همسانه‌سازی، انتقال و بیان دائم فیوژن ژن‌های اینترفرون گامای انسانی و *bar* در گیاه توتون

بهاره ذاکرقرآن[۱]، حمید رجبی معماری[۲،*]، داریوش نباتی احمدی[۲] و مرضیه سیاه مرد[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱٤)

چکیده

تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی، به‌عنوان یک پروتئین نوترکیب درمانی، در مطالعات پزشکی اهمیت بسیاری دارد. ویژگی‌های اینترفرون گاما، آن را به یک فاکتور ضد سرطانی مناسب تبدیل کرده است. فسفینوتریسین (PPT) مهارکننده گلوتامین سینتاز است و از گروه علف‌کش‌های غیرانتخابی بیالافوس می‌باشد. ژن bar کد کننده آنزیم فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (PAT) است. این آنزیم باعث ایجاد مقاومت به علف‌کش فسفینوتریسین می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر انتخابی در گیاهان استفاده شود. در این پژوهش، ژن اینترفرون گامای انسانی و ژن bar به‌صورت فیوژن در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA 1305.1 تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S و خاتمه دهنده NoS همسانه‌سازی شد. صحت همسانه‌سازی فیوژن IFNγ- Bar در ناقل بیانی حاضر با استفاده از تکنیک‌های مختلف Colony PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. سازه‌ی تهیه شده (pCAMBIA1305.1- IFNγ- Bar) با استفاده از روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 انتقال داده شد و با استفاده از روش دیسک برگی در ژنوم گیاه توتون ادغام شد. گیاهان تراریخته احتمالی در محیط گزینشگر، حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین انتخاب شدند. پس از ریشه‌دار شدن به خاک انتقال یافتند و حضور فیوژن IFNγ- Bar در ژنوم این گیاهان با استفاده از تکنیک PCR تأیید شد. در آنالیز دات‌بلات نیز حضور پروتئینIFNγ-bar در گیاهان تراریخت توتون تأیید شد.

واژگان کلیدی: اینترفرون گامای انسانی، بیان دائم، گیاه توتون، ژن *bar*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **memari@scu.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

مقدمه

اینترفرون گاما یک پروتئین مهم دارویی است. اینترفرون‌ها سیتوکین‌های طبیعی هستند که علاوه بر فعالیت‌های ضدویروسی، در مهار رشد سریع سلولی و تنظیم ایمنی نقش دارند (Ma *et al.*, 2003). اینترفرون‌ها به سه گروه آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) تقسیم شده‌اند (Zamani *et al.*, 2006) که در بین آن‌ها اینترفرون گاما نقش مهم‌تری در تنظیم ایمنی دارد. این گلیکوپروتئین محصول فعالیت سلول‌های لنفوسیت T و سلول‌های کشنده طبیعی[1] است که به‌عنوان یک عامل ضدویروسی مشخص شده است (Sareneva *et al.*, 1995). اینترفرون گاما به‌طور عمده در درمان سندرم نقص بیماری مادرزادی، لیشمانیا[2]، سالمونلاتیفی‌موریوم[3] (Nauciel and Espinasse-Maes, 1992) و بیماری‌های نوروبلاستوم[4] (Seeger *et al.*, 1998) و ملانوم[5] (Abdel-Wahab *et al.*, 1997) استفاده می‌شود. سیستم میزبان‌های پروکاریوتی به‌طور کلی برای استفاده و نگهداری، آسان و مقرون به‌صرفه می‌باشند، اما در انجام تغییرات پس از ترجمه ناتوان هستند. از سوی دیگر، تولید پروتئین نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتی بسیار پرهزینه می‌باشد (Yin *et al.*, 2007).

غالباً بیان اینترفرون گامای نوترکیب متکی بر سیستم‌های سلولی میکروبی و پستانداران بوده است. اینترفرون گامای نوترکیب بیان‌شده در این سیستم‌ها پروفایل‌های مختلف گلیکوزیلاسیون، آسیب‌پذیری نسبت به پروتئولیز و پایداری کوتاه در خون را نشان می‌دهد و از سوی دیگر، هزینه‌های تولید آن‌ها بالا می‌باشد (Chen *et al.*, 2004). در فاصله‌ی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۸۲ اینترفرون گاما در اشرشیاکلی[6] بیان شد، اما *E. coli* به‌عنوان یک باکتری قادر به اتمام تغییرات پس از ترجمه نیست. در سال ۱۹۹۳ بیان اینترفرون گاما در ساکرومایسس‌سرویزیه[7] رضایت‌بخش نبود و به‌طور مشابه، بازده بیان اینترفرون گامای انسانی در سلول‌های تخمدان موش چینی مأیوس کننده بود (Davoudi *et al.*, 2011)؛ بنابراین، برخی تحقیقات برای از بین بردن این محدودیت‌ها و بیان اینترفرون گاما در گیاهان انجام شده است. جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب گیاهان در مقایسه با سیستم‌های سنتی مزایای کاربردی، اقتصادی و ایمنی (عدم آلودگی به پاتوژن‌های حیوانی) بیشتری دارند. توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه یوکاریوتی مانند گلیکوزیلاسیون و ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی که اغلب برای فعالیت بیولوژیکی بسیاری از پروتئین‌های پستانداران ضروری بوده (Ma *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2004)، از دیگر مزایای آن‌ها می‌باشد. همسانه‌سازی و بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در بذور کلزا (Taheri-Javan, 2008; Bagheri, 2009)، توتون (Azhdari, 2009) و همچنین در کشت سلولی سوسپانسیون برنج (Chen *et al.*, 2004) با موفقیت انجام شده است.

فسفینوتریسین[8] مهارکننده گلوتامین سینتاز[9] در باکتری‌ها و گیاهان است و از گروه علف‌کش‌های غیرانتخابی بیالافوس[10] می‌باشد. مقاومت در برابر فسفینوتریسین (از طریق بیان ژن bar) توسط آنزیم فسفینوتریسین N استیل ترانسفراز (PAT) ایجاد می‌شود (Thampson *et al.*, 1987) که این آنزیم با استیله کردن گروه آمین فسفینوتریسین باعث غیرفعال شدن آن می‌شود. ژن ***bar*** اولین بار از *Streptomyces hygroscopicus* جداسازی شده است. در مقایسه با نشانگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، ژن بار مزایای قابل‌توجهی ارائه می‌دهد، زیرا انتخاب گیاهان تراریخته‌ی روییده در شرایط آزمایشگاه و زمین زراعی را می‌توان با هزینه و تخصص فنی کمتری به‌دست آورد (D'Halluin *et al.*, 1992). محصولات مقاوم در برابر علف‌کش توسط بیان ژن بار در ذرت (Spencer *et al.*, 1990)، نیشکر (Falco *et al.*, 2000)، سیب‌زمینی

1. Natural killer
2. *Leishmania*
3. *Salmonella Typhimurium*
4. *Neuroblastoma*
5. *Melanoma*
6. *E. coli*
7. *Saccharomyces cerevisiae*
8. Phosphinothricin
9. Glutamin synthase
10. Bialaphos

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

(De-Block *et al.*, 1995) و برنج (Kim *et al.*, 1999) با استفاده از انتقال به‌واسطه اگروباکتریوم به‌دست آمده است. باید توجه کرد که آنزیم فسفینوتریسین –N– استیل ترانسفراز[1] در محصولات تراریخت پتانسیل بسیار پایینی به لحاظ آلرژیک و سمی بودن دارد که این به‌واسطه، خصوصیات فیزیولوژیک این آنزیم (تجزیه سریع در شرایط گوارشی پستانداران و فقدان پایداری در گرما)، غلظت پایین در بافت‌های گیاهی و محصولات غذایی حیوانات اهلی و نهایتاً فقدان همولوژی توالی آمینواسیدی این آنزیم با پروتئین‌های سمی و آلرژیک، می‌باشد(Metz *et al.*, 1998).

این تحقیق اولین گزارش از همسانه‌سازی ژن اینترفرون گامای انسانی به‌صورت فیوژن با ژن گزینشگر *bar* در ناقل pCAMBIA1305.1 در ایران است. با توجه به ارزش دارویی پروتئین IFNγ در پزشکی و نیز اهمیت ژن گزینشگر *bar*، پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی ژن IFNγ به همراه ژن گزینشگر *bar* در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1 انجام شد تا امکان انتقال سازه حاصل به گیاه توتون فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ناقل‌های pRSET دارای ژن IFNγ و PCAMBIA-3301 دارای ژن *bar* به‌عنوان الگو برای تکثیر اختصاصی ژن‌های IFNγ و *bar* در واکنش PCR و از ناقل pCAMBIA1305.1 برای همسانه‌سازی این ژن‌ها استفاده شد.

همسانه‌سازی ژن IFNγ در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1305.1

به‌منظور تکثیر ژن IFNγ دو آغازگر اختصاصی بر اساس توالی موجود در بانک ژن (با شماره دسترسی NM_000619.2)، شامل جایگاه‌های برشی SpeI و BsrGI ، توالی His Tag و جایگاه پروتئازی فاکتور Xa، طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد. توالی آغازگرهای ژن IFNγ به شرح زیر می‌باشد:

Forward primer: 5'-GATAGCAA ACT AGT CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA G-3'

Reverse primer 5'-TATATATA TGT ACA ACG CGT GCG GCC CTC GAT CTG GGA TGC TCT TCG ACC TCG AAA C-3'

پلاسمید pCAMBIA1305.1 با استفاده از کیت شرکت Bioneer استخراج و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *SpeI* و *BsrGI*، با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت Bioneer تخلیص شد. ژن IFNγ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و هضم آنزیمی مذکور انجام شد. سپس محصول واکنش هضم با استفاده از کیت PCR Purification شرکت QIAGENE تخلیص و در واکنش اتصال با ناقل برش خورده با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase، استفاده شد. انتقال سازه‌ی نوترکیب pCAMBIA1305.1-IFNγ به سلول‌های مستعد *E.coli* به روش شوک حرارتی انجام گرفت. به‌منظور شناسایی کلونی‌های مثبت، بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط گزینشگر (حاوی کانامایسین)، Colony PCR انجام و کلونی‌های مثبت انتخاب شده با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شدند.

همسانه‌سازی ژن گزینشگر *bar* در سازه‌ی PCAMBIA1305.1-IFNγ

به‌منظور تکثیر ژن *bar* دو آغازگر اختصاصی بر اساس توالی موجود در بانک ژن (با شماره دسترسی JQ293091)، شامل جایگاه‌های برشی *BsrGI* و *BstEII*، توالی His Tag و لینکر GPGP، طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد. توالی آغازگرهای ژن *bar* به شرح زیر می‌باشد:

Forward primer: 5'-TATATATA TGT ACA GGC CCT GGC CCT ATG AGC CCA GAA CGA CGC CCG GCC GAC ATC-3'

Reverse primer 5'-GAGATATC GGTCACC TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG AAT CTC GGT GAC GGG CAG GAC-3'

در این پژوهش ژن *bar* به‌صورت فیوژن به ژن IFNγ همسانه‌سازی شد. بدین منظور، پلاسمید PCAMBIA1305.1-IFNγ استخراج و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *BsrGI* و *BstEII*، تخلیص شد. ژن *bar* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

1. Phosphinothricin N- acetyl transferase

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

تکثیر و هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های برشی انجام شد. سپس محصول واکنش هضم تخلیص و در واکنش اتصال با ناقل برش خورده با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase، استفاده شد. انتقال سازه‌ی نوترکیب PCAMBIA1305.1-IFNγ-*Bar* به سلول‌های مستعد *E .coli* به روش شوک حرارتی انجام گرفت. به‌منظور شناسایی کلونی‌های مثبت، بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط گزینشگر (حاوی کانامایسین)، Colony PCR انجام شد و برای تأیید نهایی همسانه‌سازی کلونی‌های مثبت انتخابی با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت انتقال ژن به گیاه، انتقال سازه‌ی نوترکیب حامل ساختار فیوژن ژن‌های IFNγ و *bar* به اگروباکتریوم[1] سویه LBA4404 با استفاده از روش انجماد و ذوب (Sambrook and Russel, 2001) انجام شد و جهت تأیید نهایی حضور ناقل بیانی نوترکیب در باکتری از تکنیکColony PCR استفاده شد.

تهیه‌ی ریزنمونه

در این تحقیق از گیاه توتون (*Nicotiana tobaccum* cv. Xanthi) جهت تراریختی استفاده شد. به‌منظور تهیه‌ی ریزنمونه‌های درون شیشه‌ایی مناسب جهت تراریختی، بذور توتون ابتدا توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، سپس در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۸ دقیقه قرار داده شده و در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور استریل پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل، در محیط MS کامل (شرکت Duchefa) کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت نور فلورسنت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. پس از اینکه گیاهان به اندازه کافی رشد کردند از برگ‌های جوان آن‌ها به‌عنوان ریزنمونه در فرآیند تراریختی استفاده شد.

آماده‌سازی اگروباکتریوم

اگروباکتریوم تومه‌فاسینس[2] سویه LBA4404 در بردارنده پلاسمید نوترکیب pCAMBIA1305.1-IFNγ-*bar* در تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای آماده‌سازی سوسپانسیون تلقیح، یک کلونی از باکتری حاوی سازه‌ی موردنظر در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری (LB[3]) مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین کشت شد و پس از اینکه OD باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ رسید، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب باکتری‌ها در محیط تلقیح (حاوی نمک‌های محیط کشت MS، گلوکز ۵ درصد با pH برابر ۷/۵ و استوسرینگون ۲۰۰ میکرو مولار)، به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شدند.

تراریختی سلول‌های گیاه توتون با استفاده از اگروباکتریوم

جهت انجام تراریختی ریزنمونه‌ها، به روش دیسک برگی عمل شد. ریزنمونه‌های برگی ۱-۰/۵ سانتی‌متری از برگ‌های جوان گیاهان ۱ الی ۲ ماهه تهیه و در محیط تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده به مدت ۲ روز در محیط هم‌کشت شامل MS پایه به همراه هورمون‌های BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از آن به‌منظور حذف آگروباکتریوم، ریزنمونه‌ها با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر شسته شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط باززایی شامل محیط هم‌کشت تکمیل شده با آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر جهت انتخاب گیاهچه‌های تراریخته و سفوتاکسیم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر جهت حذف اگروباکتریوم، انتقال داده و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با دوره‌ی

1. *Agrobacterium*

2. *A. tumefaciens*
3. Luria Bertani broth

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت نور فلورسنت سفید قرار گرفتند. واکشت ریزنمونه‌های باززایی شده هر دو هفته در محیط‌های گزینشگر مشابه انجام شد. به‌منظور ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده، گیاهچه‌ها به محیط ریشه‌زایی (MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA) منتقل شدند.

استخراج DNA و آنالیز PCR

جهت تعیین حضور احتمالی ژن هدف در ژنوم گیاهان باززایی شده مقاوم به هیگرومایسن، DNA ژنومی از برگ‌های جوان این گیاهچه‌ها همراه با گیاهان مادری غیرتراریخته، به روش CTAB استخراج شد. به‌منظور تأیید حضور ترانس‌ژن، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ انجام گرفت و محصول PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شد.

استخراج پروتئین و آنالیز دات‌بلات

پس از استخراج کل پروتئین محلول از برگ‌های جوان گیاهان تراریخت و غیرتراریخت، آنالیز دات‌بلات بر اساس دستورالعمل شرکت Roche انجام شد. به این ترتیب که نمونه‌های پروتئینی مستقیماً به‌صورت نقاطی بر روی غشاء نیتروسلولز گذاشته شدند. پس از خشک شدن، محلول1X western blocking اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای۲۵ – ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول قبلی را دور ریخته و Anti-His6 Peroxidase را جایگزین نموده و به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. سپس محلول را دور ریخته و با TBST 1x سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شد. در نهایت سوبسترای آنتی‌هیستیدین (شرکت Roche) را اضافه نموده و پس از ظهور رنگ، غشاء نیتروسلولزی با آب مقطر شسته شد و نمونه‌های تراریخت و غیرتراریخت ارزیابی شدند.

نتایج و بحث

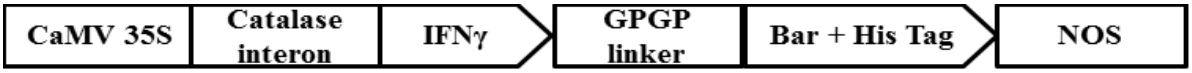
همسانه‌سازی ژن IFNγ در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1305.1

ژن IFNγ با استفاده از پلاسمید pRSET به‌عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. محصول PCR به‌دست آمده در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1، همسانه‌سازی گردید. سپس محصول اتصال از طریق شوک حرارتی به درون سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شد. جهت تأیید کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط گزینشگر، از دو روش، Colony PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ و هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های برشی *SpeI* و *AflII*، استفاده شد، در تکثیر با آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ی ٤٥٠ bp تکثیر گردید و نتایج به‌دست آمده همسانه‌سازی را در کلون‌های انتخابی تأیید نمود. تأیید نهایی بر حضور ژن اینترفرون گاما در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1 با استفاده از توالی‌یابی، انجام شد.

همسانه‌سازی ژن گزینشگر bar در سازه‌ی pCAMBIA1305.1-IFNγ

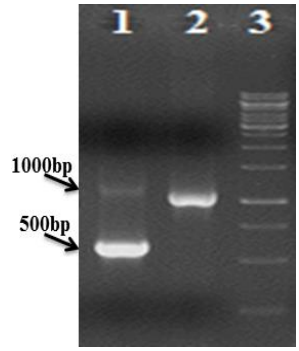
ژن *bar* با استفاده از پلاسمید pCAMBIA3301 به‌عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. محصول PCR به‌دست آمده در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1-IFNγ، بین دو جایگاه برشی *SpeI* و *BstEII*، بعد از توالی افزایش دهنده‌ی بیانی اینترونی کاتالاز همسانه‌سازی گردید (شکل ۱). سپس محصول اتصال (pCAMBIA1305.1-IFNγ-*bar*) از طریق شوک حرارتی به درون سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شد. جهت تأیید کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط گزینشگر، از دو روش، Colony PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *bar* و هضم آنزیمی با کمک آنزیم برشی مناسب، استفاده شد. در تکثیر با آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ی ۵۵۰ bp تکثیر گردید و همسانه‌سازی را در کلون‌های انتخابی تأیید نمود. برای اطمینان بیشتر و تأیید همسانه‌سازی ژن *bar* به‌صورت فیوژن با ژن IFNγ در این سازه، تکنیک Colony PCR با استفاده از آغازگر رفت IFNγ و آغازگر برگشتی *bar* انجام شد و با مشاهده باند ۱۰۵۰ bp حضور فیوژن IFNγ-*bar* در سازه pCAMBIA1305.1 تائید شد (شکل۲).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]



شکل ۱- همسانه‌سازی کاست بیانی IFNγ-*bar* در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1. فیوژن IFNγ-*bar* بین دو جایگاه برشی *SpeI* و *BstEII*، بعد از توالی افزایش دهنده‌ی بیانی اینترونی کاتالاز همسانه‌سازی شده است

Figure 1. Cloning of IFNγ-*bar* fusion in pCAMBIA1305.1 expression vector. The IFNγ-*bar* has been cloned between the *Spe*I and *Bst*EII restriction sites and downstream of the catalase intron



شکل ۲- تائید حضور فیوژن IFNγ-*bar* در سازه pCAMBIA1305.1: چاهک۱: باند ۵۵۰ نتیجه تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *bar*، چاهک ۲: باند ۱۰۰۰ bp نتیجه تکثیر با آغازگر رفت IFNγ و آغازگر برگشتی *bar* تأییدی بر حضور فیوژن IFNγ-*bar*، چاهک ۳: نشانگر اندازه 1Kb

Figure 2. Confirmation of the presence of IFNγ-*bar* fusion in pCAMBIA1305.1. 1: The 550 bp fragment of *bar* gene. 2: The 1000 bp fragment of IFNγ-*bar* fusion. 3: One kb DNA marker

هضم آنزیمی با کمک آنزیم برشی *AflII* انجام شد (شکل ۳). تأیید نهایی بر حضور ژن *bar* در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1-IFNγ با استفاده از توالی‌یابی، انجام شد. انتقال ناقل بیانی نوترکیب به درون اگروباکتریوم صورت گرفت و باکتری‌های نوترکیب از طریق واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ارزیابی و حضور ژن هدف تأیید شد.

انتقال ژن فیوژن IFNγ-*bar* به گیاه توتون

بعد از تاریخت کردن گیاهان توتون، گزینش گیاهان تاریخت بر روی محیط حاوی هیگرومایسین انجام شد. پس از ۵ هفته ریزنمونه‌های تلقیح شده باززایی شدند (شکل ٤-A) و هر سه هفته یک‌بار بر روی محیط گزینشگر جدید واکشت شدند. گیاهچه‌های باززایی شده مقاوم به هیگرومایسین، پس از چند هفته تولید نو ساقه نمودند که این نو ساقه‌ها در شرایط استریل جدا شده و به محیط کشت ریشه‌زایی، برای رشد و ریشه‌زایی منتقل شدند (شکل ٤-B) و در نهایت به ورمی‌کولایت و به خاک انتقال یافتند (شکل ٤-C). گیاهان غیرتراریخت به‌تدریج زرد شده و از بین رفتند (شکل ٤-D).

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA

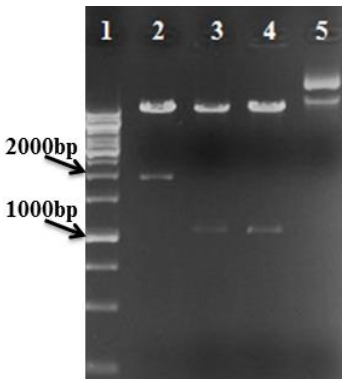
پس از استخراج DNA، برای تأیید حضور و درج T-DNA حاوی فیوژن IFNγ-*bar*، در ژنوم گیاه توتون حاصل از تلقیح، آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ بر روی گیاهان مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین انجام شد. آنالیز PCR حضور ژن IFNγ را در گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین تأیید نمود. وجود نوار ٤٥٠ bp در گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی، نشان دهنده‌ی درج احتمالی ژن IFNγ در ژنوم این گیاه می‌باشد. در گیاهان غیرتراریخت هیچ‌گونه باندی تکثیر نشد که نشان دهنده‌ی عدم حضور ترانس‌ژن در ژنوم آن‌ها می‌باشد. با این حال، به‌منظور تأیید نهایی درج ژن هدف در ژنوم توتون و تراریختی گیاهان انتخابی آنالیزهای مناسب‌تری مورد نیاز است.

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA

پس از استخراج DNA، برای تأیید حضور و درج T-DNA حاوی فیوژن IFNγ-*bar*، در ژنوم گیاه توتون حاصل از تلقیح، آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای

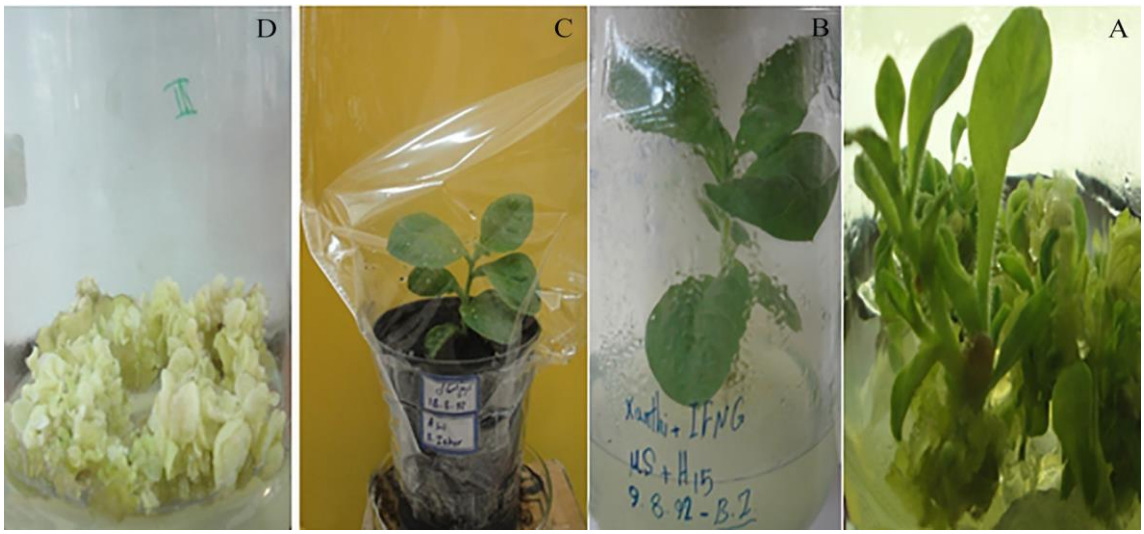
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

اختصاصی ژن IFNγ بر روی گیاهان مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین انجام شد. آنالیز PCR حضور ژن IFNγ را در گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین تأیید نمود. وجود نوار ٤٥٠ bp در گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی، نشان دهنده‌ی درج احتمالی ژن IFNγ در ژنوم این گیاه می‌باشد. در گیاهان غیرتراریخت هیچ‌گونه باندی تکثیر نشد که نشان دهنده‌ی عدم حضور ترانس‌ژن در ژنوم آن‌ها می‌باشد. با این حال، به‌منظور تأیید نهایی درج ژن هدف در ژنوم توتون و تراریختی گیاهان انتخابی آنالیزهای مناسب‌تری مورد نیاز است.



شکل ۳- تائید هضم آنزیمی حضور ژن *bar* در سازه نوترکیب pCAMBIA1305.1-IFNγ: چاهک ۱: نشانگر اندازه 1Kb، چاهک ۲: کنترل منفی، هضم آنزیمی pCAMBIA1305.1-IFNγ با *AflII* و مشاهده باند ۱۸۰۰ bp شامل ژنIFNγ و GUS Plus و بخشی از ناقل، چاهک۳ و ٤: سازه نوترکیب پس از هضم آنزیمی با *AflII* و مشاهده باند ۱۰۵۰ bp شامل فیوژن IFNγ-*bar*

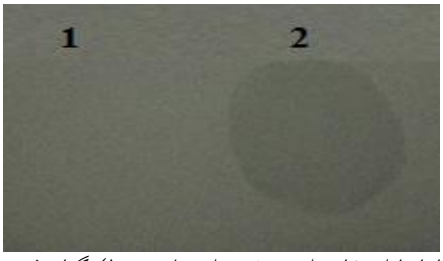
Figure 3. The restriction digest confirmation of pCAMBIA1305.1-IFNγ construct. 1: One kb DNA marker. 2: Negative control, restriction digest with *AflII*, the 1800 bp fragment of IFNγ gene, GUS Plus and a section of plasmid. 3, 4: The restriction digest of recombinant construct with *AflII*, the 1050 bp fragment of IFNγ-*bar* fusion



شکل٤- تولید گیاهان تراریخته احتمالی از ریزنمونه‌های برگی توتون. A) جوانه‌های باززایی شده حاوی سازه نوترکیب PCAMBIA1305.1- IFNγ-*bar* بر روی محیط گزینشگر هیگرومایسین؛ B) انتقال گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به محیط ریشه‌زایی؛ C) انتقال گیاهان تراریخته به ورمی کولایت و در نهایت D) گیاهان غیر تراریخت در خاک

Figure 4. The regeneration of putative transgenic plants from leaf explants of tobacco. A. The regenerated bud on hygromycin selection medium. B. Presumptive transgenic seedlings in rooting medium. C. The putative transgenic in greenhouse

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]



شکل ۵- تأیید بیان پروتئین اینترفرون گاما با استفاده از روش دات‌بلات. ۱) گیاه غیرتراریخت و ۲) گیاه تراریخت
Figure 5. Confirmation of the expression of IFNγ protein by dot blot assay. 1) Non-transgenic plant. 2) Transgenic plant

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین: برای اطمینان از بیان فیوژن IFNγ-*bar* در سطح پروتئین، پروتئین کل استخراج شده از برگ‌های توتون، با استفاده از تکنیک Dot Blot بررسی شد و در نهایت پروتئین‌ها در معرض Anti-His6Peroxidase قرار گرفتند و آنزیم متصل شده به آن، در واکنش با سوبسترای مصرفی تغییر رنگ داد و بیان پروتئین فیوژن IFNγ-*bar* در گیاهان تراریخته اثبات گردید، درحالی‌که در گیاهان غیرتراریخت تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۵). در این مطالعه از وکتور بیانی گیاهی pCAMBIA1305.1 برای انتقال به گیاه استفاده شد. این وکتور حامل ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش کلونی‌های باکتری و ژن مقاومت به هیگرومایسین برای گزینش گیاهان تراریخته بود. پروموتور CaMV35s و خاتمه دهنده‌ی Nos به‌عنوان عناصر رونویسی مورد استفاده قرار گرفتند. در بیشتر مطالعات بیانی از پروموتور CaMV35s برای بیان دائم پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود که یکی از قوی‌ترین پروموتورها بوده و باعث بیان بالای ترانس‌ژن در سطح بالا در بخش‌های مختلف گیاه می‌شود (Ahangarzadeh *et al.*, 2012). این سازه امکان بیان پروتئین اینترفرون گاما را به‌صورت فیوژن با ژن مقاومت به فسفینوتریسین فراهم می‌سازد. توالی هیستیدین‌تگ به‌منظور شناسایی و جداسازی پروتئین هدف از پروتئین کل با استفاده از توالی آنتی‌هیس، به انتهای ژن *bar* اضافه شد. این استراتژی یک روش مناسب برای تخلیص پروتئین مورد نظر می‌باشد. فاکتور Xa جهت جداسازی هیستیدین‌تگ و پروتئین ژن مقاومت به علف‌کش، از پروتئین تخلیصی موردنظر استفاده شده است. حدفاصل این دو ژن لینکر GPGP، جهت کاهش برهم‌کنش بین مولکولی دو پروتئین و به حداقل رساندن تغییرات ساختاری هر پروتئین، در نظر گرفته شده است. در مطالعه‌ای دیگر توسط همین گروه تحقیقاتی، ژن اینترفرون گامای انسانی در وکتور بیانی گیاهی pCAMBIA1304 تحت کنترل پیش‌بر CaMV35s همسانه‌سازی و به گیاه گوجه‌فرنگی انتقال داده شد، نتایج حاصل بیانگر تولید پروتئین اینترفرون گاما در گوجه‌فرنگی بود (Ebrahimi *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر، برای انجام بیان دائم ژن از روش دیسک برگی به‌وسیله تلقیح با اگروباکتریوم و گیاه توتون، به‌عنوان میزبان برای بیان ژن IFNγ استفاده شد. توتون یک گیاه خودگرده‌افشان است و علی‌رغم تولید مواد آلکالوئیدی به‌دلیل قابلیت بیان بالا به‌عنوان گیاه مدل، انباشت بیوماس، سهولت دست‌کاری، محافظت در برابر آلودگی زنجیره غذایی و محدودیت زیستی انتخاب گردید (Tremblay *et al.*, 2010). در نتیجه، ژن اینترفرون گاما به این گیاه انتقال داده شد و نتایج دات‌بلات در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت بیان پروتئین اینترفرون گاما را تأیید نمود و بیان این پروتئین با موفقیت در گیاه توتون انجام شد. با این حال مطالعات بیشتری در زمینه‌ی بهینه‌سازی تولید اینترفرون گاما در گیاهان، پروتکل‌های استخراج و تخلیص که تأثیر قابل توجهی بر عملکرد نهایی دارند، مورد نیاز است. کلید موفقیت محصولات تولید شده از گیاهان تراریخت در آینده در میزان بیان، سهولت و اقتصادی بودن روش تخلیص آن‌ها خواهد بود. واضح است که تلاش‌های موجود در این زمینه باید در جهت بالاتر بردن سطوح بیان باشد. اگر توان غلبه بر موانع تکنیکی وجود داشته باشد، به‌زودی این امکان به‌وجود خواهد آمد که داروهای پروتئینی با قیمت مناسب در دسترس افراد نیازمند قرار بگیرند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

References

Abdel-Wahab, Z., Weltz, C., Hester, D., Pickett, N., Vervaert, C., Barber, J.R., Jolly, D. and Seigler, H.F. (1997). A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon- gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer*, **80**: 401-412.

Ahangarzadeh, S.H., Daneshvar, M.H., Rajabi-Memari, H., Galehdari, H. and Alamisaied, K.H. (2012). Cloning, transformation and expression of human interferon α2b gene in tobacco plant (*Nicotiana tobaccum* cv. xanthi). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, **7**: 111-116.

Azhdari, H. (2009). *Cloning and transformation of human gamma interferon gene to tobacco plants*, M.Sc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran (In Persian).

Bagheri, K.H. (2009). *Oleosin gamma interferon gene transfer to canola and study of transgenic plants*, Ph.D. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran (In Persian).

Chen, T.L., Lin, Y.L., Lee, Y.L., Yang, N.S. and Chan, M.T. (2004). Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Research*, **13**: 499-510.

Davoudi, N., Hemmati, A., Khodayari, Z., Adeli, A. and Hemayatkar, M. (2011). Cloning and expression of human ifn-gamma in leishmania tarentolae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**:1893-1899.

De-Block, M., De Sonville, A. and Debrouwer, D. (1995). The selection mechanism of phosphinothricin is influenced by the metabolic status of the tissue. *Planta*, **197**: 619–626.

D'Halluin, K., De-Block, M. and Denecke, J. (1992). The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods in Enzymology*, **216**: 415–426.

Ebrahimi, N., Rajabi-Memari, H., Ebrahimi, M.A. and Roayaei Ardakani, M. (2012). Cloning, transformation and expression of human gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon esculentum mill.*). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **26**: 2925-2929.

Falco, M.C., Neto, A.T. and Ulian, E.C. (2000). Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a brazilian sugarcane. *Plant Cell Reports*, **19**: 1188–1194.

Horn, M.E., Woodard, S.L. and Howard, J.A. (2004). Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, **22**: 711–20.

Kim, J.K., Duan, X. and Wu, R. (1999). Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene. *Molecular Breeding*, **5**: 85–94.

Ma, J.K., Drake, P.M. and Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 794–805.

Metz, P.L.J., Stiekema, W.I. and Nap, J.P. (1998). A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Molecular Breeding*, **4**: 335-341.

Nauciel, C. and Espinasse-Maes, F. (1992). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to salmonella typhimurium infection. *Infection and Immunity*, **60**:450-454.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K. and Julkunen, I. (1995). N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochemical Journal*, **308**: 9-14.

Seeger, R.C., Rosenblatt, J.D., Duerst, R.E., Reynolds, C.P., Villablanca, J.G., Hasenauer, B. and Feig, S.A. (1998). A phase i study of human gamma interferon gene-transduced tumor cells in patients with neuroblastoma. *Human Gene Therapy*, **9**: 379-390.

Spencer, T.M., Gordon-Kamm, W.J., Daines, R.J., Start, W.G. and Lamaux P.G. (1990). Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics*, **79**: 625–631.

Taheri-Javan, N. (2008). *Transformation human gamma IFN gene to canola and regeneration of the transgenic plants*, M.Sc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran (In Persian).

Thampson, C.H., Movva, N.R., Tizard, R., Crameri, R., Deivies, E.M., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicid-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. *The EMBO Journal*, **6**: 2519-2523.

Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A.M. and Ma, S.H. (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, **28**: 214–221.

Yin, J. and Li, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, **127**: 335–47.

Zamani, A., Pour-Jafari, H., Elahi, S.M., Moghadam-Nazem, N. and Massie, B. (2006). Inducible expression of human gamma interferon. *Iranian Biomedical Journal*, **10**: 197-202.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]

[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]

Cloning, Transformation and Stable Expression of a Fusion of Human Interferon Gamma and *bar* Genes in Tobacco Plant *(Nicotiana tobaccum* cv. xanthi*)*

Bahareh Zakerghoran[1], Hamid Rajabi Memari[2,*], Daryoosh Nabati Ahmadi[2] and Marzieh Siahmard[3]

1- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz
2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz
3- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ramin Agriculture and Natural Resources University, Ahwaz

(Received: October 7, 2013 – Accepted: February 3, 2014)

Abstract

The production of human gamma interferon in eukaryote expression systems refers as a therapeutic recombinant protein which has significant impact in medical studies. Unique com position of gamma interferon makes such protein as a suitable tool against cancer. It is documented that phosphinothricin (PPT) classified as non-selective herbicide group of bialaphos acts an inhibitor for glutamine synthetase. The bar gene is encoding the phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) enzyme. This enzyme capable of boosting resistance against PPT herbicide, thus it can be selected as a selective marker within plant population. Then various colony PCR techniques, enzymatic digestion and sequencing were used to confirm the accuracy of fusion of IFNγ-bar gens within expression transporter. Using freezing and thawing method to transfer the pCAMBIA1305.1- IFNγ-bar construction into strain of LBA4404 of agrobacterium, then disc leaves was used to integrate into the genomic of tobacco plant. The transgenic plants were selected under selector condition which possess 30 mg/l of hygromycin. After the developed roots were transferred into soil, and PCR technique was used to confirm the presence of IFNγ-bar in the genomic of plants. Dot blot analysis was applied to detect IFNγ-bar protein in transgenic of to tobacco plants.

Keywords: Human interferon gamma, Stable expression, Tobacco plant, *bar* gene

* **Corresponding Author, E-mail: memari@scu.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-11-22]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.1.3.8]
[DOI: 10.29252/pgr.1.1.27]