مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، شماره بیست‌وچهارم، زمستان ۱۳۹۷ (۵۸-۴۷)

Crop Biotech.
Winter (2018) 24:47-58. DOI: 10.30473/cb.2019.41663.1742

ایجاد توتون تراریخت تولیدکننده لاکاز قارچی با استفاده از یک پروموتر دارای بیان ریشه-ویژه

مجید دانا[۱]، غلامرضا بخشی‌خانیکی[۲]، امیرعباس مختاریه[۳]، سیدجواد داورپناه[٤*]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

٤. استادیار، مرکز تحقیقات زیست‌فناوری کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/٦/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۱/۵)

Generation of fungal laccase producing transgenic tobacco plants using a root-specific expression promoter

Majid Dana[1], Gholamreza Bakhshi Khaniki[1], Amir Abbas Mokhtarieh[2], Seyed Javad Davarpanah[3*]

1. Ph.D. Candidate of Plant Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
3. Assitant Professor, Department of cellular and molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
4. Assitant Professor, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received: Sep. 14, 2018 -Accepted: Jan. 25, 2019)

چکیده

لاکازها گروهی از گلیکوپروتئین‌ها با ویژگی پلی‌فنل‌اکسیدازی هستند که می‌توانند ترکیبات گوناگونی را اکسید نمایند. این گروه آنزیمی در گیاهان، قارچ‌ها، حشرات و باکتری‌ها بیان می‌شوند و دارای نقش‌های مهمی در فعالیت‌های زیستی و کاربردهای گوناگونی در صنایع غذایی، دارویی، نساجی و حتی نظامی می‌باشند. با توجه به ساختار این آنزیم و این‌که تشکیلات بیان پروتئین در گیاهان قادر به تولید کامل پروتئین‌ها ازجمله گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند به جهت کاربرد در پالایش زیستی، سازه‌ای طراحی گردید که لاکاز II قارچی تحت کنترل پیشرانه باکتریایی ویژه بیان در ریشه مانوپین سنتاز و تشدیدکننده ترجمه Tobacco Etch Virus در گیاه توتون بیان شود. افزودن سیگنال پپتید اندوکیتیناز اسیدی Q توتون به ابتدای آنزیم باعث ترشح آن به فضای آپوپلاستی می‌شود. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تراریختی گیاهان توتون توسط ژن لاکاز به‌وسیله آگروباکتریوم تأیید گردید. نتایج نیمه‌کمی بیان ترانسکریپتومیک لاکاز در ریشه و برگ تراریخت‌های مفروض نشانگر بیان متمایز آن در ریشه و برگ بود که ناشی از کارکرد متمایز پیشرانه باکتریایی مانوپین سنتاز می‌باشد. نتیجه وسترن بلاتینگ تولید پروتئین بالغ در ریشه را تأیید کرد. وجود این پروتئین به‌صورت تک سایز نشانه عملکرد صحیح سیگنال پپتید و ترشح آن به فضای آپوپلاستی در ریشه توتون می‌باشد. با توجه به کاربرد این گیاهان جهت استخراج آنزیم یا پالایش زیستی می‌توان تراریخت‌های موردنظر را بر اساس میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی غربالگری و گزینش نمود.

واژه‌های کلیدی: تراریختی، ترشح توسط ریشه، توتون، لاکاز، مانوپین سنتاز.

Abstract

Laccases are a group of glycoproteins which can oxidize a wide range of compounds with various biological activities and industrial applications in food and beverage, pharmaceutical, textile, and even military-related industries. Regarding this enzyme structure and the ability of plant protein production machinery for protein glycosylation, a construct consisting of fungal laccaseII under control of root-specific mannopine synthase promoter and tobacco etch virus translation enhancer was designed for tobacco transformation to be used in phytoremediation. N-terminal addition of acidic tobacco endochitinase Q to Laccase directs its apoplastic secretion. Putative laccase agrobacterium-mediated transformants were confirmed using polymerase chain reaction. Semi-quantitative PCR of roots and leaves of putative transformants showed differential expression of the laccase gene at the transcriptomic level resulting from the differential function of bacterial mannopine synthase promoter. Western blotting results confirmed production of mature protein in roots which also confirms the correct function of signal peptide and secretion of this enzyme into the apoplastic space of roots. Regarding their application for protein production or phytoremediation transgenics of interest should be screened based on protein concentration and enzyme activity.

Keywords: Laccase, Mannopine synthase, Rhizosecretion, Tobacco, Transformation,

* نویسنده مسئول: سیدجواد داورپناه شهری

E-mail: davarpanah@bmsu.ac.ir

مقدمه

لاکاز (EC 1.10.3.2) یک پلی‌فنل اکسیداز حاوی چند مولکول مس است که اکسیداسیون دامنه وسیعی از مواد آلی و غیرآلی را با استفاده از اکسیژن به‌عنوان یک پذیرنده الکترون انجام می‌دهد (Passarini *et al.*, Tzanov *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004; Rezaei *et al.*, 2015; 2015). لاکازها گلیکوپروتئین‌های حاوی ۱۵ تا۳۰ درصد کربوهیدرات هستند که بیشتر به شکل مونومر، و دارای وزن مولکولی بین ۵۰ kDa تا ۹۰ هستند و توسط خانواده‌ای از ژن‌ها به رمز درمی‌آیند که به‌صورت ایزوزیم‌های چندگانه تولید می‌شوند (Xiao *et al.*, 2004; Mansur *et al.*, 2003) این آنزیم ابتدا توسط ژاپنی‌ها در گیاه *Rhus vernicifera* کشف گردید (Yoshida, 1883) و پس‌ازآن در گیاهان مختلف، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات یافت شد (Soden *et al.*,2002; Xiao *et al.*,2004; Xu *et al.*, 2015). همچنین در قارچ‌های پوسیدگی سفید چوب به فراوانی یافت می‌شود. لاکازها دارای چهار اتم مس هستند که به‌صورت سه نوع اتم مس دسته‌بندی می‌شوند (T1,T2,T3). این سه نوع مس را می‌توان با استفاده از اسپکتروسکوپی فرابنفش/مرئی و تشدید پارامغناطیسی الکترونی (EPR) تشخیص داد (Pannu and Kapoor, 2014; Shraddha *et al.*, 2011).

لاکاز پایداری حرارتی قابل‌توجهی بین ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد دارد اما دمای بهینهٔ فعالیت لاکازها باهم متفاوت است (Xu *et al.*, 2015). پیش ماده طبیعی برای انجام فعالیت لاکاز، فنل و ترکیبات مشابه آن مثل ارتو و پارافنل، آمینوفنل، پلی‌فنل، پلی‌آمین و آریل‌دی‌آمین می‌باشد، این پیش‌ماده‌ها به‌وسیله لاکاز اکسید می‌شوند و با جدا شدن یک الکترون به‌صورت رادیکال آزاد در می‌آید (Pannu and Kapoor, 2014). این آنزیم در pHهای متفاوت فعالیت دارد و بیشینه فعالیت آن در pH قارچ‌ها ۴/۵ تا ۶ دیده شده است (Shraddha *et al.*, 2011).

لاکاز آنزیم بالقوه مهمی در صنعت در نظر گرفته می‌شود زیرا کاربردهای متنوعی در زیست‌فناوری و محیط‌زیست ازجمله در سم‌زدایی ضایعات و کاربرد به‌عنوان زیست حسگر ترکیبات فنلی دارد. همچنین لاکاز در فرآیندهای رنگ‌بری صنعتی به‌عنوان یک سفیدکننده زیستی، در صنایع غذایی و نساجی، در رنگ رزی پارچه‌ها (Pannu and Kapoor 2014) سنگ‌شویی پارچه‌ها (Montazer and Sadeghian, 2008) و حفظ شفافیت رنگ در نساجی کاربرد دارد (Sadeghian and Montazer, 2009). همچنین در زمینه تولیدکننده‌های نوین انرژی و زیست‌حسگرها در امور نظامی، سوخت‌های میکرو و بیوالکتروکاتالیز به کار می‌رود (Tzanov *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004; Hood *et al.*, 2003 Gupta *et al.*, 2003). علاوه بر این در صنایع غذایی برای تهیه رنگ‌های خوراکی کاربردهای وسیع دارد چون قادر به پلی‌مریزه کردن مولکول‌ها می‌باشد و در کیفیت خمیر نان، آبمیوه، انواع نوشیدنی تأثیرگذار می‌باشد همچنین در صنعت کاغذ و خمیرکاغذ هنگام تولید خمیرکاغذ مواد سمی کلردار متفاوتی مثل کلرولیگنین تولید می‌شود که لاکاز می‌تواند در حذف این ترکیبات در حین تولید مؤثر باشد (Virk *et al.*, 2013). لاکاز همچنین می‌تواند در سم‌زدایی (سم پالایی) ترکیباتی چون پلی ونیل الکل از خاک و محیط‌زیست نقش داشته باشد (Chhabra *et al.*, 2015). در بخش دارویی امروزه از آن در تهیه داروهای ضدالتهاب (Maestre-Reyna *et al.*, 2015) و در لوازم‌آرایشی برای شفافیت پوست استفاده می‌شود (Pannu and Kapoor, 2014). پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی، پژوهشگران را قادر به تراریختی ژنتیکی گونه‌های زیادی از گیاهان کرده است (Umbeck *et al.*, 1987) و گیاهان گوناگونی

به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید محصولات ترا ریخته مختلف و به‌عنوان سیستم ارزان و مؤثر برای تولید پروتئین‌ها استفاده‌شده است (Gutiérrez *et al.*, 2013; Davarpanah *et al.*, 2009; Foo and Kaplan, 2002; Min *et al.*, 2015; Scheller *et al.*, 2001) که این امر شامل لاکاز نیز می‌شود. پژوهشگران متعددی بیش بیانی لاکاز از منابع گوناگون زیستی و ایجاد گیاهان تراریخت را گزارش کرده‌اند (de Wilde *et al.*, 2008; Hirai *et al.*, 2003; Sonoki *et al.*, 2008; Hood *et al.*, 2008). برای نخستین بار در سال ۲۰۰۸ سیستمی برای بیان مؤثر لاکاز نوترکیب در کلروپلاست ایجاد شد (Yoo *et al.*, 2008). اگرچه در گیاهان ترانسپلاستومیک (نوترکیب در کلروپلاست) انباشت mRNA لاکاز رخ داد ولی پروتئین آن تشخیص داده نشد. همچنین در پژوهشی دیگر که توسط Davarpanah *et al.* (2012) انجام شد، بیش بیانی لاکاز در کلروپلاست توتون اگرچه منجر به تولید پروتئین فراوان در کلروپلاست شد. اما لاکاز موجود فعالیت آنزیمی قابل‌توجهی نشان نداد. با توجه به ساختار لاکاز و نقش ریشه در مبادلات گیاه با محیط و تولید و ترشح پروتئین‌ها (Drake *et al.*, 2009; Gaume *et al.*, 2003)، در این تحقیق سازه‌ای طراحی شد تا با تراریختی توتون توسط آن، بیان ریشه –ویژه و ترشح لاکاز توسط گیاه توتون صورت گیرد. تا آنجا که می‌دانیم برای نخستین بار است که این پژوهش در دنیا صورت می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

طراحی و ساخت سازه

با استفاده از بانک اطلاعات NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) و بانک اطلاعات پروتئین(http://www.uniprot.org) قطعات موردنظر سازه انتخاب شد. خصوصیات سازه با توجه به کلیه عوامل مؤثر بر طراحی سازه از جمله پروموتر مانوپین سنتاز، تشدیدکننده ترجمه Tobacco Etch Virus، سیگنال پپتید ترشحی، توالی ژن آنزیم Laccase2 قارچ *Trametes versicolor* (Uniprot: Q12718) پس از حذف سیگنال پپتید قارچی و جایگزینی آن با سیگنال پپتید اندوکیتیناز اسیدی Q توتون (Uniprot: p17514) و تأیید برش سیگنال پپتید توسط سرور (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalPSi) gnaLP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011)، بهینه‌سازی کدون مربوط به ژن لاکاز نوترکیب ابتدا ترجمه معکوس شد و توالی DNA به‌دست‌آمده توسط سامانه (http://www.kazusa.or.jp/codon) (http://eu.idtdna.com/CodonOpt) جهت بیان بهینه در توتون بهینه‌سازی کدون انجام شد. تگ هیستیدین و جایگاه‌های برشی مناسب توسط سایت‌های متعدد تخصصی مرتبط با هر بخش، بررسی امکان بیان و سازگاری کدون در میزبان گیاهی توتون با استفاده از (https://www.genscript.com/ tools/ rare-codon-analysis) و همچنین نرم‌افزار Bioedit 7.0.5.3 بررسی و تحلیل شد. سازه موردنظر در بانک ژن به شماره KP036495 ثبت گردید (شکل۱).

شکل ۱. سازه طراحی شده جهت بیان ریشه–ویژه لاکاز قارچی در گیاهان توتون
mas2' promoter: پیشرانه مانوپین سنتاز ۲، TEV: تشدیدکننده ترجمه tobacco etch virus، SP: سیگنال پپتید اندوکیتیناز Q اسیدی توتون، Lac: لاکاز۲ قارچی بدون سیگنال پپتید قارچی، His: تگ هیستیدین شش تایی

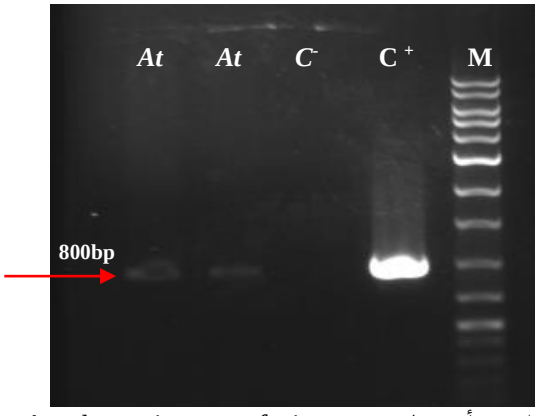
سپس توالی موردنظر توسط شرکت Biomatik کانادا سنتز گردید و در وکتور pUC57 همسانه‌سازی انجام گردید. پس از تعیین توالی، از درستی آن اطمینان حاصل شد. این توالی در دو جایگاه برش آنزیم‌های HindIII/SacI در وکتور مخصوص تراریختی گیاهان pBI121 همسانه‌سازی شد و مجدداً توسط شرکت، تعیین توالی انجام گرفت. این وکتور جدید pBlac نام‌گذاری شد.

طراحی پرایمر

یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن لاکاز با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7.58 و سایت NCBI به‌توالی LacF: ccagcatacactggcatgga و LacR: agctggtaatgggtacacgc برای بخشی از ژن *lcc2* آنزیم Laccas2 به طول حدوداً ۸۰۰ جفت باز طراحی شد و توسط شرکت سیناکلون، ایران سنتز گردید.

تراریختی باکتری

باکتری *E.coli* سویه DH5α توسط پلاسمید جدید بانام pBlac به روش الکتروپوریشن (تهیه سلول مستعد و سپس تلقیح ژن مورد نظر از طریق جریان برق) تراریخت گردید. کلنی‌های تراریخت که قادر به رشد بر روی محیط جامد LB به اضافه ۵۰ کانامایسین بودند در سه میلی‌لیتر این محیط کشت در طول شب کشت شدند. پس از استخراج پلاسمید، باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 به روش شوک حرارتی (بعد از تهیه یاخته مستعد، با شوک حرارتی عمل تلقیح پلاسمید انجام می‌شود) تراریخته شد. کلنی‌های گزینش‌شده مجدداً در سه میلی‌لیتر محیط مایع YEPبه اضافه ۵۰ کانامایسین کشت شدند و پس از رشد در طول شب (۸ ساعت)، تراریختی آن‌ها توسط پرایمرهای طراحی‌شده برای توالی مربوط به لاکاز توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۲. تأیید تراریختی *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر ویژه برای بخش میانی ژن لاکاز به اندازه حدود ۸۰۰ جفت باز، C^+: کنترل مثبت پلاسمید pBlac، C^-: آگروباکتریوم، *At*: تک کلنی آگروباکتریوم که روی محیط YEP دارای کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد کرده بود. M: دی‌ان‌ای سایز مارکر $1kb^+$.

تراریختی گیاه

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 در طی شب در محیط YEPحاوی ۵۰ میلی‌گرم کانامایسین کشت شد تا به $OD_{600}=1$ برسد. پس از این مجدداً ۵۰ میلی‌لیتر محیط YEP بدون آنتی‌بیوتیک تلقیح شد و ۲ تا ۴ ساعت در دمای۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۹۰ دور در دقیقه هم زده شد تا به $OD_{600}=1$ برسد. سپس به مدت ۱ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب باکتری محیط اینفیلتراسیون به همراه ۱۰۰ میکرمولار استوسرینگون و IGEPAL® ۰/۰۰۱ درصد افزوده شد (Behnam *et al.*, 2016). پس از یک ساعت قطعات یک سانتی‌متری برگ گیاه توتون ۲ ماهه پرورش یافته در شرایط کشت بافت، به آن افزوده و در دسیکاتور گذاشته شد. در نهایت خلائی برابر ۱۰۰ میلی‌بار به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد تا حباب هوای در حال خروج از برگ مشاهده شود (Leuzinger *et al.*, 2013). پس از آن رطوبت قطعات برگی گرفته شد. قطعات جدا کشت حاوی باکتری *Agrobacterium*

tumefaciens LBA4404 به محیط RMOP (نمک‌های پایه موراشیگ–اسکوگ «MS»، ویتامین‌های محیط موراشیگ–اسکوگ، ساکاروز ۳۰ گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین ۱ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. سطح بالایی برگ روی محیط قرار گرفت. پس از ۳ روز هم‌کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰۰ لوکس روشنایی با طول دوره روشنایی ۱۸ ساعت و ۶ ساعت تاریکی، جداکشت‌ها به همین محیط (RMOP) حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل شدند. سطح زیرین برگ روی محیط گذاشته شد. هر ۲۱ روز واکشت به محیط جدید (RMOP) صورت پذیرفت. گیاهان تراریخت احتمالی باززایی شده از جدا کشت برگ جهت ریشه‌زایی به محیط MS با نصف غلظت نمک‌های ماکرو به اضافه ۳٪ ساکاروز به خاطر تسریع در ریشه‌زایی منتقل گردید (شکل ۳).

تأیید تراریختی گیاه

برای تأیید تراریختی گیاه تنباکو، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگی از هر گیاه جدا شد و استخراج DNA انجام گرفت (Doyle, 1990). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر که برای قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی از ژن lcc2 مربوط به آنزیم Laccase2 طراحی‌شده بود، انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر Mastercycler® pro, eppendorf, USA ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه) و ۳۶ چرخه با برنامه ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی)، ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال)، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمراز) و درنهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط نهایی) انجام شد. برای انجام PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، بافر واکنش X ۱۰ به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۱۰ میلی مولار ۰/۷۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ژن *lcc2* لاکاز هرکدام ۱۰pmol، DNA ژنومیک به میزان ۲ میکرولیتر (کمتر از ۱ میکروگرم) و در آخر آنزیم PrimeTaq DNA Polymerase, GeNetBio, Korea به میزان ۰/۱ ۲۵ µ به ویال اضافه گردید.

تأیید بیان لاکاز در سطح ترانسکریپتومی

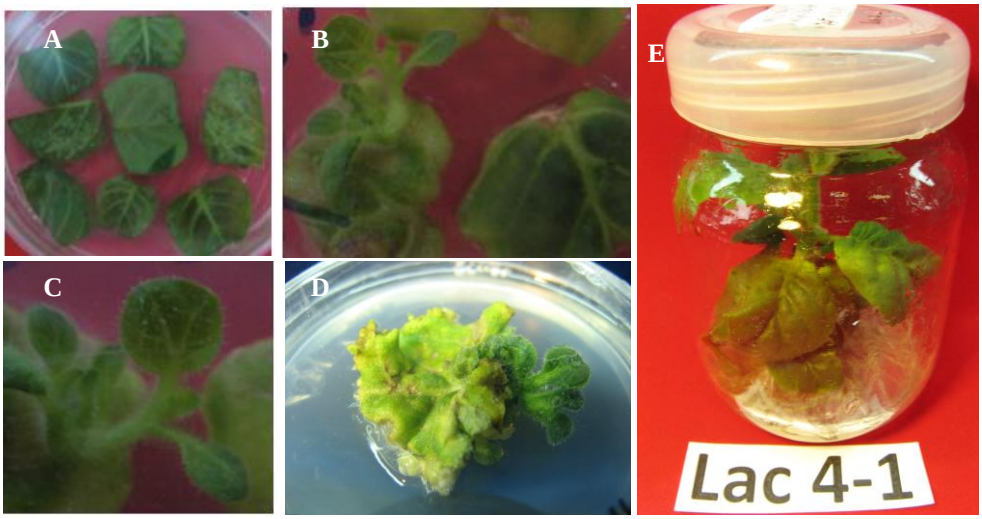
RNA از بافت گیاهی برگ و ریشه با کمک بافر استخراج RNA با استفاده از لیتیم کلراید استخراج شد (Behnam *et al*., 2016). کیفیت و کمیت RNA استخراجی با الکتروفورز در بافر رقیق TBE و با کمک نانودراپ تعیین شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (DNA-Technology, Russia) ساخته شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *lcc2* لاکاز، PCR به این شرح ۱۰µl x PCR buffer ۲/۵ µl، ۲dNTP mixture، هر پرایمر هر کدام ۱۰ pmol، µl ۲ cDNA، ۰/۵ µl Taq DNA polymerase با حجم نهایی ۲۵µl و طبق شرایطی که پیش‌تر گفته شد انجام گرفت. به‌عنوان شاهد، بیان ژن اکتین توتون با از پرایمرهای ActF: aatgtacctgccatgtatg و ActR: tccaatccagacactgtac جهت مقایسه نیمه‌کمی بیان لاکاز مورداستفاده قرار گرفت. دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه در نظر گرفته شد و سایر شرایط مشابه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد تا قطعه‌ای به طول ۶۴۷ جفت باز تکثیر گردد (شکل‌های ۵ و ۷).

تأیید تولید پروتئین توسط وسترن بلاتینگ

پروتئین محلول کل (TSP[1]) از ریشه گیاهان نسل صفر که ۲ ماه در محیط هیدروپونیک Knop تقویت‌شده، توسط ۷۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA، رشد کرده بودند، به روش استوکس استخراج شد (Stokes *et al*.,

1. Total Soluble Protein

2000).



شکل ۳. مراحل تراریختی برگ و باززایی گیاهان تراریخت فرضی از قطعات جداکشت برگی از گیاه توتون در محیط باززایی. A: قطعات برگی روی محیط RMOP بدون آنتی‌بیوتیک پس از فیلتراسیون خلاء؛ B-D: باززایی گیاهان تراریخت مفروض روی محیط باززایی RMOP دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم؛ E: گیاه تراریخته مفروض پس از ریشه زایی در محیط MS دارای نصف نمک‌های ماکرو.

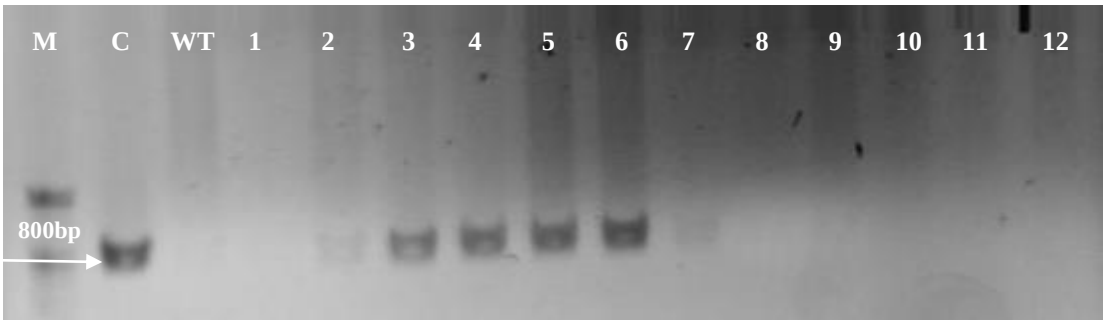
سپس ۳۰ میکروگرم از این پروتئین روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ (w/v) طبق روش لاملی الکتروفورز شد (Laemmli *et al.*, 1970). پس از رنگ‌آمیزی ژل توسط کوماسی بریلیانت بلو (CBB) و مشاهده کیفیت پروتئین‌های استخراج‌شده از ریشه، با ژلی دیگر انتقال پروتئین‌ها به غشا PVDF انجام شد. پس از انجام رنگ‌آمیزی با Ponceau S و تأیید انتقال پروتئین به غشا، هیبریدیزاسیون با استفاده از آنتی‌بادی اولیه Anti-His Tag موشی (Biolegend) و آنتی‌بادی ثانویه Anti-mouse (IgG (H+L)-HRP (from goat) (Bio-Rad) مطابق دستور راهنمای مصرف، صورت گرفت. از رنگ دی آمینو بنزیدین (DAB) به‌عنوان سوبسترای آنزیم پراکسیداز جهت مشخص کردن باندهای پروتئین موردنظر روی غشا استفاده شد.

نتایج و بحث

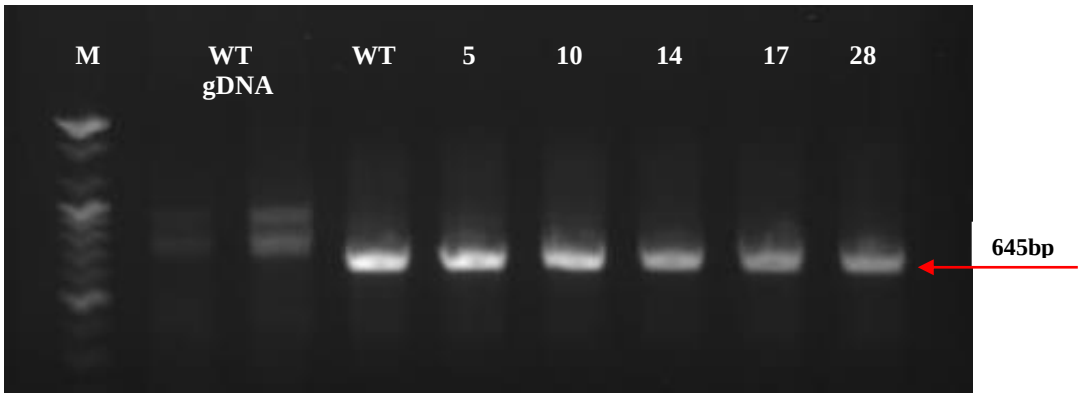
سازه‌ای که جهت بیان ریشه–ویژه آنزیم لاکاز در توتون طراحی گردید، دارای بخش هسته‌ای پروموتر مانوپین سنتاز متعلق به *Agrobacterium tumefaciens* است. پروموتر مانوپین سنتاز۲ عمده بیان را در ریشه هدایت می‌کند اگرچه مقادیر اندکی از بیان در ساقه و برگ نیز مشاهده شده است (Feltkamp *et al.*, 1995; Guevara-Garcia *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007). این ساختار، تشدیدکننده ترجمه Tobacco Etch Virus است که باعث افزایش بیان پروتئین در توتون و سایر گیاهان به میزان ۲–۳ برابر می‌شود (Lee *et al.*, 2007; Ñopo *et al.*, 2012; Restrepo *et al.*, 1990)، در این سازه، سیگنال پپتید ترشحی اندوکیتیناز اسیدی Q باعث ترشح پروتئین به فضا خارج سلولی گیاهی می‌شود (Linthorst *et al.*, 1990; Payne *et al.*,1990) و توالی ژن آنزیم Laccase2 قارچ *Trametes versicolor* که مسئول تجزیه ترکیبات لیگنینی و سم‌زدایی مشتقات آن می‌باشد (Fujihiro *et al.*, 2009) (شکل ۱). با زیرهمسانه‌سازی این سازه بین دو جایگاه برش HindIII/SacI در وکتور باینری pBI121 امکان انتقال آن به گیاه توسط

Agrobacterium tumefaciens فراهم گردید (شکل۲).

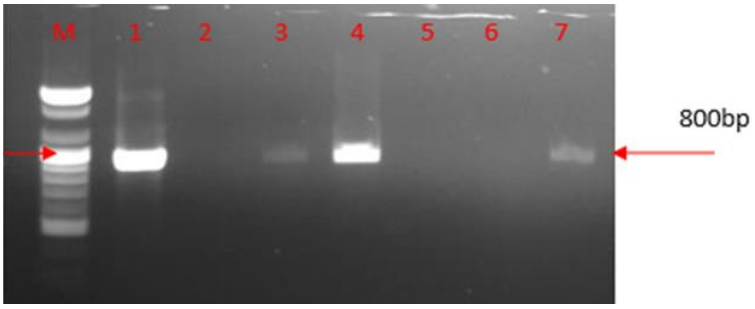
درنتیجه تراریختی جدا کشت برگی توتون توسط آگروباکتریوم و کشت آن در محیط کشت بافت روی محیط موراشیگ–اسکوگ حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر محتوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، تعداد زیادی گیاه باز زایی شده از رخدادهای جداگانه پس از ۸ هفته پدید آمد (شکل ۳) که تراریختی تعدادی از آن‌ها با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۴) و به‌عنوان گیاه ترا ریخته فرضی در شرایط در شیشه (این‌ویترو) واکشت و نگهداری شد.



شکل ۴. تایید تراریختی گیاهان باززایی شده تراریخت فرضی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن لاکاز توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز. C: کنترل مثبت پلاسمید pBlac حاوی ژن لاکاز، WT: گیاه غیرتراریخت توتون، 12-1: گیاهان باززایی شده در محیط باززایی.



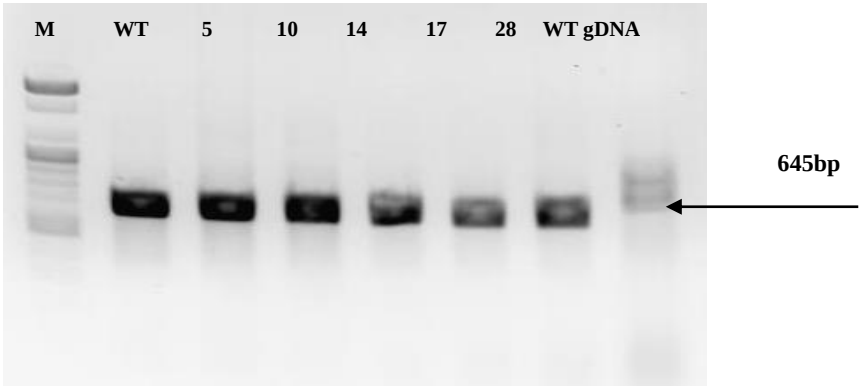
شکل ۵. بررسی بیان ژن اکتین در برگ گیاهان تراریخت لاکاز و WT با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز. دی‌ان‌ای WT به عنوان کنترل مثبت برای اکتین مورد استفاده قرار گرفت. میزان بیان اکتین در هر لاین جهت نرمال سازی بررسی بیان لاکاز مورد استفاده قرار گرفت.



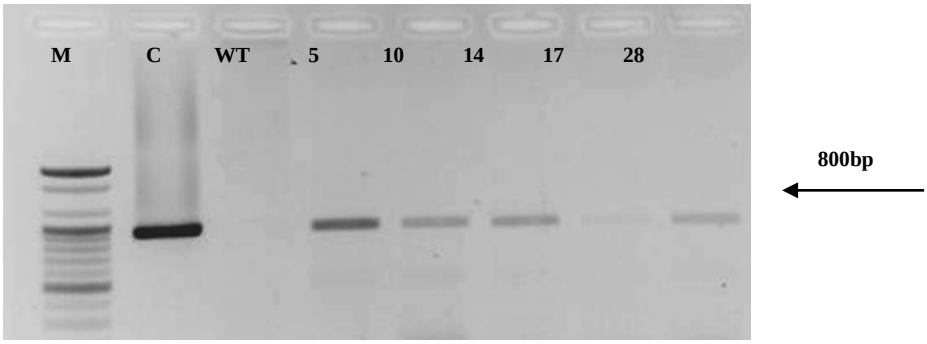
شکل۶. بررسی بیان ژن لاکاز قارچی در برگ گیاهان تراریخت لاکاز و WT با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز ۱:. پلاسمید pBLac به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ۲:WT، ۳ تا ۷ :به ترتیب لاین‌های تراریخت لاکاز ۵، ۱۰، ۱۴، ۱۷ و ۲۸.

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن لاکاز ۲ و اکتین در اندام‌های گیاه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن نشان می‌دهد ژن لاکاز به گیاه منتقل‌شده است و بیان آن در سطح RNA به اثبات رسید (شکل‌های ۵ تا ۸). همچنین مقایسه بیان لاکاز در دو اندام ریشه و برگ بر اساس سطح بیان آکتین نشان می‌دهد لاکاز بیشترین بیان را در ریشه‌ها داشته است زیرا هدایت بیان آن توسط پروموتر ریشه–ویژه مانوپین سنتاز انجام‌شده است (شکل‌های ۶ و ۸) که نقش هدایت‌گر آن در ریشه در مقالات گوناگونی پیشتر به اثبات رسیده است (Feltkamp *et al.*, 1995; Guevara-Garcia *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007; Ñopo, *et al.*, 2012). با توجه به الگوی بیان لاکاز در گیاهان ترا ریخته تصور می‌شود با توجه به اهداف این پژوهش لاین ۵ بهترین گزینه است و پس از آن به ترتیب لاین‌های ۱۰، ۱۴ و ۲۸ و درنهایت ۱۷ بهتر می‌باشد، که کمترین بیان را در برگ و ریشه داشته است (شکل‌های ۵ تا ۸).

لاکاز در ارگانیسم‌های گوناگونی و با خاستگاه‌های متفاوت بیان‌شده است (Kiiskinen, 2005; Soden *et al.*, 2002; Parand *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009). در گیاهان گوناگونی ازجمله برنج، ذرت و توتون در کلروپلاست، دانه یا کل گیاه نیز لاکازهای قارچی بیان‌شده است (Bailey *et al.*, 2004; Davarpanah *et al.*, 2012; Hirai *et al.*, 2008; Hood *et al.*, 2003; de Wilde *et al.*, 2008; Sonoki *et al.*, 2005). آنچه در طراحی ساختار این سازه اهمیت دارد بیان و ترشح آنزیم لاکاز توسط ریشه‌ها می‌باشد.



شکل۷. بیان ژن اکتین درریشه گیاهان تراریخت لاکاز و WT با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز. دی‌ان‌ای WT به عنوان کنترل مثبت برای اکتین مورد استفاده قرار گرفت. میزان بیان اکتین در هر لاین جهت نرمال‌سازی بررسی بیان لاکاز به کار برده شد.



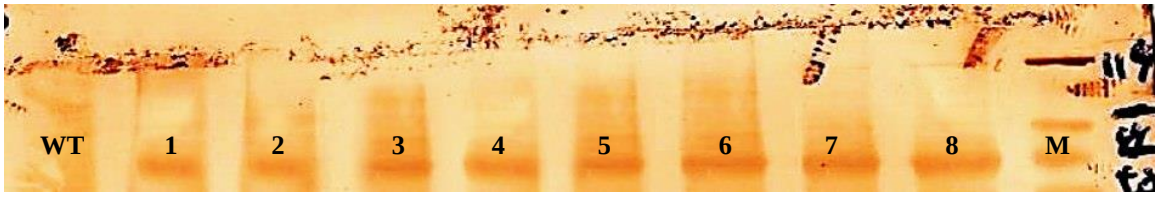
شکل ۸. بررسی بیان ژن لاکاز قارچی درریشه گیاهان تراریخت لاکاز و WT با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز. C: پلاسمید

pBLac به‌عنوان کنترل مثبت؛ ابتدا WT سپس به ترتیب لاین‌های تراریخت لاکاز ۵، ۱۰، ۱۴، ۱۷ و ۲۸.

گیاهان توسط فرایند ترشح توسط ریشه با محیط پیرامون ریشه در تعامل با دیگر جانداران و حتی بخش غیرزنده خاک هستند. در این تحقیق این ویژگی جهت تولید آنزیم لاکاز نوترکیب مورداستفاده قرار گرفت. فرایندی که به‌طور طبیعی مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد و در مورد پروتئین‌هایی چون GFP، گزیلاناز باکتریایی، آلکالین فسفاتاز، GUS و آنتی‌بادی مونوکلونال نیز مورداستفاده قرارگرفته است (Drake *et al.*, 2003; Gleba *et al.*, 1999). در این تحقیق نشان داده شد که تولید پروتئین نوترکیب توسط ریشه، با استفاده از پروموتر مخصوص بیان ریشه جهت تولید یک پروتئین هترولوگ در گیاه توتون موفقیت‌آمیز بوده است (شکل ۹). همچنین به‌کارگیری سیگنال پپتید اندوکیتیناز اسیدی Q توتون، پروتئینی که به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود (Linthorst *et al.*, 1990)، در این سازه باعث شد ضمن پرهیز از افزودن متیونین اضافی به ابتدای لاکاز بالغ، ترشح آن به فضای خارج سلولی هدایت شود. وجود سیگنال مرتبط با لاکاز در وسترن‌بلات به‌صورت یک تک باند در سایز موردنظر ۵۴/۴۲ کیلو دالتون مؤید این مطلب است. زیرا اگر سیگنال پپتید فاقد عملکرد باشد یا به‌خوبی عمل نکند انتظار می‌رود یا باند در سایز بزرگ‌تر ۵۷ کیلو دالتون مشاهده شود یا دو باند مشاهده شود (شکل ۹).

کارکرد موفق سیگنال پپتید در جدایی از پروتئین هدف و قاعدتاً ترشح آنزیم به فضای بیرون سلولی این سیگنال پپتید را به‌عنوان هدفی ارزشمند برای بیان و تولید پروتئین‌های ترشحی هترولوگ در گیاهان به‌ویژه پروتئین‌های دارویی که حفظ ساختارشان مهم است مطرح می‌کند. بیان ریشه-ویژه سازگار با اقتصاد گیاه می‌باشد، لذا با طراحی سازه بیش بیانی ویژه در ریشه از تولید و انباشت بیهوده پروتئین در دیگر بافت‌های گیاه جلوگیری می‌شود و از طرفی با ترشح آن به خارج از بافت ریشه، با توجه به این‌که ۸۰ تا ۹۰٪ هزینه تولید پروتئین را هزینه استخراج آن تشکیل می‌دهد (Gleba *et al.*, 1999; Gaume *et al.*, 2003; Drake *et al.*, 2009). تولید و ترشح لاکاز در محیط کشت هیدروپونیک هزینه استخراج و جداسازی پروتئین را در فرایندهای فرودست به حداقل ممکن خواهد رساند، زیرا با تراوش آن به محیط نمکی ساده و ارزان‌قیمت، استخراج آن بسیار آسان‌تر است، ضمن این‌که در مقایسه با تولید و انباشت پروتئین‌های نوترکیب در دیگر اندام‌های گیاه، مثل برگ و دانه‌ها، این روش نیازمند طی مراحل گوناگون و پیچیده جهت حذف ترکیبات پیچیده نمی‌باشد و پروتئین موردنظر به‌سادگی استخراج می‌شود (Drake *et al.*, 2009).

ازآنجاکه تولید پروتئین در روش ترشح پروتئین توسط ریشه در شرایط کنترل‌شده گلخانه و یا در شرایط کشت در شیشه (این‌ویترو) در ریشه‌های مویین انجام می‌شود خطرات زیست‌محیطی فرار ژن به محیط به‌طور مشخص در آن وجود ندارد. بنابراین می‌توان انتظار داشت در پالایش محیط‌زیست توسط گیاهان تراریخت، طی فرایند ترشح توسط ریشه به‌کار رود.



شکل ۹. تایید بیان پروتئین لاکاز در ریشه گیاه توتون تراریخت: وسترن بلات برای ۳۰ میکروگرم پروتئین محلول کل برای

هر نمونه؛ لاین‌های ۱–۸ پروتئین گیاهان تراریخت با پلاسمید pBlac می‌باشد. باند حاصل از حضور پروتئین دارای تگ‌هیستیدین بین ۴۵–۶۶ کیلو دالتون قرار گرفته است.

با کاشت گیاه تراریخت ترشح‌کننده لاکاز می‌توان پس از زیست‌پالایی محیط از ترکیبات سمی، پیش از گلدهی و تولید گرده آن را برداشت کرد تا ایرادی ازنظر ایمنی زیستی بر آن وارد نشود. جهت تولید صنعتی آن از کشت هیدروپونیک و ریشه مویی گیاهان استفاده کرد بدون آن‌که خطر رهاسازی تراژن به محیط وجود داشته باشد.

سپاسگزاری

هزینه این پژوهش توسط گرنت شماره ۹۱۰۶۰۷۹۵ از صندوق حمایت از پژوهشگران معاونت علمی ریاست جمهوری تأمین‌شده است. این پژوهش در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله به انجام رسیده است.

REFERENCES

Bailey MR, Woodard SL, Callaway E, Beifuss K, Magallanes-Lundback M, Lane JR, Horn ME, Mallubhotla H, Delaney DD, Ward M, Van Gastel F (2004) Improved recovery of active recombinant laccase from maize seed. Appl Microbiol. Biot. 63: 390-397.

Behnam M, Davarpanah SJ, Karimian R (2016) Designing and cloning a masp1-based synthetic gene in binary vector for transient expression in cotton fiber. NBR. 3: 238-248.

Chhabra M, Mishra S, Sreekrishnan TR (2015) Immobilized laccase mediated dye decolorization and transformation pathway of azo dye acid red 27. J . Environ. Health. Sci. 13:38.

Davarpanah SJ, Ahn JW, Ko SM, Jung SH, Park YI, Liu JR, Jeong WJ (2012) Stable expression of a fungal laccase protein using transplastomic tobacco. Plant Biotechnol. Rep. 6: 305-12.

Davarpanah SJ, Jung SH, Kim YJ, Park YI, Min SR, Liu JR, Jeong WJ (2009) Stable plastid transformation in *Nicotiana benthamiana*. J. Plant Biol. 52: 244-50.

de Wilde C, Uzan E, Zhou Z, Kruus K, Andberg M, Buchert J, Record E, Asther M, Lomascolo A (2008) Transgenic rice as a novel production system for *Melanocarpus* and *Pycnoporus* laccases. Transgenic. Res. 17: 515.

Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12:13-5.

Drake PM, Barbi T, Sexton A, McGowan E, Stadlmann J, Navarre C, Paul MJ, Ma JK (2009) Development of rhizosecretion as a production system for recombinant proteins from hydroponic cultivated tobacco. FASEB. J. 23: 3581-9.

Drake PM, Chargelegue DM, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Obregon P, Ma JK (2003) Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. Plant. Mol. Biol. 52: 233-41.

Feltkamp D, Baumann E, Schmalenbach W, Masterson R, Rosahl S (1995) Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the mas elements and correlates with high transcript levels of mas-binding factor. Plant. Sci. 109: 57-65.

Foo CW, Kaplan DL (2002) Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. Adv .Drug . Deliver .Rev. 54:1131-43.

Fujihiro S, Higuchi R, Hisamatsu S, Sonoki S (2009) Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. Appl. Microbiol. Biot. 82: 853.

Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I (2003) Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy

roots. Plant. Cell. Rep. 21: 1188-93.
Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. P. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 5973-7.
Guevara-Garcia A, Lopez-Bucio J, Herrera-Estrella L (1999) The mannopine synthase promoter contains vectorial cis-regulatory elements that act as enhancers and silencers. Mol. Gen. Genet. 262: 608-17.
Gupta G, Rajendran V, Atanassov P (2003) Laccase biosensor on monolayer- modified gold electrode. Electroanal. 15:1577-83.
Gutiérrez SP, Saberianfar R, Kohalmi SE, Menassa R (2013) Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. BMC Biotechnol. 13: 40.
Hirai H, Kashima Y, Hayashi K, Sugiura T, Yamagishi K, Kawagishi H, Nishida T (2008) Efficient expression of laccase gene from white-rot fungus *Schizophyllum* commune in a transgenic tobacco plant. FEMS. Microbiol. lett. 286: 130-5.
Hood EE, Bailey MR, Beifuss K, Magallanes- Lundback M, Horn ME, Callaway E, Drees C, Delaney DE, Clough R, Howard JA (2003) Criteria for high- level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. Plant. Biotechnol. J. 1:129-40.
Kiiskinen LL (2005) Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*. VTT Technical Research Centre of Finland.
Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680.
Lee LY, Kononov ME, Bassuner B, Frame BR, Wang K, Gelvin SB (2007) Novel plant transformation vectors containing the superpromoter. Plant. Physiol. 145: 1294-300.
Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q (2013) Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. J. Vis. Exp: JoVE. 77.
Li J, Yuan H, Yang J (2009) Bacteria and lignin degradation. Frontiers of biology in China. 4: 29-38.
Linthorst HJ, Van Loon LC, van Rossum CM, Mayer A, Bol JF, van Roekel JS, Meulenhoff EJ, Cornelissen BJ (1990) Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. Mol. Plant-Microbe. Interact. 3:252-8.
Madhavi V, Lele SS (2009) Laccase: properties and applications. BioResources. 4: 1694-717.
Maestre-Reyna M, Liu WC, Jeng WY, Lee CC, Hsu CA, Wen TN, Wang AH, Shyur LF (2015) Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. PLOS One. 10: e0120601.
Min SR, Davarpanah SJ, Jung SH, Park YI, Liu JR, Jeong WJ (2015) An episomal vector system for plastid transformation in higher plants. Plant. Biotechnol. Rep. 9: 443-9.
Montazer M, Sadeghian A (2008) Application of laccases with cellulases on denim for clean effluent and repeatable biowashing. J. Appl. Polym. Sci. 110: 3121-9.
Ñopo L, Woffenden BJ, Reed DG, Buswell S, Zhang C, Medina-Bolivar F (2012) Super-promoter: TEV, a powerful gene expression system for tobacco hairy roots. In Recombinant Gene Expression (pp. 501-526). Humana Press, Totowa, NJ.
Pannu JS, and Kapoor RK (2014)

Microbial laccase: a mini review on their production, purification and applications, Int. J. Pharm. Arch. 3, 528- 536.

Parand M, Ranaei SS, Yamchi A (2015) cloning and extracellular expression of laccase enzyme from bacillus of Iranian hot spring into yeast cell *Pichia pastoris*. Modern Genet. J.1-10.

Passarini MR, Ottoni CA, Santos C, Lima N, Sette LD (2015) Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. AMB Express. 5: 19.

Payne G, Ahl P, Moyer M, Harper A, Beck J, Meins F, Ryals J (1990) Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. P. Natl. A. Sci. USA. 87: 98-102.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods. 8: 785.

Restrepo MA, Freed DD, Carrington JC (1990) Nuclear transport of plant potyviral proteins. Plant. Cell. 2: 987-98.

Rezaei S, Tahmasbi H, Mogharabi M, Ameri A, Forootanfar H, Khoshayand MR, Faramarzi MA (2015) Laccase-catalyzed decolorization and detoxification of Acid Blue 92: statistical optimization, microtoxicity, kinetics, and energetics. J. Environ. Health. Sci. 13: 31.

Sadeghian A, Montazer M (2009) The effect of cellulase and laccase enzymes on denim color. J. Color. Sci. Technol. 3: 53-64.

Scheller J, Gührs KH, Grosse F, Conrad U (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato. Nat. Biotechnol. 19: 573.

Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A (2011) Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme. Res. 2011.

Soden DM, O'callaghan J, Dobson AD (2002) Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous Pichia pastoris host. Microbiol. 148: 4003-14.

Sonoki T, Kajita S, Ikeda S, Uesugi M, Tatsumi K, Katayama Y, Iimura Y (2005) Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 138-42.

Stokes KD, McAndrew RS, Figueroa R, Vitha S, Osteryoung KW (2000) Chloroplast division and morphology are differentially affected by overexpression of FtsZ1 and FtsZ2 genes in *Arabidopsis*. Plant. physiol. 24: 1668-77.

Umbeck P, Johnson G, Barton K, Swain W (1987) Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. Nat. Biotechnol. 5: 263.

UniProt Consortium (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic acids Res. 46: 2699.

Virk AP, Sharma P, Capalash N (2012) Use of laccase in pulp and paper industry. Biotechnol. Prog. 28:21-32.

Xu L, Zhu M, Chen X, Wang H, Zhang G (2015) A novel laccase from fresh fruiting bodies of the wild medicinal mushroom *Tricholoma matsutake*. Acta Biochim. Pol. 62.

Yoshida, H (1883). Chemistry of Lacquer (Urbz] part 1. J. Chem. Sol. 43: 472-486.