

Specific expression of exendin-4 gene fused to cholera B toxin subunit (CTB) in carrot root (*Daucus carota* L.) under regulation of *MLL* promoter

Neda Zandinava

Master of Plant Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email address: Nedazandinava@gmail.com

Bahman Bahramnejad 

*Corresponding author. Associate professor in Plant Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email address: b.bahramnejad@uok.ac.ir

Hemn Salehi 

Ph.D. Student of Plant Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email address: hemn.salehi@uok.ac.ir

Abstract

Objective

Exendin-4 (Ex4) is a 39-amino acid peptide isolated from the salivary secretions of the lizard *Heloderma susseptum* and it has similar biological function as glucan-like peptide (GLP-1) receptor. The most important physiological role of GLP-1 is to regulate the amount of glucose metabolism by reducing the entry of glucose into the cells. The binding of Ex4 to cholera toxin B subunit (CTB) increases its efficacy by binding to the receptor of intestinal epithelial cells. Transgenic plants can be used as factories for the production of recombinant proteins. In order to maximize the efficiency of transgenic plants, the expression of foreign genes can be regulated in terms of time and place under the regulation of different promoters. Considering the nutritional value of carrot tuber and its fresh consumption, in this study, *CTBEx4* gene was expressed in carrot plant using a root-specific promoter. In this study, in order to specifically express the *CTBEx4* gene in carrot root, the Major Latex-Like promoter (*MLL*) related to the specific expression in sugar beet storage root tissue was replaced by the *CaMV35S* promoter in the pBI121 construct and were used for the transformation of carrot explants.

Materials and methods

Using the CTAB method, DNA was extracted from the leaves of the sugar beet plant, then the PCR reaction was performed using specific *MLL* primers. The obtained fragment was replaced by the *CaMV35S* promoter in the pBI121 construct using restriction enzymes. Both pBI121-*MLL*-*CTBEx4* and pBI121-*CamV35S*-*CTBEx4* constructs were used to transform carrot leaf explants using *Agrobacterium tumefaciens* bacteria. Transgenic explants were indirectly regenerated into plants in MS culture media in vitro and then transferred to pot. Finally, the *CTBEx4* gene expression of the transgenic plants was analyzed at mRNA and protein levels using RT-PCR and ELISA.

Results

The results of the expression analysis using RT-PCR and ELISA methods indicated that the expression of *CTBEx4* gene in carrot root tissue was regulated by *MLL* promoter, while no expression was observed in leaf tissue. Also, the results showed that the *CTBEx4* gene was expressed under *CaMV35S* promoter regulation in both root and leaf tissues, but its expression in roots was lower (30%) than that under *MLL* promoter regulation. The obtained results indicated the ability of the *MLL* promoter to specific expression the *CTBEx4* gene in the roots of carrot plants.

Conclusions

The *MLL* promoter was able to express the *CTBEx4* gene in the root tissue of carrot plants at the mRNA and protein level, Also, *CTBEx4* protein under *MLL* promoter had higher expression level compared to *CaMV35S* promoter.

Keywords: Exendin-4, Constant expression, *MLL* promoter, CTB

Paper Type: Research Paper.

Citation: Zandinava N, Bahramnejad B, Salehi H (2024) Specific expression of exendin-4 gene fused to cholera B toxin subunit (CTB) in carrot root (*Daucus carota* L.) under regulation of *MLL* promoter. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 87-114.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 87-114.

DOI: 10.22103/jab.2023.21290.1473

Received: October 05, 2023.

Received in revised form: December 20, 2023.

Accepted: December 21, 2023.

Published online: February 20, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

بیان اختصاصی ژن اکسندین-۴ متصل به زیر واحد B سم وبا (CTB) در ریشه هویج

MLL (Daucus carota L.) تحت تنظیم راه انداز

ندا زندی نوا

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

رایانامه: Nedazandinava@gmail.com

بهمن بهرام نژاد

* نویسنده مسئول، دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

b.bahramnejad@uok.ac.ir

همین صالحی

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

hemn.salehi@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰

چکیده

هدف: اکسندین-۴ (Ex4) یک پپتید ۳۹ اسید آمینه‌ای است که از ترشحات بزاق مارمولک هلودرما سوپیتوم جدا شده و دارای عملکرد زیستی مشابه با گیرنده شبه‌گلوکان (GLP-1) می‌باشد. مهمترین نقش فیزیولوژیکی GLP-1 تنظیم متابولیسم گلوکز از طریق کاهش ورود گلوکز به سلول‌ها است. اتصال Ex4 به زیر واحد B سم وبا (CTB) باعث افزایش کارایی آن از طریق اتصال به پذیرنده سلول‌های اپیتلیال روده می‌شود. گیاهان تراریخت می‌توانند به‌عنوان کارخانه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار روند، برای به حداکثر رساندن کارایی گیاهان تراریخت می‌توان بیان ژن‌های خارجی را از نظر زمانی و مکانی تحت تنظیم راه‌اندازهای مختلف تنظیم نمود. به‌منظور بیان اختصاصی ژن *CTBEx4* در بافت ریشه هویج، راه‌انداز *Major Latex-Like (MLL)* مربوط به بیان اختصاصی در ریشه غده‌ای چغندر قند جایگزین راه‌انداز *CaMV35S* در سازه pBI121 شد و برای تراریختی ریزنمونه‌های گیاه هویج به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش CTAB از برگ‌های گیاه چغندر قند DNA ژنومی استخراج شد سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی راه‌انداز *MLL* واکنش PCR انجام گرفت. قطعه به‌دست آمده با استفاده از آنزیم‌های برشی جایگزین راه‌انداز *CaMV35S* در سازه pBI121 شد. از دو سازه *pBI121-Mll-CTBEx4* و *pBI121-CamV35S-CTBEx4* با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* برای تراریخت کردن ریزنمونه‌های هویج استفاده شد. ریزنمونه‌های تراریخت شده در محیط کشت MS درون شیشه از طریق باززایی غیرمستقیم به گیاه کامل باززا شدند و سپس به محیط گلدان انتقال یافتند. در نهایت بیان ژن *CTBEx4* در گیاهان تراریخت شده در سطح mRNA و پروتئین با استفاده از آزمون‌های RT-PCR و ELISA اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج بررسی بیان ژن با روش‌های RT-PCR و ELISA حاکی از بیان ژن *CTBEx4* در بافت ریشه هویج تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* بود در حالیکه هیچ بیانی در بافت برگ مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که ژن *CTBEx4* تحت تنظیم راه‌انداز *CaMV35S* در هر دو بافت ریشه و برگ بیان شد اما بیان آن در ریشه نسبت به بیان تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* کمتر بود (۳۰٪). نتایج به‌دست آمده حاکی از توانایی راه‌انداز *MLL* برای بیان اختصاصی ژن *CTBEx4* در ریشه گیاه هویج بود. **نتیجه‌گیری:** راه‌انداز *MLL* قادر به بیان ژن *CTBEx4* در ریشه گیاه هویج در سطح mRNA و پروتئین بود، همچنین پروتئین *CTBEx4* تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* در مقایسه با راه‌انداز *CaMV35S* دارای مقدار بیان بیشتری بود.

کلیدواژه‌ها: اکسندین-۴، بیان دائم، راه‌انداز *MLL*، CTB.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: زندی نوا ندا، بهرام نژاد بهمن، صالحی هیمن (۱۴۰۲) بیان اختصاصی ژن اکسندین-۴ متصل به زیرواحد B سم وبا (CTB) در ریشه هویج (*Daucus carota* L.) تحت تنظیم راه‌انداز *MLL*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۱)، ۸۷-۱۱۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

اکسندین-۴ یا Ex4 دارای عملکرد زیستی مشابه با پپتید شبه‌گلوکان GLP است که ترشح انسولین را تقویت می‌کند، Ex4 به دلیل شباهت با GLP به گیرنده‌های آن متصل می‌شود و باعث القا ترشح از سولین می‌گردد با این تفاوت که دارای طول عمر بیشتری نسبت به GLP است و همچنین نسبت به آنزیم دی پپتیدیل پپتیداز-۴ مقاوم است، بنابراین در حال حاضر به‌طور گسترده

در درمان بالینی دیابت نوع ۱۲ استفاده می شود (Escalada 2014). اتصال Ex4 به زیر واحد بتا سم وبا (CTB) باعث افزایش کارایی تحویل آن از طریق سیستم گوارشی در سلول‌های اپیتلیال روده می‌شود.

زیر واحد B سم وبا (CTB) یک هومو پنتامر غیر سمی است و به گانگلیوزید GM1 روی سلول‌های سیستم گوارشی پستانداران با میل ترکیبی بالا متصل می‌شود. به دلیل ویژگی غیر سمی و میل بالای اتصال به سیستم گوارشی از CTB بعنوان یک انتقال دهنده عصبی استفاده می‌شود (Androutsellis Theotokis et al. 2010). CTB هیچ اثر سمی روی سلول‌های بافتی ندارد و در مطالعات قبلی گزارش شده است که ایمنی‌زایی قوی ایجاد می‌کند (Song et al. 2023). اتصال Ex4 به CTB می‌تواند باعث افزایش کارایی جذب آن و در نتیجه افزایش ترشح انسولین شود. به دلیل اتصال قوی CTB به گیرنده GM1 روده، تحویل پروتئین‌های متصل شده به آن از طریق بافت لنفاوی روده تسهیل می‌شود.

گزارش‌های مختلفی از انتقال و بیان موفقیت آمیز ژن *CTBEx4* به گیاهان وجود دارد. انتقال ژن *CTBEx4* به کلروپلاست گیاه تنباکو با استفاده از بمباران ناقل کلروپلاستی به برگ‌های گیاه تنباکو منجر به تولید موفقیت آمیز پروتئین *CTBEx4* در برگ‌های این گیاه شد (Nityanandam 2011). همچنین Kwon et al (2013) توانستند با استفاده از روش تفنگ ژنی، ژن *CTBEx4* را به کلروپلاست گیاه تنباکو منتقل نمایند. در پژوهشی Kokei & Bahramnejad (2020) توانستند با روش آگرواینفیلتراسیون ژن *CTBEx4* را در برگ‌های گیاه تنباکو به‌طور موقت بیان کنند.

بیان پروتئین نوترکیب با اثرات دارویی در یک گیاه می‌تواند گیاه میزبان را به یک واکنش خوراکی تبدیل کند. از مزایای استفاده از گیاهان برای بیان ژن‌های خارجی، می‌توان به ارزانی تکثیر و پرورش، مقدار بالای زیست توده تولیدی و همچنین عدم وجود بیمارگرهای مشترک بین انسان و گیاه اشاره نمود (Merlin et al. 2014). گیاه هویج (*Daucus carota* L.) متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) است. هویج یکی از سبزی‌های مهم به‌شمار می‌رود که معمولاً به صورت خام یا فراروری شده مصرف می‌شود (Baranski 2008). سازگاری بالا، ارزش غذایی زیاد و تنوع مصرف باعث افزایش سطح زیر کشت سالانه هویج در جهان شده است (Iorizzo et al. 2020). هویج منبع مهمی برای کارتنوئیدها، فنولیک‌ها، اسید اسکوربیک و پلی‌استیلین‌ها است که منجر به کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود (Maestro et al. 2019). تا کنون مطالعات گسترده‌ای برای استفاده از گیاه هویج در مطالعات تراریختی انجام شده است. ریشه هویج دارای محتوای غذایی بالایی مانند ویتامین A، بتاکاروتن، کاروتنوئیدها، لوتئین، فیبر و سلولز است. جالب توجه است که علاوه بر اثر پروتئین هترولوگ بیان شده در گیاه هویج تراریخت، کاروتنوئیدهای موجود در هویج تراریخته می‌توانند میزان لئوسیت‌ها و مونوسیت‌ها را در سیستم ایمنی مدل‌های حیوانی افزایش دهند (Ekam et al. 2006). همچنین ریشه هویج در مقایسه با سایر سبزی‌ها، پتانسیل نگهداری طولانی‌تری دارد. از طرفی هویج گیاهی دوساله است که تا سال دوم بذر تولید نمی‌کند، این امر باعث افزایش کنترل بر انتشار ژن‌های تراریخته به بستگان وحشی هویج می‌شود، زیرا ریشه‌های هویج به طور معمول در طول سال اول برداشت می‌شوند (Lindh et al. 2009). ماده ژنتیکی یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ وقت به‌طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند

(Barazandeh et al. 2016). بیان ژن در یوکاریوت‌ها به عوامل مختلفی از قبیل محیط، مرحله نموی، بافت و مقدار محصول تولید شده توسط ژن بستگی دارد. محیطی که موجود در آن قرار دارد مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست (Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود که بیان آنها علاوه بر نوع بافت به مرحله نموی نیز بستگی دارد (Masoudzadeh et al. 2020). همچنین مقدار بیان یک ژن در یک بافت و نیز سایر بافت‌ها سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2021; Shokri et al. 2023). در رابطه با بیان ژن خارجی در گیاهان، می‌توان گفت بیان ژن‌های خارجی تا حدود زیادی وابسته به طراحی و ساختار ناقل بیانی، بویژه عناصر تنظیمی موجود در ناقل مورد استفاده برای فرایند تراریختی است. برای به حداکثر رساندن کارایی گیاهان تراریخته، می‌توان بیان ژن‌های خارجی را از نظر زمانی و مکانی تنظیم نمود. برای این هدف، می‌توان از راه‌اندزهای مختلف به‌منظور کنترل بیان در یک بافت یا مرحله نموی خاص استفاده نمود. راه‌اندزها نقش بسیار مهمی در شروع و تنظیم رونویسی ایفا می‌کنند (Li et al. 2012).

استفاده از راه‌اندزهای ویژه بافت برای بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در یک بافت ذخیره‌ایی و با طول عمر بیشتر باعث افزایش کارایی این پروتئین‌ها می‌گردد. راه‌اندز *MLL* یک راه‌اندز اختصاصی بافت برای بیان در ریشه ذخیره‌ایی چغندر قند است که در سال ۲۰۰۲ شناسایی شد (Kloos et al. 2002). همچنین در سال ۲۰۰۶ راه‌اندز *MLL* برای تراریختی گیاه چغندر قند و تنباکو مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که راه‌اندز *MLL* در کل اندام ذخیره‌ای فعال بود و در تمام مراحل رشد، اختصاصی عمل کرد و باعث بیان ژن گزارشگر *GUS* در بافت ریشه شد (Oltmanns et al. 2006). در مطالعه حاضر ژن *CTBex4* تحت تنظیم راه‌اندزهای *MLL* و *CaMV35S* به گیاه هویج انتقال یافت و بیان آن در بافت‌های برگ و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. لذا، هدف این پژوهش بیان ژن *Ex4* متصل به زیر واحد B سم ویا (CTB) در ریشه گیاه هویج با استفاده از راه‌اندز اختصاصی ریشه *MLL* بود.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه: در این مطالعه از ناقل pBI121 حاوی ژن *CTBex4* تحت تنظیم راه‌اندز *CaMV35S* (pBI121-) مربوط به مطالعه Kokei & Bahramnejad (2020) استفاده شد. جهت جایگزینی راه‌اندز *CaMV35S* با راه‌اندز *MLL* از توالی AX449164.1 مربوط به شماره ثبت ژنی WO0240687 موجود در پایگاه داده NCBI استفاده شد. آغازگرهای پیشرو و پسرو با توجه به توالی موجود و با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Primer3 طراحی شدند. آغازگرهای طراحی شده حاوی محل برش آنزیم‌های *HindIII* و *XbaI* بودند (جدول ۱). با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *MLL*، واکنش زنجیره پلیمرز PCR از روی DNA ژنومی استخراج شده از برگ چغندر قند به روش CTAB انجام شد. واکنش

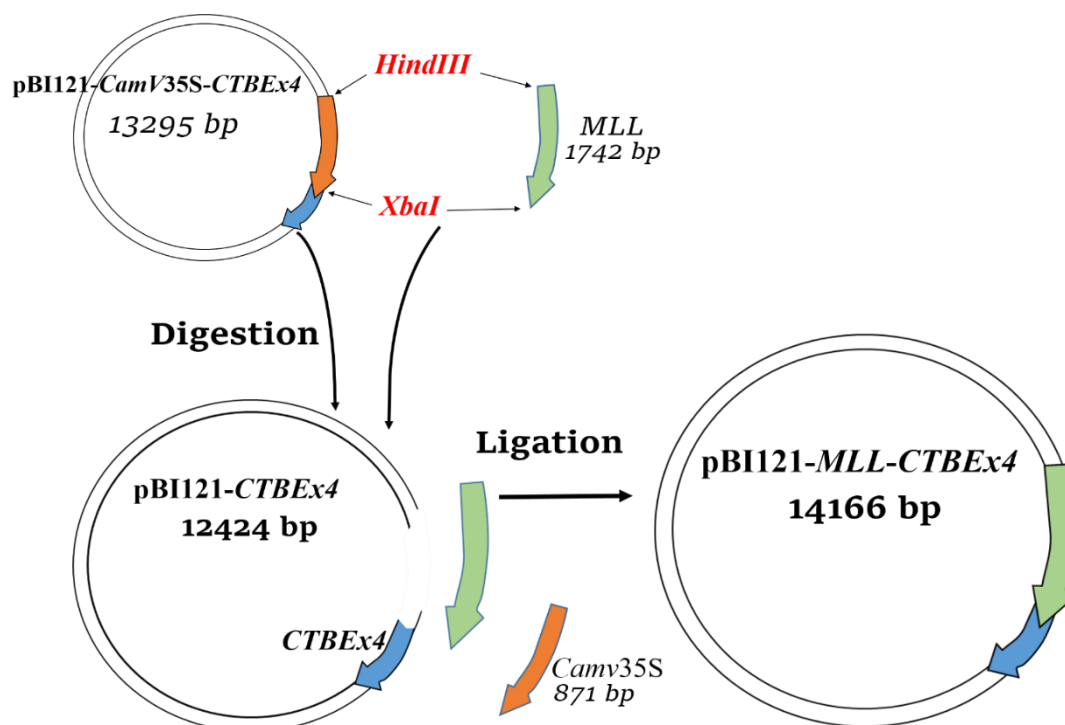
PCR با استفاده از Mastermix شرکت WizbioSolutions (Cat No. W1401) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در حجم ۲۰ میکرولیتر با شرایط دمایی ۱ چرخه و ۱۰ دقیقه به مدت ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه ۱ دقیقه-۵۵ درجه ۱ دقیقه-۷۲ درجه ۲ دقیقه و ۱ چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر قطعه ۱۷۴۲ جفت‌بازی *MLL* انجام گرفت.

سازه *pBI121-CamV35S-CTBex4* و راه‌انداز *MLL* با استفاده از آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XbaI* با نسبت‌های ۱ میکرولیتر آنزیم *XbaI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *HindIII*، ۲ میکرولیتر بافر Tango 10X، ۸ میکرولیتر DNA و آب دیونیزه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در ۲ تیوب جداگانه مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. ابتدا هر میکروتیوب با استفاده از آنزیم *XbaI* به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس برای غیرفعال کردن آنزیم میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد از آنزیم *HindIII* استفاده شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. در نهایت برای غیرفعال کردن آنزیم میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای اتصال راه‌انداز *MLL* به پلاسمید خطی شده *pBI121-CTBex4* و ساخت سازه نو ترکیب از آنزیم T4 لیگاز شرکت BIORON (Ref No. 402002) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از تهیه نسبت‌ها شامل ۵۰ نانوگرم ناقل خطی شده، ۴ برابر آن قطعه درج شونده *MLL*، ۲ میکرولیتر بافر 10X (pH 7.8, 10 mM Tris HCl) برابر آن قطعه درج شونده *MLL*، ۲ میکرولیتر بافر 10X (pH 7.8, 10 mM Tris HCl)، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 ligase، آب عاری از نوکلئاز برای حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و برای افزایش کارایی به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۶ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. برای غیر فعال کردن آنزیم T4 لیگاز میکروتیوب حاوی واکنش در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از تایید درج راه‌انداز *MLL* در ناقل *pBI121-CTBex4* با استفاده از واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش برای همسانه‌سازی در باکتری *E. coli DH5α* استفاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده

Table 1. Sequence of used Primers

طول قطعه تکثیری Length of product	دمای اتصال Annealing temperature	توالی آغازگر 5→3 Primer sequence 5→3	نام آغازگر Primer name
1742 bp	57 °C	ATAAAGCTTGTTTGTTAACTGAACTGAACTGTTAATT	F-MLL
	57 °C	ATATCTAGAGTGAGCGTTTCAAAATTTCAAAAAG	R-MLL
429 bp	60 °C	TGTGCAGAATACCACAACACAC	F-CTBEX4
	60 °C	TCAAGAAGGAGGAGGAGCAC	R-CTBEX4
2414 bp	53 °C	TTGTAACGACGGCCAGT	M13-Fw
	53 °C	GGATAACAATTTACACACAGG	M13-Rev



شکل ۱. تصویر شماتیک مراحل برش، اتصال و ساخت سازه نو ترکیب pBI121-MLL-CTBEx4

Figure 1. Schematic diagram of the digestion, ligation and construction of the recombinant construct pBI121-MLL-CTBEx4

تراریختی باکتری ها: انتقال سازه های pBI121-MLL-CTBEx4 و pBI121-CamV35S-CTBEx4 به باکتری های مستعد شده *E. coli* DH5α به روش شوک دمایی به صورت تیمار روی یخ و سپس قرار دادن در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت (Sambrook & Russell 2006). برای این منظور پس از رشد کلونی ها روی محیط انتخابی کانامایسین (۱۰۰ mg/mL)، و واکنش کلونی PCR، از باکتری ها تراریخت شده با روش لیز قلیایی، DNA پلاسمیدی استخراج شد (Sambrook & Russell 2006). از DNA پلاسمیدی استخراج شده جهت تراریختی باکتری *A. tumefaciens* سویه Gv3101 و انتقال ژن به گیاه استفاده شد. به منظور انتقال سازه به سلول های مستعد شده باکتری *A. tumefaciens* از روش استاندارد انجماد و ذوب استفاده شد (Höfgen & Willmitzer 1988). ۴۸ ساعت قبل از تلقیح ریزنمونه های گیاهی، یک پرگنه از باکتری های *A. tumefaciens* سویه GV3101 حاوی هر یک از سازه های pBI121- و pBI121-MLL-CTBEx4 و pBI121-CamV35S-CTBEx4 به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک های کانامایسین (۱۰۰ mg/mL)، ریفامپیسین (۵۰ mg/mL) و جنتامایسین (۳۰ mg/mL) اضافه شد و به مدت ۳۶ ساعت درون انکوباتور لرزاننده در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور rpm نگهداری شد. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رشد یافته باکتری به ۲۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک های کانامایسین (۱۰۰ mg/mL)، ریفامپیسین (۵۰ mg/mL) و جنتامایسین (۳۰ mg/mL) افزوده شد و تا زمانی که

جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ (OD₆₀₀= 0.5) رسید در انکوباتور لرزاننده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰ نگهداری شد. پس از این مرحله باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۵۰۰۰ در سانتریفیوژ رسوب داده شدند و پس از دور ریختن روش‌ناور، رسوب باقی‌مانده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog 1962)، حاوی ۱۰ MgSO₄ میلی‌مولار و استوسیرینگون ۱۵۰ میکرومولار به خوبی حل شد و پیش از آلوده‌سازی ریزنمونه‌های گیاه هویج به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. از این سوسپانسیون برای تراریختی ریزنمونه‌های گیاه هویج استفاده شد.

تراریختی ریزنمونه‌های گیاه هویج: پس از رشد بذرهای هویج درون شیشه، بافت‌های برگ و هیپوکوتیل در شرایط

استریل به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتیمتری برش یافتند. ریزنمونه‌های به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون درون شیشه‌های حاوی محیط MS جامد فاقد آنتی‌بیوتیک به مدت ۲ تا ۴ روز در تاریکی کشت داده شدند (هم‌کشتی باکتری و ریزنمونه‌ها)، سپس به محیط MS جامد انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ترکیبی از BAP ۰/۵٪ و NAA ۱٪ تا زمان ایجاد کالوس انتقال داده شدند. پس از کالوس‌زایی، کالوس‌ها به محیط کشت MS جدید حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ترکیبی از غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP، NAA و 2-4-D انتقال یافتند. پس از ایجاد اندام‌های هوایی، نمونه‌ها به محیط کشت MS پایه جهت ریشه‌زایی منتقل شدند.

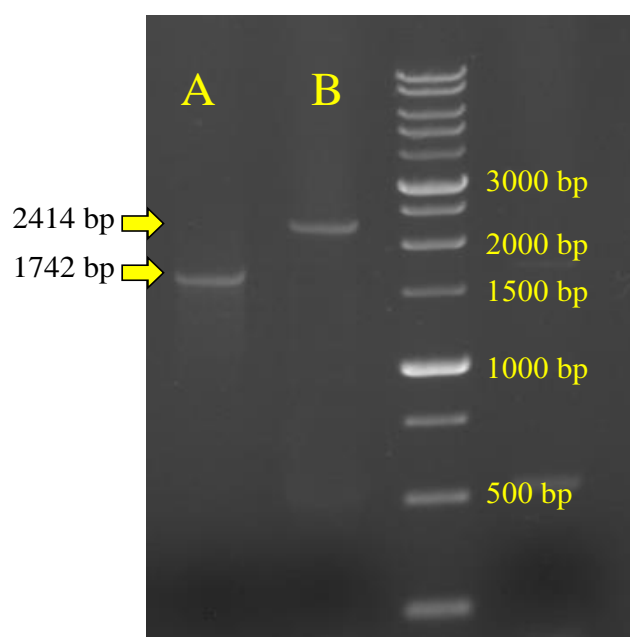
آزمون‌های تایید تراریخته‌ها: جهت بررسی فرایند انتقال ژن توسط *A. tumefaciens* از کالوس‌ها و همچنین

اندام‌های باززا شده DNA استخراج شد، سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای MLL و CTBEx4 انجام گرفت. به‌منظور بررسی بیان ژن *CTBEx4* در گیاه هویج از برگ و ریشه گیاهان تراریخت شده و گیاهان شاهد RNA با استفاده از روش Ghawana et al. (2011) استخراج شد و پس از حذف DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase I شرکت یکتا تجهیز (Cat No: YT9054) و هم‌غلظت‌سازی RNAهای استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز (Cat No: YT4500) سنتز شد. جهت بررسی بیان ژن *CTBEx4* در بافت‌های مختلف، اقدام به انجام واکنش PCR شد، سپس محصول واکنش روی ژل ۱/۲٪ آگارز بارگذاری شد. بررسی بیان ژن به صورت کیفی (بیان یا عدم بیان) و بدون مقایسه با ژن کنترل داخلی انجام شد. برای بررسی بیان در سطح پروتئین ابتدا با استفاده از روش Tris-HCl پروتئین کل از بافت‌های برگ و ریشه گیاهان تراریخت شده و شاهد استخراج شد (Kim et al. 2001). پس از استخراج، غلظت مساوی از پروتئین کل گیاهان تراریخت و شاهد برابر با ۱۰ میکروگرم برای آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی بیان پروتئین *CTBEx4* از روش antigen coating plate-ELISA (Jiang et al. 2003) استفاده شد. در نهایت میزان جذب در طول ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader، ELx808 شرکت Bio Tek Instruments اندازه‌گیری شد.

بررسی‌های آماری: تمامی آزمایش‌های انجام شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام گرفت. نمودارها، با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج PCR پس از اتصال قطعه ۱۷۴۲ جفت‌بازی *MLL* به پلاسمید خطی شده *pBI121-CTBEx4* حاکی از درستی واکنش‌های هضم و اتصال بر اساس قطعات به دست آمده بود. نتایج PCR با آغازگرهای *MLL* و *M13* حاکی از درج صحیح قطعه *MLL* در سازه بود (شکل ۲). پس از هم‌سانه سازی سازه‌های *pBI121-CamV35S-CTBEx4* و *pBI121-MLL* در باکتری *E. coli DH5α*، سازه‌ها به باکتری *A. tumefaciens Gv3101* برای فرایند تراریختی گیاه انتقال یافتند.

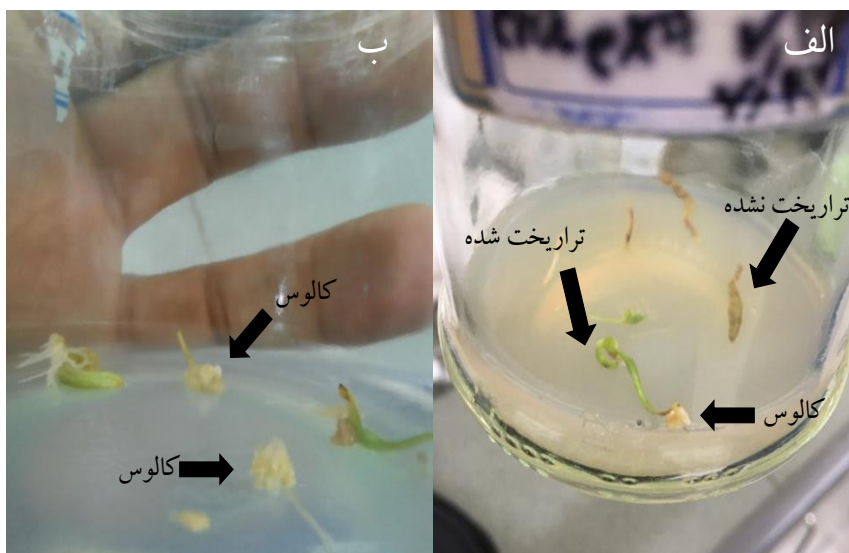


شکل ۲. نتایج PCR روی ژل ۱/۲٪ آگارز برای تایید اتصال و ساخت سازه نوترکیب (لدر 250bp-10kb) (A) 1742 bp PCR product of *MLL* promoter by *M13-Fw* and *MLL-Rev* Primers (B) 2414 bp PCR product of *M13* primers

M13

Figure 2. PCR products on 1.2% agarose gel to confirm the ligation reaction and construction of recombinant DNA (DNA ladder 250bp-10kb) A) 1742 bp PCR product of *MLL* promoter by *M13-Fw* and *MLL-Rev* Primers B) 2414 bp PCR product of *M13* primers

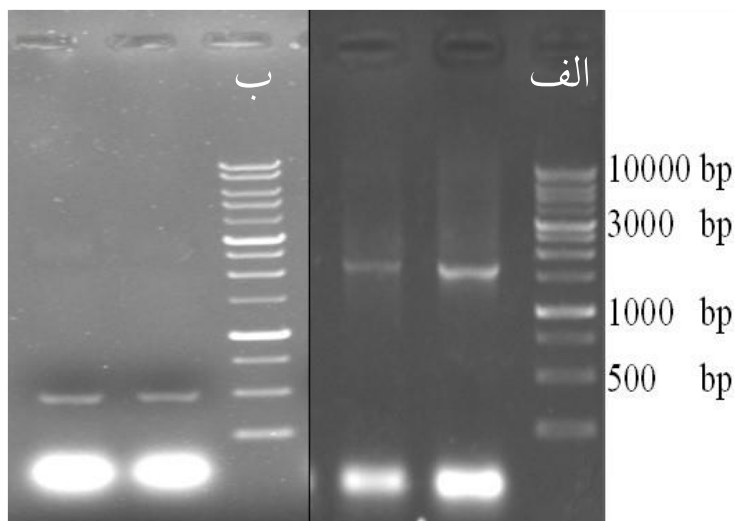
ريز نمونه‌هاى بدست آمده از گياه هويج پس از تراريختى و هم‌كشتى با باكتري *A. tumefaciens* Gv3101، به‌منظور ايجاد كالوس روى محيط MS انتخابى قرار گرفتند. پس از دو هفته، ريز نمونه‌هاى تراريخت شده شروع به ايجاد كالوس نمودند، در حاليكه ريز نمونه‌هاى تراريخت نشده تغيير رنگ داده و از بين رفتند (شكل ۳).



شكل ۳. الف) ريز نمونه‌هاى تراريخت شده و تراريخت نشده گياه هويج روى محيط انتخابى MS ب) رشد كالوس‌هاى تراريخت شده روى محيط انتخابى MS

Figure 3. A) Transgenic and non-transgenic explant of carrot on MS selective media B) Transgenic callus growth on MS selective media

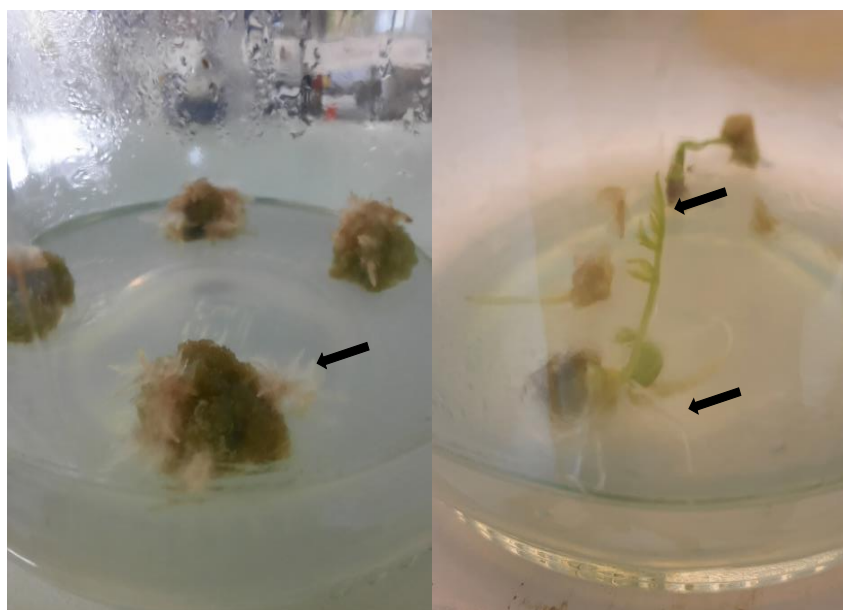
نتايج بررسى تراريختى كالوس‌ها بوسيله واكنش PCR با استفاده از آغازگرهاى اختصاصى MLL و آغازگرهاى CTBEx4 حاكى از تكثير قطعه ۱۷۴۲ جفت بازى مربوط به راه‌انداز MLL در كالوس‌هاى تراريخت شده با سازه pBI121-MLL-CTBEx4 (شكل ۴ الف) و تكثير قطعه ۴۸۲ جفت بازى مربوط به ژن CTBEx4 در كالوس‌هاى تراريخت شده با سازه pBI121-CamV35S-CTBEx4 بود (شكل ۴ ب). پس از تايد تراريختى، كالوس‌ها به محيط بازرابى و ريشه‌زايى انتقال يافتند. پس از طى يك هفته به تدريج كالوس‌ها شروع به ايجاد گياهچه و ريشه نمودند (شكل ۵). نتايج بررسى بيان ژن CTBEx4 در اندام‌هاى هوايى و ريشه ذخيرهايى در گياهان شاهد و تراريخته حاكى از بيان ژن CTBEx4 در هر دو اندام‌هاى هوايى و ريشه در گياهان تراريخت شده با سازه pBI121-CamV35S-CTBEx4 بود. اين در حالى بود كه گياهان تراريخت شده با سازه pBI121-MLL-CTBEx4 فقط در اندام ريشه قادر به بيان ژن CTBEx4 بودند و هيچ بيانى در گياهان شاهد مشاهده نشد (شكل ۶).



شکل ۴. آزمون PCR برای تایید تراریختی کالوس‌های ایجاد شده (لدر 250bp-10kb) الف) تکثیر قطعه

۱۷۴۲ جفت بازی راه‌انداز *MLL* ب) تکثیر قطعه ۴۸۲ جفت بازی ژن *CTBEx4*

Figure 4. PCR reaction to validation of transgenic calluses (DNA ladder 250bp-10kb) A) Amplification of the 1742 bp PCR product of *MLL* promoter B) Amplification of the 482 bp PCR product of *CTBEx4* gene



شکل ۵. رشد گیاهچه و ریشه از کالوس‌های تراریخت شده روی محیط باززایی MS حاوی BAP ۰/۵٪ و

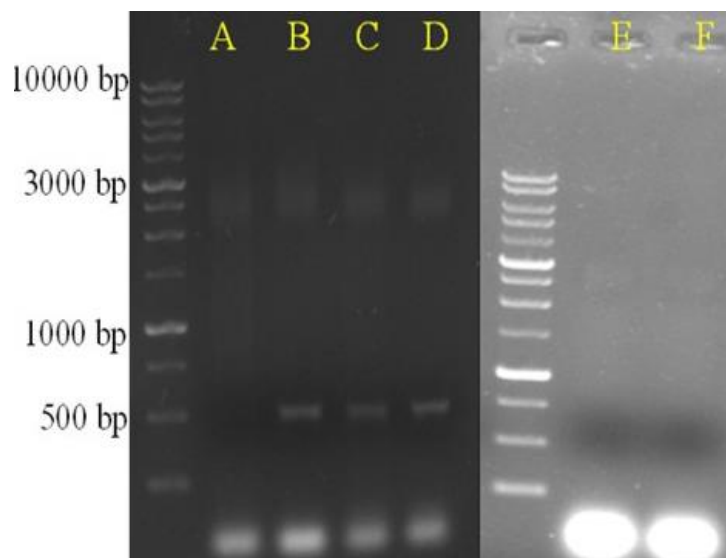
NAA ۱٪

Figure 5. Seedling and root growth from transgenic callus on regeneration MS media containing BAP 0.5% and NAA 1%

نتایج بررسی بیان پروتئین CTBEx4 با استفاده از روش ELISA نشان داد که هیچ بیانی در بافت‌های ریشه و برگ شاهد همان گونه که انتظار می‌رفت مشاهده نشد. مقدار بیان پروتئین CTBEx4 تحت تنظیم راه‌انداز *CamV35S* در بافت‌های برگ و ریشه به یک اندازه بود و از مقدار تولید پروتئین در ریشه هویج تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* کمتر بود (شکل ۷). مقدار بیان در برگ‌های گیاه تراریخت شده با *MLL* نیز برابر با کنترل منفی و گیاه شاهد بود. نتایج مطالعه حاضر حاکی از بیان موفقیت آمیز ژن *CTBEx4* به صورت انتقال دائم در سطوح mRNA و پروتئین در ریشه گیاه هویج بود و بیشترین مقدار بیان نیز در بافت ریشه گیاه تراریخت شده با سازه *pBI121-MLL-CTBEx4* مشاهده شد به طوری که مقدار بیان ۳۰٪ بیشتر از مقدار بیان پروتئین در اندام‌های هوایی و ریشه گیاه تراریخت شده با سازه *pBI121-CamV35S-CTBEx4* بود.

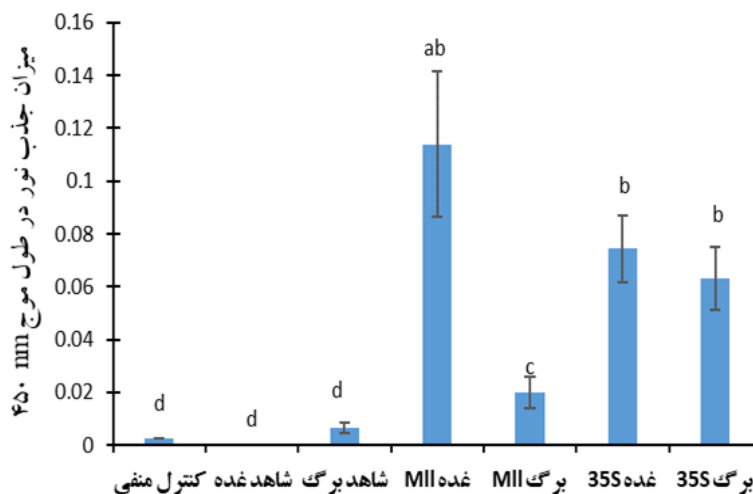
گزارش‌ها حاکی از آن است که راه‌انداز *CamV35S* ویروس موزاییک گل کلم بیان ژن‌های هدف را تقریباً در تمام بافت‌ها و در تمام مراحل رشد هدایت می‌کند (Fang et al. 1989; Amack & Antunes 2020). با این حال، بیان همیشگی تحت تاثیر راه‌اندازهای ساختاری در تراریخته‌ها چه برای اهداف مطالعاتی و چه برای اهداف کاربردی همیشه مطلوب نیست. بیان دائم ژن خارجی می‌تواند باعث خاموشی ژن هدف و حذف عملکرد آن شود و به‌عنوان یک بار اضافی بر گیاه تراریخته تلقی شود (Chen et al. 2014). در مطالعه‌ای Oltmanns et al (2006) راه‌انداز ۳ ژن که محصولشان در ریشه ذخیره می‌شد از جمله راه‌انداز *MLL* را در گیاه چغندر قند و تنباکو مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ژن تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* در مراحل مختلف نمو ریشه بسیار اختصا صی عمل نمود و در ریشه بیان شد. در حالی که در گیاه تنباکو ژن تحت تنظیم راه‌انداز *Ttp* در هیپوکوتیل و ژن تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* در ریشه بیان شد که نشان از بیان مختص بافت راه‌انداز *MLL* بود (Oltmanns et al. 2006). در مطالعه‌ای Luchakivskaya et al (2011) ژن اینترفرون alpha-2b را تحت تنظیم راه‌اندازهای *CaMV35S* و *MLL* با واسطه آگروباکتریوم در گیاه هویج بیان نمودند. نتایج آنها حاکی از آن بود که فعالیت اینترفرون در عصاره برگ هویج ناشی از راه‌انداز ساختاری *CaMV35S* بیشتر بود، اما فعالیت اینترفرون در عصاره ریشه برای گیاهان تراریخت شده با ژن اینترفرون تحت کنترل راه‌انداز *MLL* به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. آنها عنوان نمودند که هر دو راه‌اندازهای *CaMV35S* و *MLL* سطوح بالایی از بیان ژن را هدایت می‌کنند (Luchakivskaya et al. 2011).

نتایج برخی از مطالعات حاکی از مقدار کم بیان ژن خارجی تحت تاثیر راه‌انداز گیاهی بدلیل نبود برهمکنش درست بین عناصر cis راه‌انداز و trans گیاه میزبان است (Kamo et al. 1995; Joung & Kamo 2006; Furtado et al. 2008). به‌نظر می‌رسد با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعات قبل راه‌انداز *MLL* می‌تواند به‌خوبی در اندام ریشه گیاه هویج بیان ژن‌های خارجی را هدایت نماید.



شکل ۶. بررسی بیان ژن *CTBEX4* در بافت‌های برگ و ریشه گیاهان هویج (لدر 250bp-10kb) (A) برگ تراریخت با سازه *MLL* (B) ریشه تراریخت با سازه *MLL* (C) برگ تراریخت با سازه *CaMV35S* (D) ریشه تراریخت با سازه *CaMV35S* (E) برگ شاهد (F) ریشه شاهد

Figure 6. Expression analysis of *CTBEx4* gene in leaf and tuber tissues of carrot plants (DNA ladder 250bp-10kb) A) transgenic leaf with *MLL* construct B) transgenic tuber with *MLL* construct C) transgenic leaf with *CaMV35S* construct D) transgenic tuber with *CaMV35S* construct E) leaf control F) tuber of control



شکل ۷. بیان پروتئین *CTBEX4* در بافت‌های ریشه و برگ گیاه هویج شاهد و تراریخت با تحت تنظیم راه‌انداز *MLL* و راه‌انداز *CaMV35S*

Figure 7. Expression level *CTBEx4* protein in tuber and leaf tissues of control carrot plant, transduced with *MLL* and *CaMV35S* promoter.

نتيجه گيرى: نتايج تحقيق حاضر نشان داد راه انداز *MLL* مى تواند به خوبي بيان ژن *CTBEx4* را در اندام ريشه گياه هويج هدايت نمايد. علاوه بر مقدار بيان بيشتري پروتئين *CTBEx4* تحت تنظيم راه انداز *MLL* در مقايسه با راه انداز *CaMV35S*. توجه به برخى نگرانى هاى موجود در مورد راه اندازهاى با منشا ويروسي از قبيل نگرانى هاى زيست محيطى، سلامت و مقبوليت جامعه و همچنين توجه به اين واقعيت كه بيان بيشتري از حد ژن هاى خارجى تحت تنظيم راه اندازهاى ساختارى مى تواند با فرايندهاى طبيعى در گياه تراريخت تداخل ايجاد كند، راه انداز *MLL* را به گزينه مناسب تري براى توليد پروتئين هاى خارجى در گياه هويج تبديل مى كند.

سپاسگزارى: از صندوق حمايت از پژوهشگران (گرت شماره ۹۵۸۴۹۶۸۳) و دانشكده كشاورزي دانشگاه كردستان به خاطر حمايت مالى و همكارى در اجراى پژوهش حاضر سپاسگزارى مى شود.

منابع

جعفرى احمدآبادى سيد على اصغر، عسكرى همت حشمت اله، محمدآبادى محمدرضا (۱۴۰۲) تاثير شاهدانه بر بيان ژن *DLK1* در بافت قلب بره هاى كرمانى. مجله بيوتكنولوژى كشاورزي، ۱۵(۱)، ۲۳۴-۲۱۷.

شكرى سميرا، خضرى امين، محمدآبادى محمدرضا، خيرالدين حميد (۱۴۰۲) بررسى بيان ژن *MYH7* در بافت هاى ران، دست و راسته بره هاى پروارى نژاد كرمانى. مجله بيوتكنولوژى كشاورزي، ۱۵(۲)، ۲۳۶-۲۱۷.

References

- Amack SC, Antunes MS (2020) *CaMV35S* promoter—A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Curr Plant Biol* 1, e100179.
- Androutsellis-Theotokis A, Walbridge S, Park DM et al. (2010) Cholera toxin regulates a signaling pathway critical for the expansion of neural stem cell cultures from the fetal and adult rodent brains. *PLoS One* 26, e10841.
- Baranski R (2008) Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other Apiaceae species. *Transgenic Plant J* 2, 18-31.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadi-Pour H (2016) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 17, 487-495.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals* 25, 1103.
- Chen L, Jiang B, Wu C et al. (2014) GmPRP2 promoter drives root-preferential expression in transgenic Arabidopsis and soybean hairy roots. *BMC Plant Biol* 14, 1-13.

- Ekam VS, Udosen EO, Chigbu AE (2006) Comparative effect of carotenoid complex from Golden Neo-Life Dynamite (GNLD) and carrot extracted carotenoids on immune parameters in albino Wistar rats. *Niger J Physiol Sci* 21, 1-4.
- Escalada FJ (2014) The physiology of glucagon-like peptide-1 and its role in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin* 143, 2-7.
- Fang RX, Nagy F, Sivasuramian S, Chua NH (1989) Multiple cis-regulatory elements for maximal expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1, 141-150.
- Furtado A, Henry RJ, Takaiwa F (2008) Comparison of promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 6, 679-693.
- Ghawana S, Paul A, Kumar H et al. (2011) An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC Res Notes* 4, 1-5.
- Höfgen R, Lothar W (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Res* 16, e9877.
- Iorizzo M, Curaba J, Pottorff M et al. (2020) Carrot anthocyanins genetics and genomics: Status and perspectives to improve its application for the food colorant industry. *Genes* 7, e906.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15, 217-234 (In Persian).
- Jiang JX, Chen ZX, Zhou XP (2003) Production of a monoclonal antibody to sugarcane mosaic virus and its application for virus detection in China. *J Phytopathol* 151, 361-364.
- Joung YH, Kamo K (2006) Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus*. *Plant Cell Rep* 25, 1081-1088.
- Kamo K, Blowers A, Smith F et al. (1995) Stable transformation of *Gladiolus* using suspension cells and callus. *J Am Soc Hortic Sci* 12, 347-352.
- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY (2001) Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22, 2103-2109.
- Kloos DU, Oltmanns H, Dock C et al. (2002) Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. *J Exp Bot* 53, 1533-1534.
- Kokei S, Bahramnejad B (2020) Transient Expression of CTB-Exendin Fused Genes in *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. *J Agric Sci Technol* 22, 1603-1612.

- Kwon KC, Nityanandam R, New JS, Daniell H (2013) Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC 6 cells. *Plant Biotechnol J* 11, 77-86.
- Li Y, Sun Y, Yang Q (2012) Cloning and function analysis of an alfalfa (*Medicago sativa* L.) zinc finger protein promoter *MsZPP*. *Mol Biol Rep* 39, 8559–8569.
- Lindh I, Wallin A, Kalbina I et al. (2009) Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. *Protein Expr Purif* 66, 46-51.
- Luchakivskaya Y, Kishchenko O, Gerasymenko I (2011) High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. *Plant Cell Rep* 30, 407-415.
- Maestro MA, Molnar F, Carlberg C (2019) Vitamin D and its synthetic analogs. *J Med Chem* 27, 6854-6875.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2020) *Dlk1* gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677 .
- Merlin M, Gecchele E, Capaldi S (2014) Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *BioMed Res Int* 2014, 1-14
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7, e08542
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Nityanandam R (2011) Expression and functional evaluation of exendin 4 fused to cholera toxin B subunit in tobacco chloroplast to treat type 2 diabetes. McS thesis, University of Central Florida. 19-29.
- Oltmanns H, Kloos DU, Brie W, et al. (2006) Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet. *Planta* 224, 485-495.
- Sambrook J, Russell DW (2006) Transformation of *E. coli* by electroporation. *Cold Spring Harb Protoc* 2006, 3933.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyrodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agric Biotechnol J* 15, 217-236 (In Persian).
- Song HC, Yang YX, Lan QG, Cong W (2023) Immunological effects of recombinant *Lactobacillus casei* expressing pilin MshB fused with cholera toxin B subunit adjuvant as

an oral vaccine against *Aeromonas veronii* infection in crucian carp. Fish Shellfish Immunol 139, 108934.