ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۴۶- ۳۷

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

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

اسماعیل قاسمی[۱]، حسین هنری[۲]، منصور امیدی[۳]، علی اکبر شاه نجات بوشهری[٤]، مختار جلالی جواران[٥]، هوشنگ علیزاده[*٦]

۱، ۳، ۴، ۶- 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 E[1], Honari H[2], Omidi M[3], Shahnejat Bushehri AA[4], Jalali M[5], 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 *rbcL* و *accD* (برگرفته از ژنوم کلروپلاست کاهو)، راه-انداز *prrn*، خاتمه دهنده *psbA* و کاست ژنی مقاومت به آنتی‌بیوتیک های 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*) برروی کالوس‌ها و ساقه‌های تراریخته انجام شد. تولید پروتئین بتاگلوکورونیداز در گیاهان تراریخته به وسیله روش الکتروفروز SDS-PAGE نیز تایید شد. نتایج این پژوهش می‌تواند راه را برای تولید وسیع پروتئین‌های پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها و آنتی‌بادی های نوترکیب در گیاه کاهوی ایرانی هموار کند.

واژه‌های کلیدی

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

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 پروتئین-های 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 مواردزیر اشاره نمود:

کاهش خطر دگرگرده‌افشانی 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 پلاستیدی در هر سلول گیاهی (De Cosa 2001). ژنوم‌های پلاستیدی 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 می باشد، به‌عنوان مثال سلول‌هایی که به‌طور اختصاصی مسئول انجام فتوسنتز می-باشند، می‌توانند تا صد کلروپلاست داشته باشند. تراریختی پایدار نیازمند انتقال ژن به ژنوم همه کلروپلاست ها می‌باشد و کلروپلاست های غیرتراریخته باید به‌وسیله انتخاب حذف شوند (Molina 2004)، در گیاهان پلاستید- تراریخته[1]، ژن خارجی در مکان مشخصی از ژنوم پلاستید الحاق می گردد. این امر از ایجاد اثرات حاشیه ای جلوگیری می کند (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 کلروپلاست ها انجام می شود (Staub 2000). کلروپلاست ها توانایی انجام گلیکوزیلاسیون ندارند بنابراین امکان تولید پروتئین‌های دارویی غیرگلیکوزیله 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 پلاستیدی آرابیدوپسیس 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). Hoe (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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

کاهو به صورت تازه توسط انسان استفاده می‌شوند و مدت زمان لازم برای تولید بیوماس مورد استفاده در گیاه کاهو (برگ‌های کاهو) نسبت به محصولاتی مانند 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 Hirosuke et al. (2005) 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 معمولا 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 نوترکیبی همولوگوس، لازم است برای هر گونه گیاهی ناقل ویژه-ای ساخته شود. علاوه بر این برای به‌دست آوردن گیاهان پلاستید-تراریخت با کارایی بالا، بایستی توالی نوکلئوتیدی نواحی الحاق کاملا 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 پلی‌اتیلن‌گلیکول 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 می شود. در این صورت امکان تولید اقتصادی پروتئین‌های مفید در کاهوی ایرانی فراهم می‌شود.

مواد و روش‌ها

ساخت ناقل پلاستیدی کاهوی ایرانی

برای ساخت ناقل پلاستیدی از دو قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی برگرفته از دو ژن *rbcl* و *accD* به عنوان توالی‌های هدف مورد نیاز جهت نوترکیبی همولوگوس استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز مربوط به ژنوم کلروپلاست گیاه کاهو از سایت (DDB)/Gen Bank/ EMBL Accession AP007232 گرفته شد. با استفاده از این اطلاعات آغازگرهای مناسب جهت تکثیر توالی های 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 rbcLFor و rbcLRev (جدول ۱) و آنزیم *Pfu* یک قطعه دی ان ای ۱۱۰۰ جفت بازی بر گرفته 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 نوترکیب مناسب، ناقل A تحت عمل برش آنزیمی به وسیله آنزیم *Apa*I قرار گرفت. به‌وسیله آنزیم‌های *Xho*I و *Pst*I، کاست‌ژنی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین (به‌طول ۹۴۶ جفت باز) از داخل ناقل پلاستیدی 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 *Sac*I , *Not*I 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 آنزیم های *Pst*I ، *Sal*I و *Eco*RI 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش

نام آغازگر	توالی آغازگر
GUSFor:	5′ GTCGACGGAGGTTTATGTTACGTCCTGTAGA 3′
GUSRev:	5′ CCAAGCTTCATTATTGTTTGCCTCCCTGCT 3′
accDFor:	5′ ATGCGGCCGCCCACCCATCCTGTATATTGTCC 3′
accDRev:	5′ GCGCGAGCTCTTCATCCATAGGCTCCCAAG 3′
Pro16sFor:	5′ CTGCAGGATATTTTGATTTGCTACCC 3′
Pro16sRev:	5′ GAATTCGTCGACATTTCGCCCGGAGTTCGCTCC 3′
psbATFor:	5′ GTCGACGAATTCAAGCTTCTGGAGGAGCAGCAATGAAG 3′
psbATRev:	5′ GCGGCCGCTGCAAACCGCTTTTGATTTAC 3′
rbcLFor:	5′ ATGGGCCCAGTATGGTCGTCCCCTGTTG 3′
rbcLRev:	5′ CGCTCGAGCGATCCAGGGAAAATACAGG 3′

محل‌های برشی مناسب برای آنزیم‌های *Not*I، *Eco*RI، *Sal*I، *Hind*III بود. سپس به وسیله Swing PCR دو قطعه ۱۱۳ و ۳۳۸ جفت بازی به‌هم متصل شدند و یک قطعه ۴۵۱ جفت بازی به دست آمد. در مرحله بعد دوباره به‌وسیله مکانیزم Swing PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱)، دو قطعه ۱۱۰۰ و ۴۵۱ جفت بازی به‌هم متصل شدند و یک قطعه ۱۵۵۱ جفت بازی به‌دست آمد. قطعه به‌دست آمده بر اساس مکانیزم همسانه سازی TA در یک ناقل pGEM-T Easy Vector به‌صورت مجزا همسانه شد (ناقل C). سپس ناقل C به‌وسیله آنزیم‌های *Not*I و *Sac*I برش داده شد و قطعه به‌دست آمده پس از جداسازی از روی ژل در ناقل B همسانه شد. ناقل به‌دست 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 *Eco*RI، *Sal*I و *Hind*III برش دهیم، می‌توانیم ژن‌های موردنظر را در آن همسانه کنیم. جهت الحاق ژن *GUS* در ناقل pCL96-39، ابتدا ژن *GUS* به‌وسیله 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 *Sal*I و *Hind*III از ناقل pGEM-T Easy جداسازی و در ناقل pCL96-39 همسانه شد.

انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی

ضدعفونی بذور وتهیه ریزنمونه

بذر کاهوی ایرانی (رقم TN-96-36) به مدت ۲۵ دقیقه درمحلول توییین-۲۰، یک درصد و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرارداده 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±۶۸ ساعت لپه‌ها جداسازی و روی محیط پیش‌کشت (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 به‌وسیله تفنگ‌ژنی 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 سازه‌ژنی، عمل شلیک در فشار ۱۱۰۰psi و تحت شرایط استریل انجام شد. در ضمن فاصله نازل پرتاب کننده و ریزنمونه‌ها ۶ سانتی‌متر بود (Kanamoto 2005). دو روز پس از شلیک، ریزنمونه‌ها در صورت امکان به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند و به محیط‌کشت باززایی حاوی ۵۰ میلی-گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (محیط کشت انتخابی) منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار به محیط‌کشت انتخابی جدید انتقال داده شدند. گیاهچه‌های باززا شده برای تولید ریشه به محیط کشت ریشه‌زایی (MS یک دوم با غلظت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

هورمونی NAA mg/l ۰٫۷/۱، pH=۵/۰ 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 بذرگیری تقریبا ۲/۵ ماه بعد از کاشت گیاهچه‌ها درگلدان 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 سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد 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 Jefferson (1987) et al. 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 Bradford (1976) et al. تعیین شد، سپس با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین کل محلول گیاهان تراریخت تفکیک شد.

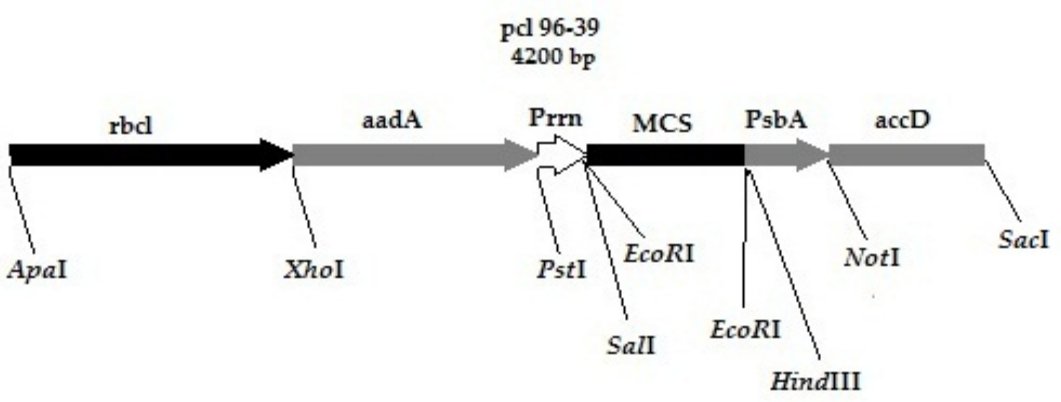
نتایج و بحث

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 نوترکیبی همولوگوس بر اساس مطالعات انجام شده انتخاب شدند و همان‌طور که قبلا ذکر شد این نواحی شامل دو قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی از ژن های *rbcl* و *accD* بودند، این نواحی به‌وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر شدند. علاوه بر این‌ها، دو قطعه دیگر یعنی *psbA* با ۳۳۹ جفت باز و *prrn* با ۱۱۳ جفت باز به‌ترتیب به‌عنوان راه‌انداز و خاتمه-دهنده نیز به‌وسیله PCR تکثیر شدند. کاست انتخابی (مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین) هم از ناقل پلاستیدی pKZS (که برای انتقال ژن به کلروپلاست توتون استفاده می‌شود) جداسازی شد. در مرحله بعد به‌وسیله تکنیک Swing PCR و با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱) دو قطعه *prrn* و *psbA* به هم متصل شدند و یک قطعه ۴۵۴ جفت بازی به‌دست آمد. به‌منظور تائید حضور قطعات مختلف در ناقل ساخته شده، برش آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های مناسب و همچنین تکثیر به‌وسیله آغازگرهای مناسب انجام شد. در نهایت جهت تائید 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 نوترکیب pGEM-T Easy Vector ژن *GUS* دارای انتهاهای چسبان، در ناقل pCL 96-36 همسانه شد. به منظور تائید حضور ژن *GUS* در ناقل نوترکیب pCL96-39 عمل تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای مناسب و ناقل نوترکیب 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. حدودا ۳۵ روز بعد از شلیک، کالوس‌های سبز رنگ مقاوم به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بر روی محیط‌کشت انتخابی ظاهر شدند. تقریبا چند هفته بعد از پدیدار شدن کالوس-ها، تعدادی از آنها تولید ساقه نمودند (شکل ۲ج). قبل از تولید ریشه، جهت به‌دست 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 بذرگیری 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* تائید شد. طول قطعه به دست آمده ۱۸۰۰ جفت باز و هم اندازه با ژن *GUS* بود (شکل ۳). برای تائید تولید پروتئین در گیاهان تراریخته آزمون هیستوشیمیایی GUS روی کالوس‌ها و ریزنمونه‌های تراریخته

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

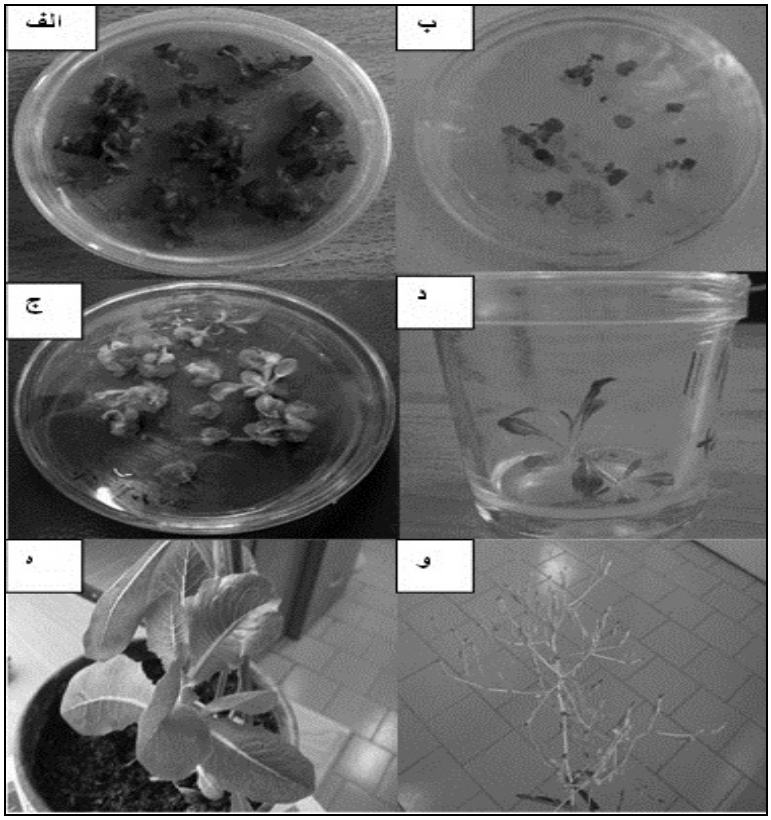


شکل ۱- یک قطعه ۴۲۰۰ جفت بازی شامل ۱- دو قطعه دارای همولوژی کامل با بخش هایی از ژنوم کلروپاتست کاهو(*rbcL* و *accD*) در دو انتها ۲- ژن *aadA* به عنوان نشانگر انتخابی ۳- راه‌انداز 16SrRNA ۴- قطعه ۶۰۰ جفت بازی به عنوان سایت برشی (MCS) 5- خاتمه دهنده psbA. این قطعه را می توان به‌عنوان قسمت اصلی ناقل پلاستیدی 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.

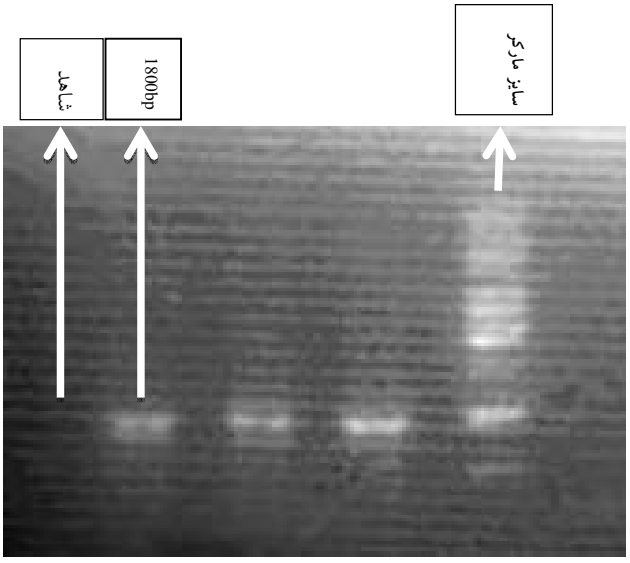
انجام گرفت. مشاهده لکه های تیره رنگ در نمونه‌ها، نشان‌دهنده بیان ژن *GUS* بود (شکل ۴). پس از استخراج پروتئین کل محلول برگ، غلظت پروتئین نمونه های حاصل تخمین زده شد. تفکیک پروتئین کل محلول گیاهان تراریخت، یک باند ۶۸/۲ کیلودالتونی (هم اندازه با پروتئین بتاگلوکورونیداز) نشان داد که در گیاهان شاهد وجود نداشت. در ضمن براساس محاسبات انجام شده با استفاده از نرم افزار Quantitive 1 میزان پروتئین تولیدی در گیاهان تراریخته ۳ درصد کل پروتئین محلول گیاه بود.

فناوری انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان می‌تواند ویژگی‌های منحصر به فردی مانند تولید پروتئین‌های مفید را به گیاهان اعطا نماید. به‌خصوص در صورت انتقال ژن موفق به کلروپلاست گیاهان برگی امکان تولید واکسن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و سایر پروتئین-های مفید به صورت خوراکی و بدون نیاز به سیستم‌های خاص جهت تحویل آنها، فراهم می شود (Kanamoto 2005). یکی از مزایای مهم انتقال ژن به پلاستید گیاهان، تجمع مقادیر زیاد پروتئین نوترکیب 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 پروتئین‌های نوترکیب در کاهو در مقایسه با توتون دارای مزایای بیشتری می باشد: ۱) در گیاه کاهو بخش عمده گیاه را برگ‌های گیاه تشکیل می دهند و در ضمن برگ‌ها دارای بیشترین میزان پلاستید در هر سلول می باشند و از این نظر گیاه کاهو کاندیدای بسیار مناسبی جهت تراریختی کلروپلاست می باشد ۲) بر خلاف گیاه توتون هیچ آلکالوئید سمی در گیاه کاهو تولید نمی شود و این امر تخلیص پروتئین‌های تولیدی در گیاه کاهو را تسهیل می-نماید. ۳) گیاه کاهو معمولا 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 می‌آورد (Lelivelt 2005). بنابراین گیاه کاهو می تواند یک گزینه مناسب جهت تولید و تحویل پروتئین‌های مختلف مانند واکسن‌های نوترکیب، داروهای پروتئینی و پروتئین‌های تجاری باشد. با توجه به اینکه تا کنون انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی انجام نشده‌است، این پژوهش روی دو جنبه انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی یعنی ساخت یک ناقل مناسب جهت انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی و بهینه‌سازی انتقال ژن به کلروپلاست کاهوی ایرانی به وسیله تفنگ ژنی متمرکز شده‌است. در طراحی ناقل‌های پلاستیدی وجود دو جایگاه دارای همولوژی کامل با بخش‌هایی از ژنوم پلاستید لازم وضروری است. تاکنون جایگاه‌های دوتایی زیادی مانند rbcL-accD، ycf3-trnS، trnG-trnfM ،trnH-psbA ، 3ørps12-، ndhB-rps7، petD-rpoA، 5ørps12-clpP،petA-psbJ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

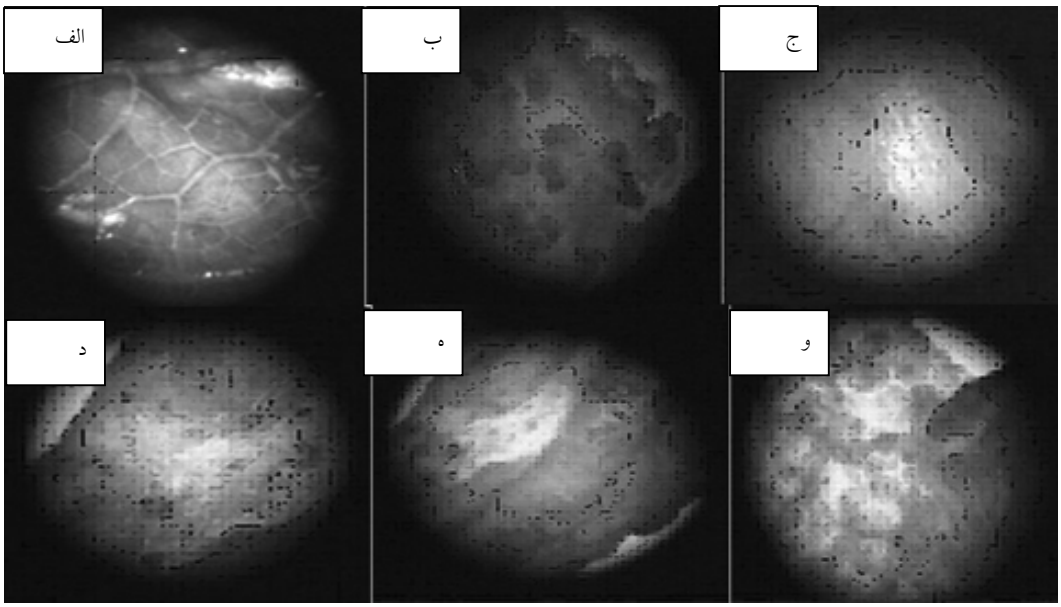


شکل ۲- مراحل تولید گیاهان کلروپلاست- تراریخت به‌وسیله بمباران ذره ای الف) ریز نمونه ها (لپه) در محیط پیش کشت (بدون آنتی‌بیوتیک)؛ ب) ریزنمونه ها ۳ روز بعد از بمباران در محیط کشت انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین؛ ج) کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت انتخابی ۳۵ روز پس از شلیک؛ د) ریشه‌زایی ساقه‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین؛ ه) انتقال گیاه کلروپلاست-تراریخت به گلدان؛ و) به گل نشستن گیاه کاهوی ایرانی کلروپلاست-تراریخت ۴۵ روز پس از انتقال گیاهچه‌های تراریخته به گلدان.



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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]



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 شیمریک ژن بتاگلوکورونیداز در ریز نمونه تراریخت شده؛ و) بیان شیمریک ژن بتاگلوکورونیداز در کالوس‌های تراریخت شده.

trnR-trnN ، trnI-trnA ، rrn16-trnI، trnV-rrn16، trnV و rpl32-trnL جهت انتقال ژن به پلاستید گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Maliga 2004). برای طراحی ناقل پلاستیدی در گیاهان مختلف از جایگاه‌های بین دو ناحیه-trnI trnA, (ناحیه‌ای از IR ژنوم کلروپلاست) بیشترین استفاده شده است. یکی از علل انتخاب این جایگاه‌ها در گیاهان مختلف میزان تظاهر بالای ژن خارجی در سازه‌های 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 به‌عنوان نواحی همولوگ، عمل همانندسازی ژن الحاقی تسهیل شده و ممکن است هموپلاستیدی با سرعت بیشتری درسلول اتفاق افتد (Koop 1996; Newell 2003). ولی این ناقل‌های عمومی به علت عدم همولوژی کامل با ژنوم کلروپلاستی گیاهان مختلف دارای کارآیی بالایی نبوده و موجبات بیان مناسب ژن انتقالی را فراهم نمی‌آورند. به عنوان مثال Newell et al. (2003) با استفاده از یک ناقل عمومی که برای گیاه توتون طراحی شده بود، ژن *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 پلاستیدی مختص گونه از نواحی *rbcL–accD* (برگرفته از ژنوم کلروپلاست کاهوی ایرانی) به‌عنوان 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* درگیاهان مختلف کاملا محافظت شده می-باشد و همپوشانی بالایی (تا ۹۸ درصد) دارد. بنابراین درصورت محقق بودن سایر شرایط می‌توان 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

کند و باعث القاء مناسب مقاومت به استرپتومایسین شوند. Sun et al. (2006) نیز علی رغم 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. معمولا از ژن های 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 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 پلاستیدی 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.

منابع

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolf-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity icroprojectiles. 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* Cry1Abprotoxin. 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 sequencies 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]

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.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.5.7]