

## طراحی، ساخت و بررسی کارآیی دو ناقل بیانی گیاهی (pBI121<sup>GUS-9</sup> و pBI121<sup>3+4</sup>) با جایگاه‌های همسانه‌سازی توسعه یافته

### Designing, Construction and Functional Analysis of Two Plant Expression Vectors (pBI121<sup>GUS-9</sup> and pBI121<sup>3+4</sup>) with Improved Cloning Sites

محمد بهزادمند<sup>۱</sup>، کسری اصفهانی<sup>۲\*</sup>، علی هاتف سلمانیان<sup>۳</sup> و امیر موسوی<sup>۴</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۱۶

#### چکیده

اکثر ناقلین دوتایی متداول در تراریختی گیاهان به واسطه آگروباکتریوم، به دلیل اندازه بزرگ، دارای تعداد اندکی جایگاه شناسایی منحصر به فرد آنزیم‌های برشی شناخته شده و متداول می‌باشند که این موضوع همسانه‌سازی ژن‌های موردنظر را در آن‌ها با مشکل مواجه می‌کند. برای رفع این مشکل ناقل pBI121<sup>3+4</sup>، با سه جایگاه برشی منحصر به فرد جدید نسبت به ناقل pBI121 در پایین دست ژن گزارشگر *gus* ( $\beta$ -glucuronidase) و همچنین ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup>، دارای نه جایگاه منحصر به فرد آنزیم‌های برشی بین پیشبر 35S CaMV و خاتمه‌دهنده NOS (با طراحی دو آغازگر یکی در بالا دست و دیگری پایین دست خاتمه‌دهنده NOS و استفاده از آن‌ها در یک واکنش PCR)، ساخته و معرفی شدند. برای بررسی کارآیی ناقلین جدید، هم در مرحله همسانه‌سازی و هم در مرحله انتقال ژن به گیاه، ابتدا ژن گزارشگر *gus* در داخل این ناقلین همسانه‌سازی و سپس سازه‌های نوترکیب حاصل به گیاه مدل توتون رقم سامسون منتقل شدند. کارآیی ناقلین جدید، پس از استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخته حاصل از دانه‌های رشد یافته در محیط کشت انتخابی، ابتدا با انجام PCR جهت تأیید تلفیق تراژن و سپس آزمون سنجش فعالیت GUS با استفاده از روش هیستوشیمیایی برای تأیید بیان مؤثر ژن منتقل شده، ارزیابی شد. آنالیزهای مولکولی، حضور تراژن و بیان آن را در گیاهان تراریخته تأیید کردند. با تأیید کارآیی ناقلین pBI121<sup>GUS-9</sup> و pBI121<sup>3+4</sup> در انتقال ژن گزارشگر و بیان مؤثر آن، می‌توان از آن‌ها برای انتقال ژن‌های تجاری به گیاهان استراتژیک استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** ناقلین دوتایی، ناقل بیانی گیاهی، انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، تراریختی گیاه

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و استاد گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۴. دانشیار گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

\* نویسنده مسوول Email: kasra13@nigeb.ac.ir

## مقدمه

روش انتقال ژن، ساده‌ترین، معمول‌ترین و ارزان‌ترین روش در مقایسه با سایر روش‌های انتقال ژن به گیاه است (Rao *et al.*, 2009). بررسی کارایی این دو ناقل در امکان همسانه‌سازی ژن خارجی و انتقال موثر آن به گیاه مدل در مقایسه با ناقل pBI121 انجام شد. برای این منظور پس از همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقلین جدید، انتقال سازه‌های حاصل به گیاه توتون رقم سامسون انجام شد و آنالیز گیاهان تراریخته ابتدا با روش‌های مولکولی و سپس آزمون سنجش فعالیت GUS با استفاده از روش هیستوشیمیایی برای تأیید بیان موثر ژن منتقل شده انجام شد.

## مواد و روش‌ها

آنزیم DNA polymerase *Pfu*، آنزیم‌های برشی، آنزیم لیگاز T4، نشانگر وزن مولکولی و X-Gluc مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی *gus* از شرکت Thermo Scientific تهیه شدند. کیت‌های خالص‌سازی محصول PCR و خالص‌سازی پلاسمید از شرکت Roche تهیه شد. هورمون‌های بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) از شرکت Sigma تهیه شد. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق که در جدول ۱ معرفی شده‌اند، پس از طراحی، همگی برای سنتز به شرکت TAG Copenhagen سفارش داده شدند.

## ساخت ناقلین

برای ساخت ناقل  $pBI121^{3+4}$ ، دو آغازگر یکی در پایین دست ژن *gus* (F/DownGUS) و دیگری در پایین دست خاتمه‌دهنده NOS (RENOS) طراحی و توسط شرکت TAG Copenhagen ساخته شد (جدول ۱). آغازگر RENOS ۲۴ نوکلئوتیدی، واجد توالی شناسایی آنزیم برشی *EcoRI* (بعد از خاتمه‌دهنده NOS) بوده و آغازگر F/DownGUS ۳۸ نوکلئوتیدی، در ۱۸ نوکلئوتید ناحیه 3' خود مکمل توالی بعد از ژن *gus* و قبل از خاتمه‌دهنده NOS بوده و دارای دنباله‌ای ۲۰ نوکلئوتیدی شامل جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی *SalI*، *BcuI*، *Alw44I* و *SacI* در انتهای 5' خود می‌باشد (شکل ۱).

واکنش PCR با این دو آغازگر از روی توالی الگوی pBI121 با برنامه: واسرشتی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه؛ ۷ چرخه: ۹۵ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۵۰ درجه سلسیوس یک دقیقه؛ ۲۵ چرخه: ۹۵ درجه سلسیوس یک دقیقه، ۵۲ درجه سلسیوس یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه) و با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA polymerase انجام شد و قطعه تکثیر شده شامل خاتمه‌دهنده

پلاسمید pBin19 و مشتق اصلی آن pBI121 (Clontech) از جمله اولین ناقلین دوتایی می‌باشند جفرسون و همکاران (Jefferson *et al.*, 1987) که پس از معرفی، استفاده از این ناقلین و مشتقات آن‌ها به سرعت در بین محققان زیست‌شناسی مولکولی گسترش پیدا کرد. براساس بررسی‌های انجام شده، در بیش از ۴۰ درصد پروژه‌های انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم از ناقلین مبتنی بر pBin19 و pBI121 استفاده شده کوماری و همکاران (Komori *et al.*, 2007) و علی‌رغم ارائه انواع ناقلین جدید، ناقل pBI121 هنوز محبوبیت و کارایی خود را از دست نداده است لی و گلویین؛ لین و همکاران؛ ناکامورا و همکاران (Lee and Gelvin, 2008; Lin *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2010). ناحیه T-DNA این ناقل شامل دو توالی حاشیه‌ای راست و چپ مشخص‌کننده این ناحیه، ساختار بیانی نشانگر انتخابی نوامیاسین فسفوترانسفراز II (ژن مقاومت به کانامایسین) و ژن گزارشگر *gus* تحت کنترل پیشبر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS می‌باشد چن و همکاران (Chen *et al.*, 2003). در حد فاصل ژن *gus* ( $\beta$ -glucuronidase) و پیش بر CaMV 35S به ترتیب سه جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی، *XbaI*، *BamHI*، *SmaI* وجود دارد. همچنین در پایین دست ژن گزارشگر *gus* در ناقل pBI121 تنها یک جایگاه شناسایی آنزیم *SacI* قرار دارد. به دلیل تعداد محدود جایگاه‌های همسانه‌سازی ژن، خصوصاً تنها حضور یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی در انتهای ژن *gus*، در برخی موارد ساخت سازه‌های انتقالی با مشکل مواجه می‌شود. برای رفع این مشکل، دو ناقل با نام‌های  $pBI121^{3+4}$  که دارای سه جایگاه برشی جدید نسبت به ناقل pBI121 شامل آنزیم‌های *SalI*، *BcuI* (*SpeI*) و *Alw44I* (*ApaLI*) در پایین دست ژن *gus* و بعد از جایگاه شناسایی آنزیم *SacI* است و  $pBI121^{GUS-9}$  که دارای نه جایگاه منحصر به فرد به ترتیب شامل آنزیم‌های *SacI* 3'، *BcuI*، *BcuI*، *SalI*، *SacI* 5' بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS است، ساخته شدند. در ادامه برای ارزیابی کارایی انتقال ناحیه T-DNA ناقلین به گیاه، ژن گزارشگر *gus* در ناقلین جدید همسانه‌سازی شده و سازه‌های حاصل به گیاه مدل منتقل شدند.

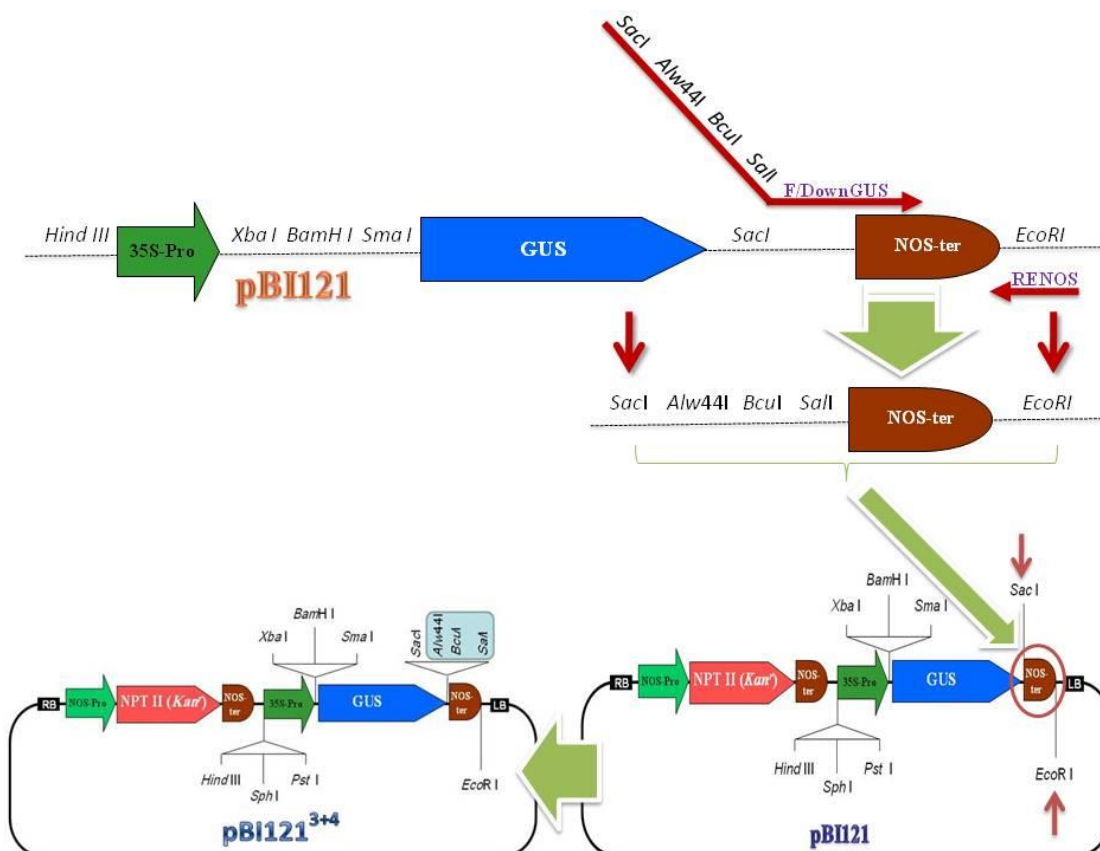
استفاده از آگروباکتریوم تومی فاشینس به‌عنوان یک ناقل طبیعی در تراریختی گیاهان روشی مرسوم است که در مورد بسیاری از گیاهان کاربرد دارد. در این تحقیق نیز از سویه LBA4404 این باکتری استفاده گردید که بر مبنای ناقلین دوتایی (Binary) در آگروباکتریوم طراحی شده و عملکرد بهتری در مراحل تراریختی و انتقال ژن نشان می‌دهد. این

باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط جامد واجد کاناماپسین با استفاده از PCR بر روی همسانه‌ها بررسی شده و نمونه‌های مثبت، دوباره در محیط مایع کشت شده و پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت خالص‌سازی پلاسمید شرکت Roche، صحت ساخت ناقل جدید با استفاده از روش PCR، الگوی هضم آنزیمی و در نهایت تعیین توالی تایید شد.

NOS و جایگاه شناسایی چهار آنزیم برشی (*Alw44I*, *SacI*) و یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی (*SacI* و *BcuI*) بالادست آن و یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی *EcoRI* پایین دست آن به دست آمد. این قطعه با آنزیم‌های *EcoRI* و *SacI* هضم شد و در ناقل pBI121 که با همین آنزیم‌ها هضم شده بود با استفاده از آنزیم لیگاز T4 همسانه‌سازی شد (شکل ۱). محصول واکنش اتصال به باکتری‌های مستعد (Competent Cells) منتقل شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق  
Table 1: The sequence of primers used in this study

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence
35SF	5'-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3'
UP35S	5'-CCAGGCTTTACACTTTATGC-3'
GUSF	5'-GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3'
GUSR	5'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCATG-3'
F/DownGUS	5'-CGAGCTCGTGCAGTACTCGACTCGAATTCCTCCGATCG-3'
RENOS	5'-CCAGTGAATTCCCGATCTAGTAAC-3'



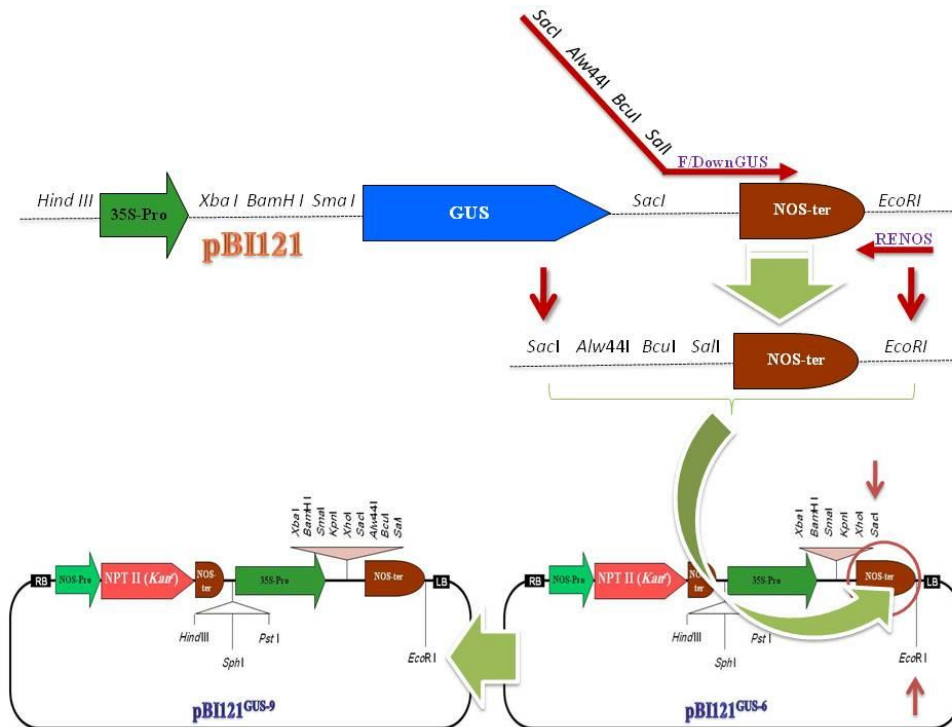
شکل ۱: نقشه شماتیک مربوط به مراحل ساخت ناقل pBI121<sup>3+4</sup> (فلش‌ها محل همسانه‌سازی را نشان می‌دهد)  
Fig. 1: Schematic representation of the construction processes of pBI121<sup>3+4</sup> vector

و CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS می‌باشد محمدحسن و همکاران (Mohammadhassan et al., 2018). قطعه حاصل از تکثیر با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA polymerase (طبق برنامه ذکر شده در ناقل قبلی)، شامل خاتمه‌دهنده NOS

برای ساخت ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup>، همین قطعه تکثیر شده با این دو آغازگر جایگزین خاتمه‌دهنده ناقل pBI121<sup>GUS-6</sup> شد. ناقل pBI121<sup>GUS-6</sup> شامل شش جایگاه شناسایی آنزیم‌های *SacI* و *XhoI*، *KpnI*، *SmaI*، *BamHI*، *XbaI* 3' بین پیشبر

رشد کرده بر روی محیط واجد کانامایسین (نشانگر گزینشگر ناقل) با استفاده از روش PCR بر روی همسانه‌های رشد کرده، بررسی شده و نمونه‌های مثبت، مجدداً در محیط مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کشت شده و پس از استخراج پلاسمید، صحت ساخت ناقل جدید با استفاده از PCR، الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد.

جایگاه شناسایی چهار آنزیم برشی (*Alw44I*, *BcuI* و *SacI* و *EcoRI*) بالادست آن و جایگاه شناسایی یک آنزیم برشی *EcoRI* پایین‌دست آن، با آنزیم‌های *SacI* و *EcoRI* هضم شد و در داخل ناقل  $pBI121^{GUS-6}$  که با همین دو آنزیم هضم شده بود همسانه‌سازی شد (شکل ۲). پس از انتقال محصول واکنش الحاق به باکتری‌های مستعد *Escherichia coli*، باکتری‌های



شکل ۲: نقشه شماتیک مربوط به مراحل ساخت ناقل  $pBI121^{GUS-9}$  (فلش‌ها محل همسانه‌سازی را نشان می‌دهد)

Fig. 2: Schematic representation of the construction processes of  $pBI121^{GUS-9}$  vector

قطعی همسانه‌سازی از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب استفاده شد و پلاسمیدهای تخلیص شده با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* و همچنین *HindIII* و *EcoRI* مورد هضم قرار گرفتند. نتیجه واکنش هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

#### انتقال ناقلین به آگروباکتریوم

برای انتقال سازه‌های مورد نظر از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و روش انجماد و ذوب با کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار و ازت مایع استفاده شد هوسترز و همکاران (Holsters et al., 1978). پس از انتقال سازه‌های مورد نظر به باکتری *A. tumefaciens*، کلونی‌های آگروباکتری حاصل توسط آزمون PCR بر روی کلونی‌ها و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (GUSF/GUSR-جدول ۱) بررسی شدند.

#### همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقل $pBI121^{GUS-9}$ و $pBI121^{3+4}$

به منظور بررسی کارایی ناقلین، ناقل  $pBI121$  با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* هضم شده و ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز (*gus*) از آن جداسازی شده و با استفاده از کیت استخراج از روی ژل آگارز تخلیص شد. هم‌زمان ناقلین جدید  $pBI121^{GUS-9}$  و  $pBI121^{3+4}$  نیز با این دو آنزیم (*XbaI/SacI*) هضم شده و بدنه ناقلین با استفاده از کیت استخراج از روی ژل تخلیص شد. واکنش اتصال انجام شد و محصول الحاق با روش شوک حرارتی به درون میزبان *E. coli* منتقل شد سمبروک و راسل (Sambrok and Russel, 2001). همسانه‌های حاصل با استفاده از روش PCR بر روی همسانه‌ها بررسی شده و نمونه‌های مثبت، مجدداً در محیط مایع کشت و پس از آن استخراج پلاسمید و بررسی صحت همسانه‌سازی آن‌ها انجام شد.

جهت بررسی حضور ژن *gus* ( $\beta$ -glucuronidase) واکنش PCR با کمک جفت پرایمرهای اختصاصی ژن *gus* (جدول ۱) و با دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. برای تأیید

### تراریختی گیاهان و باززایی آن

برای تراریختی گیاهان از روش بهینه شده برای گیاه توتون توسط مارینهو و گالویس (Marinho and Gallois, 1996) با تغییراتی استفاده شد. از کشت شبانه آگروباکتری واجد قطعات برگی توتون استفاده شد. باکتری‌ها در محیط تلقیح (محیط کشت MS، ۵٪ ساکارز، pH= ۵) به صورت سوسپانسیون درآمد و برگ‌های برش خورده توتون، رقم سامسون به مدت یک دقیقه در این محیط قرار داده شدند. سپس جداکشت‌ها بر روی محیط هم‌کشتی (محیط کشت MS، ۳٪ ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر NAA، pH= ۵/۸) بدون آنتی‌بیوتیک به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار گرفتند. پس از شستشو جداکشت‌ها با محلول ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتوکسیم، جدا کشت‌ها بر روی محیط باززایی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. محیط‌ها هر دو هفته یک بار تعویض شدند. غلظت آنتی‌بیوتیک کانامایسین به تدریج در هر تعویض محیط از ۵۰ به ۶۵، ۸۰ و نهایتاً ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. پس از دو ماه، گیاهچه‌های حاصل به محیط جدید (محیط کشت MS، ۳٪ ساکارز، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتوکسیم، pH= ۵/۸) منتقل شدند و برگ‌های آن‌ها جهت استخراج DNA و آنالیز PCR استفاده شدند.

### آنالیز گیاهان تراریخته از طریق PCR

برای استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های تراریخته، از یک روش سریع استخراج استفاده شد. برای این منظور بافت کوچکی از برگ گیاه بین دو اسلاید شیشه‌ای ساییده شده و با ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی: ۲ میلی‌لیتر کلرید لیتیم ۲ مولار، ۵۰۰ میکرولیتر EDTA ۵۰۰ میلی‌مولار ۸، pH= ۲

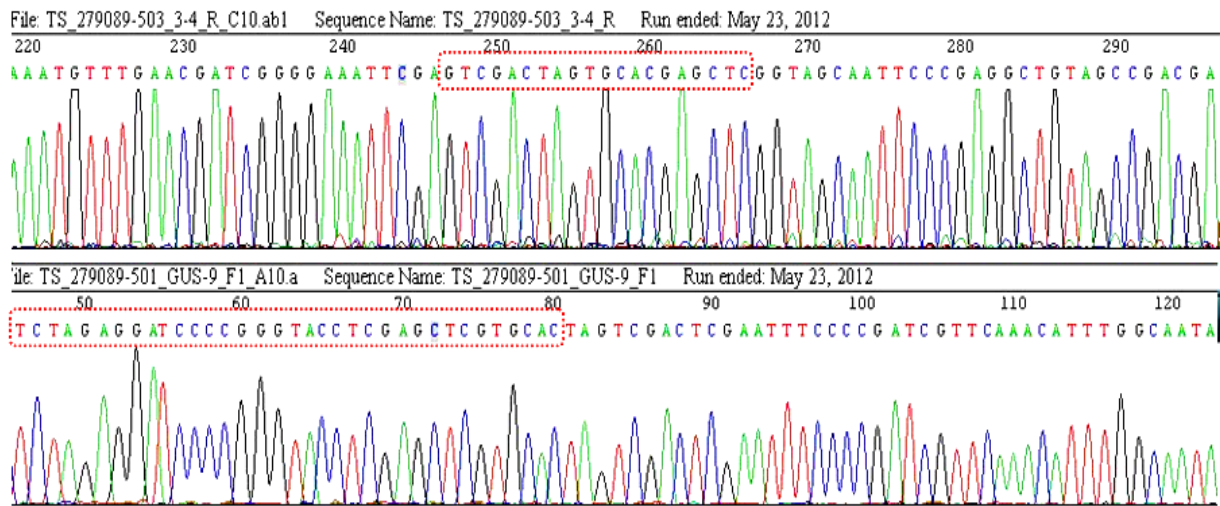
میلی‌لیتر Tris-HCl یک مولار ۸ pH= و یک میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد با ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر، بافت له شده شسته و به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس به مدت ۵ دقیقه مخلوط بافت گیاهی له شده و بافر استخراج، با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و ۳۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به ویال جدیدی حاوی ۳۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول منتقل شد. محلول به خوبی مخلوط شده و ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله محلول رویی دور ریخته و رسوب خشک شد. پس از خشک شدن رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر به رسوب افزوده و با تکان دادن ملایم حل شد. پس از استخراج DNA، آنالیز PCR با آغازگرهای ژن *gus* (جدول ۱) برای آزمون انتقال ناحیه T-DNA ناقلین به ژنوم گیاهان انجام شد.

### سنجش هیستوشیمیایی GUS

سنجش فعالیت GUS با استفاده از روش هیستوشیمیایی ارائه شده توسط جفرسون (1987) با برخی تغییرات انجام شد. بدین منظور، بخشی از برگ گیاهچه‌های تراریخته که نتیجه PCR آن‌ها مثبت بود، ۲۴ ساعت در محلول واکنش شامل بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار) pH= ۷، یک در هزار حجمی/حجمی Triton X-100، Na<sub>2</sub>EDTA (۱ میلی‌مولار)، بتامرکاپتواتانول (۷۸/۰ میکرولیتر در یک لیتر) و سه در هزار وزنی/حجمی 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid نگهداری شد. نمونه‌ها طی ۴۸ ساعت ۶ بار با اتانول ۶۰ درجه کلروفیل‌زدایی شدند. سپس برای بررسی فعالیت GUS و رنگ آبی حاصل، نمونه‌ها مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت.

### نتایج

صحت ساخت ناقلین جدید با استفاده از PCR و الگوی هضم آنزیمی تایید و نهایتاً تعیین توالی انجام شد (شکل ۳).

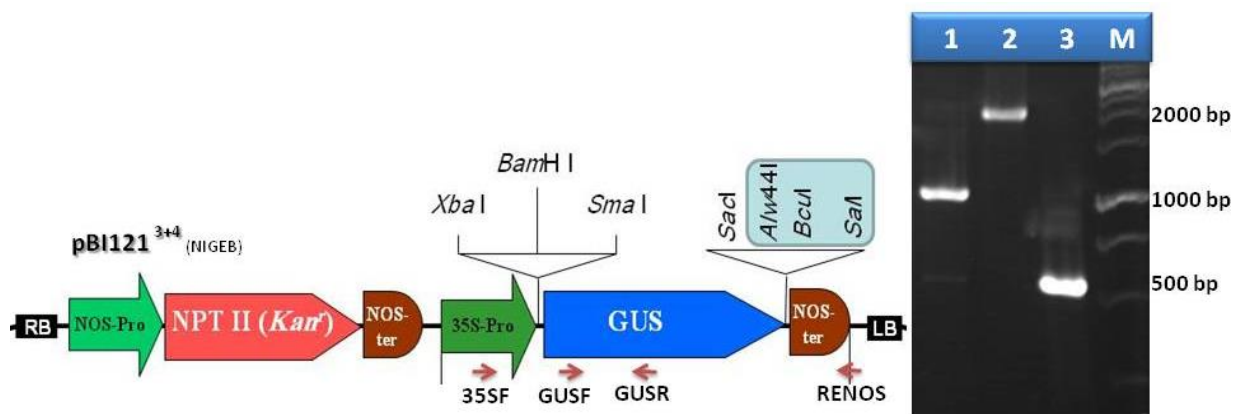


شکل ۳: نتایج تعیین توالی جایگاه همسانه‌سازی ناقلین جدید (بالا pBI121<sup>3+4</sup> و پایین pBI121<sup>GUS-9</sup>)

Fig. 3: Sequencing results of MCS of pBI121<sup>3+4</sup> (up) and pBI121<sup>GUS-9</sup> (down) vectors

آغازگرهای ژن *gus* (جدول ۱)، جهت تأیید نهایی کلون‌ها، از باکتری‌هایی که آزمون PCR بر روی کلون‌های آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید شد و PCR با ترکیب آغازگرهای مختلف انجام شد (شکل‌های ۴ و ۵).

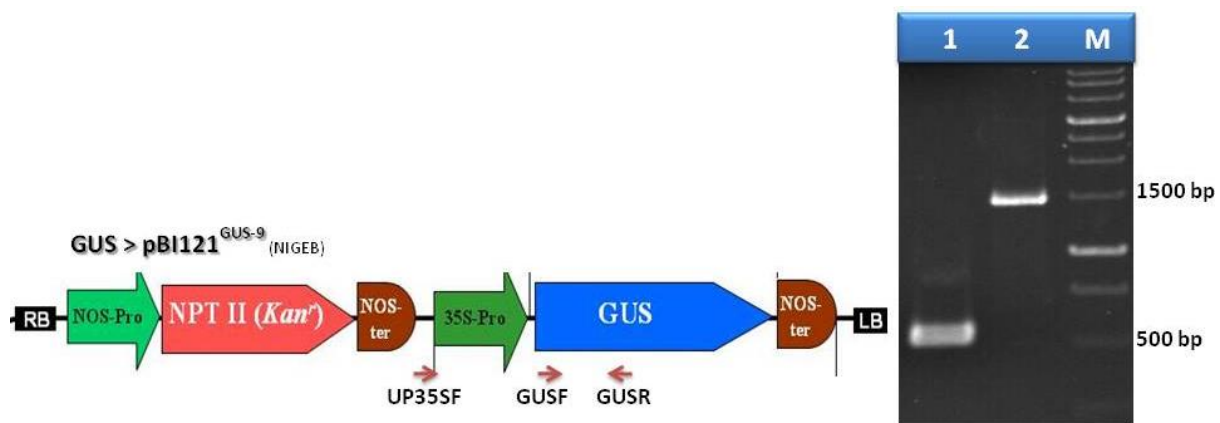
برای بررسی کارایی ناقلین جدید در پذیرش ژن مورد نظر و انتقال ناحیه T-DNA آنها به گیاه، ژن گزارشگر *gus* (به‌عنوان مدل) از پلاسمید pBI121 در این دو ناقل همسانه‌سازی شد. پس از انجام واکنش PCR بر روی کلونی‌ها با استفاده از



شکل ۴: آنالیز PCR به‌منظور تأیید همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقل pBI121<sup>3+4</sup>. محل اتصال آغازگرها روی شکل شماتیک مشخص شده است. ۱: قطعه حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر با آغازگرهای 35SF/GUSR؛ ۲: قطعه حدود ۲۰۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر با آغازگرهای GUSF/RENOS؛ ۳: قطعه حدود ۵۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر با آغازگرهای GUSF/GUSR و M: نشانگر

وزن مولکولی 1kb، Thermo Scientific

Fig. 4: PCR analysis confirming cloning of reporter gene in pBI121<sup>3+4</sup> vector. The position of primers are shown in the schematic figure. 1: A 1000 bp amplified fragment by 35SF/GUSR primers; 2: A 2000 bp amplified fragment by RENOS/GUSF primers; 3: A 500 bp amplified fragment by GUSF/GUSR primers and M: 1Kb DNA ladder, Thermo Scientific

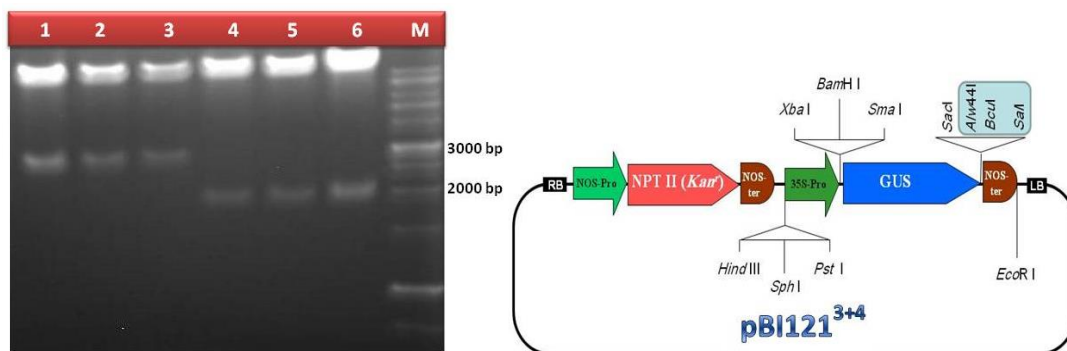


شکل ۵: آنالیز PCR به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup>. محل اتصال آغازگرها روی شکل شماتیک مشخص شده است. ۱: قطعه حدود ۵۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر با آغازگرهای GUSF/GUSR؛ ۲: قطعه حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر با آغازگرهای UP35SF/GUSR و M: نشانگر وزن مولکولی 1kb، Thermo Scientific

Fig. 5: PCR analysis confirming cloning of reporter gene in pBI121<sup>GUS-9</sup> vector. The position of primers are shown in the schematic figure. 1: A 500 bp amplified fragment by GUSF/GUSR primers; 2: A 1500 bp amplified fragment by UP35SF/GUSR primers and M: 1Kb DNA ladder, Thermo Scientific

۳۰۰۰ bp بر روی ژل آغاز مشاهده شد (شکل ۶). نتایج حاصل حاکی از صحت همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقلین جدید بود.

نتیجه هضم آنزیمی هر دو ناقل با آنزیم‌های *SacI* و *XbaI* به صورت یک باند ۱۹۰۰ bp مشاهده شد. هضم آنزیمی با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* نیز به صورت یک باند حدود



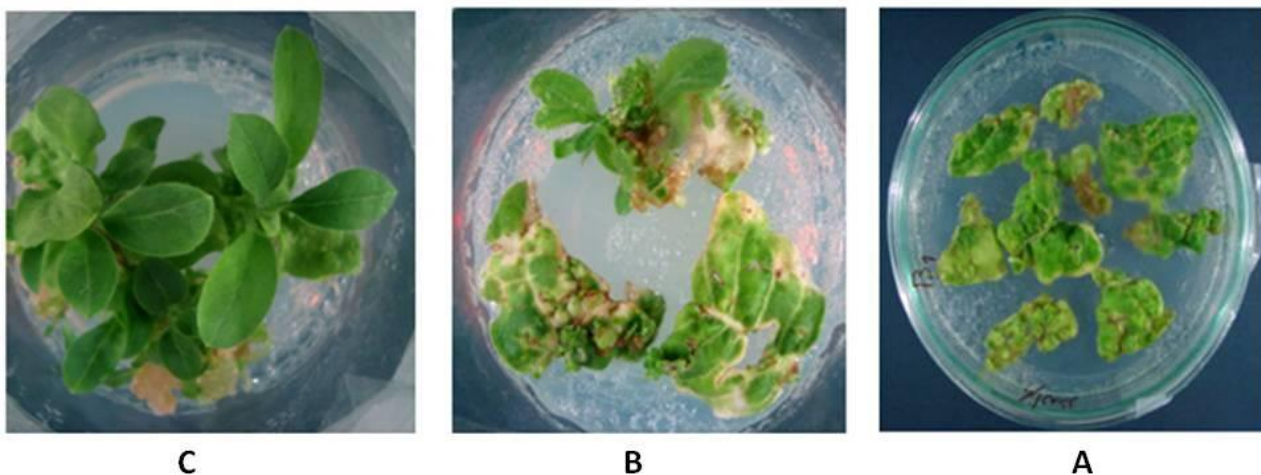
شکل ۶: هضم ناقلین pBI121<sup>GUS-9</sup> (۱ و ۴)، pBI121<sup>3+4</sup> (۲ و ۵) و pBI121 (۳ و ۶) به عنوان کنترل (۳ و ۶) با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* و خروج قطعه حدود ۱۹۰۰ جفت بازی ژن *gus* (۱ تا ۳) و آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* و خروج قطعه حدود ۳۰۰۰ جفت بازی ژن *gus* همراه با پیشبر 35S CaMV و خاتمه‌دهنده NOS (۴ تا ۶)؛ M: نشانگر وزن مولکولی 1kb، Thermo Scientific

Fig. 6: Digestion of pBI121<sup>GUS-9</sup> (1 and 4), pBI121<sup>3+4</sup> (2 and 5) and pBI121 (3 and 6) vectors respectively with *XbaI* and *SacI* to separate a 1900 bp *gus* gene fragment and with *EcoRI* and *HindIII* to separate a 3000 bp *gus* cassette fragment; M: 1Kb DNA ladder, Thermo Scientific

هورمون‌های BAP و NAA و آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل شده و پس از ظاهر شدن شاخساره‌های اولیه، برای توسعه اندام‌های هوایی و رشد ریشه به محیط جدید منتقل شدند (شکل ۷).

از بافت گیاهان رشد کرده بر روی محیط واجد گزینشگر، DNA ژنومی استخراج شد. آزمون PCR به منظور اثبات حضور سازه‌های مورد نظر با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (جدول ۱) انجام شد که نتایج آن در شکل ۸ نشان داده شده است.

تراریختی سلول‌های آگروباکتریوم با ناقلین نو ترکیب pBI121<sup>GUS-9</sup> و pBI121<sup>3+4</sup> واجد ژن گزارشگر *gus* و هم‌چنین ناقل pBI121 به عنوان کنترل انجام و حضور سازه‌های ژنی در باکتری‌های تراریخته از طریق آزمون PCR بر روی کلونی‌ها تأیید شد. از آگروباکتری تراریخته تأیید شده حاوی سازه‌های pBI121، pBI121<sup>3+4</sup> و pBI121<sup>GUS-9</sup> واجد ژن *gus* برای تراریختی استفاده شد. جداگشت‌های گیاهی تلقیح شده پس از تراریختی به محیط هم‌کشتی حاوی غلظت مناسب

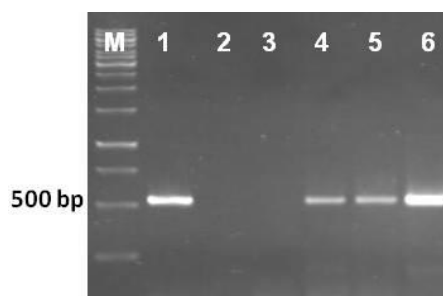


C

B

A

شکل ۷: A: جداکشت‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم؛ B: ظهور گیاهچه‌ها و C: توسعه اندام هوایی گیاهچه‌ها پس از حدود ۲ ماه  
 Fig. 7: A: Explants inoculated with Agrobacterium; B: Seedling emergence and C: Shoot development of seedlings after about 2 months



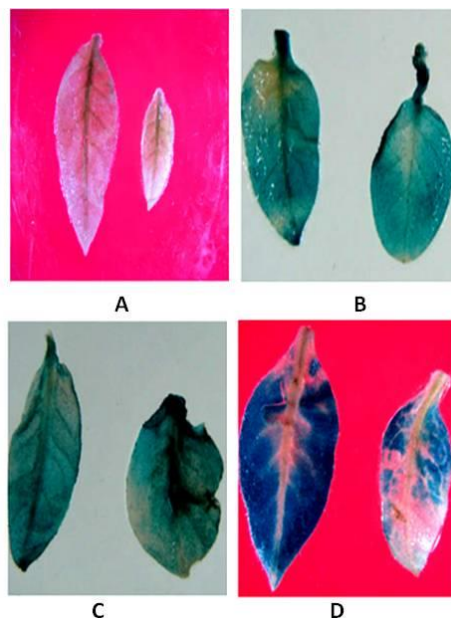
شکل ۸: آنالیز PCR گیاهان تراریخته احتمالی؛ تکثیر باند ۵۰۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار از DNA استخراج شده از گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آغازگرهای GUSF/GUSR. ۱: محصول PCR گیاه تراریخته با ناقل pBI121؛ ۲: محصول PCR گیاه غیر تراریخته (کنترل منفی)؛ ۳: محصول PCR گیاه تراریخته با ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup> (فاقد ژن *gus*)؛ ۴: محصول PCR گیاه تراریخته با ناقل pBI121<sup>3+4</sup>؛ ۵: محصول PCR گیاه تراریخته با ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup> همسانه‌سازی شده با ژن *gus*؛ ۶: پلاسمید pBI121 به‌عنوان کنترل مثبت و M: نشانگر وزن مولکولی 1kb، Thermo Scientific

Fig. 8: PCR analysis of different putative transgenic lines. Expected 500 bp fragment amplified by PCR from the DNA isolated from putative transgenic plants using GUSF/GUSR primers. 1: Transgenic plant transformed by pBI121; 2: Nontransgenic Plant (negative control); 3: Transgenic plant transformed by pBI121<sup>GUS-9</sup>; 4: Transgenic plant transformed by pBI121<sup>3+4</sup>; 5: Transgenic plant transformed by pBI121<sup>GUS-9</sup> cloned with *gus* gene; 6: pBI121 plasmid DNA template as positive control; M: 1Kb DNA ladder, Thermo Scientific

شدند. نتایج حاصله، حاکی از بیان این ژن گزارشگر در بافت برگ گیاهچه‌های تراریخته در مقایسه با برگ‌های گیاهان شاهد بود.

جهت بررسی سنجش فعالیت *GUS*، گیاهچه‌های تراریخته که روی محیط حاوی گزینشگر رشد کرده و نتیجه آزمون PCR آن‌ها مثبت بود، با آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ارزیابی





شکل ۹: ارزیابی فعالیت GUS در برگ‌های گیاهچه‌های غیرتراریخته (A) و گیاهچه‌های تراریخته حاصل از انتقال پلاسمید pBI121 (B)، pBI121<sup>GUS-9</sup> و pBI121<sup>3+4</sup> (C) و pBI121<sup>3+4</sup> (D)

Fig. 9: GUS activity assay in leaves of nontransgenic (A), and transgenic plants transformed by pBI121, pBI121<sup>GUS-9</sup> containing *gus* gene (C), and pBI121<sup>3+4</sup> (D) plasmids

#### بحث

آنزیم‌های برشی شناخته شده و موجود در بازار می‌باشند. به‌طور مثال، ناقل pBI121 از سری ناقلین مبتنی بر pBin19 که بیش از ۴۰ درصد پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان در جهان کوماری و همکاران (2007) و بسیار بیش از این در ایران، به‌واسطه آن انجام می‌شود، دارای جایگاه شناسایی تنها چهار آنزیم برشی بین پیشبر و خاتمه‌دهنده خود می‌باشد. از این بین فقط یک جایگاه برشی *SacI* پس از ژن *gus* قرار دارد که این موضوع همسانه‌سازی ژن‌هایی که دارای سایت برشی *SacI* در توالی خود هستند را با مشکل روبرو می‌کند. برای رفع این مشکل، در این گروه، ناقلین دوتایی متعددی ساخته و معرفی شده‌اند. ناقل pBI121<sup>GUS-6</sup> اولین ناقلی بود که با حذف ژن *gus* از ناقل pBI121، ساخته شد و تنها دارای جایگاه شناسایی دو آنزیم برشی *XbaI* و *BamHI* بین پیشبر 35S CaMV و خاتمه‌دهنده NOS برای همسانه‌سازی ژن‌های مورد نظر در ناحیه T-DNA خود بود/صفهانی و همکاران (Esfahani et al., 2012). در مرحله بعد، ناقل pBI121<sup>GUS-6</sup> که به جای این دو جایگاه، دارای تعداد بیشتری توالی شناسایی آنزیم‌های برشی می‌باشد، معرفی شد محمدحسن و همکاران (2018). در ادامه و در این مقاله، ناقل pBI121<sup>3+4</sup> با چهار جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی در پایین دست ژن *gus* ساخته و معرفی شد که مشکل وجود تنها یک جایگاه شناسایی آنزیم *SacI* در این بخش از ناقل pBI121 را حل می‌نماید. همچنین ناقل pBI121<sup>GUS-9</sup>، دارای نه جایگاه منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی معمول، ارزان و موجود در بازار برای همسانه‌سازی

تلاش‌های اولیه برای انتقال ژن با استفاده از سیستم آگروباکتری بسیار مشکل بود زیرا دست‌ورزی یک پلاسمید بزرگ برای ورود یک ژن خارجی در ناحیه T-DNA پلاسمید Ti با موانع متعددی روبرو بود. علاوه بر اندازه بزرگ این پلاسمید، مشکل جداسازی، تعداد نسخه پایین و عدم تکثیر در *Escherichia coli* به‌عنوان میزبان حدواسط نیز وجود داشت لی و گلوین (2008). بعد از تلاش‌های اولیه برای انتقال ژن به پلاسمید Ti با استفاده از نوترکیبی زامبریسکی و همکاران (Zambryski et al., 1983)، ناقلین دوتایی معرفی شدند هوکما و همکاران (Hoekema et al., 1983) که با جداسازی بخش T-DNA از ناحیه ژن‌های *vir* ناقل مورد دست‌ورزی کوچکتر شده و کار با آن راحت‌تر بود. از آن پس تاکنون همواره سعی محققین تولید ناقلین دوتایی‌ای بود که دست‌ورزی آن‌ها ساده‌تر، جایگاه همسانه‌سازی (Multiple Cloning Site) (MCS) آن‌ها شامل آنزیم‌های متنوع‌تر، تعداد نسخه‌های بیشتر، طیف میزبانان گسترده‌تر و ژن‌های گزینشگر متنوع‌تری بوده و در عین حال قابلیت همسانه‌سازی قطعات بزرگتر و نرخ انتقال ژن بالاتری را داشته باشند کوماری و همکاران (2007). در این بین وجود جایگاه‌های برشی منحصر به فرد متعدد در ناحیه همسانه‌سازی این ناقلین، همواره اهمیت ویژه‌ای داشته و تعدد آن‌ها، همسانه‌سازی ژن مورد نظر را تسهیل می‌کند درحالی‌که ناقلین دوتایی متداول به دلیل اندازه بزرگ آن‌ها، عمدتاً دارای تعداد اندکی جایگاه شناسایی منحصر به فرد

کارایی کدون‌های اختتام در پایان ترجمه کمک می‌نماید /آنگنون و همکاران (Angenon et al., 1990).

براساس نتایج این تحقیق، ناقلین جدید همانند ناقل استاندارد pBI121 کارایی انتقال و بیان ژن مورد نظر را داشته و به عبارت دیگر، تغییرات صورت گرفته در دو ناقل جدید از جمله توسعه MCS، بر عملکرد این ناقلین تأثیر منفی نداشته است. این ناقلین ضمن سهولت همسانه‌سازی قطعه مورد نظر، در گیاه توتون رقم سامسون کارایی مناسبی در انتقال ژن نشان داده و نتیجه سنجش بیان ژن گزارشگر در گیاهچه‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های برگ‌ها با سازه‌های حاصل از همسانه‌سازی ژن گزارشگر در ناقلین معرفی شده، بیانگر بیان مناسب تراژن *gus* در این گیاهان بوده و اثبات‌کننده توانایی انتقال و بیان موثر ژن با استفاده از این دو ناقل جدید در گیاه - علی‌رغم دستورزی صورت گرفته- است. محققان براساس نیاز تحقیقاتی خود می‌توانند یکی از دو ناقل معرفی شده را برای انتقال ژن‌های مورد نظر به گیاهان مختلف از جمله گیاهان استراتژیک استفاده کنند.

#### سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح ۹۵۰۶۱۵-I-۵۷۹ و با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. از مسئولین و کارشناسان محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که در طول اجرای این تحقیق از هیچ گونه کمک و مساعدتی دریغ نکردند، سپاسگزاری می‌شود.

ژن‌های مورد نظر بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS می‌باشد، نیز در این تحقیق معرفی شده است. ارزانی این آنزیم-ها و همچنین در دسترس قرار داشتن آن‌ها تنها دلایل انتخاب این آنزیم‌ها نبوده است و ترتیب قرار گرفتن جایگاه شناسایی این آنزیم‌ها در ناحیه MCS به گونه‌ای است که این ناقلین بیشترین کارایی را داشته باشند. به‌طور مثال برای گسترش جایگاه همسانه‌سازی ناقلین جدید، انتخاب ترادف جایگاه شناسایی این آنزیم‌ها به گونه‌ای طراحی شد تا آنزیم‌هایی که جایگاه شناسایی آن‌ها برای قرارگیری در بالادست ژن مناسب بوده و ایجادکننده زمینه مناسب برای شناسایی کدون شروع ترجمه نیز باشند (مثل *KpnI* با جایگاه شناسایی GGTACC) در نیمه اول MCS قرار گیرند. در صورت استفاده از آنزیم *KpnI* برای همسانه‌سازی ژن مورد نظر، در بالادست رمز ATG این ژن، جایگاه ACC که در اکثر ژن‌ها زمینه مناسبی برای کدون آغاز می‌باشد، کوزاک (Kozak, 1991) ایجاد می‌شود. به‌طور کلی در انتخاب تمامی آنزیم‌های نیمه اول MCS سعی بر این بود که نوکلئوتید A یا G در جایگاه ۳- قرار گیرد زیرا که در بالادست بسیاری از ژن‌های گیاهان، خصوصاً دولپه‌ای‌ها، یکی از این دو نوکلئوتید در این مکان قرار دارد سوگیو و همکاران (Sugio et al., 2010). در عین حال، آنزیم‌هایی که جایگاه شناسایی آن‌ها مناسب قرار گرفتن پس از کدون خاتمه بوده (مثل *BcuI* با جایگاه شناسایی ACTAGT)، در نیمه دوم MCS قرار گرفتند. در این آنزیم‌ها حضور نوکلئوتید A در ابتدای توالی شناسایی آنزیم کلیدی است، زیرا حضور این نوکلئوتید بلافاصله بعد از هر سه کدون اختتام، به افزایش

#### منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۸-۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.