

## طراحی و ساخت سازه ترکیبی اولئوسین - اینترفرون گاما و انتقال

### آن به گیاه کلزا

خدیجه باقری<sup>۱</sup>، مختار جلالی جواران<sup>\*</sup><sup>۱</sup>، فریدون مهبدی<sup>۲</sup>، احمد معینی<sup>۱</sup>، علیرضا زبرجدی<sup>۳</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی  
دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار بخش بیوتکنولوژی، انسیستتو پاستور ایران

۳- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

\*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک : m\_jalali@modares.ac.ir

### چکیده

استفاده از ژن اولئوسین گیاهی یک روش مطلوب به منظور تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد و همچنین استخراج راحت تر و ارزان تر است. اتصال اولئوسین به ژن مدنظر و استفاده از پیشرنده اختصاصی بذر، موجب هدف‌گیری پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی بذر می‌شود. در این تحقیق، سازه ترکیبی اینترفرون گاما- اولئوسین برای تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی در بذر گیاه کلزا طراحی و ساخته شد. برای این منظور ابتدا ژن اولئوسین از ژنوم گیاه کلزا جدا و در ناقل ییانی گیاهی pBI121 همسانه سازی شد. سپس ژن اینترفرون گاما در پائین دست ژن اولئوسین همسانه سازی شد و بین این دو ژن تحت کنترل پیشرنده بذری Napin قرار گرفت. ناقل pBI121 حاوی سازه مورد نظر به اگروباکتریوم سویه LBA4404 معروفی و برای تاریختی گیاه کلزا از ریزنمونه های کوتیلدون استفاده شد. گزینش نواسقه های بازیابی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین انجام شد. آنالیز بذر تاریخته نسل اول (T0) با PCR بیانگر انتقال ژن γ IFN و آزمون RT-PCR نشان دهنده بیان ژن γ IFN بود.

### واژه های کلیدی

سازه ژنی فیوزن ،  
اینترفرون گاما ،  
اولئوسین ،  
اجسام روغنی ،  
پروتئین نوترکیب ،  
کلزا تاریخته

**مقدمه**

دارد و در دانه های روغنی مثل کلزا مقدار آن تا ۲۰٪ پروتئین کل بذر را تشکیل می دهد، هدف گیری صحیح پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی صورت می گیرد (۵). با توجه به مقدار بالای تری اسیل گلیسرولئید (TAGs) در اجسام روغنی، این بخش به راحتی با استفاده از سانتریفوژ از دیگر پروتئین های بذر و اجزای سلولی جدا می شود (۶). در ارزیابی کارآیی این روش مشخص شده که بیش از ۹۰٪ از پروتئین های بذری حذف می شوند. به این ترتیب خالص سازی پروتئین نوترکیب با هزینه کمتر و سهولت بیشتری صورت می گیرد (۳).

هدف از این تحقیق، تولید ایترفرون گامای (IFN $\gamma$ ) انسانی با استفاده از فناوری کشاورزی مولکولی در بذر گیاه کلزا است. پروتئین IFN $\gamma$  برای درمان بیماران با نقص مادرزادی و همچنین عوامل عفونی درون سلولی مانند لیشمانيا (۷) و سالمونلا تیفوموریوم (۸) و غیره کاربرد دارد. استفاده از آن در درمان سرطان های مختلف از جمله نوروبلاستوما (۹) و ملانوما (۱۰) نیز کاربرد گسترده ای دارد.

به دلیل ارزش درمانی بالای IFN $\gamma$ ، تلاش های زیادی در جهت تولید انبوه آنها صورت گرفته اما در اغلب موارد پروتئین تولید شده ساختار فضایی مناسب نداشته و یا اینکه برخلاف انواع طبیعی گلیکوزیله نمی شوند (۱۱). استفاده از سلول های یوکاریوتی جهت تولید آنها نیز هزینه بسیار بالایی دارد. بنابراین به نظر می رسد که استفاده از گیاهان برای تولید پروتئینهای نوترکیب از جمله IFN $\gamma$  یک روش جایگزین مناسب کم هزینه و سریع باشد.

**مواد و روش ها**

**ناقل های ژنی و سویه های باکتری**  
از باکتری *E.coli* سویه' Top10 F' و ناقل pGEM<sup>®</sup>-T Easy برای همسانه سازی استفاده شد. برای تاریختی گیاهان از باکتری اگروباكتریوم (*Agrobacterum tumefaciens*) سویه LBA4404 و پلاسمید pBI121 (Novagen) حاوی پیشبرنده بذری Napin (این پیشبرنده از خارج از کشور تهیه شد) استفاده گردید.

سیستمهای رایج برای تولید داروهای بیولوژیکی استفاده از میکرووارگانیسم هایی مثل باکتری *E. coli* و سلولهای جانوری است. اما معایب عمله این روش ها، هزینه بالا و نیز متفاوت بودن پروتئین های تولید شده با فرم طبیعی آنها است. با استفاده از میزان های گیاهی می توان مواد زیستی فعال، مطمئن و با هزینه پائین تولید کرد. مزیت عمله گیاهان نسبت به میکرووارگانیسم ها این است که تغییرات پس از ترجمه که برای فعالیت پروتئین های نوترکیب لازم است در گیاهان بهتر و مطلوبتر انجام می شود. همچنین هزینه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می تواند حداقل یک دهم سیستم تخمیری و یک هزار مول جانوری باشد. به علاوه در این روش خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماریزای انسانی یا بیماری های مشترک انسان و دام به حداقل می رسد (۲).

پروتئین های نوترکیب در اندامهای مختلف گیاهی مثل برگ، بذر، باقهای ذخیره رویشی مثل غده تولید شده است. به چند دلیل بذور گیاهی برای تولید و ذخیره رویشی پروتئین های نوترکیب بیشتر مورد توجه هستند. از جمله اینکه پروتئین تولید شده و ذخیره شده در بذر نسبت به اندامهای دیگر گیاه پایداری بیشتری دارد، همچنین پائین بودن مقدار ترکیبات فنولیک در بذر و نیز تخلیص راحت تر پروتئین از آنها موجب شده که به عنوان یک گزینه مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند (۳).

با وجود اینکه گیاهان در بیشتر موارد پروتئین های انسانی را تولید می کنند ولی به دلیل بالا بودن هزینه های تخلیص، استفاده از این فناوری محدود شده است. یادآوری این نکته ضروری است که حدود ۸۸٪ هزینه های تولید پروتئین های نوترکیب در سیستم های مختلف مربوط به خالص سازی آنها است (۴). چنانچه بتوان پروتئین نوترکیب تولید شده را به اجسام روغنی بذر هدف گیری کرد، استخراج پروتئین تولید شده با سهولت بیشتر و هزینه کمتری انجام خواهد شد.

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده که در صورت استفاده از پیشبرنده بذری و همچنین اتصال ژن مورد نظر به ژن اولئوسین گیاهی (اولئوسین پروتئینی) است که در ساختار اجسام روغنی بذر وجود

طوری طراحی شد تا رمز ژنتیکی خاتمه از انتهای آن حذف شود. استخراج دی.ان.ای ژنومی از برگ های جوان گیاه کلزا به روش CTAB انجام شد (۱۳). سپس ژن اولئوسین با بهره گیری از تکنیک PCR از دی.ان.ای ژنومی کلزا جدا و تکثیر شد. پس از تکثیر و تخلیص، زنهای مورد نظر در ناقل T Easy Vector (Promaga) همسانه سازی شدند. سازه تهیه شده به سلولهای مستعد *E. coli*. منتقل گردید. به منظور شناسایی کلنی های مثبت، بر روی کلنی های سفید رشد کرده در محیط انتخابی (حاوی آمپی سیلین، تتراسیکلین، IPTG و X-Gal)، کلنی PCR- انجام شد. سپس کلون های مثبت انتخاب شده با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و تائید شدند. جهت حصول اطمینان از صحیح بودن کلون های شناسایی شده پس از توالی یابی قطعات DNA هدف، آنالیزهای لازم با استفاده از نرم افزار (۱۴) و BLAST و برنامه Clustalw (۱۵) صورت پذیرفت.

تکثیر ژن های IFN $\gamma$  و اولئوسین و همسانه سازی آنها در ناقل

**T Easy Vector** ژن IFN $\gamma$  انسانی از انتیتو پاستور ایران تهیه شد. mRNA این ژن توسط معین رضاخانلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ جدا و تعیین توالی شد و در بانک ژن با شماره دسترسی AF506749 به ثبت رسیده است (۱۶). براساس توالی موجود  $\gamma$  IFN در بانک ژن، دو آغازگر اختصاصی (شماره ۳ و ۴) برای تکثیر آن طراحی شد (جدول ۱). در آغازگر پیش بر توالی برشی پروتئولایتیکی در انتهای<sup>۵</sup> (که زیر آن خط کشیده شده است) تعییه شد. جایگاه برشی آنزیمهای SmaI و SacI به ترتیب در آغازگر پیش بر آغازگر معکوس قرارداده شد.

برای تکثیر ژن اولئوسین دو آغازگر اختصاصی براساس توالی موجود در بانک ژن (شماره دسترسی X61937) طراحی شد. جایگاه های برشی BamHI و SmaI به ترتیب در ابتدای آغازگر پیش بر و آغازگر معکوس قرار داده شد (جدول ۱، آغازگر شماره ۱ و ۲). لازم به ذکر است که آغازگر معکوس ژن اولئوسین

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر زنهای اولئوسین و IFN $\gamma$

شماره آغازگر	توالی
۱	۵' TTGGATCCATGACGGATACTAGCTAGAAC ۳'
۲	۵' TACCCGGGGTAGTGTGCTGGGTTCCAC ۳'
۳	۵' TTCCC <span style="text-decoration: underline;">GGGATCGAAGGTCGTATGCAGGACC</span> CATATG ۳'
۴	۵' CTGAGCTCTACTGGGATGCTCTC ۳'

تهیه سازه ترکیبی ایترفرون گاما- اولئوسین *HindIII* و *BamHI* که در دو طرف آن قرار دارند، استفاده شد. سپس با همان آنزیم ها، پیشبرنده Napin جایگزین شد. در مرحله بعد ژن *gus* با آنزیمهای برشی *SacI* و *SmaI* حذف و به جای آن، ژن IFN $\gamma$  در همان مکان های برشی قرار داده شد. سپس ژن اولئوسین با استفاده از آنزیمهای برشی *BamHI* و *SmaI* در بالادرست ژن IFN $\gamma$  همسانه سازی گردید (شکل ۴).

#### تهیه سازه ترکیبی ایترفرون گاما- اولئوسین

ابتدا در ناقل بیانی pBI121، پیشبرنده اختصاصی بذر Napin جایگزین پیشبرنده CaMV 35S شد. پیشبرنده مذکور مربوط به پروتئین ذخیره ای Napin در بذر گیاه کلزا است. در بذور رسیده کلزا مقدار این پروتئین ۲۰-۳۰٪ پروتئین کل بذر را تشکیل می دهد (۱۶). برای حذف پیشبرنده CaMV 35S از آنزیم های برشی

ابتدا به گلدان های حاوی پرلیت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) و سپس به خاک منتقل شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. در مرحله گلدهی، گیاهان تاریخته با پاکت گذاری از یکدیگر جدا شدند تا از دگرگشته آنها جلوگیری شود. بذور جمع آوری شده از گیاهان تاریخته جهت آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

**بررسی مولکولی گیاهان تاریخته در سطح دی. ان. ای. و آر. ان. ای:**

از برگ های جوان گیاهان تاریخت و شاهد (گیاه غیرتاریخت)، DNA ژنومی با روش CTAB استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و ژن *IFNγ* واکنش PCR بر روی گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد.

**بررسی مولکولی گیاهان تاریخته در سطح آر. ان. ای:**  
برای بررسی بیان ژن در سطح آر. ان. ای از روش RT-PCR استفاده شد. نمونه برداری از بذور تاریخته حدود ۲۵ روز بعد از گلدهی انجام شد. آر. ان. ای از بذر گیاهان شاهد و تاریخته با استفاده از کیت تخلیص آر. ان. ای (QIAGEN) انجام و سپس نمونه با اسپکتروفتومتر تعیین غلظت شد. به منظور تأیید حذف آلودگی DNA بر روی آر. ان. ای PCR انجام شد. مراحل ساخت RevertAid™ First Strand cDNA cDNA با استفاده از کیت Synthesis Kits شرکت Fermentas و مطابق با پروتوكل با استفاده از آغازگرهای oligodT و Hexamer PCR انجام شد. بر روی cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *IFNγ* انجام شد.

### نتایج

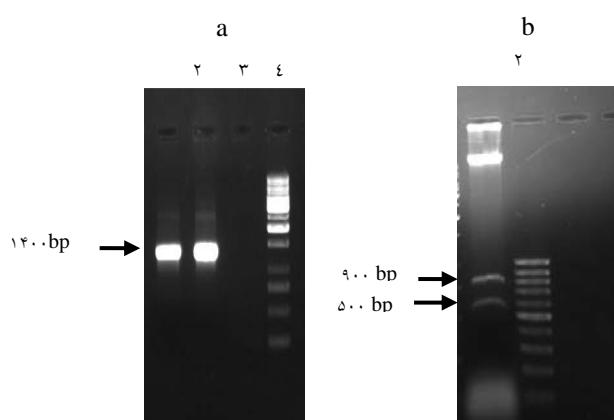
جايكزيني پيشبرنده Napin با هضم آنزيمی تاييد شد به اين ترتيب که قطعه ۱۱۴۰ bp (مربوط به Napin) بجای قطعه ۸۳۵ bp (مربوط به CaMV 35S) قرار گرفت (شکل ۱).

انتقال ژن و باززايی گیاهان تاریخته:

ضدغونوئي بذور كلزا (PF) با استفاده از هيپوكلريت ۲/۵٪ به مدت ۱۵ دقيقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استيريل، هر بار به مدت ۱۰ دقيقه انجام شد. برای جوانه زني بذور از محیط MS (۱۷) در دمای ۲۶°C با دوره نوري ۱۶ ساعت روشنايی و ۸ ساعت تاريکي استفاده شد. تاریخته و باززائی گیاهان مطابق با روش Molony و همكاران (۱۸) با اندکي تغييرات انجام شد. به اين ترتيب که ۶-۴ روز پس از جوانه زني بذر، برگهای کوتيلدوني (با طول دمبرگ تقریباً ۳ mm) با دقت از انتهای ترین محل دمبرگ (با حذف جوانه انتهایی) بریده شدند. يك روز قبل از انجام آلودگی، تک کلنی های اگر باكتريوم حاوی سازه مورد نظر در محیط ۵۰ µg/ml + LB نظر در دمای ۲۸°C تاریکي کشت داده شد، وقتی که OD باكتري رشد کرده به ۰/۷-۱ رسید، در دمای ۴°C و دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۵-۸ دقيقه سانتریفوژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت باكتري (LB)، محیط تلقیح (شامل ۵۰ gL⁻¹ MS گلوكز) به سلولهای باكتري رسوب داده شده اضافه و سلول ها کاملا در آن حل شدند. بعد از آماده کردن سوسپانسيون باكتري، ريزنمونه ها به مدت ۲۰-۳۰ ثانية در تماس با سوسپانسيون اگروباكتريوم حاوی سازه مورد نظر (ایترفرون گاما- اولنوسین) قرار گرفته و در پتري ديش های حاوی محیط هم کشتی (شامل ۴/۵ mgL⁻¹ BAP + MS) به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۶°C در تاريکي قرار داده شدند. در مرحله بعدی اين ريزنمونه ها بر روی محیط کشت انتخابي شامل محیط هم کشتی به اضافه ۱۰ mgL⁻¹ کاناامایسين (به منظور گزینش گیاهچه های تاریخته) و ۲۰۰ mgL⁻¹ سفاتوكسیم (برای کنترل اگروباكتريوم) در دما و دوره نوري مشابه مرحله قبل به مدت ۴ هفته نگهداري شدند. واکشت نمونه ها به فاصله هر ۱۵ روز يك بار انجام شد. برای طویل شدن ساقه از محیط ۱/۲ MS ۱/۲ MS ۱/۲ کاناامایسين به اضافه ۲۰۰ mgL⁻¹ سفاتوكسیم و برای ريشه زائي نوساقه های بدست آمده از محیط ۱۰۰ mgL⁻¹ + ۱/۲ MS سفاتوكسیم استفاده شد. در مرحله آخر، گیاهان ريشه دار شده

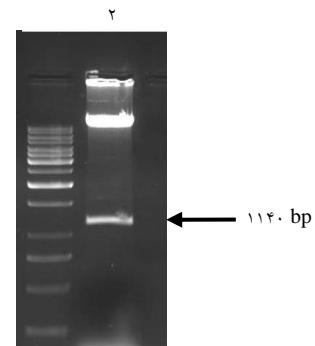
تکثیر ژن اولئوسین با استفاده از روش PCR و دی.ان.ای ژنومی کلزا به عنوان الگو، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، یک قطعه تقریبا ۹۰۰ bp تولید کرد. این قطعه نیز ابتدا در ناقل TA همسانه سازی و توالی یابی شد. پس از اطمینان از صحت قطعه ژن اولئوسین جداسازی شده، در محل های برشی *Sma*I و *Bam*HI در ناقل pBI121 در بالادست ژن IFN $\gamma$  کلون شد. بررسی نتایج توالی یابی میزان مشابهت ۹۹٪ را با توالی موجود در بانک ژن نشان داد.

سازه ترکیبی ایترفرون گاما- اولئوسین با استفاده از آغازگر پیش بر ژن اولئوسین و آغازگر معکوس IFN $\gamma$  (آغازگر شماره ۱ و ۴) با کلونی-PCR و هضم آنزیمی تایید شد. همانطور که انتظار می رفت محصول PCR یک قطعه ۱۴۰۰ bp بود که با هضم آنزیمی دو قطعه ۵۰۰ bp و ۹۰۰ bp تولید شد (شکل ۳).



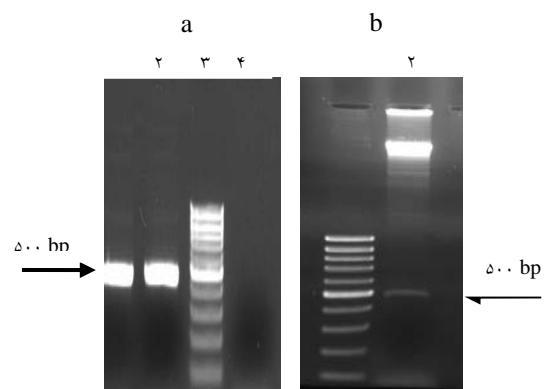
شکل ۳: تایید همسانه سازی ژن های INF $\gamma$  و اولئوسین با کلونی-PCR و هضم آنزیمی؛ (a) خط ۱ و ۲ قطعه ۱۴۰۰ bp تکثیر شده (مربوط به ژنهای INF $\gamma$  و اولئوسین)، خط ۳: کنترل منفی، خط ۴: نشانگر وزنی ۱kb. (b) خط ۱: ناقل pBI121 برش داده شده و قطعه ۵۰۰ و ۹۰۰ bp آزاد شده، خط ۲: نشانگر وزنی ۱۰۰ bp.

به این ترتیب سازه حاصله ترکیبی از پیشبرنده بذری Napin ژن اولئوسین و INF $\gamma$  و توالی برشی در بین دو ژن بدست آمد (شکل ۴).

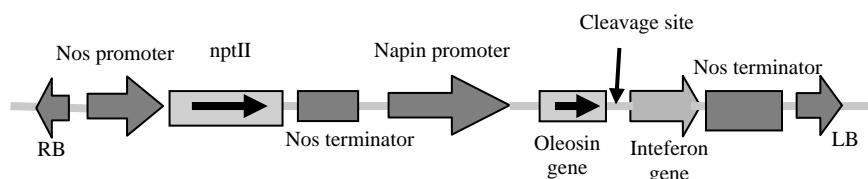


شکل ۱: تایید جایگزینی پیشبرنده CaMV 35S با پیشبرنده Napin خط ۱: نشانگر وزنی ۱kb خط ۲: ناقل pBI121 برش داده شده با آنزیمهای *Bam*HI و *Hind*III و که قطعه ۱۱۴۰ bp (مربوط به پیشبرنده Napin) آزاد شده است.

قطعه ۵۰۰ bp مربوط به ژن INF $\gamma$  بعد از همسانه سازی در ناقل TA و تایید توالی، در ناقل بیانی گیاهی pBI121 مجددا کلون شد سپس با استفاده از روشهای کلنسی-PCR و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۲).



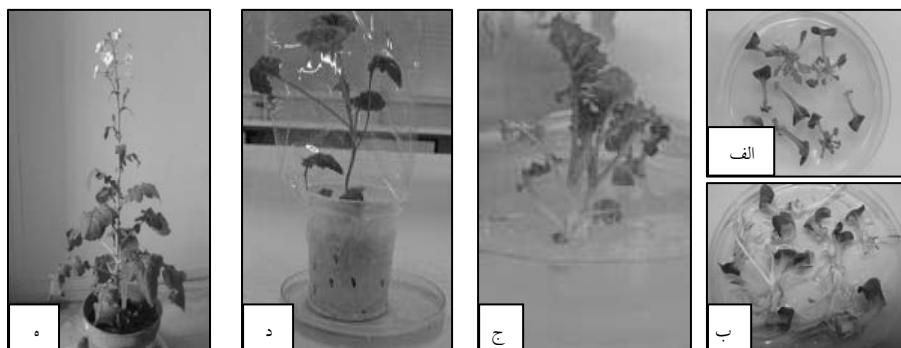
شکل ۲: تکثیر ژن INF $\gamma$  و تایید همسانه سازی آن با هضم آنزیمی در ناقل pBI121؛ شکل (a) خط ۱ و ۲: قطعه ۵۰۰ bp تکثیر شده (مربوط به INF $\gamma$ )، خط ۳: نشانگر ۱۰۰ bp و خط ۴: کنترل منفی. شکل (b) خط ۱: نشانگر وزنی ۱۰۰ bp، خط ۲: ناقل pBI121 برش داده شده و قطعه ۵۰۰ bp (ژن INF $\gamma$ ) آزاد شده.



شکل ۴: نمودار سازه حاوی ژن *nptII* (مقابلت به کاناامایسین)، پیشبرنده *Napin*، ژن  $\text{INF}\gamma$ ، جایگاه برشی پروتئولایتیکی و ژن اولئوسین که در ناقل بیانی pBI121 در بین دو ناحیه مرزی چپ (LB) و ناحیه مرزی راست (RB) قرار گرفته است.

گیاهان رشد یافته به گلدان های حاوی خاک، ماسه و ورمیکولیت منتقل شدند و تا زمان رسیدگی بذور در شرایط گلخانه نگهداری شدند (شکل ۵). گیاهان انتخاب شده در مرحله گلدهی پاکت گذاری شدند تا از دگرگرده افشارانی جلوگیری شود و بذور حاصل از آنها (نسل T0) جمع آوری و جهت بررسی های بعد نگهداری شد.

سازه تهیه شده به روش انجاماد و ذوب (۱۹) به اگروباکتریوم منتقل و با روش کلونی-PCR تایید شد و از آن برای تراریختی ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده شد. جوانه های باززایی شده که در محیط انتخابی، سبز مانده بودند ابتدا به محیط رشد نوساقه (فاقد هورمون) منتقل و پس از ریشه دار شدن به گلدان های حاوی پرلیت جهت سازگاری به شرایط محیط منتقل شدند. سپس



شکل ۵: باززایی و رشد نوساقه های گیاه کلزا پس از تراریختی، (الف) باززایی نوساقه ها از ریزنمونه کوتیلدونی در محیط انتخابی، (ب) باززایی نوساقه های سفید از ریزنمونه های غیرتراریخت (شاهد) در محیط انتخابی، (ج) رشد نوساقه ها در محیط طویل شدن ساقه، (د) گیاه تراریخت ریشه دار شده در گلدان حاوی پرلیت، (ه) گیاه تراریخت در مرحله گلدهی در گلدان حاوی خاک

حالیکه در گیاهان شاهد باندی مشاهده نشد (شکل ۶ و ۷). لازم به ذکر است که اندازه ژن *nptII* ۷۹۵ bp برابر است ولی چون دو آغازگر فوق در بالادست و پائین دست ژن *nptII* طراحی شده بود به همین دلیل اندازه قطعه تکثیر شده بزرگتر و برابر ۱۳۴۱ bp است.

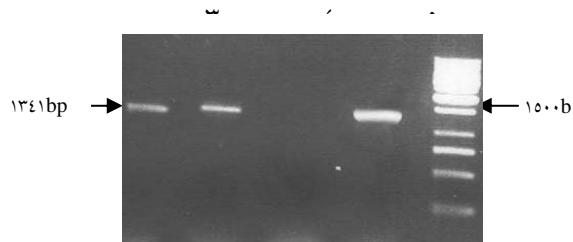
به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح دی.ان.ای و اطمینان از انتقال سازه هدف به گیاهان تراریخت، پس از استخراج دی.ان.ای ژنومی از برگ گیاهان نسل اول (T0) و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* و ژن  $\text{IFN}\gamma$  انجام شد و قطعه ۱۳۴۱ bp مربوط به ژن *nptII* و قطعه ۵۰۰ bp مربوط به ژن  $\text{IFN}\gamma$  در گیاهان تراریخت مشاهده شد در

## بحث

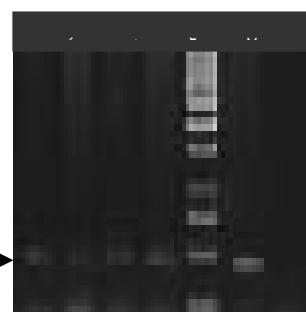
اتصال ژن اولئوسین به ژن مدنظر یک روش بسیار مناسب برای ذخیره پروتئین نوترکیب در اجسام روغنی بذر و در نتیجه تخلیص راحت تر پروتئین ارائه می‌کند (۵). بیان پروتئین نوترکیب به همراه اولئوسین تمام مزایای بیان در بذر از جمله ظرفیت بالای تولید، کاهش قیمت تمام شده محصول، افزایش پایداری پروتئین و... را دارد. تا به حال پروتئین‌های مختلفی به صورت ترکیبی با اولئوسین بیان شده‌اند و در تمام موارد ارزیابی فعالیت پروتئین مثبت بوده است (۲۰، ۲۱، ۲۲). در بیشتر موارد حتی پروتئین متصل به اجسام روغنی هم فعال بوده که نشان می‌دهد اتصال به اولئوسین بسته بندی پروتئین نوترکیب را مختل نمی‌کند (۳). این تحقیق با هدف استفاده از ظرفیت بالای این فناوری جهت تولید پروتئین ایترفرون گاما انسانی که دارای کاربردهای وسیع در پزشکی می‌باشد، طراحی و اجرا شد.

از عوامل مهم در انتقال ژن به گیاه کلزا، نوع ریزنمونه، رقم کلزا، سویه اگروباکتریوم و مدت زمان تلقیح است که در بالا بودن فراوانی باززائی و تاریختی بسیار موثر هستند. در این تحقیق بر اساس نتایج کار زبرجدی و همکاران (۱) ریز نمونه کوتیلدون، رقم PF، سویه LBA4404 و مدت زمان تلقیح ۲۰-۱۰ ثانیه انتخاب شد. نکته قابل توجه در به کارگیری کوتیلدون به عنوان ریزنمونه، وجود جوانه انتهایی در بین برگ‌های اولیه است در صورتی که این بخش کاملاً حذف نشود، پس از آلوده سازی با اگروباکتریوم و کشت ریزنمونه بر روی محیط‌های کشت، جوانه انتهایی که غیرتاریخته است سریعاً رشد کرده و محقق دچار اشتباه می‌شود. از سوی دیگر حذف سلول‌های قاعده دمبرگ که از قوان تاریختی و باززایی بالایی برخوردار هستند نیز باعث عدم شاخه زایی و کاهش میزان تاریختی می‌شود. بنابراین در تهیه ریزنمونه‌ها و برش دمبرگ کوتیلدونی باید دقت کافی اعمال شود تا نتیجه مطلوب حاصل گردد.

در خصوص مصرف کاناپاسین به عنوان عامل انتخابگر سلول‌ها و جوانه‌های تاریخته باید توجه داشت که محدوده بین  $1^{-1}$  mg L<sup>-1</sup>، ۱۵-۳۰، برای کلزا کافی است. میزان بالای کاناپاسین موجب

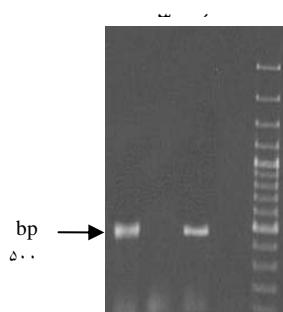


شکل ۶: اثبات حضور ژن *nptII* در گیاهان تاریخت از طریق آزمون PCR. چاهک ۱ و ۲: گیاهان تاریخت که باند ۱۳۴۱ جفت بازی را نشان می‌دهند، ۳: کنترل منفی (گیاه غیر تاریخت)، ۴: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121) و ۵: مارکر 1 kb



شکل ۷: آنالیز گیاهان تاریخت با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی IFN $\gamma$ : خط ۱، ۲، ۳، ۴، گیاهان تاریخت شده، خط ۵: نشانگر وزنی 1 kb، خط ۶: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی سازه)، خط ۷: کنترل منفی (گیاه غیرتاریخت)

گیاهانی که نتیجه آزمون PCR آنها مثبت بود برای استخراج RNA از بذر انتخاب شدند. نتایج RT-PCR هم نشان داد که بیان ژن IFN $\gamma$  در سطح آر.ان.ای در تعدادی از گیاهان تاریخته صورت می‌گیرد (شکل ۸).



شکل ۸: آنالیز گیاهان تاریخت با RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی IFN $\gamma$ : خط ۱: کنترل مثبت (پلاسمید pBI121 حاوی سازه ترکیبی)، خط ۲ و ۳ گیاهان تاریخت، خط ۴: کنترل منفی (گیاه غیرتاریخت)، خط ۵: نشانگر 100 bp

- خدیجه باقری، مختار جلالی جواران، فریدون مهبدی، احمد معینی، علیرضا زبرجدی
- 4- Evangelista RL, Kusnadi AR, Howard JA, Nikolov ZL (1998) Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, 14(4): 607-14.
  - 5- Vanrooijen GJH, Moloney MM (1995) Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bio-Technology*, 13(1): 72-77.
  - 6- Murphy DJ (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in Lipid Research*, 29(4): 299-324.
  - 7- Assreury J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, 24(3):672-6.
  - 8- Nauci C, Espinasse-Maes F(1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun*, 60(2): 450–454.
  - 9- Seeger RC, Rosenblatt JD, Duerst RE, Reynolds CP, Villablanca JG, Hasenauer B, Feig SA (1998) A Phase I Study of Human Gamma Interferon Gene-Transduced Tumor Cells in Patients with Neuroblastoma. *Human Gene Therapy*, 9(3): 379-390.
  - 10- Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF (1997) A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon- $\gamma$  gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer*, 80: 401-12.
  - 11- Baron E, Narula, S (1990) From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(3): 179-90.
  - 12- Moeenrezakhanlou A, Maghsoudi N, Mahboudi F (2002). Homo sapiens interferon-gamma mRNA, complete cds. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=20805895>.
  - 13- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
  - 14- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
  - 15- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
  - 16- Crouch ML and Sussex IM.(1981). Development and storage- protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos invitro and invitro. *Planta*, 153:64-74.
  - 17- Murashige S, Skoog M (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*, 15: 473-497.

حذف نوساقه های تاریخته نیز می شود. از طرف دیگر، به علت مرگ سلول های گیاهی غیرتاریخته که در اثر آنتی بیوتیک کانامایسین روی می دهد، ترکیبات فنلی و سایر محتویات درون واکوئل ها به محیط بیرون سلولی منتقل می شود که این ترکیبات نیز می توانند بر روی سلول های دیگر و حتی سلول های تاریخته اثرات منفی بگذارند. لذا، مرگ بسیاری از سلول های گیاهی (از جمله سلولهای تاریخته) نه به واسطه ماده انتخابگر (کانامایسین) است، بلکه به علت آزاد شدن ترکیبات نامطلوب و مواد سمی از سلولهای مرده است (۲۳).

در گیاهان انتخاب شده بر سطح محیط کشت (حاوی کانامایسین)، حضور ژن IFN $\gamma$  و nptII با آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در گیاهان تاریخته اثبات گردید. بررسی های تکمیلی و آزمون RT-PCR، نسخه برداری از ژن IFN $\gamma$  را در بذور گیاه کلزا تائید کرد. مجموعه آزمونهای انجام شده و نتایج حاصل نشان داد که ژن IFN $\gamma$  به ژنوم گیاه کلزا منتقل شده و نسخه برداری از آن صورت می پذیرد. امید است با تکمیل بررسی های بعدی در زمینه استخراج و استحصال این پروتئین نوترکیب ارزشمند امکان تولید انبوه و ارزان آن را فراهم کرد.

## منابع

- 1- زبرجدی ع، جلالی جواران م، سلمانیان ع، کریم زاده ق (۱۳۸۴). بررسی تاثیر ساختارهای (سننس و آنتی سننس) انتقال یافته ژن کدکننده آنزیم  $\beta$ -ketoacyl CoA synthase در کلزا. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۸۳ ص.
- 2- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21(12): 570-578.
- 3- Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA (1997) "Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Development Research*, 42(3-4): 172-181.

- 18- Moloney MM, Walker JM, Sharma, KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using Agrobacterium vectors. *Plant Cell Reports*, 8:238-242.
- 19- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Research*, 16: 9877.
- 20- Parmenter DL, Boothe JG, Rooijen GJ, Yeung EC (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Molecular Biology*, 29(6): 1167-80.
- 21- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol. J*, 4: 77–85.
- 22- Peng CC, Chen JC, Shyu DJ, Chen MJ, Tzen JT( 2004). A system for purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* via artificial oil bodies constituted with their oleosin-fused polypeptides. *J. Biotechnol.*, 111: 51–57.
- 23-Chawla HS (2000). Introduction to plant Biotechnology. Chapters: 8,9,13,18,22.