

انتقال ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS*) به کلروپلاست کاهوی (*Lactuca sativa*) ایرانی

Transformation of *beta*-glucuronidase gene to plastid of lettuce Iranian variety (*Lactuca sativa*. L)

اسماعیل قاسمی^۱، حسین هنری^۲، منصور امید^۳، علی اکبر شاه نجات بوشهری^۴، مختار جلالی جواران^۵، هوشنگ علیزاده^{۶*}

۱، ۳، ۴- دانشجوی دکتری، استادان، استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- کرج

۲- استادیار دانشگاه امام حسین

۵- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

Ghasemi E¹, Honari H², Omidi M³, Shahnejat Bushehri AA⁴, Jalali M⁵, Alizadeh H^{*6}

1,3,4,6. PhD Student, Professors and Assistant Professor, University College of Agricultural & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Karaj

2. Assistant professor, Imam Hoseyn University, Tehran

5. Associate Professor, Agricultural College, University of Tarbiat Modarres, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان دارای مزایای زیادی مانند بیان بالای ژن خارجی و عدم آلودگی زیست محیطی می‌باشد. با توجه به توالی‌یابی ژنوم پلاستید کاهو می‌توان از قطعات همولوگ زیادی برای طراحی یک ناقل مختص گونه استفاده کرد. ما در این تحقیق از قطعات همولوگ *accD* و *rbcL* (برگرفته از ژنوم کلروپلاست کاهو)، راه-انداز *prn*، خاتمه دهنده *psbA* و کاست ژنی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و اسپکتینومایسین برای ساخت یک ناقل مختص گونه استفاده نمودیم و پس از توالی‌یابی، ناقل ساخته شده به نام pCL96-39 (پلاسمید کلروپلاستی (*Lactuca sativa*) رقم TN-96-39 ایرانی) نامگذاری شد. جهت بهینه‌سازی انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی ژن بتاگلوکورونیداز (۱۸۰۰ جفت باز) پس از همسانه‌سازی در ناقل pCL96-39 با استفاده از تفنگ-ژنی به کلروپلاست گیاه کاهو منتقل شد. وجود ژن بتاگلوکورونیداز در ژنوم پلاستید با استفاده از PCR تایید شد و جهت تایید بیان ژن، آزمون هیستوشیمیایی بتاگلوکورونیداز (*GUS*) بر روی کالوس‌ها و ساقه‌های تراریخته انجام شد. تولید پروتئین بتاگلوکورونیداز در گیاهان تراریخته به وسیله روش الکتروفورز SDS-PAGE نیز تایید شد. نتایج این پژوهش می‌تواند راه را برای تولید وسیع پروتئین‌های پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌های نو ترکیب در گیاه کاهوی ایرانی هموار کند.

واژه‌های کلیدی

پلاستید،
تفنگ ژنی،
ژن بتاگلوکورونیداز،
کاهوی ایرانی،
ناقل

مقدمه

گیاهان می‌توانند جانشینی ارزشمند برای کشت سلولی پستانداران و همچنین سیستم‌های تخمیری میکروبی در تولید تجاری داروهای پروتئینی باشند. استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌های مفید و با ارزش دارای مزایای بسیار زیادی می‌باشد، به عنوان مثال هزینه تولید پروتئین‌های دارویی و مفید در گیاهان نسبت به سایر سیستم‌ها بسیار کمتر می‌باشد، گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا می‌باشند و امکان کاشت آنها در مقیاس وسیع وجود دارد (Koya 2005). از سوی دیگر تولید پروتئین‌های مفید در کلروپلاست گیاهان نسبت به تولید آنها در هسته دارای مزایای بیشتری هم می‌باشد. از مزایای تولید پروتئین‌های با ارزش در کلروپلاست گیاهان می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

کاهش خطر دگرگرفته‌افشانی گیاهان تراریخته با گیاهان غیرتراریخته و گیاهان وحشی خویشاوند به دلیل ویژگی توارث مادری ژنوم کلروپلاست (Daniell 2002; Ruiz 2005)، امکان تولید پروتئین‌های خارجی در سطح بالا در پلاستیدها به واسطه وجود بیش از ۱۰۰۰۰ نسخه از ژنوم پلاستییدی در هر سلول گیاهی (De Cosa 2001). ژنوم‌های پلاستییدی به میزان زیادی پلی‌پلوئید می‌باشند و هر پلاستید می‌تواند به طور متوسط ۱۰ تا ۱۰۰ نسخه ژنومی داشته باشد. از سوی دیگر تعداد پلاستیدهای هر سلول هم به‌طور قابل‌توجهی با هم متفاوت می‌باشد، به‌عنوان مثال سلول‌هایی که به‌طور اختصاصی مسئول انجام فتوسنتز می‌باشند، می‌توانند تا صد کلروپلاست داشته باشند. تراریختی پایدار نیازمند انتقال ژن به ژنوم همه کلروپلاست‌ها می‌باشد و کلروپلاست‌های غیرتراریخته باید به‌وسیله انتخاب حذف شوند (Molina 2004)، در گیاهان پلاستید-تراریخته^۱، ژن خارجی در مکان مشخصی از ژنوم پلاستید الحاق می‌گردد. این امر از ایجاد اثرات حاشیه‌ای جلوگیری می‌کند (Daniell 2005)، بنابراین به نظر می‌رسد پدیده سکوت ژنی تاکنون در گیاهان پلاستید-تراریخته مشاهده نشده است (Dhingra 2004)، کلروپلاست مانند سایر پروکاریوت‌ها قادر است پلی‌سیسترون‌ها را بدون پردازش در یک مرحله ترجمه نماید، این امر امکان تولید هم-

زمان چندین پروتئین را در یک مرحله تراریختی فراهم می‌آورد (Quesada-Vargas 2005)، بعضی از تغییرات پس از ترجمه‌ای مانند تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و تاخوردگی‌های صحیح در کلروپلاست‌ها انجام می‌شود (Staub 2000). کلروپلاست‌ها توانایی انجام گلیکوزیلاسیون ندارند بنابراین امکان تولید پروتئین‌های دارویی غیرگلیکوزیده در پلاستید وجود دارد (Dheeraj 2008).

انتقال ژن به پلاستیدها برای اولین بار در جلبک سبز *Chlamydomonas* گزارش شد (Boynton 1988) و سپس این فناوری به سایر گیاهان عالی مانند توتون (Svab 1993) نیز گسترش پیدا کرد. ولی به علت غلظت بالای نیکوتین و سایر آلکالوئیدهای سمی در گیاه توتون تولید پروتئین‌های دارویی در این گیاه همواره با مشکل روبرو بوده است (Kanamoto 2005). انتقال ژن به پلاستید گیاهانی مانند سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و اطلسی نیز به‌وسیله ناقل مورد استفاده برای گیاه توتون انجام شد. ولی میزان تولید پروتئین خارجی در این گیاهان به دلیل عدم همولوژی کامل نواحی هدف با ژنوم پلاستید گیاهان مذکور بسیار کمتر از توتون بود و در برخی از گیاهان مشکلاتی مانند عقیمی نیز رخ داد (Kanamoto 2005). انتقال ژن به پلاستید گیاه *Arabidopsis thaliana* توسط Sikdar et al. (1998) انجام شد ولی میزان تراریختی بسیار پائین بود و گیاهان تراریخته عقیم بودند (Sikdar 1998). (Skarjinskaia et al. 2003) موفق شدند با استفاده از یک ناقل شیمریک ساخته شده از ناقل پلاستییدی آراییدوپسیس و توتون، گیاه *Lesquerella fendleri* را تراریخته نمایند ولی درصد کمی از گیاهان تراریخته بارور بودند (Skarjinskaia 2003). محققین توانستند با استفاده از ناقل‌های مختص گونه گیاهان تراریخته بارور پنبه و سویا به دست بیاورند (Kumar 2004; Dufourmantel 2005; Lelivelt 2005) et al. (2003) با استفاده از یک ناقل اختصاصی برای گیاه *napus* *Brassica* موفق شدند کلروپلاست‌های کلزا را تراریخته نمایند، ولی گیاهان به‌دست آمده هتروپلاسمیک بودند (Hou 2003). از میان گیاهان مختلف، کاهو *Lactuca Sativa* می‌تواند یک گزینه بسیار مناسب جهت تولید پروتئین‌های مفید باشد. برگ‌های گیاه

¹ Transplastomic

مواد و روش‌ها

ساخت ناقل پلاستییدی کاهوی ایرانی

برای ساخت ناقل پلاستییدی از دو قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی برگرفته از دو ژن *rbcl* و *accD* به عنوان توالی‌های هدف مورد نیاز جهت نو ترکیبی همولوگوس استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز مربوط به ژنوم کلروپلاست گیاه کاهو از سایت GenBank/EMBL Accession AP007232 گرفته شد. با استفاده از این اطلاعات آغازگرهای مناسب جهت تکثیر توالی‌های هدف (دو قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی برگرفته از دو ژن *rbcl* و *accD*) از روی ژنوم کلروپلاست کاهوی ایرانی طراحی شد. در ابتدا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rbcl*For و *rbcl*Rev (جدول ۱) و آنزیم *Pfu* یک قطعه دی ان ای ۱۱۰۰ جفت بازی برگرفته از ژن *rbcl* کاهوی ایرانی تکثیر شد و قطعه به دست آمده از PCR طبق مکانیزم همسانه‌سازی TA در ناقل pGEM-T Easy Vector (ناقل A) همسانه شد. در مرحله بعد، برای تعیین جهت قرارگیری صحیح ژن الحاق‌شده، برای انتخاب ناقل نو ترکیب مناسب، ناقل A تحت عمل برش آنزیمی به وسیله آنزیم *ApaI* قرار گرفت. به وسیله آنزیم‌های *XhoI* و *PstI*، کاست ژنی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اسپکینومایسین و استرپتومایسین (به طول ۹۴۶ جفت باز) از داخل ناقل پلاستییدی pKZS (این ناقل از طریق گروه گیاهشناسی دانشگاه ال ام یو مونیخ کشور آلمان تهیه شد) جدا سازی و در ناقل A همسانه شد (ناقل B). در مرحله بعد سه قطعه دیگر نیز با استفاده از آنزیم *Pfu* تکثیر شدند: ۱- یک قطعه ژنی به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز و برگرفته از ژن *accD* کلروپلاست کاهوی ایرانی. این قطعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *accD*For و *accD*Rev (جدول ۱) تکثیر شد و دارای محل‌های برش مناسب برای آنزیم‌های برشی *SacI* و *NotI* بود؛ ۲- قطعه 16SrRNA به اندازه ۱۱۳ جفت باز که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Pro16sFor* و *Pro16sRev* (جدول ۱) تکثیر شد و دارای محل‌های برش مناسب برای آنزیم‌های *PstI*، *SalI* و *EcoRI* بود؛ ۳- قطعه دی ان ای خاتمه‌دهنده *PsbA* به طول ۳۳۸ جفت باز که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *psbATFor* و *psbATRev* (جدول ۱) تکثیر شد و دارای

کاهو به صورت تازه توسط انسان استفاده می‌شوند و مدت زمان لازم برای تولید بیوماس مورد استفاده در گیاه کاهو (برگ‌های کاهو) نسبت به محصولاتمانند گوجه فرنگی و سیب‌زمینی بسیار کوتاه‌تر می‌باشد (Lelivelt 2005). گزارش‌هایی مبنی بر تولید ارقام کاهوی پلاستید-تراریخت با استفاده از ناقل‌های مختلف وجود دارد. به عنوان مثال Lelivelt et al. (2005) با ساخت یک سازه مناسب براساس مناطق *trnI/trnA* ژنوم کلروپلاست کاهو، گیاهان پلاستید-تراریخت پایدار به دست آوردند (Lelivelt 2005). در گزارشی دیگر et al. (2005) Hirotsuke با استفاده از مناطق *rbcl* و *accD* ژنوم کلروپلاست کاهو، ناقلی به نام pRL200 ساخته و ژن *GFP* را به کلروپلاست کاهو منتقل کردند (Kanamoto 2005). تراریختی پلاستید در گیاهان مختلف معمولاً در سه مرحله انجام می‌پذیرد: الف) ساخت ناقل مناسب و مختص گونه، با توجه به وجود تنوع در سازمان‌دهی ژن‌ها در ژنوم پلاستید گیاهان مختلف و انجام عمل الحاق ژن‌های خارجی در ژنوم پلاستیدها به کمک فرآیند نو ترکیبی همولوگوس، لازم است برای هر گونه گیاهی ناقل ویژه-ای ساخته شود. علاوه بر این برای به دست آوردن گیاهان پلاستید-تراریخت با کارایی بالا، بایستی توالی نوکلئوتیدی نواحی الحاق کاملاً شبیه مناطق هدف در ژنوم پلاستید باشند (Kanamoto 2005؛ ب) انتقال ناقل حاوی ژن موردنظر به پلاستید گیاهان، این عمل می‌تواند به کمک تفنگ‌ژنی (Maliga 2004) و یا تیمار پلی‌اتیلن گلیکول انجام شود (Koop 1996؛ ج) انتخاب سلول‌های حاوی پلاستیدهای تراریخته و باززایی آنها تحت شرایط انتخاب سخت برای یک نشانگر آنتی بیوتیکی (Kanamoto 2005). با توجه به اهمیت تولید پروتئین‌های خارجی در پلاستید گیاهان برگی مانند کاهو و عدم وجود یک ناقل مناسب برای انتقال ژن‌های مختلف به کلروپلاست کاهوی ایرانی (*Lactuca sativa* رقم TN-96-39)، نیاز به ساخت یک ناقل مختص گونه و همچنین بهینه سازی انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی احساس می‌شود. در این صورت امکان تولید اقتصادی پروتئین‌های مفید در کاهوی ایرانی فراهم می‌شود.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش

نام آغازگر	توالی آغازگر
GUSFor:	5' GTCGACGGAGGTTTATGTTACGTCCTGTAGA 3'
GUSRev:	5' CCAAGCTTCATTATTGTTTGCCTCCCTGCT 3'
accDFor:	5' ATGCGGCCGCCCCACCCATCCTGTATATTGTCC 3'
accDRev:	5' GCGCGAGCTCTTCATCCATAGGCTCCCAAG 3'
Pro16sFor:	5' CTGCAGGATATTTTGATTGCTACCC 3'
Pro16sRev:	5' GAATTCGTCGACATTTTCGCCCCGAGTTCGCTCC 3'
psbATFor:	5' GTCGACGAATCAAGCTTCTGGAGGAGCAGCAATGAAG 3'
psbATRev:	5' GCGGCCGCTGCAAACCGCTTTTGATTTAC 3'
rbcLFor:	5' ATGGGCCAGTATGGTCGTCCCCTGTTG 3'
rbcLRev:	5' CGCTCGAGCGATCCAGGGAAAATACAGG 3'

انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی

ضد عفونی بذور و تهیه ریزنمونه

بذر کاهوی ایرانی (رقم TN-96-36) به مدت ۲۵ دقیقه در محلول توئین-۲۰، یک درصد و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار داده شد. سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل منتقل و بعد از ۴±۶ ساعت لپه‌ها جداسازی و روی محیط پیش کشت (MS) کامل با غلظت‌های هورمونی ۰/۲ mg/l BA و ۰/۲ mg/l NAA با pH=۵/۷ قرار داده شدند. پس از ۲۴-۴۸ ساعت لپه‌ها آماده شلیک به وسیله تفنگ ژنی می باشند. برای شلیک ریزنمونه‌ها از ذرات طلا با قطر ۰/۶ میکرومتر، راپچر دیسک ۱۱۰۰ psi و تفنگ-ژنی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. پس از پوشش دار کردن ذرات طلا با سازه ژنی، عمل شلیک در فشار ۱۱۰۰ psi و تحت شرایط استریل انجام شد. در ضمن فاصله نازل پرتاب کننده و ریزنمونه‌ها ۶ سانتی متر بود (Kanamoto 2005). دو روز پس از شلیک، ریزنمونه‌ها در صورت امکان به قطعات کوچک تر تقسیم شدند و به محیط کشت باززایی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین (محیط کشت انتخابی) منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار به محیط کشت انتخابی جدید انتقال داده شدند. گیاهچه‌های باززا شده برای تولید ریشه به محیط کشت ریشه‌زایی (MS) یک دوم با غلظت

محل‌های برشی مناسب برای آنزیم‌های *SalI*, *EcoRI*, *NotI*، *HindIII* بود. سپس به وسیله Swing PCR دو قطعه ۱۱۳ و ۳۳۸ جفت بازی به هم متصل شدند و یک قطعه ۴۵۱ جفت بازی به دست آمد. در مرحله بعد دوباره به وسیله مکانیزم Swing PCR با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱)، دو قطعه ۱۱۰۰ و ۴۵۱ جفت بازی به هم متصل شدند و یک قطعه ۱۵۵۱ جفت بازی به دست آمد. قطعه به دست آمده بر اساس مکانیزم همسانه سازی TA در یک ناقل pGEM-T Easy Vector به صورت مجزا همسانه شد (ناقل C). سپس ناقل C به وسیله آنزیم‌های *NotI* و *SacI* برش داده شد و قطعه به دست آمده پس از جداسازی از روی ژل در ناقل B همسانه شد. ناقل به دست آمده بعد از توالی یابی توسط شرکت آلمانی Seq-Lab با نام مخفف pCL96-39 (پلاسمید کلروپلاستی کاهوی ایرانی (*Lactuca sativa*) رقم TN-96-39 معرفی شد. اگر ناقل pCL96-39 را به وسیله آنزیم‌های *SalI*, *EcoRI* و *HindIII* برش دهیم، می‌توانیم ژن‌های مورد نظر را در آن همسانه کنیم. جهت الحاق ژن *GUS* در ناقل pCL96-39، ابتدا ژن *GUS* به وسیله آنزیم *Pfu* تکثیر و پس از اضافه نمودن دنباله آدنین به انتهای ۳' آن، در ناقل pGEM-T Easy همسانه شد. در مرحله بعد ژن *GUS* به وسیله آنزیم‌های *SalI* و *HindIII* از ناقل pGEM-T Easy جداسازی و در ناقل pCL96-39 همسانه شد.

به هم متصل شدند و یک قطعه ۴۵۴ جفت بازی به دست آمد. به منظور تأیید حضور قطعات مختلف در ناقل ساخته شده، برش آنزیمی به وسیله آنزیم‌های مناسب و همچنین تکثیر به وسیله آغازگرهای مناسب انجام شد. در نهایت جهت تأیید نهایی ناقل ساخته شده عمل توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مناسب صورت گرفت. شکل یک اجزای ناقل ساخته شده جهت انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی (pCL96-39) را نشان می‌دهد. ژن *GUS* که از ابتدا در ناقل pBI121 بود نیز با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر شد و از طریق مکانیزم همسانه‌سازی TA در ناقل pGEM-T Easy Vector همسانه شد. پس از برش آنزیمی ناقل نو ترکیب pGEM-T Easy Vector ژن *GUS* دارای انتهای چسبان، در ناقل pCL 96-36 همسانه شد. به منظور تأیید حضور ژن *GUS* در ناقل نو ترکیب pCL96-39 عمل تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای مناسب و ناقل نو ترکیب حاوی ژن *GUS* به عنوان الگو، انجام شد.

تولید و تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخته

برای تراریخته نمودن کلروپلاست گیاه کاهوی ایرانی، لپه‌های آن در یک محیط استریل و با استفاده از راپچر دیسک 1100 psi بمباران شدند. حدوداً ۳۵ روز بعد از شلیک، کالوس‌های سبز رنگ مقاوم به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بر روی محیط کشت انتخابی ظاهر شدند. تقریباً چند هفته بعد از پدیدار شدن کالوس-ها، تعدادی از آنها تولید ساقه نمودند (شکل ۲ج). قبل از تولید ریشه، جهت به دست آوردن حداکثر هموپلاستی برگ‌های سبز به دست آمده سه بار متوالی به قطعات کوچک‌تر تقسیم و روی محیط انتخابی کشت شدند، سپس ساقه‌های باززا شده به محیط کشت ریشه زایی منتقل شدند. پس از ظهور ریشه (شکل ۲د)، گیاهچه‌ها برای بذریکری به گلدان منتقل شدند (شکل ۲ه). گیاهان به دست آمده ۲/۵ ماه بعد از کاشت در گلدان بذر دادند (شکل ۲و). وجود ژن انتقالی در گیاهان تولیدی به وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب برای ژن *GUS* تأیید شد. طول قطعه به دست آمده ۱۸۰۰ جفت باز و هم اندازه با ژن *GUS* بود (شکل ۲ز). برای تأیید تولید پروتئین در گیاهان تراریخته آزمون هیستوشیمیایی *GUS* روی کالوس‌ها و ریزنمونه‌های تراریخته

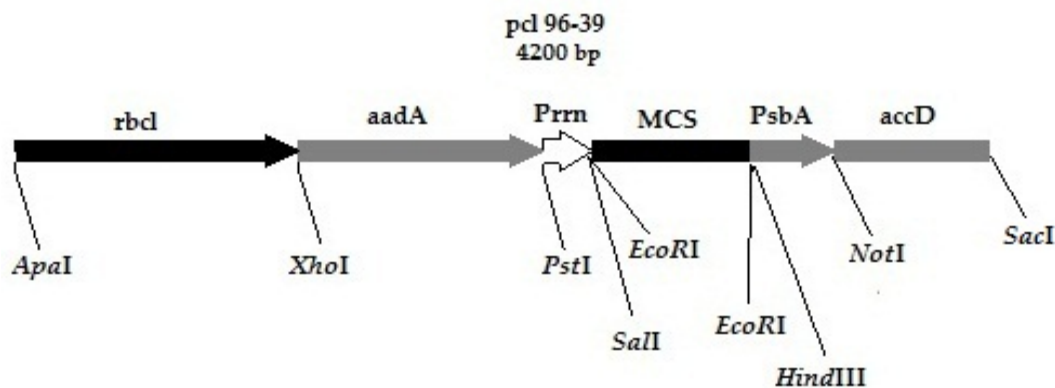
هورمونی $\text{NAA } 5.0 \times 10^{-7} \text{ mg/l}$ و $\text{pH}=5.0$ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین) انتقال پیدا کردند. ساقه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های کاغذی کوچک حاوی پرلیت استریل منتقل و در گلخانه در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهان بعد از ۴۵ روز به گل نشستند و عمل بذریکری تقریباً ۲/۵ ماه بعد از کاشت گیاهچه‌ها در گلدان صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل PCR گیاهان تراریختی

DNA ژنومی گیاهان تراریخته T_0 ، به روش CTAB استخراج شد و عمل PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن *GUS* و تحت شرایط استاندارد (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، برای ۳۰ چرخه PCR) انجام شد. محصول PCR به دست آمده به وسیله الکتروفورز جداسازی شد. ارزیابی هیستوشیمیایی فعالیت ژن *GUS* بر اساس روش et al. (1987) Jefferson انجام گرفت. برای استخراج پروتئین کل محلول برگ از روش Guy et al. (1992) استفاده شد و غلظت پروتئین نمونه‌های حاصل با استفاده از روش et al. (1976) Bradford تعیین شد، سپس با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین کل محلول گیاهان تراریخت تفکیک شد.

نتایج و بحث

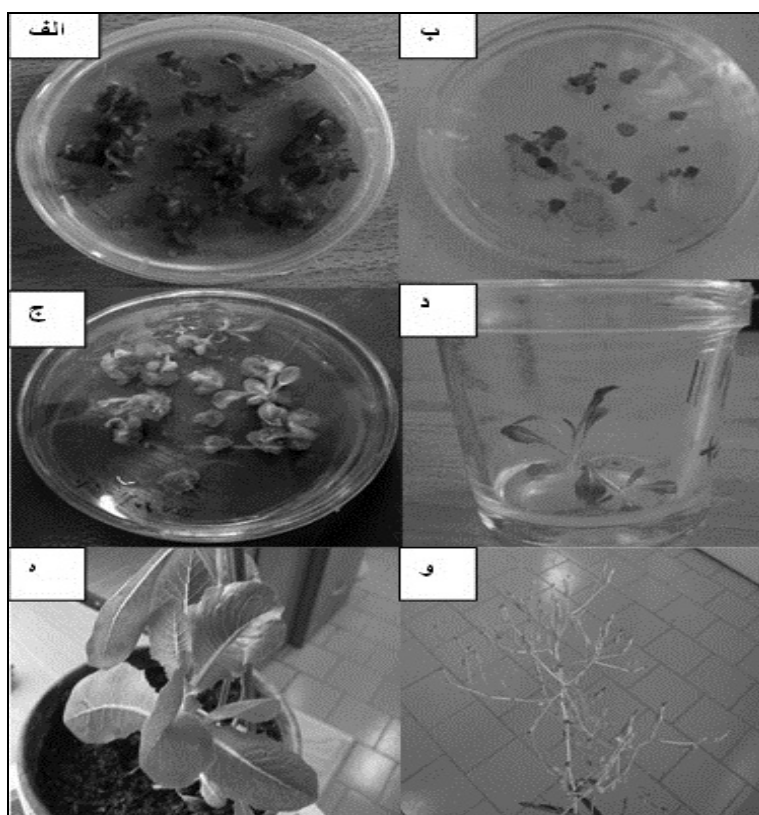
یک ناقل مناسب برای انتقال ژن به پلاستید باید دارای دو بخش مهم ۱- منطقه الحاق ۲- کاست ژنی گزینشگر باشد. نواحی مناسب جهت انجام نو ترکیبی همولوگوس بر اساس مطالعات انجام شده انتخاب شدند و همان‌طور که قبلاً ذکر شد این نواحی شامل دو قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی از ژن‌های *rbcl* و *accD* بودند، این نواحی به وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر شدند. علاوه بر این‌ها، دو قطعه دیگر یعنی *psbA* با ۳۳۹ جفت باز و *prn* با ۱۱۳ جفت باز به ترتیب به عنوان راه‌انداز و خاتمه-دهنده نیز به وسیله PCR تکثیر شدند. کاست انتخابی (مقاومت به استرپتومایسین و اسپیکتینومایسین) هم از ناقل پلاستییدی pKZS (که برای انتقال ژن به کلروپلاست توتون استفاده می‌شود) جداسازی شد. در مرحله بعد به وسیله تکنیک Swing PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱) دو قطعه *psbA* و *prn*



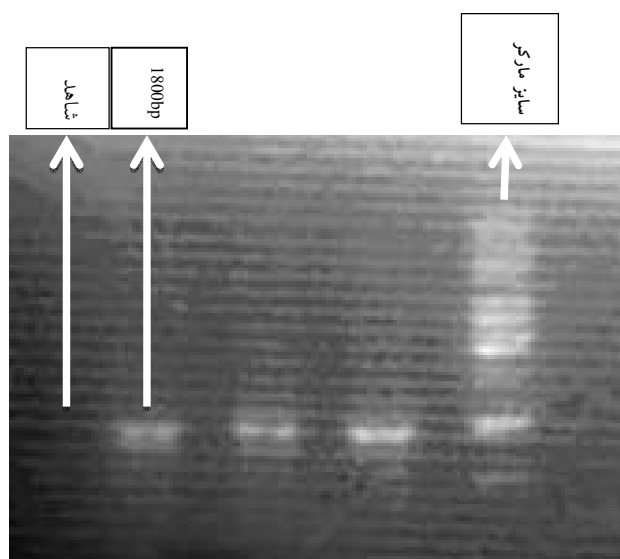
شکل ۱- یک قطعه ۲۲۰۰ جفت بازی شامل ۱- دو قطعه دارای همولوژی کامل با بخش هایی از ژنوم کلروپلاست کاهو (*accD* و *rbcL*) در دو انتها ۲- ژن *aadA* به عنوان نشانگر انتخابی ۳- راه انداز 16S rRNA ۴- قطعه ۶۰۰ جفت بازی به عنوان سایت پرشی (MCS) ۵- خاتمه دهنده *psbA*. این قطعه را می توان به عنوان قسمت اصلی ناقل پلاستییدی کاهوی ایرانی در ناقل های مختلف همسانه کرد و آن را تکثیر کرد. به عنوان مثال در این پژوهش این قطعه در ناقل pGEM-T Easy Vector همسانه شد و ناقل مختص گونه (pCL96-39) به دست آمد.

گیاه تشکیل می دهند و در ضمن برگ ها دارای بیشترین میزان پلاستید در هر سلول می باشند و از این نظر گیاه کاهو کاندیدی بسیار مناسبی جهت تراریختی کلروپلاست می باشد (۲) بر خلاف گیاه توتون هیچ آکالوئید سمی در گیاه کاهو تولید نمی شود و این امر تخلیص پروتئین های تولیدی در گیاه کاهو را تسهیل می نماید. (۳) گیاه کاهو معمولاً به صورت تازه و بدون نیاز به پختن استفاده می شود که این امر امکان تحویل مستقیم پروتئین های تولیدی را بدون نیاز به تخلیص آنها فراهم می آورد (Lelivelt 2005). بنابراین گیاه کاهو می تواند یک گزینه مناسب جهت تولید و تحویل پروتئین های مختلف مانند واکسن های نو ترکیب، داروهای پروتئینی و پروتئین های تجاری باشد. با توجه به اینکه تا کنون انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی انجام نشده است، این پژوهش روی دو جنبه انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی یعنی ساخت یک ناقل مناسب جهت انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی و بهینه سازی انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی به وسیله تفنگ ژنی متمرکز شده است. در طراحی ناقل های پلاستییدی وجود دو جایگاه دارای همولوژی کامل با بخش هایی از ژنوم پلاستید لازم و ضروری است. تاکنون جایگاه های دوتایی زیادی مانند *trnH-psbA*، *trnG-trnfM*، *trnS-ycf3*، *accD-rbcL*، *30rps12*، *ndhB-rps7*، *petD-rpoA*، *50rps12-clpP*، *petA-psbJ*

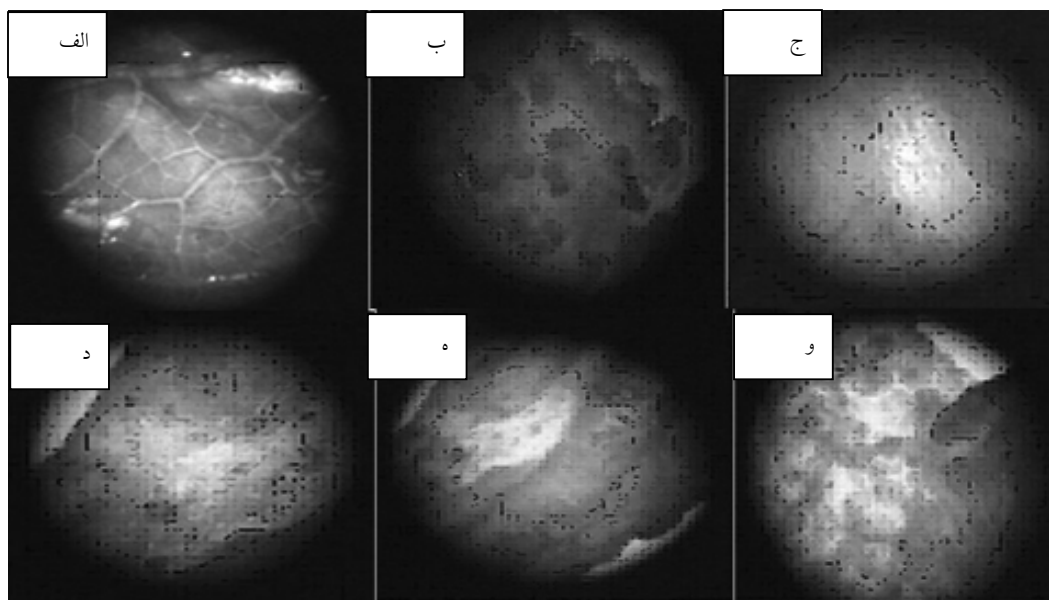
انجام گرفت. مشاهده لکه های تیره رنگ در نمونه ها، نشان دهنده بیان ژن *GUS* بود (شکل ۴). پس از استخراج پروتئین کل محلول برگ، غلظت پروتئین نمونه های حاصل تخمین زده شد. تفکیک پروتئین کل محلول گیاهان تراریخت، یک باند ۶۸/۲ کیلو دالتونی (هم اندازه با پروتئین بتاگلوکورونیداز) نشان داد که در گیاهان شاهد وجود نداشت. در ضمن براساس محاسبات انجام شده با استفاده از نرم افزار Quantitative 1 میزان پروتئین تولیدی در گیاهان تراریخته ۳ درصد کل پروتئین محلول گیاه بود. فناوری انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان می تواند ویژگی های منحصر به فردی مانند تولید پروتئین های مفید را به گیاهان اعطا نماید. به خصوص در صورت انتقال ژن موفق به کلروپلاست گیاهان برگی امکان تولید واکسن ها، آنتی بادی ها و سایر پروتئین های مفید به صورت خوراکی و بدون نیاز به سیستم های خاص جهت تحویل آنها، فراهم می شود (Kanamoto 2005). یکی از مزایای مهم انتقال ژن به پلاستید گیاهان، تجمع مقادیر زیاد پروتئین نو ترکیب می باشد. تا کنون چندین پروتئین دارویی مختلف در کلروپلاست های گیاه توتون تولید شده است و میزان تولید این پروتئین ها نیز بسیار بالا بوده است. ولی تولید این پروتئین های نو ترکیب در کاهو در مقایسه با توتون دارای مزایای بیشتری می باشد: (۱) در گیاه کاهو بخش عمده گیاه را برگ های



شکل ۲- مراحل تولید گیاهان کلروپلاست- تراریخت به وسیله بمباران ذره ای الف) ریز نمونه ها (لپه) در محیط پیش کشت (بدون آنتی بیوتیک؛ ب) ریز نمونه ها ۳ روز بعد از بمباران در محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین؛ ج) کالوس زایی و باززایی ریز نمونه ها در محیط کشت انتخابی ۳۵ روز پس از شلیک؛ د) ریشه زایی ساقه ها در محیط کشت ریشه زایی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین؛ ه) انتقال گیاه کلروپلاست-تراریخت به گلدان؛ و) به گل نشستن گیاه کاهوی ایرانی کلروپلاست-تراریخت ۴۵ روز پس از انتقال گیاهچه های تراریخته به گلدان.



شکل ۳- تکثیر ژن *GUS* (۱۸۰۰bp) از روی DNA استخراج شده از گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (که نشان دهنده حضور ژن *GUS* در گیاهان تراریخته احتمالی است).



شکل ۴- ارزیابی هیستوشیمیایی فعالیت *GUS* (الف) بیان ژن بتاگلوکورونیداز را در ریز نمونه بمباران شده؛ (ب) بیان ژن بتاگلوکورونیداز در کالوس های تراریخته؛ (ج) عدم بیان ژن بتاگلوکورونیداز در برخی از ریز نمونه های بمباران شده؛ (د) بیان شیمیریک ژن بتاگلوکورونیداز در ریز نمونه تراریخت شده؛ (و) بیان شیمیریک ژن بتاگلوکورونیداز در کالوس های تراریخت شده.

GFP را به کلروپلاست گیاه کاهو منتقل نمودند ولی میزان تولید پروتئین *GFP* در مقایسه با تولید آن در گیاه توتون بسیار کمتر بود (Kerry 2008). لذا پیشنهاد می شود که برای انتقال قطعات ژنی به کلروپلاست گیاهان مختلف، ناقل اختصاصی ساخته شود. از این رو در این پژوهش برای طراحی یک ناقل پلاستییدی مختص گونه از نواحی *rbcl-accD* (برگرفته از ژنوم کلروپلاست کاهوی ایرانی) به عنوان نواحی همولوژیک استفاده نمودیم. انتخاب این نواحی مزایای زیادی دارد به عنوان مثال: (الف) بالا بودن میزان بیان ژن انتقالی در صورت استفاده از این دو جایگاه (Kanamoto 2005). (ب) ژن *rbcl* در گیاهان مختلف کاملاً محافظت شده می- باشد و همپوشانی بالایی (تا ۹۸ درصد) دارد. بنابراین در صورت محقق بودن سایر شرایط می-توان از ناقل pCL96-39 به عنوان یک ناقل عمومی در گیاهان مختلف استفاده کرد (Kanamoto 2005). در این تحقیق نیز نشان داده شده است که راه انداز ژن *16S rRN* و خاتمه دهنده *psbA* (برگرفته از ژنوم کلروپلاست توتون) می- توانند ژن *aadA* موجود در ناقل pCL96-39 را به خوبی بیان

trnR-trnN ، *trnI-trnA* ، *rrn16-trnI*، *trnV-rrn16*، *trnV-rpl32-trnL* جهت انتقال ژن به پلاستید گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Maliga 2004). برای طراحی ناقل پلاستییدی در گیاهان مختلف از جایگاه های بین دو ناحیه- *trnI-trnA* (ناحیه ای از IR ژنوم کلروپلاست) بیشترین استفاده شده است. یکی از علل انتخاب این جایگاه ها در گیاهان مختلف میزان تظاهر بالای ژن خارجی در سازه های دارنده این نواحی است. در ضمن محل شروع همانندسازی *oriA* ژنوم کلروپلاست نیز در ناحیه *trnI* قرار دارد و در صورت استفاده از این نواحی به عنوان نواحی همولوگ، عمل همانندسازی ژن الحاقی تسهیل شده و ممکن است هموپلاستی با سرعت بیشتری در سلول اتفاق افتد (Koop 1996; Newell 2003). ولی این ناقل های عمومی به علت عدم همولوژی کامل با ژنوم کلروپلاستی گیاهان مختلف دارای کارایی بالایی نبوده و موجبات بیان مناسب ژن انتقالی را فراهم نمی-آورند. به عنوان مثال (Newell et al. 2003) با استفاده از یک ناقل عمومی که برای گیاه توتون طراحی شده بود، ژن

گزارشگر *GUS* برای بهینه‌سازی انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی استفاده شد و پروتئین تولیدی توانست بیان ژن در مراحل مختلف را بخوبی نشان دهد. با توجه به ساخت ناقل پلاستییدی مختص گونه و همچنین تولید بالای پروتئین بتاگلوکورونیداز (به میزان ۳ درصد کل پروتئین محلول گیاه، این میزان معادل ۱۵ تا ۱۸ کیلوگرم پروتئین نوترکیب در هکتار می‌باشد) در گیاهان پلاستید-تراریخت، تولید پروتئین‌های مختلف در کلروپلاست کاهوی ایرانی پیشنهاد می‌شود.

کند و باعث القاء مناسب مقاومت به استرپتومایسین شوند. Sun et al. (2006) نیز علی‌رغم استفاده از راه‌اندازهای قوی و اختصاصی (مشتق شده از ژنوم کلروپلاست کاهو) و همچنین غیر اختصاصی (مشتق شده از ژنوم کلروپلاست توتون) برای بیان ژن *aadA* تفاوت معنی داری در استفاده از راه‌اندازهای اختصاصی و غیر اختصاصی مشاهده نکردند. معمولاً از ژن‌های گزارشگر جهت مقایسه میزان بیان ژن، بهینه‌سازی پارامترهای بمباران ذره‌ای، مقایسه روش‌های تراریخت و تجزیه و تحلیل راه-اندازها استفاده می‌شود (Chhandak 2004). در این تحقیق از ژن

منابع

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.

Bradford MM, (1976) A dye binding assay for protein. *Anal Biochem* 72:248-254.

Chhandak Basu A, Albert P, Kausch B, Joel MC (2004) Use of b-glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. *Biochem and Biophys Res Com* 320 7-10.

Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol* 20: 581-586.

Daniell H, Kumar S, Dufourmantel N (2005) Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol* 23: 238-245.

De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19: 71-74.

Dheeraj V, Samson NP, Koya V, Daniell H (2008) A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Prot* 522:121-125.

Dhingra A, Portis AR, Jr, Daniell H (2004) Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6315-6320.

Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garçon F, Muhr C, Jansens S, Pelissier B, Peltier G, Dubald M (2005) Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. *Plant Mol Bio* 58:659-668.

Guy C, Haskell D, Neven L, Klein P, Smelser C (1992) Hydration-state-responsive protein link cold and drought stress in spinach. *Planta* 188: 265- 270.

Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. *Trans Res* 12: 111-114.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) Gus fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.

Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K (2005) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv Cisco (lettuce) plastids. *Trans Res* 15:205-217.

Kerry AL, Maliga P (2008) Plastid genomes in a regenerating tobacco shoot derive from a small number of copies selected through a stochastic process *Plant Journal* 56:975-983.

Koop HU, Steinmuller K, Wagner H, Rossler C, Eibl C, Sacher L (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via PEG-mediated protoplast transformation. *Planta* 199: 193-201.

Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H (2005) Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge *Infect. Immun* 73:8266-8274.

Kumar S, et al. (2004) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Bio* 56:203-216.

Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH, Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 58:763-774.

Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 289-313.

Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal* 2: 141-153.

Newell CA, Birch-Machin I, Hibberd JM, Gray JC (2003) Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. *Trans Res* 12: 631-634.

Quesada-Vargas T, Ruiz ON, Daniell H (2005) Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing and translation. *Plant Physiol* 138: 1746-1762.

Ruiz ON, Daniell H (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of beta-ketothiolase. *Plant Physiol* 138: 1232-1246.

Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18: 20-24.

Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri* an oilseed Brassicacea. *Trans Res* 12: 115-122.

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz P, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russe DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18: 333-338.

Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006) Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *Federation European Biochemical Societies Letters* 580: 620-626.

Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene *Proc. Natl Acad Sci USA* 90: 913-917.