مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۳۰-۲۳

انتقال ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B به گیاه توتون

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

ماجده نیسی[۱]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی*[۲]، سیروس قبادی[۳]،
حمید رجبی معماری[۴] و غزاله خاکسار[۵]

Majedeh Neisi[1], Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei[2*], Cyrus Ghobadi[3], Hamid Rajabi Memari[4], Ghazaleh Khaksar[5]

۱- دانش آموخته ارشد بیوتکنولوژی ۲- استاد گروه بیوتکنولوژی ۳- استادیار گروه علوم باغبانی
دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
۴- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
۵- دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

[1] MSc in Biotechnology, [2] Prof, Department of Biotechnology,
[3] Assistance Prof, Department of Horticulture,
Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[4] Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
[5] Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sayedt@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۴)

چکیده

یکی از شایع‌ترین آلودگی‌های ویروسی انسانی در سراسر جهان آلودگی ویروس هپاتیت B است. مؤثرترین شیوه برای کنترل و درمان این بیماری، تزریق واکسن می‌باشد، اما با توجه به گران بودن داروهای شیمیایی، تولید پروتئین نوترکیب ویروس هپاتیت B به عنوان واکسن خوراکی در گیاهان طی چند سال گذشته با بیورآکتورهای مناسب برای تولید ارزان و فراوان اهمیت یافته است. بنابراین در این پژوهش سعی شده است که ژن *HBsAg* با کمترین هزینه به گیاه مدل توتون منتقل شود. بدین‌منظور ابتدا ناقل دوگانه pCAMBIA 1304 حاوی ژن *HBsAg* در باکتری *Escherichia coli* سویهJM107 و اگروباکتریوم سویه LBA4404 کلون و به روش قطعات برگی به گیاه توتون منتقل شد. باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط‌کشت انتخابی MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد در غلظت‌های یک میلی‌گرم در لیتر BAP و یک دهم میلی‌گرم در لیتر NAA انجام گرفت. در آخر پس از رسیدن گیاهچه‌های غربال شده به ارتفاع ۱۵ سانتیمتر، به روش CTAB از گیاهان تراریخته احتمالی DNA استخراج شد و جهت شناسایی و تأیید حضور ژن با آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR و جهت بررسی بیان ژن واکنش RT-PCR انجام گرفت و بدین ترتیب حضور و بیان این ژن در گیاهان تراریخته توتون تأیید شد

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم
تراریختی
توتون
ژن *HBsAg*
واکسن خوراکی

مقدمه

هپاتیت B یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی است و نزدیک به یک سوم جمعیت جهان در خطر ابتلا به این بیماری و ۳۵۰ میلیون نفر حامل این بیماری می‌باشند. سالیانه بیش از یک میلیون نفر در اثر ابتلا به سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma) ناشی از این ویروس می‌میرند (Rizzetto and Ciancio2008). ویروس هپاتیت B حاوی ژنوم DNA می‌باشد و بر این اساس عضو خانواده هپادناویریده (*Hepadnaviridae*) طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس در ساختار خود دارای یک DNAی منحصر به فرد کروی و دو رشته‌ای، به طول ۳۲۰۰ جفت باز می‌باشد. در قسمت خارجی ویروس پوشش لیپوپروتئینی (آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B(HBsAg)) و در قسمت مرکزی آن هسته نوکلئوکپسیدی (آنتی-ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg)) به‌طول ۲۷ نانومتر موجود است (Ram Maya *et al*. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B مهم‌ترین قسمت پوشش خارجی ویروس و محصول ژن *S* می‌باشد. این آنتی‌ژن از سه گلیکوپروتئین کوچک، متوسط و بزرگ به نام‌های SHBs، MHBs و LHBs ساخته شده و به ترتیب توسط ناحیه $pre\text{-}s_1$، $pre\text{-}s_2$ و s و ژن *S* کد می‌شوند (Sunil Kumar *et al*. 2007). این آنتی‌ژن از ویروس HBV پاسخ ایمنی مناسب علیه بیماری را القا و موجب تولید آنتی‌بادی خنثی‌ساز (Neutralizing) می‌شود (Guan *et al*. 2012).

یکی از مؤثرترین و پیشرفته‌ترین روش‌های کنترل عفونت هپاتیت B واکسیناسیون می‌باشد (Guan *et al*. 2012). اولین واکسن نوترکیب HBV در مخمر تولید شد که از لحاظ اقتصادی گران و مقرون به‌صرفه نبود (Marcondes and Hasen 2008). در سال‌های گذشته گیاهان تراریخته به عنوان بیورآکتور-های مناسب برای تولید ترکیبات دارویی و نوترکیب متنوعی از جمله آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌های نوترکیب، آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی، فاکتورهای رشد، واکسن‌های خوراکی و انواع زیادی از پروتئین‌های نوترکیب جانوری و انسانی به کار برده شده‌اند (Shereen *et al*. 2009). واکسن‌های مشتق شده از گیاهان تراریخته از نظر امنیت زیستی، پایداری، راندمان بالا و هزینه تولید نسبت به واکسن‌های نوترکیب مشتق شده از سلول‌های پستانداران و مخمر توجه زیادی را در سراسر جهان به خود جلب کرده‌اند (Baesi *et al*. 2011; Li *et al*. 2011). به طور کلی استفاده از گیاهان تراریخته برای تولید واکسن مزیت‌های زیادی نسبت به سیستم‌های سنتی دارد. گیاهان فقط بخش مختص عفونت یا مسمومیت ذاتی را بیان کرده و بدین ترتیب باعث کاهش دیگر عکس‌العمل‌های مضر می‌شوند (Shereen *et al*. 2009)؛ گیاهان میزبان پاتوژن‌های انسانی و جانوری نمی‌باشند بنابراین در اثر تولید واکسن، خود آلوده نمی‌شوند (Shereen *et al*. 2009)؛ هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰-۲ درصد سیستم فرمنتاسیون باکتری‌ها و ۰/۱ درصد کشت سلول-های پستانداران بوده (Giddings 2001) و همچنین قیمت تمام شده تولید آنتی‌بادی در گیاهان حدود ۰/۱- ۰/۰۰۱ تولید آن در سیستم‌های دیگر است (Daniell 2003).

با توجه به قیمت گزاف داروهای شیمیایی، نیاز به سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت مناسب، در مقیاس بالا و بیشترین فعالیت زیستی و ایمنی در اختیار بیماران قرار دهد، امری ضروری می‌باشد. بنابراین در حال حاضر مؤثرترین روش در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب، واکسن‌های خوراکی مشتق شده از گیاهان تراریخته است. تولید واکسن هپاتیت B در گیاه می‌تواند روش مناسبی برای پیشگیری از این بیماری باشد و از نظر اقتصادی، امکان‌پذیر و عملی است (Sunil Kumar *et al*. 2007). گزارش‌های زیادی از انتقال و بیان ژن *HBsAg* در گیاهان مختلف وجود دارد (Shereen *et al*. 2009; Li *et al*. 2011; Choi *et al*. 2011; Guan *et al*. 2012). ولی توتون به‌جهت سهولت در انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخته، تولید بذر فراوان و تولید انبوه زیست توده (بیوماس)، کاندید مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نسبت به گیاهان دیگر می‌باشد (Daniell 2003; Ahangarzadeh *et al*. 2012). این مطالعه به‌منظور بررسی امکان انتقال ژن *HBsAg* به صورت پایدار و بیان آن در گیاهان تراریخته توتون در جهت تولید ارزان و انبوه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و ناقل‌های ژنی

در این پژوهش از دو باکتری *Escherichia coli* و *Agrobacterium tumefaciens* و ناقل بیانی pCAMBIA1304 استفاده شد. از باکتری *E.coli* سویه JM107 به‌عنوان میزبان جهت نگهداری و تکثیر ناقل و از باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 و ناقل بیانی دوگانه pCAMBIA1304 جهت انتقال ژن موردنظر و تراریختی گیاه توتون استفاده شد. این ناقل دارای نشانگر انتخابی کانامایسین جهت گزینش باکتریایی و نشانگر هیگرومایسین جهت گزینش گیاهان تراریخته می‌باشد (شکل ۱).

آغازگرهای اختصاصی ژن

به‌منظور شناسایی و تکثیر ژن مورد نظر از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای توالی ژن *HBsAg*، آغازگرهای اختصاصی با رعایت شرایطی همچون عدم تشکیل حلقه، عدم تشکیل دو رشته‌ای و درصد GC توسط نرم افزار oligoanalyser طراحی شد. توالی این آغازگرها عبارتند از: آغازگر رفت:

5'-ATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA-3' و آغازگر برگشت:

5'-TCATCCATATAGCTGAAAGCCAAACAG-3'

انتقال ناقل به باکتری *Agrobacterium tumefaciens*

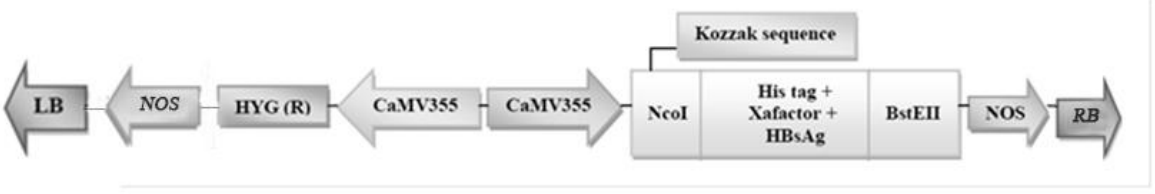
در این مطالعه ناقل pCAMBIA – HBsAg تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35s)، به روش انجماد و ذوب به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت (Sambrook and Russel 2001).

ارزیابی میزان حساسیت ریزنمونه‌های برگی به هیگرومایسین

جهت بررسی میزان حساسیت ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین، ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت MS دارای غلظت‌های مختلفی از این آنتی‌بیوتیک (صفر، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت و به مدت یک ماه در اتاق رشد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از یک ماه اثر این آنتی بیوتیک بر باززایی و نکروز شدن ریزنمونه‌های برگی بررسی شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم جهت انتقال ناقل به گیاه

بدین‌منظور، یک همسانه از باکتری *A.tumefaciens* حاوی ناقل مورد مطالعه به محیط‌کشت LB مایع دارای $50 mgl^{-1}$ استرپتومایسین و $100 mgl^{-1}$ کانامایسین منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد روی شیکر (۱۸۰ دور در دقیقه) نگهداری شد تا باکتری به میزان مناسبی از رشد برسد. سپس جهت دست‌یابی به غلظت مناسبی از باکتری (۰/۸ – ۰/۶ در OD_{600})، باکتری رشد یافته به محیط‌کشت LB مایع جدید منتقل شد. پس از رسیدن باکتری به OD مناسب، لوله‌های حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. با حذف فاز رویی، سلول‌های ته‌نشین شده باکتری در محیط‌کشت MS مایع رقیق و حل شدند.



شکل ۱- ناحیه T-DNA ناقل pCAMBIA1304 حاوی ژن *HBsAg*

Figure 1. T-DNA Region of pCAMBIA1304 containing *HBsAg* gene.

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

در این پژوهش، ابتدا بذرهای توتون با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد به همراه یک قطره توین ۸۰ (جهت افزایش چسبندگی سطحی مواد ضدعفونی کننده با بذور) به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی شده و در محیط جوانه‌زنی MS بدون هورمون (Murashige and Skoog 1962) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از سه هفته برگ‌های جوان توتون به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن انتخاب شده و به مدت سه روز در محیط‌کشت MS دارای هورمون (۱ BAP + ۰/۱ NAA) قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها با سوسپانسون اگروباکتریوم (۰/۶– OD_{600nm} =۰/۸) جهت انتقال ژن مورد نظر تلقیح شدند. برای مایه‌کوبی، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در پتری دیش‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسون اگروباکتریوم و در دمای اتاق قرار گرفته و پس از خشک شدن نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل به ظروف دارای محیط‌کشت (MS + ۱mgl^{-1} BAP + ۰/۱mgl^{-1} NAA) منتقل و به مدت سه روز در این محیط در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده و دارای ۵۰۰mgl^{-1} سفوتاکسیم شسته و روی کاغذ صافی استریل خشک گردید. سپس، نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (محیط کشت MS+۵۰۰mgl^{-1} سفوتاکسیم و ۱۵mgl^{-1} هیگرومایسین) منتقل و به مدت دو هفته در این محیط و در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول بر ثانیه برمترمربع) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از باززایی ریزنمونه‌ها، جوانه‌های باززا شده از کالوس انتخاب شده و برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شد (Ahangarzadeh *et al.* 2012). در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی پرلایت و پیت‌ماس انتقال یافته و برای انجام مطالعات بعدی نگهداری شدند.

تأیید حضور ژن *HBsAg* در گیاهان با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

جهت شناسایی و تکثیر ژن *HBsAg*، از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Murray and Thampson 1998) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن انجام گرفت. بدین‌منظور ابتدا واسرشت‌سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس واکنش در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی، اتصال و تکثیر هریک به مدت یک دقیقه به‌ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

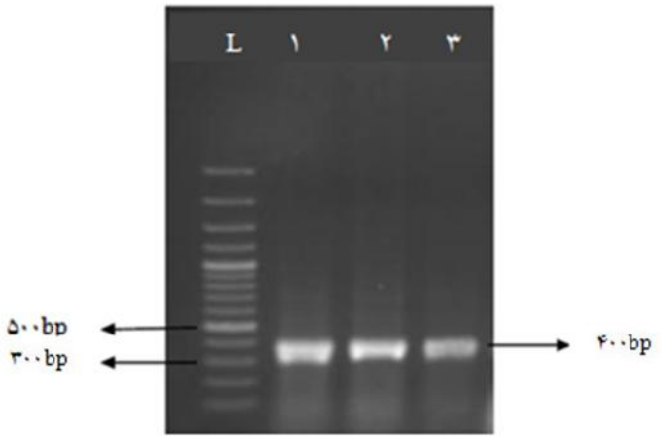
بررسی بیان ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT – PCR

به‌منظور بررسی بیان ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج RNA توسط کیت (Rneasy Micro Kit شرکت QIAGEN، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت (شرکت Fermentas، آلمان) استفاده شد. سپس واکنش RT–PCR با همان شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) صورت گرفت.

نتایج

تأیید مولکولی حضور ناقل در اگروباکتریوم با انجام Colony PCR

کلونی‌های رشدیافته در محیط‌کشت LB حاوی کانامایسین و استرپتومایسین صحت انتقال را تأیید کرد. همچنین با انجام واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر و الگوی همسانه‌های حاوی ناقل pCAMBIA 1304–*HBsAg*، قطعه DNA به طول تقریبی ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد. (شکل ۲).



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام واکنش Colony PCR با آغازگرهای HB_R و HB_F. L- نشانگر اندازه ۱۰۰bp، ۱ تا ۳- همسانه‌های اگروباکتریوم نوترکیب

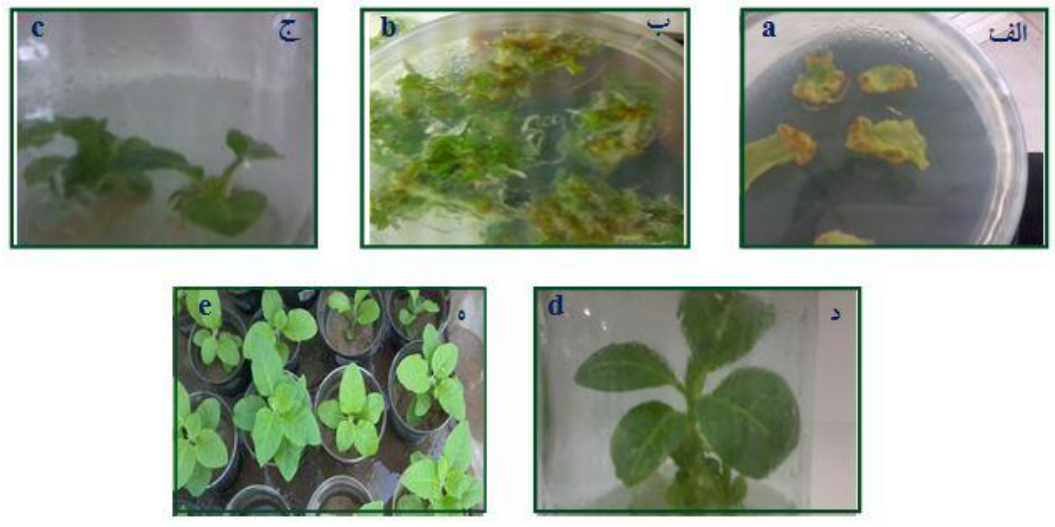
Figure 2- Confirmation of Cloning of *HBsAg* Gene in *A. tumefaciens* by Colony PCR Technique. L: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentase), Lane 1-3: Transformed Colonies.

تعیین سطح مؤثر هیگرومایسین بر ریزنمونه‌های برگی توتون

نتایج این بررسی نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین نمونه‌ها همچنان سبز مانده و باززا شدند در حالی که در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر، نمونه‌ها قهوه‌ای و نکروز شده و باززا نشدند. بنابراین غلظت $15mgl^{-1}$ هیگرومایسین به عنوان سطح مؤثر انتخاب شد به گونه‌ای که نمونه‌هایی که پس از تلقیح در این غلظت باززا شدند به علت دریافت ژن مقاومت به هیگرومایسین که در ناحیه T–DNA و در مجاورت ژن *HBsAg* قرار دارد، به عنوان نمونه‌های تراریخته احتمالی انتخاب شدند (Ahangarzadeh *et al*. 2012).

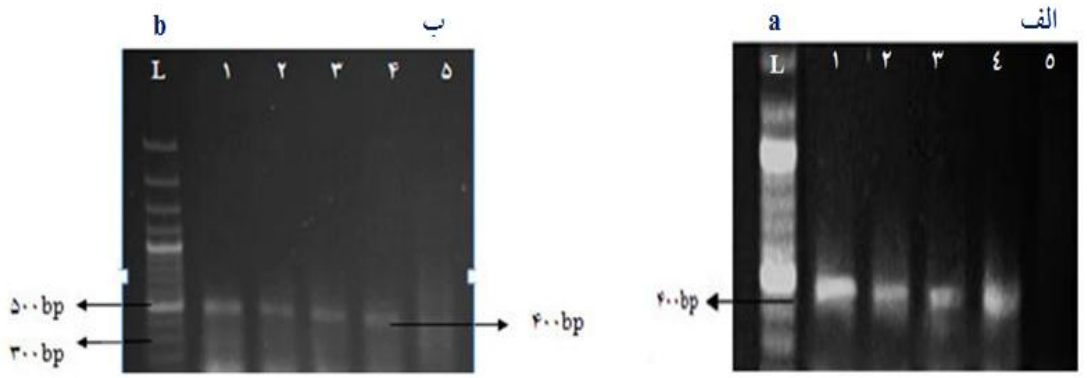
انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگی توتون با اگروباکتریوم حاوی ژن مورد مطالعه و انتقال آن‌ها به محیط‌کشت انتخابی، برگ‌های توتون در حدود دو هفته، متورم و بزرگ شده و آثار کالوس‌زایی در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۳ـالف). پس از دو هفته جوانه‌ها از کالوس، باززا شده (شکل ۳ـب) و سه هفته بعد، ریشه‌ها ظاهر شد (شکل ۳ـ ج). گیاهچه‌هایی با ارتفاع مناسب (۱۵ سانتیمتر) (شکل ۳ـد)، به عنوان گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به خاک منتقل شدند (شکل ۳ـ ه).



شکل ۳- مراحل باززایی ریزنمونه‌های برگی توتون پس از تلقیح با اگروباکتریوم: الف- بزرگ و متورم شدن ریزنمونه‌های برگی و ظهور کالوس. ب- باززایی جوانه‌ها ۱۰ روز پس از کالوس‌زایی. ج- ریشه دار شدن جوانه‌ها در محیط‌کشت بدون هورمون. د- رسیدن گیاهچه‌ها به حد مناسبی از رشد. ه- انتقال گیاهچه‌ها به خاک.

Figure 3- Regeneration of tobacco explants following co-culture with Agrobacterium. a: callus formation, b: shoot formation (2 weeks old), c: root formation (4-6 weeks old), d: transgenic plantlets, e: plants were transfered to soil.



شکل۴- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام PCR (الف) و RT-PCR (ب) در گیاهان تراریخته توتون. L- نشانگر اندازه ۱۰۰bp، ۱- پلاسمید حاوی قطعه موردنظر، ۲ تا ۴ – گیاهان توتون تراریخته، ۵ – گیاه توتون غیرتراریخته

Figure 4- PCR and RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants. a: PCR, b: RT-PCR. L: ™ 100 bp DNA Ladder (Fermentase), 1: Positive Control (pCAMBIA-HBsAg), 2-4: transgenic plants, 5: untransformed plant (negative control).

بررسی حضور ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته با انجام واکنش PCR

نتایج حاصل از تکثیر ژن مورد مطالعه با الگوی DNA حاصل از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته و آغازگرهای اختصاصی ژن نشان داد که حداقل یک نسخه از ژن *HBsAg* در ژنوم گیاهان تراریخته وجود دارد. عدم مشاهده باند در گیاهان شاهد نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ۴- الف).

بررسی بیان ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT – PCR

طبق نتایج حاصل از واکنش RT-PCR و مشاهده قطعه‌ای با اندازه ۴۰۰ جفت باز، بیان ژن مورد مطالعه در گیاهان تراریخته تأیید شد (شکل ۴-ب). اما در گیاهان شاهد، عدم مشاهده تکثیر قطعه فوق بیانگر فقدان بیان ژن *HBsAg* در این گیاهان بود.

بحث

کارسینوم سلول کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) یکی ازشایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است که علت حداقل ۷۵ درصد از این سرطان‌ها ویروس هپاتیت B (HBV) می‌باشد (Rizzetto and Ciancio 2008). این ویروس عامل اصلی بیماری‌های کبدی بوده و شدت آن از فردی به فرد دیگر متغیر است (Ram Maya 2008).

زراعت مولکولی و تکنولوژی گیاه تراریخته در ابتدا به عنوان راهی جهت رسیدن به مقاومت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفت، اما ظرفیت بالای سلول‌های گیاهی برای تاخوردگی صحیح و سریع پروتئین‌های بیگانه با ساختارهای پیچیده و همچنین حفظ ساختار اصلی آن‌ها در گیاهان نشان داد که گیاهان دارای پتانسیل بالقوه‌ای جهت تولید بهینه و مقرون به صرفه پروتئین‌های نوترکیب دارویی و صنعتی می‌باشند (Lopez *et al*. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B تولید شده در گیاهان تراریخته از نظر صفات آنتی‌ژنی و فیزیکی شباهت بسیاری به ذرات HBsAg مشتق شده از سرم انسانی و مخمر نوترکیبی دارد که تاکنون به عنوان واکسن استفاده شده‌اند (Mason *et al*.1992).

ژن *HBsAg* در سیستم‌های گیاهی مختلفی از جمله گوجه‌فرنگی (Srinivas *et al*. 2008)، سیب زمینی (Richter *et al*. 2000; Shulga *et al*. 2004)، موز (Sunil Kumar *et al*. 2005)، هویج (Imani *et al*. 2002)، لوپین و کاهو (Kapusta *et al*. 1999) بیان شده است. در سال‌های گذشته نیز گزارش‌های بسیاری از های-پنگ و همکاران (۲۰۰۹)، شرین و همکاران (۲۰۰۹)، لی و همکاران (۲۰۱۱)، چوی و همکاران (۲۰۱۱) و گوان و همکاران (۲۰۱۲) وجود دارد که در آن‌ها انتقال و بیان ژن *HBsAg* در

سلول‌های گیاه جینسنگ، موز، گوجه فرنگی، یونجه و گوجه-فرنگی مینیاتوری تأیید شده است (Hai-peng *et al*. 2009; Shereen *et al*. 2009; Li *et al*. 2011; Choi *et al*. 2011; Guan *et al*. 2012). علاوه بر این در گزارشی از های‌پنگ و همکاران (۲۰۰۹) و ریشتر و همکاران (۲۰۰۰)، HBsAg مشتق شده از گیاه جینسنگ و سیب زمینی تراریخته به طور موفقیت‌آمیزی در موش پاسخ ایمنی ایجاد کرد (Hai-peng *et al*. 2009; Richter *et al*. 2000). در گزارشی از کاپوستا و همکاران نیز پس از بیان این ژن در کاهو و لوپین و تغذیه موش از کالوس‌های تراریخته، آنتی‌بادی خاصی در آن‌ها حاصل گردید (Kapusta *et al*. 1999). اما آنچه حایز اهمیت است بیان متغیر ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته در شرایط محیطی متفاوت می‌باشد. بنابراین میزان تولید پروتئین فوق و درنتیجه پاسخ ایمنی پس از مصرف گیاهان تراریخته در موش و انسان، متفاوت است.

استفاده از سیستم گیاهی به‌عنوان بیوراکتورهای طبیعی، راه حل مناسبی برای تولید در مقیاس زیاد پروتئین HBsAg و تولید واکسن خوراکی می‌باشد. این پروژه با هدف گسترش زراعت مولکولی واکسن هپاتیت B (HBsAg) در گیاه توتون انجام پذیرفت. توتون گیاهی غیرعلوفه‌ای بوده و در مقایسه با گیاهان دیگر کشت بافت و باززایی آن راحت‌تر، انتقال ژن به آن ساده‌تر و نسبت به دستورزی ژنتیکی دارای انعطاف‌پذیری نسبی می‌باشد. با تکثیر توتون تراریخته در مدت زمان کوتاهی می‌توان محصول پروتئین نوترکیب موردنظر را در سطح وسیع و به طور بهینه و ارزان تولید و وارد بازار کرد (Daniell 2003). از این رو در مطالعه حاضر از گیاه توتون و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 استفاده شد تا بر بیان ژن *HBsAg* افزوده شود. این ناقل دارای پیشبر CaMV 35S و ترمیناتور NOS می‌باشد. پیشبر CaMV 35S در گیاهان دو لپه انتخابی مناسب، قوی و سازنده بوده و باعث افزایش بیان ژن انتقال یافته در بخش‌های مختلف گیاه می‌شود به طوری که استفاده از این پیشبر در توتون می‌تواند میزان بیان را در مقایسه با پیشبرهای دیگر چندین برابر افزایش دهد (Sunil Kumar *et al*. 2003). همچنین از توالی کوزاک (Kozak sequence) جهت افزایش بیان ژن (Rajabi Memari *et al*. 2010)، از توالی His tag جهت سهولت شناسایی و تخلیص پروتئین موردنظر از سایر پروتئین‌ها در پژوهش‌های آتی و از فاکتور هگزا (X) به منظور حذف توالی His tag بعد از تخلیص پروتئین، استفاده شد (Leelavathi and Reddy 2003).

در این مطالعه ریزنمونه‌های برگی توتون به طور موفقیت‌آمیزی توسط ناقل گیاهی بیانی pCAMBIA1304 و با واسطه‌گری اگروباکتریوم تراریخته شدند. حضور ژن *HBsAg* و بیان آن در گیاهان تراریخته نیز توسط بررسی‌های مولکولی PCR و RT-PCR تأیید شد. در گزارشاتی از گوان و همکاران، شرین و همکاران، باغثی و همکاران، لی و همکاران و سرینیواس و همکاران نیز حضور ژن *HBsAg* به ترتیب در گیاهان تراریخته گیلاس، موز و گوجه فرنگی با انجام واکنش PCR تأیید شده است (Guan *et al*. 2012; Li *et al*. 2011; Srinivas *et al*. 2008; Baesi *et al*. 2011; Shereen *et al*. 2011). سرینیواس و همکاران نیز بیان این ژن را در گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی با RT–PCR تأیید کردند (Srinivas *et al*. 2008). اما براساس نتایج این پژوهش استفاده از ناقل فوق به‌تنهایی برای افزایش بیان ژن *HBsAg* و تولید پروتئین به‌عنوان واکسن خوراکی کافی نبوده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد در مطالعات آینده باید از توالی‌های افزایش‌دهنده در ناقل ژن موردنظر برای افزایش بیان و در نتیجه تولید انبوه پروتئین HBsAg استفاده کرد.

منابع

Ahangarzadeh Sh, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied Kh. 2012. Cloning, Transformation and Expression of Human Interferon α2b Gene in Tobacco Plant *(Nicotianatabacum cv. xanthi)*. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products **7**:111-116.

Baesi M, NabatiAhmadi D, Rajabi-Memari H, Siahpoosh MR, Abdollahi MR, Jaberolansar N. 2011. Cloning and Transformation of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Gene to Tomato *(Lycopersiconesculentum* Mill*.)*. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 6:32-41.

Choi JW, Park HS. 2011. Development of Transient Gene Expression System using Seedlings. Journal of Agricultural Science 45:193-199.

Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 371-376.

Giddings G. 2001. Transgenic plants as protein factories. Current Opinion in Biotechnology 12: 450–454.

Guan ZJ, Guo B, Hao HY, Huo YL, Dai JK, Wei YH. 2012. Expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene in transgenic cherry tomato. African Journal of Biotechnology 11:7186-7192.

Hai-peng YU, Yan XUE, Wei AN, Dan LIU, Shu-mei HAO, Jun SH. 2009. Expression of Hepatitis B Surface Antigen Gene in Ginseng Cells. Chemical Research in Chinese Universities 25: 695-698.

Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich WH, Neumann KH. 2002. The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. Plant Cell Tissue And Organ Culture 71:157–164.

Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M. 1999. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus.The Faseb Journal 13:1796-1799.

Leelavathi S, Reddy VS. 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.

Li T, Sun JK, Lu ZH, Liu Q. 2011. Transformation of *HBsAg* (Hepatitis B Surface Antigen) Gene into Tomato Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 47: 69–77.

Lopez A, Rosabal Y, Hernandez A, Gonzalez B, Rios J, Perez M, Clark Y, Boffill R, Fuentez A, Rodriguez L, Penton E, Falcon V, Menendez I, Rosa MCDL, Enriquez G. 2008. Expression of the Hepatitis A virus empty capsids in suspension cells and transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Biotechnologia Aplicada 25:42-46.

Marcondes J, Hasen E. 2008. Transgenic lettuce carrying hepatitice B virus antigen HBsAg. Brazilian Journal of Infectious Diseases 12:469-471.

Mason SH, Lam DMK, Arntzen CJ. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. The Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 89:11745-11749.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 5:473-479.

Murray MG, Thampson WF. 1998. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.

Rajabi- Memari H, Ramanan RN, Ariff AB. 2010. Comparison of expression systems for the production of human interferon-α2b. Central European Journal of Biology 5:446-55.

Ram-Maya M, Gershwin E, Shoenfeld Y. 2008. Hepatitis B Virus (HBV) and Autoimmune Disease. Clinical Reviews in Allergy and Immunology 34:85–102.

Richter L, **Thanavala JY, Arntzen CJ, Mason HS. 2000.** Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotechnology 18:1167-1171.

Rizzetto M, Ciancio A. 2008. Chronic HBV-related liver disease. Molecular Aspects of Medicine 29:72–84.

Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual.3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.1448.

Shereen FE, Roba MI, Bahieldin A, Sadik AS, Madkour MA. 2009. Expression of Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) gene in transgenic banana (*Musa* Sp.). Arab Journal of Biotechnology 12:291-302.

Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, Melnikov VA, Bykov VA. 2004. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. Biochemical 69:1158–1164.

Srinivas L, Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathia CJ, Bapat VA. 2008. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Biotechnology Reports 2:1-6.

Sunil P, Sanjay Y, Vinod S. 2012. Pharmacognostical investigation and standardization of *capsicum annum* L. Roots. International Jurnal of Pharmacogn Phytochem 4:21-24.

Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KSN, Bapa VA. 2003. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. Science direct, Protein Expression and Purification 32:10-17.

Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. Planta 222:484 -493.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol5, Number1, Spring and summer 2016, Bi-seasonal

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

Majedeh Neisi[1], Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei[2*], Cyrus Ghobadi[3], Hamid Rajabi Memari[4], Ghazaleh Khaksar[5]

[1] MSc in Biotechnology, [2] Prof, Department of Biotechnology, [3] Assistance Prof, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

[4] Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

[5] Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

*Corresponding Author, Email: sayedt@cc.iut.ac.ir

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most widespread viral infections of humans. An effective way to treat and prevent the disease is vaccination. Since production of conventional HBV vaccines is very expensive, use of transgenic plants as an alternative bioreactor has recently become of interest to many researchers. In this study, the *HBsAg* gene has been transferred to pepper plants (*Nicotiana tabacum*) through the leaf disk technique. The recombinant plant expression vector, pCAMBIA containing *HBsAg* was cloned into *E. coli* strain JM107 and was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Young tobacco leaves were used as explants and co-cultivated with *A. tumefaciens*. The transformants were regenerated on selection medium containing 1$mg.l^{-1}$ BAP, 0/1$mg.l^{-1}$ NAA, 500 $mg.l^{-1}$ cephotaxim and 15 $mg.l^{-1}$ hygromycin. After the growth of plantlets (about 15 cm), genomic DNA was extracted from putatively regenerated plants by the CTAB method. The presence of *HBsAg* gene in transgenic plants was detected using PCR analysis. Finally expression of *HBsAg* gene was tested via RT-PCR analysis.

Key Words

Agrobacterium, Edible Vaccine, Gene Transformation, *HBsAg* Gene, Transgenic Tobacco