

همسانه‌سازی و انتقال آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاز T7 به توتون

Cloning and Transformation of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Tobacco

کبری نعلبندی^۱، اصغر میرزایی اصل^{۲*}، لیلا خدایی^۳، غلام خداکرمیان^۴
Kobra Nalbandi¹, Asghar Mirzaie Asl^{2*}, Leila Khodaei³, Gholam Khodakaramian⁴

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی و ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه پیام نور همدان،

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

^{1,2}Department of Biotechnology, ⁴ Plant Protection Dept.
College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
³Department of Agriculture, Payam Noor University, Hamedan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۴)

چکیده

کشاورزی مولکولی به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی توسط گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یکی از مهمترین آنزیم‌هاست که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، از قبیل سنتز و مطالعه ساختار و عملکرد RNA ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. RNAهای سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی در هیبریداسیون، ریزآرایه، آزمایشات RNAi و RNA آنتی‌سنس کاربرد دارد. این آنزیم همچنین در سیستم‌های بیانی وابسته به پیش‌ر و خاتمه دهنده T7 کاربرد فراوان دارد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یک آنزیم باکتریوفازی بوده و فعالیت اصلی آن در سیتوپلاسم می‌باشد. تحقیق حاضر جهت همسانه‌سازی، انتقال ژن آنزیم *T7RNA* پلیمراز به هسته سلولهای یوکاریوتی و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت. آغازگرهای مناسب از روی توالی ژن *T7RNA* پلیمراز به همراه توالی‌های مناسب برای آنزیم‌های برشی، طراحی و ژن *T7RNA* پلیمراز مورد نظر پس از جداسازی در ناقل بیانی pCambia1304 همسانه‌سازی شد. به منظور اطمینان از همسانه‌سازی، سازه تهیه شده با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بررسی شده و هم‌ردیفی آن در بانک اطلاعاتی اسیدهای نوکلئیک تأیید گردید. سپس، سازه نو ترکیب به کمک سویه LB4404 آگروباکتریوم به گیاهان توتون منتقل و گیاهان تراریخته بر روی محیط-های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم، باززا شدند. حضور و بیان ژن *T7RNA* پلیمراز در گیاهان تراریخته با روشهای PCR و RT-PCR تأیید شد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم *T7RNA* پلیمراز،
همسانه‌سازی،
انتقال ژن،
توتون،
کشاورزی مولکولی

مقدمه

تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی گویند. تولید پروتئین‌های نو ترکیب و آنزیم‌ها در سیستم بیانی گیاهی دارای مزیت‌های بیشماری از جمله: اقتصادی‌تر بودن تولید نسبت به سیستم‌های صنعتی، بیان بالای ژن و تولید در مقیاس زیاد پروتئین‌های نو ترکیب، پایداری بیشتر، حفظ ساختار اصلی پروتئین و عدم آلودگی می‌باشد (Shinmyo and Kato. 2010; Tekoah et al. 2015). بنابراین گیاهان تراریخته برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب و آنزیم‌های صنعتی جایگزین مناسبی می‌باشند. گونه‌های گیاهی زیادی در کشاورزی مولکولی استفاده شده است. محصولات برگی، بذر خشک، دانه‌های روغنی، میوه و سبزیجات، گیاهان مدل غیر زراعی مانند آراییدوپسیس و زراعی از قبیل توتون از جمله آنها می‌باشد. توتون زراعی (*Nicotiana tabacum*) به عنوان یک محصول غیر غذایی و غیر علوفه‌ای، محصول برگی است که تاکنون برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب بیشتر استفاده گردیده است و محصول بیشتری بعثت چند بار برداشت در سال تولید می‌کند. توتون دارای انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به دستوری ژنتیکی می‌باشد و همچنین تولید کننده وزن تر عالی (۵۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار در عملکرد برگ تازه در یک فصل کاشت)، تولید کننده بذر زیاد (بیش از یک میلیون بذر در یک گیاه) می‌باشد (Daniell et al. 2003; Ganaphathi et al. 2004; Dhingra et al. 2013). بدلیل خود گرده افشان بودن گیاه توتون و کم بودن خویشاوندان زراعی و وحشی برای آن، فرار ژنها از این گیاه بسیار کم می‌باشد. علاوه بر این هر دو روش نر عقیمی و عقیمی بذر قبلاً در توتون ایجاد شده‌اند و تکنولوژی پیشرفته‌ای برای جلوگیری از انتقال و فرار ژن از طریق گرده یا بذر به گیاهان دیگر به آسانی در دسترس است (Ma et al. 2003). بنابراین بر خلاف بسیاری از بیوراکتورهای گیاهی، توتون از نظر مسائل ایمنی زیستی و اخلاق زیستی و کمترین احتمال آلودگی زنجیره‌های گیاهی و جانوری بهترین شرایط را دارد.

آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاژ *T7* یک آنزیم تک زیرواحدی می‌باشد. رونویسی توسط این آنزیم به سرعت و بسیار اختصاصی

بوده و فقط به راه‌انداز *T7* اتصال پیدا می‌کند و ۵ برابر سریعتر از RNA پلیمراز باکتری انجام می‌گیرد. رونویسی با اتصال اختصاصی آنزیم به راه‌انداز شروع شده و خاتمه نسخه‌برداری نیاز به سیگنالهای بخصوصی دارد که باعث می‌شود این آنزیم قادر به رونویسی از هر DNA ای نباشد. این آنزیم رونویسی را در *T7* DNA و ژن‌های دارای راه‌انداز *T7* و خاتمه دهنده *T7* انجام می‌دهد (Studier and Moffatt., 1986; Carter et al., 1981; Borkotoky et al. 2016). زنجیره پلی‌پپتیدی این آنزیم دارای ۸۸۳ آمینواسید با وزن مولکولی ۹۸۰۹۲ دالتون می‌باشد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز اولین بار از باکتریوفاژ *T7* آلوده‌کننده باکتری ای کولای در سال ۱۹۶۹ جداسازی گردیده است (Chamberlin et al., 1970). ساختار اولیه این آنزیم در سال ۱۹۸۰ تعیین گردید و ساختار کریستالی آن بوسیله اشعه ایکس تجزیه و تحلیل گردید (Sousa et al., 1993; Cheetham and Steitz., 1999; Basu et al. 2014). غلظت mRNA تولیدی توسط آنزیم *T7RNA* پلیمراز با غلظت RNA های ریبوزمی قابل مقایسه هست و بنابراین تولید پروتئین توسط این آنزیم ۵۰٪ کل پروتئینها در عرض چند ساعت خواهد بود (Studier and Moffatt, 1986). آنزیم *T7RNA* پلیمراز برای سنتز RNA نه تنها در محیط *In vivo* بلکه برای سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) نیز مناسب می‌باشد. سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی بوسیله *T7RNA* پلیمراز به طور گسترده‌ای در انواع دستورالعمل‌های تکثیر از جمله روش ابروین (Eberwine) و دستورالعمل اسمارت (SMART)، استفاده می‌شود (Pamela et al. Liang, 2007; Russel et al. 2008).

پیش از این سنتز RNA و cDNA بر اساس روش PCR و فعالیت ترانس کریپتاز معکوس انجام می‌گرفت ولی به دلیل تکثیر متغیر cDNA و خطای Tag پلیمرازها، یک روش جدیدی برای سنتز RNA و cDNA ابداع گردید که روش ابروین نامیده می‌شود که اساس آن رونویسی در شرایط آزمایشگاهی بر اساس راه‌انداز *T7* و *T7RNA* پلیمراز می‌باشد. اساس بسیاری از کیت‌های سنتز RNA استفاده از این روش و آنزیم *T7RNA* پلیمراز می‌باشد (Russel et al. 2008).

PCR، واکنش هضم آنزیمی و در نهایت توالی یابی و همردیف-سازی آن در بانک های اطلاعاتی مورد تأیید قرار گرفت. این سازه سپس به آگروباکتریوم منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم جهت تلقیح گیاهان توتون استفاده شد. گیاهان توتون حاوی ژن *T7RNA* پلیمرز با استفاده از محیط های کشت انتخابی باززایی شدند. جهت اثبات انتقال ژن از روش PCR و RT-PCR استفاده گردید.

باکتریها

در این پژوهش از دو باکتری *E. coli* سویه DH5α و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان نگهداری و تکثیر سازه تهیه شده استفاده شد و از *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها

برای تکثیر ژن *T7RNA* پلیمرز طراحی آغازگرها به گونه ای انجام شد که حاوی جایگاه های برشی *BstEII* و *BglIII* برای درج در ناقل pCAMBIA1304 باشند. به منظور افزایش کارایی هضم توسط آنزیم های برشی، دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم، به دو طرف آغازگر افزوده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرها برای همسانه سازی در ناقل pCAMBIA1304

Table1. Primers for cloning in pCAMBIA1304

نام آغازگر	توالی آغازگر
آغازگر پیشرو	GGAAGATCTGATCCGGATTACTAACTGGAGAG
آغازگر معکوس	CCGGTCACCTCCGGAGTCGTATTGATTGG

ناقل ها

در مطالعه حاضر ژن *T7RNA* پلیمرز، از ناقل pAR3283 (تهیه شده از دکتر ویلیام استودیر، آزمایشگاه ملی بروکهیون، ایالات متحده، آمریکا) به ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 منتقل شد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش باکتریایی، ژن مقاومت به هیگرومایسین جهت گزینش در گیاه، راه انداز

RNA های سنتز شده توسط آنزیم *T7RNA* پلیمرز در مطالعه ساختار و عملکرد RNA در شرایط آزمایشگاهی در آزمایشات هیبریداسیون از جمله سادرن بلات، ریزآرایه، RNA مداخله گر (RNA interference)، آزمایشات آنتی سنس و... استفاده می-شوند. برای سنتز RNA بوسیله آنزیم *T7RNA* پلیمرز ژن های مورد نظر در ناقلهایی که دارای راه انداز T7 می باشد، همسانه سازی می شود (Yang ; Novak et al. 2004; Pamela et al. 2004; et al. 2007). خالص سازی و جداسازی این آنزیم از سلول های تحت تاثیر باکتریوفاژ مناسب نیست چون آنزیم به میزان کم، بلافاصله بعد از عفونت تولید می شود. همچنین بلافاصله پس از تولید این آنزیم، لیز شدن سلول در مدت کوتاهی انجام می شود. بنابراین با همسانه سازی ژن این آنزیم در یک ناقل مناسب و انتقال آن به داخل سلول میزبان می توان مقادیر زیادی از این آنزیم را تولید نمود (Davanloo et al. 1984; Nilson et al. 2013). در دهه های گذشته تولید تجاری و در مقیاس وسیع این آنزیم به منظور توسعه تکنولوژی های مبتنی بر آنزیم *T7RNA* پلیمرز بوجود آمده است و بیشتر این آنزیم ها در باکتریها تولید گردیده است (Davanloo et al. 1984). به طور معمول تولید آنزیم *T7RNA* پلیمرز نوترکیب عمدتاً به سیستم های میکروبی وابسته است. همچنین فرمهای تجاری این آنزیم گران می باشد. با توجه به اهمیت روزافزون این آنزیم در پژوهش های بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، تولید انبوه و کم هزینه آن در قالب کشاورزی مولکولی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به نیاز روزافزون تولید تجاری این آنزیم در شکل صحیح و مقیاس گسترده، در این تحقیق از گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید این آنزیم استفاده شده است.

مواد و روش ها

در این پژوهش ژن *T7RNA* پلیمرز پس از تکثیر از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pCAMBIA1304 بین راه انداز CaMV35S و خاتمه دهنده NOS با استفاده از آنزیم های برشی *BstEII* و *BglIII* همسانه سازی گردید و به باکتری *E. coli* منتقل و تکثیر شد. سازه ژنی تهیه شده با استفاده از آزمون های

CaMV35S و توالی خاتمه دهنده NOS است.

گیاهان توتون

در این تحقیق گیاه توتون *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi استفاده شد (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری). بذور استریل شده و در محیط ۱/۲MS، بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. ساقه گیاه توتون به قطعاتی به طول ۲-۳ سانتیمتر حاوی یک جوانه و یک برگ بریده شده و به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از دو هفته گیاهان رشد کرده و جهت تلقیح آماده شدند.

تکثیر با PCR و تخلیص محصول PCR

تکثیر قطعه DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مواد واکنش دهنده PCR (در حجم ۲۵μl عبارت بودند از: ۰/۲ mM از dNTP، ۰/۵ mM از MgCl₂، ۰/۵ mM از هر یک از آغازگرها، ۱۰۰-۳۰۰ نانوگرم از DNA به عنوان الگو و نیم واحد از آنزیم *pfu* پلیمراز. شرایط PCR برای تکثیر آنزیم *T7RNA* پلیمراز شامل دمای واسرشت سازی °C ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال °C ۶۲ برای ۴۰ ثانیه و دمای طویل شدن °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه می‌باشد. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص *Vivantis* استفاده گردید. سپس محصول تخلیص شده و همچنین ناقل pCambia1304 با آنزیم‌های *Bgl*III و *Bst*EII هضم گردیده و دوباره خالص‌سازی گردیدند. در نهایت ژن *T7RNA* پلیمراز در ناقل بیانی گیاهی pCambia1304 همسازسازی شد. سازه بدست آمده pACT7 نامیده شد.

تراژن نمودن *E. coli* با سازه تهیه شده

برای تراژن نمودن باکتری از روش شوک حرارتی استفاده شد. بدین صورت که باکتری‌های مستعد شده *E. coli* ذوب گردیده همراه با محصول همسازسازی به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتریها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای °C ۴۲ و دوباره در یخ به مدت ۲ دقیقه قرار داده

شدند. در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به میکروتیوب‌ها اضافه شده به مدت ۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور در دمای °C ۳۷ قرار داده شدند. در نهایت محلول باکتری حاصل روی پتری دیش حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توزیع شد و در دمای °C ۳۷ به مدت ۱۶ ساعت نگهداری گردید.

ترازینی توتون با استفاده از آگروباکتریوم

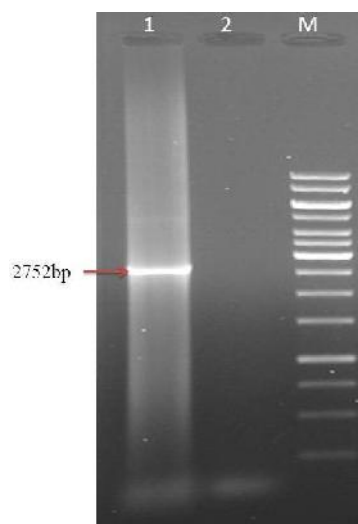
گیاهان توتون بر روی محیط MS کشت داده شدند و جوانترین برگها (طول ۴ سانتیمتر) برای تلقیح انتخاب شدند. سوسپانسیون آگروباکتریوم ($OD_{600}=0.8$) حاوی سازه مورد نظر تهیه گردید. برگهای آماده شده به ۱۰ قطعه تقسیم شدند و در داخل پتری دیش‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود نگهداری شدند. در این مدت هر چند دقیقه یکبار شیک آرامی به پتری‌ها داده شد. قطعات برگ‌ها بر روی محیط هم کشتی (محیط ۱/۲MS + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + 2 میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل و در دمای °C ۲۶ در تاریکی به مدت ۲ روز نگهداری شدند. در مرحله بعدی این قطعات برگ‌ها بر روی محیط MSIII (شامل محیط هم کشتی + ۱۵ و ۲۵ میلی-گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) در دمای °C ۲۶ با یک دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۴ هفته منتقل شدند. بعد از ساقه زایی، گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط ریشه زایی (محیط پایه MS + ۲۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) انتقال و در دمای °C ۲۶ با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا ریشه زایی صورت گرفت. در نهایت بعد از ریشه زایی، گیاهان توتون به گلدانهای حاوی ورمیکولات منتقل و سپس به خاک انتقال داده شدند.

استخراج DNA و بررسی PCR

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. بررسی PCR با استفاده از

تکثیر ژن *T7RNA* پلیمرز بوسیله PCR با آغازگرهای اختصاصی

ژن *T7RNA* پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و محل-های برشی *Bgl*III (درآغازگر پیشرو) و *Bst*EII (در آغازگر معکوس) طراحی شده بود، از طریق PCR تکثیر گردید. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بیانگر تکثیر مناسب می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR، تکثیر *T7RNA* پلیمرز، M: مارکر ۱ Kb، ۱: محصول PCR، تکثیر قطعه ۲۷۵۲bp ژن *T7RNA* پلیمرز ۲: واکنش شاهد (آب به عنوان الگو)

Figure 1. Electrophoresis of the PCR product, amplification of *T7RNA* polymerase 1: PCR product 2: control (water as template) M: 1 kb DNA Ladder.

نتایج

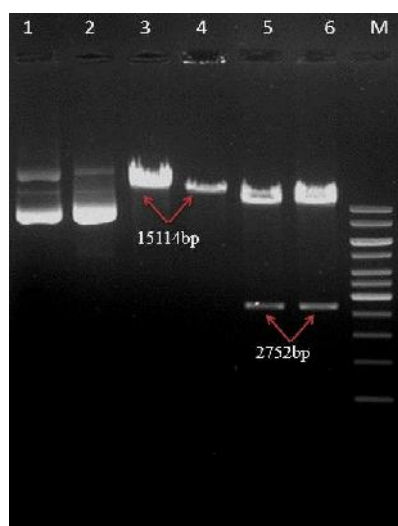
همسانه سازی ژن *T7RNA* پلیمرز در ناقل بیانی گیاهی (pCambia1304)

محصول PCR و همچنین ناقل با آنزیمهای برشی *Bgl*III و *Bst*EII برش داده شدند. پس از صحت برشها، واکنش اتصال صورت گرفت و در نهایت محصول هضم آنزیمی در وکتور pCambia1304 همسانه سازی گردید. سازه ایجاد شده (شکل

آغازگرهای اختصاصی انجام و گیاهان حاوی ژن *T7RNA* پلیمرز شناسایی و انتخاب شدند.

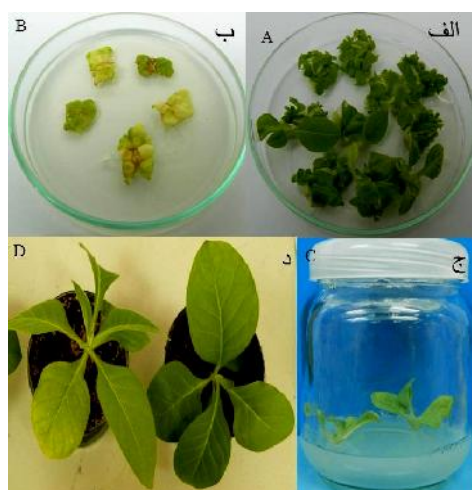
استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. RNA استخراج شده برای بررسی کمیت و کیفیت روی ژل آگارز بررسی گردید. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA استخراجی، تیمار با آنزیم *DNase I* انجام شد و جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA، از RNA های استخراج شده واکنش PCR صورت گرفت. برای استخراج RNA از محلول استخراج RNA، RNX Plus (سیناکلون) استفاده شد. سپس برای سنتز cDNA از کیت (SuperscriptII شرکت Invitrogen) استفاده گردید. قبل از افزودن مخلوط PCR برای حذف ساختارهای ثانویه RNA، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. رونویسی معکوس از روی RNA ها به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای تصادفی، dT و همچنین آغازگر معکوس اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمرز انجام گرفت. سپس cDNA سنتز شده توسط آب استریل رقیق سازی شد و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. برای رقیق سازی به مخلوط حاصل واکنش RT-PCR میزان ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. واکنشهای PCR به شرح قبل انجام شدند. برای تأیید صحت سنتز cDNA (Jain et al., 2006; Xiao et al. 2012; Lee et al. 2010) از ژنهای دایم بیان شونده استفاده می شود. در این تحقیق آغازگرهای ژن گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز *GAPDH* (با توالی 5': TATGTTTGTGTTGGTGTCAACGAGCACGAATACAAG و 3': ATGTTAAATGATGCAGCCCTTCACCTCTC (R) به عنوان ژن دایم بیان شونده و کنترل مثبت استفاده گردید.



شکل ۳- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pACT7، ۱ و ۲: پلاسمید نوترکیب ۳: هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم *Bgl*III و خطی شدن پلاسمید ۴: هضم با آنزیم *Bst*EII و خطی شدن پلاسمید ۵: هضم با دو آنزیم *Bgl*III و *Bst*EII پلاسمید ۱ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده ۶: هضم با دو آنزیم *Bgl*III و *Bst*EII پلاسمید ۲ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده، M: مارکر ۱Kb

Figure 3. Proof of the presence of *T7RNAP* gene by digestion reaction. 1 and 2: recombinant vector, 3: recombinant vector after digestion by *Bgl*III enzyme, 4: recombinant vector after digestion by *Bst*EII enzyme, 5: recombinant vector 1 after digestion by *Bgl*III and *Bst*EII enzymes, 6: recombinant vector 2 after digestion by *Bgl*III and *Bst*EII enzymes. M: 1 kb DNA Ladder.



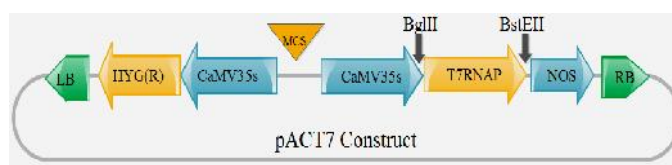
شکل ۴- الف: پیدایش و رشد جوانه های اولیه از ریزنمونه ها بر سطح محیط انتخابی اولیه حاوی 15mg.L^{-1} هیگرومایسین. ۳ الی ۴ هفته بعد از تلقیح، ریزنمونه های تلقیح شده تولید گیاهچه نمودند، ب: هیچ گونه باززایی بر روی ریزنمونه های شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم بدون ناقل) مشاهده نشد. ج: گسترش ریشه ها در محیط ریشه زایی، د: رشد گیاهچه ها در گلدان.

Figure 4 A: Regeneration of plants on selection medium containing hygromycin (15 mg/l), B: negative Control C: plants on selection medium, D: Transgenic tobacco plants in pots.

۲) به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد DH5 α منتقل گردید. جهت تأیید همسانه سازی از واکنش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم های *Bgl*III و *Bst*EII (شکل ۳)، و تعیین توالی استفاده شد. اندازه ناقل نوترکیب خطی شده در اثر هضم با یک آنزیم *Bgl*III و *Bst*EII به طول ۱۵۱۱۴ نوکلئوتیدی صحت همسانه سازی را نشان می دهد و همچنین هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bgl*III و *Bst*EII خروج قطعه همسانه سازی شده به اندازه ۲۷۵۲ نوکلئوتیدی را تأیید کرد (شکل ۳). آنالیز همریدی این ژن شباهت ۹۷-۹۸ درصدی را با توالی پایگاه NCBI به شماره دسترسی JQ436739.1 نشان می دهد که آنزیم *T7RNA* پلیمراز است. انتقال سازه بیانی pACT7 به آگروباکتریوم با استفاده از الکتروپوراسیون انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی ژن مورد نظر روی محیط کشت LB دارای آنتی بیوتیک های ریفامپیسین و کانامایسین رشد داده شد. بررسی کلونی ها با روش PCR با آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را در آگروباکتریوم تأیید کرد.

انتقال ژن *T7RNA* به توتون

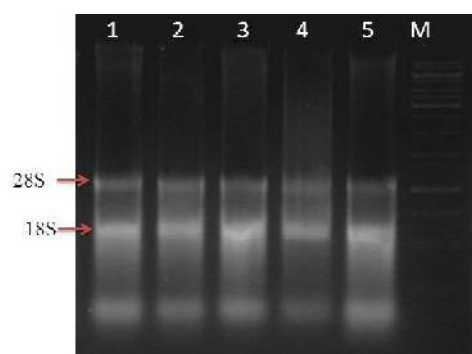
عمل تراریخته نمودن گیاهان توتون با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد LB4404 صورت گرفت. برگهای توتون که با آگروباکتریوم (حاوی سازه pACT7) تلقیح شدند بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین (۱۵ و ۲۵ میلی گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۵۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند.



شکل ۲- سازه pACT7. این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسین، محل برشی *Bgl*III و *Bst*EII، راه انداز CaMV35S، توالی خاتمه دهنده NOS، توالی های مرزی چپ و مرز راست و ژن *T7RNA* پلیمراز می باشد.

Figure 2. T-DNA region of pACT7. LB and RB: Left and Right Borders, IYG(R): Hygromycin selectable marker, CaMV35S: Cauliflower Mosaic Virus promoter and NOS: Nopaline Synthase terminator.

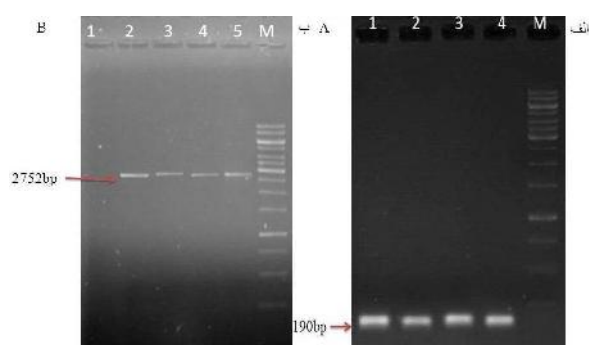
آب دیونیزه اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. صحت ساخت cDNA با آغازگر ژن دایم بیان شونده *GAPDH* (گلیسیرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناژ) و تکثیر باند مربوط به ژن *GAPDH*، تأیید شد (شکل ۷-الف). آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمرز بر روی cDNA ساخته شده، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه بانندی مشاهده نشد (شکل ۷-ب).



شکل ۶- الکتروفورز RNA استخراج شده از گیاهان تراریخته لاین ۱ الی ۴، ۵:

RNA استخراجی از توتون شاهد (غیر تراریخته) M: مارکر ۱Kb

Figure 6. Electrophoresis of RNA extracted from transgenic plants Line 1 to 4, 5: RNA extracted from non-transgenic plant M: 1 kb DNA Ladder.



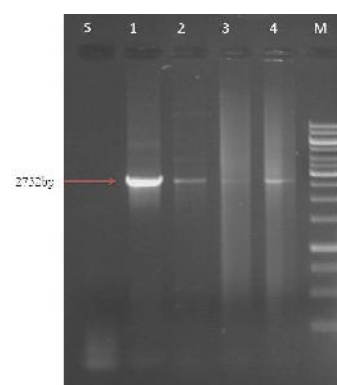
شکل ۷- الف: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای ژن *GAPDH* بر روی cDNA های سنتز شده (لاین ۱-۴) ب: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمرز بر روی cDNA های سنتز شده ۱: گیاه شاهد (عدم تکثیر) ۲-۵: گیاه تراریخته، باند ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد M: مارکر ۱Kb

Figure 7. A: Electrophoresis of PCR product with *GAPDH* primers on the cDNA synthesized (lane 1-4) B: Electrophoresis of PCR product with *T7RNA*-specific primers on the cDNA synthesized 1: control plant 2-5: Transgenic plants. M: 1 kb DNA Ladder

پس از چند هفته ریز نمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند (شکل ۴-الف) در حالی که هیچگونه باززایی بر روی برگهای توتون گیاهان شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه) مشاهده نگردید (شکل ۴-ب).

استخراج DNA ژنومی و آنالیز PCR

استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام گرفت. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه بانندی مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی

T7RNAP بر روی گیاه تراریخته لاین ۱ تا ۴ حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد S: توتون شاهد هیچ گونه بانندی را نشان نمی‌دهد M: مارکر ۱Kb

Figure 5 Electrophoresis of the PCR product in transgenic plant by PCR, M: 1 kb DNA Ladder, 1-4 : transgenic plant, S: wild type plant.

استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

استخراج RNA از برگهای جوان گیاهان باززایی شده (لاین ۱الی۵) انجام گرفت. RNA های استخراجی دارای کیفیت مناسب و زیر واحد ۲۸S و ۱۸S بود (شکل ۶). تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. RNA تیمار شده با آنزیم *DNase* در واکنش PCR، به عنوان الگو استفاده شد و با حذف کامل DNA هیچ تکثیری انجام نشد. در این مرحله سنتز cDNA برای RNA استخراج شده انجام شد برای رقیق سازی به مخلوط حاصل واکنش RT-PCR، ۴۰ میکرولیتر

بحث

ریزنمونه برگگی تلقیح شده با آگروباکتریوم حاوی ناقل رشد می- کنند (Gubis et al. 2007). بررسی های مولکولی با روش PCR بر روی گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد، انتقال ژن *T7RNA* پلیمرز به گیاهان بازرا شده را نشان داد. در این تحقیق تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. در صورت عدم حذف DNA ژنومی از RNA های استخراجی cDNA سنتز شده خالص نخواهد بود و نتایج RT-PCR برای تأیید تراریختی فاقد اعتبار لازم خواهد بود (Bustina and Tania, 2004). پس از ارزیابی ملکولی گیاهان تراریخته از طریق PCR و RT-PCR این گیاهان به گلخانه منتقل شدند، تا در نسل های بعدی مورد آنالیز قرار گیرند.

آنزیم *T7RNA* پلیمرز یکی از مهمترین آنزیم هایی است که در زمینه های مختلف بیوتکنولوژی، علوم پایه، پزشکی و صنعت، کاربردهای فراوانی دارد. در سالهای گذشته همچنین از این آنزیم در سیستم های مختلف بیانی برای افزایش بیان و پایداری بیان ژن استفاده شده است. آنزیم *T7RNA* پلیمرز دارای خصوصیتی است که برای استفاده در سیستم های بیانی مناسب می باشد از جمله عدم نیاز به فاکتور اضافی برای شناسایی راه انداز، بسیار اختصاصی عمل می کند و فقط ژنهای تحت کنترل راه انداز اختصاصی را بیان می کند (Tunitskaya et al. 2002). با توجه به کاربرد وسیع این آنزیم در پژوهش ها، تولید انبوه و کم هزینه این آنزیم از طریق کشاورزی مولکولی ارزشمند خواهد بود.

آنزیم *T7RNA* پلیمرز در سیستم های مختلف باکتریایی همساز سازی و تولید شده است ولی همساز سازی و تولید آن در گیاه کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش از ناقل بیانی pCAMBIA1304 جهت همساز سازی و انتقال ژن *T7RNAP* به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری از ویژگیها به میزان زیادی درانتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسن (جهت انتخاب باکتری حاوی ناقل) و ژن مقاومت به هیگرومایسین (جهت انتخاب گیاه تراریخته) به عنوان ژن های گزینشگر، راه انداز *CaMV35S*، خاتمه دهنده NOS می باشد (Pratheesh et al. 2013). اندازه کوچک این ناقل، تعدد نسخه ها و پایداری در آگروباکتریوم از سایر ویژگیهای این ناقل می باشد. در دولپه ای هایی مثل توتون راه انداز *CaMV35S* یک انتخاب مناسب و عمومی می باشد که باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر می شود (Raha et al. 2008). جهت انتقال ژن به گیاه توتون از آگروباکتریوم استفاده شد که به طور گسترده ای جهت تراریختی گیاهان بخصوص دو لپه ایها استفاده می شود. گیاه توتون به تلقیح با نژاد آگروباکتریوم حساس است، گیاهچه ها به طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس، بازرا می گردند و از محل لبه های بریده شده

منابع

- Basu RS, Warner BA, Molodtsov V, Pupov D, Esyunina D, Fernández-Tornero C, Kulbachinskiy A, Murakami KS. 2014. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *The Journal of Biology Chemistry*. 289 (35): 24549–24559.
- Borkotoky S, Meena CK, Murali A. 2016. Interaction Analysis of T7 RNA Polymerase with Heparin and Its Low Molecular Weight Derivatives - An In Silico Approach. *Bioinformatics and Biology Insights*. 29 (10):155-66.
- Bustina S.A, Tania N. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*.15:155–166.
- Carter A. D, Morris C. E, and McAllister W. T. 1981. Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA. *Journal of Virology*. 37: 636-642.
- Chamberlin M, and Ring J. 1970. Characterization of T7-specific Ribonucleic Acid Polymerase. *The Journal of Biology Chemistry*. 248: 2235-2244.
- Cheetham G. M, Jeruzalmi D, and Steitz T. A. 1999. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature*. 399: 80-83.
- Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. Ed.). *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*, pp: 371-376.

- Davanloo P, Alan H,R, John J.D, and Studier F.W. 1984.** Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81: 2035-2039.
- Dhingra A, James V.A, Koop H.U,3, Mok M.C, Paepe R. D, Gallo M, Folta K.M. 2008.** Tobacco. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0.
- Ganapath R, Suprasanna P, Rao P, Bapat V.A. 2004.** Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 171-184.
- Gubis J, Vankova R, Cervena V, Dragunova M, Lichtnerova H, Dokupil T, Jurekova Z. 2007.** Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany*. 73: 505-511.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK,Khurana JP .2006.** Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345:646-651.
- Lee J.M, Roche J.R, Donaghy D,Thrush A, Sathish P. 2010.** Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Molecular Biology*.11:8.
- Leslie M, Shama Robert K, Peterson D. 2004.** Agricultural and Biological Risk Assessment. Montana State University, Bozeman, MT 59717.
- Liang K. 2007.** Transcriptomics & Functional Genomics. <http://www.ipc.nxgenomics.org/newsletter/no7.htm>.
- Ma J.K.C, Drake P.M.W, and Christou P. 2003.** The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4: 794-805.
- Nilsen T. W, Rio D, Manuel M. 2013.** High-Yield Synthesis of RNA Using T7 RNA Polymerase and Plasmid DNA or Oligonucleotide Templates. *Cold Spring Harbor, NY, USA*.
- Novak P.K, Lee J.S, Mikaelyan A, Patel V, andThorgeirsson S.S. 2004.** Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *BioTechniques*. 37: 580-588.
- Pamela R, Duschl J, Klaus R. 2004.** Optimized RNA amplification using T7-RNA-polymerase based in vitro transcription. *Analytical Biochemistry*. 334: 164-174.
- Pratheesh P T, Kurup G.M. 2013.** Molecular cloning and expression of Tb antigene protein in Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Indian journal of Biotechnology*. 12: 350-355.
- Raha S, Pattanaik S, Maiti I.B. 2008.** KTRDC-developed genetic promoters for use in plant genetic engineering. Kentucky Tobacco Research and Development Center. 8-17-108.
- Russell S, Meadows L.A, Roslin R. R. 2008.** Microarray Technology in Practice. pp.464.
- Shinha P, Saxena R.k, Singh V.K, Krishnamurthy L, Varshney R.K. 2015.** Selection and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) under Heat and Salt Stress Conditions. *Front Plant Sci*. 6: 1071.
- Shinmyo A, Kato K. 2010.** Molecular farming: production of drugs and vaccines in higher plants. *The Journal of Antibiotics*. 63: 431-433.
- Sousa R, Chung Y. T, Rose J. P, and Wang B.C. 1993.** Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature*. 364: 593-599.
- Studier F. W, and Moffatt B. A. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 189: 113-130.
- Tekoah Y, Shulman A, Kizhner T, Ruderfer I, Fux L, Nataf Y, Bartfeld D, Ariel T, Gingis-Velitski S, Hanania U, Shaaltiel Y. 2015.** Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience. *Plant Biotechnology Journal*. 13: 1199-1208.
- Tunitskaya V.L, and Kochetkov S.N. 2002.** Structural-Functional Analysis of Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Biochemistry (Moscow)*. 67(10): 1124-1135.
- Twyman R. M, Schillberg S, Fischer R. 2013.** Optimizing the Yield of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Current Pharmaceutical Design*. 19: 5486-5494. University of London.
- Xiao D, Zhang N.W, Zhao J.J, Bonnema G, Hou X.L. 2012.** Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalisation in non-heading Chinese cabbage. *Functional Plant Biology*. 39 (4): 342-350.
- Yang M, Tsoi P.Y, Wing Li C, Zhao J. 2007.** Analysis of interactions of template/primer duplexes with T7 DNA polymerase by oligonucleotide microarray. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 115: 428-433.