

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 اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۴)

چکیده

تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی، به‌عنوان یک پروتئین نو ترکیب 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 بی‌آلافوس 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 IFN γ - Bar در ناقل بیانی حاضر با استفاده از تکنیک‌های مختلف Colony PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. سازه‌ی تهیه شده (pCAMBIA1305.1- IFN γ - Bar) با استفاده از روش انجماد و ذوب به آگروباکتریوم 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 IFN γ - Bar در ژنوم این گیاهان با استفاده از تکنیک PCR تأیید شد. در آنالیز دات‌بلات نیز حضور پروتئین IFN γ -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

مقدمه

ایتترفرون گاما یک پروتئین مهم دارویی است. ایتترفرون‌ها سیتوکین‌های طبیعی هستند که علاوه بر فعالیت‌های ضدویروسی، در مهار رشد سریع سلولی و تنظیم ایمنی نقش دارند (Ma et al., 2003). ایتترفرون‌ها به سه گروه آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) تقسیم شده‌اند (Zamani et al., 2006) که در بین آن‌ها ایتترفرون گاما نقش مهم‌تری در تنظیم ایمنی دارد. این گلیکوپروتئین محصول فعالیت سلول‌های لنفوسیت T و سلول‌های کشنده طبیعی^۱ است که به‌عنوان یک عامل ضدویروسی مشخص شده است (Sareneva et al., 1995). ایتترفرون گاما به‌طور عمده در درمان سندرم نقص بیماری مادرزادی، لیشمانیا^۲، سالمونلاتیفی موریوم^۳ (Nauciel and Espinasse-Maes, 1992) و بیماری‌های نوروبلاستوم^۴ (Seeger et al., 1998) و ملانوم^۵ (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 ایتترفرون گاما نوترکیب متکی بر سیستم‌های سلولی میکروبی و پستانداران بوده است. ایتترفرون گاما 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 ایتترفرون گاما در اشرشیاکلی^۶ بیان شد، اما *E. coli* به‌عنوان یک باکتری قادر به اتمام تغییرات پس از ترجمه نیست. در سال ۱۹۹۳ بیان ایتترفرون گاما در ساکرومایسس سرویزیه^۷ رضایت‌بخش

نبود و به‌طور مشابه، بازده بیان ایتترفرون گامای انسانی در سلول‌های تخمدان موش چینی مایوس کننده بود (Davoudi et al., 2011)؛ بنابراین، برخی تحقیقات برای از بین بردن این محدودیت‌ها و بیان ایتترفرون 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. همسازسازی و بیان ژن ایتترفرون 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^۸ مهارکننده گلوتامین سیتاز^۹ در باکتری‌ها و گیاهان است و از گروه علف‌کش‌های غیرانتخابی بیالافوس^{۱۰} می‌باشد. مقاومت در برابر فسفینوتریسین (از طریق بیان ژن bar) توسط آنزیم فسفینوتریسین N استیل ترانسفراز (PAT) ایجاد می‌شود (Thompson 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 قابل توجهی 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

Forward primer: 5'-GATAGCAA ACT AGT 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 *BsrGI* و *SpeI* برشی شرکت Bioneer تخلیص شد. ژن *IFN γ* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و هضم آنزیمی مذکور انجام شد. سپس محصول واکنش هضم با استفاده از کیت PCR Purification شرکت QIAGEN تخلیص و در واکنش اتصال با ناقل برش خورده با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد. انتقال سازه‌ی نو ترکیب *pCAMBIA1305.1-IFN γ* به سلول‌های مستعد *E.coli* به روش شوک حرارتی انجام گرفت. به منظور 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-IFN γ

به منظور تکثیر ژن *bar* دو آغازگر اختصاصی بر اساس توالی موجود در بانک ژن (با شماره دسترسی JQ293091)، شامل جایگاه‌های برشی *BstEII* و *BsrGI*، 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 AAT CTC GGT GAC GGG CAG GAC-3'

در این پژوهش ژن *bar* به صورت فیوژن به ژن *IFN γ* همسانه‌سازی شد. بدین منظور، پلاسمید *pCAMBIA1305.1-IFN γ* استخراج و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *BsrGI* و *BstEII*، تخلیص شد. ژن *bar* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

(De-Block *et al.*, 1995) و برنج (Kim *et al.*, 1999) استفاده از انتقال به واسطه آگروباکتریوم به دست آمده است. باید توجه کرد که آنزیم فسفینوتریسین N-استیل ترانسفراز^۱ در محصولات تراریخت پتانسیل بسیار پایینی به لحاظ آلرژیک و سمی بودن دارد که این به واسطه، 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 به صورت فیوژن با ژن گزینشگر *bar* در ناقل *pCAMBIA1305.1* در ایران است. با توجه به ارزش دارویی پروتئین *IFN γ* در پزشکی و نیز اهمیت ژن گزینشگر *bar*، پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی ژن *IFN γ* 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 *IFN γ* و *PCAMBIA-3301* دارای ژن *bar* به عنوان الگو برای تکثیر اختصاصی ژن‌های *IFN γ* و *bar* در واکنش PCR و از ناقل *pCAMBIA1305.1* برای همسانه‌سازی این ژن‌ها استفاده شد.

همسانه‌سازی ژن *IFN γ* در ناقل بیانی گیاهی

pCAMBIA1305.1

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

1. Phosphinothricin N- acetyl transferase

اگروباکتریوم تومه‌فاسینس^۲ سویه LBA4404 در بردارنده پلاسمید نوترکیب pCAMBIA1305.1-IFN γ -bar در تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای آماده‌سازی سوسپانسیون تلقیح، یک کلونی از باکتری حاوی سازه‌ی موردنظر در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری (LB^۳) 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 ۴ 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 اگروباکتریوم، 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

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 -1.305.CAMBIA PCAMBIا 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 IFN γ و *bar* به اگروباکتریوم^۱ 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 تکنیک Colony PCR استفاده شد.

تهیه‌ی ریزنمونه

در این تحقیق از گیاه توتون (*Nicotiana tabaccum* cv. Xanthi) جهت تراریختی استفاده شد. به‌منظور تهیه‌ی ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای 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

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

1. *Agrobacterium*

ژن $IFN\gamma$ 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 $IFN\gamma$ و هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های برشی *AflIII* و *SpeI*، استفاده شد، در تکثیر با آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ی ۴۵۰ 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- $IFN\gamma$

ژن *bar* با استفاده از پلاسمید pCAMBIA3301 به‌عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. محصول PCR به‌دست آمده در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1- $IFN\gamma$ ، بین دو جایگاه برشی *BstEII* و *SpeI*، بعد از توالی افزایش دهنده‌ی بیانی اینترونی کاتالاز همسانه‌سازی گردید (شکل ۱). سپس محصول اتصال (- $IFN\gamma$ -pCAMBIA1305.1) 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 $IFN\gamma$ در این سازه، تکنیک Colony PCR با استفاده از آغازگر رفت $IFN\gamma$ و آغازگر برگشتی *bar* انجام شد و با مشاهده باند ۱۰۵۰ bp حضور فیوژن $IFN\gamma$ -*bar* در سازه pCAMBIA1305.1 تأیید شد (شکل ۲).

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 $IFN\gamma$ 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 نیتروسولوز گذاشته شدند. پس از خشک شدن، محلول 1X western blocking اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ - 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 نیتروسولوزی با آب مقطر شسته شد و نمونه‌های تراریخت و غیرتراریخت ارزیابی شدند.

نتایج و بحث

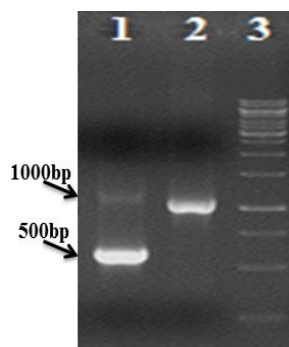
همسانه‌سازی ژن $IFN\gamma$ در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1305.1



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 دهنده 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 *SpeI* and *BstEII* restriction sites and downstream of the catalase intron



شکل ۲- تأیید حضور فیوژن *IFNγ-bar* در سازه pCAMBIA1305.1: چاهک ۱: 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

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 ۴۵۰ bp در گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی، نشان دهنده‌ی درج احتمالی ژن *IFNγ* در ژنوم این گیاه می‌باشد. در گیاهان غیرتراریخت هیچ‌گونه باندهی 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

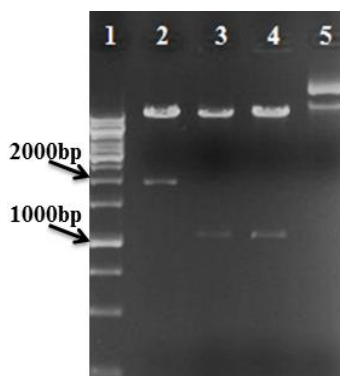
هضم آنزیمی با کمک آنزیم برشی *AflIII* انجام شد (شکل ۳). تأیید نهایی بر حضور ژن *bar* در ناقل بیانی pCAMBIA1305.1-*IFNγ* با استفاده از توالی‌یابی، انجام شد. انتقال ناقل بیانی نوترکیب به درون آگروباکتریوم صورت گرفت و باکتری‌های نوترکیب از طریق واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ارزیابی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

انتقال ژن فیوژن *IFNγ-bar* به گیاه توتون

بعد از تراریخت کردن گیاهان توتون، گزینش گیاهان تراریخت بر روی محیط حاوی هیگرومایسین انجام شد. پس از ۵ هفته ریزنمونه‌های تلقیح شده باززایی شدند (شکل ۴- 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 ۴- B) و در نهایت به ورمی‌کولایت و به خاک انتقال یافتند (شکل ۴- C). گیاهان غیرتراریخت به‌تدریج زرد شده و از بین رفتند (شکل ۴- D).

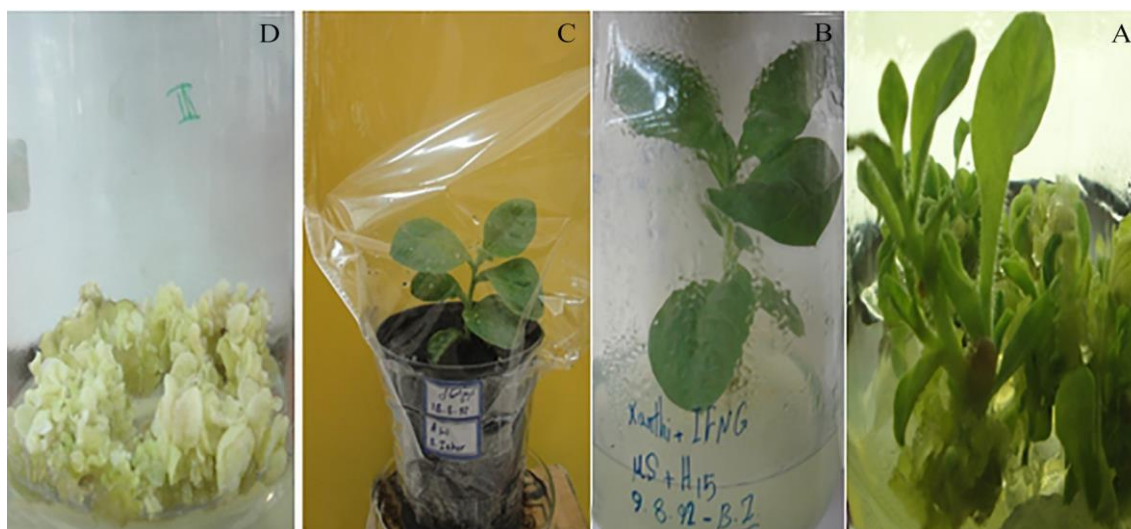
می‌باشد. در گیاهان غیرتراریخت هیچ‌گونه باندهای تکثیر نشد که نشان دهنده‌ی عدم حضور ترانس‌ژن در ژنوم آن‌ها می‌باشد. با این حال، به‌منظور تأیید نهایی درج ژن هدف در ژنوم توتون و تراریختی گیاهان انتخابی آنالیزهای مناسب‌تری مورد نیاز است.

اختصاصی ژن IFN γ بر روی گیاهان مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین انجام شد. آنالیز PCR حضور ژن IFN γ را در گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین تأیید نمود. وجود نوار ۴۵۰ bp در گیاهچه‌های تراریخته‌ی احتمالی، نشان دهنده‌ی درج احتمالی ژن IFN γ در ژنوم این گیاه



شکل ۳- تأیید هضم آنزیمی حضور ژن *bar* در سازه نوترکیب pCambia1305.1-IFN γ : چاهک ۱: نشانگر اندازه 1Kb، چاهک ۲: کنترل منفی، هضم آنزیمی pCambia1305.1-IFN γ با *AflIII* و مشاهده باند ۱۸۰۰ bp شامل ژن IFN γ و GUS Plus و بخشی از ناقل، چاهک ۳ و ۴: سازه نوترکیب پس از هضم آنزیمی با *AflIII* و مشاهده باند ۱۰۵۰ bp شامل فیوژن IFN γ -*bar*

Figure 3. The restriction digest confirmation of pCambia1305.1-IFN γ construct. 1: One kb DNA marker. 2: Negative control, restriction digest with *AflIII*, the 1800 bp fragment of IFN γ gene, GUS Plus and a section of plasmid. 3, 4: The restriction digest of recombinant construct with *AflIII*, the 1050 bp fragment of IFN γ -*bar* fusion



شکل ۴- تولید گیاهان تراریخته احتمالی از ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون. (A) جوانه‌های باززایی شده حاوی سازه نوترکیب pCambia1305.1- IFN γ -*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



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 IFN γ protein by dot blot assay. 1) Non-transgenic plant. 2) Transgenic plant

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 همسازسازی 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 آگروباکتریوم و گیاه توتون، به‌عنوان میزبان برای بیان ژن IFN γ استفاده شد. توتون یک گیاه خودگردافشان است و علی‌رغم تولید مواد آلكالوئیدی 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.

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین: برای اطمینان از بیان فیوژن IFN γ -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-His6 Peroxidase قرار گرفتند و آنزیم متصل شده به آن، در واکنش با سوبسترای مصرفی تغییر رنگ داد و بیان پروتئین فیوژن IFN γ -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 فسفینوتریسن 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. حداقل این دو ژن لینکر GPGP، جهت کاهش برهم‌کنش بین مولکولی دو پروتئین و به

References

- Abdel-Wahab, Z., Wetz, 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 $\alpha 2b$ gene in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* 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).
- Thompson, C.H., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Devies, E.M., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-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.

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

Bahareh Zakerghoran¹, Hamid Rajabi Memari^{2,*}, Daryoosh Nabati Ahmadi² and Marzieh Siahmard³

- 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 composition 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 as 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 IFN γ -*bar* genes within expression transporter. Using freezing and thawing method to transfer the pCAMBIA1305.1-IFN γ -*bar* construction into strain of LBA4404 of agrobacterium, then disc leaves were used to integrate into the genome 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 IFN γ -*bar* in the genome of plants. Dot blot analysis was applied to detect IFN γ -*bar* protein in transgenic of tobacco plants.

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

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