

Designing and constructing the encoding cassette of human epidermal growth factor for expression in barley seeds

Shahrokh Garousi 

PhD Candidate, Department of plant genetics and production engineering, Faculty of agriculture and natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: shgarousi@gmail.com

Sodabeh Jahanbakhsh Godehkahriz 

*Corresponding author. Professor, Department of plant genetics and production engineering, Faculty of agriculture and natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: jahanbakhsh@uma.ac.ir

Kasra Esfahani 

Assistant Professor, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: kasra13@nigeb.ac.ir

Tahmineh Lohrasebi 

Assistant Professor, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: lohrasebi@nigeb.ac.ir

Amir Mousavi 

Associate Professor, Plant Molecular Biotechnology Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: m-amir@nigeb.ac.ir

Ali Hatf Salmanian 

Professor, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: salman@nigeb.ac.ir

Abstract

Objective

Plants are very efficient in producing valuable pharmaceutical proteins. Human epidermal growth factor (hEGF) has numerous effects on various cellular systems, including wound healing, organogenesis, and so on. The present study was carried out with the aim of constructing monocotyledonous-specific vectors for *hegf* insertion and mass-production in a self-pollinated crop, barley, afterwards. This crop plant, with high protein yield and very low cross-pollination, is an ideal host for the production of epidermal growth factor.

Materials and methods

The *hegf* sequence was optimized by COOL software, based on the codon preference of the host plant, and synthesized with a specific promoter, D-hordein. The encoding sequence of signal peptide targeting protein storage organelles in barley seeds was included at the beginning of the encoding area. The synthesized gene cassette was isolated from the cloning vector pUC57Hvorhegf by *SacI* and *HindIII* and cloned in pBI121. To insert the gene cassette of interest into pGH215, due to the lack of similar restriction sites in pUC57Hvorhegf and pGH215, the intermediate vector, pBI121^{Gus-12}, was applied. After digesting pUC57Hvorhegf and pBI121^{Gus-12} by *SacI* and *KpnI*, the sequence of interest was incorporated into pBI121^{Gus-12}. Finally, the recombinant pBI121^{Gus-12} and pGH215 were digested with *KpnI* and *SalI*, and the gene cassette was cloned at the right border of T-DNA, behind the NOS terminator.

Results

Cloning accuracy and constructing pBI121Hvorhegf and pGH215Hvorhegf vectors bearing kanamycin and hygromycin, respectively, suitable for monocotyledons-crop transformation was confirmed by colony PCR, digestion pattern, and sequencing with forward and reverse primers.

Conclusions

The modified recombinant expression vector pGH215 with the gene of interest carrying the hygromycin gene cassette, giving a high level of ability to select transformed explants, can be used to transfer desired genes in monocotyledons and express those genes in protein storage organelles.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Cloning, Monocotyledons.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Garousi S, Jahanbakhsh Godehkahriz S, Esfahani K, Lohrasebi T, Mousavi A, Salmanian AH (2021) Designing and constructing the encoding cassette of human epidermal growth factor for expression in barley seeds. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 55-80.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 55-80.

DOI: 10.22103/jab.2021.18081.1335

Received: September 11, 2021.

Accepted: October 17, 2021.



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

© the authors

طراحی و ساخت کاست رمزکننده عامل رشد اپیدرمی انسانی برای بیان در بذر گیاه جو

شاهرخ گروسی

دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک به نژادی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: shgarousi@gmail.com

سدابه جهانبخش گده کهریز

*نویسنده مسئول: استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک به نژادی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: jahanbakhsh@uma.ac.ir

کسری اصفهانی

استادیار، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران. رایانامه: kasra13@gmail.com

تهمینه لهراسبی

استادیار، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران. رایانامه: lohrasebi@gmail.com

امیر موسوی

دانشیار، گروه زیست‌فرآورده‌های مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران. رایانامه: m-amir@nigeb.ac.ir

علی هاتف سلمانیان

استاد، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران. رایانامه: salman@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

چکیده

هدف: گیاهان کارآیی بسیاری در تولید پروتئین‌های ارزشمند دارویی دارند. عامل رشد اپیدرمی انسانی، اثرات بی‌شماری بر روی سیستم‌های مختلف سلولی داشته و نقش مهمی در بهبودی زخم‌ها و اندام‌زایی دارد. هدف از پژوهش اخیر ساخت سازه‌های ویژه تک‌لپه‌ای‌ها برای انتقال بعدی ژن عامل رشد اپیدرمی و تولید انبوه آن در یک گیاه تک‌لپه‌ای خودگشن یعنی جو بود. گیاه جو با داشتن عملکرد پروتئینی بالا و دگرگشی بسیار پایین، میزبان ایده‌آلی برای تولید عامل رشد اپیدرمی است.

مواد و روش‌ها: به منظور دسترسی به بالاترین میزان بیان عامل رشد اپیدرمی در بذر جو، توالی ژن موردنظر بر اساس ترجیح کدونی گیاه جو با نرم افزار COOL بهینه و همراه با پیش بر اختصاصی دی هورڈئین سنتز شد. همچنین توالی راهنمای پیتیدی اندام مک ذخیره‌ای پروتئین در بذر جو در ابتدای ناحیه رمزکننده قرار گرفت. پس از دریافت قطعه سنتزی در ناقل pUC57Hvorhegf، آن قطعه توسط آنزیم‌های SacI و HindIII از ناقل جدا و در پلاسمید pBI121 همسانه سازی شد. در گام بعدی همسانه سازی، برای درج توالی ژن موردنظر در ناقل pGH215، به دلیل نبود جایگاه‌های شناسایی یکسان در این ناقل‌ها، از ناقل حدواسط pBI121^{Gus-12} استفاده شد. بعد از برش ناقل همسانه سازی و pBI121^{Gus-12} توسط آنزیم‌های SacI و KpnI، همسانه سازی قطعه موردنظر در pBI121^{Gus-12} انجام گرفت. در گام آخر، ناقل pGH215 و pBI121^{G-12}Hvorhegf با آنزیم‌های KpnI و SalI هضم شده و توالی موردنظر در مرز راست T-DNA و قبل از پایان دهنده NOS قرار گرفت.

نتایج: با استفاده از آزمون کلونی پی سی آر، الگوی هضم آنزیمی و توالی یابی با آغازگرهای رفت و برگشت، درستی همسانه سازی و تولید ناقل‌های pBI121Hvorhegf و pGH215Hvorhegf با نشانگر کانامایسین و هجف ژن هجف با نشانگر هیگرومایسین، مناسب برای انتقال ژن در تک‌لپه‌ای‌ها تأیید شد.

نتیجه‌گیری: ناقل بیانی نو ترکیب pGH215 تغییر یافته دارای کاست ژنی موردنظر همراه با نشانگر هیگرومایسین می‌تواند برای انتقال ژن موردنظر در تک‌لپه‌ای‌ها و بیان پروتئین نو ترکیب در اندام ذخیره‌ای بذر استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: آگروباکتریوم تومیفایشینس، تک‌لپه‌ای، همسانه سازی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: گروسی شاهرخ، جهانبخش گده کهریز سدابه، اصفهانی کسری، لهراسبی ته‌مین، موسوی امیر، سلمانیان علی هاتف (۱۴۰۰) طراحی و ساخت کاست رمزکننده عامل رشد اپیدرمی انسانی برای بیان در بذر گیاه جو. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۴)، ۵۵-۸۰.

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



© the authors

مقدمه

با افزایش تقاضا برای داروهای زیستی و هزینه‌های بالا و مشکلات برخی سیستم‌های تولید فعلی یعنی مخمرها، میکروارگانیسم‌ها، سلول‌های حیوانی و حیوانات تراریخت، استفاده از گیاهان تراریخت به‌عنوان نسل نوین بیوراکتورها توجه بیش‌تری را به خود جلب کرده است (Basaran and Rodríguez-Cerezo 2008; Obembe et al. 2011). استفاده از

گیاهان در زراعت مولکولی به منظور تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی، صنعتی و متابولیت‌های ثانویه، چشم‌انداز امیدبخشی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع با هزینه کم ارائه داده است (Obembe et al. 2011; Huang and McDonald 2012). در این میان استفاده از گیاهان تک‌لپه‌ای مانند جو در زراعت مولکولی از جنبه‌های متعددی مهم است؛ مانند خصوصیات زراعی مناسب، وابستگی کم به انسان، داشتن دانه‌های درشت و آسانی مدیریت کشت. جوی زمستانه دارای محتوی پروتئینی نسبتاً بالا (۱۲-۱۵ درصد) است. این مسئله همراه با تطبیق‌پذیری بالای جو به شرایط گوناگون و هزینه‌های تولید کم‌تر، بذر جو را به عنوان راکتورهای زیستی برای تولید پروتئین‌های دارویی، بسیار جالب می‌سازد. علاوه بر آن، طبیعت خودگرده‌افشانی بسیار بالای جو همراه با عدم توانایی تولید دوره‌های بارور با گیاهان زراعی خویشاوند و گونه‌های وحشی، یک سازوکار وراثتی ایجاد می‌کند که عملاً از پراکندگی ناخواسته ژرم‌پلاسم تغییر یافته ژنتیکی تحت شرایط مزرعه‌ای جلوگیری می‌کند. فرآورده‌های بر پایه بذر جو ذاتاً دارای کیفیت بالاتری از سایر میزبان‌های بیان سنتی مانند باکتری‌ها و سلول‌های پستانداران بوده و فاقد بافت حیوانی، سرم و سموم می‌باشند. آن‌ها بدون عوامل آلودگی انسانی یا حیوانی بوده و فعالیت تذبذبی و پیش‌التهابی کم‌تری دارند. این پروتئین‌ها به‌طور طبیعی می‌توانند توسط سازوکار تاخوردگی پروتئین یوکاریوتی گیاهان تا بخورند و خطری برای آلودگی توسط پروتئین‌های درون‌زاد پستانداران وجود ندارد. گزارش‌های بسیار امیدوارکننده‌ای نسبت به عملکرد بالای پروتئین نو ترکیب جو ترا ریخت وجود دارد (Goedeke et al. 2007; Kumlehn and Hensel 2009). عامل رشد اپیدرمی انسانی (Human Epidermal Growth Factor, hEGF)، پلی‌پپتیدی ۶/۲ کیلودالتونی با ۵۳ اسید آمینه است. این پپتید از برش آندوپیتیدازی پیش‌ساز گلیکوپروتئینی غشایی EGF حاصل شده، اثرات بی‌شماری بر روی سیستم‌های سلولی مختلف داشته و نقش مهمی در بهبودی زخم‌ها و اندام‌زایی ایفاء می‌کند. برخی از کارکردهای این پلی‌پپتید، تکثیر و تمایز سلول‌های اپی‌تلیال پوست، قرنیه، ریه، نای، معده و روده بوده و همچنین سبب افزایش تحریک، رشد و مهاجرت کراتینوسیت‌ها شده و تکثیر فیبروبلاست‌ها و سلول‌های جنینی را بیش‌تر می‌کند. اهمیت این پروتئین به حدی است که دو دانشمند پیشگام در کشف آن موفق به دریافت جایزه نوبل شدند (Patel and Bertics 2006; Sharma et al. 2008; Zeng and Harris 2014).

پژوهش‌های صورت گرفته در حوزه ترا ریختی گیاهان نشان می‌دهد که نزدیک به ۸۰ درصد ترا ریختگی با واسطه‌گری *Agrobacterium tumefaciens* انجام گرفته و در این فرآیند، بهینه‌سازی ناقل‌های دو تایی^۱ (binary vectors) آگروباکتریوم عامل مهمی محسوب می‌شود (Bibi et al. 2013; Ji et al. 2013). هم‌ساز با ناقل‌های دوتایی مورد استفاده در تک‌لپه‌ای‌ها به‌ویژه انواع ناقل‌های قدیمی دشوار است (Himmelbach et al. 2007)؛ زیرا اندازه‌هایی بزرگ و جایگاه‌هایی اندک برای هم‌ساز سازی دارند، به علت تعداد ن‌سخه کم (Low copy number) در *E. coli*، محصول DNA

^۱ ناقل‌های دوتایی دو قسمتی هستند، کاست دارای T-DNA و اسکلت ناقل شامل ناحیه تکثیری پلاسمید در *ای کولای* و آگروباکتریوم توم‌فایشانس، ژن‌های نشانگر گزینشی برای باکتری و گاهی ژن‌های متحرک کردن پلاسمید. در ناقل‌های دوتایی ناحیه T-DNA در رپلیکون دارای میزبانی وسیع و ژن‌های بیماری‌زای مورد نیاز T-DNA بروی پلاسمید Ti خلع سلاح شده قرار می‌گیرد.

آن‌ها کم هست، رپلیکون‌های آن‌ها ناپایدار بوده و سبب از دست رفتن پلاسمید هنگام تکثیر می‌شود، هم‌چنین تعداد نشانگرهای آن‌ها محدود است (Komari et al. 2006; Sahoo et al. 2014; Low et al. 2018).

با طراحی و ساخت ناقل‌های دوتایی مطلوب علاوه بر رفع نقایص ذکر شده، هم‌چنین می‌بایست درج ترانس ژن آسان و تراریختی گیاهان کارآمد شود و ناقل به صورت وسیع در دسترس پژوهشگران قرار گیرد. از طرف دیگر، برداشتن یا جایگزینی اجزای ناقل دوتایی برای ساخت سازه‌های جدید نیز راحت و امکان‌پذیر باشد (Komari et al. 2006; Low et al. 2018).

بررسی نزدیک به ۱۳۰ مقاله اخیری که برای تراریختی گیاهان از *اگرویاکتروویوم تومه‌فا شینس* استفاده کرده‌اند، مشخص کرد که حدود ۴۰ درصد از ناقل‌های به کاررفته در این پژوهش‌ها از مشتقات ناقل نسبتاً قدیمی pBin19 مانند pBI121 می‌باشد (Chen et al. 2003; Dafny-Yelin and Tzfira 2007). ناقل pBI121 که تعداد نسخه کمی (حدود ۵ نسخه) هم در *E. coli* و هم در *ا. تومه‌فا شینس* داشته (Komari et al. 2006) دارای نشانگر گزینشی مقاومت به کانامایسین بوده و اندازه آن نسبتاً بزرگ است (Tzfira et al. 2007). هم‌چنین داشتن تنها سه جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی در پایین دست پیش‌بر 35S و یک جایگاه بالادست پایان‌دهنده NOS مشکل مهم این ناقل محسوب می‌شود. ناقل pGH215 ۱۲٫۴ کیلو بازی از ناقل pLH6000 مشتق شده و علاوه بر داشتن ویژگی‌های مطلوب برای تراریختی غلات، دارای ژن مقاومت به نشانگر هیگرومایسین نیز است (Marthe et al. 2015). ژن‌های نشانگر گزینشی و فرآورده‌های آن‌ها سلول‌های غیرتراریخت را از بین برده و تنها موجب رشد و باززایی سلول‌های تراریخت می‌شوند. نشانگر ایده‌آل توانایی بیان در تمامی سلول‌ها و بافت‌ها در بیش‌تر گونه‌های گیاهی را داشته و بیان آن از فعالیت درونی خود بافت‌های گیاهی متفاوت هست (Bibi et al. 2013). از زمان توسعه فناوری تراریختی، سه ژن رمزکننده نشانگرهای گزینشی نئومایسین فسفوترانسفراز ۲ (*nptII*)، هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hpt*) و *bar* که به ترتیب مقاومت به کانامایسین، هیگرومایسین و فسفینوتریسین را القاء می‌کنند، بیش‌ترین کاربرد را در پژوهش‌های تراریختی غلات داشته‌اند (Miki and McHugh 2004; Shrawat and Lörz 2006). در تولید گیاهان تراریخت، انتخاب نشانگر گزینشی موضوع مهمی بوده و بافت غلات نسبت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و در نتیجه نسبت به ژن *nptII* نسبتاً غیرحساس هست (Ishida et al. 2015) و در برخی از غلات سطوح بالایی از مقاومت طبیعی به کانامایسین نیز مشاهده شده است (Aragão and Brasileiro 2002). هیگرومایسین که دومین آنتی‌بیوتیک پرمصرف در تراریختی گیاهان است (Miki and McHugh 2004) سمی‌تر از کانامایسین بوده، به سرعت سلول‌های حساس را کشته و برای انتقال ژن در غلات و گیاهان علوفه‌ای دارای سطوح بالای مقاومت به کانامایسین، استفاده می‌شود (Shrawat and Lörz 2006; Himmelbach et al. 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد حدود ۸۰ درصد گیاهان تراریخت دارای ژن *hpt*، واجد ترانس ژن صفت موردنظر به همراه ژن مقاومت به هیگرومایسین نیز بوده و ۵۰ درصد و ۳۰ درصد آن‌ها به ترتیب یک یا دو نسخه از آن ترانس ژن را داشته و باقی چند نسخه‌ای بودند (Ishida et al. 2015). به علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود

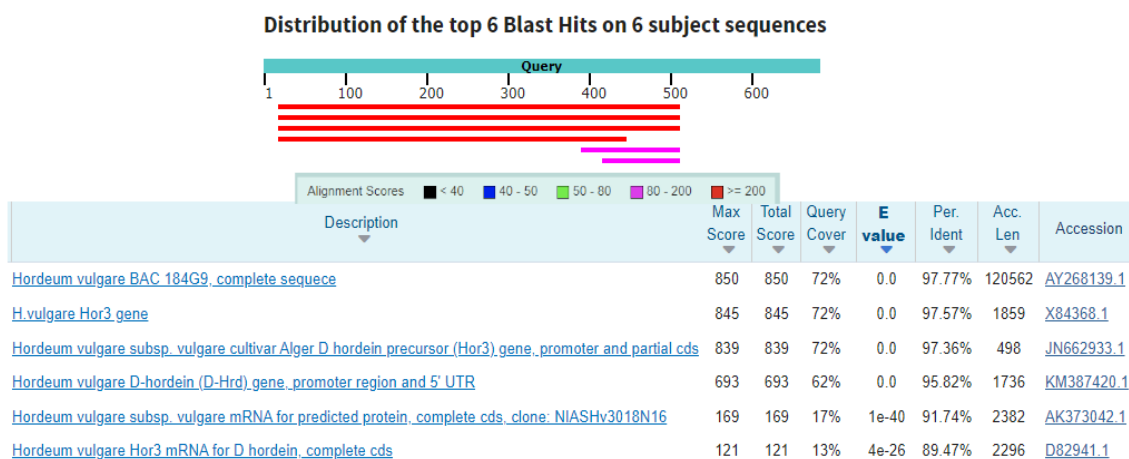
که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانند سازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). در یک سلول، DNA دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidinejad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن، اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). هدف از این مطالعه، طراحی و ساخت سازه دارای ژن بهینه‌سازی شده رمزکننده عامل رشد اپیدرمی انسانی تحت کنترل پیش‌بر اختصاصی بذر همراه با توالی راهنمای پپتیدی اندامک ذخیره‌ای بذر در ناقل معمولی pBI121 با نشانگر گزینشی کانامایسین و نیز ناقل pGH215 با نشانگر گزینشی هیگرومایسین، به‌منظور بیان این عامل در بذور گیاه جو و تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس وسیع است. با ساخت ناقل دوم که دارای نشانگر هیگرومایسین است ناقل مناسبی برای تراریختی تک‌لپه‌ای‌های نیز معرفی شده که با جایگزینی ژن موردنظر سایر پژوهش‌گران به‌جای ژن مورد استفاده در این مطالعه، قابلیت استفاده در پروژه‌های انتقال ژن و بیان پروتئین نوترکیب در غلات به‌خصوص گیاه جو را دارد.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی ژن *Hvorhegf* همراه با پپتید نشانه بر اساس ترجیح کدونی گیاه جو: توالی مرجع ژن *Hvorhegf* (*Hordeum vulgare* optimized recombinant human epidermal growth factor) با شماره دسترسی AY548762 از پایگاه داده NCBI استفاده شد. ترتیب موردنظر برای طراحی کاست ژنی ساختگی *Hvorhegf* شامل اجزای زیر بود؛ جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی به‌ترتیب *SacI*، *KpnI* و *HindIII* (بر اساس مراحل بعدی هم‌سانه‌سازی انتخاب شدند)، پیش‌بر ویژه بذر دی‌هوردئین (D-hordein) با شماره دسترسی JN662933.1، UTR 5'، پپتید نشانه (Signal peptide)، اندامک ذخیره پروتئین بذر جو و ژن *Hvorhegf* بهینه‌شده بر اساس ترجیح کدونی گیاه جو و در نهایت جایگاه آنزیم برشی *SacI*. به‌منظور بهینه‌سازی توالی پپتید نشانه و ژن موردنظر، از نرم‌افزار آنالین COOL

(<http://bioinfo.bti.a-star.edu.sg/COOL>) استفاده شد. توالی این قسمت از سازه وارد نرم‌افزار شده و سند از پیش تهیه‌شده ترجیح کدونی ژن‌های بسیار پر بیان در گیاه جو به‌عنوان راهنما به نرم‌افزار معرفی شد (پایگاه داده کاربرد کدونی kazusa، <https://www.kazusa.or.jp/codon>). بهترین توالی ارائه‌شده توسط این پایگاه برای تأیید نهایی و بررسی کدون‌های نادر وارد نرم‌افزار آن‌لاین GenScript Rare Codon Analysis Tool (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) شد. به‌دلیل عدم وجود جو در فهرست این نرم‌افزار از خویشاوند نزدیک آن یعنی ذرت استفاده شده و توالی تأیید شده برای ساخت و همسانه‌سازی در جایگاه *EcoRV* توالی *lacZa* ناقل pUC57 به شرکت shinegene (<http://www.shinegene.org.cn/english/genesynthesis.html>) چین فرستاده شد. بعد از دریافت ژن سنتز شده و هم‌ردیفی نوکلئوتیدی توالی سنتز شده توسط نرم‌افزار آن‌لاین Nucleotide BLAST پایگاه داده NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) با ژنوم انسانی (GRCh38) و آرآبیدوپسیس تالیانا، هیچ شباهت معنی‌داری مشاهده نشد، ولی تشابه معنی‌داری با ژنوم گیاه جو مشاهده شد که مربوط به بخش راه‌انداز دی‌هوردئین و پپتید نشان می‌شد (شکل ۱). مراحل کلی همسانه‌سازی و ساخت دو سازه مذکور در شکل ۲ (A و B) نشان داده شده است.

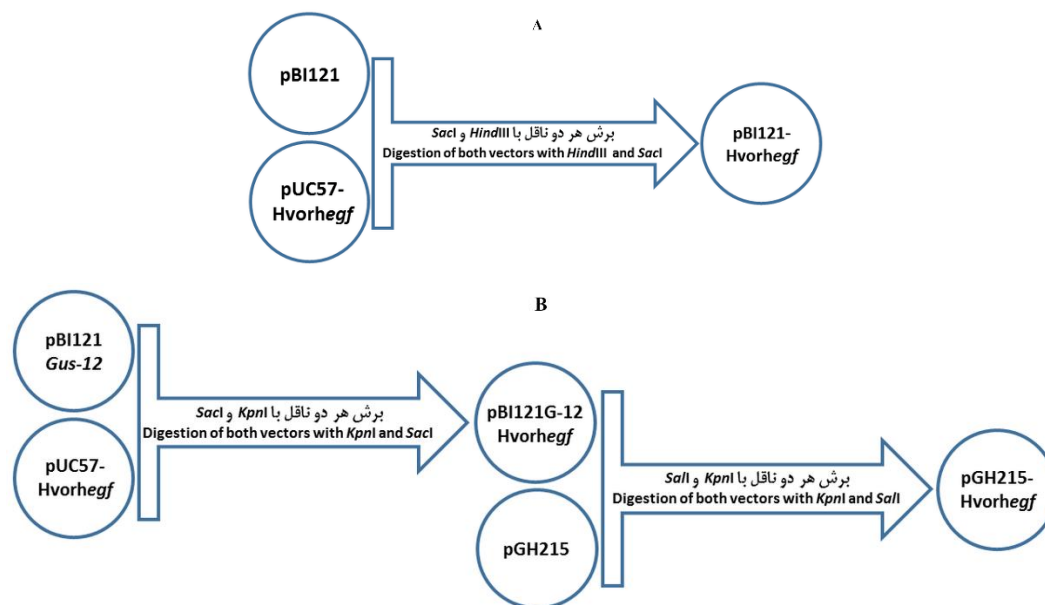
همسانه‌سازی کاست ژنی *Hvorhegf* در ناقل بیانی BI121: هر دو ناقل pUC57Hvorhegf (حاوی ژن ساختگی با ترجیح کدونی گیاه جو) و pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* (شرکت Thermo Fisher Scientific) هضم شده و کاست ژنی *Hvorhegf* جایگزین کاست ژنی *gus* در pBI121 شد (شکل ۳). در طی فرآیند همسانه‌سازی، کشت شبانه



شکل ۱. هم‌ردیفی توالی *hegf* سنتز شده با ژنوم گیاه جو با نرم‌افزار Nucleotide BLAST پایگاه داده

NCBI

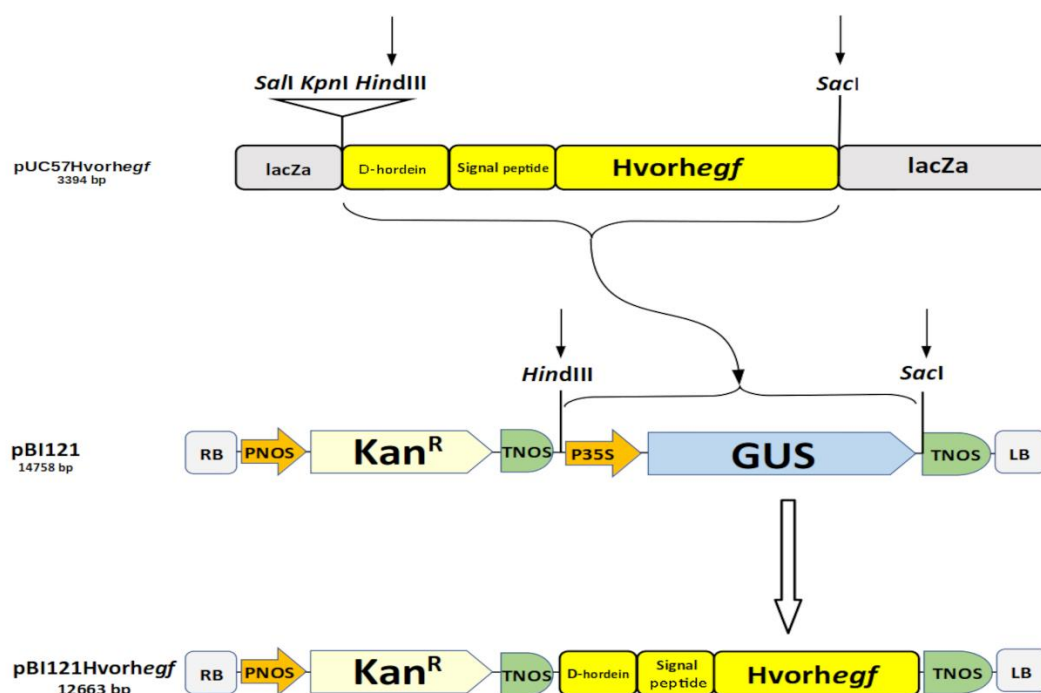
Figure 1. Alignment of the synthesized *hegf* with barley genome via Nucleotide Blast tool of NCBI



شکل ۲. نمودار گردش کار همه سانه سازی؛ الف. درج توالی عامل رشد اپیدرمی از سانی در ناقل pBI121 دارای کاست مقاومت به کانامایه سین، ب. درج توالی عامل رشد اپیدرمی از سانی در ناقل pGH215 دارای کاست مقاومت به هیگرومایسین با واسطه‌گری ناقل pBI121^{G-12}

Figure 2. Flowchart of cloning; A. Insertion of *hegf* into pBI121 containing kanamycin resistance cassette, B. Insertion of *hegf* into pGH215 containing hygromycin resistance cassette with the help of pBI121^{G-12}

باکتری‌ها در محیط LB مایع دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آمپی‌سیلین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین به ترتیب برای ناقل‌های pBI121 و pUC57 انجام و بعد از استخراج پلاسمید توسط کیت (شرکت Genet Bio, Roche) و استخراج دستی با روش (Sambrook and Russell 2006) و هضم با آنزیم‌های برشی، استخراج DNA از ژل انجام شد. تهیه سلول‌های شایسته (Competent cells) باکتری *E. coli* سویه DH5α با واکنش اتصال و انتقال محصول واکنش اتصال به سلول‌های شایسته بر اساس روش‌های معمول انجام گرفت. برای تأیید همسازیه سازی در تعدادی از کلونی‌هایی که در محیط LB جامد دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین رشد کرده بودند از کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای M13 (جدول ۱) استفاده شده و پس از تأیید کشت و استخراج پلاسمید، درستی همسازیه‌سازی با آنالیز الگوی هضم آنزیمی تأیید شد.



شکل ۳. نمودار تصویری ساخت ناقل pBI121Hvorhegf با استفاده از ناقل های pUC57Hvorhegf و pBI121؛ هر دو ناقل با آنزیم های *HindIII* و *SacI* برش خورده و کاست ژنی *Hvorhegf* جایگزین ژن *gus* شده و ناقل pBI121Hvorhegf حاصل شد

Figure 3. Schematic diagram of constructing pBI121Hvorhegf vector using pUC57Hvorhegf and pBI121; both vectors were digested with *HindIII* and *SacI*, and *gus* gene was replaced by the gene cassette of *Hvorhegf*, resulting in pBI121Hvorhegf vector

همسانه سازی کاست ژنی *Hvorhegf* در ناقل بیانی pGH215 با استفاده از ناقل حدواسط pBI121^{G-12}:

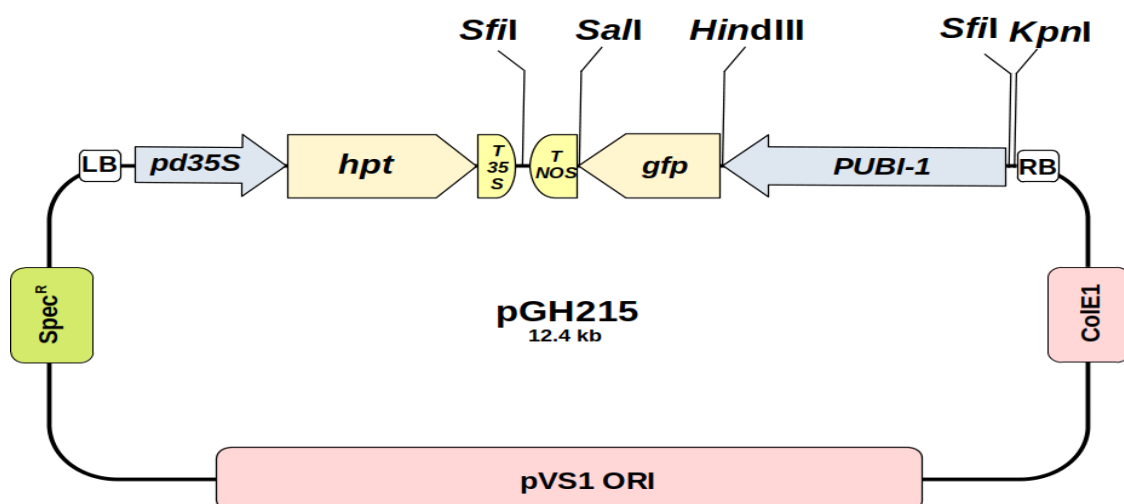
برای همسانه سازی کاست ژنی موردنظر در ناقل بیانی pGH215 (اهدایی دکتر گوتز هنسل، IPK آلمان) از ناقل حدواسط pBI121^{Gus-12} (ساخته شده در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه دکتر اصفهانی) استفاده شد. ناقل دوتایی pGH215 دارای کاست بیانی نشانگر گزینشی مقاومت به هیگرومایسین است که پایین پیش بر 2×35S قرار دارد، همچنین این پلاسمید دارای کاست ژنی *gfp* با پیش بر یوبی کوئیتین ذرت و پایان دهنده NOS است (شکل ۴). ابتدا ناقل های pUC57Hvorhegf و pBI121^{Gus-12} با آنزیم های *KpnI* و *SacI* هضم شده و کاست *Hvorhegf* در جایگاه همسانه سازی چندگانه pBI121^{Gus-12} قرار گرفته و درج آن توسط الگوی هضم آنزیمی و کلونی پی سی آر تأیید شد. در مرحله بعدی، دو ناقل جدید و pGH215 با آنزیم های *KpnI* و *SalI* هضم شده و کاست ژنی موردنظر جایگزین پیش بر یوبی کوئیتین و ژن *gfp* در ناقل pGH215 شد (شکل ۵). الگوی هضم آنزیمی، کلونی پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی *Hvorhegf* (جدول ۲) و تعیین

توالی، درستی همسانه‌سازی را تأیید کردند. در کشت مایع و جامد pGH215 از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و یا اسپکتینومایسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای رفت و برگشت M13

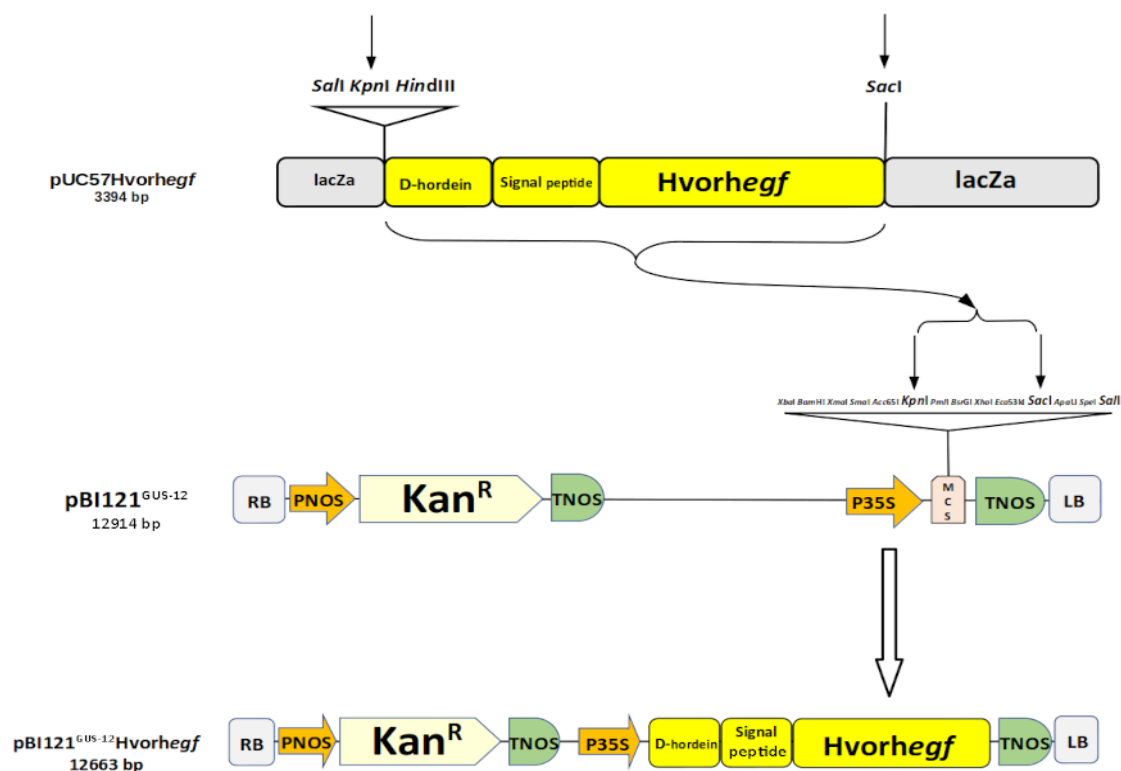
Table 1. The sequences of M13 forward and reverse primers

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer Sequence	تعداد باز # nt	درصد GC %GC	دمای ذوب Tm
M13F	5'CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG3'	27	44	59
M13R	5'GTAAAACGACGGCCAGTGAATT3'	22	45	58



شکل ۴. نمودار تصویری ناقل pGH215؛ اجزای این ناقل از ناحیه مرز راست به چپ شامل راه‌انداز پلی‌یوبی‌کوئیتین، ژن گزارش‌گر *gfp*، پایان‌دهنده نوپالین سنتاز، پایان‌دهنده 35S، نشانگر مقاومت به هیگرومایسین و پایان‌دهنده دو تایی 35S است

Figure 4. Schematic representation of pGH215; The vector components from right border to left border are composed of polyubiquitin promoter, *gfp* reporter gene, nopaline synthase terminator, 35S terminator, resistance gene to hygromycin and 2x 35S promoter, respectively



شکل ۵. نمودار تصویری ساخت سازه pGH215Hvorhegf؛ ابتدا ناقل های pUC57Hvorhegf و pBI121^{Gus-12} با آنزیم های *SacI* و *KpnI* هضم شده، کاست ژنی *Hvorhegf* در جایگاه هم سانه سازی چندگانه ناقل pBI121^{G-12} قرار گرفته و سازه pBI121^{G-12}Hvorhegf ساخته شد. سپس این ناقل و ناقل pGH215 با آنزیم های *KpnI* و *SalI* هضم شده و کاست ژنی مورد نظر جایگزین پیش بر یوبی کوئیتین و توالی ژن *gfp* شده و قبل از پایان دهنده NOS همسانه سازی شد. بدین ترتیب ناقل نهایی pGH215Hvorhegf دارای کاست ژنی *Hvorhegf* در مرز راست T-DNA، واجد نشانگر هیگرومایسین و بهینه سازی شده برای بیان بذر گیاه جو تحت کنترل پیش بر اختصاصی بذر دی هورڈئین و دارای توالی نشانه پپتیدی اندامک ذخیره ای پروتئین، ساخته شد

Figure 5. Schematic diagram of constructing pGH215Hvorhegf; The pUC57Hvorhegf and pBI121^{Gus-12} were first digested with *SacI* and *KpnI*, *Hvorhegf* gene cassette was cloned into multi cloning site, and pBI121^{G-12}Hvorhegf was constructed. This vector and pGH215 were then digested with *KpnI* and *SalI* and the cassette of interest was located instead of removed ubiquitin and *gfp*, behind the NOS terminator. Consequently, the final vector, pGH215Hvorhegf, with *Hvorhegf* gene, harboring hygromycin and located at the right border of T-DNA, was constructed. This construct, having signal peptide targeting protein storage organelles, was optimized to express in barley seeds under ubiquitin control

جدول ۲. توالی آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت ژن *Hvorhegf*Table 2. The sequences of *Hvorhegf* forward and reverse primers

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer Sequence	تعداد باز # nt	درصد GC %GC	دمای ذوب Tm
<i>Hvorhegf</i> F	5'TGTACATGCACACACCATCGT3'	21	48	59
<i>Hvorhegf</i> R	5'CCAGCAATGGCTAACAGACAC3'	21	52	57

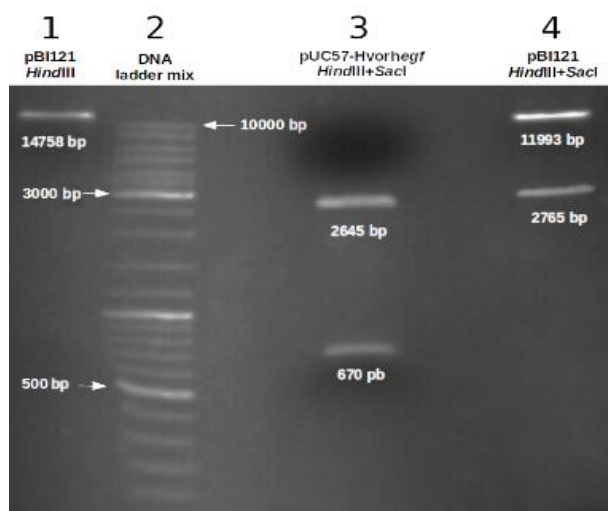
نتایج و بحث

همسانه‌سازی کاست ژنی *Hvorhegf* در ناقل pBI121 و مراحل تأیید آن: پس از طراحی سازه و ارسال توالی

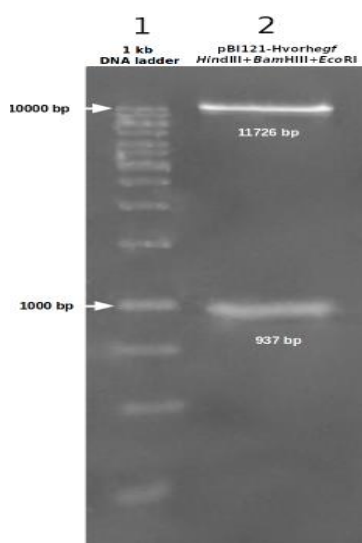
موردنظر برای سنتز، سازه مذکور در ناقل همسانه‌سازی pUC57 دریافت شد. توالی سنتزی شامل پیش‌بر اختصاصی بذری، توالی راهنمای پیتیدی اندامک ذخیره‌ای پروتئین و توالی بهینه شده ژن عامل رشد اپیدرمی از سانی برای بیان در بذری گیاه جو بود. تعیین توالی از دو جهت، درستی سنتز قطعه موردنظر را تأیید کرد (داده‌ها ارائه نشده است). همسانه‌سازی این سازه در ناقل بیانی pBI121 با هضم توسط آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* و جایگزینی سازه مذکور با پیش‌بر CaMV 35S و ژن *gus* در این ناقل صورت گرفت. بدین منظور هر دو ناقل همسانه‌سازی *pUC57Hvorhegf* و بیانی pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* هضم شدند و به ترتیب قطعات ۶۷۰ و ۲۶۴۵ و نیز ۱۱۹۹۳ و ۲۷۶۵ جفت‌بازی را ایجاد کردند (شکل ۶). با هضم این دو ناقل با آنزیم‌های ذکرشده، پیش‌بر CaMV 35S همراه با ژن *gus* (قطعه ۲۷۶۵ جفت‌بازی) از pBI121 و کاست ژنی *Hvorhegf* (قطعه ۶۷۰ جفت‌بازی) از ناقل *pUC57Hvorhegf* جدا شد. در مرحله بعد، قطعه سنتز شده شامل پیش‌بر دی‌هوردئین، توالی راهنمای پیتیدی و توالی رمزکننده بهینه شده عامل رشد اپیدرمی از سانی ۶۷۰ جفت‌بازی با واکنش اتصال، جایگزین قطعه ۲۷۶۵ جفت‌بازی در pBI121 شد. برای تأیید هم‌سانه‌سازی توسط الگوی هضم آنزیمی از ترکیب آنزیمی *HindIII + BamHI + EcoRI* استفاده شده و بعد از الکتروفورز محصولات هضم و مشاهده قطعات ۱۱۷۲۶ و ۹۳۷ جفت‌بازی درستی همسانه‌سازی تأیید شد (شکل ۷).

تأیید همسانه‌سازی در ناقل *pBI121Hvorhegf* توسط کلونی پی‌سی‌آر: برای تأیید همسانه‌سازی کاست ژنی

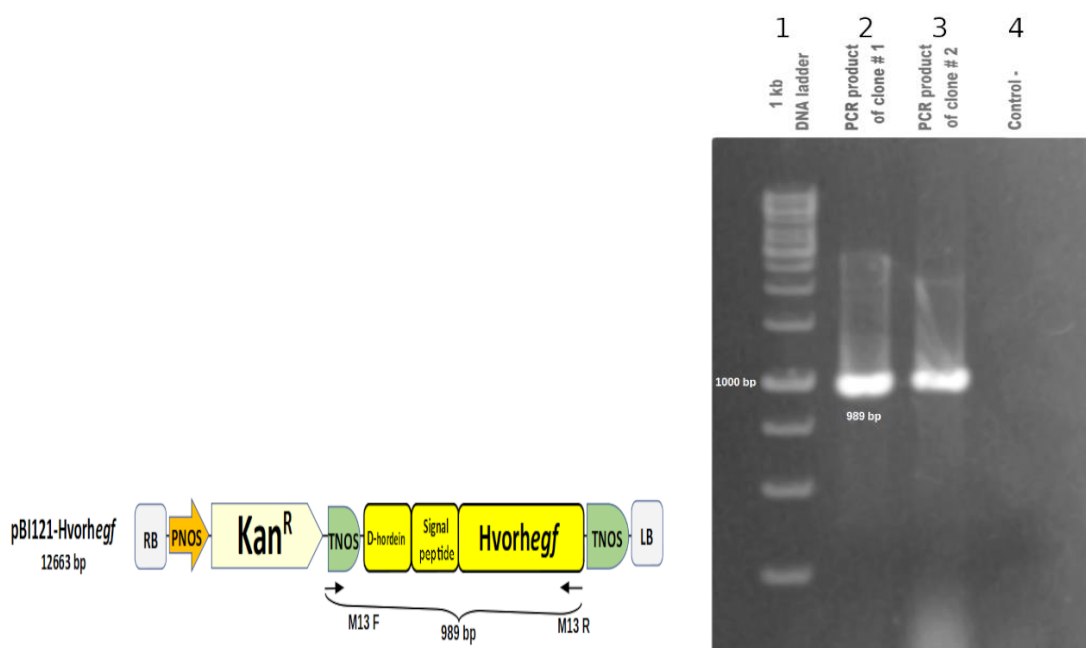
موردنظر، توسط PCR تکثیر آن با آغازگر M13 که توالی آن در دو طرف کاست قرار داشت صورت گرفته و با تکثیر ناحیه بین آغازگرهای M13، قطعه ۹۸۹ جفت‌بازی بروی ژل مشاهده شده و درستی همسانه‌سازی تأیید شد (شکل ۸). در شکل ۹ سازه ساخته شده *pBI121Hvorhegf* همراه با اجزای آن به تصویر کشیده شده است.



شکل ۶. قطعات حاصل از هضم آنزیمی با ناقل‌های pBI121 و pUC57Hvorhegf؛ ۱. هضم ناقل pBI121 با *HindIII* ۲. نشانگر وزن مولکولی Ladder Mix شرکت Thermo Fisher Scientific ۳. هضم *HindIII* با آنزیم‌های *HindIII* + *SacI* ۴. هضم pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* + *SacI*



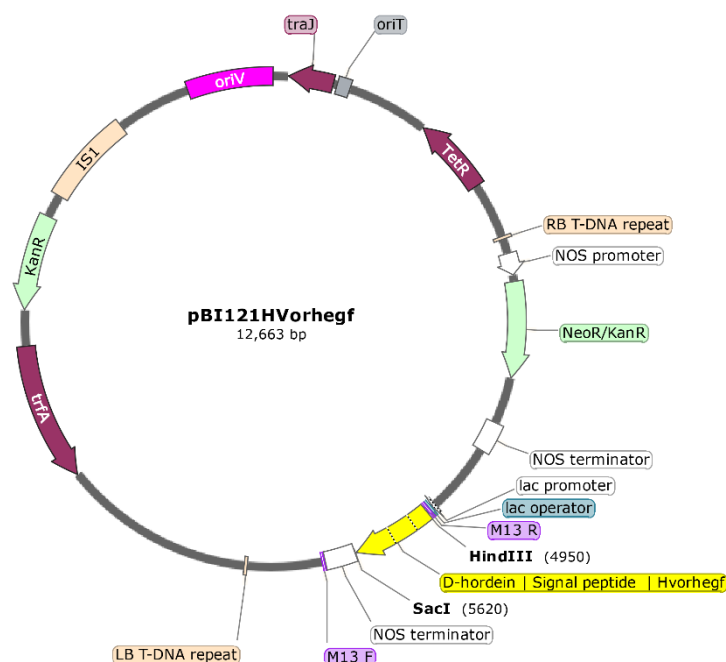
شکل ۷. تأیید درج کاست ژنی در ناقل BI121 با استفاده از الگوی هضم آنزیمی؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific ۲. هضم pBI121Hvorhegf با آنزیم‌های *HindIII* + *BamHI* + *EcoRI*



شکل ۸. تأیید همسانه سازی در ناقل *pBI121Hvorhegf* توسط کلونی پی سی آر؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific، ۲ و ۳ فرآورده ۹۸۹ جفت بازی تکثیر شده مورد انتظار توسط آغازگرهای M13 در کلون های نو ترکیب *pBI121Hvorhegf* ۴. کنترل منفی

Figure 8. Cloning confirmation in *pBI121Hvorhegf* vector by colony PCR; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, 2 and 3 Expected PCR products, 989bp, amplified by M13 primers in recombinant *pBI121Hvorhegf* clones 4. Negative control

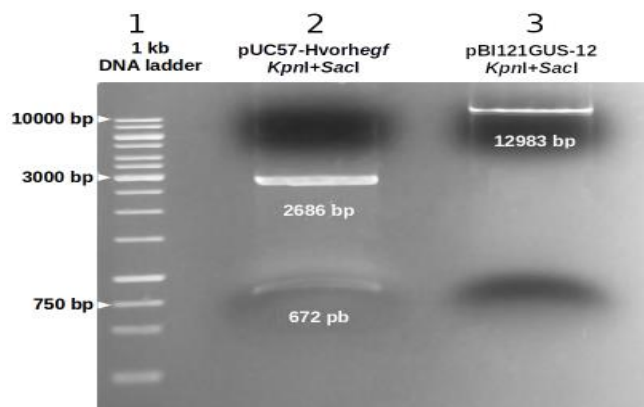
همسانه سازی کاست ژنی *Hvorhegf* در ناقل *pGH215* و مراحل تأیید آن: بعد از بررسی محل مناسب برای درج کاست ژنی مورد نظر در *pGH215*، گزینه حذف ژن *gfp* و پیش بر یوبی کوئیتین و جایگزینی آن ها با پیش بر و ژن بهینه سازی شده *hegf* در نظر گرفته شد. در ناقل دهنده *pUC57Hvorhegf* جایگاه شناسایی *SalI* قبل از *KpnI* در کاست قرار دارد در صورتی که برای همسانه سازی آن در *pUC57Hvorhegf* لازم است در پایین دست کاست ژنی باشد. بنابراین لازم بود از ناقل حدواسط استفاده شده و قبل از همسانه سازی نهایی، توالی *SalI* به انتهای کاست ژنی مورد نظر اضافه شود. بدین منظور از ناقل حدواسط *pBI121^{Gus-12}* استفاده شد. با همسانه سازی قطعه سنتزی در این ناقل، جایگاه شناسایی *SalI* در انتهای آن افزوده می شد.



شکل ۹. نمودار تصویری سازه *pBI121Hvorhegf*; این سازه از ناحیه مرز راست به چپ به ترتیب شامل راه انداز نوپالین سنتاز، ژن *nptII* پایان دهنده نوپالین سنتاز، راه انداز دی هورددین، پپتید نشانه ژن *hegf* و پایان دهنده نوپالین سنتاز است

Figure 9. Schematic diagram of *pBI121Hvorhegf* vector; The components of the construct from the right border to the left border are composed of nopaline synthase promoter, *nptII* gene, nopaline synthase terminator, D-hordein promoter, signal peptide, *hegf* gene, and nopaline synthase terminator, respectively

هم مسانه سازی کا ست ژنی مورد نظر در ناقل حدوا سبط $pBI121^{Gus-12}$ برای هم مسانه سازی قطعه در ناقل حدوا سبط، ناقل های *pUC57Hvorhegf* و $pBI121^{Gus-12}$ با آنزیم های *KpnI* و *SacI* هضم و پس از جدا سازی قطعات حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد، قطعه ۶۷۲ از ناقل *pUC57Hvorhegf* جدا و در بدنه ناقل $pBI121^{Gus-12}$ هم مسانه سازی شد (شکل ۱۰). در نتیجه هضم این دو ناقل، دو قطعه ۶۷۲ و ۲۶۸۶ جفت بازی در ناقل *pUC57Hvorhegf* و دو قطعه ۱۲۹۸۳ و ۲۱ جفت بازی در ناقل $pBI121^{Gus-12}$ ایجاد می شود که قطعه کوچک تر بر روی ژل قابل مشاهده نخواهد بود. جهت تأیید هم مسانه سازی تو سبط کلونی پی سی آر از آغازگرهای رفت و برگشت M13 که در دو طرف کا ست ترانس ژن قرار گرفته بودند استفاده و تولید قطعه ۱۸۹۱ جفت بازی در سٹی هم مسانه سازی را تأیید کرد (شکل ۱۱). هم چنین هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های *KpnI* و *SalI* و تولید قطعه های ۶۸۲ و ۱۲۸۸۳ جفت بازی در سٹی هم مسانه سازی را بر اساس الگوی هضم آنزیمی تأیید کرد (شکل ۱۲).

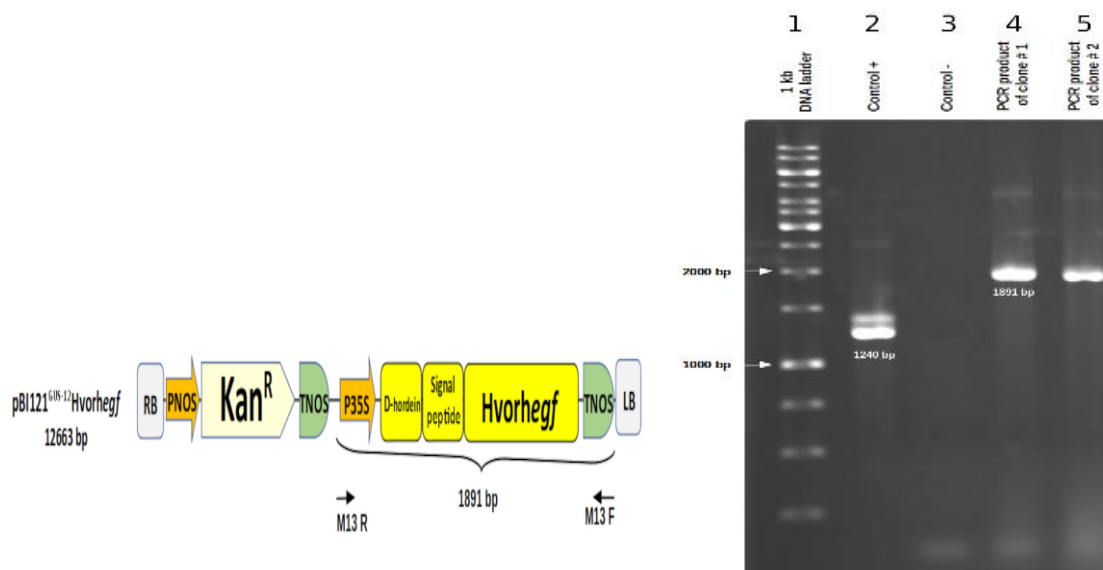


شکل ۱۰. محصولات هضم ناقل‌های pUC57Hvorhegf و pBI121^{Gus-12} بر روی ژل آگارز یک درصد؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific. ۲. فرآورده‌های حاصل از هضم ناقل‌های pUC57Hvorhegf با آنزیم‌های *KpnI* و *SacI*. ۳. فرآورده‌های حاصل از هضم ناقل‌های pBI121^{Gus-12} با آنزیم‌های *KpnI* و *SacI*

Figure 10. Digestion products of pUC57Hvorhegf and pBI121^{Gus-12} on 1% agarose gel; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 2. Digestion products of pUC57Hvorhegf with *KpnI* and *SacI* 3. Digestion products of pBI121^{Gus-12} with *KpnI* and *SacI*

هم‌سانه‌سازی ژن *Hvorhegf* در ناقل نهایی pGH215 و مراحل تأیید آن: هنگامی که ناقل‌های pGH215 و ناقل حدواسط دارای قطعه سنتزی با آنزیم‌های *KpnI* و *SalI* هضم شدند به ترتیب قطعه‌های ۱۰۰۱۳ و ۲۳۶۷ جفت‌بازی در ناقل اول و ۱۲۸۸۳ و ۶۸۲ جفت‌بازی در ناقل دوم تولید شده (شکل ۱۲) و بعد از جداسازی و خالص‌سازی، قطعه ۶۸۲ جفت‌بازی حاصل از هضم ناقل حدواسط که قطعه سنتزی موردنظر بوده و جایگاه آنزیم *SalI* به پایین دست آن اضافه شده بود، در قطعه ۱۰۰۱۳ جفت‌بازی از ناقل pGH215 هم‌سانه‌سازی شد.

تأیید هم‌سانه‌سازی توالی ژنی در ناقل pGH215Hvorhegf توسط الگوی هضم آنزیمی: برای تأیید هم‌سانه‌سازی توسط الگوی هضم، از آنزیم‌های *SmaI*، *EcoRI*، *XbaI* + *KpnI*، *XbaI* + *BsrGI* (شکل ۱۳) استفاده شده و الگوی هضم آنزیمی درستی هم‌سانه‌سازی را تأیید کرد. ترکیب آنزیمی *XbaI* + *BsrGI* بعد از برش ناقل، دو قطعه با اندازه‌های ۸۱۴۸ و ۲۵۵۵ جفت‌بازی، *XbaI* + *KpnI* دو قطعه ۷۵۷۴ و ۳۱۲۹ جفت‌بازی و *SmaI* قطعه‌های ۹۸۶۹ و ۸۳۴ جفت‌بازی و در نهایت *EcoRI* نیز قطعه‌های ۹۶۲۰ و ۱۰۸۳ جفت‌بازی را ایجاد کردند. تمامی قطعه‌های تولیدی مطابق با پیش‌بینی قبلی در صورت درستی عمل هم‌سانه‌سازی بود.

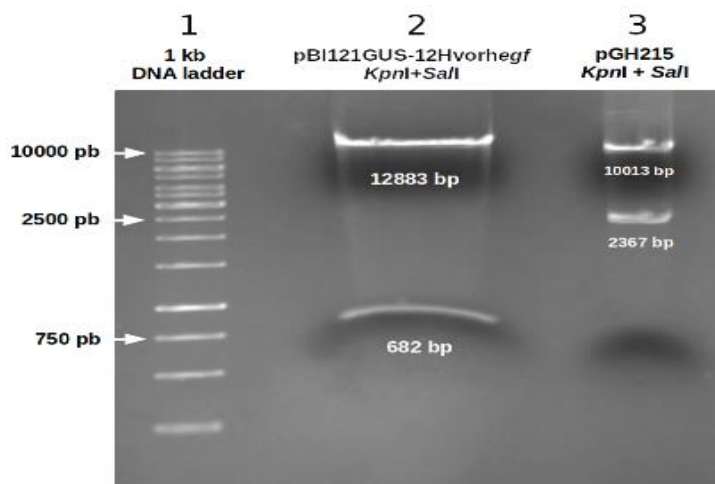


شکل ۱۱. تأیید قطعه سنتزی در ناقل حدوا سطر $pBI121^{Gus-12}$ تو سطر کلونی پی سی آر؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific ۲. $pBI121^{G-12}$ به عنوان کنترل مثبت ۳. کنترل منفی، ۴ و ۵ کلونی های دریافت کننده محصول واکنش الحاق. همان طور که مشاهده می شود باند مورد نظر که دقیقاً به اندازه ۶۵۱ نوکلئوتید بیش تر از باند ناقل خالی هست، بر روی ژل مشاهده شده است

اجزای سازه از ناحیه مرز راست به چپ به ترتیب شامل پیش بر نوپالین سنتاز، ژن *nptII* پایان دهنده نوپالین سنتاز، پیش بر دی هوردهین، پپتید نشانه، ژن *hegf* و پایان دهنده نوپالین سنتاز است

Figure 11. Confirming the insertion of the synthetic fragment in the $pBI121^{Gus-12}$ intermediate vector by colony PCR; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 2. $pBI121^{G-12}$ as control positive 3. Control negative 4 and 5 Recombinant colonies received the ligation reaction products. As can be seen, the band of interest is precisely 651 nucleotides larger than the empty vector

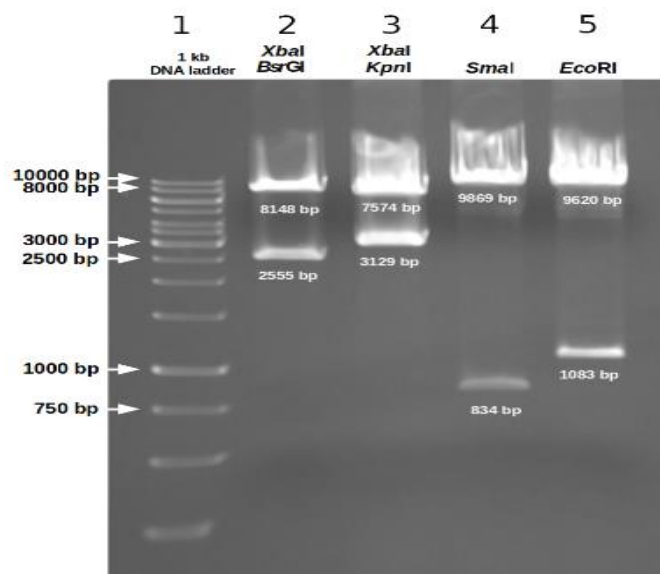
The components of the construct from right border to left border are composed of nopaline synthase promoter, *nptII* gene, nopaline synthase terminator, D-hordein promoter, signal peptide, *hegf* gene, and nopaline synthase terminator, respectively



شکل ۱۲. محصولات هضم ناقل‌های pGH215 و pBI121^{G-12}Hvorhegf؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific ۲. هضم ناقل pGH215 با آنزیم‌های *KpnI* و *SalI* ۳. هضم ناقل pBI121^{G-12}Hvorhegf با آنزیم‌های *KpnI* و *SalI*

Figure 12. Digestion products of pGH215 and pBI121^{G-12}Hvorhegf vectors; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 2. Digestion of pGH215 with *KpnI* and *SalI* 3. Digestion of pBI121^{G-12}-Hvorhegf with *KpnI* and *SalI*

تأیید هم‌سانه‌سازی در ناقل pGH215Hvorhegf توسط کلونی پی‌سی‌آر: جهت تأیید هم‌سانه‌سازی توسط کلونی پی‌سی‌آر از آغازگرهای اختصاصی خود کاست ژنی (Hvorgef F, R) استفاده شده و تولید قطعه ۵۳۴ جفت‌بازی درستی هم‌سانه‌سازی را دوباره تأیید کرد (شکل ۱۴). در شکل ۱۵ ساختار سازه pGH215Hvorhegf به تصویر کشیده شده است. در این مطالعه، هم‌سانه‌سازی ژن بهینه شده عامل رشد اپیدرمی انسانی تحت کنترل پیش‌براخته‌سازی بذر دی‌هوردئین و توالی راهنمای پپتیدی اندامک ذخیره‌ای پروتئین در ناقل pBI121 با نشانگر کانامایسین و بعد از آن pGH215 با نشانگر هیگرومایسین انجام گرفت. ناقل‌های دوتایی ابزارهای استاندارد برای انتقال ژن در گیاهان عالی به‌واسطه *Agrobacterium tumefaciens* هستند. این ناقل‌ها مشتمل بر نواحی راست و چپ T-DNA، جایگاه‌های هم‌سانه‌سازی چندگانه، نواحی شروع همانندسازی برای *E. coli* و *Agrobacterium tumefaciens*، ژن‌های مقاومت به نشانگرهای گزینشی، ژن‌های نشانگر غربالگری و سایر عناصر الحاقی هستند که کارآمدی آن‌ها را برای تراریختی افزایش می‌دهد (Komari et al. 2006). ناقل‌های دوتایی که به صورت وسیعی برای تراریختی گیاهان استفاده می‌شوند از نظر اندازه، ناحیه شروع همانندسازی، نشانگرهای گزینشی باکتریایی و یوکاریوتی، مرزهای T-DNA و ساختار کلی، باهم متفاوت هستند (Sahoo et al. 2014).

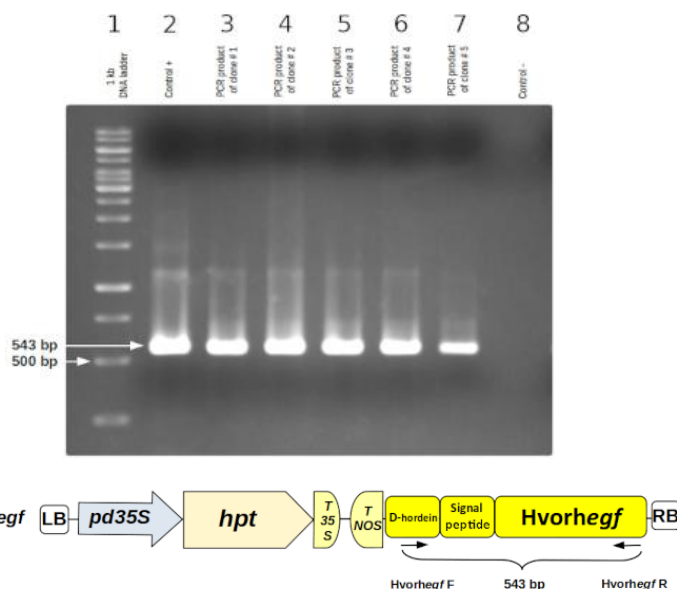


شکل ۱۳. تائید همسانه سازی کاست ژنی در ناقل *pGH215Hvorhegf* با بررسی الگوی هضم آنزیمی؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific ۲. هضم ناقل *pGH215Hvorhegf* با آنزیم های *XbaI + BsrGI* ۳. هضم ناقل *pBI121^{G-12}Hvorhegf* با آنزیم های *KpnI+XbaI* ۴. هضم ناقل *pBI121^{G-12}Hvorhegf* با آنزیم *SmaI* ۵. هضم ناقل *pBI121^{G-12}Hvorhegf* با آنزیم *EcoRI*

Figure 13. Confirmation of gene cassette insertion in *pGH215Hvorhegf* vector with digestion pattern; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 2. Digestion of *pGH215Hvorhegf* vector with *XbaI + BsrGI* 3. Digestion of *pBI121^{G-12}Hvorhegf* vector with *KpnI+XbaI* 4. Digestion of *pBI121^{G-12}Hvorhegf* vector with *SmaI* 5. Digestion of *pBI121^{G-12}Hvorhegf* with *EcoRI*

دلیل اینکه نزدیک به ۴۰ درصد پروژیه های تراریختی به واسطه /*تومه فاشینیس* از مشتقات ناقل دوتایی *pBin19* مانند *pBI121* استفاده کرده اند می تواند استفاده وسیع از این ناقل ها در پروژیه های ابتدایی انتقال ژن به گیاهان باشد که انباشت داده های تراریختی، منجر به ایجاد اعتماد زیاد به این ناقل ها شده بود. دلیل احتمالی دیگر جایگزینی یک مرحله ای ژن *gus* با ژنی دیگر در *pBI121* است (Komari et al. 2006; Low et al. 2018). ناقل نسبتاً قدیمی *pBI121* از زمان معرفی، کاربرد گسترده ای پیدا کرده است اما ضعف آن در انتقال ژن به برخی گیاهان، به ویژه تک لپه ای ها وجود داشته و لزوم جایگزینی آن در موارد متعددی منطقی به نظر می رسد. این ناقل ۱۴/۸ کیلوبازی برای همسانه سازی تا حدودی بزرگ است چرا که برای انتقال توالی های بزرگ تر لازم است که خود ناقل پلاسمیدی به اندازه کافی کوچک باشد تا توانایی حمل آن ها را داشته باشد (Sahoo et al. 2014). از سویی دیگر ناحیه T-DNA آن ۶/۱۹۳ کیلوبازی بوده و نشانگر گزینشی آن، کاناماسین، در مرز راست این ناحیه قرار گرفته است. این موضوع عیب مهم دیگری محسوب می شود زیرا در فرآیند انتقال ژن مرز راست T-DNA اولین جایی است که وارد سلول گیاهی شده و احتمال تخریب آن کم تر است. مرز راست مکانی است که باید توالی های هدف، مانند صفات ارزشمند تجاری،

مقاومت به بیماری‌ها و غیره در آن همسانه شوند تا در اثر عملکرد تخریبی آسیب نبیند و در صورت قرار گرفتن کاست ژن گزینش‌گر در مرز چپ در صورت ایجاد صفت مقاومت، به احتمال زیاد کاست ژن موردنظر نیز به گیاه منتقل خواهد شد. از سویی دیگر کمبود جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی معمول مشکل عمومی بیش‌تر ناقل‌های پلاسمیدی ویژه تک‌په‌ای است (Himmelbach et al. 2007).

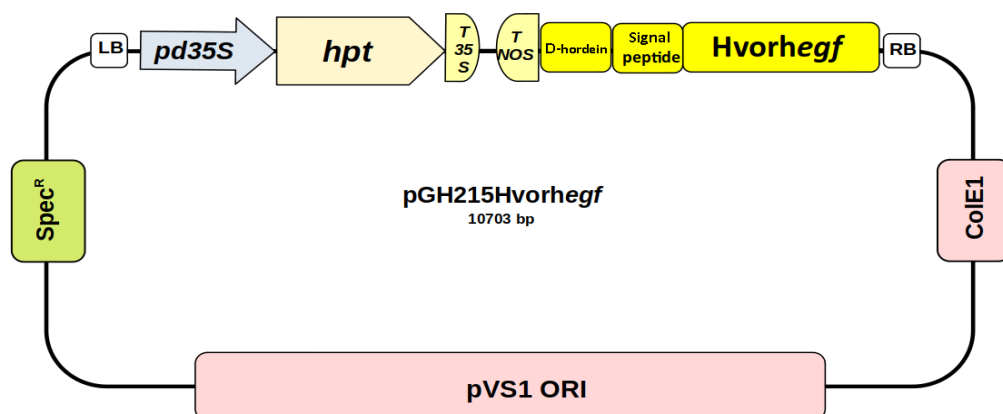


شکل ۱۴. تأیید همسانه‌سازی در ناقل pGH215Hvorhegf توسط کلونی بی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی کاست ژنی؛ ۱. نشانگر وزن مولکولی 1kb شرکت Thermo Fisher Scientific. ۲. کنترل مثبت pBI121Hvorhegf و ۳ تا ۷ فرآورده‌های حاصل از تکثیر PCR در کلون‌های نوترکیب ۸. کنترل منفی

Figure 14. Confirmation of insertion of pGH215Hvorhegf vector by colony PCR with specific primers; 1. 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 2. Positive control, pBI121Hvorhegf, 3 to 7 PCR amplification products in recombinant clones 8. Negative control

نبود جایگاه‌های همسانه‌سازی چندگانه قبل از پیش‌بر NOS ژن مقاومت به کانامایسین به نظر می‌رسد ضعف دیگر ناقل pBI121 باشد چرا که در صورت نیاز به تعویض نشانگر گزینشی و استفاده از ژن مقاومت به نشانگری قوی‌تر مانند هیگرومایسین، پژوهش‌گر با مشکل جدی در برداشتن ژن کانامایسین و جایگزینی آن با ژن دیگر مواجه خواهد شد. کاستی دیگر، ناحیه شروع همانندسازی است. ناقل pBI121 نسخه تکثیری کمی (حدود ۵ نسخه در *E. coli* و *تومه‌فائیسینس*) داشته و کار همسانه‌سازی را دشوار می‌سازد. هنگام همسانه‌سازی و انجام واکنش هضم آنزیمی، داشتن کمیت قابل قبولی از DNA ضروری است تا قطعه بریده‌شده به‌وضوح در ژل دیده شده، قابل برداشت بوده (به‌خصوص زمانی که اندازه توالی درج، کوچک باشد) و امکان استفاده از آن در واکنش اتصال وجود داشته باشد. پایین بودن تعداد نسخه‌های تکثیری این ناقل سبب می‌شود گاهی واکنش هضم بارها برای رسیدن به کمیت مطلوب

DNA تکرار شده و انرژی و زمان پژوهشگر و مواد مصرفی به هدر رود. اگرچه اکنون ناقل‌های پیشرفته متعددی روانه بازار شده است ولی این ناقل دوتایی هنوز هم برای انتقال ژن در گیاهان با ارزش محسوب می‌شود. استفاده از ناقل‌های پلاسمیدی که نسخه تکثیری بالایی دارند برای همسانه‌سازی قطعات بزرگ‌تر از ۱۵ کیلوباز گاهی منجر به دردهایمانند نوتریبی DNA می‌شود که در این موارد خاص استفاده از ناقل‌های پلاسمیدی IncP مانند pBI121 که نسخه تکثیری پایینی دارند مزیت محسوب می‌گردد (Komari et al. 2006).



شکل ۱۵. ساختار سازه pGH215Hvorhegf؛ این سازه از ناحیه مرز راست به چپ دارای ژن *hegf*، پپتید نشانه، راه‌انداز دی‌هوردئین و پایان‌دهنده نوپالین سنتاز است که بعد از آن کاست بیانی مقاومت به هیگرومایسین با راه‌انداز دوتایی 35S و پایان‌دهنده 35S قرار گرفته است

Figure 15. The pGH215Hvorhegf construction structure; This construct from right border to the border is composed of *hegf* gene, signal peptide, D-hordein promoter, and nopaline synthase terminator followed by the hygromycin resistance expression cassette with double 35S promoter and 35S terminator

ناقل دوتایی pGH215 با داشتن جایگاه‌های برشی *SfiI* در دو سوی ژن *gfp*، مناسب برای درج کاست‌های بیانی موردنظر است. این جایگاه‌های برشی برای انتقال کاست بیانی به ناقل‌های سازگار دیگر در صورت مفید بودن استفاده از نشانگر گزینشی متفاوت می‌توانند به کار روند. جایگاه *HindIII* قطعه منحصربه‌فردی را برای دورگه‌سازی ژل بلات DNA فراهم می‌سازد. این ناقل دارای پیش‌بر قدرتمند یوبی کوئیتین اینترون‌دار ذرت برای ژن *gfp* بوده و کاست ژنی آن در ناحیه مرز راست T-DNA قرار گرفته است. برخلاف ناقل pBI121 که در آن کاست ژنی نشانگر کانامایسین در مرز راست و کاست ژنی *gus* در مرز چپ T-DNA قرار گرفته و در صورت همسانه‌سازی، کاست ژنی موردنظر جایگزین کاست ژنی *gus* در مرز چپی می‌شود که ناحیه نامناسبی برای درج ترانس‌ژن است، در ناقل pGH215 می‌توان کاست ژنی موردنظر مانند یک ژن تجاری مهم را جایگزین

کا ست *gfp* در مرز را ست T-DNA کرد. از طرف دیگر قرارگیری کا ست ژنی مقاومت به هیگرومایسین در مرز چپ مهم بوده و تعداد گیاهان تراریخته مثبت کاذب، کاهش چشمگیری پیدا می‌کند. مزیت دیگر این ناقل داشتن ناحیه شروع همانندسازی با نسخه تکثیری بالا در *E. coli*، *ColE1*، است. همچنین ناقل pGH215 از داشتن ناحیه شروع همانندسازی با دامنه میزبانی وسیع از *Pseudomonas aeruginosa* سود می‌برد (Marthe et al. 2015). این رپلیکون دارای پایداری بالایی در آگروباکتروبیوم حتی در شرایط غیرگزینشی بوده و پژوهش‌گر را از پایداری جمعیت مؤثری از باکتری‌های شایسته تراریختی، هنگام هم‌کشتی (Co-cultivation) با سلول‌های گیاه هدف مطمئن می‌سازد. این ویژگی در تراریختی میزبان‌های نامتعارف آگروباکتروبیوم مانند غلات بسیار مهم بوده و وجود این رپلیکون پایدار باعث از دست نرفتن پلاسمید به روش‌های مختلف در هنگام تکثیر می‌گردد. سایر اجزای مهم این ناقل علاوه بر پیش‌بر یوبی کوئیتین ذرت، وجود پیش‌بر 2×35S بهبود یافته و پیش‌بر اکتین برنج است. همچنین پیش‌بر ژن گلوکاتایون اس ترانسفراز گندم، امکان بیان پایدار ترانس‌ژن‌های محدود به اپیدرم برگ را می‌دهد (Himmelbach et al. 2007). مزیت بسیار مهم دیگر این ناقل وجود هیگرومایسین برای تراریختی غلات است. پیش‌برهای محبوب برای غلات، 35S، یوبی کوئیتین ذرت و اکتین برنج هستند؛ نوع پیش‌بر نشانگر، کارایی تراریختی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مثلاً در غلات پیش‌بر یوبی کوئیتین نرخ تراریختی به‌مراتب بالاتری از 35S می‌دهد (Komari et al. 2006). نشانگرهای گزینشی که در تراریختی غلات استفاده گسترده‌ای دارند، ژن‌های رمزکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، هیگرومایسین و علف‌کش فسفینوتریپ سین هستند (Shrawat and Lörz 2006). هیگرومایسین در تراریختی ذرت به‌عنوان نشانگر تک‌لپه‌ای‌ها که نشانگر بسیار مؤثرتری از کانامایسین است هم در انتقال ژن به واسطه آگروباکتروبیوم و هم تفنگ ژنی مورد استفاده قرار گرفته است و در مهار رشد و تکثیر سلولی در ذرت از کانامایسین بهتر عمل کرده است (Ji et al. 2013). برای محدود کردن تراریختی به تک‌لپه‌ای‌ها، اینترون ۱ ژن (Shrunken 1, Sh 1) ذرت سبب شد که بیان فقط محدود به این گیاهان شود. همچنین این آزمایش‌ها نشان داد که الحاق توالی‌های تنظیمی خاص به نشانگرهای گزینشی برای بیشینه کردن کارایی تراریختی در برخی گیاهان بسیار مهم هستند (Miki and McHugh 2004). دو ژن نشانگر گزینشی که تا به امروز در تراریختی جو موفق عمل کرده‌اند ژن‌های *bar* و *hpt* هستند. اگرچه ژن *bar* به‌آسانی می‌تواند با اسپری کردن بروی برگ‌های گیاهان نسل‌های بعد ردیابی شود اما کارایی پایین در گزینش کالوس‌های بزرگ، ضعف اصلی آن است (Ishida et al. 2015).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، سازه *Hvorhegf* تحت کنترل پیش‌بر دی‌هوردئین که اختصاصی بذراست به همراه توالی راهنمای پپتیدی اندامک ذخیره‌ای بذر در ناقل معمولی pBI121 با نشانگر گزینشی کانامایسین ساخته شد. همچنین ناقل pGH215 با نشانگر گزینشی هیگرومایسین نیز برای بیان پروتئین نوترکیب عامل رشد اپیدرمی ازسانی در مقیاس زیاد در بذور گیاه جو تولید شد. با ساخت ناقل اخیر، ناقلی مناسب برای تراریختی تک‌لپه‌ای‌ها با نشانگر هیگرومایسین نیز معرفی شد که می‌تواند کارایی بالاتری برای گزینش و تراریختی تک‌لپه‌ای‌ها داشته و با جایگزینی ژن موردنظر سایر پژوهش‌گران به جای ژن *Hvorhegf*، قابلیت استفاده در پروژه‌های انتقال ژن و بیان پروتئین نوترکیب در غلات به‌خصوص گیاه جو را دارد.

سپا سگزاری: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای تأمین بخشی از هزینه‌های این پژوهش و آقای دکتر گوتز هنسل از موسسه IPK آلمان برای در اختیار قرار دادن ناقل pGH215 تشکر می‌شود.

منابع

- احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۱)۱۱، ۱۵۰-۱۳۵.
- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده ک شکوئی‌ه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۶، ۵۰-۳۵.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده ک شکوئی‌ه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان (۴)۴، ۱۱۹-۱۳۲.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۱)۱۲، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۱۲، ۱۶۷-۱۸۱.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PC. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۳) ۱۰، ۱۱۱-۱۲۲.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Aragão FJL, Brasileiro ACM (2002) Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. *Braz J Plant Physiol* 14, 01-10.
- Basaran P, Rodríguez-Cerezo E (2008) Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol* 28, 153-172.

- Bibi N, Fan K, Yuan S, et al. (2013) An efficient and highly reproducible approach for the selection of upland transgenic cotton produced by pollen tube pathway method. *Aust J Crop Sci* 7, 1714–1722.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol* 11, 287–293.
- Dafny-Yelin M, Tzfira T (2007) Delivery of multiple transgenes to plant cells. *Plant Physiol* 145, 1118–1128.
- Goedeke S, Hensel G, Kapusi E, et al. (2007) Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. *Transgenic Plant J* 1, 104–117.
- Himmelbach A, Zierold U, Hensel G, et al. (2007) A set of modular binary vectors for transformation of cereals. *Plant Physiol* 145, 1192–1200.
- Huang TK, McDonald KA (2012) Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnol Adv* 30, 398–409.
- Ishida Y, Tsunashima M, Hiei Y, Komari T (2015) Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. In: *Agrobacterium protocols*. Springer, 189–198.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh Kashkoueieh A, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Ruminant Research* 4 (4), 119-132.
- Ji Q, Xu X, Wang K (2013) Genetic transformation of major cereal crops. *Int J Dev Biol* 57, 495–508.
- Komari T, Takakura Y, Ueki J, et al. (2006) Binary vectors and super-binary vectors. *Agrobacterium protocols*, 15–42.
- Kumlehn J, Hensel G (2009) Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breed Sci* 59, 553–560.
- Low LY, Yang SK, Andrew Kok D, et al. (2018) Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method. *New visions in plant science*. Intech Open London, 41–61.
- Marthe C, Kumlehn J, Hensel G (2015) Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using immature embryos. In: *Agrobacterium Protocols* Springer, 71–83.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107, 193–232.

- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (in Persian).
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* 29, 210–222.
- Patel TB, Bertics PJ (2006) *Epidermal growth factor: methods and protocols*. Springer Science & Business Media.
- Sahoo DK, Dey N, Maiti IB (2014) pSiM24 is a novel versatile gene expression vector for transient assays as well as stable expression of foreign genes in plants. *PLoS One* 9, e98988.
- Sambrook J, Russell DW (2006) Fragmentation of DNA by sonication. *Cold spring harbor protocols* 2006, pdb-prot4538.
- Sharma K, Babu PC, Sasidhar P, et al. (2008) Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 60, 7–14.
- Shrawat AK, Lörz H (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J* 4, 575–603.
- Tohidinejad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50.
- Tzfira T, Kozlovsky SV, Citovsky V (2007) Advanced expression vector systems: new weapons for plant research and biotechnology, 1087-1089.
- Zeng F, Harris RC (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. In: Elsevier, 2–11.