



بیان پروتئین نو ترکیب ایتترفرون گاما در بذر گیاه توتون

صابر اصغر زاده^{۱*}، خدیجه باقری^۲، مختار جلالی جواران^۳، فریدون مهبودی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

^۲ استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

^۳ دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

^۴ دانشیار بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۲

چکیده

از مهم‌ترین عوامل موثر بر افزایش تولید پروتئین نو ترکیب در گیاه، بیان آن در بافت مناسب و نیز افزایش پایداری و تجمع پروتئین با استفاده از عوامل هدف‌گیری کننده به جایگاه‌های مناسب سلول است. در این تحقیق برای بیان ایتترفرون گامای انسانی در بذر توتون و هدایت آن به شبکه آندوپلاسمی از پیش‌برنده اختصاصی بذر (*Napin*)، توالی کوزاک در انتهای ۵' و توالی *KDEL* در انتهای ۳' ژن *IFN γ* استفاده شد. ژن *IFN γ* ابتدا در ناقل *pGEM ® -T Easy* همسانه‌سازی و پس از تایید صحت آن با استفاده از روش *PCR*، هضم آنزیمی و توالی‌یابی، در ناقل بیانی گیاهی *pBI121* زیرهمسانه‌سازی گردید. ناقل نو ترکیب *pBI IFN γ* به سویه *LBA4404* اگر باکتریوم معرفی و این باکتری برای تراریختی ریزنمونه‌های برگ‌گی توتون استفاده شد. نوساقه‌های باززائی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح *DNA* و مشاهده قطعه ۴۳۲ جفت بازی (*IFN γ*) و قطعه ۷۹۵ جفت بازی (*NPTII*) در واکنش *PCR* و هضم آنزیمی بیانگر انتقال سازه مدنظر به ژنوم گیاه بود. همچنین رونویسی از ژن *IFN γ* با *RT-PCR* تائید شد. بررسی‌ها در سطح پروتئین با استفاده از *SDS-PAGE* بیان موفقیت آمیز ژن *IFN γ* را نشان داد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بذر گیاهی پتانسیل بالایی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارند.

کلمات کلیدی: پیش‌بر ناپین، توالی *KDEL*، توالی *Kozak*، توتون تراریخت، ژن *IFN γ* .

مقدمه

نوترکیب را فراهم آورد (Droogenbroeck *et al.*, 2006). شبکه آندوپلاسمی سلول (ER) حاوی پروتئینهای چپرونی^۱ مختلف است که موجب بسته‌بندی صحیح پروتئین‌ها شده و از تجمع و تشکیل ساختارهای ۳ بعدی ناصحیح جلوگیری می‌کند. بنابراین قرارگرفتن پروتئین نوترکیب در ER موجب بسته‌بندی صحیح پروتئین شده و در نتیجه پایداری و تجمع آن افزایش می‌یابد. توالی KDEL از جمله توالی‌هایی است که برای قرارگرفتن پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در مطالعات متعددی استفاده و کارایی آن به اثبات رسیده است (Conrad & Fiedler, 1998).

از جمله اهداف دیگر در انتقال ژن، افزایش کارایی ترجمه و بیان ترنس ژن است. براساس گزارش کوزاک، وجود توالی حفاظت شده ACCAUGG در اطراف ناحیه کدن شروع، اثر بسیار مطلوبی بر بیان ژن دارد (Kozak, 1986). به همین دلیل در تحقیق حاضر توالی Kozak در آغازگر پیشبر سازه *pBI IFN γ* استفاده شد.

ایتترفرون گاما (*IFN γ*) ارزش درمانی بالا و کاربردهای وسیع در پزشکی دارد. برای بیماران با نقص مادرزادی از جمله گرانولوماتوس مزمن ۲ (Woodman *et al.*, 1992)، سالمونلا تیفی موریوم (Nauciel & Espinasse, 1992)، سرطان‌های مختلف از جمله نوروبلاستوما

نیاز روز افزون به داروهای بیولوژیک و ارزش اقتصادی بالای آنها از یک طرف و مزایای سیستم‌های بیانی گیاهی از طرف دیگر موجب شده که استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورهای طبیعی در تولید داروها مورد توجه ویژه قرار گیرد. هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان حداکثر یک‌دهم سیستم تخمیری و یک-هزارم سلول جانوری است (Ghislaine *et al.*, 2008). تغییرات پس از ترجمه که برای فعالیت پروتئین‌های نوترکیب لازم است، در گیاهان بهتر و مطلوب‌تر از پروکاریوت‌ها انجام می‌شود (Fischer *et al.*, 1999). خطرات ناشی از آلودگی با مواد سمی باکتریایی و عوامل بیماری‌زای انسانی به حداقل می‌رسد. از طرفی، امکان هدایت پروتئین سنتز شده به اجسام داخل سلولی با هدف پایداری بیشتر، وجود دارد (Daniell *et al.*, 2001). بذور گیاهی به دلایلی از جمله: افزایش پایداری پروتئین، تجمع بالای پروتئین در حجم کوچک و ذخیره‌سازی راحت آن، استخراج نسبتاً راحت به دلیل کم بودن ترکیبات فنولیک و ترکیبات پیچیده پروتئینی و محدود شدن بیان پروتئین به یک اندام ذخیره‌ای و جلوگیری از اختلال در رشد بافت‌های دیگر بیشتر مورد توجه هستند (Boothe *et al.*, 1997).

علاوه بر نوع بافت گیاه، با استفاده از توالی‌های هدف‌گیری کننده به جایگاه‌های مناسب در سلول نیز می‌توان موجبات افزایش تجمع پروتئین

¹ chaperones

² Chronic granulomatous

AF506749 به ثبت رسیده است. تکثیر ژن $IFN\gamma$ با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی رفتی (5'-AGA GGA TCC ATG) (3'-CAG GAC CCA TAT GTA AAA G-5') محل برشی $BamHI$ و آغازگر معکوس (-5' GCAGAGCTCTTACAATTCGTCTTTCT 3'-GGGATGCTCTTCG) با محل برشی $SacI$ انجام شد. قابل ذکر است که توالی کوزاک در آغازگر رفتی و توالی KDEL در آغازگر معکوس تعبیه شد. در واکنش PCR از غلظت‌های استاندارد اجزای مختلف استفاده شد و دمای اتصال آغازگر با رشته الگو °C ۶۳ انتخاب گردید. پس از تکثیر و تخلیص، ژن موردنظر در ناقل pGEM®-T Easy همسانه‌سازی گردید. سازه تهیه شده به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه $TOP10F'$ منتقل شد. بر روی کلنی‌های سفید رشد کرده در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک-های آمپی‌سیلین و تتراسیکلین، $IPTG$ و $X-gal$ کلنی- PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن $IFN\gamma$ انجام شد. سپس کلون‌های PCR مثبت با هضم آنزیمی نیز تایید شدند و در نهایت کلون‌های مثبت توالی‌یابی شدند و نتایج توالی‌یابی با نرم افزار Blast و برنامه Clustalw مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه سازه بیانی حاوی ژن $IFN\gamma$ ($pBI\ IFN\gamma$)

ابتدا در ناقل بیانی $pBI121$ پیش‌بر اختصاصی بذر *Napin* جایگزین پیش‌بر *CaMV35S* شده و قطعه‌ی $IFN\gamma$ - *Kozak*

(Wandelt *et al.*, 1992) و ملانوما (Abdel- (wahab *et al.*, 1997) استفاده می‌شود.

تلاش‌های زیادی در جهت تولید انبوه این پروتئین با ارزش صورت گرفته اما پروتئین تولید شده در باکتری *E. coli* ساختار فضایی مناسب نداشته و بخش اعظم آن به فرم انکلوژن بادی در می‌آید (Wetzel *et al.*, 1991). استفاده از سلول‌های یوکاریوتی جهت تولید آنها نیز هزینه بسیار بالایی دارد. به نظر می‌رسد که دستورزی ژنتیکی گیاهان برای تولید این گروه از پروتئین‌های با ارزش، یک روش جایگزین مناسب باشد. در این تحقیق سازه بیانی طوری طراحی و ساخته شد تا پروتئین $IFN\gamma$ در شبکه آندوپلاسمی بذر گیاه توتون بیان شود.

مواد و روش‌ها

ناقل‌های ژنی و سویه‌های باکتری

از باکتری *E. coli* سویه $Top10 F'$ و ناقل-های $pBI121$ و pGEM®-T Easy Vector برای همسانه‌سازی استفاده شد. برای تراریختی گیاهان از باکتری اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه *LBA4404* استفاده گردید.

تکثیر ژن $IFN\gamma$ همراه توالی‌های *Kozak* $KEDL$ ، و همسانه‌سازی آنها در ناقل **T Easy vector**

ژن اینترفرون گامای انسانی توسط معین رضاخانلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ جدا سازی و تعیین توالی شد و در بانک ژن با شماره

۵-۸ دقیقه سانتیفریژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت باکتری (LB)، محیط تلقیح (MS) مایع و هورمون‌های *BAP* با غلظت ۳mg/l و *NAA* به مقدار ۰/۱mg/l) به سلولهای باکتری رسوب داده شده اضافه و سلول‌ها کاملاً در آن حل شدند. بعد از آماده کردن سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه‌ها به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در تماس با سوسپانسیون اگروباکتریوم حاوی ناقل مورد نظر (*pBI IFN γ*) قرار گرفته و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط هم‌کشتی (MS) کامل و هورمون‌های *BAP* با غلظت ۳mg/l و *NAA* به مقدار ۰/۱mg/l) به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ C° در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعدی این ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت انتخابی (MS) کامل، هورمون‌های *BAP* با غلظت ۳mg/l و *NAA* به مقدار ۰/۱mg/l و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰-۲۵۰ μ g/ml و سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ μ g/ml) (به منظور گزینش گیاهچه‌های تراریخته) در دما و دوره نوری مشابه مرحله قبل به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. واکشت نمونه‌ها به فاصله هر ۱۵ روز یک‌بار انجام شد. برای طول شدن ساقه از محیط طویل شدن ساقه (MS) کامل به همراه ۱۰۰ μ g/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین) و برای ریشه‌زائی نوساقه‌های بدست آمده از محیط ریشه‌زایی (MS) کامل به همراه ۰/۱ μ g/ml هورمون (*NAA*) استفاده شد. در مرحله آخر، گیاهان ریشه‌دار شده ابتدا به گلدان‌های حاوی

KDEL با هضم آنزیمی از T-Vector جدا شده و واکنش اتصال قطعه جدا شده با ناقل *pBI121* انجام شد و از *PCR* و هضم آنزیمی برای تایید صحیح بودن کلونینگ استفاده شد. ناقل نوترکیب *pBI IFN γ* به روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم منتقل (sambrook et al., 2001) و سپس انتقال آن با روش کلنی-*PCR* تایید شد و از این باکتری برای تراریزش ریزنمونه‌های برگ‌ی استفاده شد.

تراریزش ریزنمونه‌های توتون و باززایی گیاهان تراریخت

ضدعفونی بذرهای توتون رقم *Tobacco Xanthi* با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای جوانه‌زنی بذور از محیط MS در دمای ۲۶ C° با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. بعد از ۲ هفته گیاهان رشد کرده و جوان‌ترین برگ‌ها با طول تقریباً ۴ سانتیمتر برای تراریخت نمودن انتخاب گشته (که هرکدام از آن‌ها به ۸ تا ۱۰ قطعه تقسیم شدند) و جهت تلقیح آماده شدند. یک روز قبل از انجام آلودگی، تک کلنی‌های اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر در محیط (LB + ۵۰ μ g/ml) کانامایسین در دمای ۲۸ C° و تاریکی کشت داده شد، وقتی که OD باکتری رشد کرده به ۰/۵-۱ رسید، در دمای ۴ C° و دور ۳۵۰۰ rpm به مدت

گیاهان *PCR* مثبت، ۲۰ روز پس از گلدهی انجام شد. برای انجام واکنش *PCR* از آغازگرهای مرحله قبل استفاده شد.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح پروتئین

برای بررسی بیان ژن در سطح پروتئین از روش الکتروفورزی *SDS-PAGE* استفاده شد و استخراج پروتئین کل نیز از بذور رسیده گیاهان تراریخت و شاهد (غیرتراریخت) انجام گرفت.

نتایج

جایگزینی پیشبرنده *Napin* به جای *CaMV35S* با استفاده از هضم آنزیمی (*HindIII* و *BamHI*) تایید شد به این ترتیب که قطعه ۱۱۴۰bp (مربوط به *Napin*) به جای قطعه ۸۳۵bp (مربوط به *CaMV35S*) قرار گرفت.

همان‌طور که انتظار می‌رفت تکثیر ژن *IFN γ* یک قطعه حدود ۴۳۲bp تولید نمود (شکل ۱a). پس از تایید همسانه‌سازی این قطعه در ناقل *TA* برای توالی‌یابی اقدام گردید. همسانه‌سازی مجدد ژن *IFN γ* در ناقل بیانی گیاهی *pBI121* با روش کلنی-*PCR* و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۱b) و نهایتاً سازه *pBI IFN γ* ساخته شد (شکل ۲).

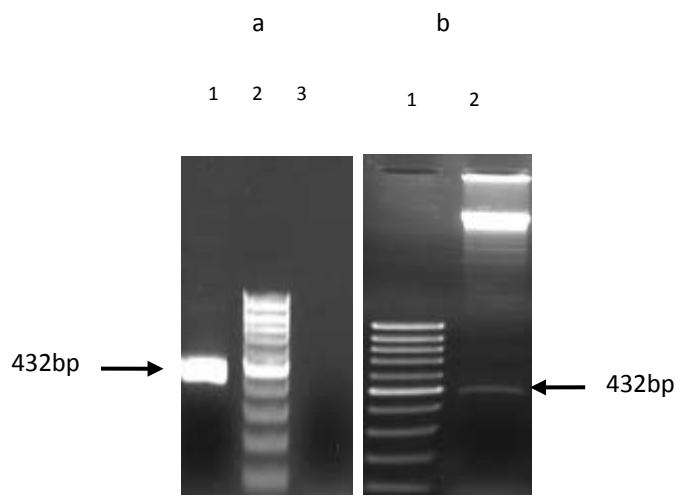
پرلایت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) و سپس به خاک منتقل شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بذور جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخته جهت آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح DNA

DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان تراریخت و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، با روش دلپورتا استخراج شد (Dellaporta et al., 1983). سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptIII* و ژن *IFN γ* واکنش *PCR* بر روی گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد. واکنش هضم آنزیمی نیز با آنزیم *XbaI* بر روی محصول *PCR* انجام گرفت.

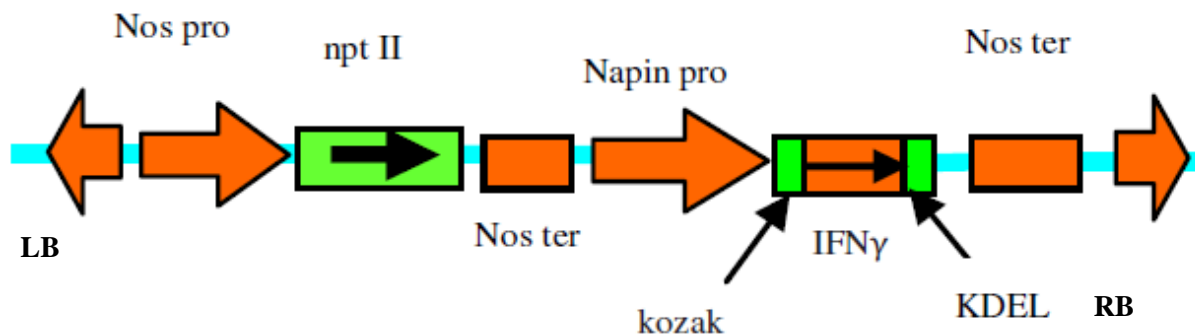
بررسی مولکولی گیاهان تراریخته در سطح RNA

برای بررسی بیان ژن در سطح *RNA* از روش *RT-PCR* استفاده شد. استخراج *RNA* از بافت‌های بذری نارس با استفاده از محلول استخراج *RNA* (*RNX-Plus* - 25ml) (RN7713C) تهیه شده از شرکت سیناژن، انجام گردید. ساخت *cdNA* از روی *RNA* استخراج شده، بوسیله کیت دومرحله‌ای *RT-PCR* (Vivantis, RTPL12) انجام گرفت. قابل ذکر است که برای استخراج *RNA*، برداشت بذر از



شکل ۱- تکثیر ژن $IFN\gamma$ با PCR (a) و تائید کلونینگ آن با هضم آنزیمی (b). (A) خط ۱: قطعه ۴۳۲bp تکثیر شده، خط ۲: نشانگر ۱۰۰bp و خط ۳: کنترل منفی (b) خط ۱: نشانگر ۱۰۰bp، خط ۲: ناقل $pBI\ IFN\gamma$ برش داده شده با آنزیم $SacI$ و $BamHI$ و قطعه ۴۳۲bp آزاد شده.

Figure 1- Amplification of the $IFN\gamma$ gene by PCR (a) and confirmation of cloning by restriction enzyme digestion(b). a) Lane 1: Amplified $IFN\gamma$ gene (500 bp); Lane 2: 100 bp ladder. Lane 3: Negative control. b) Lane 1: 100 bp ladder. Lane 2: digested recombinant $pBI121\ IFN\gamma$ plasmid by $SacI$ and $SmaI$ enzymes.



شکل ۲- تصویر ناحیه T-DNA وکتور دوگانه $pBI121\ IFN\gamma$ حاوی ژن $nptII$ (مقاومت به کانامایسین)، پیشبرنده $Napin$ ، ژن $IFN\gamma$ ، توالی کزاک و توالی $KDEL$ که در ناقل بیانی $pBI121$ در بین دو ناحیه LB و RB قرار گرفته است.

Figure 2- Schematic diagram of the T-DNA region in the binary vector $pBI121\ IFN\gamma$. Including $npt\ II$, coding sequence of the neomycin phosphotransferase II gene; napin promoter; $IFN\gamma$, human gamma interferon gene; kozak sequence; KDEL, ER retention signal; RB and LB, T-DNA right and left border, respectively.

پس از ۲ الی ۳ هفته، پیدایش جوانه‌ها از حاشیه زخمی شده ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم تراریخت شده مشاهده گردید. ریزنمونه‌های برگ‌گی که بعنوان شاهد (بدون تلقیح بواسطه آگروباکتریوم تراریخت)، بر روی محیط گزینشگر قرار داشتند، باززایی نشان ندادند و سفید رنگ شدند (شکل ۳).

آلوده‌سازی ریزنمونه‌های توتون ورشد جوانه-های تراریخت در محیط گزینشگر تراریختی ریزنمونه‌های برگ‌گی توتون در محیط تلقیح انجام شد. ریزنمونه‌های آلوده شده با آگروباکتریوم، در قسمت حاشیه نسبت به عملکرد آگروباکتریوم واکنش نشان داده و به سمت بالا خم شدند.



شکل ۳- باززایی نوساقه‌ها بعد از تلقیح ۱. جوانه‌های اولیه باززایی شده از ریزنمونه‌های ۲ الی ۳ هفته پس از تلقیح. ۲. عدم بازایی در ریزنمونه‌های شاهد.

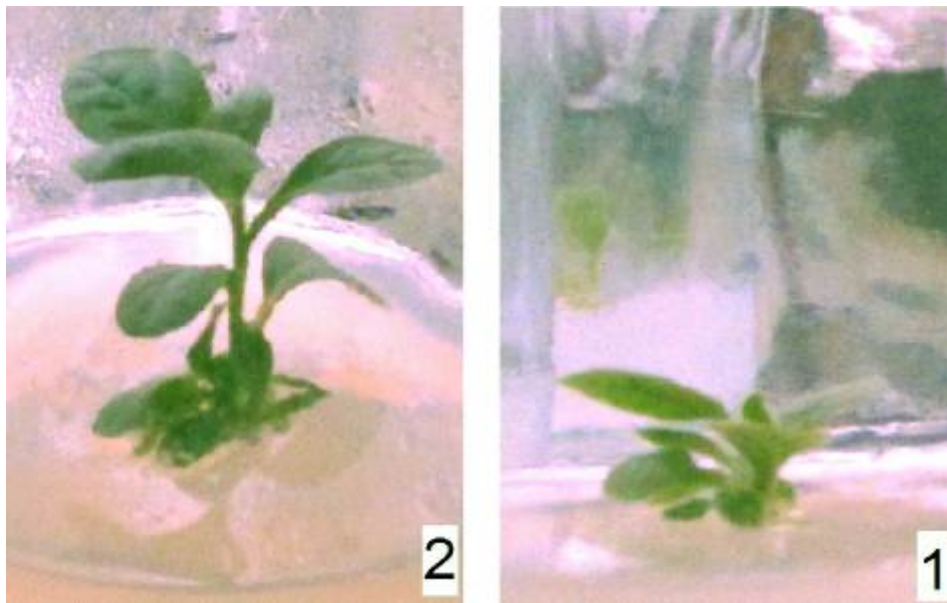
Figure 3- Regeneration of shoots after co-cultivation. 1: Regeneration of shoots from leaf disk explants 2-3 weeks after co-cultivation. 2: non regeneration in control explants.

ریشه‌زایی و درون ظروف بزرگتر انتقال یافتند (شکل ۴).

گیاهان تراریخت ابتدا به پرلایت و سپس به خاک منتقل شدند. حدود یک ماه پس از مرحله گلدهی بذور گیاهان تراریخت رسیده و آماده برداشت شدند (شکل ۵).

انتقال گیاهچه‌ها به محیط طویل شدن ساقه و ریشه‌زایی

گیاهچه‌هایی که در مقابل کانامایسین مقاومت کرده و سبز باقی ماندند، پس از رشد مناسب و به منظور طویل شدن ساقه و ریشه‌زایی، به محیط طویل شدن ساقه و پس از رسیدن گیاهچه‌ها به ارتفاع تقریباً پنج سانتی‌متر، به محیط



شکل ۴- انتقال گیاهچه‌های باززایی شده از محیط گزینشگر به محیط طولی شدن ساقه (۱) و ریشه

زایی (۲)

Figure 4- Regenerated plantlets transferred from selection medium to shoot elongation (1) and rooting medium (2).

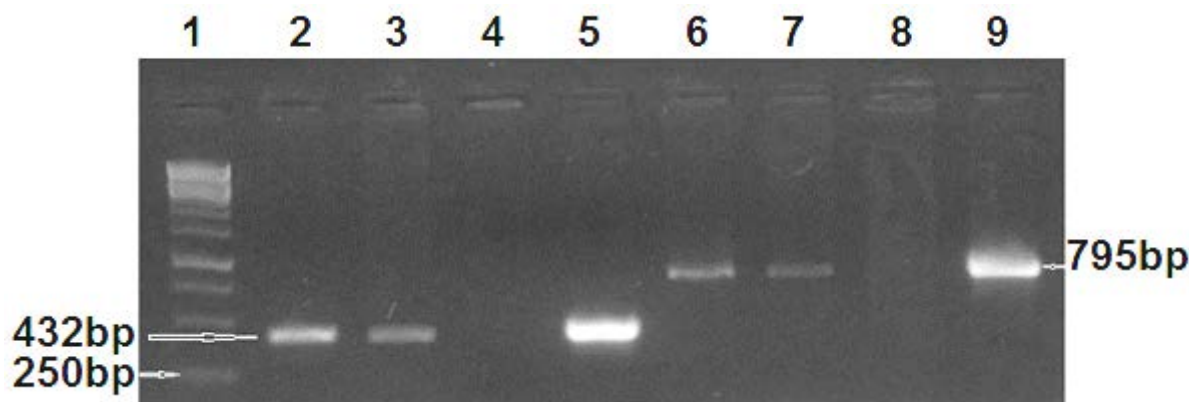


شکل ۵- انتقال گیاهچه‌ها به خاک (۱) و گلدهی آنها (۲).

Figure 5- Rooted plantlets transferred to soil (1) and flowered (2).

از برگ گیاهان نسل اول (T0) و شاهد، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *nptII* و آغازگرهای ژن *IFN γ* انجام شد، که نتیجه آن تکثیر قطعه ۴۳۲bp مربوط به ژن *IFN γ* و تکثیر قطعه ۷۹۵bp مربوط به ژن *nptII* بود (شکل ۶).

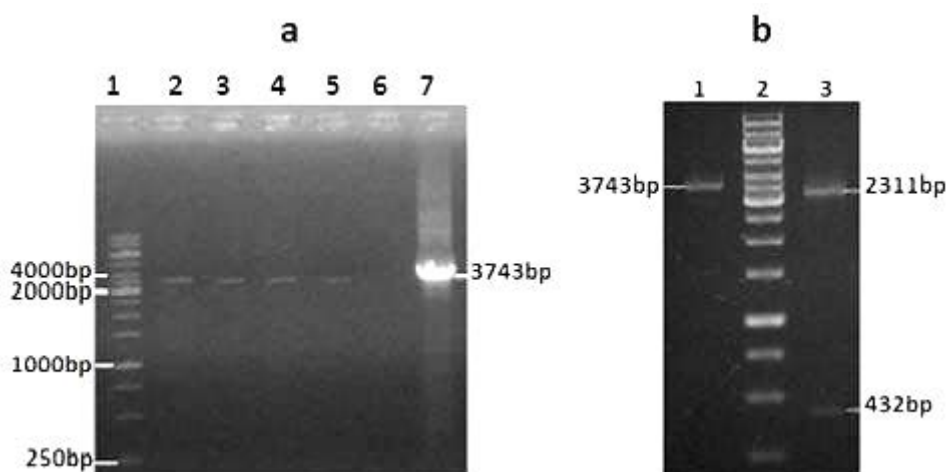
بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA، RNA و پروتئین به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA و اطمینان از انتقال ژن هدف به گیاهان تراریخت، پس از استخراج DNA ژنومی



شکل ۶- بررسی انتقال ژنهای *IFN γ* و *nptII* به گیاهچه های توتون با استفاده از تکنیک PCR ۱- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder). ۲ و ۳: قطعه ۴۳۲bp برای گیاهان تراریخت. ۴: کنترل منفی (گیاه شاهد). ۵: قطعه ۴۳۲bp کنترل مثبت. ۶ و ۷: قطعه ۷۹۵bp برای گیاهان تراریخت. ۸: کنترل منفی. ۹: قطعه ۷۹۵bp کنترل مثبت.

Figure 6- PCR analysis of *IFN γ* and *nptII* gene transfer to tobacco seedlings. 1: 1kb ladder 2, 3: amplified *IFN γ* gene (transformed seedlings) 4: negative control (wild type plant) 5: positive control (pBI *IFN γ* plasmid) 6,7: amplified *nptII* gene (transformed seedlings) 8: negative control (wild type plant) 9: positive control(pBI *nptII* plasmid).

همچنین واکنش PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی رفتی ژن *nptII* و آغازگر معکوس ژن *IFN γ* انجام شد. تکثیر قطعه ۳۷۴۳bp حاوی ژن *nptII* پیش بر *napin* و ژن *IFN γ* تائید دیگری بود مبنی بر این که این قطعات بطور صحیح و در کنار هم (پیوسته) به گیاهچه‌ها منتقل شده‌اند. (شکل ۷a).
با توجه به اینکه در سازه *PBI121-IFN γ* بین پیش بر *napin* و ژن *IFN γ* یک جایگاه برشی اختصاصی برای آنزیم *XbaI* وجود دارد، با واکنش هضم آنزیمی قطعه ۳۷۴۳bp (بدست آمده از واکنش PCR) دو قطعه ۴۳۲bp (مربوط به *IFN γ*) و ۲۳۱۱bp (مربوط به پیشبرنده *napin* و ژن *nptII*) مشاهده شد که نشان می‌دهد سازه منتقل شده به گیاه همان سازه مد نظر ما بوده است (شکل ۷b).

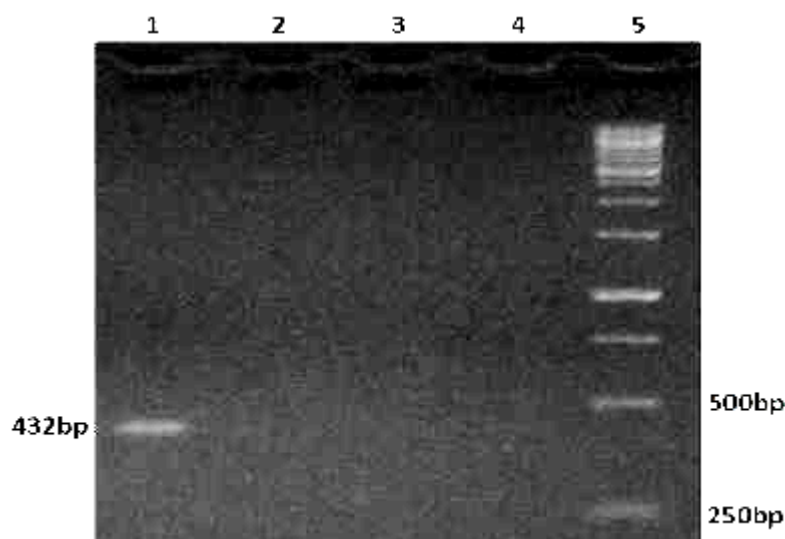


شکل ۷- بررسی انتقال قطعه $nptII$ - $napin$ - $IFN\gamma$ به گیاهچه های توتون با استفاده از PCR (a) و هضم آنزیمی (b). (A) ۱: مارکر 1Kb. ۲، ۳، ۴، ۵: قطعه ۳۷۴۳ جفت بازی تکثیر شده (گیاهان باززایی شده). ۶: کنترل منفی (گیاهچه های شاهد). ۷: کنترل مثبت (پلاسمید $PBI121-IFN\gamma$). b: هضم آنزیمی قطعه ۳۷۴۳ جفت بازی ($nptII$ - $napin$ - $IFN\gamma$). ۱: قطعه ۳۷۴۳ جفت بازی بدون تیمار با آنزیم برشی. ۲: مارکر 1Kb. ۳: قطعه های ۲۳۱۱ و ۴۳۲ جفت بازی ایجاد شده پس از هضم آنزیمی.

Figure 7- Analysis of $IFN\gamma$ - $napin$ - $nptII$ fragment transfer to tobacco seedlings by PCR (a) and digestion (b). a) 1: 1kb ladder 2, 3, 4, 5 amplified 3742bp $IFN\gamma$ - $napin$ - $nptII$ fragment (transformed seedlings) 6: negative control (wild type plant) 7: positive control (pBI $IFN\gamma$ plasmid) b) 1: undigested $IFN\gamma$ - $napin$ - $nptII$ fragment 2: 1kb ladder 3: digested $IFN\gamma$ - $napin$ - $nptII$ fragment.

(عدم حضور DNA ژنومی) انجام شد. وجود قطعه ۴۳۲bp در واکنش $RT-PCR$ ، سنتز $mRNA$ از روی ژن $IFN\gamma$ انتقال یافته به گیاهان توتون را تایید کرد. عدم وجود قطعه مشابه در محصول PCR با الگوی RNA استخراج شده عدم وجود هرگونه آلودگی DNA ژنومی را تایید کرد (شکل ۸).

گیاهانی که نتیجه PCR آنها مثبت بود برای استخراج RNA انتخاب و $cDNA$ ساخته شده، بعنوان الگو برای انجام $RT-PCR$ مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام $RT-PCR$ از آغازگرهای اختصاصی $IFN\gamma$ (که قطعه ۴۳۲bp را تکثیر می-کنند) استفاده شد. در مرحله انجام PCR ، علاوه بر $cDNA$ سنتز شده، از RNA استخراج شده هم بعنوان الگو (کنترل منفی) استفاده شد، این کار بمنظور اطمینان از خلوص RNA استخراج شده



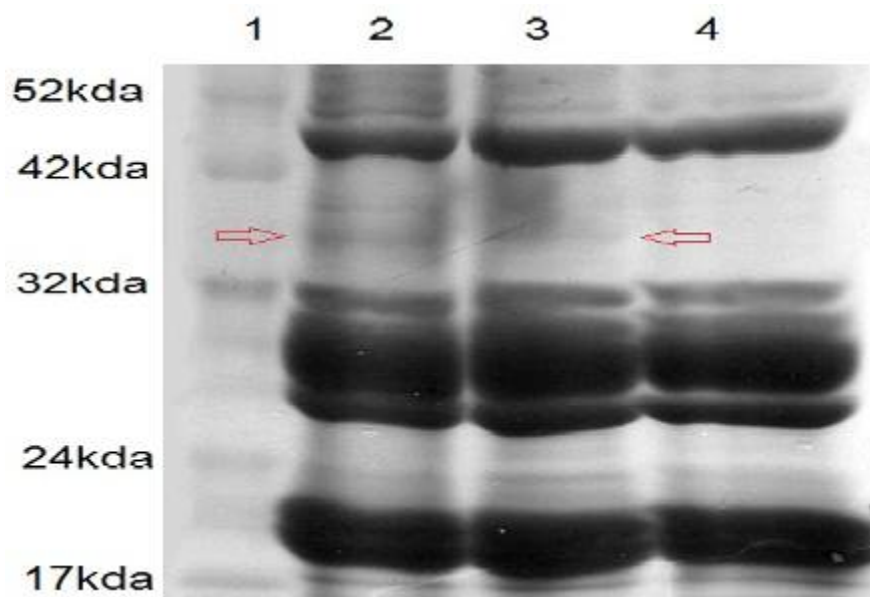
شکل ۸- تایید سنتز $mRNA$ ژن $IFN\gamma$ با واکنش $RT-PCR$. ۱: قطعه ۴۳۲bp محصول واکنش $RT-PCR$ (گیاه تراریخت) ۲: کنترل منفی (cDNA گیاه شاهد) ۳ و ۴: کنترل منفی (RNA کل بذرهای نارس گیاهان تراریخت و شاهد، بعنوان الگو در PCR استفاده شده است). ۵: مارکر 1Kb.

Figure 8- RT-PCR analysis of $IFN\gamma$ gene transcription in tobacco seeds plants. 1: amplified $IFN\gamma$ gene in RT-PCR (transformed seedlings) 2: negative control (wild type plant) 3, 4: negative control (RNA extracted from transgenic and control seeds was used as a template in PCR) 5: 1kb ladder.

بحث

این تحقیق با هدف استفاده از پتانسیل بالای گیاهان جهت تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی طراحی و اجرا گردید. بمنظور بیان ژن $IFN\gamma$ در بذر گیاه، پیش‌بر ناپین (پیش‌بر اختصاصی بذر) بجای پیش‌بر $CaMV 35S$ جایگزین شد. در بذور رسیده کلزا، پروتئین $Napin$ ، ۲۰-۳۰٪ پروتئین کل بذر را تشکیل می‌دهد (Crouch *et al.*, 1981).

آنالیز $SDS-PAGE$ بر روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت وجود قطعه اضافی مشخص با وزن حدود ۳۶Kda را در مقایسه با گیاهان شاهد را نشان داد که دوبرابر وزن مولکولی پروتئین $IFN\gamma$ (۳۶ Kda) *۲=۱۸Kda می‌باشد (شکل ۹).



شکل ۹- بررسی بیان پروتئین $IFN\gamma$ با SDS-PAGE. ۱. نشانگر پروتئین. ۲،۳. پروتئین کل استخراج شده از بذر گیاهان تراریخت ۴. پروتئین استخراج شده از بذر گیاه شاهد.

Figure 9- SDS-PAGE analysis of $IFN\gamma$ gene expression in tobacco seeds. 1: protein ladder 2,3 total protein extracted from transgenic tobacco seeds 4: total protein extracted from wild type tobacco seeds.

توسط پروتئازها است. هدف دیگر از اضافه کردن توالی $KDEL$ ، ممانعت از ورود پروتئین تولید شده به دستگاه گلژی گیاه است. در غشای سیسترون گلژی، گلیکان‌های گیاهی به پروتئین نو ترکیب اضافه می‌شود که این گلیکانها در بدن انسان پاسخ‌های ایمنی را موجب می‌شوند، در حالی که حضور توالی $KDEL$ از وارد شدن پروتئین به دستگاه گلژی ممانعت بعمل می‌آورد. نتایج کار Frigerio *et al* (2001) نشان داده که توالی $KDEL$ با کارایی بالایی از قرار گرفتن پروتئین در دستگاه گلژی ممانعت بعمل می‌آورد از طرف دیگر نتایج مطالعات جدیدتر بیانگر این است که اگر در سازه هدف، از پیش‌برنده اختصاصی بذر و توالی $KDEL$ به طور همزمان استفاده شود،

در مطالعات مختلف به منظور افزایش پایداری پروتئین تولید شده در داخل سلول با استفاده از توالی $KDEL$ آن را به شبکه آندوپلاسمی هدف‌گیری نموده‌اند. با اینکه نتایج این مطالعات تا حدی باهم متفاوت است اما تقریباً در تمام آنها یک نکته مشترک وجود دارد و آن اینکه این توالی موجب افزایش بیان پروتئین نو ترکیب می‌شود. (Schouten *et al* 1997) گزارش کردند که این توالی به خوبی توسط گیرنده‌های مربوطه شناسایی شده و موجب نگهداری آنتی‌بادی تولید شده در ER می‌شود. این مقدار افزایش تولید (تا ۱۰۰ برابر حالتی که از توالی $KDEL$ استفاده نشود) به دلیل قرار گرفتن آنتی‌بادی در ER و در امان ماندن آن از تجزیه

عملکرد پیش‌بر ناپین در گیاه توتون بود. وجود قطعه اضافی مشخص با وزن حدود ۳۶Kda در مقایسه با گیاهان شاهد بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، تایید کننده بیان ژن $IFN\gamma$ در مرحله ترجمه می‌باشد. قطعه مورد نظر دو برابر وزن مولکولی پروتئین $IFN\gamma$ (۳۶ Kda = ۲*۱۸ Kda) می‌باشد که نشان دهنده ایجاد دایمر در پروتئین $IFN\gamma$ می‌باشد. انتهای کربوکسیل یک مونومر $IFN\gamma$ (Ala-123 to Met-134) بطور کوالانسی می‌تواند به انتهای آمینی یک مونومر $IFN\gamma$ دیگر متصل شود. بین مونومرهای $IFN\gamma$ و Cu,Zn-superoxide و $IFN\gamma$ در شرایط سلولی دایمر $IFN\gamma$ تشکیل می‌شود. دایمرهای $IFN\gamma$ از نظر اندازه، عملکرد و ساختار، در شرایط مشابه سلول، رفتار مشابهی با مونومر $IFN\gamma$ دارند (Charles A. LunnS, 1992). امید است با تکمیل بررسی‌های بعدی در زمینه استخراج و استحصال و افزایش بیان این پروتئین، امکان تولید انبوه و ارزان یک پروتئین نوترکیب با ارزش را فراهم کرد.

سپاسگزاری

با تشکر از راهنمایی‌های زنده‌یاد دکتر علی حق‌نظری که در مراحل مختلف انجام این پروژه با ما همکاری نمودند.

میزان بیان پروتئین به طور چشم‌گیری بالا می‌رود. در تحقیقی (Droogenbroeck et al (2006) گزارش کردند که با استفاده از سازه بیانی اختصاصی بذر و هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به شبکه آندوپلاسمی بالاترین میزان بیان $ScFv$ (بیش از ۳۶٪ پروتئین محلول کل در بذور آراییدوپسیس) بدست آمد. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ژن $IFN\gamma$ با موفقیت به گیاه توتون منتقل شده و در دو سطح رونویسی و ترجمه بخوبی بیان می‌شود. جهت انتقال ژن به گیاه توتون از روش آگروباکتریوم استفاده گردید که امروزه به طور گسترده‌ای جهت تراریختی گیاهان (خصوصاً دولپه‌ای‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تراریختی توتون این روش مزایای زیادی نسبت به سایر روش‌های انتقال ژن دارد که از آن جمله عبارتند از: گیاه توتون به تلقیح با نژادهای آگروباکتریوم (مانند $LBA4404$) فوق العاده حساس است، گیاهچه‌ها مستقیماً و بدون نیاز به تشکیل کالوس باززایی می‌شوند، گیاهچه‌ها به آسانی از محل لبه‌ای بریده شده ریزنمونه (برگ) که بوسیله آگروباکتریوم حاوی ناقل تلقیح شده است رشد می‌کنند و کارایی باززایی از بافت‌های گیاهی از این طریق نسبت به سایر روش‌ها بسیار بالاست (Fischer, 2003). بررسی‌های مولکولی با تکنیک PCR بر روی گیاهان تراریخت، انتقال ژن $IFN\gamma$ به گیاهان باززایی شده را تایید کرد. رونویسی از روی ژن $IFN\gamma$ با تکنیک $RT-PCR$ تایید شد. بیان ژن در سطح رونویسی بر

منابع

- Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF (1997). A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon- γ gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 80: 401-12.
- Alicia F, Inmaculada F, Andrea M, Angel, M, Mingo-Castel A, Jon V (2007). Expression of recombinant proteins lacking methionine as N-terminal amino acid in plastids: Human serum albumin as a case study. *Journal of Biotechnology* 127: 593-604.
- Bagheri Kh, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, Zebarjadi A (2010). Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. *African Journal of Biotechnology* 9: 5066-5072.
- Barta A (1986). The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* 6:347-357.
- Bewley R, Black M (1994). *Seed: physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA (1997). Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Development Research* 42: 172-181.
- Charles A, Liza D, David D, Satwant K, Paul J, Zavodny S, Daniel L (1992). An Active Covalently Linked Dimer of Human Interferon-gamma. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 17920-17924.
- Conrad U, Fiedler U (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological function and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* 38:101-109.
- Crouch ML and Sussex IM (1981). Development and storage- protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. *Planta* 153:64-74.
- Daniell H (2003). Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome. *Plant Biotechnology* 1: 371-376.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science* 7: 84-91.
- Daniell H, Lee S B, Panchal T, Wiebe PO (2001). Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*. 311:1001-1009.
- Dellaporta SJ, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Droogenbroeck BV, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Lerberge EV, Terry N, Montagu MV, Liang M, Depicker A, Jaeger GD (2006). Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *PNAS* 104(4): 1430-1435.
- Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S, Drossard J (1999). Towards molecular farming in future: Using plant-cell-suspension culture as bioreactors, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30:109-112.
- Fischer R, Emans N, Twyman RM, Schillberg S (2003). Molecular farming of industrial proteins in plants, In: Fingerman M, Nagabhusanam R (Eds.), *Recent advances in*

- marine biotechnology. Volume 9: Biomaterials and bioprocessing. Science Publisher Inc., USA, pp. 279-313.
- Frigerio L, Pastres A, Vitale A (2001). Influence of KDEL on the Fate of Trimeric or Assembly-Defective Phaseolin: Selective Use of an Alternative Route to Vacuoles. *The Plant cell* 13:1109-1126.
- Ghislaine T, Helene C, Marie N, Aris M (2008). Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal* 6: 309-320.
- Hiatt AH, Cafferkey R, Bowdish K (1989). Production of antibody in transgenic plants. *Nature* 342:76-78.
- Maliga P (2002). Engineering the plastid genome of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 164-172.
- Kozak M (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* 15 (20): 8125-48.
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS* 89(24): 11745-11749.
- Moeenrezakhanlou A, Maghsoudi N, Mahboudi F (2002). Homo sapiens interferon-gamma mRNA, complete cds, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=20805895>.
- Nauciel C, Espinasse-Maes F (1992). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infection and Immunity* 60: 450-454.
- Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, Van Ooyen AJJ, Van Den Elzen PJM, Rietveld K, Hoekema A (1992). Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *Biotechnology* 10: 292-296.
- Sambrook, J. and Russel, DW (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp 12.1-12.114.
- Schouten A, Roosien J, Engelen FA, Jong GAM, Borst-Vrens AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 30:781-793.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 12: 570-578.
- Wandelt CI, Khan MR, Craig S, Schroeder HE, Spencer D, Higgins TJ (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant Journal* 2:181-192.
- Wetzel R, Perry LJ, Veilleux C (1991). Mutations in human interferon gamma affecting inclusion body formation identified by a general immunochemical screen. *Biotechnology* 9: 731-737.
- Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte JT (1992). Prolonged recombinant interferon- γ therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood* 79: 1558-1562.

Expression of recombinant gamma interferon in tobacco plant seeds

Asgharzadeh S.^{*1}, Bagheri Kh.², Jalali Javaran M.³, Mahboudi F.⁴

¹M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan.

²Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan.

³Associate professor of Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture Tarbiat Modares University.

⁴Associate professor of Biotechnology Department, Pasture Institute of Iran.

Abstract

Some important strategies to increase recombinant protein yield in plants include expression of protein in suitable tissue, improvement of protein stability and accumulation by targeting into subcellular organs using specific targeting signals. In this perspective, seed-based platforms are attractive because they allow recombinant proteins to stably accumulate at a relatively high concentration in a compact biomass, which is beneficial for extraction and downstream processing. On the other hand, the ER contain chaperons and isomerase for folding of nascent proteins, which can promote correct protein folding leading to recombinant protein stability and accumulation. In this research for human Gamma interferon expression in tobacco seeds and targeting into ER, we used seed specific promoter (Napin), Kozak sequence at 5' end and KDEL sequence in 3' end of the IFN γ gene. The fragment was cloned into pGEM \oplus -T Easy vector and after confirmation by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing, was subcloned into a plant binary vector (pBI121). This construct cassette was transferred to *A.tumefaciens* LBA4404 and then used to transform tobacco explants. The transformed plants were screened on antibiotic-contained media. The presence of the transgenes was confirmed in the transformants by PCR and expected 432bp (IFN γ) and 795bp (nptII) sequences were amplified. Digestion result indicated that the mentioned construct completely and correctly transferred into tobacco genome. Transcription of IFN γ gene was confirmed by RT-PCR. Analysis of transgenic plants by SDS-PAGE represented that IFN γ protein is being expressed in seeds. Our results indicate that plant seeds have potential for production of recombinant proteins as 'natural bioreactors'.

Keywords: *Napin promoter, IFN γ gene, KDEL sequence, KOZAK sequence, transgenic tobacco.*

* Corresponding Author: Asgharzadeh S.

Tel: 09144230562

Email: asgharzadeh_saber@yahoo.com