

بیان ژن اینترفرون گاما 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^۳، 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 داروهای به روشن‌های مختلف می‌تواند تولید شود که تولید آن در گیاهان به روش زراعت مولکولی یکی از آنها می‌باشد. در سال‌های اخیر تولید پروتئین‌های نوتروکریپت 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 گاما 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 باززنایی شده جهت ریشه‌زنایی به محیط MS انتقال یافته‌ند. حضور و بیان ژن اینترفرون گاما در گیاهان تراریخت باززنایی شده با استفاده از تکنیک‌های RT-PCR و PCR تایید شد. برای اثبات بیان ژن در سطح پروتئین از روش SDS-PAGE و آزمون لکه گذاری استفاده شد. برای رسیدن به هموپلاسمی کامل چهار دور باززنایی از گیاهان توتون تراریخت انجام شد.

واژه‌های کلیدی

اینترفرون گاما

بیان دیسیسترونی

توتون

زراعت ملکولی

گیاهان تراریخت کلروپلاستی

مقدمه

al. 2004) ایترفرون آلفا (Arlen 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 نوترکیب تک دومنی (V_{HH}) علیه ژن MUC1 در گیاه توتون (Rajabi Memari et al. 2006) و پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی^۵ با منشا انسانی در توتون (Masoumi et al., 2009) اشاره کرد.

ایترفرون‌ها به طور عمده به عنوان فعال کننده سلول‌های سیستم ایمنی عمل می‌کنند. ایترفرون گاما یک مولکول پروتئین همودایمر ترشحی است که هر مونومر آن از ۱۴۳ اسید امینه تشکیل شده است و دارای دو محل جهت گلیکوزیلاسیون در محل اسید امینه‌های ۲۵ و ۹۷ و فرم فعال آن به صورت دایمیر می‌باشد (Ganes et al. 1992). ژن ایترفرون گاما بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد و شامل ۳ ایتررون و ۴ اگرلون می‌باشد و پلی پپتیدی با طول ۱۶۶ اسید امینه را کد می‌کند که دارای ۲۰ اسید امینه پپتید نشانه می‌باشد. وزن مولکولی پیش‌بینی شده برای ایترفرون گاما (Ganes et al. 1992) متفاوت بوده و ۱۷ تا ۲۵ کیلو دالتون را شامل می‌شود. از این پروتئین برای درمان بیمارانی که نقص ایمنی مادرزادی دارند، استفاده می‌شود. از ایترفرون‌های نوترکیب 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 نوترکیب با قیمت مناسب برآیند. این پروتئین تا کنون در میزان mammary gland of CHO ، baculovirus-infected sf9 insect cells و transgenic mice شده است (Freedman et al. 1996) اما در واقع امروزه ایترفرون گاما ایترکیب تولید شده در باکتری E. coli (ActimmunTM) به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین ایترفرون گاما در گیاهان از جمله در سوسپانسیون برنج (Chen et al.

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 زیر واحدی 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 تهی با یک بار تاریخت 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 بهره گیری از مهندسی ژنتیک، تاریختی کلروپلاستی برای اصلاح صفات زراعی، بهبود مسیرهای متابولیکی و همچنین در زراعت مولکولی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب (داروئی و صنعتی) ارزشمند با منشا گیاهی گسترش یافته است. اولین تاریختی پایدار کلروپلاستی در جلبک کلامیدومناس با الحاق DNA^۴ بر هنه^۵، درون ژنوم کلروپلاست از طریق تفنگ ژنی گزارش شد (Boynton et al. 1988) اولین تاریختی 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 تاریختی کلروپلاستی پیشرفت‌های زیادی حاصل شده است از جمله می‌توان به تولید آنتی بادی مونوکلونال (Daniell et al.

¹ Chloroplast transformation² Position effect³ Transgene silencing⁴ Naked DNA⁵ Tissue plasminogen activator

گرفتند. آغازگر پیشرو حاوی توالی His-tag برای تسهیل در مراحل تخلیص پروتئین ایترفرون گاما در مراحل نهایی و سایت برشی آنزیم *NcoI* میباشد و آغازگر پیشرو 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 پیشرو تعییه شود. در مرحله بعد هضم آنزیمی ژن *ifn-G* و ناقل pKCZ با آنزیم *NcoI* و اتصال قطعات هضم شده طبق (Sambrook et al. 1989). برای اطمینان از همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل pKCZ از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌بایی بهره گرفته شد.

تاریختی کلروپلاستی

بذور توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Zanthe) ضد عفونی و برای جوانه زنی بر روی محیط^۱ MS^۱ قرار داده شدند. بعد از چند هفتۀ برگ‌هایی که طولشان از ۵ سانتی‌متر 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 بازیابی به محیط RMOP که حاوی *aadA* ۵۰۰mg/L اسپکتینومایسین بود، انتقال یافتند. از آنجا که ژن *aadA* ۵۰۰ اسپکتینومایسین ایجاد مقاومت در برابر اسپکتینومایسین می‌شود، تنها سلول‌هایی می‌توانند زنده مانده و بازرا شوند که سازه مذکور را دریافت کرده باشند. شش تا هشت هفته بعد از بمباران اولین گیاهان بازرا شده برای ریشه‌دار شدن به محیط MS حاوی ۵۰۰ اسپکتینومایسین انتقال یافتند.

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

(Ebrahimi et al. 2004) و توتون (Wu et al. 2009) تیز تولید شده است. اما میزان بیان در آنها بسیار پایین بوده است. یکی از راههای افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان استفاده از فناوری انتقال ژن به کلروپلاست است. لذا با توجه به مزایای بسیار زیاد انتقال ژن به کلروپلاست دارد در این تحقیق امکان بیان ژن ایترفرون گاما (*ifn-G*) و ژن آمینوگلایکوزید-۳-آدنیل ترانسفراز (*aadA*: ژن *ifn-G* مقاومت به آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استریپتومایسین) در کلروپلاست توتون به صورت یک اپرون دیسیسترونی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه کلروپلاستی حاوی ژن ایترفرون گامای انسانی (Human *ifn-G*) برای تهییه ناقل کلروپلاستی دارای ژن ایترفرون گاما که در آن ژن *ifn-G* و *aadA* در یک اپرون و تحت کنترل یک راه انداز *pKCZ* (AF506749) در ناقل کلروپلاستی *Zhurong* (این ناقل در سال ۲۰۰۱ توسط علیزاده تهییه شد) بین راهانداز *Prrn* (راهانداز ژن *rRNA*) و ژن *aadA* در محل آنزیم برشی *NcoI* درج شد تا به صورت دیسیسترونی بیان شود. توالی‌های *INSL* و *INSR* در ناقل *pKCZ* موجود می‌باشند و دقیقاً مشابه توالی‌هایی هستند که در ژنوم کلروپلاست توتون در ناحیه توالی‌های تکراری و معکوس (IR) قرار دارند. نوترکیبی بین این توالی‌های مشابه منجر به الحاق توالی بین *INSL* و *INSR* در ناقل *pKCZ* حامل ژن *ifn-G* درون *trnN-GUU* و *trnR-ACG* می‌شود. برای تکثیر ژن *ifn-G*، آغازگر پیشرو (5'-cat gcc F1 atg gaa cat cat cat cat cag gag cca tat gta aaag-3') و *atg gaa cat cat cat cat cag gag cca tat gta aaag-3'* (5'-cat gcc atg gat ccc tcc cat tac tgg gat Taq ctt cgac-3') آغازگر پیشرو R با غلطت μM ۰/۴، یک واحد آنزیم Taq، پلیمراز، بافر ۱X PCR (سیناژن)، $MgCl_2$ با غلطت mM ۱/۴، آب دو بار استریل مورد استفاده قرار با غلطت mM ۰/۲ dNTP با غلطت mM ۰/۲ و آب دو بار استریل مورد استفاده قرار

^۱ Murashig and Skoog

شد (1992 Akins and Tuan⁵). ژل SDS-PAGE 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. همچین برای تشخیص دقیق‌تر پروتئین‌ها از آزمون لکه‌گذاری⁶ استفاده شد. پروتئین‌های استخراج شده بر روی غشاء نیتروسلولزی بارگیری و آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه (Santa Cruz) برای تأیید حضور (Sambrook et al. 1989) اضافه شدند و نهایتاً سوبسترا (شامل⁷ H₂O₂, DAB⁸) برای تشخیص اتصال آنتی‌بادی اولیه به پروتئین ایترفرون گاما بر روی غشاء نیتروسلولزی اضافه شد.

نتایج و بحث

همسانه‌سازی ژن ایترفرون 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 Prm طراحی شده بود و آغازگر پیرو G (R ifn-G) PCR انجام گرفت. تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۶۰۰ bp در PCR نشان‌داد که ژن در جهت صحیح آن درج شده است (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) بازرا شدند (شکل ۲-الف). گیاهان بازازایی شده برای ریشه‌زایی به محیط MS (حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین) انتقال یافته‌اند (شکل ۲-ب). برای رسیدن به هموپلاسمی کامل در گیاهان ترازیخت ۴ دور بازازایی در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انجام گرفت و گیاهان ترازیخت کلروپلاستی به خاک منتقل شدند (شکل ۲-ج).

^۱ استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی G ifn-G PCR^۲ انجام شد. همچنین برای تایید درج ژن در محل صحیح آن در ژنوم کلروپلاست (بین R و trnN) با استفاده از آغازگری trnR 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 G ifn-G PCR دیگری انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون ترازیخت 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 سایبیده شده بود، درون ویال که محتوى 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 ۸ g × ۱۰۶۲۵ در دمای ۴۰°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوز شد. از سه فاز تشکیل شده در ویال، فاز رویی 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 رویی 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 سانتریفیوز در ۸ g × ۱۰۶۲۵ RNA رسوب کرد و بعد از شست و شوی رسوب با اتانول ۷۵ درصد، مقدار ۱۱ μl آب^۳ DEPC به رسوب اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای ۵۵°C قرار داده شد تا RNA خوب حل شود. برای حذف DNA های پلاستیدی و ژنومی از cDNA و برای ساخت cDNA از کیت فرمتوza استفاده شد. واکنش RT-PCR^۴ بر روی این cDNA انجام شد.

تجزیه گیاهان توتون ترازیخت 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 polyacrylamid gel electrophoresis

⁶ Dot blot

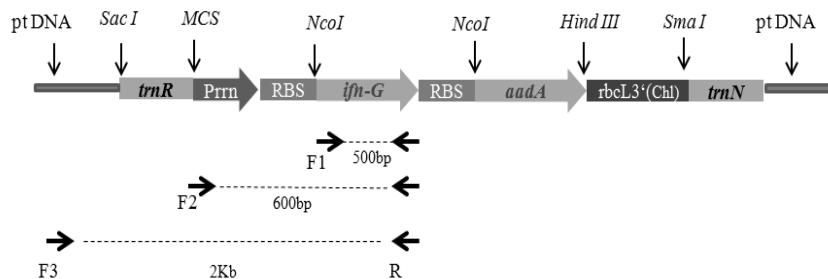
⁷ 3,3'-diaminobenzidine

¹ Cetyl trimethyl ammonium bromide

² Polymerase chain reaction

³ Diethylpyrocarbonate

⁴ Reverse transcriptase PCR



شکل ۱- سازه *trnN* و *trnR* در دو طرف سازه توالی های مشابه با ژنوم کلروپلاستی که جهت انجام نوترکیبی الزامی هستند، راه انداز هر دو ژن *RBS*، *aadA* و *ifn-G* محل اتصال پروتئین های ریبوزومی برای شروع ترجمه، *rbcL3'(Chl)* توالی خاتمه دهنده رونویسی، *aadA* ژن آمینوگلایکوزید ۳-آدنیل ترانسفراز که مقاومت به اسپیکتینومایسین را ایجاد می کند، *ifn-G* پروتئین ایترفون گاما را تولید می کند. *ptDNA* محل اتصال آغازگرهای اختصاصی را نشان می دهد: *F1* توالی ابتدای ژن ایترفون گاما، *F2* توالی ابتدای راه انداز *Prrn* توالی در درون ژنوم کلروپلاست نزدیک به توالی *trnR* و *R* توالی انتهای ژن ایترفون گاما.

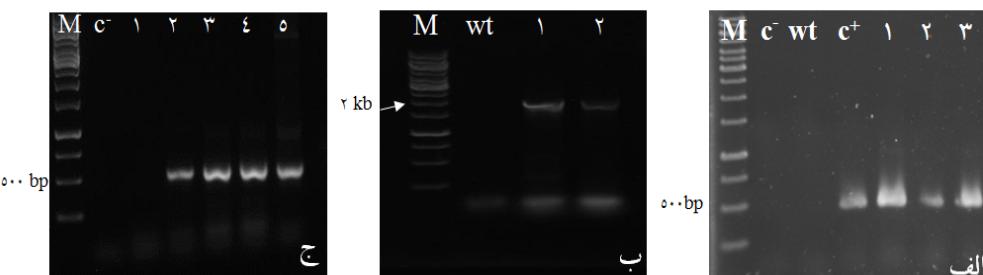


شکل ۲- (الف) گیاهان باز زایی شده بر روی محیط ساقه زایی حاوی 500 mg/L اسپیکتینومایسین شش هفته بعد از بمباران؛ (ب) گیاهان ریشه دار شده در محیط 500 mg/L اسپیکتینومایسین؛ (ج) گیاهان تراریخت کلروپلاستی منتقل شده به گلدان (بعد از ۴ دور باز زایی).

انجام شد و برای اطمینان از حذف کامل DNA های پلاستیدی، RNA استخراجی از گیاهان تراریخت که با آنزیم I DNase معالجه شده بود نیز مورد PCR قرار گرفت. تجزیه گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح پروتئین الکتروفورز پروتئین های استخراج شده از برگ گیاهان تراریخت و شاهد توتون بر روی ژل SDS-PAGE انعام 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 ایترفون گاما در سطح پروتئین آزمون لکه گذاری انجام شد و اتصال پروتئین ایترفون گاما به آنتی بادی اختصاصی به وسیله سوبستران DAB اثبات شد (شکل ۵).

واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی *ifn-G* (F1 و R) بر روی DNA استخراجی از گیاهان باز زایی شده انجام شد و تراریختی این گیاهان را تأیید کرد (شکل ۳-الف). همچنین ورود ژن ایترفون 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 می دهد. فاصله این دو آغازگر در گیاهان تراریخت که توالی بین *trnR* و *trnN* را در pKCZ دریافت کرده اند، تقریباً ۲ kb می باشد در صورتی که در گیاهان شاهد این قطعه دیده نمی شود (شکل ۳-ب).

واکنش RT-PCR بر روی cDNA گیاهان شاهد و تراریخت



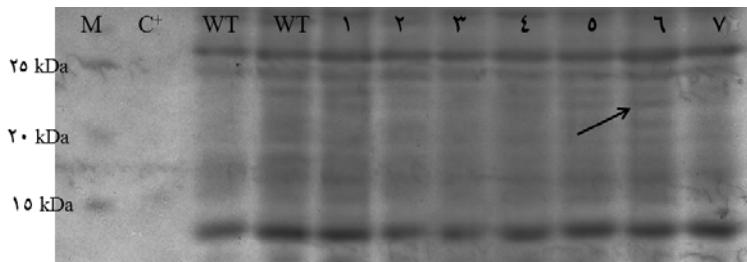
شکل ۳- (الف) نتایج PCR بر روی گیاهان بازرا شده برای تأیید انتقال ژن ایترفرون گاما به ژنوم کلروپلاست توتون با استفاده از آغازگرهای F1 و R. M. نشانگر C⁻ کنترل منفی؛ wt گیاه شاهد؛ C⁺ کنترل مثبت؛ ۱-۳) گیاهان تراریخت کلروپلاستی (ب) نتایج PCR برای تأیید درج ژن ایترفرون گاما در محل صحیح درون ژنوم کلروپلاست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

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

ژن ایترفرون گاما به هسته گیاهان مختلفی از جمله توتون انتقال یافته است اما میزان بیان در آنها بسیار پایین بوده است مثلا 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 ۰/۰۱ درصد (Leelavathi et al. 2009) بوده است. برای افزایش بیان و پایداری این پروتئین با روش تراریختی هسته‌ای از اتصال آن به اولموسین و بیان آن در بذر کلزا با یک راهانداز القایی می‌توان نام برد (Bagheri et al. 2003). به هر حال بیان ژن در کلروپلاست بسیار بیشتر از هسته است و می‌تواند باعث کاهش قابل توجهی در هزینه‌ها شود. مثلا انتقال ژن پروانسولین به کلروپلاست گیاه کاهو منجر به تولید آن تا ۴۷ درصد از کل پروتئین برگ شده است (Boyan et al. 2011). اما مساله تجزیه شدن پروتئین‌هایی از جمله ایترفرون گاما باز هم محدودیتی ایجاد کرده که برای حل این مشکل محققین از تکنیک اتصال به پروتئین‌های پایدار مانند^۱ CTB و GUS استفاده می‌کنند در یک تحقیق ایترفرون 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 ایترفرون 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 دیسیترونی به وسیله روش‌های RT-PCR و لکه‌گذاری در سطح RNA و پروتئین اثبات شد. همسانه‌سازی ژن در ژنوم پلاستیدی به وسیله ناقل pKCZ در حد فاصل بین دو ژن tRNA آرزنین 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 پلاستیدی 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 مسئله 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 ایترفرون گاما نیز همان طوری که گفته شد در دو محل گلیکوزیله می‌شود اما نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که هر دو مولکول گلیکوزیله شده و غیر گلیکوزیله شده ایترفرون گاما از نظر بیولوژیکی فعال هستند (Wetzel et al. 1990). بنابراین

^۱ Cholera toxin b subunit



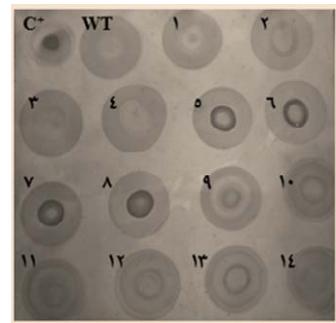
شکل ۴- الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل SDS-PAGE، M نشانگر پروتئین، C⁺ کنترل مثبت (پروتئین ایترفرون گاما: ایموکین)، WT پروتئین استخراج شده از گیاهان غیر تراریخت، ۱ تا ۶ پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون. فلش محل پروتئین نوترکیب را نشان میدهد.

(Soria-Guerra et al. 2009). در این تحقیق نیز بیان همزمان ژن aadA با ایترفرون 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 امکان‌پذیر است که در انتقال ژن به هسته امکان آن وجود ندارد.

در مجموع طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت استفاده از سیستم بیانی کلروپلاست در گیاه توتون برای تولید پروتئین ایترفرون گاما می‌تواند به عنوان یک روش ایمن و ارزان بهویژه در کشورهای در حال توسعه که این نوع داروها را با قیمت‌های بالا وارد می‌کنند، بسیار مفید باشد. اما تحقیقات بیشتر جهت رفع معضلات آن نظری افزایش پایداری پروتئین در کلروپلاست و توسعه روش‌های تخلیص پروتئین از گیاه ضروری می‌باشد.

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 chloroplastderived interferon-a2b. Plant Biotechnol 5: 511-525.
- Bagheri KH, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, Zebarjadi A (2010) Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. African Journal of Biotechnology 9: 5066-5072.
- Boyan 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 Biotechnol Journal 9: 585-598.



شکل ۵- بررسی بیان پروتئین ایترفرون گاما با روش لکه گذاری، C⁺ پروتئین کنترل مثبت (پروتئین ایترفرون 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 ایترفرون گاما در گیاهان تراریخت می باشد.

در این تحقیق همچنین امکان بیان ژن ایترفرون گاما و ژن گرینش گر در قالب یک اپرون بررسی شد. بسیاری از ژن‌ها در ژنوم کلروپلاست به صورت اپرون سازمان‌دهی شده‌اند بدین معنی که مجموعه دو یا چند ژن به وسیله RNA پلیمراز از یک راه انداز رونویسی می‌شوند. بنابراین اگر هدف انتقال چند ژن به طور همزمان به ژنوم کلروپلاست باشد می‌توان این ژن‌ها را فقط با یک راه انداز و یک ژن گرینش گر در یک بار شلیک وارد ژنوم ساخت که در این صورت کار انتقال ژن‌ها ساده‌تر شده و در زمان کوتاه‌تری امکان‌پذیر می‌شود. 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 پیتید DPT (واکسن تلفیقی علیه سه بیماری دیفتری، کزان و سیاه سرفه) به صورت همزمان با ژن مقاومت aadA در کلروپلاست توتون بیان شد

- 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, Wenham, 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, Lengyels 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 antracis* 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, Rasae 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.