مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی گیاهان ترانسپلاستومیک نسل اول (T_1) توتون حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی (*hIFNγ*)

مژگان سلیمانی زاده[1]، مختار جلالی جواران*[2]، مریم نیکخواه[3]، شهلا رزمی[4]

[1] دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

[2] دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

[3] استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

[4] دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 1391/08/25، تاریخ پذیرش: 1392/02/30

چکیده

در دهه‌های اخیر، پیشرفت در بیوتکنولوژی گیاه، بویژه زراعت مولکولی امکان استفاده از گیاهان را به عنوان یک سیستم تولید جدید و راکتور زیستی برای محدوده‌ی وسیعی از پروتئین‌های نوترکیب فراهم کرده است. اینترفرون گامای انسانی یکی از پروتئین‌های ارزشمند دارویی می‌باشد که کاربردهای پزشکی وسیعی در زمینه‌های تشخیصی و درمانی پیدا کرده است. کلونینگ ژن اینترفرون گامای انسانی به همراه ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین - استرپتومایسین با استفاده از ناقل کلروپلاستی pKCZ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته و سپس به روش بیولستیک به کلروپلاست گیاه توتون انتقال یافته است. هدف از انجام این تحقیق بررسی پایداری بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاهان ترانسپلاستومیک نسل اول توتون بود. گیاهان رشد کرده در سطح محیط انتخابگر، در سطوح مختلف (DNA، RNA و پروتئین) به منظور تایید درج و بیان ژن مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی این گیاهان در سطح DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن اینترفرون گاما و تکنیک PCR صورت پذیرفت، نتایج حاصل درج این ژن را در ژنوم کلروپلاستی گیاهان تایید کرد، به علاوه با آزمون RT-PCR رونویسی ژن هدف تایید شد. همچنین به منظور بررسی بیان ژن هدف در سطح پروتئین، آزمون‌های SDS-PAGE، Dot-blot و Western-blot انجام شد و نتایج بدست آمده، بیان این ژن را در سطح پروتئین تایید کرد. در نهایت به منظور تعیین میزان بیان ژن اینترفرون گامای انسانی آزمون ELIZA انجام شد. نتایج نشان داد که بالاترین سطح تجمع اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک بالای 0/2٪ پروتئین محلول کل می‌باشد.

کلمات کلیدی: *توتون، ترانسپلاستومیک، ژن اینترفرون گامای انسانی، زراعت مولکولی، پروتئین‌های نوترکیب.*

* نویسنده مسئول: مختار جلالی جواران تلفن: 09123091917 Email: Jalali.mokhtar@gmail.com

مقدمه

تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان مزایای بالقوه زیادی دارد که عبارتند از: اول، سیستم‌های گیاهی اقتصادی‌تر از سایر سیستم‌های صنعتی می‌باشند .دوم، در حال حاضر تکنولوژی‌هایی جهت برداشت و فراوری گیاهان موجود است و گیاهان به راحتی در مقیاس وسیع و حجم انبوه تولید می‌شوند. سوم، در صورت مصرف خوراکی بافت گیاهی حاوی پروتئین دارویی نوترکیب، احتیاج به تخلیص نمی‌باشد (واکسن‌های خوراکی). چهارم، پروتئین هدف را در گیاهان می‌توان به درون اندامک‌های درون سلولی که در آن جا پروتئین پایدارتر است هدف‌گیری نمود و در نهایت، سلامتی انسان بواسطه آلودگی با عوامل بیماریزای مشترک انسانی یا توکسین‌ها به حداقل می‌رسد (Daniell *et al*., 2001) هم اکنون تقاضای روزافزون برای برخی داروهای زیستی و تشخیصی از یک سو و در عین حال قیمت بالا از سوی دیگر، دسترسی به آن‌ها را محدود کرده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که استفاده از سیستم‌های گیاهی جایگزین مناسبی برای سایر سیستم‌ها باشد (Schillberg *et al*., 1999). پروتئین‌های نوترکیب به اندامک‌های درون سلولی متفاوت، نظیر آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، کلروپلاست و یا واکوئل در سلول‌های گیاهی هدف‌گیری می‌شوند. انتخاب صحیح اندامک جهت بیان پروتئین نوترکیب نقش مهمی در سطوح تولید پروتئین‌های نامتجانس[1] دارد (Karg and Kallio, 2009). یکی از راهکارهای مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته، الحاق ژن یا ژن‌های رمز کننده پروتئین نوترکیب مورد نظر در ژنوم کلروپلاست می‌باشد. در روش تولید پروتئین نوترکیب در کلروپلاست، ژن‌های خارجی به ژنوم کلروپلاستی گیاه ملحق می‌شوند و تا 10000 کپی از ژن خارجی می‌تواند در هر سلول گیاهی وجود داشته باشد و بنابراین امکان تجمع مقادیر زیادی از پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست فراهم می‌شود (Daniell *et al*., 2001). همچنین هیچ گونه خاموشی ژن در این سیستم وجود ندارد، چندین ژن را می‌توان به صورت اپرانی بیان کرد و پروتئین‌های نوترکیب در داخل کلروپلاست می‌توانند تجمع پیدا کنند و در گیاه میزبان ایجاد سمیت نمی‌کنند. عدم حضور DNA کلروپلاستی در دانه گرده در بیشتر محصولات باعث جلوگیری از جریان ژنی و فرار ژن می‌شود (Daniell, 2002). کلروپلاست‌ها می‌توانند پروتئین‌های یوکاریوتی را هم پردازش کنند. پروتئین‌های چاپرونی موجود در کلروپلاست نقش فعالی در سرهم کردن[2] پروتئین‌های خارجی[3] بیان شده در کلروپلاست دارند. بدین ترتیب سرهم کردن صحیح پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست باعث حذف شدن مرحله پردازش درون شیشه‌ای

[1] Heterologous
[2] Assembly
[3] Foreign proteins

پروتئین‌های دارویی می‌شود که بخش بزرگی از هزینه تولید را به مصرف کننده تحمیل می‌کند (Daniell *et al*., 2001). پروتئین اینترفرون گامای نوترکیب یکی از پروتئین‌های داروئی است که ارزش زیادی در پزشکی دارد (Ebrahimi *et al*., 2012). از این پروتئین برای درمان بیماران با نقص مادرزادی کرونیک یا گرانولوماتوز مزمن[1]، لیشمانیا[2] (Assreuy *et al*., 1994)، سالمونلا تیفوموریوم[3] (Nauciel and Espinasse-Maes, 1992) استفاده شده است. همچنین این پروتئین در درمان سرطان‌های مختلف از جمله نوروبلاستوما[4](Seeger *et al*., 2011) و ملانوما[5] (Abdel-Wahab *et al*., 1997) کاربرد دارد. در سال‌های اخیر فروش جهانی اینترفرون‌ها بالغ بر چهار میلیارد دلار برآورد شده است (Ebrahimi *et al*., 2012). اینترفرون گاما در سال 1992 با موفقیت در باکتری *E. coli* بیان شد و بدین ترتیب امکان تولید این پروتئین در مقادیر زیاد فراهم شد (Zhang *et al*., 1992). ژن اینترفرون گامای انسانی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در ناقل کلروپلاستی pKCZ همسانه سازی و به روش بیولستیک به کلروپلاست گیاه توتون انتقال داده شده است (Razmi *et al*., 2012). در این تحقیق هدف بررسی پایداری بیان ژن اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک نسل اول توتون بود. پس از کشت بذور ترانسپلاستومیک نسل اول و دست یابی به این گیاهان، بررسی گیاهان ترانسپلاستومیک در سطح DNA با استفاده ازآزمون PCR، در سطح RNA با آزمون RT-PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های SDS-PAGE، Dot-blot، Western blot و ELISA انجام گرفت.

[1] Chronic granulomatous disease
[2] Leishmania
[3] Salmonella typhimurium
[4] Neuroblastoma
[5] Melanoma

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی موردنیاز

بذور ترانسپلاستومیک نسل اول رقم Xanthi گیاه توتون که حاوی ژن اینترفرون گاما بود، در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تولید گردید (Razmi *et al*., 2012). به منظور دسترسی به این بذور، گیاهان ترانسپلاستومیک توتون پس از حداقل 4 مرحله باززایی و انتخاب بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین، ابتدا به پرلیت و سپس به گلدان حاوی خاک مناسب منتقل شدند.

استخراج DNA ژنومی و انجام PCR

به منظور استخراج DNA ژنومی، از برگ‌های جوان و سبز گیاه ترانسپلاستومیک توتون استفاده شد و برای این منظور از روش CTAB استفاده گردید (Murray and Thompson, 1980). کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از الکتروفروز روی ژل آگارز 1٪ و اسپکتروفتومتر در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر تعیین گردید.

نمونه DNA استخراجی به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای ifng R و ifng F که اختصاصی ژن اینترفرون گاما بودند، جهت تکثیر ژن اینترفرون گاما مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور اطمینان از درج ژن در ژنوم کلروپلاست، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو (طراحی شده از روی ژنوم کلروپلاست) و آغازگر معکوس (طراحی شده از روی ژن هدف) انجام گرفت.

جدول 1- آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر و تایید درج ژن اینترفرون گاما در ژنوم کلروپلاست.

Table 1- Specific primers were designed for amplification and confirmation IFNγ gene insertion into the chloroplast genome.

FP (ifngF)	5'-CATGCCATGGAACATCATCATCATCATCAGGACCCATATG ATAAAG-3'
RP (ifngR)	5'-CATGCCATGGATCCCTCCCTTCATTACTGGGATGCTCTTCGAC-3'
FP (Chl)	5'- GCUTCTAAGTAGTAAGCCCACCCCAAGATG -3'

استخراج RNA ژنومی و انجام تکنیک RT-PCR

استخراجRNA از برگ‌های گیاهان ترانسپلاستومیک و شاهد با استفاده از محلول RNX-plus (شرکت سیناژن) صورت گرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، RNA استخراجی روی ژل آگارز 1٪ برده شد. از آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز (DNAase) برای از بین بردن نسخه‌های DNA ژنومی استفاده شد و ساخت cDNA با استفاده از کیت PureExtreme شرکت فرمنتاز انجام شد. سپس واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن اینترفرون گامای انسانی انجام گرفت.

استخراج پروتئین از گیاهان ترانسپلاستومیک و شاهد (غیر تراریخته) توتون

ابتدا 1ml از بافر استخراج (تریس 0/1 مولار (pH= 8)، سوکروز 0/4 مولار، EDTA 0/01 مولار، SDS 0/1٪، توئین 0/05٪) درون یک میکروتیوب 1/5ml ریخته شد. سپس 0/2 گرم بافت برگی سائیده شده در ازت مایع به آن اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه توسط دستگاه ورتکس مخلوط شده تا یکنواخت گردد. در مرحله بعد سانتریفوژ در 13000rpm، دمای 4 درجه سانتی‌گراد و به مدت 5 دقیقه انجام گرفت. در نهایت رونشین که حاوی پروتئین بود به میکروتیوب جدید انتقال داده شد

بررسی گیاهان ترانسپلاستومیک توتون در سطح پروتئین به روش SDS-PAGE

در این تحقیق از روش Laemmli که متداولترین روش برای الکتروفورز پروتئین‌ها می‌باشد، استفاده شد (Laemmli, 1970). پس از استخراج پروتئین از گیاهان ترانسپلاستومیک و شاهد، غلظت پروتئین محلول کل در فاز رونشین با آزمون برادفورد و با استفاده از پروتئین آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تخمین زده شد. پس از جوشاندن نمونه‌های پروتئینی به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد (درون بافر نمونه‌گذاری (تریس 0/31 مولار (pH= 6/8)، گلیسرول 50٪، SDS 5٪ و برموفنول بلو 0/1٪)، نمونه‌ها درون چاهک‌ها بارگذاری شدند و الکتروفورز نمونه‌ها به مدت 14 ساعت در ولتاژ 80 صورت پذیرفت. بعد از الکتروفورز ژل، ابتدا رنگ‌آمیزی و سپس رنگ‌بری مناسب صورت پذیرفت و عکسبرداری از آن انجام گرفت. در نهایت ژل‌های رنگ‌آمیزی شده در اسید استیک 7٪ در داخل پاکت‌های پلاستیکی در یخچال نگهداری شد.

آزمون بلات نقطه‌ای (Dot blotting)

پس از استخراج پروتئین با روش استاندارد از گیاهان ترانسپلاستومیک و شاهد، مقدار 20 نانوگرم از پروتئین برای آزمون بلات نقطه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین‌های استخراج شده به صورت نقطه‌ای بر روی غشا نیتروسلولزی قرار داده شدند و پس از خشک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، برای بلوکه کردن نواحی غیر اختصاصی، کاغذ در بافر بلاکینگ BSA[1] یک درصد به مدت 1 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ریختن بافر بلاکینگ، کاغذ نیتروسلولزی 3 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه با محلول PBST شستشو داده شد. پس از انجام مرحله بلاکینگ، آنتی‌بادی اولیه (IFN-γ H-145: sc-8308) که با نسبت 1:200 در بافر PBST+BSA٪0/1 رقیق شده بود به کاغذ نیتروسلولزی اضافه شد و به مدت 1 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنتی‌بادی اولیه پس از یک ساعت برداشته شد و کاغذ 3 بار با بافر شست شوی PBST و هر بار 5 دقیقه شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004) به نسبت 1 به 500 با بافر PBST+BSA٪0/1 رقیق شد و به کاغذ نیتروسلولزی اضافه شد و به مدت 1 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (آنتی‌بادی‌ها از شرکت سانتاکروز[2]تهیه شد). آنتی‌بادی ثانویه خارج گردید و مجددا 3 بار شست شو انجام شد و در نهایت با استفاده از سوبسترای DAB[3] یک درصد بیان این پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Bovine serum albumin
[2] Santacruz
[3] Diaminobenzidine tetrahydrochloride

بررسی پروتئین استخراجی از گیاهان ترانسپلاستومیک با روش Western blot

پس از انجام SDS-PAGE ژل از دستگاه الکتروفورز خارج شد (بایستی دقت شود که برای انجام وسترن بلاتینگ رنگ بافر نمونه حتما باید از ژل خارج شود، در غیر این صورت رنگ موجود در ژل به غشا نیتروسلولزی منتقل شده و غشا غیر قابل استفاده خواهد شد). سپس غشاء نیتروسلولزی، کاغذ صافی و کاغذ واتمن ضخیم برای 45-30 دقیقه در بافر انتقال (3/03 گرم تریس (pH= 8/3)، 14/4 گرم گلیسین، 0/2 گرم SDS و متانول 20٪ برای تهیه 1000ml بافر انتقال) قرار داده شد. پس از تهیه ساندویچ انتقال، مجموعه ساندویچ انتقال در دستگاه Semi-Dry Transfer قرار داده شد. پس از اتصال مخزن به منبع تغذیه با ولتاژ 12 و به مدت 30 دقیقه عمل انتقال صورت گرفت. در مرحله بعد غشا نیتروسلولزی در بافر پوشاننده شیر خشک بدون چربی 5٪ (5 گرم شیر خشک در 100 میلی‌لیتر بافر(PBS-T) به مدت 5 ساعت قرار گرفت. بعد از مرحله بلاکینگ، بقیه‌ی مراحل مشابه با آزمون بلات نقطه‌ای انجام شد.

الیزا (ELISA)

پس از استخراج پروتئین و تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، مقدار 10µg از هر نمونه، با بافر پوشش‌دهنده[1] (1/59 گرم Na_2Co_3، 2/93 گرم $NaHCo_3$) مخلوط گردید و سپس داخل هر چاهک پوشش داده شد. نمونه‌های پوشش داده شده به مدت یک شب درون یخچال 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از شستشوی چاهک‌های مربوطه (3 بار و هر بار 5 دقیقه با بافر شستشوی PBST)، بلوکه کردن چاهک‌ها با BSA 1٪ انجام شد و سپس به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت پس از افزودن آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه، TMB[2] سوبسترای مخصوص HRP به هر چاهک افزوده شد و بعد از گذشت زمان 20-15 دقیقه، واکنش آنزیمی با استفاده از HCl (2N) متوقف شد و در نهایت پلیت با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج 450 نانومتر خوانده شد.

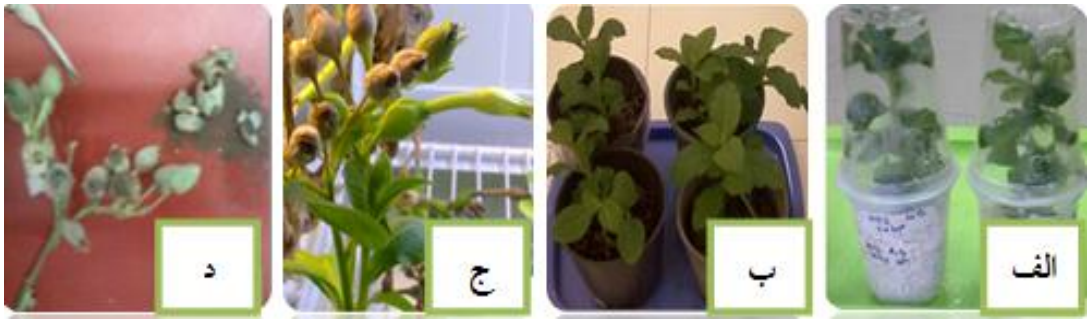
نتایج

بذرگیری از گیاهان ترانسپلاستومیک T_0

پس از انجام حداقل 4 مرحله باززایی از گیاهان ترانسپلاستومیک T_0 توتون، گیاهان باززایی شده نهایی ابتدا به پرلیت و سپس به خاک منتقل شدند. پس از حدود 3 الی 4 ماه گیاهان به بذر رفتند و در مرحله رسیدگی کامل، بذور به رنگ قهوه‌ای تیره در آمدند (شکل 1).

[1] Coating buffer

[2] 3, 3′, 5, 5′-Tetramethylbenzidine



شکل 1- گیاهان ترانسپلاستومیک T_0 توتون: الف) گیاهان ترانسپلاستومیک منتقل شده به پرلیت ب) گیاهان ترانسپلاستومیک منتقل شده به خاک ج) گیاهان ترانسپلاستومیک به بذر رفته د) بذور ترانسپلاستومیک توتون.

Figure 1- T_1 tobacco transplastomic plants: A) Transplastomic plants were transferred to perlite, B) Transplastomic plants were transferred to soil, C) Transplastomic plants gone to seed, D) Tobacco transplastomic seeds.

تولید گیاهان ترانسپلاستومیک نسل اول (T_1)

بذور جمع‌آوری شده از گیاهان ترانسپلاستومیک T_0 جهت تهیه گیاهان نسل اول (T_1) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ضدعفونی، بذور ترانسپلاستومیک ابتدا در محیط MS، کشت گردیدند. در نهایت گیاهان حاصل به گلدان‌های حاوی خاک استریل منتقل شدند و پس از رشد کامل گیاهان، آزمون‌های لازم در سطح DNA، RNA و پروتئین بر روی آن‌ها انجام شد (شکل2).

شکل2- مراحل رشد گیاهان ترانسپلاستومیک توتون: الف) بذور جوانه زده در محیط MS پس از 14 روز ب) بذورجوانه زده در محیط MS پس از 20 روز ج) گیاهان نسل اول منتقل شده به گلدان حاوی خاک.

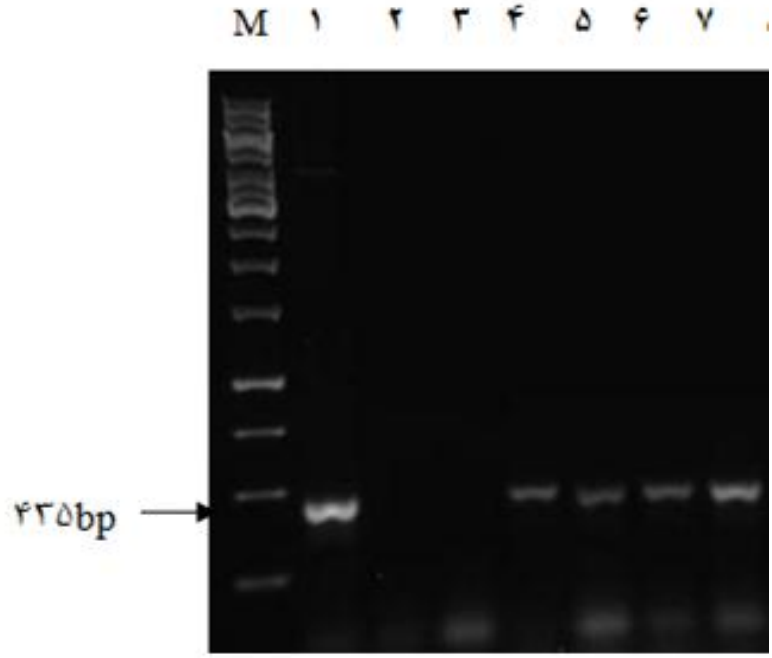
Figure 2- Growth stages of transplastomic plants: A) Germinated seeds on MS medium after 14 days, B) Germinated seeds on MS medium after 20 days, C) T_1 plants transferred to pot containing soil.

تایید حضور ژن اینترفرون گامای انسانی در گیاهان ترانسپلاستومیک نسل اول (T_1) توتون

نتایج آنالیز PCR، حضور باند 435 bp مربوط به ژن اینترفرون گامای انسانی را در گیاهان ترانسپلاستومیک توتون تایید کرد (شکل3). همچنین تکثیر قطعه 2Kb در گیاهان ترانسپلاستومیک، درج ژن هدف را در ژنوم کلروپلاست اثبات کرد (شکل4).

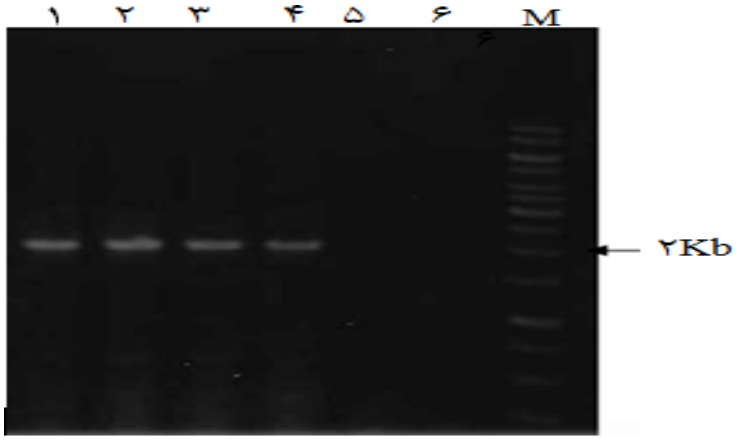
تایید نسخه‌برداری از ژن اینترفرون گاما با بهره‌گیری از تکنیک RT-PCR

نتایج آزمون RT-PCR نشان داد که در محدوده 435bp در گیاهان ترانسپلاستومیک باندی مشاهده می‌شود که در گیاه غیرتراریخته وجود ندارد و این بیانگر رونویسی موفق از ژن اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک می‌باشد. همچنین RNA تیمار شده با DNase هیچ گونه آلودگی نشان نداد (شکل5).



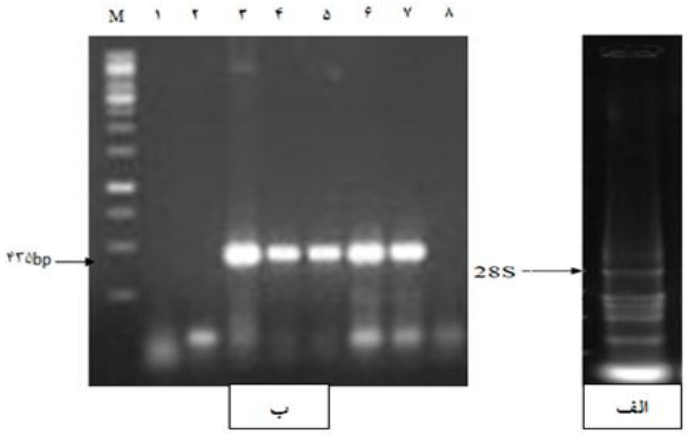
شکل 3- تایید حضور قطعه‌ی 435bp ژن اینترفرون گامای انسانی در ژنوم کلروپلاستی گیاه توتون: چاهک M- نشانگر مولکولی 1Kb، چاهک 1 کنترل مثبت (پلاسمید pKCZ حاوی ژن اینترفرون گاما)، چاهک 2- کنترل منفی (بدون DNA الگو)، چاهک 3- گیاه شاهد (غیر تراریخته)، چاهک 4 الی 7 گیاهان ترانسپلاستومیک.

Figure 3- Confirmation the presence of 435 bp fragment of hIFNγ gene in the tobacco chloroplast genome, Lane M- 1Kb molecular marker, Lane 1- Positive control (pKCZ plasmid containing IFNγ gene), Lane 2- Negative control (without template DNA), Lane 3- Wild-type plant (non transformed), Lanes 4-7: Transplastomic plants.



شکل 4- تایید حضور قطعه ی 2Kb در ژنوم کلروپلاستی گیاهان ترانسپلاستومیک توتون حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی: چاهک M- نشانگر مولکولی1Kb، چاهک‌های 1 الی 4 گیاهان ترانسپلاستومیک، چاهک 5- کنترل منفی (بدونDNA الگو)، چاهک 6- گیاه شاهد (غیر تراریخته).

Figure 4- Confirmation the presence of 2Kb fragment in the chloroplast genome of tabacco transplastomic plants containing hIFNγ gene: Lane M- 1Kb molecular marker, Lanes 1-4: Transplastomic plants, Lane 5- Negative control (without template DNA), Lane 6- Wild-type plant (non transformed).



شکل5- آنالیز گیاهان ترانسپلاستومیک در سطح RNA: الف) RNA استخراجی از گیاهان ترانسپلاستومیک ب) تایید رونویسی ژن اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک توتون: چاهکM- نشانگر مولکولی 1Kb، چاهک 1- کنترل منفی (بدون DNA الگو)، چاهک 2- RNA تیمار شده با DNase (کنترل منفی)، چاهک 3- کنترل مثبت (پلاسمید pKCZ حاوی ژن اینترفرون گاما)، چاهک 4 الی 7 گیاهان ترانسپلاستومیک حاوی ژن اینترفرون گاما، چاهک 8- گیاه شاهد (غیرتراریخته).

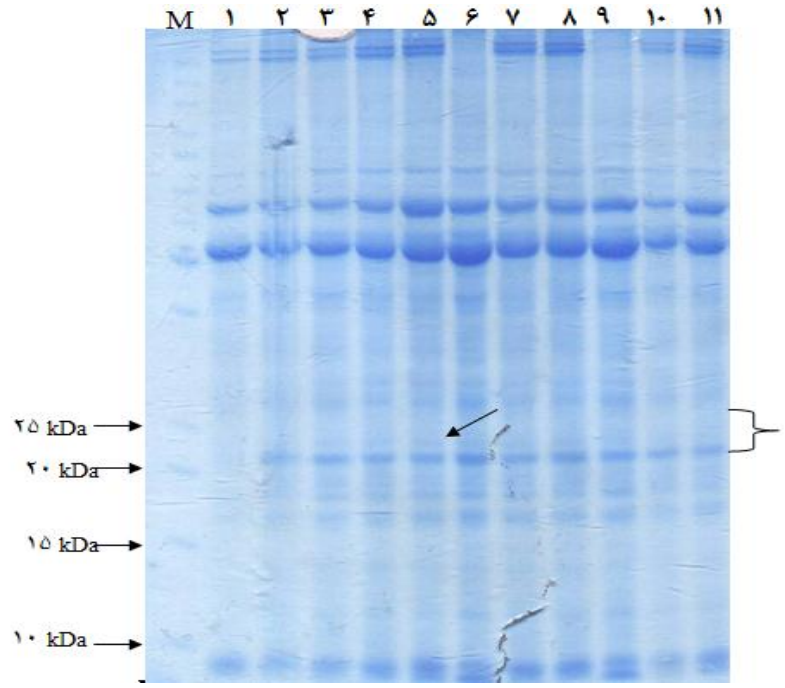
Figure 5- Analysis of transplastomic plants at RNA level: A) Extracted RNA of transplastomic plants, B) Confirmation of IFNγ gene transcription in tobacco plants, Lane M 1Kb molecular marker, Lane 1- Negative control (without template DNA), Lane2- Treated RNA with DNase (negative control), Lane 3- Positive control (pKCZ plasmid containing IFNγ gene), Lane 4-7: Transplastomic plants containing IFNγ gene, Lane 8- Wild-type plant (non transformed).

بررسی بیان ژن اینترفرون گاما در سطح پروتئین به روش SDS-PAGE

نتایج حاصل نشان داد در محدوده‌ی 25-20 کیلو دالتون، باندی کم رنگ مشاهده می‌شود که در گیاه شاهد مشاهده نمی‌گردد (شکل6). از آن جایی کا با قاطعیت کامل نمی‌توان گفت این باند مربوط به پروتئین اینترفرون گاما می‌باشد، لذا آزمون‌های Dot-blot و Western-blot به منظور بررسی بیشتر بیان این پروتئین انجام شدند.

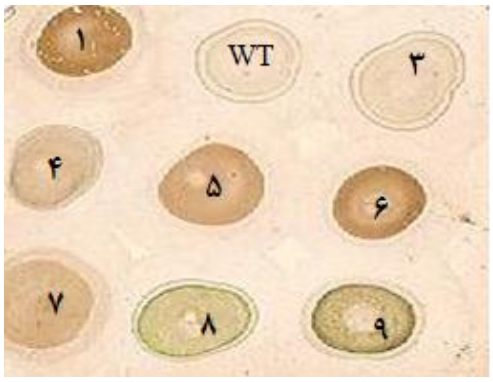
بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما استخراجی از گیاهان ترانسپلاستومیک با روش Dot-blot

پس از انجام مراحل آزمایش، در مرحله آخر با اضافه کردن سوبسترا و مشاهده تغییر رنگ، بیان پروتئین اینترفرون گامای انسانی در گیاهان ترانسپلاستومیک تایید شد. در حالی که هیچ تغییر رنگی در گیاه غیر تراریخته مشاهده نشد (شکل7).



شکل 6- نتیجه‌ی SDS-PAGE پروتئین‌های استخراجی از گیاهان ترانسپلاستومیک و شاهد (غیرتراریخته): چاهک M- نشانگر پروتئینی (PageRuler™Unstained Protein Ladder, Fermentas,#SM0431)، چاهک 1 الی 9 گیاهان ترانسپلاستومیک، چاهک 10 و 11 گیاهان شاهد (غیرتراریخته).

Figure 6- SDS-PAGE result of extracted proteins of transplastomic and Wild-type plants (non transformed): Lane M- Protein marker (PageRuler™Unstained Protein Ladder, Fermentas,#SM0431), Lanes 1-9: Transplastomic plants, Lanes 10 and 11: Wild-type (non transformed) plants.



شکل7- نتیجه آزمون بلات نقطه‌ای در گیاهان ترانسپلاستومیک توتون در مقایسه با گیاه شاهد (غیر تراریخته): نمونه شماره 1- کنترل مثبت (نمونه پروتئینی IFNγ استاندارد)، WT- گیاه شاهد (غیر تراریخته)، شماره 3 الی 9 گیاهان ترانسپلاستومیک حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی.

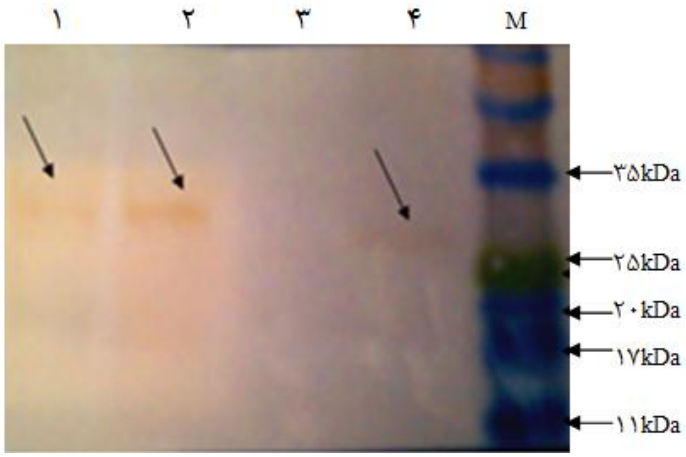
Figure 7- Dot blot result in transplastomic plants compared with the Wild-type plant (non transformed): Sample 1- Positive control (standard IFNγ protein sample), WT- Wild-type plant (non transformed), Sample 3-9: Transplastomic plants containing hIFNγ gene.

بررسی بیان ژن اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک توتون با استفاده از تکنیک Western-blot

نتایج آزمون وسترن بلات نیز به خوبی نشان داد که در برخی از گیاهان ترانسپلاستومیک، در محدوده‌ی بین 25 تا 35 کیلودالتون باندی مشاهده می‌شود که در گیاه شاهد (غیر تراریخته) وجود ندارد (شکل8). با توجه به چاهک شماره 4 که مربوط به اینترفرون گامای استاندارد می‌باشد و همچنین حضور باند مشابه در نمونه‌های ترانسپلاستومیک گیاهی و عدم حضور چنین باندی در نمونه گیاهی غیر تراریخته، می‌توان نتیجه گرفت که ژن اینترفرون گامای انسانی به خوبی در سطح پروتئین بیان می‌شود.

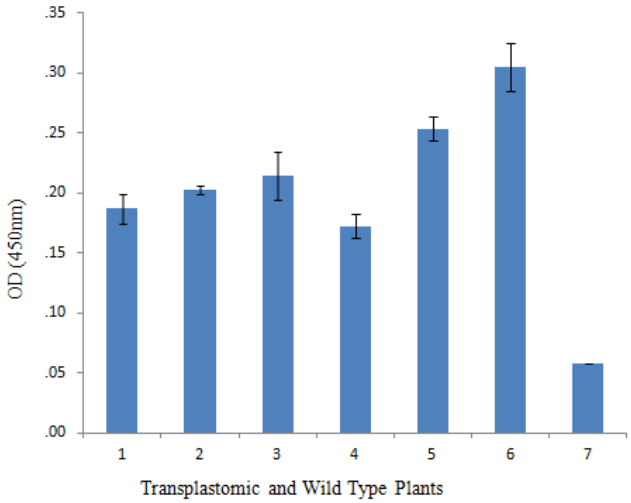
بررسی میزان بیان پروتئین اینترفرون گامای انسانی در گیاهان ترانسپلاستومیک به روش ELISA

نتایج آزمون الیزا نشان داد که تفاوت معنی داری بین پروتئین‌های استخراجی از گیاهان ترانسپلاستومیک نسبت به گیاه شاهد وجود دارد. همانطور که در شکل 9 مشاهده می‌شود گیاه ترانسپلاستومیک شماره 9 بیشترین تفاوت میزان جذب را نسبت به گیاه شاهد نشان داد. این گیاه با بیشترین میزان جذب حاوی 1/2 میکروگرم پروتئین نوترکیب اینترفرون گاما در گرم بافت برگی می‌باشد (شکل 9).



شکل 8- آزمون وسترن بلاتینگ برای تایید بیان پروتئین اینترفرون گامای انسانی : الف) چاهک‌های 1 و 2 گیاهان ترانسپلاستومیک حاوی پروتئین اینترفرون گامای انسانی، چاهک 3- گیاه شاهد (غیر تراریخته)، چاهک 4- کنترل مثبت (نمونه پروتئینی IFNγ استاندارد)، چاهک M، نشانگر پروتئینی (Prestained Protein Ladder, PR901614).

Figure 8- Western blot for confirmation the expression of the hIFNγ protein expression, A) Lanes 1-9: Transplastomic plants containing hIFNγ protein, Lane 3 Wild-type (non transformed) plants protein, Lane 4 Positive control (standard IFNγ protein sample), Lane M Protein marker (Prestained Protein Ladder, PR901614).



شکل9- نمودار آزمون الیزا برای پروتئین‌های استخراجی گیاهان ترانسپلاستومیک در مقایسه با گیاه شاهد (غیر تراریخته): ستون‌های 1 الی 6 گیاهان ترانسپلاستومیک، ستون 7 گیاه شاهد (غیر تراریخته).

Figure 9- ELISA chart for extracted Proteins of the transgenic plants compared with Wild-type plants: Columns 1-6: Transplastomic plants, column 7 Wild-type (non transformed) plant.

بحث

امروزه با رشد روز افزون تقاضا برای پروتئین‌های دارویی مواجه می‌باشیم، اما ظرفیت کافی برای پاسخ به این تقاضا بویژه در کشورهای فقیر و در حال توسعه وجود ندارد. به گونه‌ای که برخی از داروهای مهم یا در این کشورها اصلا وجود ندارد و یا با هزینه‌های زیاد وارد می‌شود که فقط اقشار ثروتمند قادر به تهیه و استفاده از آن‌ها می‌باشند (Jalali javaran *et al*., 2010). تراریختی ژنوم کلروپلاستی به دلیل دارا بودن مزایای زیاد نسبت به تراریختی هسته‌ای، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، امروزه بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (Daniell *et al*., 2001). پروتئین اینترفرون گاما یکی از پروتئین‌های با ارزش در علم پزشکی می‌باشد که کاربردهای زیادی جهت مصارف تشخیصی و درمانی دارد. به همین دلیل، تلاش‌های زیادی در جهت تولید انبوه آن‌ها صورت گرفته است (Ebrahimi *et al*., 2012). بیان موفق اینترفرون گاما برای اولین بار در سال 1992 در باکتری *E. coli* انجام گرفت و پس از آن امکان تولید این پروتئین در مقادیر زیاد فراهم شد (Zhang *et al*., 1992). به دلیل ارزش درمانی بالای اینترفرون گاما، تلاش‌های زیادی در جهت تولید انبوه آن صورت گرفته اما در اغلب موارد پروتئین تولید شده ساختار فضایی مناسب نداشته است (Baron and Narula, 1990). بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از جمله اینترفرون‌ها یک روش جایگزین مناسب باشد (Bagheri *et al*., 2010). اینترفرون گاما همچنین در پروتوپلاست گیاهان توتون با موفقیت بیان گردید (Mori *et al*., 1993). در سال 2003، Leelavathi و همکارانش موفق به بیان اینترفرون گاما در هسته و کلروپلاست گیاه توتون شدند. آن‌ها توانستند پایداری بیان این ژن را در گیاه توتون با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک مانند تولید فیوژن پروتئین‌ها و یا اضافه کردن هیستیدین افزایش دهند. نتایج این تحقیق نشان داد بالاترین سطح تجمع اینترفرون گاما در گیاهان تراریخته هسته‌ای حدود 0/001٪ می‌باشد در صورتی که در گیاهان تراریخته کلروپلاستی سطح تجمع این پروتئین 0/1٪ بود. همچنین وقتی که فیوژن GUS به انتهای N اینترفرون گاما متصل شد، سطح بیان از 0/1 به 6٪ افزایش یافت (Leelavathi and Reddy, 2003). علاوه بر این در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، بیان اینترفرون گامای انسانی در اجسام روغنی گیاه کلزا (Bagheri *et al*., 2010) و در اندامک کلروپلاست توتون (Razmi *et al*., 2012) با موفقیت صورت پذیرفت. در سال 2012 نیز ژن اینترفرون گامای انسانی در هسته گیاه گوجه فرنگی بیان شد (Ebrahimi *et al*., 2012). در این تحقیق پس از تکثیر ژن اینترفرون گامای انسانی با آزمون PCR و تایید رونویسی این ژن، بررسی بیان این ژن در سطح پروتئین با استفاده از

آزمون‌های SDS-PAGE، Dot-blot، Western-blot و ELISA انجام پذیرفت. واکنش پروتئین استخراج شده از برگ گیاهان ترانسپلاستومیک نسبت به آنتی‌بادی اینترفرون گاما با استفاده از روش ELISA مورد آزمون قرار گرفت. نتایج آزمون الیزا نشان داد که میزان بیان پروتئین اینترفرون گاما بیشتر از 1 میکروگرم پروتئین اینترفرون گامای انسانی در گرم بافت برگی می‌باشد. به عبارت دیگر بالاترین سطح تجمع اینترفرون گاما در گیاهان ترانسپلاستومیک حدود 0/2٪ پروتئین محلول کل می‌باشد. در آزمون بلات نقطه‌ای، تغییر رنگ نمونه‌های شماره 6 و 5 نسبت به سایر نمونه‌ها مشهودتر بود. این نمونه‌ها همان نمونه‌های 6 و 5 در آزمون الیزا می‌باشند که بیشترین مقدار جذب و بیشترین مقدار پروتئین را دارا بودند. لذا نتایج این آزمون در تایید آزمون الیزا بود.

به منظور انجام آزمون وسترن بلات نمونه‌هایی گیاهی که در آزمون بلات نقطه‌ای و الیزا در تایید یکدیگر بودند انتخاب شدند. نتایج وسترن بلات گیاهان ترانسپلاستومیک نشان داد در محدوده‌ی بین باندهای 25 و 35 کیلودالتون باندی مشاهده می‌گردد که در گیاه شاهد (غیرتراریخته) وجود ندارد. این باند تقریبا در ردیف باند مربوط به اینترفرون گامای استاندارد بود. در سازه کلروپلاستی مورد نظر قبل از ژن اینترفرون گاما چندین اسید آمینه اضافه شده است. به همین دلیل باند مربوط به پروتئین اینترفرون گاما اندکی بالاتر از باند مربوط به اینترفرون گامای استاندارد می‌باشد. وزن مولکولی پروتئین اینترفرون گاما بین 15-50kDa گزارش شده است و علت آن منومر یا دایمر بودن، گلیکوزیلاسیون به صورت کامل یا ناقص، حذف شدن چند اسیدآمینه از انتهای C مولکول و اینکه پروتئین در چه سیستمی تولید شده است، می‌باشد (Bagheri *et al*., 2009). نتایج کلی این تحقیق نشان داد که این پروتئین در کلروپلاست گیاه توتون به طور موفق آمیز در هر سه سطح DNA، RNA و پروتئین بیان می‌شود. در مقایسه با تحقیقات انجام شده در زمینه پروتئین اینترفرون گاما که در متن به برخی از آن ها اشاره شده است، برای اثبات بیان این پروتئین در این تحقیق از آزمون‌های بیشتری استفاده شده است. همچنین درصد بیان این پروتئین در مقایسه با انواع هسته‌ای و حتی برخی تحقیقات کلروپلاستی بالاتر بود.

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. Cancer 80: 401-412.

Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew F Y, Moncada S (1994). Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. European Journal of Immunology 24: 672-676.

Bagheri K, 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.

Bagheri KH (2009). Gamma-Oleosin interferon gene transfer to Canola and study of transgenic plants. Ph.D. Thesis. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran.

Baron E, Narula S (1990). From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. Critical Reviews in Biotechnology 10: 179-90.

Daniell H (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nature Biotechnology 20: 581-586.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science 6: 219-226.

Ebrahimi N, Memari H R, Ebrahimi MA, Ardakani MR (2012). Cloning, Transformation and Expression of Human Gamma Interferon Gene in Tomato (*Lycopersicon Esculentum Mill)*. Biotechnology & Biotechnological Equipment 26: 2925-2929.

Jalali Javaran M, Mohebodini M, Masoumi Asl A, Saifi Nabi Abad H, Alizadeh H, Mahbodi F, Ismail A, Rajabi Memari H, Moini A, Honari H, Bagheri Kh, Yaghobi M.M, Zebarjadi A.R, Rasai M.J, Shakib A.M, Rahbarizadeh F, Masoumi H, Forozandeh Moghadam M, Sharifi-Sirchi G.R, Dymyad S, Sadat Noori S.A, Vishlaghi N, Hosseini Pour A, Taheri Javan N, Razmi Sh, Rahimi Far P, Latif B, Abdolinasab M, Azhdari H, Poorkhaleghi M, Razmi A, Khosravi H, Kazemi H (2010). The success of molecular farming in Iran. Journal of Agricultural Biotechnology 1: 19-47 (In Farsi).

Karg S R, Kallio PT (2009). The production of biopharmaceuticals in plant systems. Biotechnology advances 27: 879-894.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Leelavathi S, Reddy VS (2003). Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Molecular Breeding 11: 49-58.

Mori M, Zhang G H, Kaido M, Okuno T, Furusawa I (1993). Efficient production of human gamma interferon in tobacco protoplasts by genetically engineered brome mosaic virus RNAs. The Journal of general virology 74: 1255.

Murray M, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4326.

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.

Razmi Sh, Jalali javaran M, Bagheri A, Honari H, Mohebodini M, Soleimanizadeh M (2012). Feasibility study of the human interferon gamma gene expression in the tobacco chloroplast. 12th Iranian genetic Congress. May 22-24 2012. Tehran, Iran (In Farsi).

Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R (1999). Apoplastic and cytosolic expression of full size antibodies and antibody fragments in Nicotiana tabacum. Transgenic Research 8: 255-263.

Seeger RC, Rosenblatt JD, Duerst RE, Reynolds CP, Villablanca JG, Hasenauer B, Feig SA (2011). A Phase I study of human gamma interferon gene-transduced tumor cells in patients with neuroblastoma. Human Gene Therapy 9: 379

Zhang Z, Tong KT, Belew M, Pettersson T, Janson JC (1992). Production, purification and characterization of recombinant human interferon gamma. Journal of Chromatography A 604: 143-155.

Study of T_1 Tobacco Transplastomic Plants Containing Human Gamma Interferon Gene (*hIFNγ*)

Soleimanizadeh M.[1], jalali javaran M.[*2], Nikkhah M.[3], Razmi Sh.[4]

[1] Student of Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Associate Professor of Plant Breeding Department, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Assistant Professor of Nano Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4] Student of Plant Breeding Department, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

In the recent decades the progress in plant biotechnology, especially in the field of molecular farming, has made it possible to produce a wide range of recombinant protein using plants as a novel production system and bioreactor. human gamma interferon is one of the valuable pharmaceutical proteins which has found wide medical applications in diagnosis and *therapeutic*. Cloning of human gamma interferon gene associated with spectinomycin-streptomycin antibiotic resistance gene using chloroplast pKCZ vector has been performed at agricultural biotechnology laboratory of Tarbiat Modares University and has been transferred into the tabacco chloroplast genome with biolistic method. The purpose of this study is to determine gamma interferon gene expression stability in T_1 tobacco transplastomic plants. plants, which are grown on selective media, were analysed at different levels of (DNA, RNA and protein) to confirm integration and expression of the gene into the tobacco chloroplast. Analysis of plants was performed at DNA level by using of PCR and specific primers for human gamma interferon gene, results confirmed integration of this gene into the chloroplast genome. In addition, transcription of target gene was confirmed by RT-PCR. In order to study expression of target gene at protein level SDS-PAGE, Dot blotting and Western-blot were also done and the obtained results show target gene expression at protein level. Finally, ELISA test was done to determine quantity of gamma interferon gene expression. Results indicated that the highest gamma interferon level in transplastomic plant is up to 0.2% of total soluble protein.

Keywords: *Tobacco, Transplastomic, Human Gamma Interferon Gene, Molecular Farming, Recombinant Proteins.*

[*] Corresponding Author: Jalali Javaran M. Tel: 09123091917 Email: Jalali.mokhtar@gmail.com