ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۱۴۸-۱۴۳

همسانه سازی و انتقال ژن *AtCDPK5* به توتون

Cloning and transformation of *AtCDPK* to tobacco

رویا حقیقی[۱]، ولی‌اله محمدی*[۱]، علیرضا عباسی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ایران.

Haghighi R[1], Mohammadi V[*1], Abasi A[1]

1- MSc Student, Asociate Professor, College of Agriculture and Natural Resources,University of Tehran, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:vmohammadi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۵- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

تنش‌های محیطی مهم‌ترین عامل کاهش عملکرد محصولات زراعی هستند. ژن *AtCDPK5* یکی از ژن‌های خانواده بزرگ *CDPK* در گیاهان است که نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه نسبت به تنش‌های غیر زیستی دارد. هدف از این پژوهش همسانه سازی ژن *AtCDPK5* و انتقال آن به توتون به‌منظور افزایش تحمل به تنش‌های غیر زیستی بود. بدین منظور ابتدا RNA از برگ گیاه آرابیدوپسیس استخراج و cDNA ساخته شد. ژن *AtCDPK5* توسط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و به ناقل pGEM-T وارد و در باکتری *E.coli* کلون شد. سپس قطعه ژن مورد نظر درون ناقل pBI121 قرار داده شده و در باکتری *E.coli* کلون شد. یکپارچگی سازه حاوی ژن *AtCDPK5* توسط انجام کلونی PCR تایید شد و توالی‌یابی قطعه، وجود ژن را اثبات کرد. پلاسمید نوترکیب حاصل از طریق تکنیک اگرواینفکشن به گیاه توتون منتقل شد. پس از هم‌کشتی با اگروباکتریوم، رشد ریزنمونه‌های گیاه توتون در محیط انتخابی حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین و سفوتاکسیم تراریختی آن‌ها را تایید کرد. گیاهچه‌های تراریخت به محیط ریشه‌زایی و سپس به گلدان منتقل شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی تراریخت بودن گیاهان توتون را در سطح DNA وcDNA تایید کرد.

واژه‌های کلیدی

تراریزش
توتون
ژن *AtCDPK*
همسانه سازی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]

پاسخ گیاهان به محرک‌های زیستی و غیرزیستی به الگوهای انتقال پیام وابسته است که توسط مکانیسم‌های متنوع بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کنترل می‌شود. سریع‌ترین پاسخ‌های سلولی به تنش-های محرک با تغییر در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی صورت می‌گیرد. ژن‌ها یا پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم *CDPK*[1] در سازگاری به سرما، تحمل شوری و خشکی و پاسخ به بیمارگرها نقش دارند (Ludwig et al. 2004; Yao et al. 2010). پروتئین-های *CDPKs* پروتئین کینازسرین- ترئونین هستند که از یک ناحیه آمینی، یک ناحیه استیله، یک ناحیه اتصال و یک ناحیه مشابه کالمودولین تشکیل شده‌اند (Ito et al. 2011). *CDPK*ها یکی از پروتئین‌هایی هستند که با افزایش غلظت یون کلسیم برانگیخته می‌شوند (Brugger et al. 2012). ژن *AtCDPK5* یکی از ژن‌های خانواده *CDPK* ۱۹٤۱ جفت باز طول دارد. وزن مولکولی این پروتئین حدود ٦۰ کیلو دالتون بوده (Boudsocq et al. 2010) و در مسیر تنش اکسایشی نقش دارد. Boudsocq et al. (2010) گزارش کردند که این ژن در برهمکنش با رسپتور فلاژلین ۲۲ و در مسیر مصونیت گیاه نسبت به بیمارگرها نقش اختصاصی دارد. Boudsocq and Sheen (2013) نشان دادند که ژن *AtCDPK5* نسبت به کلسیم بسیار حساس بوده و به محض تغییر غلظت کلسیم حتی در مقادیر کم فعال می‌شود. ایزوفرم *CDPK5* پروتئین کیناز وابسته به کلسیم در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا در پاسخ به PAMP[2] از نظر بیوشیمیایی به سرعت فعال می‌شود و گونه‌های اکسیژن فعال تولید می‌کند (Romeis et al. 2013). انتقال یا تشدید بیان برخی از خانواده ژنی *CDPK* در آرابیدوپسیس (Teige et al. 2010) و توتون (Ito et al. 2011) برای تحمل به تنش‌های خشکی و شوری و سایر تنش‌های غیر زنده موفقیت‌آمیز بوده‌است، اما انتقال ژن *AtCDPK5* تاکنون گزارش نشده است. از آنجاکه تنش‌های زنده و غیر زنده مهم‌ترین عامل کاهش عملکرد گیاهان زراعی هستند، تولید گیاهان زراعی مقاوم از طریق روش‌های کلاسیک یا از طریق مهندسی ژنتیک حائز اهمیت است. هدف از پژوهش حاضر ساخت سازه ژنی *AtCDPK5* و انتقال آن به گیاه توتون به عنوان یک گیاه مدل بود تا از اطلاعات به دست آمده برای تراریخت نمودن گیاهان مهم اقتصادی مانند کلزا استفاده شود.

در این تحقیق از بذور گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum* L.) رقم تجاری سامسون و آرابیدوپسیس تالیانا اکوتیپ Col_0 استفاده شد. برای تهیه سلول‌های مستعد[3] و سپس نگهداری پلاسمید نوترکیب از باکتری *E.coli*[4] سویه *DH5α* و برای انتقال سازه ژنی به گیاه از آگروباکتریوم تومفاسینس سویه *LBA4404* استفاده شد. از پلاسمید دوگانه pBI121 به عنوان ناقل بیان گیاهی با استفاده از روش تراریزش[5] با آگروباکتریوم به منظور بیان قطعات کلون شده درگیاه استفاده شد. ناقل pBI121 دارای نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و تحت کنترل راه انداز *CaMV 35S* و خاتمه دهنده NOS است که موجب بیان ژن درسلول‌های موجودات پرسلولی می‌شود. توالی ژن *AtCDPK5* به شماره شناسایی *At4G35310.1* از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI[6] و TAIR[7] بدست آمده و از روی توالی cDNA و به کمک پایگاه IDT[8] و Primer 3[9] آغازگرهایی به‌طول ۲۸ جفت باز طراحی شد. در آغازگر مستقیم توالی جایگاه برشی آنزیم *Bam*HI و در آغازگر معکوس توالی جایگاه برشی آنزیم *Sac*I در جایگاه '5 آغازگر در نظر گرفته شد، به این دلیل که قطعه در جهت صحیح (سنس) در ناقل قرار گیرد. ساخت این آغازگر توسط شرکت تکاپوزیست به-ترتیب با توالی‌های نوکلئوتیدی رفت و برگشت

5'-GGA TCC AGT CAG ATT CCT TCC TAA TCC C-3'

و 5'-GAG CTC AGT CAC GAT CGC ACT AAC ATA T-3'

با طول محصول bp ۱۹٤۱ بعد از PCR انجام شد. جهت جداسازی ژن *CDPK5* از برگ گیاه آرابیدوپسیس استخراج RNA صورت گرفت و cDNA ساخته شد، واکنش PCR (Reverse touchdown PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *AtCDPK5* و با شرایط ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۷ چرخه یک دقیقه، ٥٤ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲:۲۰ ثانیه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۲۸ چرخه ۱دقیقه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد یک

[1] Calcium dependent protein kinas
[2] Pathogen associated molecular patterns
[3] Competent cell
[4] *Eschershia coli*
[5] Transformation
[6] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
[7] http://www.arabidopsis.org/
[8] http://www.idtdna.com/site
[9] http://primer3.sourceforge.net/

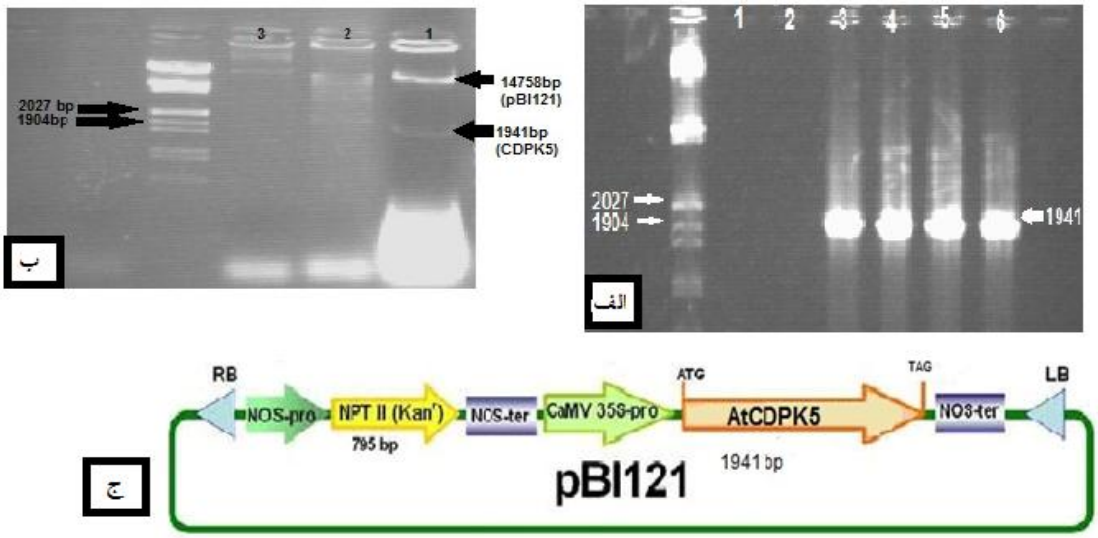
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]

دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و نهایتاً ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد با آنزیم Tag پلیمراز (شرکت فرمنتاز) روی cDNA ساخته شده صورت گرفت. این ناقل به صورتی است که نوکلئوتیدهای A (اتصال یک نوکلئوتید A به انتهای '۳ قطعه تکثیر شده توسط آنزیم Tag DNA polymerase بدون نیاز به الگو در هنگام PCR انجام می‌شود) در دو انتهای ژن به صورت مکمل در مقابل نوکلئوتیدهای T از ناقل قرار می‌گیرد و آنزیم لیگاز باعث اتصال آن‌ها می‌شود. سپس در ناقل pGEMT-easy Vector (شرکت پرومگا) طبق دستورالعمل این شرکت وارد شده و سپس در باکتری *E.coli* سویه *DH5α* کلون شد. استخراج پلاسمید از باکتری *E.coli* حاوی سازه *CDPK5.pGEMT* صورت گرفت. برش با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I انجام شده و قطعه *CDPK5* از سازه *pGEMT* جداشد. ناقل گیاهی در این تحقیق *pBI121* بود، برش با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I به‌منظور حذف ژن بتاگالاکتورونیداز انجام شد، قطعه *CDPK5* به آن وارد شد و ساخت سازه کامل شد. جهت انتقال سازه ایجاد شده به اگروباکتریوم یک کلون منفرد از اگروباکتریوم سویه LBA ٤٤٠٤ در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم آنتی-بیوتیک ریفامپسین کشت شد و سلول مستعد به روش Gallagher and Wiley(2008) ساخته شد. به‌منظور تراریخت نمودن توتون با استفاده از اگروباکتریوم از سوسپانسیون (۰/۸-OD=۱) حاوی سازه موردنظر استفاده شد. در شرایط استریل سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به پتری دیش‌های حاوی برگ‌های زخمی شده توتون انتقال داده شد. ریزنمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در محیط تلقیح قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها روی محیط هم‌کشت، حاوی ۱ mg l^{-1} هورمون BAP و ۰/۱ mg l^{-1} هورمون NAAکشت شده و به‌مدت ۲ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. پس از طی شدن طول دوره کشت هم زمان، ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی انتخابی که دارای آنتی-بیوتیک سفوتاکسیم به میزان ۵۰۰ mg l^{-1}، کانامایسین به میزان ۲۵mg l^{-1}، هورمون BAP ۱ mg l^{-1} وهورمون NAA ۰/۱ mg l^{-1} بود، انتقال داده شده و به‌مدت دو هفته در شرایط ١٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه جدا شده و به محیط انتخابی بعدی منتقل شدند. هر دو هفته یک‌بار عمل واکشت بر روی محیط کشت باززایی انتخابی صورت پذیرفت. و مقادیر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تا ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ mg l^{-1} در هر بار واکشت افزایش یافت. ساقه‌های باززا شده در محیط حاوی کانامایسین به محیط ریشه‌زایی محیط MS ۱/۲ حاوی mg l^{-1} ۵۰۰ سفوتاکسیم و ۵۰ mg l^{-1} کانامایسین بدون هورمون منتقل شدند. پس از چهار هفته گیاهچه‌های سبز ریشه‌دار شده در شرایط استریل به لیوان‌های حاوی پرلیت و کوکوپیت با نسبت ۱:۱ انتقال داده شدند و روی آن لیوان پلاستیکی قرار داده شد. مراحل سازگاری گیاه انجام شد و گیاهان به گلخانه منتقل شدند (Ohata 1990). جداسازی RNA از برگ گیاه توتون تراریخت به کمک کیت کیاژن RNeasy plant Mini Kit طبق پروتکل انجام شد. تیمار RNA نیز با Dnase به روش Sambrook (2001) صورت گرفت. نتیجه حاصل از تکثیر ژن *AtCDPK5* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، توسط PCR بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داد؛ طول قطعه تکثیر شده ١٩٤١ جفت باز است و بین دو باند ١٩٠٤ و ٢٠٢٧ جفت بازی نشانگر وزن مولکولیLambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III قرار دارد. قطعه تکثیر شده به ناقل pGEM-T وارد ودر باکتری *E.coli* کلون شد. کلونی‌ها پس از دوازده ساعت بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین ظاهر شدند واحتمالاً دارای سازه *pGEM-T:AtCDPK5* هستند. ناقل pGEM-T دارای ژن مقاومت به آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین است. به‌منظور تایید حضور ژن *AtCDPK5* درون ناقل pGEM-T چند کلونی به طور تصادفی انتخاب شده و کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد. سپس محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز انجام شد. از آنجاکه باند ١٩٤١جفت بازی، روی ژل آگارز در چاهک مربوط به کلون‌های شماره ٣، ٤، ٥ و٦ دیده می‌شود احتمالا چهار کلونی دارای قطعه *AtCDPK5* هستند (شکل ۱-الف). سپس یکی از کلون‌های تایید شده با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I بریده شد و قطعه *AtCDPK5* به ناقل pBI121 وارد شد (شکل ۱-ج). به-منظور تایید سازه ابتدا کلونی PCR انجام شد و کلون‌هایی که نتایج کلونی PCR آن‌ها مثبت بود، تحت هضم با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I قرار گرفته‌اند (شکل۱-ب). باند اول نشان

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]

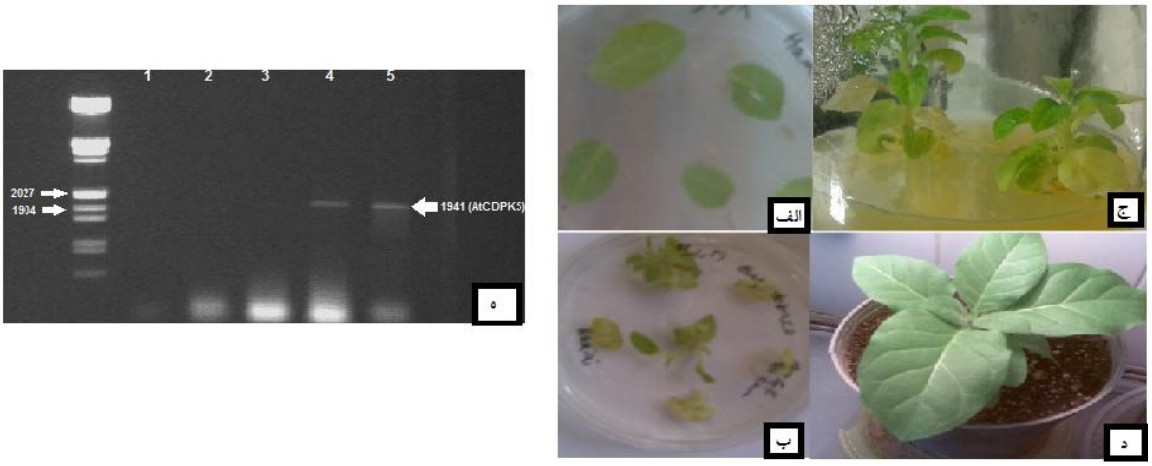
دهنده‌ی قطعه pBI121 با ۱۴۷۱۸ جفت باز است که به‌علت وزن بیش‌تر در بالای ژل قرار گرفته است. باند دوم مربوط به قطعه *AtCDPK5* با ۱۹۴۱ جفت باز است که به علت وزن کم‌تر در انتهای ژل واقع شده است. جهت اطمینان از صحیح بودن سازه *pBI 121: AtCDPK5*، درست قرار گرفتن قطعه *AtCDPK5* در جایگاه مناسب و صحیح بودن نوکلئوتیدها در قطعه *AtCDPK5* توالی‌یابی از طریق شرکت کاوش فناوران کوثر توسط شرکت MACRO GEN در کره انجام شد. نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با توالی ژن بدست آمده از پایگاه اینترنتی NCBI به‌طور کامل هماهنگی داشت. همچنین توسط نرم‌افزار DNA Star با توالی ژن بدست آمده از پایگاه اینترنتی NCBI مقایسه شد. سازه تایید شده به اگروباکتریوم وارد شد. به‌منظور تایید کلونی‌های اگروباکتریوم، کلونی PCR توسط آغازگرهای اختصاصی انجام شد. جهت تایید حضور سازه *AtCDPK5*، *pBI121* برش با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I در کلونی‌هایی از اگروباکتریوم که نتیجه PCR آن‌ها مثبت بود صورت گرفت. پس از تایید کامل، یک تک‌کلون برای انتقال به گیاه انتخاب شد.

انتقال ژن به گیاه توتون به روش اگروباکتریوم و باززایی مستقیم ریز نمونه‌های گیاهی توسط کشت بافت در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم صورت گرفت. پس از اینکه ریزنمونه‌ها در اولین محیط انتخابی قرار گرفتند باززایی صورت گرفت. هر گیاهچه از بافت زیری جدا شد و به محیط جدید انتقال یافت (شکل ۲-الف تا د). از برگ گیاه توتون تراریخت احتمالی و شاهد استخراج RNA صورت گرفت و سپس cDNA ساخته شد و توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر صورت گرفت. در شکل۲-ه چاهک شماره ۱ و ۲ به‌ترتیب مربوط به شاهد منفی و نمونه RNA استخراج شده از گیاه تراریخت می‌باشد.



شکل۱- تایید سازه. الف) تایید حضور قطعه *AtCDPK5* در ناقل pGEM-T با انجام کلونی PCR حاصل ٦ کلونی که به‌طور تصادفی انتخاب شدند، روی ژل آگارز یک درصد. سمت چپ نشانگر وزن مولکولی Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III؛ ب) نتایج حاصل از انجام برش روی کلون ۳ روی ژل آگارز یک درصد. در چاهک ۱ دو قطعه بدست آمده قطعه با طول ۱۹۴۱ جفت باز معادل اندازه قطعه *AtCDPK5* و قطعه مربوط به ناقل که در ناحیه بالاتری قرار گرفته است. برش در چاهک‌های ۲ و۳ به خوبی انجام نگرفته‌است، سمت چپ نشانگر وزن مولکولی؛ ج) نمایی از سازه *pBI: AtCDPK5*. ژن *AtCDPK5* به وکتور *pBI121* وارد شد و تحت راه انداز *CaMV 35S* و خاتمه دهنده *NOS* قرار گرفت. ژن مقاومت به کانامایسین NPT II به‌عنوان نشانگر انتخابی است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]



شکل۲- مراحل باززایی گیاه و تایید ملکولی گیاه تراریخت. الف) انتقال ریز نمونه‌ها به محیط هم کشت؛ ب) محیط انتخابی القاء نوساقه حاوی کانامایسین؛ ج) واکشت نمونه‌ها در محیط ساقه زایی؛ د) انتقال گیاهچه‌های باززا شده به گلدان؛ ه) تایید گیاهان توتون تراریخت از طریق انجام PCR بر روی cDNA از سمت چپ باند مربوط به پلاسمید حاوی ژن *AtCDPK5*، cDNA گیاه توتون تراریخت شماره۱، cDNA گیاه توتون شاهد، RNA گیاه تراریخت، شاهد منفی بدون الگو، سمت چپ نشانگر وزن مولکولی Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III

چاهک شماره ۳ مربوط به cDNA گیاه توتون شاهد بوده و در واکنش PCR باندی تولید نکرد که بیان کننده عدم حضور این ژن یا توالی مشابه این ژن در نمونه شاهد است. چاهک شماره ٤ نشان دهنده cDNA گیاه تراریخت شماره ۱ است و چنان‌که در شکل نشان داده شده دارای باند مربوط به ژن *AtCDPK5* است. به علت این‌که از cDNA استفاده شده نمی‌تواند آلودگی ژنومی باشد. در چاهک شماره ۵ نمونه پلاسمید حاوی سازه *AtCDPK5*: *pBI121* بوده که باند مورد نظر با باند گیاه تراریخت مطابقت دارد. Yao et al. (2010) گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت تحت کنترل دو راه‌انداز *CaMV 35S* تولید کردند. مقایسه بین گیاه موتانت *cdpk6* با گیاهانی که تشدید بیان یافته نشان داد ژن *Atcdpk6* در تحمل به شوری و خشکی نقش دارند. همچنین مشخص شد در شرایط غیر از تنش تفاوتی بین هیچ‌یک از گیاهان وجود ندارد. در این تحقیق گیاهان توتون تراریخت که احتمالا دارای ژن *AtCDPK5* هستند تولید شد. در مراحل بعدی لازم است آزمون‌های مقایسه‌ای بیش‌تری انجام شود، سپس با استفاده از اطلاعات بدست آمده از آن به عنوان یک گیاه مدل می‌توانیم انتقال این ژن را به گیاهان زراعی مهم همچون کلزا انجام داد.

منابع

Boudsocq M, Droillard MJ, Regad L, Ere L (2010) Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium?. Biochemical Journal 447: 291–299.

Boudsocq M, Sheen J (2013) CDPKs in immune and stress signaling. Trends in Plant Science 18:30-40.

Brugger A, Pugin A, Schoefs B, Vatsa P, Madani S, Chiltz A, Manzoor H (2012) Calcium signatures andsignaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. Cell Calcium 51:434-444.

Gallagher SR, Wiley EA (2008) current protocol essential laboratory techniques. John wiley. 806.

Ito T, nakata M, Ishida S, takahashi Y (2011) The mechanism of substrate recognition of ca^{2+} dependent protein kinases. Plant Signaling and Behavior 6: 924-926.

Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. Journal of Experimental Botany 55:181-188.

Ohta S, Hattori T, Nakamura K (1990) Construction and expression in tobacco of β-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiology 31: 805-813.

Romeis T, Schulze WX, Witte CP, Lassig R, Komander E, Durian G, Seybold H, Dubiella U (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. Molecular Plant Physiology 21: 8744-8749

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]

Teige M, Bayer R, Pfister R, Csaszar E, Rodrigues D, Stael S, Wurzinger B, Mehlmer N (2010) The Ca^{2+}-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. Plant Journal 63: 484-498.

Yao QH, Hou XL, Fu XY, Gao F, Jin XF, Zho B, Xiong Ash, Peng RH, Tian Ysh, Xu J (2010) Atcpk6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. Planta 231:1251-1260.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.15.8]