌بیوتیک با آغازگرهای اختصاصی ناقل در شکل ۶ دیده می شود.

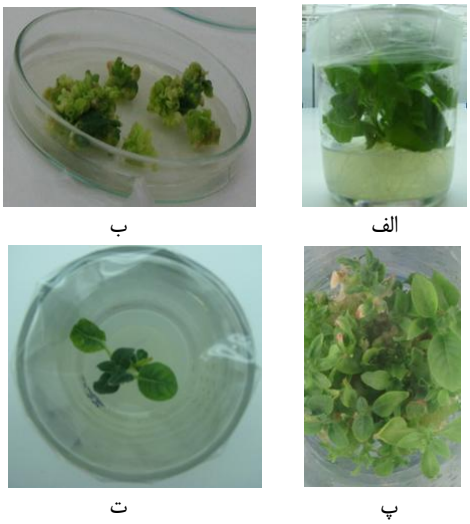


شکل ۶- Colony-PCR با آغازگرهای مستقیم داخل پیشبر و معکوس داخل ژن *gus* (35SF و gusR). تکثیر قطعه حدود ۱۰۵۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار در کلونی ها. -C: آگروباکتریوم غیر تراریخت، +C: $pBI105^{+GUS}$، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb (Fermentas).

تراریختی گیاه مدل

جهت تهیه جدا کشت، گیاهان توتون رقم سامسون در محیط MS رشد داده شدند (شکل ۷-الف). پس از کشت باکتری آگروباکتریوم حامل سازه‌های مورد نظر، برگ‌های برش خرده رقم سامسون توتون (جدا کشت) در محیط تلقیح قرار گرفته و سپس به محیط هم‌کشتی منتقل شدند.

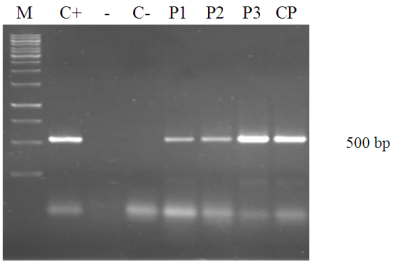
پس از ۳ روز جدا کشت‌ها با محلول واجد آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم شستشو داده شده و بر روی محیط باززایی حاوی عامل گزینشگر (کانامایسین) قرار گرفتند. جداکشت‌های واجد جوانه‌های ایجاد شده هر ۲ هفته یک بار به محیط جدید منتقل می‌شدند (شکل۷-ب). غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین به تدریج افزایش یافت. پس از حدود دو ماه، گیاهچه‌های حاصل (شکل۷-پ) به محیط ریشه‌زایی با غلظت مناسب عامل گزینشگر منتقل شدند (شکل ۷-ت) و برگ‌های آنها جهت استخراج DNA و آزمون سنجش فعالیت GUS استفاده شدند.



شکل ۷- کشت بافت، تراریختی و باززایی گیاه توتون.
الف) کشت گیاهچه‌های توتون در شرایط استریل. ب) ایجاد جوانه‌ها در قطعات جداکشت. پ) انتقال جداکشت‌های واجد جوانه به محیط جدید واجد غلظت بالاتر گزینشگر. ت) جدا کردن گیاهچه‌ها و انتقال آنها به محیط جدید.

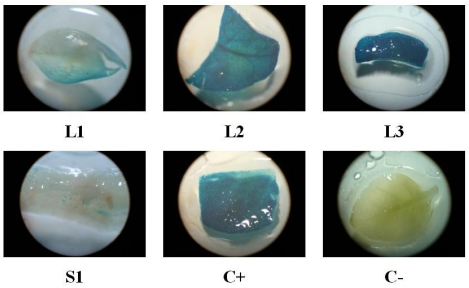
آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهچه‌های مقاوم به عامل گزینشگر، با آغازگرهای ژن *gus* انجام شد و باند مورد نظر بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۸). همچنین این آنالیز با

آغازگرهای VirGF و VirGR مربوط به آگروباکتریوم برای بررسی آلودگی احتمالی انجام شد که در این حالت غیر از کنترل مربوط به آگروباکتریوم، باندی مشاهده نشد (داده‌ها نمایش داده نشده‌اند).



شکل ۸- آنالیز PCR گیاهچه های مقاوم به عامل گزینشگر کانامایسین با آغازگرهای مرتبط با ژن *gus* (gusF و gusR) قطعه ۵۲۱ نوکلئوتیدی مورد انتظار در تمامی نمونه‌های انتخاب شده تکثیر شده است. P1، P2 و P3: گیاهچه‌های تیمار شده با آگروباکتریوم واجد pBI105، CP: گیاهچه تیمار شده با آگروباکتریوم واجد pBI121، +C: پلاسمید pBI121، -C: گیاهچه توتون غیرتراریخت، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb (Fermentas).

سنجش فعالیت GUS در برگ و ساقه گیاهان تراریخته تمامی نمونه‌هایی که PCR آنها مثبت بود، انجام شد. همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است در تمامی نمونه‌ها فعالیت ژن گزارشگر و رنگ حاصل از آن با شدت مختلف مشاهده می‌شود.



شکل ۹- نتایج آزمون هیستوشیمیایی GUS در برگ و ساقه گیاهچه‌های تراریخت.

L1-L3: قطعات برگ و S1: ساقه گیاهچه تراریخت، +C: گیاهچه تیمار شده با آگروباکتریوم واجد pBI121، -C: برگ گیاهچه غیر تراریخت توتون.

بحث

محبوبیت ناقل pBI121 ممکن است به خاطر انتشار وسیع این ناقل در آزمایشگاه‌ها و دست به دست گشتن آن در سال‌های اولیه انجام پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان و در نتیجه آن حجم بالای مقالات منتشر شده با استفاده از این ناقل و در پی آن آشنایی بیشتر و اعتماد محققان به این ناقل باشد. همچنین سادگی ناقل pBI121 و سهولت جایگزینی یک مرحله‌ای ژن مورد نظر با ژن *gus* و پس از آن بیان مناسب ژن منتقل شده تحت کنترل پیشبر قدرتمند CaMV 35S می‌تواند از جمله دلایل محبوبیت این ناقل باشد. اما به دلیل تعداد محدود جایگاه‌های منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی در این ناقل، در برخی موارد ساخت سازه‌های انتقالی، خصوصاً همسانه‌سازی ژن‌هایی که دارای جایگاه شناسایی معدود آنزیم‌های موجود در جایگاه همسانه-سازی ناقل pBI121 (از همه مهمتر *Sac*I) در توالی خود هستند، با مشکل مواجه می‌شود.

جهت رفع این مشکل، در این تحقیق برای گسترش جایگاه همسانه‌سازی ناقل جدید، ۱۳ آنزیم برشی که توالی ناقل pBI121 را در هیچ نقطه دیگری هضم نمی‌کردند، در دسترس بوده و نسبتاً ارزان نیز بودند، انتخاب شدند. ترتیب این آنزیم‌ها به نحوی در نظر گرفته شد که آنزیم‌هایی که جایگاه شناسایی آنها مناسب بالادست ژن بوده و ایجادکننده زمینه مناسب برای شناسایی کدون شروع ترجمه نیز باشند (مثل *Bsp*1407I با جایگاه شناسایی TGTACA و *Kpn*I با جایگاه شناسایی GGTACC) در نیمه اول MCS قرار گیرند. به طور مثال در صورت استفاده از آنزیم *Bsp*1407I برای همسانه‌سازی ژن مورد نظر، در بالا دست این ژن جایگاه ACA که در گیاهان زمینه مناسبی برای شناسایی کدون آغاز می‌باشد (Lütcke *et al.*, 1987)، ایجاد می‌شود. استفاده از *Kpn*I در بالادست ژن موردنظر، جایگاه ACC که در اکثر ژن‌ها زمینه

مناسبی برای شناسایی کدون آغاز می‌باشد (Kozak, 1991)، ایجاد می‌کند. به طور کلی در انتخاب تمامی آنزیم‌های نیمه اول MCS سعی بر این بود که نوکلئوتید A یا G در جایگاه "۳-" قرار گیرد زیرا که در بالادست بسیاری از ژن‌های گیاهان، خصوصاً دو لپه‌ای‌ها، یکی از این دو نوکلئوتید در این مکان قرار دارد (Sugio *et al*., 2010).

همچنین آنزیم‌هایی که جایگاه شناسایی آنها مناسب قرار گرفتن پس از کدون اختتام بوده (مثل *Bcu*I با جایگاه شناسایی ACTAGT و *Bsu*15I با جایگاه شناسایی ATCGAT) در نیمه دوم MCS قرار گرفتند. در این آنزیم‌ها حضور نوکلئوتید A در ابتدای توالی شناسایی آنزیم کلیدی است، زیرا حضور این نوکلئوتید بلافاصله بعد از هر سه کدون اختتام، به افزایش کارآیی کدون های اختتام در پایان ترجمه کمک می‌نماید (Angenon *et al*., 1990).

در توالی جایگزین در این ناقل، یک توالی رمز کننده His-Tag با تکرار هشت اسید آمینه هیستیدین برای خالص‌سازی پروتئین نوترکیب نیز در نظر گرفته شد. His-Tag توالی کوتاهی شامل زیر واحدهای هیستیدین است که به‌طور گسترده برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب بر اساس کروماتوگرافی گذرا بین یک یون فلزی (مثل Zn^{2+}) تثبیت شده بر روی یک بستر و زنجیره‌های جانبی یک اسید آمینه خاص استفاده می‌شود و هیستیدین اسیدآمینه‌ای است که قویترین برهم‌کنش را با یون فلزی تثبیت شده روی بستر نشان می‌دهد (Terpe ۲۰۰۳). همچنین پس از توالی رمز کننده دنباله His-Tag از رمز اختتام چهار نوکلئوتیدی TGAA که یکی از قوی‌ترین رمزهای پایان ترجمه است (Angenon *et al*., 1900)، استفاده شده است. وجود دو آنزیم ایزوکادومر[1] *Asi*SI و *Pac*I در دو طرف توالی His-Tag که پس از برش، انتهای چسبنده مشابهی ایجاد می‌کنند، در صورت لزوم امکان حذف این توالی را از ناقل می‌دهد.

با معرفی این ناقل و افزایش جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی مختلف بین پیشبر و خاتمه‌دهنده، جایگزینی ژن‌های مورد نظر با سهولت بیشتر انجام می‌شود و هزینه و مدت زمان اجرای طرح‌ها و پروژه‌های تحقیقاتی در این حوزه کاهش محسوسی خواهد داشت. این ناقل بهبودیافته غیر از استفاده جهت انتقال ژن به گیاه، می‌تواند برای ساخت ناقل‌های جدید نیز مورد استفاده قرار گیرد.

در اکثر نمونه‌های گیاهی تیمارشده با آگروباکتریوم واجد ناقل‌های pBI105، همانند نمونه کنترل مثبت (تیمار شده با آگروباکتریوم واجد pBI121) حضور ژن منتقل شده، تایید شد. این موضوع حاکی از کارآیی انتقال ناحیه T-DNA ناقل طراحی شده و در نتیجه انتقال مؤثر ژن مورد نظر به گیاه می‌باشد. نتایج سنجش فعالیت GUS نیز حاکی از فعالیت این آنزیم در تمامی نمونه‌های تراریخت بود. البته شدت رنگ ایجاد شده در نمونه‌ها تفاوت داشتند که این تفاوت می‌تواند به دلیل اثر موضعی[2] محل ژن وارد شده باشد. ایجاد رنگ آبی در تمامی نمونه‌های تراریخت و مقایسه آن با گیاهچه‌های تراریخت با pBI121، نشانه کارآیی ناقل جدید همانند ناقل استاندارد pBI121 است. به عبارت دیگر، تغییرات صورت گرفته در ناقل pBI105 از جمله توسعه MCS و افزوده شدن توالی‌های تکمیلی مثل His-Tag و M13 بر عملکرد این ناقل تاثیر منفی نداشته است. ناقل pBI105 به واسطه مزایای بیشتر از جمله MCS غنی‌تر آن و با توجه به اثبات کارآیی آن، می‌تواند جایگزین مناسبی برای pBI121 در پروژه های انتقال ژن به گیاهان باشد.

1. Isocaudomers

2. Positional Effect

REFERENCES

Akbarzadeh A, Kordbacheh F, et al. (2010) A Binary Vector for Agrobacterium Mediated Plant Transformation with New Glyphosate tolerant Gene as a Selectable Marker. Biharean Biologist 4(1): 19-29.

Angenon G, Van Montagu M. et al. (1990) Analysis of the stop codon context in plant nuclear genes. FEBS Letters 271(1-2): 144-146.

Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research 12(22): 8711-8721.

Chen PY, Wang CK, et al (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding 11(4): 287-293.

Esfahani K (2012) $pBI121^{+2upGUS}$: The new plant expression vector with two new recognition sites of restriction enzymes upstream of β-glucuronidase. 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran.

Esfahani K (2012) $pBI121^{GUS-6}$: The new plant expression vector with several recognition sites of different restriction enzymes. 12th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran.

Esfahani K, Salmanian AH (2013) Designing and construction of new plant expression vectors with more recognition sites of restriction enzymes. 8th National Congress of Biotechnology, Tehran, Iran.

Esfahani K, Salmanian AH (2014) Plant expression vectors containing developed multiple cloning site and sequences required for sequencing and purification of recombinant proteins. Iran patent No. 82179.

Gallois P, Marinho P (1996) Leaf Disk Transformation Using Agrobacterium tumefaciens-Expression of Heterologous Genes in Tobacco. Plant Gene Transfer and Expression Protocols, Methods in Molecular Biology™, ed Jones H (Springer New York), 49: 39-48.

Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(1): 16-37.

Hellens R, Mullineaux P, et al (2000) A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. Trends in Plant Science 5(10): 446-451.

Holsters M, De Waele D, et al. (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular and General Genetics MGG 163(2): 181-187.

Jefferson RA, Kavanagh TA, et al. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal 6(13): 3901-3907.

Karimi M, Inzé D, et al. (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in Plant Science 7(5): 193-195.

Karimi M, Inzé D, et al. (2013) Gateway vectors for transformation of cereals. Trends in Plant Science 18(1): 1-4.

Kawasaki S (2004) Method for producing a transformed plant with a high capacity binary shuttle vector. US Patent Office.

Kochetov AV, Volkova OA, et al. (2011) Tandem termination signal in plant mRNAs. Gene 481(1): 1-6.

Komori T, Imayama T, et al (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. Plant Physiology 145(4): 1155-1160.

Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. Journal of

Biological Chemistry 266(30):19867-19870.

Lee LY, Gelvin SB (2008) T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiology 146(2): 325-332.

Lin CY, Ku HM, et al. (2011) Construction of the binary vector with bi-selectable markers for generating marker-free transgenic plants. Botanical Studies 52(3): 239-248.

Lütcke H, et al (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. The EMBO Journal 6(1):43-48.

Nakamura S, Mano S, et al. (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 74(6): 1315-1319.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York.

Sripriya R, Sangeetha M, et al. (2011) "Improved Agrobacterium-mediated co-transformation and selectable marker elimination in transgenic rice by using a high copy number pBin19-derived binary vector. Plant Science 180(6): 766-774.

Sugio T, Matsuura A, et al. (2010) Effect of the sequence context of the AUG initiation codon on the rate of translation in dicotyledonous and monocotyledonous plant cells. Journal of Bioscience and Bioengineering 109, 170-173.

Tanaka Y, Nakamura S, et al. (2011) Development of a series of Gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for the transformation of *Arabidopsis thaliana*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 75(4): 804-807.

Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 523–533

Tohidfar M, Ghoreyshi E, Fakheri B, Mohsenpour M (2014) Design and Construction of Specific Chloroplast Vectors for Rice Plants Containing Betaine Aldehyde Dehydrogenase (*badh*) and Flavodoxin (*fld*) Genes for Resistance to Abiotic Stress. Crop Biotech. 6: 47-59.

Zamani K, Malboobi MA, Lohrasebi T, Esfahani K (2008) Expression vectors for production and purification of plant recombinant proteins". Iran patent No. 64775.