ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۴۰- ۳۳۳

بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در کلروپلاست گیاه توتون

Expressing of the human interferon gamma gene in the Tobacco chloroplast

شهلا رزمی[۱]، مختار جلالی جواران*[۱]، عبدالرضا باقری [۲]، حسین هنری[۳]، مهدی محب الدینی[٤]، مژگان سلیمانی زاده[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استاد، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، دانشگاه امام حسین
۴- استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی

Razmi SH[1], Jalali Javaran M[*1], Bagheri A[2], Honari H[3], Mohebodini M[4], Soleimani Zadeh M[1]

1. PhD Student, Associate Professor and MSc Student, Tarbiat Modares University
2. Professor, Ferdosi University of Mashhad
3. Assistant Professor, Emam hosein University
4. Assistant Professor, Mohaghegh Ardebili University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jalali.mokhtar@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

چکیده

اینترفرون گاما یکی از مهمترین پروتئین‌ها در فعالیت‌های تشخیصی و درمانی به‌ویژه درمان بیماری‌های ویروسی و تنظیم فعالیت‌های دستگاه ایمنی است. این پروتئین به عنوان ماده موثر بسیاری از داروها به روش‌های مختلف می-تواند تولید شود که تولید آن در گیاهان به روش زراعت مولکولی یکی از آنها می‌باشد. در سال‌های اخیر تولید پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست گیاهان زراعی به دلیل مزایای زیادی که دارد از جمله تجمع مقدار زیاد پروتئین خارجی در کلروپلاست، عاری بودن این پروتئین‌ها از عوامل بیماری‌زای انسانی و امکان بیان چندین ژن به طور همزمان، مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این پروژه بررسی امکان استفاده از روش تراریختی کلروپلاست برای تولید اینترفرون گامای انسانی در کلروپلاست گیاه توتون به صورت دیسیسترونی بود. بدین منظور ژن اینترفرون گاما در ناقل کلروپلاستی pKCZ همسانه‌سازی شد. سازه تهیه شده بر روی ذرات طلا پوشش داده شد و بوسیله تفنگ ژنی بر روی برگهای توتون شلیک شد. قطعات برگی بمباران شده به محیط کشت ساقه زایی حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین منتقل شدند. سپس گیاهچه‌های باززایی شده جهت ریشه‌زایی به محیط MS انتقال یافتند. حضور و بیان ژن اینترفرون گاما در گیاهان تراریخت باززایی شده با استفاده از تکنیکهای PCR و RT-PCR تایید شد. برای اثبات بیان ژن در سطح پروتئین از روش SDS-PAGE و آزمون لکه‌گذاری استفاده شد. برای رسیدن به هموپلاسمی کامل چهار دور باززایی از گیاهان توتون تراریخت انجام شد.

واژه‌های کلیدی

اینترفرون گاما
بیان دیسیسترونی
توتون
زراعت ملکولی
گیاهان تراریخت کلروپلاستی

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]

مقدمه

در سال‌های اخیر انتقال ژن به کلروپلاست[1] به دلیل مزایای زیادی که دارد بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. از جمله این مزایا می‌توان به سطح بالای بیان و تجمع پروتئین در داخل اندامک کلروپلاست به دلیل پلی پلوئید بودن سیستم ژنتیکی پلاستید و محدودیت تعداد مسیرهای تجزیه پروتئین، نبود اثرات مکانی[2] و عدم خاموشی ژن[3] به دلیل ورود ژن در جایگاه‌های مشخص در ژنوم پلاستیدی، عدم انتقال ژن‌های پلاستیدی از طریق دانه گرده (به دلیل توارث مادری پلاستیدها) در اغلب گونه‌های نهاندانگان اشاره کرد (Verma and Daniell 2007). علاوه بر موارد فوق، پلاستیدها به دلیل دارا بودن سیستم بیان پروکاریوتی، توانایی بیان چندین ژن (پلی سیسترونی) را به طور هم زمان از یک اپرون دارند. این ویژگی امکان بیان پروتئین‌های پیچیده چند زیرواحدی را از یک mRNA که توسط یک راه انداز رونویسی می‌شود، فراهم می‌سازد. همچنین بیان چندین ژن به صورت پلی سیسترونی، امکان انجام واکنش های متابولیکی پی در پی را تنها با یک بار تراریخت نمودن فراهم می‌کند. از طرف دیگر با استفاده از یک اپرون برای چندین ژن، می‌توان به جای چندین ژن نشانگر تنها یک نشانگر گزینشی استفاده کرد (Obembe et al. 2010) . در این راستا با بهره گیری از مهندسی ژنتیک، تراریختی کلروپلاستی برای اصلاح صفات زراعی، بهبود مسیرهای متابولیکی و همچنین در زراعت مولکولی برای تولید پروتئین های نوترکیب (داروئی و صنعتی) ارزشمند با منشأ گیاهی گسترش یافته است. اولین تراریختی پایدار کلروپلاستی در جلبک کلامیدوموناس با الحاق DNAی برهنه[4]، درون ژنوم کلروپلاست از طریق تفنگ ژنی گزارش شد (Boynton et al. 1988). اولین تراریختی پایدار در ژنوم کلروپلاست گیاهان عالی در توتون توسط سیستم تفنگ ژنی انجام شد (Svab et al. 1990). در زمینه زراعت مولکولی به منظور تولید پروتئین‌های با ارزش دارویی با استفاده از تراریختی کلروپلاستی پیشرفت‌های زیادی حاصل شده است از جمله می‌توان به تولید آنتی بادی مونوکلونال (Daniell et al. 2004)، اینترفرون آلفا (Arlen et al. 2007)، هورمون رشد شبه انسولین (Daniell et al. 2009) و پپتید آنتی میکروبی (Oey et al. 2009) اشاره کرد. در ایران نیز کارهای تحقیقاتی ارزنده‌ای در زمینه استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور انجام شده که از جمله آنها می‌توان به تولید آنتی بادی نوترکیب تک دومنی (V_{HH}) علیه ژن *MUC*1 در گیاه توتون (Rajabi Memari et al. 2006) و پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی[5] با منشا انسانی در توتون (Masoumi et al. , 2009) اشاره کرد.

اینترفرون‌ها به طور عمده به عنوان فعال کننده سلول‌های سیستم ایمنی عمل می‌کنند. اینترفرون گاما یک مولکول پروتئین همودایمر ترشحی است که هر مونومر آن از ۱۴۳ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای دو محل جهت گلیکوزیلاسیون در محل اسید آمینه‌های ۲۵ و۹۷ و فرم فعال آن به صورت دایمر می باشد (Ganes et al. 1992). ژن اینترفرون گاما بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد و شامل ۳ اینترون و۴ اگزون می‌باشد و پلی پپتیدی با طول ۱۶۶ اسیدآمینه را کد می‌کند که دارای ۲۰ اسید آمینه پپتید نشانه می‌باشد. وزن مولکولی پیش بینی شده برای اینترفرون گاما متفاوت بوده و ۱۷ تا ۲۵ کیلو دالتون را شامل می‌شود (Ganes et al. 1992). از این پروتئین برای درمان بیمارانی که نقص ایمنی مادر زادی دارند، استفاده می‌شود. از اینترفرون‌های نوترکیب در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی و سرطان‌ها استفاده می شود. این عوامل معمولاً به شکل تزریقی زیر جلدی یا درون عضلانی استفاده می‌شوند. نیمه عمر پلاسمایی آنها حدود ۸-۴ ساعت است و اثرات بیولوژیک آنها ۴-۲ روز در بدن باقی می ماند. (Gresser 1990). کاربردهای فراوان این دارو باعث شده تا محققین در صدد تولید آن با استفاده از روش‌های DNAی نوترکیب با قیمت مناسب برآیند. این پروتئین تا کنون در میزبان های مختلفی از جمله سلول‌های CHO ، mammary gland of transgenic mice و baculovirus-infected sf9 insect cells بیان شده است (Freedman et al. 1996) اما در واقع امروزه اینترفرون گامای نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* (Actimmun ™) به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین اینترفرون گاما در گیاهان از جمله در سوسپانسیون برنج (Chen et al.

[1] Chloroplast transformation
[2] Position effect
[3] Transgene silencing
[4] Naked DNA
[5] Tissue plasminogen activator

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]

(2004، سلول‌های کوتیلدونی گوجه فرنگی .Ebrahimi et al) (2012 و توتون (Wu et al. 2009) نیز تولید شده است. اما میزان بیان در آنها بسیار پایین بوده است. یکی از راه‌های افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان استفاده از فناوری انتقال ژن به کلروپلاست است. لذا با توجه به مزایای بسیار زیاد انتقال ژن به کلروپلاست و به ویژه مزایایی که بیان پلی سیسترونی ژن‌ها در کلروپلاست دارد در این تحقیق امکان بیان ژن اینترفرون گاما (*ifn-G*) و ژن آمینوگلایکوزید ۳- آدنیل ترانسفراز (*aadA* : ژن مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین) در کلروپلاست توتون به صورت یک اپرون دیسیسترونی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه کلروپلاستی حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی (Human *ifn-G)*

برای تهیه ناقل کلروپلاستی دارای ژن اینترفرون گاما که در آن ژن های *ifn-G* و *aadA* در یک اپرون و تحت کنترل یک راه انداز بیان شوند، ژن *ifn-G* (AF506749) در ناقل کلروپلاستی pKCZ (این ناقل در سال ۲۰۰۱ توسط Zhurong به منظور انتقال ژن به کلروپلاست توتون ساخته شد و در ایران از آقای دکتر هوشنگ علیزاده تهیه شد) بین راه‌انداز *Prrn* (راه‌انداز ژن *rRNA*) و ژن *aadA* در محل آنزیم برشی *Nco*I درج شد تا به صورت دیسیسترونی بیان شود. توالی‌های INSL و INSR در ناقل pKCZ موجود می‌باشند و دقیقا مشابه توالی‌هایی هستند که در ژنوم کلروپلاست توتون در ناحیه توالی‌های تکراری و معکوس (IR) قرار دارند. نوترکیبی بین این توالی‌های مشابه منجر به الحاق توالی بین INSL و INSR در ناقل pKCZ حامل ژن *ifn-G* درون ژنوم کلروپلاست دقیقاً در ناحیه بین trnR-ACG و trnN-GUU می شود. برای تکثیر ژن *ifn-G*، آغازگر پیشرو F1 (5'-cat gcc atg gaa cat cat cat cat cat cat cag gac cca tat gta aaag-3′) و آغازگر پیرو R (5'-cat gcc atg gat ccc tcc ctt cat tac tgg gat gct ctt cgac-3′) با غلظت ۰/۴ µM، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، بافر PCR 1X (سیناژن)، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۴ mM، dNTP با غلظت ۰/۲ mM و آب دو بار استریل مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگر پیشرو حاوی توالی His-tag برای تسهیل در مراحل تخلیص پروتئین اینترفرون گاما در مراحل نهایی و سایت برشی آنزیم *Nco*I می‌باشد و آغازگر پیرو حاوی توالی اتصال به ریبوزوم و سایت برشی برای آنزیم *Nco*I می‌باشد. از آنجا که سایت برشی *Nco*I در ناقل pKCZ بعد از توالی اتصال به ریبوزوم (RBS) مربوط به ژن *aadA* قرار دارد، بنابراین همسانه‌سازی ژن *ifn-G* در این محل، منجر به جدایی سایت شروع ترجمه ژن *aadA* از توالی اتصال به ریبوزوم آن خواهد شد، بنابراین لازم بود توالی اتصال به ریبوزوم دیگری برای ژن *aadA* در آغازگر پیرو تعبیه شود. در مرحله بعد هضم آنزیمی ژن *ifn-G* و ناقل pKCZ با آنزیم *Nco*I و اتصال قطعات هضم شده طبق دستورالعمل‌های استاندارد انجام گرفت .Sambrook et al) (1989. برای اطمینان از همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل pKCZ از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بهره گرفته شد.

تراریختی کلروپلاستی

بذور توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Zanthi) ضد عفونی و برای جوانه زنی بر روی محیط MS[1] قرار داده شدند. بعد از چند هفته برگهایی که طولشان از ۵ سانتی‌متر بیشتر بود و به رنگ سبز تیره بودند برای شلیک انتخاب شدند و بر روی محیط ساقه‌زایی (RMOP) طوری قرار گرفتند که پشت برگ در تماس با محیط باشد. سپس شلیک طبق دستورالعمل‌های استاندارد (Svab and Maliga 1993) انجام شد. برگها بعد از شلیک به قطعات کوچکتر تقسیم شدند و برای باززایی به محیط RMOP که حاوی ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین بود، انتقال یافتند. از آنجا که ژن *aadA* باعث ایجاد مقاومت در برابر اسپکتینومایسین می‌شود، تنها سلول‌هایی می‌توانند زنده مانده و باززا شوند که سازه مذکور را دریافت کرده‌باشند. شش تا هشت هفته بعد از بمباران اولین گیاهان باززا شده برای ریشه‌دار شدن به محیط MS حاوی mg/L ۵۰۰ اسپکتینومایسین انتقال یافتند.

تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح DNA

برای تجزیه گیاهان تراریخت مقاوم به آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین و برای تایید انتقال ژن به این گیاهان در سطح DNA، ابتدا DNAی ژنومی گیاهان تراریخت و شاهد با روش

[1] Murashig and Skoog

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]

CTAB[1] استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ifn-G*، PCR[2] انجام شد. همچنین برای تایید درج ژن در محل صحیح آن در ژنوم کلروپلاست (بین trnR و trnN) با استفاده از آغازگری که بر اساس توالی در درون ژنوم کلروپلاست در نزدیکی trnR طراحی شده بود (Soria-Guerra et al. 2009) به عنوان آغازگر پیشرو و آغازگر پیرو ژن *ifn-G*، PCR دیگری انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح RNA

استخراج RNA با استفاده از محلول RNX-Plus™ (شرکت سیناژن) انجام شد. برای این منظور g ۰/۲ از بافت برگ سبز که با نیتروژن مایع به خوبی سابیده شده بود، درون ویال که محتوی یک میلی‌لیتر از این محلول بود، ریخته شد و بعد از ۳۰ ثانیه مخلوط کردن، ویال به مدت یک ساعت روی یخ قرار داده شد. مقدار µl ۲۰۰ کلروفرم درون ویال اضافه شد و بعد از ۲ تا ۳ بار وارونه کردن ویال، ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل در g x ۱۰۶۲۵ در دمای ۴ºC به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از سه فاز تشکیل شده در ویال، فاز رویی که حاوی RNA می‌باشد به آرامی به ویال استریل انتقال داده شد. سپس µl ۲۰۰ کلروفرم اضافه شد و مرحله قبل مجدداً تکرار شد. به فاز رویی µl ۸۰۰ ایزوپروپانول اضافه شده و بعد از چند بار وارونه‌سازی به مدت یک ساعت در ۲۰ºC- قرار داده شد. بعد از مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در g x ۱۰۶۲۵، RNA رسوب کرد و بعد از شست و شوی رسوب با اتانول ۷۵ درصد، مقدار µl ۳۰ آب DEPC[3] به رسوب اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای ۵۵ºC قرار داده شد تا RNA خوب حل شود. برای حذف DNA های پلاستیدی و ژنومی از DNase I و برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز استفاده شد. واکنش RT-PCR[4] برروی این cDNA انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح پروتئین

کل پروتئین‌های محلول با روش مبتنی بر فنول (Faurobert et al. 2007) استخراج و کمیت آن با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Akins and Tuan 1992). ژل SDS-PAGE[5] به صورت ۱۲ درصد تهیه شد و پروتئین‌ها بر روی ژل به مدت ۱۶ ساعت الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز مراحل رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری برای ظهور باندهای پروتئین انجام شد. همچین برای تشخیص دقیق‌تر پروتئین‌ها از آزمون لکه‌گذاری[6] استفاده شد. پروتئین‌های استخراج شده بر روی غشاء نیتروسلولزی بارگیری و آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه (Santa Cruz) برای تأیید حضور پروتئین اینترفرون گاما طبق دستورالعمل (Sambrook et al. 1989) اضافه شدند و نهایتا سوبسترا (شامل DAB[7]، H_2O_2 و PBS) برای تشخیص اتصال آنتی‌بادی اولیه به پروتئین اینترفرون گاما بر روی غشاء نیتروسلولزی اضافه شد.

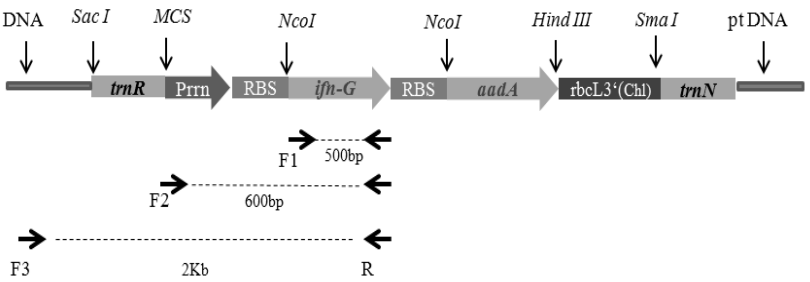
نتایج و بحث

همسانه‌سازی ژن اینترفرون گاما در ناقل pKCZ به وسیله PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. سپس برای تشخیص جهت ژن در سازه با استفاده آغازگر F2 به عنوان آغازگر پیشرو که از ابتدای راه‌انداز Prrn طراحی شده بود و آغازگر پیرو *ifn-G* (R) PCR انجام گرفت. تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی bp ۶۰۰ در PCR نشان‌داد که ژن در جهت صحیح آن درج شده‌است (شکل ۱).

سازه pKCZ-*infG* با بهره‌گیری از تفنگ ژنی و بمباران قطعات برگی توتون به ژنوم کلروپلاستی منتقل شد. حدود شش تا هفت هفته پس از شلیک چندین گیاه در محیط ساقه‌زایی (حاوی mg/L ۵۰۰ اسپکتینومایسین) باززا شدند (شکل۲-الف). گیاهان باززایی شده برای ریشه‌زایی به محیط MS (حاوی mg/L ۵۰۰ اسپکتینومایسین) انتقال یافتند (شکل۲-ب). برای رسیدن به هموپلاسمی کامل در گیاهان تراریخت ۴ دور باززایی در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انجام گرفت و گیاهان تراریخت کلروپلاستی به خاک منتقل شدند (شکل۲- ج).

[1] Cetyl trimethyl ammonium bromide
[2] Polymerase chain reaction
[3] Diethylpyrocarbonate
[4] Reverse transcriptase PCR
[5] Sodium dodecyl sulfate polyacrilamid gel electrophoresis
[6] Dot blot
[7] 3,3'-diaminobenzidine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]



شکل۱- سازه pKCZ-*ifn-G* : trnR و trnN در دو طرف سازه توالی‌های مشابه با ژنوم کلروپلاستی که جهت انجام نوترکیبی الزامی هستند، Prrn راه‌انداز هر دو ژن *ifn-G* و *aadA* ، RBS محل اتصال پروتئین‌های ریبوزومی برای شروع ترجمه، rbcL3'(Chl) توالی خاتمه‌دهنده رونویسی، *aadA* ژن آمینوگلایکوزید ۳- آدنیل ترانسفراز که مقاومت به اسپکتینومایسین را ایجاد می‌کند، *ifn-G* پروتئین اینترفرون گاما را تولید می‌کند. ptDNA ژنوم کلروپلاستی. فلش‌ها جایگاه اتصال آغازگرهای اختصاصی را نشان می‌دهند: F1 توالی ابتدای ژن اینترفرون گاما، F2 توالی ابتدای راه‌انداز Prrn، F3 توالی در درون ژنوم کلروپلاست نزدیک به توالی trnR و R توالی انتهای ژن اینترفرون گاما.

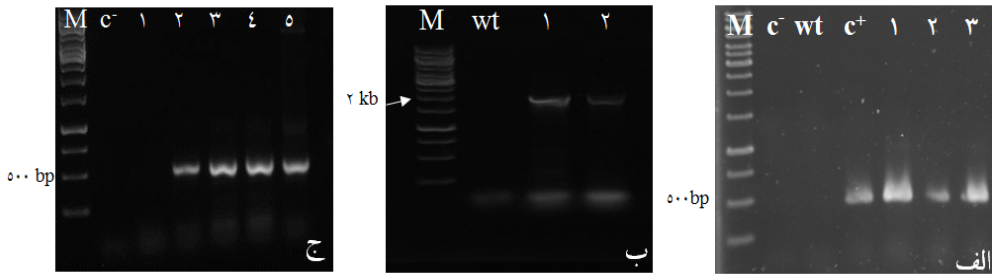


شکل۲- الف) گیاهان باززایی شده بر روی محیط ساقه زایی حاوی ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین شش هفته بعد از بمباران؛ ب) گیاهان ریشه دار شده در محیط MS حاوی ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین؛ ج) گیاهان تراریخت کلروپلاستی منتقل شده به گلدان (بعد از ۴ دور باززایی).

واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی *ifn-G* (F1 و R) بر روی DNAی استخراجی از گیاهان باززا شده انجام شد و تراریختی این گیاهان را تأیید کرد (شکل ۳- الف). همچنین ورود ژن اینترفرون گاما در محل صحیح در ژنوم کلروپلاست به وسیله PCR با آغازگرهایی که به این منظور طراحی شده بود (F3 و R)، اثبات شد. شکل۱ محل طراحی این آغازگرها را به صورت شماتیک نشان می‌دهد. فاصله این دو آغازگر در گیاهان تراریخت که توالی بین trnR و trnN را در pKCZ دریافت کرده‌اند، تقریبا ۲ kb می‌باشد در صورتی که در گیاهان شاهد این قطعه دیده نمی‌شود (شکل۳ - ب).

واکنش RT-PCR بر روی cDNA گیاهان شاهد و تراریخت انجام شد و برای اطمینان از حذف کامل DNAهای پلاستیدی، RNAی استخراجی از گیاهان تراریخت که با آنزیم DNase I تیمار شده بود نیز مورد PCR قرار گرفت. تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح پروتئین الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده از برگ گیاهان تراریخت و شاهد توتون بر روی ژل SDS-PAGE انجام شد و یک باند تقریباً ۲۲ کیلو دالتونی در گیاهان تراریخت مشاهده شد ولی در گیاهان شاهد این مشاهده نشد (شکل۴). همچنین برای اطمینان بیشتر از بیان ژن اینترفرون گاما در سطح پروتئین آزمون لکه‌گذاری انجام شد و اتصال پروتئین اینترفرون گاما به آنتی بادی اختصاصی به وسیله سوبسترای DAB اثبات شد (شکل ۵).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]



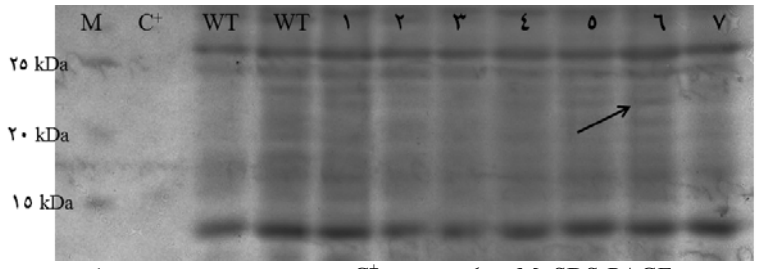
شکل۳- الف) نتایج PCR بر روی گیاهان باززا شده برای تأیید انتقال ژن اینترفرون گاما به ژنوم کلروپلاست توتون با استفاده از آغازگرهای F1 و R. M نشانگر 1 kb؛ C^- کنترل منفی؛ wt گیاه شاهد؛ C^+ کنترل مثبت؛ ۱-۳) گیاهان تراریخت کلروپلاستی ب) نتایج PCR برای تأیید درج ژن اینترفرون گاما در محل صحیح درون ژنوم کلروپلاست با استفاده از آغازگرهای F3 و R. M نشانگر 1 kb، wt گیاه شاهد؛ ۱-۲) گیاهان تراریخت کلروپلاستی ج) نتایج RT-PCR. M نشانگر 1 kb، C^- کنترل منفی؛ ۱) RNA کل بعد از تیمار با DNase؛ ۲) کنترل مثبت؛ ۳-۵) cDNA به عنوان الگوی PCR.

در این تحقیق ژن اینترفرون گاما به همراه یک ژن گزینش‌گر *(aadA)* به وسیله ناقل pKCZ در محل مناسبی در ژنوم کلروپلاست توتون درج شد و بیان آن در یک اپرون دیسیترونی به وسیله روش‌های RT-PCR و لکه‌گذاری در سطح RNA و پروتئین اثبات شد. همسانه‌سازی ژن در ژنوم پلاستیدی به وسیله ناقل pKCZ در حد فاصل بین دو ژن *tRNA* آرژنین و آسپارژین است که یکی از نواحی مناسب برای ورود ژن خارجی می‌باشد. زیرا رونوشت‌های ژن‌های *tRNA* در دو سمت این ناحیه سبب افزایش پایداری mRNAی حاصل از ژن‌های ورودی می‌شود. از طرف دیگر به دلیل آنکه محل ورود ژن در نواحی تکراری معکوس (IR) ژنوم پلاستیدی واقع شده، اگر یکی از این توالی-های تکراری ژن مورد نظر را دریافت کند، در اثر نوترکیبی توالی دوم هم آن را دریافت خواهد کرد. لذا تعداد نسخه‌های ژن ورودی در هر نسخه ژنوم کلروپلاست دو برابر شود. در واقع این مسأله به نوبه خود می‌تواند باعث افزایش بیان پروتئین‌های خارجی شود که یکی از اهداف این پروژه بوده است. البته انتقال ژن به هسته گیاهان هنوز دارای مزیت‌هایی نسبت به کلروپلاست می‌باشد از جمله انجام تغییرات پس از ترجمه از قبیل گلیکوزیلاسیون بر روی پروتئین‌ها که در کلروپلاست رخ نمی-دهد. پروتئین اینترفرون گاما نیز همان طوری که گفته شد در دو محل گلیکوزیله می‌شود اما نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که هر دو مولکول گلیکوزیله شده و غیر گلیکوزیله شده اینترفرون گاما از نظر بیولوژیکی فعال هستند (Wetzel et al. 1990). بنابراین محدودیتی برای تولید آن در کلروپلاست از نظر فرایندهای پس از ترجمه وجود ندارد.

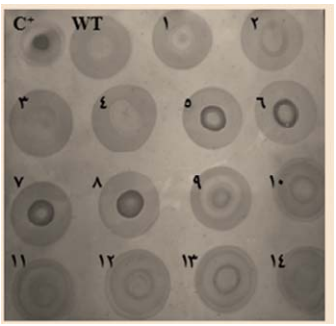
ژن اینترفرون گاما به هسته گیاهان مختلفی از جمله توتون انتقال یافته است اما میزان بیان در آنها بسیار پایین بوده‌است مثلا در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ انجام گرفته بیشترین میزان بیان در توتون ۰/۰۴ درصد از کل پروتئین محلول برگ بوده است (Wu et al. 2009) و در تحقیق دیگری ۰/۰۰۱ درصد (Leelavathi et al. 2003) بوده است. برای افزایش بیان و پایداری این پروتئین با روش تراریختی هسته‌ای از اتصال آن به اولئوسین و بیان آن در بذر کلزا با یک راه‌انداز القایی می‌توان نام برد (Bagheri et al. 2010). به هر حال بیان ژن در کلروپلاست بسیار بیشتر از هسته است و می‌تواند باعث کاهش قابل توجهی در هزینه‌ها شود. مثلا انتقال ژن پروانسولین به کلروپلاست گیاه کاهو منجر به تولید آن تا ۴۷ درصد از کل پروتئین برگ شده است (Boyhan et al. 2011). اما مساله تجزیه شدن پروتئین‌هایی از جمله اینترفرون گاما باز هم محدودیتی ایجاد کرده که برای حل این مشکل محققین از تکنیک اتصال به پروتئین های پایدار مانند CTB[1] و GUS استفاده می‌کنند در یک تحقیق اینترفرون گاما با پروتئین GUS متصل شده در کلروپلاست تولید شده است و میزان بیان پروتئین بسیار افزایش یافته است (Leelavathi et al. 2003). ولی اتصال این پروتئین‌ها نیز مسائل دیگری مانند اختلال در اثرات بیولوژیکی را به وجود می‌آورد.

[1] Cholera toxin b subunit

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]



شکل۴- الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل SDS-PAGE، M نشانگر پروتئین، C^+ کنترل مثبت (پروتئین اینترفرون گاما: ایموکین)، WT پروتئین استخراج شده از گیاهان غیر تراریخت، ۱ تا ۶ پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون. فلش محل پروتئین نوترکیب را نشان میدهد.



شکل۵- بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما با روش لکه گذاری، C^+ پروتئین کنترل مثبت (پروتئین اینترفرون گاما)، WT) پروتئین استخراج شده از گیاه غیر تراریخت، ۱ تا ۱۴) پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی، تغییر رنگ در شماره های ۹ تا ۱۳ نشان دهنده بیان پروتئین اینترفرون گاما در گیاهان تراریخت می باشد.

در این تحقیق همچنین امکان بیان ژن اینترفرون گاما و ژن گزینش‌گر در قالب یک اپرون بررسی شد. بسیاری از ژن‌ها در ژنوم کلروپلاست به صورت اپرون سازمان‌دهی شده‌اند بدین معنی که مجموعه دو یا چند ژن به وسیله RNA پلیمراز از یک راه انداز رونویسی می‌شوند. بنابراین اگر هدف انتقال چند ژن به طور همزمان به ژنوم کلروپلاست باشد می‌توان این ژن ها را فقط با یک راه انداز و یک ژن گزینش‌گر در یک بار شلیک وارد ژنوم ساخت که در این صورت کار انتقال ژن‌ها ساده‌تر شده و در زمان کوتاه‌تری امکان‌پذیر می‌شود. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ انجام شده است، ژن *GFP* با ژن *aadA* به صورت دیسیسترونی در توتون با موفقیت بیان شده است (Jeong et al. 2004) همچنین در سال ۲۰۰۹ در تحقیق دیگری بیان پلی پپتید DPT (واکسن تلفیقی علیه سه بیماری دیفتری، کزاز و سیاه سرفه) به صورت همزمان با ژن مقاومت *aadA* در کلروپلاست توتون بیان شد (Soria-Guerra et al. 2009). در این تحقیق نیز بیان همزمان ژن *aadA* با اینترفرون گاما در قالب یک اپرون دی سیسترونی در کلروپلاست گیاه توتون بررسی شد و نتایج این تحقیق نیز نشان داد که بیان همزمان چندین ژن در کلروپلاست در قالب یک اپرون یعنی با یک راه انداز و یک خاتمه دهنده امکان‌پذیر است که در انتقال ژن به هسته امکان آن وجود ندارد.

در مجموع طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت استفاده از سیستم بیانی کلروپلاست در گیاه توتون برای تولید پروتئین اینترفرون گاما می‌تواند به عنوان یک روش ایمن و ارزان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که این نوع داروها را با قیمت‌های بالا وارد می‌کنند، بسیار مفید باشد. اما تحقیقات بیشتر جهت رفع معضلات آن نظیر افزایش پایداری پروتئین در کلروپلاست و توسعه روش‌های تخلیص پروتئین از گیاه ضروروی می‌باشد.

منابع

Akins RE, Tuan RS (1992) Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. Biotechniques 12: 496.

Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplastderived interferon-a2b. Plant Biotechnol 5: 511-525.

Bagheri KH, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, Zebarjadi A (2010) Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. African Journal of Biotechnology 9: 5066-5072.

Boyhan D, Daniell H (2011) Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. Plant Biotechnolohy Journal 9: 585-598.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR (1988) Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. Science 240: 1534-1537.

Chen TL, Lin YL, Lee YL, Yang NS, Chan MT (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. Transgenic research 13: 499-510.

Daniell H, Carmona-Sanchez O, Burns B (2004) Chloroplast derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. In: Molecular Farming. Fischer R and Schillberg S (Eds.) Verlag Publ, Wenham, Germany 113-133.

Daniell H, Uiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W (2009) Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. BMC Biotechnology 9: 23.

Ebrahimi N, Memari HR, Ebrahimi MA, Ardakani MR (2012) Cloning, transformation and expression of hunan gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). Biotechnology and Biotechnological equipment 26: 2925-2929.

Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J (2007) Plant proteomics: method and protocols. Humana Press, New Jersey, USA, 9 -14.

Freedman RB, Jenkins N, James DC, Goldman MH, Hoare M, Oliver RWA, Green BN (1996) Posttranslational processing of recombinant human interferon- in animal expression systems. Protein Science 5: 331-340.

Ganes CS, Lengyels P (1992) The Interferon System a bird's eye view of its biochemistry. Journal of Biological Chemistry 267: 5017-5020.

Gresser I (1990) Biologic effects of interferons. Investigative Dermatology 95: 66-71.

Honari H (2008) Expression of *PA* gene from Bacillus antracis in Iranian lettuce (*Lactuca sativa*). Dissertations, Tehran University, Iran. (In Farsi).

Jeong SW, Jeong WJ, Woo JW, Choi DW, Park YI, Liu JR (2004) Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. Plant Cell Report 22: 747-751.

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

Masoumi Asl M, Jalali Javaran F, Mahbodi F Alizadeh H (2009) Cloning and Transformation of human tissue Plasminogen Activator (t-PA) gene in Tobacco Plants. Iranian Journal of Biology 22: 516- 529. (In Farsi).

Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Siva Reddy V (2010) Recent advances in chloroplast transformation. Indian Journal of Science and Technology 3: 1229-1235.

Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R (2009) Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 106: 6579-6584.

Rajabi-Memari H, Jalali-Javaran M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh Moghadam M, Esmaili A (2006) Expression and characterization of a recombinant single-domain monoclonal antibody against MUC1 mucin in tobacco plants. Hybridoma 25: 209- 215.

Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NewYork, USA.

Soria-Guerra RE, Alpuche-Solis AG, Rosales-Mendoza S, Moreno-Fierros L, Bendik EM, Martinez-Gonzales L (2009) Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer. Plant 229:1293-1302

Svab Z, Hajdukiewicz P Mailga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. Proceeding of the National Academy of Science of USA 87: 8526-8530.

Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. Proceeding of the National Academy of Science of USA 90: 913-917.

Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. Plant Physiology 145:1129-1143.

Wetzel R, Perry LJ, Veilleux C, Chang G (1990) Mutational analysis of the C-terminus of human interferon-γ. Protein Engineering 3: 611-623.

Wu Y, Zhao D, Song L, Xu W (2009) Heterologous expression of synthetic chicken IFN-γ in transgenic tobacco plants. Biology 64: 1115-1122.

Zhurong Z (2001) Analysis of cis-acting expression determinants of the tobacco *psbA* 5'UTR in vivo. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.4.1.9]