

بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در کلروپلاست گیاه توتون

Expressing of the human interferon gamma gene in the Tobacco chloroplast

شهلا رزمی^۱، مختار جلالی جواران^{۱*}، عبدالرضا باقری^۲، حسین هنری^۳، مهدی محب الدینی^۴، مژگان سلیمانی زاده^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، دانشگاه امام حسین

۴- استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی

Razmi SH¹, Jalali Javaran M^{*1}, Bagheri A², Honari H³, Mohebodini M⁴, Soleimani Zadeh M¹

1. PhD Student, Associate Professor and MSc Student, Tarbiat Modares University

2. Professor, Ferdosi University of Mashhad

3. Assistant Professor, Emam hosein University

4. Assistant Professor, Mohaghegh Ardebili University

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

اینترفرون گاما
بیان دیسیسترونی
توتون
زراعت مولکولی
گیاهان تراریخت کلروپلاستی

مقدمه

در سال‌های اخیر انتقال ژن به کلروپلاست^۱ به دلیل مزایای زیادی که دارد بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. از جمله این مزایا می‌توان به سطح بالای بیان و تجمع پروتئین در داخل اندامک کلروپلاست به دلیل پلی پلوئید بودن سیستم ژنتیکی پلاستید و محدودیت تعداد مسیرهای تجزیه پروتئین، نبود اثرات مکانی^۲ و عدم خاموشی ژن^۳ به دلیل ورود ژن در جایگاه‌های مشخص در ژنوم پلاستیدی، عدم انتقال ژن‌های پلاستیدی از طریق دانه گرده (به دلیل توارث مادری پلاستیدها) در اغلب گونه‌های نهاندانگان اشاره کرد (Verma and Daniell 2007). علاوه بر موارد فوق، پلاستیدها به دلیل دارا بودن سیستم بیان پروکاریوتی، توانایی بیان چندین ژن (پلی سیسترونی) را به طور هم زمان از یک اپرون دارند. این ویژگی امکان بیان پروتئین‌های پیچیده چند زیرواحدی را از یک mRNA که توسط یک راه انداز رونویسی می‌شود، فراهم می‌سازد. همچنین بیان چندین ژن به صورت پلی سیسترونی، امکان انجام واکنش‌های متابولیکی پی در پی را تنها با یک بار تراریخت نمودن فراهم می‌کند. از طرف دیگر با استفاده از یک اپرون برای چندین ژن، می‌توان به جای چندین ژن نشانگر تنها یک نشانگر گزینشی استفاده کرد (Obembe et al. 2010). در این راستا با بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک، تراریختی کلروپلاستی برای اصلاح صفات زراعی، بهبود مسیرهای متابولیکی و همچنین در زراعت مولکولی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب (داروئی و صنعتی) ارزشمند با منشأ گیاهی گسترش یافته است. اولین تراریختی پایدار کلروپلاستی در جلبک کلایدوموناس با الحاق DNA برهنه^۴، درون ژنوم کلروپلاست از طریق تفنگ ژنی گزارش شد (Boynton et al. 1988). اولین تراریختی پایدار در ژنوم کلروپلاست گیاهان عالی در توتون توسط سیستم تفنگ ژنی انجام شد (Svab et al. 1990). در زمینه زراعت مولکولی به منظور تولید پروتئین‌های با ارزش دارویی با استفاده از تراریختی کلروپلاستی پیشرفت‌های زیادی حاصل شده است از جمله می‌توان به تولید آنتی بادی مونوکلونال (Daniell et

al. 2004). اینترفرون آلفا (Arlan et al. 2007)، هورمون رشد شبه انسولین (Daniell et al. 2009) و پپتید آنتی میکروبی (Oey et al. 2009) اشاره کرد. در ایران نیز کارهای تحقیقاتی ارزنده‌ای در زمینه استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور انجام شده که از جمله آنها می‌توان به تولید آنتی بادی نو ترکیب تک دومنی (V_{HH}) علیه ژن MUC1 در گیاه توتون (Rajabi Memari et al. 2006) و پروتئین فعال کننده پلازمینوژن بافتی^۵ با منشأ انسانی در توتون (Masoumi et al. 2009) اشاره کرد.

اینترفرون‌ها به طور عمده به عنوان فعال کننده سلول‌های سیستم ایمنی عمل می‌کنند. اینترفرون گاما یک مولکول پروتئین همودایمر ترشحی است که هر مونومر آن از ۱۴۳ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای دو محل جهت گلیکوزیلاسیون در محل اسید آمینه‌های ۲۵ و ۹۷ و فرم فعال آن به صورت دایمر می‌باشد (Ganes et al. 1992). ژن اینترفرون گاما بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد و شامل ۳ اینترون و ۴ اکزون می‌باشد و پلی پپتیدی با طول ۱۶۶ اسید آمینه را کد می‌کند که دارای ۲۰ اسید آمینه پپتید نشانه می‌باشد. وزن مولکولی پیش بینی شده برای اینترفرون گاما متفاوت بوده و ۱۷ تا ۲۵ کیلو دالتون را شامل می‌شود (Ganes et al. 1992). از این پروتئین برای درمان بیماری‌هایی که نقص ایمنی مادر زادی دارند، استفاده می‌شود. از اینترفرون‌های نو ترکیب در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی و سرطان‌ها استفاده می‌شود. این عوامل معمولاً به شکل تزریقی زیر جلدی یا درون عضلانی استفاده می‌شوند. نیمه عمر پلاسمایی آنها حدود ۴-۸ ساعت است و اثرات بیولوژیک آنها ۲-۴ روز در بدن باقی می‌ماند. (Gresser 1990). کاربردهای فراوان این دارو باعث شده تا محققین در صدد تولید آن با استفاده از روش‌های DNA نو ترکیب با قیمت مناسب برآیند. این پروتئین تا کنون در میزبان‌های مختلفی از جمله سلول‌های CHO، mammary gland of transgenic mice و baculovirus-infected sf9 insect cells بیان شده است (Freedman et al. 1996) اما در واقع امروزه اینترفرون گامای نو ترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* (Actimmun™) به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین اینترفرون گاما در گیاهان از جمله در سوسپانسیون برنج (Chen et al.

¹ Chloroplast transformation

² Position effect

³ Transgene silencing

⁴ Naked DNA

⁵ Tissue plasminogen activator

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

مواد و روش‌ها

ساخت سازه کلروپلاستی حاوی ژن اینترفرون گامای انسانی (Human *ifn-G*) برای تهیه ناقل کلروپلاستی دارای ژن اینترفرون گاما که در آن ژن های *ifn-G* و *aadA* در یک اپرون و تحت کنترل یک راه انداز بیان شوند، ژن *ifn-G* (AF506749) در ناقل کلروپلاستی pKCZ (این ناقل در سال ۲۰۰۱ توسط Zhurong به منظور انتقال ژن به کلروپلاست توتون ساخته شد و در ایران از آقای دکتر هوشنگ علیزاده تهیه شد) بین راه انداز *Prnn* (راه انداز ژن *rRNA*) و ژن *aadA* در محل آنزیم برشی *NcoI* درج شد تا به صورت دیسیسترونی بیان شود. توالی‌های INSR و INSL در ناقل pKCZ موجود می‌باشند و دقیقاً مشابه توالی‌هایی هستند که در ژنوم کلروپلاست توتون در ناحیه توالی‌های تکراری و معکوس (IR) قرار دارند. نو ترکیبی بین این توالی‌های مشابه منجر به الحاق توالی بین INSL و INSR در ناقل pKCZ حامل ژن *ifn-G* درون ژنوم کلروپلاست دقیقاً در ناحیه بین *trnR-ACG* و *trnN-GUU* می‌شود. برای تکثیر ژن *ifn-G*، آغازگر پیشرو 5'-cat gcc F1 (5'-cat gcc atg gat ccc tcc ctt cat tac tgg gat R آغازگر پیرو 5'-cat gcc atg gat ccc tcc ctt cat tac tgg gat R با غلظت ۰/۴ μM، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، بافر PCR ۱X (سیناژن)، MgCl₂ با غلظت ۱/۴ mM، dNTP با غلظت ۰/۲ mM و آب دو بار استریل مورد استفاده قرار

گرفتند. آغازگر پیشرو حاوی توالی His-tag برای تسهیل در مراحل تخلیص پروتئین اینترفرون گاما در مراحل نهایی و سایت برشی آنزیم *NcoI* می‌باشد و آغازگر پیرو حاوی توالی اتصال به ریبوزوم و سایت برشی برای آنزیم *NcoI* می‌باشد. از آنجا که سایت برشی *NcoI* در ناقل pKCZ بعد از توالی اتصال به ریبوزوم (RBS) مربوط به ژن *aadA* قرار دارد، بنابراین همسانه‌سازی ژن *ifn-G* در این محل، منجر به جدایی سایت شروع ترجمه ژن *aadA* از توالی اتصال به ریبوزوم آن خواهد شد، بنابراین لازم بود توالی اتصال به ریبوزوم دیگری برای ژن *aadA* در آغازگر پیرو تعبیه شود. در مرحله بعد هضم آنزیمی ژن *ifn-G* و ناقل pKCZ با آنزیم *NcoI* و اتصال قطعات هضم شده طبق دستورالعمل‌های استاندارد انجام گرفت (Sambrook et al. 1989). برای اطمینان از همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل pKCZ از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بهره گرفته شد. تراریختی کلروپلاستی

بذور توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Zanthi) ضد عفونی و برای جوانه زنی بر روی محیط MS^۱ قرار داده شدند. بعد از چند هفته برگهایی که طولشان از ۵ سانتی متر بیشتر بود و به رنگ سبز تیره بودند برای شلیک انتخاب شدند و بر روی محیط ساقه‌زایی (RMOP) طوری قرار گرفتند که پشت برگ در تماس با محیط باشد. سپس شلیک طبق دستورالعمل‌های استاندارد (Svab and Maliga 1993) انجام شد. برگها بعد از شلیک به قطعات کوچکتر تقسیم شدند و برای باززایی به محیط RMOP که حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین بود، انتقال یافتند. از آنجا که ژن *aadA* باعث ایجاد مقاومت در برابر اسپکتینومایسین می‌شود، تنها سلول‌هایی می‌توانند زنده مانده و باززا شوند که سازه مذکور را دریافت کرده‌باشند. شش تا هشت هفته بعد از بمباران اولین گیاهان باززا شده برای ریشه‌دار شدن به محیط MS حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین انتقال یافتند.

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

^۱ Murashig and Skoog

شد (Akins and Tuan 1992). ژل SDS-PAGE⁵ به صورت ۱۲ درصد تهیه شد و پروتئین‌ها بر روی ژل به مدت ۱۶ ساعت الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز مراحل رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری برای ظهور باندهای پروتئین انجام شد. همچنین برای تشخیص دقیق‌تر پروتئین‌ها از آزمون لکه‌گذاری⁶ استفاده شد. پروتئین‌های استخراج شده بر روی غشاء نیتروسولوزی بارگیری و آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه (Santa Cruz) برای تأیید حضور پروتئین اینترفرون گاما طبق دستورالعمل (Sambrook et al. 1989) اضافه شدند و نهایتاً سوبسترا (شامل DAB⁷، H₂O₂ و PBS) برای تشخیص اتصال آنتی‌بادی اولیه به پروتئین اینترفرون گاما بر روی غشاء نیتروسولوزی اضافه شد.

نتایج و بحث

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

سازه *pKCZ-ifnG* با بهره‌گیری از تفنگ ژنی و بمباران قطعات برگی توتون به ژنوم کلروپلاستی منتقل شد. حدود شش تا هفت هفته پس از شلیک چندین گیاه در محیط ساقه‌زایی (حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین) باززا شدند (شکل ۲-الف). گیاهان باززایی شده برای ریشه‌زایی به محیط MS (حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین) انتقال یافتند (شکل ۲-ب). برای رسیدن به هموپلاسمی کامل در گیاهان تراریخت ۴ دور باززایی در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انجام گرفت و گیاهان تراریخت کلروپلاستی به خاک منتقل شدند (شکل ۲-ج).

CTAB¹ استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ifn-G* PCR² انجام شد. همچنین برای تأیید درج ژن در محل صحیح آن در ژنوم کلروپلاست (بین *trnN* و *trnR*) با استفاده از آغازگری که بر اساس توالی در درون ژنوم کلروپلاست در نزدیکی *trnR* طراحی شده بود (Soria-Guerra et al. 2009) به عنوان آغازگر پیشرو و آغازگر پیرو ژن *ifn-G*، PCR دیگری انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح RNA استخراج RNA با استفاده از محلول RNX-PlusTM (شرکت سیناژن) انجام شد. برای این منظور ۰/۲ g از بافت برگ سبز که با نیتروژن مایع به خوبی ساییده شده بود، درون ویال که محتوی یک میلی‌لیتر از این محلول بود، ریخته شد و بعد از ۳۰ ثانیه مخلوط کردن، ویال به مدت یک ساعت روی یخ قرار داده شد. مقدار ۲۰۰ μl کلروفرم درون ویال اضافه شد و بعد از ۲ تا ۳ بار وارونه کردن ویال، ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل در ۱۰۶۲۵ x g در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از سه فاز تشکیل شده در ویال، فاز روایی که حاوی RNA می‌باشد به آرامی به ویال استریل انتقال داده شد. سپس ۲۰۰ μl کلروفرم اضافه شد و مرحله قبل مجدداً تکرار شد. به فاز روایی ۸۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه شده و بعد از چند بار وارونه‌سازی به مدت یک ساعت در ۲۰°C- قرار داده شد. بعد از مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۰۶۲۵ x g، RNA رسوب کرد و بعد از شست و شوی رسوب با اتانول ۷۵ درصد، مقدار ۳۰ μl آب DEPC³ به رسوب اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای ۵۵°C قرار داده شد تا RNA خوب حل شود. برای حذف DNA های پلاستییدی و ژنومی از DNase I و برای ساخت cDNA از کیت فرمتاز استفاده شد. واکنش RT-PCR⁴ بر روی این cDNA انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح پروتئین کل پروتئین‌های محلول با روش مبتنی بر فنول (Faurobert et al. 2007) استخراج و کمیت آن با روش برادفورد اندازه‌گیری

⁵ Sodium dodecyl sulfate polyacrilamid gel electrophoresis

⁶ Dot blot

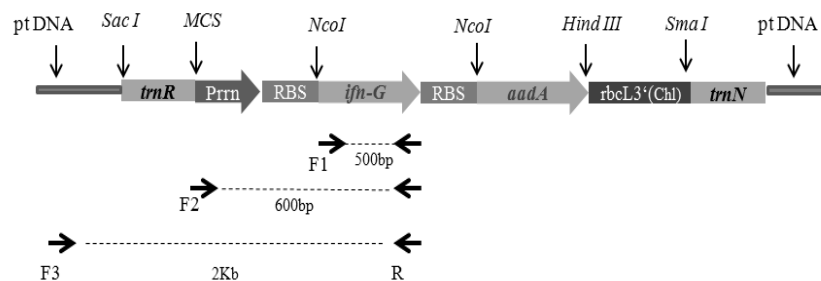
⁷ 3,3'-diaminobenzidine

¹ Cetyl trimethyl ammonium bromide

² Polymerase chain reaction

³ Diethylpyrocarbonate

⁴ Reverse transcriptase PCR



شکل ۱- سازه pKCZ-ifn-G : trnR و trnN در دو طرف سازه توالی‌های مشابه با ژنوم کلروپلاستی که جهت انجام نوترکیبی الزامی هستند، Prm1 راه‌انداز هر دو ژن *ifn-G* و *aadA*، RBS محل اتصال پروتئین‌های ریبوزومی برای شروع ترجمه، *rbcL3'(Chl)* توالی خاتمه‌دهنده رونویسی، *aadA* ژن آمینوگلاکوزید ۳- آدنیل ترانسفراز که مقاومت به اسپکتینومایسین را ایجاد می‌کند، *ifn-G* پروتئین اینترفرون گاما را تولید می‌کند. ptDNA ژنوم کلروپلاستی. فلش‌ها جایگاه اتصال آغازگرهای اختصاصی را نشان می‌دهند: F1 توالی ابتدای ژن اینترفرون گاما، F2 توالی ابتدای راه‌انداز Prm1، F3 توالی درون ژنوم کلروپلاست نزدیک به توالی R و trnR توالی انتهایی ژن اینترفرون گاما.

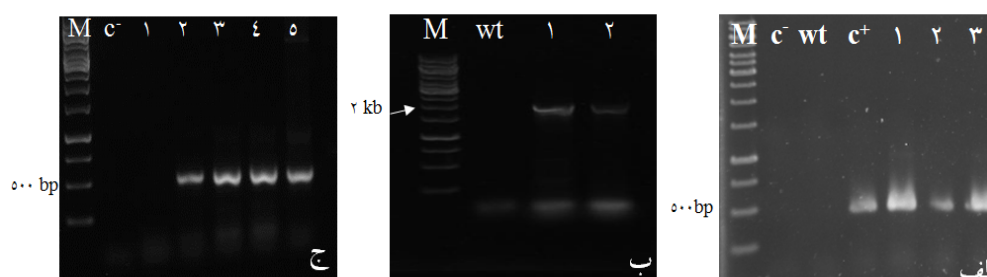


شکل ۲- الف) گیاهان باززایی شده بر روی محیط ساقه زایی حاوی ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین شش هفته بعد از بمباران؛ ب) گیاهان ریشه دار شده در محیط MS حاوی ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین؛ ج) گیاهان تراریخت کلروپلاستی منتقل شده به گلدان (بعد از ۴ دور باززایی).

انجام شد و برای اطمینان از حذف کامل DNAهای پلاستی، RNA استخراجی از گیاهان تراریخت که با آنزیم DNase I تیمار شده بود نیز مورد PCR قرار گرفت. تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح پروتئین الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده از برگ گیاهان تراریخت و شاهد توتون بر روی ژل SDS-PAGE انجام شد و یک باند تقریباً ۲۲ کیلو دالتونی در گیاهان تراریخت مشاهده شد ولی در گیاهان شاهد این مشاهده نشد (شکل ۴). همچنین برای اطمینان بیشتر از بیان ژن اینترفرون گاما در سطح پروتئین آزمون لکه‌گذاری انجام شد و اتصال پروتئین اینترفرون گاما به آنتی بادی اختصاصی به وسیله سوبسترای DAB اثبات شد (شکل ۵).

واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی *ifn-G* (F1 و R) بر روی DNA استخراجی از گیاهان باززا شده انجام شد و تراریختی این گیاهان را تأیید کرد (شکل ۳- الف). همچنین ورود ژن اینترفرون گاما در محل صحیح در ژنوم کلروپلاست به وسیله PCR با آغازگرهایی که به این منظور طراحی شده بود (F3 و R)، اثبات شد. شکل ۱ محل طراحی این آغازگرها را به صورت شماتیک نشان می‌دهد. فاصله این دو آغازگر در گیاهان تراریخت که توالی بین trnR و trnN را در pKCZ دریافت کرده‌اند، تقریباً ۲ kb می‌باشد در صورتی که در گیاهان شاهد این قطعه دیده نمی‌شود (شکل ۳- ب).

واکنش RT-PCR بر روی cDNA گیاهان شاهد و تراریخت



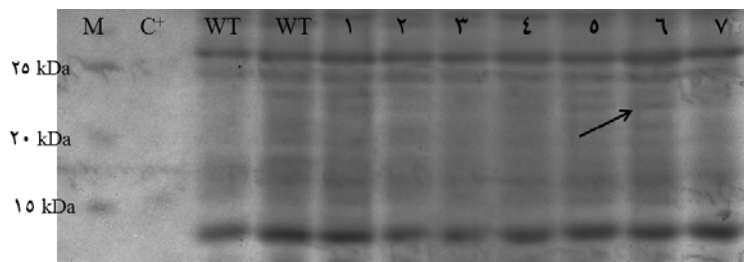
شکل ۳- الف) نتایج PCR بر روی گیاهان باززا شده برای تأیید انتقال ژن اینترفرون گاما به ژنوم کلروپلاست توتون با استفاده از آغازگرهای F1 و R. M نشانگر 1 kb؛ C⁻ کنترل منفی؛ wt گیاه شاهد؛ C⁺ کنترل مثبت؛ (۱-۳) گیاهان تراریخت کلروپلاستی ب) نتایج PCR برای تأیید درج ژن اینترفرون گاما در محل صحیح درون ژنوم کلروپلاست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

محدودیتی برای تولید آن در کلروپلاست از نظر فرایندهای پس از ترجمه وجود ندارد.

ژن اینترفرون گاما به هسته گیاهان مختلفی از جمله توتون انتقال یافته است اما میزان بیان در آنها بسیار پایین بوده است مثلاً در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ انجام گرفته بیشترین میزان بیان در توتون ۰/۰۴ درصد از کل پروتئین محلول برگ بوده است (Wu et al. 2009) و در تحقیق دیگری ۰/۰۰۱ درصد (Leelavathi et al. 2003) بوده است. برای افزایش بیان و پایداری این پروتئین با روش تراریختی هسته‌ای از اتصال آن به اولئوسین و بیان آن در بذر کلزا با یک راه‌انداز القایی می‌توان نام برد (Bagheri et al. 2010). به هر حال بیان ژن در کلروپلاست بسیار بیشتر از هسته است و می‌تواند باعث کاهش قابل توجهی در هزینه‌ها شود. مثلاً انتقال ژن پروانسولین به کلروپلاست گیاه کاهو منجر به تولید آن تا ۴۷ درصد از کل پروتئین برگ شده است (Boyhan et al. 2011). اما مساله تجزیه شدن پروتئین‌هایی از جمله اینترفرون گاما باز هم محدودیتی ایجاد کرده که برای حل این مشکل محققین از تکنیک اتصال به پروتئین‌های پایدار مانند CTB^۱ و GUS استفاده می‌کنند در یک تحقیق اینترفرون گاما با پروتئین GUS متصل شده در کلروپلاست تولید شده است و میزان بیان پروتئین بسیار افزایش یافته است (Leelavathi et al. 2003). ولی اتصال این پروتئین‌ها نیز مسائل دیگری مانند اختلال در اثرات بیولوژیکی را به وجود می‌آورد.

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

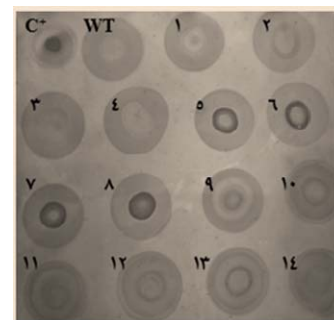
^۱ Cholera toxin b subunit



شکل ۴- الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل SDS-PAGE، M نشانگر پروتئین، C^+ کنترل مثبت (پروتئین اینترفرون گاما: ایموگین)، WT پروتئین استخراج شده از گیاهان غیر تراریخت، ۱ تا ۶ پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون. فلش محل پروتئین نو ترکیب را نشان میدهد.

(Soria-Guerra et al. 2009). در این تحقیق نیز بیان همزمان ژن *aadA* با اینترفرون گاما در قالب یک اپرون دی سیسترونی در کلروپلاست گیاه توتون بررسی شد و نتایج این تحقیق نیز نشان داد که بیان همزمان چندین ژن در کلروپلاست در قالب یک اپرون یعنی با یک راه انداز و یک خاتمه دهنده امکان پذیر است که در انتقال ژن به هسته امکان آن وجود ندارد.

در مجموع طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان گفت استفاده از سیستم بیانی کلروپلاست در گیاه توتون برای تولید پروتئین اینترفرون گاما می تواند به عنوان یک روش ایمن و ارزان به ویژه در کشورهای در حال توسعه که این نوع داروها را با قیمت های بالا وارد می کنند، بسیار مفید باشد. اما تحقیقات بیشتر جهت رفع معضلات آن نظیر افزایش پایداری پروتئین در کلروپلاست و توسعه روش های تخلیص پروتئین از گیاه ضروری می باشد.



شکل ۵- بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما با روش لکه گذاری، C^+ پروتئین کنترل مثبت (پروتئین اینترفرون گاما)، WT پروتئین استخراج شده از گیاه غیر تراریخت، ۱ تا ۱۴ پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی، تغییر رنگ در شماره های ۹ تا ۱۳ نشان دهنده بیان پروتئین اینترفرون گاما در گیاهان تراریخت می باشد.

در این تحقیق همچنین امکان بیان ژن اینترفرون گاما و ژن گزینشگر در قالب یک اپرون بررسی شد. بسیاری از ژن ها در ژنوم کلروپلاست به صورت اپرون سازمان دهی شده اند بدین معنی که مجموعه دو یا چند ژن به وسیله RNA پلیمراز از یک راه انداز رونویسی می شوند. بنابراین اگر هدف انتقال چند ژن به طور همزمان به ژنوم کلروپلاست باشد می توان این ژن ها را فقط با یک راه انداز و یک ژن گزینشگر در یک بار شلیک وارد ژنوم ساخت که در این صورت کار انتقال ژن ها ساده تر شده و در زمان کوتاه تری امکان پذیر می شود. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ انجام شده است، ژن *GFP* با ژن *aadA* به صورت دیسیسترونی در توتون با موفقیت بیان شده است (Jeong et al. 2004) همچنین در سال ۲۰۰۹ در تحقیق دیگری بیان پلی پپتید DPT (واکسن تلفیقی علیه سه بیماری دیفتری، کزاز و سیاه سرفه) به صورت همزمان با ژن مقاومت *aadA* در کلروپلاست توتون بیان شد

منابع

- Akins RE, Tuan RS (1992) Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. *Biotechniques* 12: 496.
- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnol* 5: 511-525.
- Bagheri KH, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, Zebajadi A (2010) Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. *African Journal of Biotechnology* 9: 5066-5072.
- Boyhan D, Daniell H (2011) Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnolohy Journal* 9: 585-598.

- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1537.
- Chen TL, Lin YL, Lee YL, Yang NS, Chan MT (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic research* 13: 499-510.
- Daniell H, Carmona-Sanchez O, Burns B (2004) Chloroplast derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. In: *Molecular Farming*. Fischer R and Schillberg S (Eds.) Verlag Publ, Weinham, Germany 113-133.
- Daniell H, Uiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W (2009) Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnology* 9: 23.
- Ebrahimi N, Memari HR, Ebrahimi MA, Ardakani MR (2012) Cloning, transformation and expression of human gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). *Biotechnology and Biotechnological equipment* 26: 2925-2929.
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J (2007) *Plant proteomics: method and protocols*. Humana Press, New Jersey, USA, 9-14.
- Freedman RB, Jenkins N, James DC, Goldman MH, Hoare M, Oliver RWA, Green BN (1996) Posttranslational processing of recombinant human interferon- in animal expression systems. *Protein Science* 5: 331-340.
- Ganes CS, Lengyel P (1992) The Interferon System a bird's eye view of its biochemistry. *Journal of Biological Chemistry* 267: 5017-5020.
- Gresser I (1990) Biologic effects of interferons. *Investigative Dermatology* 95: 66-71.
- Honari H (2008) Expression of PA gene from *Bacillus anthracis* in Iranian lettuce (*Lactuca sativa*). *Dissertations*, Tehran University, Iran. (In Farsi).
- Jeong SW, Jeong WJ, Woo JW, Choi DW, Park YI, Liu JR (2004) Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. *Plant Cell Report* 22: 747-751.
- Leelavathi S, Siva Reddy V (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS- fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Molecular Breeding* 11:49- 58.
- Masoumi Asl M, Jalali Javaran F, Mahbodi F Alizadeh H (2009) Cloning and Transformation of human tissue Plasminogen Activator (t-PA) gene in Tobacco Plants. *Iranian Journal of Biology* 22: 516- 529. (In Farsi).
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Siva Reddy V (2010) Recent advances in chloroplast transformation. *Indian Journal of Science and Technology* 3: 1229-1235.
- Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R (2009) Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 6579-6584.
- Rajabi-Memari H, Jalali-Javaran M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh Moghadam M, Esmaili A (2006) Expression and characterization of a recombinant single-domain monoclonal antibody against MUC1 mucin in tobacco plants. *Hybridoma* 25: 209- 215.
- Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NewYork, USA.
- Soria-Guerra RE, Alpuche-Solis AG, Rosales-Mendoza S, Moreno-Fierros L, Bendik EM, Martinez-Gonzales L (2009) Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer. *Plant* 229:1293-1302
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Mailga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceeding of the National Academy of Science of USA* 87: 8526-8530.
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceeding of the National Academy of Science of USA* 90: 913-917.
- Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiology* 145:1129-1143.
- Wetzel R, Perry LJ, Veilleux C, Chang G (1990) Mutational analysis of the C-terminus of human interferon- γ . *Protein Engineering* 3: 611-623.
- Wu Y, Zhao D, Song L, Xu W (2009) Heterologous expression of synthetic chicken IFN- γ in transgenic tobacco plants. *Biology* 64: 1115-1122.
- Zhurong Z (2001) Analysis of cis-acting expression determinants of the tobacco *psbA* 5'UTR in vivo. *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany.