زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره نوزدهم، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۹۷-۱۱۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۰۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۰/۲۸

ساخت ناقل بیانی pGCGi حاوی ژن GUS اینترون‌دار و تأیید آن با روش‌های ریزپرتابی و تزریق اگروباکتریوم

فرهاد شکوهی‌فر [۱]، مصطفی مطلبی [۲] و محمدرضا زمانی [۲]*
[۱] پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

بیان موقت یک روش سریع و آسان در آنالیز بیان پروموتر است. این روش تحت تأثیر موقعیت ورود تراژن در ژنوم واقع نمی‌شود، زیرا این نکته می‌تواند بیان تراژن را در روش انتقال دایمی تحت تأثیر قرار دهد. بیان موقت از راه‌های مختلف نظیر: اگروانفیلتراسیون، ریزپرتابی و وکتورهای ویروسی قابل انجام است. بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم کارآیی بالا و قابل قبول در آنالیز بیان تراژن، خاموشی ژن، برهمکنش پاتوژن-میزبان، پروتئین-پروتئین‌ها، توالی‌های تنظیمی-عوامل نسخه‌برداری استفاده شده است. به منظور آنالیز عناصر تنظیمی یک وکتور حامل، یک ژن گزارشگر تحت کنترل یک پروموتر رایج مورد نیاز است تا برای استاندارد نمودن سطح بیان مورد استفاده قرار گیرد. پژوهش حاضر، با هدف ساخت یک وکتور شاهد بر اساس توالی دو وکتور والدی به نام‌های pGPTV و pCAMBIA3301 طراحی و انجام شده است. وکتور ساخته شده به نام pGCGi دارای یک ژن گزارشگر GUS اینترون‌دار است که تحت کنترل پروموتر CaMV 35S قرار گرفته است. سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در سلول‌های اگروباکتریوم عدم بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر را تأیید نمود. آنالیز عملکرد وکتور pGCGi با استفاده از روش تزریق اگروباکتریوم و ریزپرتابی در برگ توتون و بافت اپیدرم پیاز انجام شد. نتایج سنجش هیستوشیمیایی GUS نشان داد که وکتور pGCGi قادر است ژن گزارشگر را در سلول های گیاهی بیان نماید و می‌توان از آن به عنوان شاهد در آزمایش‌های بیان موقت استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: وکتورهای جفتی، بیان ژن موقت، تزریق اگروباکتریوم، روش ریزپرتابی، سنجش فعالیت GUS

مقدمه

در اختیار بودن سازه مناسب جهت بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن دایمی و موقت ضروری است. در تکنیک‌های بیان موقت (transient expression analysis) یک تراژن پس از انتقال به درون سلول های گیاه و انتقال به درون هسته برای مدت زمان کوتاهی درون سلول های

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zamani@nigeb.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۶۳

گیاه بیان می‌شود. در این روش‌ها ضمیمه شدن تراژن درون ژنوم برای بیان آن ضروری نیست و توارث نیز نخواهد یافت. روش بیان موقت در جهت رفع مشکلات مربوط به تراریختی گیاهان و انتقال مجموعه پروموتر::ژن گزارشگر به گیاه در پژوهش‌های متعدد مورد توجه قرار گرفت (Yang *et al*., 2000؛ Kapila *et al*., 1997؛ Wroblewski *et al*., 2005). در روش بیان موقت، توالی ژن هدف تحت کنترل توالی تنظیمی مناسب با روش‌های مختلفی وارد سلول می‌شود و بدون این که ضرورتاً در ژنوم سلول وارد شود امکان نسخه‌برداری و بیان ژن هدف را مهیا می نماید. در صورتی که بخواهیم در این روش یک توالی تنظیمی را مورد بررسی قرار دهیم، با قرار دادن آن در بالادست توالی ژن گزارشگر اینترون دار می توانیم سازه را به درون سلول منتقل نموده، بر اساس میزان بیان ژن گزارشگر فعالیت توالی تنظیمی را در سلول‌های مورد نظر مقایسه نماییم. از مزایای این روش ساده بودن و صرفه‌جویی در زمان است و از معایب آن می توان به بودن بیان و عدم انتقال دایم سازه به نسل‌های بعدی اشاره کرد (Liu *et al*., 2011). جالب توجه است که این معایب خود می‌تواند از نظر زیست محیطی یک مزیت به شمار آید.

بیان موقت یک تراژن در سلول‌های هدف با روش‌های مختلف قابل انجام است. به طور کلی در این تکنیک‌ها دو روش برای انتقال تراژن به سلول گیاه استفاده شده است. در گروه اول از روش‌های فیزیکی مانند ذرات بسیار ریز طلا یا تنگستن (Helenius *et al*., 2000؛ Nehlin *et al*., 2000؛ Higo *et al*., 2005) یا ترکیب شیمیایی مانند پلی اتیلن گلایکول (PEG) استفاده می‌شود (Gandhi *et al*., 1999؛ Kirsch *et al*., 2001؛ Heise *et al*., 2002؛ Baur *et al*., 2005؛ Nugent *et al*., 2006)، در حالی که در گروه دوم معمولاً سلول‌های اگروباکتریوم به کار گرفته می‌شوند (Van der Hoorn *et al*., 2000؛ Yang *et al*., 2000؛ Wroblewski *et al*., 2005). در بعضی از موارد، از وکتورهای ویروسی نیز می‌توان برای بیان موقت تراژن نیز استفاده کرد (Hoffmeisterova *et al*., 2008).

در روش هایی نظیر الکتروپوریشن و ریزپرتابی به دلیل ماهیت فیزیکی امکان استفاده از آنها در گونه های مختلف گیاهی وجود دارد و فراوانی تراریختی در آنها بالا است. هر چند پژوهشگران در ایران نیز از این روش‌ها برای انتقال ژن به صورت دایمی و موقت استفاده نموده‌اند (Goleyjani Moghaddaam *et al*., 2012؛ Taghavian *et al*., 2014)، اما به علت معایبی همچون هزینه بالا و ضرورت در اختیار بودن امکانات لازم انجام آن به آزمایشگاه‌های مجهز محدود می‌شود. از سوی دیگر، به دلیل متغیر بودن تعداد نسخه انتقال‌یافته از ژن مورد نظر به درون سلول های هدف و ناهمگن بودن این تعداد بین سلول‌های مختلف این روش‌ها در عمل با محدودیت‌هایی مواجه هستند (Yang *et al*., 2000).

در مطالعات آنالیز پروموتر، در اختیار بودن وکتور حامل توالی پروموتر کامل با بیان دایمی مانند پروموتر CaMV 35S به عنوان شاهد مثبت امکان مقایسه سطح بیان پروموترها را با یک نمونه شاهد ممکن می‌سازد. همچنین، به منظور بررسی اثر توالی تنظیمی، استفاده از وکتوری با اجزای کاملاً مشابه با وکتور مورد بررسی

بسیار مورد توجه است. همچنین، استفاده از ژن گزارشگر واجد اینترون امکان متمایز نمودن بیان یوکاریوتی و پروکاریوتی را فراهم می‌نماید و از مداخله بیان باکتریایی در نتایج به دست آمده جلوگیری می‌نماید.

یکی از وکتورهای مناسب برای استفاده در مطالعات آنالیز توالی پروموتر وکتور pGPTV (Sprenger-Haussels and Weisshaar, 2001) است. این سازه با داشتن توالی T-DNA با آرایش مناسب به نحوی ساخته شده است که ژن گزارشگر تحت کنترل یک توالی حداقل پروموتر واجد جایگاه‌های آنزیمی همسانه‌سازی قرار دارد. این مجموعه در بالادست توالی مرز راست قرار گرفته است. در بالادست این مجموعه نیز ژن غربالگری مقاومت به کانامایسین در جهت معکوس به صورتی قرار گرفته است که با توجه به انتقال T-DNA از جهت مرز راست، انتظار می‌رود در گیاهان تراریخت غربال‌شده روی محیط حاوی کانامایسین، توالی در برگیرنده مجموعه ژن گزارشگر::توالی تنظیمی نیز انتقال یافته باشد. لذا، گیاهان گزینش شده روی محیط حاوی کانامایسین به احتمال زیاد ژن هدف را نیز دریافت نموده‌اند. با توجه به ویژگی‌های مثبت متعدد با این وجود، این وکتور به دلیل استفاده از ژن گزارشگر GUS فاقد اینترون جهت استفاده در مطالعات آنالیز بیان موقت مفید نیست. در صورت استفاده از این وکتور سلول‌های اگروباکتریوم قادرند ژن GUS را بیان نمایند، لذا، بیان باکتریایی ژن GUS از بیان ناشی از انتقال T-DNA به سلول گیاهی قابل تمایز نیست. از آنجا که متمایز نمودن منشأ بیان ژن در آنالیز بیان و به ویژه تعیین عملکرد توالی‌های تنظیمی حایز اهمیت است، لذا ساخت وکتوری مشابه که دارای ژن گزارشگر واجد اینترون باشد در مطالعات آنالیز بیان پروموتر کارآیی خواهد داشت. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف ساخت وکتور حامل توالی ژن GUS اینترون‌دار و قرار دادن آن تحت کنترل پروموتر کامل CaMV 35S انجام شد. عملکرد وکتور ساخته شده با روش ریزپرتابی و تزریق اگروباکتریوم (اگرواینجکشن) مورد تأیید قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتریایی و وکتورها: واریته زانتی توتون (*Nicotiana tabacum* L. var Xanthi) و فلس‌های پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) (تجاری تهیه شده از فروشگاه) برای آنالیز بیان موقت استفاده شد. در پژوهش حاضر، از سویه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک استفاده شد. وکتورهای pBI121 (Chen *et al*., 2003)، pCAMBIA3301 (CAMBIA, Australia) و pGPTV (Sprenger- Haussels and Weisshaar, 2001) برای ساخت وکتور جدید مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت وکتور pGC: به منظور شبیه‌سازی مراحل ساخت وکتور pGCGi، از نرم‌افزار Vector NTi, V11 استفاده شد. مراحل ساخت به طور شماتیک در شکل ۱ نمایش داده شده است. در ساخت وکتور pGCGi از وکتورهای والدی pGPTV و pCAMBIA3301 استفاده شد. قطعه در برگیرنده توالی پروموتر کامل

CaMV 35S و بخش ابتدایی ژن GUS که حامل اینترون است با استفاده از آنزیم‌های *Hind*III/*Bst*BI از وکتور pCAMBIA3301 جداسازی شد. واکنش هضم مضاعف وکتور pCAMBIA3301 با محتوای ۱ میکروگرم وکتور، ۱ واحد آنزیم *Hind*III، ۱ واحد آنزیم *Bst*BI، ۲ میکرولیتر از بافر Tango 10X (Thermo Fisher Scientific Inc) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. همچنین، وکتور pGPTV نیز در شرایط مشابهی هضم شد تا قطعه در برگیرنده توالی پایه وکتور جفتی به استثنای توالی پروموتر حداقل و قطعه ابتدایی ژن GUS از آن خارج گردد. محصول واکنش هضم هر دو وکتور در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و به ترتیب باندهایی با اندازه‌های ۱۲۲۱ و ۹۲۴۸ جفت باز از واکنش هضم وکتور pCAMBIA3301 و وکتور pGPTV جداسازی شد. قطعات جداسازی شده با استفاده از کیت خالص‌سازی از ژل (*AccuPrep* Gel Purification Kit, Bioneer, Korea) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شدند. به منظور تعیین غلظت، قطعات خالص شده الکتروفورز شدند و پس از تخمین غلظت مقادیر مورد نیاز از هر قطعه جهت تهیه واکنش اتصال با استفاده از برنامه تحت شبکه (Krauss and Eggert, ligation calculator 2014) محاسبه شد. واکنش اتصال شامل ۱۵ نانوگرم از قطعه '5-*Hind*III:::*Bst*BI-3'، ۵۰ نانوگرم از قطعه '5- *Bst*BI::: *Hind*III -3'، ۱ واحد آنزیم T4 لیگاز (Thermo Fisher Scientific Inc) و ۲ میکرولیتر از بافر T4 ۱۰ برابر غلظت (Thermo Fisher Scientific Inc) در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد نگهداری شد. مرحله تراریختی سلول‌های DH5α با اضافه نمودن ۲ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به تیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد و بر اساس روش شوک حرارتی (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. سلول‌های ترانسفورم شده جهت انتخاب کلونی‌های نوترکیب روی محیط LB (۱۰ گرم بر لیتر Bacto-tryptone، ۵گرم بر لیتر Bacto-yeast extract، ۱۰ گرم بر لیتر NaCl و ۱۵ گرم بر لیتر آگار (Microbiology Agar, Sigma) حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین پخش شدند.

تأیید مولکولی کلونی‌های نوترکیب:

کلونی‌های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلونی PCR (Sambrook and Russell, 2001) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh4-F با توالی 5'- TCC TTT AGC AGC CCT TGC GC -3' و پرایمر PSh4-R با توالی 5'- CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC A -3' (Shokouhifar *et al*., 2013) تأیید شدند. محتویات واکنش شامل ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت پارس توس)، ۱ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲۰۰ میکرومولار از مخلوط dNTPs (Genet Bio. Co, South Korea)، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۵ پیکومول از جفت پرایمر PSh4-F/R در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و با استفاده از نوک سمپلر استریل هر یک از کلونی‌های انتخاب شده به عنوان الگو در واکنش اضافه و به صورت موازی روی محیط LB حاوی کانامایسین کشت شدند. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Personal

Thermocycler, MWG Co. Germany) با ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد (واسرشته‌سازی اولیه) و ۳۵ چرخه با برنامه ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد (واسرشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتیگراد (دمای اتصال)، یک دقیقه در ۶۸ درجه سانتیگراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمراز بر اساس توصیه شرکت پارس توس) و در نهایت، ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد (بسط نهایی) انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۱ هزارم غلظت از رنگ green viewer (شرکت پارس توس) رنگ‌آمیزی شد. تصویر ژل‌ها با استفاده از دستگاه Geldoc تهیه شد.

به منظور تأیید مجدد استخراج پلاسمید از کلونی‌های گزینش شده با استفاده از کیت (AccuPrep®Plasmid Extraction, Bioneers Co., South Korea) و بر اساس دستور شرکت سازنده انجام شد و الگوی الکتروفورزی آنها با الگوی الکتروفورزی وکتور pGPTV با استفاده از جفت پرایمرهای PSh4-F/R و PSh4-F/3R (Shokouhifar *et al.*, 2013) در شرایط مشابه با واکنش کلونی PCR بررسی شد.

ارزیابی بیان سازه pGCGi در سلول اگروباکتریوم: تهیه سلول مستعد از سویه LBA4404 اگروباکتریوم و انتقال وکتور pGCGi به آن با استفاده از روش انجماد آنی انجام شد (Hofgen and Willmitzer, 1988). همچنین، وکتورهای pGPTV، pBI121 و pCAMBIA3301 به عنوان شاهد به سلول‌های اگروباکتریوم منتقل شد تا بیان ژن GUS فاقد و واجد اینترون در سلول اگروباکتریوم مورد مقایسه قرار گیرد. سلول‌های تراریخت شده با استفاده از تکنیک کلونی PCR و با استفاده از پرایمرهای PSh3-F/R (Shokouhifar *et al.*, 2013) تأیید شد. ۱ میلی‌لیتر از کشت مایع کلونی‌های حاوی وکتورهای pGC، pGPTV، pBI121 و pCAMBIA3301 با نیروی ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Sigma, Germany) شد و پس از حذف محیط کشت جهت سنجش فعالیت آنزیم GUS به کار گرفته شد.

بیان موقت با استفاده از روش تزریق اگروباکترویوم: برای انتقال موقت سازه‌ها به نمونه‌های مورد آزمایش از روش تزریق اگروباکترویوم استفاده شد (Yang *et al.*, 2000). بدین منظور سلول‌های اگروباکتریوم حاوی وکتور pGCGi در ۱۰ میلی‌لیتر از محیط LB حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ریفآمپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و با نیروی ۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت در ۲۰ میلی‌لیتر محیط القا (۱ گرم بر لیتر NH_4Cl، ۰/۳ گرم بر لیتر $MgSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۱۵ گرم بر لیتر KCl، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $CaCl_2$، ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر $FeSO_4$-$7H_2O$، ۲ میلی‌مولار بافر فسفات، ۲۰ میلی‌مولار MES، ۱ درصد سوکروز با اسیدیته ۵/۵) معلق شدند و جهت القا به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد تیمار شدند. سلول‌ها با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شدند و سپس در محلول تزریق (۱۰ میلی‌مولار $MgSO_4$ و ۱۰ میلی‌مولار MES با

اسیدیته ۵/۵) تا غلظت OD600=۰/۸ رقیق شدند. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری درون فضای میان سلولی برگ‌های سالم و متصل به گیاه با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۱ میلی‌لیتری تزریق شد. گیاهچه‌ها پس از تزریق به وسیله پوشش‌های پلاستیکی پوشانده و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت پوشش‌های پلاستیکی حذف گردید و برگ‌های تزریق شده بعد از سه روز جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن GUS استفاده شدند.

آنالیز بیان وکتور pGCGi با استفاده از روش ریزپرتابی: سازه pGCGi روی ذرات طلا پوشش داده شد. در این مطالعه، از دستگاه Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad, USA). بدین منظور ذرات طلا به قطر ۰/۵ میکرومتر به وسیله پلاسمید مربوط به سازه pGCGi آغشته شدند. در این روش، حدود ۱۰ میکروگرم پلاسمید روی ۵ میلی‌گرم ذرات طلا پوشش داده شد و به ده قسمت برای ده شلیک تقسیم شدند. فشار گاز روی ۳۰۰ PSI و از دیسک مناسب استفاده شد. عمل شلیک در فاصله ۶ سانتی‌متر روی فلس‌های پیاز انجام شد. پس از بمباران نمونه‌ها درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم بسته شد و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، بشره فلس‌های پیاز جداسازی و بیان ژن گزارشگر GUS با روش سنجش هیستوشیمیایی آنزیم بتاگلوکورونیداز (Jefferson *et al*., 1987؛ Cervera, 2004) بررسی شد.

سنجش هیستوشیمیایی فعالیت آنزیمی GUS: دیسک‌های برگی به قطر ۱ سانتی‌متر ۴۸ ساعت پس از آلودگی از محل تزریق و شلیک تهیه شد و برای سنجش هیستوشیمیایی، فعالیت GUS مورد بررسی قرار گرفت (Jefferson *et al*., 1987؛ Cervera, 2004). پس از طی مراحل رنگ‌آمیزی از نمونه‌ها تصویربرداری شد.

نتایج و بحث

با توجه به ویژگی‌های لازم برای آنالیز پروموتر، ناقل pGPTV به عنوان یک ناقل مطلوب در بیان موقت (که انجام آن مستلزم زمان کمتری است) مورد استفاده قرار می‌گیرد. ناقل pGPTV (Sprenger-Haussels and Weisshaar, 2001) به دلیل دارا بودن توالی حداقل پروموتری و جایگاه‌های آنزیمی مناسب جهت همسانه سازی توالی‌های تنظیمی در آنالیز پروموترهای مصنوعی مورد استفاده قرار گرفته است (Kirsch *et al*., 2001؛ Heise *et al*., 2002؛ Rushton *et al*., 2002؛ Mazarei *et al*., 2008؛ Shokouhifar *et al*., 2011؛ Shokouhifar *et al*., 2013). در تعدادی از این مطالعات، ناقل pGPTV با انتقال دایمی مبتنی بر اگروباکتریوم به گیاه هدف انتقال یافته و گیاه ترایخت حاصل جهت آنالیز پروموتر به کار گرفته شده است (Mazarei *et al*., 2008؛ Shokouhifar *et al*., 2011؛ Shokouhifar *et al*., 2013). در برخی دیگر از پژوهش‌ها، از انتقال ناقل با روش مبتنی بر PEG به سوسپانسیون سلولی گیاه اسفناج جهت آنالیز پروموتر استفاده شده است (Kirsch *et al*., 2001؛ Heise *et al*., 2002؛ Rushton *et al*., 2002). مزایای متعدد آنالیز بیان موقت از روش تزریق آگروباکتریوم از جمله زمان و امکانات اندک مورد نیاز جهت انجام آن سبب شده

است تا استفاده از این روش در آنالیز توالی های تنظیمی نیز مورد توجه قرار گیرد (Yang *et al*., 2000؛ Zahur *et al*., 2009؛ Dalal *et al*., 2010). هرچند ناقل pGPTV را می‌توان برای آنالیز پروموتر در سیستم بیان موقت مبتنی بر اگروباکتریوم مورد استفاده قرار داد، اما از آنجا که این ناقل، حاوی ژن گزارشگر فاقد اینترون است، بیان آن در آگروباکتریوم نیز امکان‌پذیر است، لذا اینترون دار کردن این ژن گزارشگر برای جلوگیری از بیان پروکاریوتی آن ضروری به نظر می‌رسد.

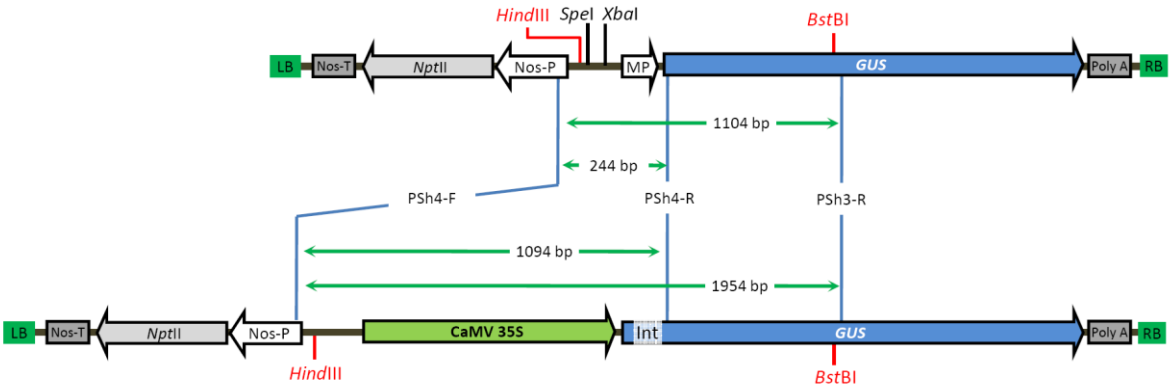
ساخت ناقل pGCGi و تأیید مولکولی آن: در پژوهش حاضر، به منظور ساخت سازه حاوی ژن GUS اینترون‌دار تحت کنترل پروموتر کامل CaMV 35S، از ناقل‌های pCAMBIA3301 (CAMBIA, Australia) و pGPTV (Sprenger-Haussels and Weisshaar, 2001) استفاده شد. ناقل pCAMBIA3301 به عنوان دهنده توالی ژن GUS حامل اینترون و همچنین توالی پروموتر کامل CaMV 35S و ناقل pPGPTV به عنوان توالی پایه در این مطالعه به کار گرفته شد.

بدین منظور قطعه ابتدای ژن GUS اینترون‌دار از ناقل pCAMBIA3301 با قطعه معادل آن در ناقل pGPTV (قطعه فاقد اینترون) جایگزین می‌شود. هم‌ردیفی توالی منطقه T-DNA ناقل‌های pCAMBIA3301 و pGPTV نشان داد که منطقه کاملاً یکسانی در ابتدای ژن GUS وجود دارد. با مقایسه جایگاه‌های آنزیمی موجود در این محدوده، آنزیم *Bst*BI که دارای جایگاه در پایین دست منطقه اینترونی ژن GUS در ناقل pCAMBIA3301 است و آنزیم *Hind*III در بالادست پروموتر CaMV 35S، انتخاب شدند (شکل ۱). استفاده از نرم‌افزار Vector NTi نشان داد که همسانه‌سازی قطعات جایگزین شده در دو ناقل با حفظ چهارچوب خواندن (ORF) ژن GUS امکان‌پذیر است.

قطعه جداشده از ناقل pCAMBIA3301 (با آنزیم‌های *Bst*BI و *Hind*III) با طول ۱۲۲۱ نوکلیوتید که علاوه بر توالی پروموتر CaMV 35S، بخشی از ژن GUS را که واجد اینترون است نیز در بر می‌گیرد با قطعه معادل آن در ناقل pGPTV جایگزین شد. ناقل جدید سنتز شده به نام pGCGi نام‌گذاری گردید و اطلاعات آن در بانک ژن به شماره KF240818 به ثبت رسیده است.

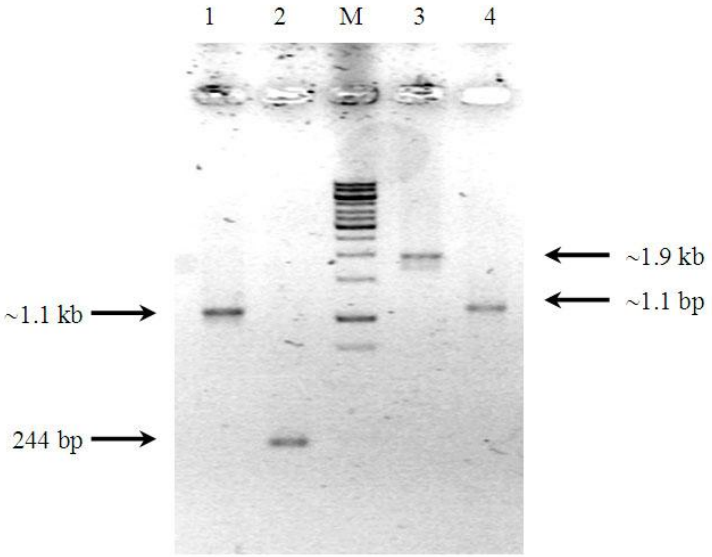
تأیید همسانه‌سازی ناقل pGCGi بر اساس الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. آغازگر سنس به نام PSh4F در بالادست جایگاه *Hind*III و یک آغازگر آنتی سنس به نام PSh4R در ابتدای ژن GUS و دیگری به نام PSh3R در پایین دست جایگاه آنزیم *Bst*BI مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

با استفاده از دو آغازگر PSh4F/4R با تکثیر باندهایی به اندازه‌های ۱۰۹۴ و ۲۴۴ جفت باز به ترتیب دو ناقل pGCGi و pGPTV از یکدیگر قابل تمایز هستند (شکل ۲). همچنین، به وسیله جفت آغازگر PSh4F/3R باندهایی با اندازه های ۱۹۵۴ و ۱۱۰۴ جفت باز به ترتیب از ناقل‌های pGCGi و pGPTV تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۱- نمای شماتیک منطقه T-DNA در ناقل pGPTV و سازه جدید pGC، نشان‌دهنده محل اتصال پرایمرها و اندازه قطعات متمایز کننده.

LB: left border, NOS-ter: nopaline synthase terminator, NptII: neomycin phosphotransferase, NOS-pro: nopaline synthase promoter, CaMV 35S: cauliflower mosaic virus (*CaMV*) *35S promoter*, MP: minimal promoter (the sequence -46 to +8 from CaMV 35S promoter), GUS: *β-glucuronidase gene containing an intron*, NOS-ter: nopaline synthase terminator, int: intron, RB: right border, PSh4-F/R and PSh3-R: specific primers.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی حاصل از تکنیک کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای PSh4F/4R و PSh4F/3R. 1 و 3: مربوط به کلونی حاوی ناقل جدید pGCGi به ترتیب مربوط به پرایمرهای PSh4F/4R و PSh4F/3R، 2 و 4: مربوط به ناقل pGPTV به عنوان شاهد به ترتیب مربوط به پرایمرهای PSh4F/4R و PSh4F/3R، M: نشانگر وزنی DNA.

بررسی عدم بیان پروکاریوتی GUS اینترون‌دار ناقل pGCGi: ناقل pGCGi به دلیل دارا بودن توالی GUS اینترون‌دار در سیستم پروکاریوتی قادر به تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز نخواهد بود. بنابراین، انتظار می‌رود در کلونی‌های اگروباکتریوم ترانسفورم شده با ناقل pGCGi به دلیل عدم پیرایش RNA و حذف اینترون و عدم ترجمه آن، واکنش آنزیمی تبدیل شدن پیش‌ماده بتاگلوکرونید و تولید رنگ آبی انجام نگیرد. بدین منظور، ناقل pGCGi به سویه LBA4404 آگروباکتریوم منتقل شد و

کلونی‌های ترانسفورم شده با استفاده از آغازگرهای PSh4-F/R تأیید شدند. عملکرد کلونی‌های حاوی ناقل pGCGi از نظر قابلیت تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز و انجام واکنش تولید رنگ آبی مقایسه شد. از ناقل‌های pGPTV (دارای GUS فاقد اینترون تحت کنترل توالی حداقل پروموتری)، pCAMBIA301 (دارای GUS اینترون‌دار تحت کنترل پروموتر کامل CaMV 35S) و pBI121 (دارای GUS فاقد اینترون تحت کنترل پروموتر کامل CaMV 35S) به عنوان شاهد استفاده گردید.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی کلونی ها نشان داد فقط واکنش حاوی کلونی‌های حامل ناقل pBI121 رنگ آبی تولید نمود، در حالی که سایر کلونی ها قادر به انجام واکنش نبودند (شکل ۳). ناقل pBI121 به دلیل دارا بودن ژن GUS فاقد اینترون تحت کنترل توالی کامل پروموتر CaMV 35S در سیستم پروکاریوتی قادر به تولید آنزیم بوده است، در حالی که در دیگر ناقل‌ها به دلیل حضور GUS اینترون‌دار (مانند ناقل pCAMBIA3301) یا عدم حضور توالی کامل پروموتر (مانند ناقل pGPTV) امکان تولید آنزیم وجود نداشته است.

Ohta و همکاران (۱۹۹۰) با وارد نمودن اینترون در ژن GUS نشان دادند سلول‌های اگروباکتریوم به دلیل نبود سیستم پردازش RNA قادر به تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز نیستند. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر در خصوص بیان ژن GUS در ناقل‌های pGCGI و pCAMBIA3301 با نتایج آنها مطابقت دارد. از سوی دیگر، نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که ناقل pBI121 حاوی ژن GUS فاقد اینترون تحت کنترل پروموتر CaMV 35S قادر به بیان ژن GUS در سلول آگروباکتریوم است و آنزیم فعال تولید می‌نماید. نتایج مشابهی توسط Ohta و همکاران (۱۹۹۰) و Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) در مورد بیان ژن GUS فاقد اینترون در سلول‌های آگروباکتریوم گزارش شده است.

هر چند در این آزمایش عدم بیان باکتریایی ژن GUS، نتایج قبلی مربوط به همسانه‌سازی انجام شده را تأیید نمود، با وجود این، در این مرحله ضروری است امکان بیان ژن GUS اینترون‌دار در سیستم یوکاریوتی مورد بررسی و تأیید قرار گیرد.

شکل ۳- تأیید عدم بیان باکتریایی GUS در سازه pGCGi به دلیل وارد شدن توالی اینترونی در ژن گزارشگر. رنگ آبی نشان دهنده بیان باکتریایی ژن GUS در نمونه کنترل مثبت (ناقل pBI121) است.

۱: ناقل pGPTV حامل توالی GUS بدون اینترون تحت کنترل توالی حداقل پروموتر،

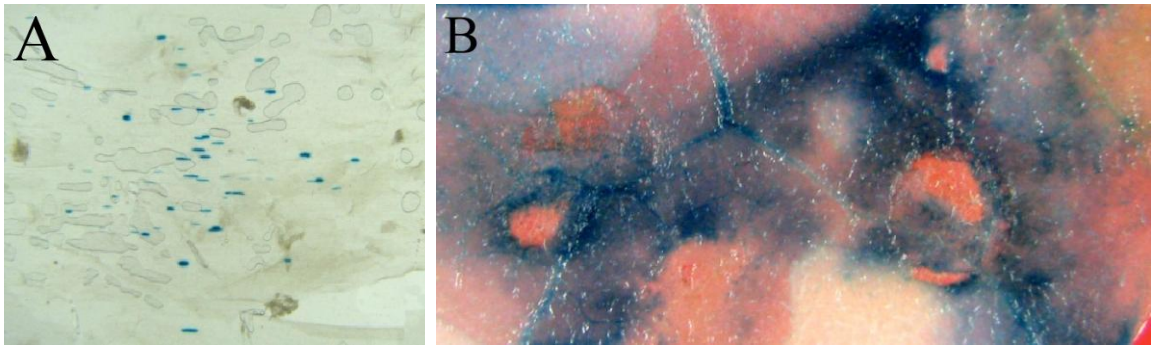
۲: ناقل pCAMBIA3301 حامل توالی GUS اینترون‌دار تحت کنترل توالی کامل پروموتر CaMV 35S،

۳: ناقل pGCGi حامل توالی GUS اینترون‌دار تحت کنترل توالی کامل پروموتر CaMV 35S،

۴: ناقل pBI121 حامل توالی GUS بدون اینترون تحت کنترل توالی کامل پروموتر CaMV 35S.

تأیید بیان یوکاریوتی ژن GUS اینترون دار ناقل pGCGi: قابلیت بیان ژن GUS اینترون‌دار ناقل pGCGi در سیستم یوکاریوتی توسط آزمون بیان موقت با استفاده از روش ریزپرتابی و تزریق اگروباکتریوم بررسی شد. با توجه به حضور پروموتر CaMV 35S انتظار می‌رود ژن GUS به طور دایم در سلول‌های گیاهی بیان شود. ناقل خالص pGCGi با روش ریزپرتابی به بافت بشره فلس پیاز منتقل شد. نتایج سنجش هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز نقاط آبی رنگ را در بافت مورد بررسی نمایان ساخت (شکل ۴-A). به دلیل ماهیت انتقال ژن با روش ریزپرتابی انتظار می‌رود سلول‌ها به صورت پراکنده ناقل را دریافت کرده باشند، به همین دلیل نقاط آبی پراکنده‌ای در نتیجه سنجش نمایان گردد. در بررسی‌های مشابه، قابلیت بیان موقت ژن GUS تحت کنترل پروموتر CaMV 35S در بافت‌های مختلف گیاهی با روش ریزپرتابی تأیید شده است (Helenius *et al.*, 2000؛ Nehlin *et al.*, 2000؛ Higo *et al.*, 2005). نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، ضمن تأیید مراحل ساخت ناقل pGCGi نشان داد که پرموتر CaMV 35S قرار گرفته در بالادست ژن گزارشگر GUS قادر به فعالیت است. از سوی دیگر، ژن GUS با توجه به در یافت توالی اینترونی به خوبی در چارچوب خواندن صحیح کلون شده و در سلول گیاهی پس از انجام مراحل پردازش قادر به تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز است.

در مطالعه دیگر، به منظور اطمینان از تمایز بیان یوکاریوتی و پروکاریوتی ناقل pGCGi از روش تزریق اگروباکتریوم استفاده شد. در این روش، سلول‌های ترانسفورم شده اگروباکتریوم واجد ناقل pGCGi که قادر به انجام واکنش تولید رنگ آبی نبودند با استفاده از سرنگ به بافت برگ گیاه توتون تزریق شدند. سه روز پس از تزریق، دیسک‌های برگی از ناحیه تزریق شده تهیه شد و با سنجش هیستوشیمیایی فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز قابلیت بیان ژن GUS بررسی شد. نتایج نشان داد که لکه‌های آبی رنگی در محل تزریق تشکیل شده است (شکل ۴-B).



شکل ۴- نتایج سنجش هیستوشیمیایی بیان موقت ژن GUS در بافت بشره فلس پیاز (A) و برگ توتون (B) به ترتیب با استفاده از روش‌های ریزپرتابی و تزریق اگروباکتریوم. A) نقاط آبی رنگ نشان‌دهنده سلول‌های بشره پیاز که ژن را پس از شلیک با روش ریزپرتابی دریافت کرده و بیان نموده‌اند، B) هاله آبی رنگ منطقه نفوذ سوسپانسیون اگروباکتریوم حامل سازه pGCGi که توانسته است با انتقال T-DNA به طور موقت ژن GUS حامل اینترون را در بافت برگ توتون بیان نماید. تصویر نشان دهنده صحت عملکرد پروموتر CaMV 35S و و صحیح بودن چهارچوب خواندنی توالی ژن GUS در وکتور جدید pGCGi و سازگار بودن توالی اینترونی وارد شده در آن است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ناقل pGCGi تنها در سلول گیاهی قادر به تولید آنزیم و انجام واکنش بوده است. در مطالعات مشابه، از روش تزریق اگروباکتریوم برای بیان موقت ژن GUS در گیاهان مختلف استفاده شده است (Kapila *et al*., 1997؛ Van der Hoorn *et al*., 2000؛ Yang *et al*., 2000؛ Wroblewski *et al*., 2005). این نتایج تأیید نمود ناقل pGCGi با کارآمدی مناسبی به سلول‌های بافت برگ توتون منتقل شده است و در روش تزریق اگروباکتریوم قابل استفاده است.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که ناقل pGCGi با توجه به قابلیت بیان ژن GUS اینترون‌دار در سلول‌های بافت برگ گیاه و عدم بیان آن در سلول اگروباکتریوم، برای انجام آنالیز پروموتر توسط بیان موقت با روش تزریق اگروباکتریوم و اگرواینفیلتراسیون قابل استفاده است.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به خاطر مساعدت در تأمین منابع مالی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین، از مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به سبب مهیا نمودن امکانات آزمایشگاهی لازم جهت انجام بخشی از آزمایشات قدردانی می‌شود.

منابع

Baur, A., Kaufmann, F., Rolli, H., Weise, A., Luethje, R., Berg, B., Braun, M., Baeumer, W., Kietzmann, M., Reski, R. and Gorr, G. (2005) A fast and flexible peg-mediated transient expression system in plants for high level expression of secreted recombinant proteins. Journal of Biotechnology 119: 332-342.

Cervera, M. (2004) Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. In: Transgenic plants: Methods and protocols (Ed. Pena, I.) 203-213. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong S.C.; To, K.Y. (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding 11: 287-293.

Dalal, M., Chinnusamy, V. and Bansal, K. C. (2010) Isolation and functional characterization of *lycopene beta-cyclase* (*CYC*-B) promoter from *Solanum habrochaites*. Biology and Medicine Central (BMC) Plant Biology 10: 1471-2229.

Gandhi, R., Maheshwari, S. C. and Khurana, P. (1999) Transient gene expression and influence of promoters on foreign gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 35: 232-237.

Goleyjani Moghaddaam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. and Rezanejad, H. (2012) Optimization of regeneration and transformation of canola, Hyola 308 and RGS003 lines. Iranian Journal of Plant Biology 11(4): 47-60 (in Persian).

Heise, A., Lippok, B., Kirsch, C. and Hahlbrock, K. (2002) Two immediate-early pathogen-responsive members of the atcmpg gene family in arabidopsis thaliana and the w-box-containing elicitor-response element of atcmpg1. Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 9049-9054.

Helenius, E., Boije, M., Niklander-Teeri, V., Palva, E. T. and Teeri, T. H. (2000) Gene delivery into

intact plants using the helios tm gene gun. Plant Molecular Biology Reporter 18: 287a-287l.

Higo, H., Tsuruya, K., Mano, H., Hasegawa, K. and Minobe, Y. (2005) New chimeric promoter useful for expression of selectable marker genes in rice transformation. Plant Biotechnology 22: 287-294.

Hoffmeisterova, H., Cerovska, N., Moravec, T., Plchova, H., Folwarczna, J. and Veleminsky, J. (2008) Transient expression of fusion gene coding for the hpv-16 epitopes fused to the sequence of potyvirus coat protein using different means of inoculation of *Nicotiana benthamiana* and *Brassica rapa*, cv. Rapa plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94: 261-267.

Hofgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucleic Acids Research 16: 9877-9877.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The European Molecular Biology Organization Journal 6(13): 3901-3907.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. and Angenon, G. (1997) An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Science 122: 101-108.

Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated cmpg1 gene in petroselinum crispum. The Plant Journal 26: 217-227.

Krauss, U. and Eggert, T. (2014) LIGation.CALCulator. In-silico online bioinformatics resources, Institute for Molecular Enzymetechnology, Research Centre Juelich, Heinrich Heine University Duesseldorf. Retrieved from http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html.

Liu, W., Mazarei, M., Rudis, M., Fethe, M. and Stewart, C. (2011) Rapid *in vivo* analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytosensing. Biology and Medicine Central Biotechnology 11: 108.

Mazarei, M., Teplova, I., Hajimorad, M. R. and Stewart, C. N. (2008) Pathogen phytosensing: Plants to report plant pathogens. Sensors 8: 2628-2641.

Nehlin, L., Mollers, C., Bergman, P. and Glimelius, K. (2000) Transient β-GUS and GFP gene expression and viability analysis of microprojectile bombarded microspores of *Brassica napus* L.. Journal of Plant Physiology 156: 175-183.

Nugent, G. D., Coyne, S., Nguyen, T. T., Kavanagh, T. A. and Dix, P. J. (2006) Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. Botrytis (cauliflower) using peg-mediated uptake of DNA into protoplasts. Plant Science 170: 135-142.

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

Rushton, P. J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B. and Somssich, I. E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. The Plant Cell Online 14: 749-762.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shokouhifar, F., Abbaspour, N. and Ghafariania, N. S. (in press) Construction of pcabgi, a promoterless binary expression vector to analysis regulatory elements in plants. Iranian Journal of Plant Biotechnology (in Persian).

Shokouhifar, F., Zamani, M., Motallebi, M., Mousavi, A. and Malboobi, M. (2011) Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in *brassica napus*. Biologia

Plantarum 55: 689-695.

Sprenger-Haussels, M. and Weisshaar, B. (2001) Transactivation properties of parsley proline-rich bzip transcription factors. The Plant Journal 22: 1-8.

Taghavian, O., Mousavi, A., Hashemi Sohi, H., Jourabchi, E. and Esfahani, K. (2014) Functional assessment of plastid signal peptide sequences lim14 and atcpreca in localization of Green Fluorescent Protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter proteins in transgenic potato plants. Iranian Journal of Plant Biology 17(3): 99-112 (in Persian).

Van der Hoorn, R. A. L., Laurent, F., Roth, R. and De Wit, P. (2000) Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of avr 9/cf-9-induced and avr 4/cf-4-induced necrosis. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 439-446.

Wroblewski, T., Tomczak, A. and Michelmore, R. (2005) Optimization of agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and arabidopsis. Plant Biotechnology Journal 3(2): 259-273.

Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. The Plant Journal 22: 543-551.

Zahur, M., Maqbool, A., Irfan, M., Barozai, M. Y. K., Qaiser, U., Rashid, B., Husnain, T. and Riazuddin, S. (2009) Functional analysis of cotton small heat shock protein promoter region in response to abiotic stresses in tobacco using Agrobacterium-mediated transient assay. Molecular Biology Reports 36: 1915-1921.

Construction of pGCGi, an expression vector carries intron containing GUS and analysis using micro-bombardment and agroinjection

Farhad Shokouhifar [1], Mostafa Motallebi [2] and Mohammad Reza Zamani [2]*

[1] Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Department of Plant Molecular Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Transient gene expression is fast, easy and not influenced by positional effects that potentially affect on gene expression levels in stable gene transformation. Transient expression can be applicable using agroinfilteration, biolistic and viral vectors. *Agrobacterium* mediated transient expression have been shown as an efficient and versatile method for analyzing transgene expression, gene scilencing, host-pathogen interactions, protein-protein interaction, and *cis*-element/*trans*factor interaction. A control vector consists of an interon containing reporter gene under control of a common promoter is often required for Cis-acting elemen analysis to standardize the variation. This study was carried out to construct a control vector based on two parental binary vectors, pGPTV and pCAMBIA3301. The constructed vector, pGCGi had an interon containing GUS reporter gene under control of the full sequence of CaMV 35S promoter. The GUS staining results revealed that the GUS intron containg gene cannot produce an active B- glucronidase enzyme in agrobacterial cells. The functional gene expression analysis of the new vector was done using agroinjection and prticle delivery system in tobacco and onion eoidermal cells respectively. The histochemical GUS staining results showed pGCGi could express the reporter gene in plant cells and culd be used as control vector in transient expression experiments.

Key words: Binary vectors, Transient gene expression, Agroinfiltration, Micro-bombardment, Biolistic gene delivery system, GUS staining

* Corresponding Author: zamani@nigeb.ac.ir