

پایداری هموپلاسمی و توارث سیتوپلاسمی داربست پروتئینی دارپین G3 در تکثیر زایشی و رویشی گیاهان ترانسپلاستوم توتون

مریم احساسات‌وطن^۱ و بهرام باغبان کهنه‌روز^{۲*}

۱- دکتری تخصصی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸)

چکیده

مهندسی پلاستید مزایای بی‌شماری را برای نسل بعدی فناوری تراریختی گیاهی به ارمغان می‌آورد که شامل تسهیل انباشت تراژن‌ها و تولید سطوح بیان بالای پروتئین‌های نو ترکیب می‌باشد. پروتئین‌های تکرار آنکرینی طراحی شده (دارپین‌ها) پروتئین‌های داربست غیرایمونوگلوبولینی نسبتاً کوچکی هستند که با تمایل بالا به اهداف اختصاصی خود متصل می‌شوند. G3 یک نوع دارپین طراحی شده برای اتصال به پروتئین گیرنده تیروزین کیناز HER2 (گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسان) است. در مطالعه قبلی یک فرآیند زیستی برای تولید دارپین G3 به‌عنوان عامل تصویربرداری در سرطان‌های با بیان بالای HER2 در سیستم بیان کلروپلاستی توتون تولید شد. در این مطالعه، پایداری هموپلاسمی و بیان ژن دارپین G3 در نسل رویشی و زایشی گیاهان T1 ترانسپلاستوم توتون مطالعه شد. تأیید حضور ژن دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از واکنش PCR انجام شد. آنالیز لکه‌گذاری سادرن وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم را تأیید کرد. آنالیز لکه‌گذاری وسترن تجمع دارپین G3 را در کلروپلاست نسل بعدی گیاهان ترانسپلاستوم تأیید کرد. محتوی دارپین G3 تولید شده در کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از الایزا برای پروتئین محلول کل کلروپلاست حدود ۳۳ درصد برآورد شد. نتایج این مطالعه تأیید کرد که ژن دارپین G3 در گیاهان رویشی و زایشی نسل T1 گیاهان توتون ترانسپلاستوم به‌صورت پایدار و در سطوح بالا بیان می‌شود.

واژگان کلیدی: تراریختی کلروپلاستی، ترانسپلاستوم، توتون، دارپین G3، هموپلاسمی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

مقدمه

امروزه بازار پروتئین‌های دارویی نو ترکیب به سرعت در حال رشد است و در سال‌های اخیر، تولید این پروتئین‌ها در سیستم‌های هترولوگ به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Felberbaum, 2015; Gharelo et al., 2016). پیشرفت در فناوری‌های DNA نو ترکیب و موفقیت در تراریختی گیاهی یکی از دلایل عمده استفاده از گیاهان به‌عنوان سیستم بیان برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب می‌باشد (Sahshorpour et al., 2014; Zakerghoran et al., 2014). تولید تجاری پایدار پروتئین‌های نو ترکیب در میزبان‌های گیاهی نیازمند تحقیق درباره صفات مهم باروری و پایداری ژن انتقالی و در نهایت تولید فرآورده پروتئینی در مقیاس اقتصادی می‌باشد. مهندسی ژنتیک کلروپلاست برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب در این اندامک روشی مناسب برای تولید و انباشت بسیاری از داروهای زیستی، آنتی‌بادی‌ها و واکسن‌های خوراکی با ارزش، حتی تا ۷۰ درصد پروتئین کل محلول است (Oey et al., 2009). مهندسی ژنوم کلروپلاستی به‌عنوان یک رهیافت ارزشمند نه‌تنها برای بیان ژن‌های متنوع از منابع گوناگون بلکه برای ژن‌های طراحی شده و کاملاً ساختگی جهت تولید فرآورده‌های نوین با ارزش اقتصادی بالا به‌عنوان بیوراکتور گیاهی در حال توسعه صنعتی است. در این روش به‌جای درج تصادفی ژن‌ها در ژنوم هسته، درج هدایت شده در مکان معین در ژنوم کلروپلاست انجام شده و به‌دلیل وجود غشای مضاعف کلروپلاستی، فرآورده ژنی در اندامک کلروپلاست تجمع می‌یابد.

پروتئین‌های تکرار آنکراین طراحی شده (دارپین‌ها) مولکول‌های ساختگی غیرایمونوگلوبولینی مشتق شده از پروتئین تکرار آنکراین طبیعی، با وزن مولکولی کمتر از ۲۰ کیلودالتون بوده و با توجه به ویژگی‌های برتر نسبت به آنتی‌بادی‌های منوکلونال به‌عنوان مولکول‌های جایگزین معرفی شده‌اند (Boersma and Plückthun, 2011; Bork, 1993; Li et al., 2006). دارپین‌ها قادر به اتصال به آنتی‌ژن هدف با تمایل و اختصاصیت بالا بوده و برخلاف

آنتی‌بادی‌ها به‌دلیل عدم وجود سیستمین و پایداری بالا برای هدف‌گیری پروتئین‌های درون‌سلولی نیز مناسب هستند (Kummer et al., 2012; Parizek et al., 2012).

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER2) یک سیستم مدل مهم و بسیار خوب مطالعه شده برای تعیین نقش گیرنده تیروزین‌کینازی در ایجاد سرطان است. بیان بیش از حد HER2 در بسیاری از تومورهای بدخیم مانند سرطان سینه، سرطان ریه و سرطان معده گزارش شده است که با افزایش اندازه و وضعیت تهاجمی تومور همراه است (Yarden, 2001). نقش بیولوژیکی مهم HER2 در شبکه سیگنال‌دهی، همراه با قابلیت دسترسی خارج سلولی آن و بیان بیش از حد آن در برخی از تومورهای انسانی باعث شده است که به‌عنوان یک هدف مناسب برای درمان‌های اختصاصی تومور در نظر گرفته شود.

دارپین G3 با وزن مولکولی ۱۵-۱۴ کیلودالتون، از دو تکرار داخلی تشکیل شده است و بیشترین میل ترکیبی (pmol/l) ۹۰ را با HER2 دارد (Epa et al., 2013; Zahnd et al., 2007; Zahnd et al., 2010). تاکنون، دارپین G3 در سیستم میزبان *Escherichia coli* (Zahnd et al., 2007) و *Pichia pastoris* (Goldstein et al., 2015; Livanos, 2019) با موفقیت تولید شده است. اخیراً دارپین G3 برای اولین بار با تولید گیاهان ترانسپلاستوم رمزگردان این مولکول آنتی‌بادی‌نما برای هدف‌گیری HER2 در سرطان‌های HER2 مثبت تولید شده است (Ehsasatvatan et al., 2022a). نتایج این مطالعه با استفاده از روش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) نشان داد که دارپین G3 گیاه-ساخت، با میل ترکیبی عالی و مشابه با آنچه قبلاً برای دارپین G3 بیان شده در *E. coli* یا *P. Pastoris* گزارش شده است، به HER2 متصل می‌شود. طبق همین گزارش، اتصال اختصاصی دارپین G3 گیاه-ساخت به گیرنده HER2 در سطح سلول‌های سرطانی توسط فلوسایتومتری و میکروسکوپ ایمونوفلورسنت نیز تأیید شده است.

علاوه بر پتانسیل برتر سیستم کلروپلاستی در تولید انبوه، ایمن و مقرون به‌صرفه آنتی‌بادی‌نمای دارپین G3، فرآوری پایین‌دستی

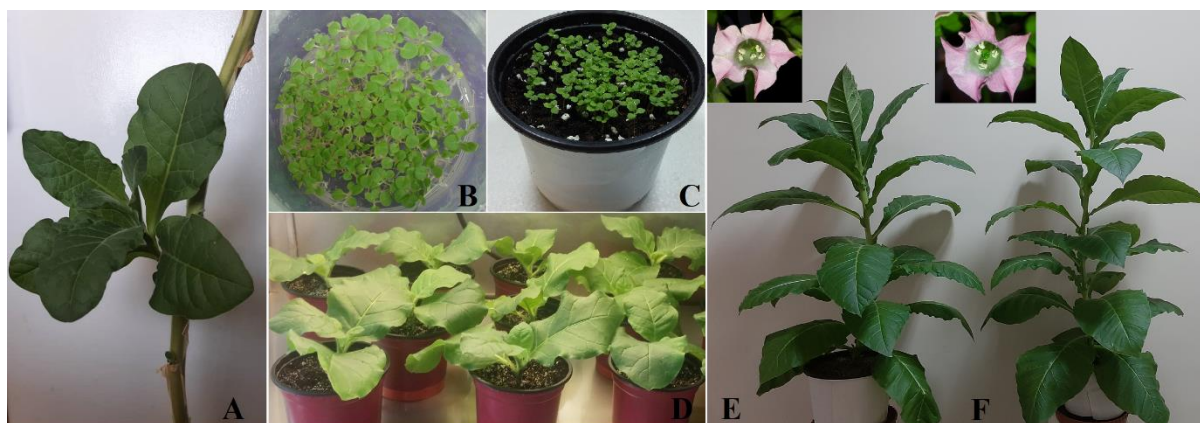
و پایداری تولید این فرآورده زیستی در گیاهان ترانسپلاستوم در چرخه تولید بسیار مهم است، چرا که گیاهان ترانسپلاستوم در صورت برخورداری از باروری و هموپلاسمی می‌توانند در نسل‌های بعدی برای تولید این پروتئین نو ترکیب کشت شوند، ولی چنانچه تراخی در نسل‌های بعدی گیاهان ترانسپلاستوم پایدار نباشد، گیاهان ترانسپلاستوم برای کشت فاقد ارزش بوده و کلروپلاست‌های تولید کننده دارپین G3 نیز به سرعت با کلروپلاست‌های کم بازده و نهایتاً کلروپلاست‌های نوع وحشی جایگزین می‌شوند. برای دستیابی به این اطلاعات لازم است مطالعات مربوط به هموپلاسمی به صورت کمی و کیفی در سطح DNA کلروپلاستی و پایداری فرآورده نو ترکیب دارپین G3 در نسل‌های بعدی گیاهان ترانسپلاستوم انجام و سؤالات مربوطه پاسخ داده شوند.

در این مقاله، نتایج تحقیقات مربوط به این‌همانی، باروری و توارث سیتوپلاسمی تراژن‌های کلروپلاستی، هموپلاسمی و ارزیابی بیان و پایداری دارپین G3 گیاه-ساخت به عنوان اولین آنتی‌بادی‌نمای تولید شده در گیاهان، در سطح DNA با استفاده از PCR و لکه‌گذاری سادرن و در سطح پروتئین با استفاده از لکه‌گذاری وسترن و الایزا در گیاهان زایشی نسل T1 حاصل از نسل T0 گیاهان ترانسپلاستوم و همچنین گیاهان رویشی تکثیر یافته از جوانه‌های جانبی ساقه گیاهان ترانسپلاستوم T0 گزارش می‌گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: گیاهان مورد استفاده در این تحقیق از تکثیر زایشی کنترل شده از طریق بذر و همچنین از تکثیر رویشی مربوط به ادامه رشد جوانه‌های جانبی پس از سربرداری گیاهان ترانسپلاستوم توتون T0 تولید شدند. بذر ترانسپلاستوم مورد نیاز برای تولید گیاهان نسل T1 از گیاهان ترانسپلاستوم توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Peregá) حاوی ژن دارپین G3 تولید شدند (Ehsasatvatan et al., 2022a). برای تولید گیاهان ترانسپلاستوم بیان کننده دارپین G3، از سازه کلروپلاستی حاوی توالی رمزکننده دارپین G3 بهینه‌سازی شده بر اساس رمزهای ترجیحی کلروپلاست توتون (*N. tabacum*) تحت راه‌انداز *rrn* توتون (*Prm*) و توالی 5' UTR بهینه‌سازی شده ژن ۱۰ فاژ T7

(T7g10) و همچنین توالی پایان‌دهنده اپرون *rrnB* باکتری *E. coli* در ناقل کلروپلاستی pPRV111A استفاده شد. انتقال ژن با استفاده از تفنگ ژنی و بر اساس پارامترهای بهینه انتقال ژن به کلروپلاست توتون انجام شد (Ehsasatvatan et al., 2022b). گیاهان هموپلاسم پس از سه دوره باززایی و گزینش در محیط گزینش حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین/استرپتومایسین به شرایط محیط طبیعی سازگار شده و به عنوان گیاهان T0 در نظر گرفته شدند. سه گیاه ترانسپلاستوم نسل T0 انتخاب و سرزنی بوته‌های توتون پس از گلدهی و جمع‌آوری بذور، به صورت دستی انجام شد. پس از عملیات سرزنی به دلیل از بین رفتن غالبیت مریستم انتهایی، جوانه‌های جانبی در محل اتصال دمبرگ به ساقه شروع به رشد نمودند (شکل ۱A). سه گیاهچه رویشی از هر گیاه ترانسپلاستوم نسل T0 در مرحله چهار تا شش برگی از گیاه مادری جدا و پس از غوطه‌ور کردن طوقه گیاهچه‌ها در محلول NAA (۱۰۰ mg/l) به مدت ۲۰ دقیقه، به گلدان‌های حاوی پیت‌ماس: پرلیت (۳:۱) منتقل شده و در شرایط رطوبت نسبی ۹۶ درصد، دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ و ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. از بذور حاصل از خودگشتی گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 برای ایجاد گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 استفاده شد. به منظور آزمایش اولیه هموپلاسمی بذور در محیط گزینش، تعدادی از بذور از هر یک از سه گیاه انتخاب شده ترانسپلاستوم نسل T0، پس از ضدعفونی سطحی در محیط گزینش شامل محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) همراه با ویتامین‌های B5، ۱۰۰ mg/l میواینوزیتول، ۰/۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز حاوی ۵۰۰ mg/l از آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین کشت شدند (شکل ۱B). گیاهچه‌های سبز پس از سه هفته به گلدان‌های حاوی پیت‌ماس: پرلیت (۳:۱) منتقل شده و در شرایط رطوبت نسبی ۹۶ درصد، دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ و ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (شکل ۱D). همچنین، تعدادی از بذور از هر یک از سه گیاه انتخاب شده ترانسپلاستوم نسل T0 بدون در نظر گرفتن فشار گزینشی در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس: پرلیت (۳:۱) کاشته شده و در شرایط مذکور نگهداری شدند (شکل ۱C).



شکل ۱- گیاهان توتون ترانسپلاستوم نسل T1 تولید کننده دارپین G3. A) گیاهچه‌های رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی بعد از سرزنی گیاهان توتون ترانسپلاستوم نسل T0، B) گیاهچه‌های حاصل از بذور جوانه‌زده نسل T0 تحت فشار گزینشی در محیط کشت حاوی ۵۰۰ mg/l اسپکتینومایسین/استرپتومایسین، C) گیاهچه‌های حاصل از بذور جوانه‌زده نسل T0 بدون فشار گزینشی در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس: پرلیت (۳:۱)، D) گیاهچه‌های رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی پس از انتقال به گلدان، مقایسه فنوتیپی، E) گیاه نوع وحشی و F) گیاه ترانسپلاستوم نسل T1

Figure 1. T1 generation of DARPin G3 transplastomic tobacco plants. A) Vegetative plants resulting from lateral bud growth in T0 generation of transplastomic plants after decapitation, B) T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in selection medium containing 500 mg/l spectinomycin/streptomycin, C) T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in soil, D) Potted vegetative plants resulting from lateral bud growth. Phenotypic comparison of E) wild-type and F) T1 generation of transplastomic tobacco plants

شامل دمای $^{\circ}\text{C}$ ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، $^{\circ}\text{C}$ ۵۲ به مدت ۵۰ ثانیه و $^{\circ}\text{C}$ ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۷۲ به مدت ۷ دقیقه انجام شد که می‌بایست منجر به تولید قطعه‌ای به اندازه ۲۱۵ bp شود. برای تشخیص هر نوع هتروپلاسمی احتمالی از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست نزدیک به نواحی درج کاست ژنی (P3/P4، جدول ۱) طبق برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای $^{\circ}\text{C}$ ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، $^{\circ}\text{C}$ ۵۸ به مدت ۱ دقیقه و $^{\circ}\text{C}$ ۷۲ به مدت ۳ دقیقه و بسط نهایی در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۴ kb نشانه هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم و تکثیر قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۲ kb نشان دهنده ژنوم کلروپلاستی فاقد ژن‌های انتقالی و یا گیاهان نوع وحشی خواهد بود. در این آزمون از DNA کل گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 به عنوان شاهد مثبت و گیاه نوع وحشی به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

استخراج DNA کل و آنالیز هموپلاسمی با روش PCR:

برای تأیید اولیه هموپلاسمی بذور حاصل از خود گرده‌افشانی گیاهان ترانسپلاستوم T0، آنالیز PCR با استفاده از DNA کل استخراج شده به صورت بالک از مجموعه گیاهچه‌های سبز جوانه‌زده در محیط گزینش و همچنین از بذور جوانه‌زده در خاک انجام شد. برای آنالیزهای دقیق‌تر مولکولی، آنالیز PCR با استفاده از DNA کل استخراج شده از برگ گیاهان ترانسپلاستوم رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 انجام شد. DNA کل از تمام نمونه‌ها به روش CTAB استخراج شد (Doyle and Doyle, 1987). DNA استخراج شده پس از بررسی کیفیت نمونه روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن دارپین G3 (P1/P2، جدول ۱) طبق برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تأیید اولیه درج ژن و وضعیت هموپلاسمی

Table 1. Sequences of primers used for primary confirmation of gene integration and homoplasmy

نام آغازگر Primer name	توالی ۵'-۳' Sequence (5'-3')	Tm(°C)
P1	GCTGCTAGAGCTGGACAAGA	56.5
P2	TGTCCAATAAAAGCAGCTAAATGT	53.8
P3	AACTAAACACGAGGGTTGC	53
P4	AGTATTAGTTAGTGATCCCGAC	51.3

آنالیز لکه‌گذاری سادرن: برای تعیین وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 و همچنین یکپارچگی کاست درجی در ژنوم کلروپلاست این گیاهان از آنالیز لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. به این منظور ۲ گیاه رویشی، ۲ گیاه از بذور جوانه‌زده و رشد یافته تحت فشار گزینشی و ۲ گیاه از بذور جوانه‌زده بدون فشار گزینشی به‌طور تصادفی از گیاهان PCR مثبت انتخاب شدند. ۲ تا ۳ میکروگرم از DNA کل گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی با استفاده از آنزیم برشی *Bgl*III هضم شد. جهت انتقال DNA روی غشاء، ابتدا DNA هضم شده به‌وسیله الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ به مدت ۶ ساعت روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تفکیک شد. انتقال از ژل به غشاء نایلونی با بار مثبت به روش کاپیلاری انجام گردید. کاوشگر مورد استفاده از ژن *16S rRNA* ژنوم کلروپلاست تهیه شد. برای نشان‌دار کردن کاوشگر از سیستم غیررادیواکتیو DIG مطابق با دستورالعمل کیت PCR DIG probe synthesis kit (شرکت Roche، آلمان) استفاده شد. دورگه‌سازی، مراحل شستشو و تشخیص سیگنال‌ها بر اساس دستورالعمل کیت DIG DNA Labeling and Detection (شرکت Roche، آلمان) در دستگاه آون هیبریداسیون با دمای هیبریداسیون ۶۵ °C انجام شد. اندازه قطعه مورد انتظار در گیاهان ترانسپلاستوم تقریباً ۶/۵ kb و در گیاهان نوع وحشی تقریباً ۴/۵ kb است. از DNA کل گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 و گیاه نوع وحشی به‌ترتیب، به‌عنوان شاهد مثبت و شاهد منفی در این آنالیز استفاده شد.

جداسازی کلروپلاست از سلول‌های برگ: کلروپلاست از سلول‌های برگ گیاهان ترانسپلاستوم رویشی، گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T0 و T1 و گیاه نوع وحشی استخراج شد. از آنجایی که حضور نشاسته باعث کاهش بازده استخراج کلروپلاست‌های سالم می‌شود، گیاهان قبل از جداسازی کلروپلاست به مدت یک یا دو روز در تاریکی مطلق قرار گرفتند. برگ‌های سالم و سبز از گیاهان ترانسپلاستوم و گیاهان نوع وحشی جدا شده و رگبرگ میانی آن‌ها حذف شد. برگ‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و سه برابر وزن بافت برگی بافر استخراج کلروپلاست (۵۰ mM Tris-HCl، ۰/۳۵ M، مانیتول، ۵ mM EDTA، ۰/۱ (w/v) درصد BSA و ۲۰/۱ mM -مرکاپتواتانول) سرد اضافه شد و سلول‌ها در خردکن برقی متلاشی شدند. هموژن گیاهی حاصل از ۳ لایه Miracloth عبور داده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰ × g و دمای ۴ °C سانتریفیوژ و مایع رویی به لوله ۵۰ ml جدید منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ × g و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. پس از شستشوی رسوب حاصل در بافر استخراج کلروپلاست، سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ × g و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. بلافاصله از رسوب حاصل جهت استخراج پروتئین استفاده شد.

استخراج پروتئین و آنالیز لکه‌گذاری وسترن: پروتئین کل محلول از کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم رویشی، گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 و گیاه نوع وحشی برای استفاده در آنالیز لکه‌گذاری وسترن و الیزا استخراج شد. به این منظور ۱۰۰ mg از کلروپلاست استخراج شده

با $500 \mu\text{l}$ از بافر استخراج پروتئین (PBS 1X) با $\text{pH}: 7/4$ ، 150 mM NaCl و مهارکننده پروتئاز (1X) ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C ورتکس شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C و 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی پروتئین کل محلول کلروپلاست جهت استفاده در آنالیزهای بعدی در 20°C - نگهداری شد. غلظت پروتئین استخراج شده، به روش برادفورد تعیین گردید (Bradford, 1976).

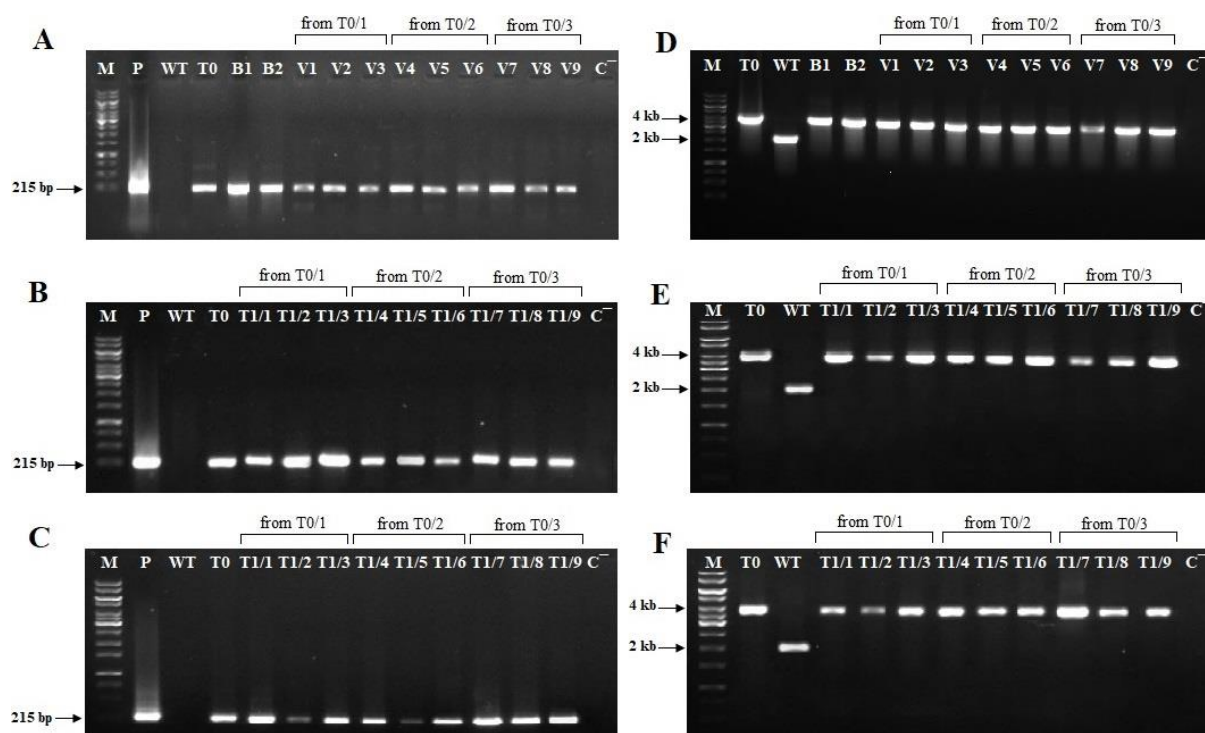
برای انجام آنالیز لکه‌گذاری وسترن، پروتئین استخراج شده روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲ درصد و مطابق با روش لاملی تفکیک شد (Laemmli, 1979). انتقال از ژل به غشاء نیتروسولوز طبق دستورالعمل BioRad و به وسیله دستگاه Mini transblot (Bio-Rad) به مدت ۱ ساعت و در دمای 4°C با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد. تشخیص ایمونولوژیکی پروتئین دارپین G3 متصل به برجسب هیستیدینی با استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی علیه برجسب هیستیدینی به عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی بزی ضد خرگوش متصل به HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه با استفاده از دستورالعمل Bio-Rad صورت گرفت. از پروتئین محلول کل کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 به عنوان شاهد مثبت و از پروتئین محلول کل کلروپلاست گیاه نوع وحشی به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

بررسی کمی دارپین G3 با آزمون الایزا: بررسی کمی و تعیین محتوی دارپین G3 تولید شده در کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 با استفاده از آزمون الایزا انجام شد. به این منظور، ۵۰ نانوگرم از پروتئین محلول کل کلروپلاست (chTSP) از گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی و گیاه نوع وحشی در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه الایزا در سه تکرار ریخته شد و پلیت به مدت یک شب در دمای 4°C نگهداری شد. جهت مسدود کردن مکان‌های اتصال غیراختصاصی $200 \mu\text{l}$ محلول بلوکه‌کننده (محلول PBS-T حاوی ۱ درصد BSA) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای 20°C قرار گرفت. $100 \mu\text{l}$ از محلول آنتی‌بادی اولیه رقیق شده

در بافر بلوکه‌کننده ($1:1000$) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای 20°C قرار گرفت. $100 \mu\text{l}$ از محلول آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده در بافر بلوکه‌کننده ($1:10000$) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای 20°C قرار گرفت. پس از هر مرحله سه مرتبه شستشوی پلیت با محلول شستشوی PBS-T (محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰) انجام شد. $100 \mu\text{l}$ از محلول سوسترای TMB پراکسیداز (200 mM بافر سترات با $\text{pH}: 3/95$ ، ۱ درصد TMB و ۰/۱ درصد H_2O_2) به هر چاهک اضافه شد و پلیت تا زمان تشکیل رنگ در دمای محیط و تاریکی نگهداری شد. با اضافه کردن $100 \mu\text{l}$ اسیدسولفوریک ۲ مولار به هر چاهک واکنش تشکیل رنگ متوقف و جذب نوری در طول موج 450 nm اندازه‌گیری شد. در این آنالیز از پروتئین محلول کل کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 به عنوان شاهد مثبت و از پروتئین محلول کل کلروپلاست گیاه نوع وحشی به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

نتایج و بحث

تأیید اولیه هموپلاسمی در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1: گیاهچه‌های بذری نسل T1 در محیط گزینش حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین (هرکدام 500 mg/l) به صورت کاملاً سبز جوانه زدند و هیچ نشانه‌ای از اتیوله شدن نشان ندادند که تأیید اولیه فنوتیپی بر یکنواختی ژنتیکی ژن *addA* در ژنوم کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 است (شکل ۱B). همچنین آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست و نزدیک به ناحیه نوترکیبی همتای دوگانه و DNA استخراج شده از مجموعه گیاهچه‌های سبز دو برگه جوانه‌زده از بذور کشت شده در محیط گزینش و همچنین بذور کشت شده در خاک فقط قطعه DNAی با اندازه تقریبی 4 kb تولید کرد، در حالی که در گیاهان نوع وحشی قطعه DNAی با اندازه تقریبی 2 kb تولید شد که اولین تأیید مولکولی از هموپلاسمی صددرصدی گیاهان حاصل از گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 به روش تکثیر زایشی می‌باشد (شکل ۲D).



شکل ۲- تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن دارپین G3 برای گیاهان ترانسپلاستوم رویشی (A)، گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 کشت شده تحت فشار گزینشی (B) و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 کشت شده بدون فشار گزینشی (C). تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی کناری ناحیه درج کاست ژنی برای گیاهان ترانسپلاستوم رویشی (D)، گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 کشت شده تحت فشار گزینشی (E) و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 کشت شده بدون فشار گزینشی (F). M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)، P: پلاسمید نو ترکیب pPRV111A-DARPin-G3 استفاده شده در تراریختی، WT: گیاهان توتون غیر تراریخته، T0: گیاه ترانسپلاستوم نسل T0، B1: مجموعه گیاهچه‌های سبز جوانه زده در محیط گزینش، B2: مجموعه گیاهچه‌های جوانه زده در خاک، V1-V9: گیاهان رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0، T1/1-T1/9: گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1، C-: واکنش بدون DNA به عنوان شاهد منفی.

Figure 2. PCR analysis with DARPin G3-specific primers in vegetative transplastomic plants (A), T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants under selection pressure (B) and T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in soil (C). PCR analysis with flanking sequence primers in vegetative transplastomic plants (D), T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants under selection pressure (E) and T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in soil (F). M: 1kb DNA size marker (Fermentas), WT: wild-type tobacco plants, T0: T0 generation of transplastomic plants, B1: Bulk DNA from seedling germinated in selection medium, B2: Bulk DNA from seedling germinated in soil, V1-V9: vegetative transplastomic plants, T1/1-T1/9: T1 generation of transplastomic plants, C-: DNA free reaction as the negative control.

کپسول کاملاً مشابه بوده و رشد طبیعی داشتند (شکل ۱E و ۱F). این نشان می‌دهد که بیان بالای دارپین G3 در کلروپلاست گیاه توتون اثر منفی بر پارامترهای مورفولوژیکی و رشدی این گیاهان ندارد.

آنالیز مولکولی گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و نسل T1: اگرچه رشد گیاهچه‌های بذری صد درصد سبز روی محیط

بررسی گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و نسل T1 برای صفات مورفولوژیک: تمام گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و همچنین گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 در مقایسه با گیاهان نوع وحشی تحت شرایط مشابه کشت و رشد از نظر ویژگی‌های فنوتیپی از جمله ارتفاع گیاه، اندازه برگ، زمان گلدهی و بذردهی، تعداد گل و تعداد بذر در هر

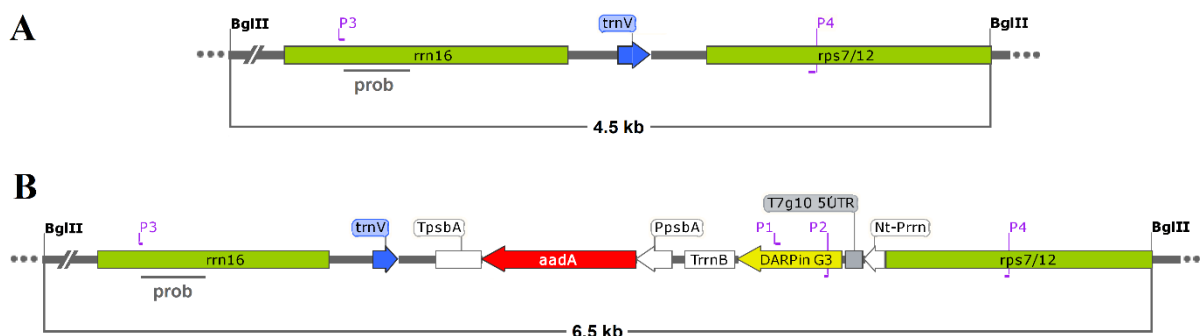
گزینش اختصاصی کلروپلاست می‌تواند تأیید اولیه عملکردی بر تراریختی آن‌ها از طریق فعالیت ژن گزینشگر *aadA* باشد، ولی تأیید مولکولی درج کامل کاست بیانی کلروپلاستی در ژنوم کلروپلاست و هموپلاسمی صددرصدی گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1 و گیاهان ترانسپلاستوم رویشی به‌عنوان دو وجه اصلی در آنالیز مولکولی لازم و ضروری است. به این منظور، حضور ژن رمزکننده دارپین G3 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تراژن در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و نسل T1 تأیید شد. گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 قطعه‌ای با اندازه ۲۱۵ bp و هم‌اندازه با قطعه تکثیر شده توسط گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 و همچنین پلاسمید PRV-DARPin G3 استفاده شده برای تراریختی به‌عنوان شاهد مثبت تکثیر کردند، در حالی که در گیاه نوع وحشی تکثیری مشاهده نشد که دلیل بر عدم حضور ژن مذکور در ژنوم آن است (شکل ۲A، B و C). جهت تأیید حضور یکپارچه و کامل کاست بیانی در ژنوم کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم نیز از یک جفت آغازگر طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی استفاده شد. نتایج حاصل از تکثیر با این آغازگرها در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 نشان داد که تنها یک قطعه DNA به طول تقریبی ۴ kb و هم‌اندازه با قطعه DNA تکثیر شده از گیاهان نسل T0 به‌عنوان شاهد مثبت تکثیر شد، در صورتی که در گیاه نوع وحشی یک قطعه DNA با اندازه تقریبی ۲ kb تکثیر شد و عدم وجود قطعه ۲ kb در گیاهان ترانسپلاستوم تأیید اولیه‌ای بر هموپلاسمی صددرصدی این گیاهان می‌باشد (شکل ۲D، E و F).

برای تأیید دقیق مولکولی حضور کاست بیانی و آگاهی کامل از وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 از روش لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. نقشه فیزیکی ژنوم پلاستید گیاه نوع وحشی و گیاه ترانسپلاستوم در شکل ۳ نشان داده شده است. با استفاده از کاوشگر تهیه شده از ناحیه *rrn16* ژنوم کلروپلاست توتون (شکل ۳) و DNA کل سلولی هضم شده با *BglIII* در

گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 یک قطعه با اندازه تقریبی ۶/۵ kb هم‌اندازه با قطعه ایجاد شده در گیاهان نسل T0 ایجاد شد، در صورتی که در گیاه نوع وحشی قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۴/۵ kb مشاهده گردید که نشان دهنده عدم حضور کاست بیانی دارپین G3 در ژنوم کلروپلاست این گیاهان است (شکل ۴).

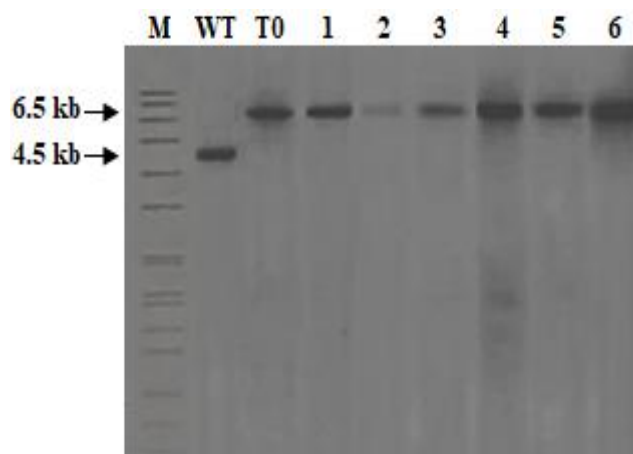
درج پایدار ژن، توارث سیتوپلاسمی صددرصدی ژن‌های انتقالی از طریق توارث سیتوپلاسمی کلروپلاست به گیاهان نسل جدید و پایداری سطح بالای بیان ژن‌های انتقالی از مهم‌ترین عوامل حیاتی و کاربردی در مهندسی ژنتیک کلروپلاستی برای مقاصد کشاورزی مولکولی می‌باشند. تراریختی کلروپلاست از طریق مکانیسم نو ترکیبی هم‌تا فرصتی را برای درج و ادغام دقیق ژن هدف در یک ناحیه از پیش تعیین شده در ژنوم پلاستید فراهم می‌کند. نتایج آنالیزهای مولکولی انجام شده در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 نشان دهنده حضور یکپارچه و پایدار کاست ژنی بیان کننده دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم توتون و توارث‌پذیری صددرصدی کاست بیانی حاوی ژن‌های دارپین G3 و *aadA* در این گیاهان می‌باشد، همچنین پلاستید نوع وحشی قابل تشخیص توسط این آنالیزها در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و یا زایشی نسل T1 مشاهده نشد. علاوه بر این، هیچ‌گونه قطعه پیش‌بینی نشده‌ای که می‌تواند ناشی از نو ترکیبی بین توالی وارد شده و ژنوم پلاستید باشد مشاهده نگردید. چنین نتایجی در گیاهان ترانسپلاستوم توتون بیان کننده ژن *cry1Ia5* در نسل T1 و T2 (Reddy et al., 2002)، ژن *DPT* (Soria-Guerra et al., 2009) و ژن *tPA* (Rezaei et al., 2014) نیز گزارش شده است.

تجمع و بیان دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1: بیان و تجمع پروتئین دارپین G3 در بافت‌های برگ گیاهان توتون ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 توسط آنالیز لکه‌گذاری وسترن تحت شرایط SDS-PAGE احیاء شده و آزمون الایزا با استفاده از پروتئین کل محلول کلروپلاست (chTSP) مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳- نقشه فیزیکی ژنوم کلروپلاست توتون در (A) گیاه شاهد و (B) گیاه ترانسپلاستوم همراه با جایگاه‌های برش آنزیمی *BglIII* مورد استفاده برای لکه‌گذاری سادرن. *rps7/12*: توالی رمزکننده پروتئین ریبوزومی S12/7، *Nt-Prrn*: توالی راه‌انداز ژن *rm* توتون، *T7g10 5'UTR*: ناحیه غیرترجمه شونده 5' ژن ۱۰ فاز T7، *DARPin G3*: توالی رمزکننده ژن دارپین G3 علیه HER2، *rmB*: توالی خاتمه دهنده ژن *rmB* باکتری *E. coli*، *psbA*: توالی راه‌انداز ژن *psbA*، *aadA*: توالی رمزکننده ژن *aadA* اعطا کننده مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین، *TpsbA*: توالی خاتمه‌دهنده ژن *psbA*، *rrn16*: توالی رمزکننده RNA ریبوزومی 16S پلاستیدی، P1 تا P4: مکان اتصال آغازگرهای مورد استفاده و *prob* جایگاه کاوشگر مورد استفاده در لکه‌گذاری سادرن را نشان می‌دهند.

Figure 3. Physical map of tobacco chloroplastic genome in A) wild-type and B) transplastomic plants along with *BglIII* restriction site used in Southern blotting. *rps7/12*: ribosomal S12/7 protein encoding sequence, *Nt-Prrn*: ribosomal RNA operon promoter from tobacco; *T7g10 5' UTR*: 5' untranslated region of bacteriophage T7 gene 10; *DARPin G3*: coding sequence of *DARPin G3*, *TrmB*: *rmB* 3' untranslated region from *E. coli*; *PpsbA*: promoter and 5' UTR of *psbA* gene; *aadA*: aminoglycoside 3'-adenylyltransferase gene; *TpsbA*: terminator of *psbA* gene. *rrn16*: plastidial 16s rRNA encoding sequence, P1-P4: annealing sites of used primers, *prob*: site of designed prob.



شکل ۴- آنالیز لکه‌گذاری سادرن گیاهان توتون ترانسپلاستوم نسل T1 تولید کننده دارپین G3. M: نشانگر وزن مولکولی VII نشان‌دار شده با DIG (Roche)، WT: گیاه توتون نوع وحشی، T0: گیاه ترانسپلاستوم نسل T0، ۱ و ۲: گیاهان رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0، ۳ و ۴: گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1 حاصل از جوانه‌زنی بذور گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 تحت فشار گزینشی، ۵ و ۶: گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1 حاصل از جوانه‌زنی بذور گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 بدون فشار گزینشی.

Figure 4. Southern blotting of *DARPin G3* transplastomic tobacco plants. M: Dig-labeled molecular marker VII, WT: wild type tobacco plant, T0: T0 generation of transplastomic tobacco plant, 1, 2: Vegetative plants resulting from lateral bud growth in T0 generation of transplastomic plants, 3, 4: T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants under selection pressure, 5, 6: T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in soil.

آنالیز لکه‌گذاری و سترن با استفاده از آنتی‌بادی علیه برجسب هیستیدینی نوار مورد انتظار با اندازه ۱۵ کیلو دالتون مربوط به پروتئین دارپین G3 را در نمونه‌های مربوط به پروتئین کل محلول کلروپلاست‌های جدا شده از گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و زایشی نسل T1 و همتراز با نوار مشاهده شده در گیاهان نسل T0 نشان داد. در گیاه نوع وحشی نوار متناظر مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود پروتئین هدف در این گیاهان است (شکل ۵A).

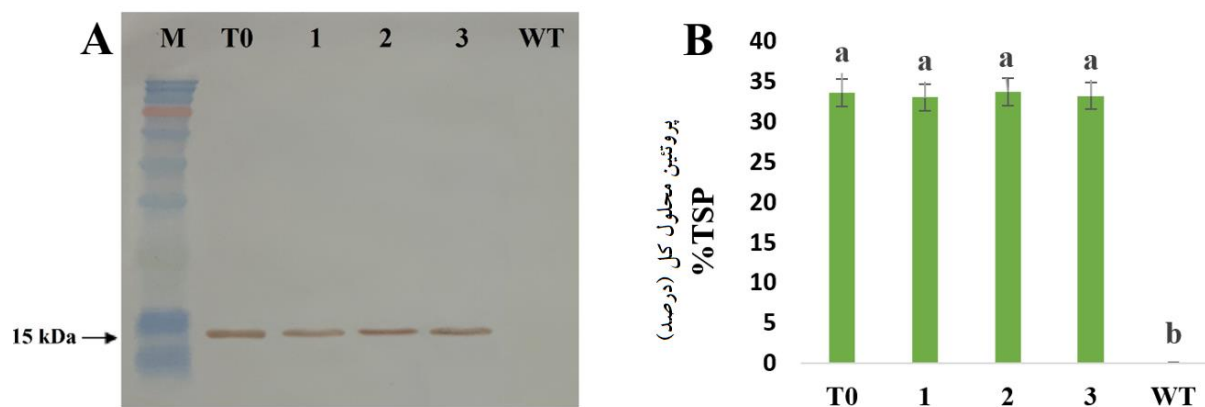
میزان تجمع پروتئین دارپین G3 در کلروپلاست توتون با استفاده از آزمون الایزا تعیین شد. مقدار پروتئین تولید شده در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 به صورت درصد پروتئین دارپین G3 در پروتئین محلول کل در سه تکرار محاسبه شد. محتوی پروتئین دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی ۳۳/۱ درصد از پروتئین محلول کل کلروپلاست بود. همچنین، محتوی پروتئین دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 در گیاهان جوانه‌زده و رشد یافته تحت فشار گزینشی و یا بدون فشار گزینش به ترتیب ۳۳/۸ و ۳۳/۳ درصد از پروتئین محلول کل کلروپلاست بود که اختلاف معنی‌داری با سطح بیان این پروتئین در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 نشان نداد (شکل ۵B). همان‌طور که انتظار می‌رفت، در آزمون الایزا گیاه نوع وحشی، هیچ سیگنالی مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود پروتئین دارپین G3 در این گیاهان است. آنالیز پروتئین در گیاهان ترانسپلاستوم رویشی و گیاهان ترانسپلاستوم زایشی نسل T1 سطوح بیان بالا، پایدار و یکنواخت دارپین G3 (به عنوان اولین آنتی‌بادی‌نمای بیان شده در گیاه) را در گیاهان تکثیر شده به روش رویشی و همچنین در نسل زایشی بعدی گیاهان ترانسپلاستوم توتون و همتراز با نسل T0 تأیید کرد.

قیمت بالای داروهای پروتئینی به دلیل تولید آن‌ها در سیستم‌های فوق‌العاده گران قیمت تخمیر، خالص‌سازی بسیار پرهزینه، نیاز به ذخیره‌سازی و حمل و نقل در یخچال و عمر مفید کوتاه محصول نهایی می‌باشد (Farran et al., 2010; Spök et al., 2008). پروتئین‌های دارویی تولید شده در کلروپلاست‌های گیاهی به دلیل عدم نیاز به چنین فرآیندهای تولید پرهزینه و همچنین امکان ذخیره‌سازی بدون از دست دادن کارایی قادر به غلبه بر این چالش‌ها هستند (Holtz et al., 2015; Rosales-

Mendoza et al., 2010). همچنین تولید پروتئین نو ترکیب در سلول‌های گیاهی به دلیل عدم آلودگی با مواد ویروسی یا باکتریایی خارجی، پاتوژن‌های پستانداران یا سایر آلاینده‌های کشت سلولی حیوانی ایمن‌تر از روش‌های سنتی است. با توجه به پایداری پروتئین نو ترکیب در پلاستید، بیان این پروتئین‌ها در پلاستیدها می‌تواند جایگزین خوبی برای بیان پروتئین در بافت دانه یا اندام‌های ذخیره با تراریختی هسته‌ای باشد.

امروزه علی‌رغم ناتوانی پلاست‌ها در گلیکوزیلاسیون برخی از پروتئین‌های نو ترکیب، کلروپلاست‌های گیاهی به دلیل توانایی انجام دقیق سایر تغییرات پس از ترجمه از جمله فسفریلاسیون، آمیداسیون، تاخوردگی صحیح، تشکیل پیوندهای دی‌سولفید و مونتاژ کمپلکس‌های پروتئینی چند زیر واحدی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب ارجح می‌باشند (Adem et al., 2017). بنابراین گیاهان ترانسپلاستوم می‌توانند منجر به پیشرفت قابل توجهی در بیوتکنولوژی، از گیاه‌پالایی تا سنتز تجاری آنزیم‌ها و سوخت‌های زیستی در مقیاس وسیع و کشاورزی مولکولی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و داروهای زیستی (Adem et al., 2017; Scotti et al., 2013; Scotti et al., 2012) و اخیراً، پروتئین‌های داربست به عنوان آنتی‌بادی‌نما شوند (Ehsasatvatan et al., 2022a). از آنجایی که داربست پروتئینی دارپین G3 نیازمند هیچ‌یک از تغییرات بعد از ترجمه فوق‌الذکر نیست، سطح بالای بیان و تجمع آن در کلروپلاست گیاه توتون به اثبات رسیده است.

با توجه به این امر مهم که درج پایدار و توارث تراژن و بیان سطح بالای پروتئین انتقالی از عوامل اساسی برای کاربرد عملی مهندسی ژنتیک و تولید کارآمد پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاه است و طبق نتایج این مطالعه، این ویژگی‌ها در گیاهان توتون ترانسپلاستوم به اثبات رسیده است، می‌توان گام‌های فنی برای تحقیقات کاربردی و تولید تجاری این فرآورده را آغاز کرد. این دستاورد مهم نشان می‌دهد که می‌توان با کشت این گیاهان برای سال‌های متمادی، پروتئین نو ترکیب عاری از هرگونه پاتوژن انسانی و باکتریایی را در سطوح بالا و به صورت پیوسته در سیستم‌های مدیریت گلخانه‌ای و با هزینه بسیار معقول‌تر از سیستم‌های پرهزینه باکتریایی و تخمیری تولید کرد.



شکل ۵- بررسی بیان و تجمع دارپین G3 در گیاهان ترانسپلاستوم توتون نسل T1 با استفاده از پروتئین محلول کل کلروپلاست. (A) آنالیز لکه‌گذاری وسترن تحت شرایط احیاء شده، M: نشانگر پروتئینی Prestained Protein Ladder (PR911654، سیناکلون)، T0: گیاه توتون ترانسپلاستوم نسل T0، ۱: گیاهان رویشی حاصل از رشد جوانه‌های جانبی در گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0، ۲: گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1 حاصل از جوانه‌زنی بذور گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 تحت فشار گزینشی، ۳: گیاهان ترانسپلاستوم نسل T1 حاصل از جوانه‌زنی بذور گیاهان ترانسپلاستوم نسل T0 در خاک، WT: گیاه توتون نوع وحشی. نوار حدود ۱۵ kDa پروتئین دارپین G3 را نشان می‌دهد، (B) آزمون الیزا برای گیاهان توتون ترانسپلاستوم نسل T1 حاوی ژن رمزکننده دارپین G3. ستون‌ها، $\pm$ SE میانگین را نشان می‌دهند. اعداد دارای حروف غیرمشترک از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.

Figure 5. Expression and accumulation analysis of DARPin G3 in T1 generation of tobacco transplastomic plants using chloroplastic total soluble protein. A) Western blot analysis under reduced condition, M: Prestained molecular mass markers (PR911654, Sinaclone), T0: T0 generation of transplastomic tobacco plant, 1: Vegetative plants resulting from lateral bud growth in T0 generation of transplastomic plants, 2: T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants under selection pressure, 3: T1 generation from germinated seeds of T0 transplastomic plants in soil, WT: wild type tobacco plant. The corresponding band of 15 kDa indicates the DARPin G3 protein, B) ELISA analysis for the DARPin G3 content expressed in T1 generation of transplastomic tobacco plants. Column indicate means $\pm$ SE. Treatment with different letters have a statistically significant difference ($P < 5\%$).

سپاسگزاری

کشاورزی، دانشگاه تبریز صورت گرفته است. از پژوهشگاه اطلاعات و مدارک علمی ایران (ایران-داک) به‌خاطر تأمین امکانات لازم برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌گردد.

این پژوهش تحت حمایت مادی و معنوی آزمایشگاه مهندسی ژنتیک، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده

References

- Adem, M., Beyene, D. and Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, **13**: 30.
- Boersma, Y.L. and Plückthun, A. (2011). DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**: 849-857.
- Bork, P. (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **17**: 363-374.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.

- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Ehsasatvatan, M., Kohnehrouz, B.B., Gholizadeh, A., Ofoghi, H. and Shanehbandi, D. (2022a). The production of the first Functional antibody mimetic in higher plants: the chloroplast makes the DARPIn G3 for HER2 imaging in oncology. *Biological Research*, **55**: 31.
- Ehsasatvatan, M., Kohnehrouz, B.B., Gholizadeh, A., Ofoghi, H. and Shanehbandi, D. (2022b). Physical and biologically effective parameters in developing transplastomic tobacco plants by particle bombardment method using PDS-1000/He. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **10**: 237-252 (In Persian).
- Epa, V.C., Dolezal, O., Doughty, L., Xiao, X., Jost, C., Plückthun, A. and Adams, T.E. (2013). Structural model for the interaction of a designed Ankyrin Repeat Protein with the human epidermal growth factor receptor 2. *PLoS One*, **8**: 59163.
- Farran, I., McCarthy-Suárez, I., Río-Manterola, F., Mansilla, C., Lasarte, J.J. and Mingo-Castel, Á.M. (2010). The vaccine adjuvant extra domain A from fibronectin retains its proinflammatory properties when expressed in tobacco chloroplasts. *Planta*, **231**: 977-990.
- Felberbaum, R.S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, **10**: 702-714.
- Gharelo, R.S., Oliaei, E.D., Bandehagh, A., Khodadadi, E. and Noparvar, P.M. (2016). Production of therapeutic proteins through plant tissue and cell culture. *Journal of BioScience & Biotechnology*, **5**: 93-104.
- Goldstein, R., Sosabowski, J., Livanos, M., Leyton, J., Vigor, K., Bhavsar, G., Nagy-Davidescu, G., Rashid, M., Miranda, E. and Yeung, J. (2015). Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPIn) G3 for HER2 molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **42**: 288-301.
- Holtz, B.R., Berquist, B.R., Bennett, L.D., Kommineni, V.J., Muniguntti, R.K., White, E.L., Wilkerson, D.C., Wong, K.Y.I., Ly, L.H. and Marcel, S. (2015). Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals. *Plant Biotechnology Journal*, **13**: 1180-1190.
- Kummer, L., Parizek, P., Rube, P., Millgramm, B., Prinz, A., Mittl, P.R., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Herberg, F.W. and Plückthun, A. (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 2248-2257.
- Laemmli, U. (1979). Slab gel electrophoresis: SDS-PAGE with discontinuous buffers. *Nature*, **227**: 680-685.
- Li, J., Mahajan, A. and Tsai, M.D. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry*, **45**: 15168-15178.
- Livanos, M. (2019). Production of DARPins in the Yeast *Pichia pastoris*. Ph.D. Thesis, University College London, London, England.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Oey, M., Lohse, M., Scharff, L.B., Kreikemeyer, B. and 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*, **106**: 6579-6584.
- Parizek, P., Kummer, L., Rube, P., Prinz, A., Herberg, F.W. and Plückthun, A. (2012). Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) as novel isoform-specific intracellular inhibitors of c-Jun N-terminal kinases. *ACS Chemical Biology*, **7**: 1356-1366.
- Reddy, V.S., Leelavathi, S., Selvapandian, A., Raman, R., Giovanni, F., Shukla, V. and Bhatnagar, R.K. (2002). Analysis of chloroplast transformed tobacco plants with cry1Ia5 under rice psbA transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Molecular Breeding*, **9**: 259-269.
- Rezaei, A., Jalali-Javaran, M. and Abdoli-Nasab, M. (2014). Homoplasmy stability of transplastomic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* CV. Xhanti) containing human tissue-type plasminogen activator (K2S form) gene in T1 generation. *International Journal of Biosciences (IJB)*, **4**: 116-125.

- Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R.E., Moreno-Fierros, L., Alpuche-Solís, Á.G., Martínez-González, L. and Korban, S.S. (2010). Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta*, **232**: 409-416.
- Sahshorpour, M., Amani, J., Jafari, M. and Salmanian, A.H. (2014). Expression of recombinant chimeric EspA-intimin protein in *Nicotiana tabacum* for oral vaccine development. *Plant Genetic Researches*, **1(1)**: 77-94 (In Persian).
- Scotti, N., Bellucci, M. and Cardi, T. (2013). The Chloroplasts as Platform for Recombinant Proteins Production. In: Duchene, A.M., Ed., *Translation in mitochondria and other Organelles*, pp. 225-262. Springer Berlin, Heidelberg, DE.
- Scotti, N., Rigano, M.M. and Cardi, T. (2012). Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnology Advances*, **30**: 387-397.
- Soria-Guerra, R.E., Alpuche-Solís, A.G., Rosales-Mendoza, S., Moreno-Fierros, L., Bendik, E.M., Martínez-González, L. and Korban, S.S. (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. *Planta*, **229**: 1293-1302.
- Spök, A., Karner, S., Stein, A. and Rodríguez-Cerezo, E. (2008). Plant molecular farming: opportunities and challenges. *JRC Scientific and Technical Reports*, **28**: 153-172.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, **61**: 1-13.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H.K. and Waibel, R. (2010). Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Research*, **70**: 1595-1605.
- Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J.M., Steiner, D., Lawrence, M.C., McKern, N.M., Pecorari, F., Ward, C.W., Joos, T.O. and Plückthun, A. (2007). A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2. *Journal of Molecular Biology*, **369**: 1015-1028.
- Zakerghoran, B., Rajabi-Memari, H., Nabati-Ahmadi, D. and Siahmard, M. (2014). Cloning, transformation and stable expression of a fusion of human interferon gamma and bar genes in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi). *Plant Genetic Researches*, **1(1)**: 27-36 (In Persian).

Homoplasmic Stability and Cytoplasmic Inheritance of DARPin G3 Scaffold Protein in Generative and Vegetative Propagation of Transplastomic Tobacco Plants

Maryam Ehsasatvatan¹ and Bahram Baghban Kohnehrouz^{2,*}

1- Ph.D., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: October 17, 2022 – Accepted: December 29, 2022)

Abstract

Plastid engineering gives numerous benefits for the next generation of transgenic technology, consisting of the convenient use of transgene stacking and the production of high expression levels of recombinant proteins. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) are relatively small non-immunoglobulin scaffold proteins that bind to their specific target with high affinity. The G3 is a type of DARPin designed to bind to the HER2 tyrosine kinase receptor (human epidermal growth factor receptor 2). We previously developed a bioprocess for the production of DARPin G3 in tobacco chloroplasts as an imaging agent in HER2 over-expressed cancers. In this study, we analyzed the expression and homoplasmic stability of DARPin G3 gene in vegetative and generative T1 generation of transplastomic tobacco plants. The presence of DARPin G3 gene in the next generation of transplastomic plants was confirmed with specific primers by PCR analysis. Southern blot analysis confirmed the homoplasmic status of transplastomic plants. The western blot analysis confirmed the accumulation of the DARPin G3 in the chloroplasts of next generation of transplastomic plants. The DARPin G3 protein content was estimated around 33% by ELISA in chloroplast total soluble protein (TSP) of the transplastomic plants. Results confirmed that the DARPin G3 gene in vegetative and generative T1 generation of transplastomic tobacco plants was stably and highly expressed.

Keywords: Chloroplast transformation, DARPin G3, Homoplasmy, Transplastomic, Tobacco

* Corresponding Author, E-mail: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir