

طراحی و ساخت سازه‌های پلاسمیدی مختص انتقال هدفمند ژن به ژنوم کلروپلاستی Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation

مطهره محسن پور^۱، مسعود توحیدفر^۲ و نادعلی بابائیان جلودار^۳

چکیده

محسن پور، م.، م. توحیدفر و ن. ع. بابائیان جلودار. ۱۳۹۱. طراحی و ساخت سازه‌های پلاسمیدی مختص انتقال هدفمند ژن به ژنوم کلروپلاستی. مجله علوم زراعی ایران. ۲۱۸-۲۲۴(۳):۱۴.

الحاق ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی از طریق نوترکیبی همتا بین توالی‌های مجاور آن ژن در حامل‌های کلروپلاستی، رخداد می‌دهد. از آنجایی که شباهت صد درصدی توالی هدف‌گیری‌کننده کارایی تواریختی پلاستوم را به طور چشمگیری افزایش خواهد داد، یک جفت پرایمر برای جداسازی این ناحیه طوری طراحی گردید که دارای شباهت صد درصدی در تمامی پلاستوم‌های گیاهی باشد، ولی طول و توالی ناحیه تکثیری در ژنوم‌های مختلف متفاوت بود. توالی هدف‌گیری کننده، از پلاستوم‌های توتون، پنبه، ذرت، کاهو، گوجه‌فرنگی، هویج و حتی کلزا و لیموترش که پلاستوم آنها هنوز توالی‌بایی نشده است، جداسازی و کلون‌سازی گردید. حضور و جهت ناحیه جداسده از پلاستوم گیاهان مختلف و صحت کلون‌سازی، توسط آنزیمهای مختلف و از جمله *BamHI* و *HindIII* مورد تایید قرار گرفت. سپس با افزودن نواحی تنظیمی مختلف شامل پیشبرها و پایانبرهای دائمی کلروپلاستی و القابی، نواحی بدون ترجمه یا UTR‌های مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاه‌های آنزیمی مناسب ورود ژن برای بیان انفرادی و یا پلی‌سیسترونی، ژن‌های گزارشگر، ژن‌های نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی و غیرآنتی‌بیوتیکی و توالی‌هایی برای حذف ژن نشانگر پس از انتقال ژن، تلاش شد تا انواع مختلفی از حامل‌های کلروپلاستی ساخته شوند تا بتوان بیان هر ژن خارجی را به طور دلخواه در ژنوم‌های پلاستیدی گیاهان مختلفی به صورت کارآمد امکان‌پذیر نمود که سازه‌های کلروپلاستی pFNG_i, pFNG_j از جمله آنها بود. این پلاسمیدهای نوترکیب می‌توانند به عنوان حامل‌های پلاستیدی عمومی و اختصاصی برای انتقال ژن به کلروپلاست استفاده شوند. در این تحقیق نه تنها برای گیاهان مذکور، بلکه برای هر گونه گیاهی دیگری که توالی پلاستومی آن در دسترس نیست نیز حامل پلاستیدی اختصاصی و دارای کارایی بالا تهیه شد.

واژه‌های کلیدی: پلاستوم، تواریخش و حامل اختصاصی کلروپلاستی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۴

۱- دکتری اصلاح نباتات، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: mthrrhm@yahoo.com)

۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Dufourmantel et al, 2004; Kumar et al, 2004a;)

(kumar et al, 2004b). ناقل هایی که برای تراریزش کلروپلاست استفاده می شوند، دارای توالی های مجاور گرفته شده از توتون یا آرابیدوپسیس هستند که می توانند یکی از دلایل پایین بودن کارایی تراریزش در سایر محصولات باشد. در حالی که ساخت ناقل های اختصاصی هر گونه گیاهی که در آنها از توالی های اختصاصی همان گونه استفاده می شود، به طور چشمگیری کارایی تراریزش پلاستید را افزایش می دهد (Verma and Daniell, 2007) و کومار (Kumar, 2004a,b) با ساخت ناقل های اختصاصی به ترتیب برای سویا، هویج و پنبه، افزایش کارایی انتقال ژن به پلاستید گیاهان مذکور را گزارش دادند.

ناقل های انتقال ژن به پلاستید از ناقل های DNA E. coli مشتق شده اند که در آنها توالی های کلروپلاستی با طول یک تا دو کیلوباز در هر دو طرف یک ژن نشانگر انتخابی کلون سازی می شود و محل هایی نیز برای کلون کردن ژن مورد نظر در آنها تعییه خواهد شد. توالی های ژنوم کلروپلاستی (ptDNA) (FR, Flanking region) یا به عنوان نواحی مجاور (FR, Flanking region) یا توالی های هدف گیری کننده برای الحاق مستقیم قطعات مورد نظر به داخل ژنوم پلاستید عمل می کند (Maliga, 2005) گزارش شده است که ورود ژن نشانگر هیچ تداخلی با بیان ژن های پلاستیدی مجاور ۱۴ ناحیه بین ژنی در پلاستوم نداشت. قطعات rDNA پلاستیدی که حاوی هر یک از این ۱۴ مکان ورود بین ژنی خشی می باشند، این قابلیت را دارند که برای طراحی حامل های انتقال ژن به پلاستید از آنها استفاده شود (Maliga, 2005). اغلب ژن های کلروپلاست در گروه های ژنی رونویسی می شوند. این موضوع اجازه می دهد دو یا چند چارچوب بازخواندن (ORF)، به درون یک ناقل، در توالی هایی تحت یک پیشبر وارد شوند. نشانگر انتخابی و ژن های دلخواه بین پیشبر و

مقدمه

ژنوم کلروپلاستی (پلاستوم) گیاهان دارای سازماندهی بسیار حفاظت شده ای است. این ژنوم یک کروموزوم منفرد حلقوی دارای همانندسازی مستقل بوده که می توان چهار قسمت برای آن در نظر گرفت. این قسمت ها شامل دو نسخه یکسان از یک تکرار معکوس (Inverted repeat, IR) می باشد که نواحی تک نسخه ای بزرگ (LSC) و تک نسخه ای کوچک (SSC) را از هم جدا می کند. فقدان اطلاعات ژنومی کلروپلاستی در گذشته کاربرد تکنولوژی تراریزش پلاستید را در بسیاری از محصولات محدود کرده بود (Daniell et al, 2006; Ruhlman 2010; Clarke and Daniell 2011). در سال های اخیر با افزایش تعداد پلاستوم هایی که به طور کامل توالی یابی شده اند و در دسترس بودن آنها از طریق پایگاه های بیانفورماتیک، دانش ما از سازماندهی و تکامل پلاستوم ها در حال گسترش است (Maliga, 2004; Maliga, 2005).

مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت دارد که شامل: بیان بالای ترانسژن (Daniell et al, 2002)، مهندسی چند ژنی در یک رویداد انتقال ژن (De Cosa et al, 2001; Daniell et al, 2002; Ruiz et al, 2003)، محدود نگهداشت ترانسژن از طریق وراثت مادری (Daniell, 2002)، فقدان خاموشی ژن (De Cosa et al, 2001; Lee et al, 2003)، فقدان اثرات مکانی (Lee et al, 2003) و پلیوتروپیک (Daniell et al, 2002) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می باشد. برای اصلاح پایدار پلاستیدها لازم است که rDNA انتقالی، با استفاده از توالی های همولوگ به مکان مشخصی از ژنوم پلاستید هدف گیری شود. همولوژی بالای توالی های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی همولوگ و برای هدف گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی، از عوامل مهم موقیت در انتقال ژن محسوب می شوند

مواد و روش‌ها

بررسی‌های بیوانفورماتیکی

برای یافتن بهترین محل الحق ژن به ژنوم کلروپلاستی، توالی کامل ژنوم‌های کلروپلاستی چندین گونه گیاهی از NCBI دریافت شد. مقایسه نواحی بین ژنی پلاستوم برای هدف‌گیری ژن مورد نظر، انجام گرفت. آغازگرهای لازم برای جداسازی ناحیه هدف‌گیری کننده به پلاستوم گیاهان مختلف، از محلی طراحی شدن که دارای همولوژی ۱۰۰ درصد توالی در ژنوم‌های کلروپلاستی تمامی گیاهانی باشند که توالی ژنوم پلاستیدی آنها از طریق بانک ژن در دسترس OligoTech است. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI مورد آنالیز قرار گرفت. از آنجایی که طول ناحیه هدف‌گیری کننده ژن به پلاستوم، در افزایش کارایی انتقال ژن از طریق بالا بردن امکان نوترکیبی همتا موثر است، طراحی آغازگر از قسمتی از توالی صورت گرفت که ناحیه‌ای در حدود چهار کیلوباز از پلاستید گیاهان مختلف تکثیر نماید که شامل ori و جایگاه منحصر به فرد آنزیمی باشد.

جداسازی ناحیه هدف‌گیری کننده

استخراج کل DNAی سلولی که DNAی کلروپلاستی را نیز دربردارد از گیاهان توتون، پنبه، کلنزا، گوجه‌فرنگی، هویج و کاهو و ذرت و لیموترش، با استفاده از QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و با استفاده از آنزیم پلیمراز PCR حاصل از هر گیاه پس از الکتروفورز از روی ژل High Pure PCR Product آگارز با استفاده از Roche Purification Kit (Roche) خالص‌سازی گردید.

کلون کردن ناحیه هدف‌گیری کننده و ساخت حامل نوترکیب

واکنش اتصال قطعه مربوط به ناحیه هدف‌گیری کننده اختصاصی ژنوم کلروپلاستی توتون،

پایانبر، در مجاورت نواحی بدون رونویسی (UTR) ۵' و ۳' قرار داده می‌شوند (Maliga, 2005). استفاده از نواحی تنظیمی مناسب در ساخت ناقل‌های کلروپلاستی می‌تواند نقش بسزایی در بیان مناسب ژن خارجی مورد نظر ایفا کند. برای بیان تراژن‌های پلاستیدی معمولاً از یک کاست ۵'PL (Promoter&Leader) و یک کاست (Terminator T)، استفاده می‌شود. کاست PL شامل یک پیشبر و توالی‌های کنترل کننده ترجمه می‌باشد. توالی‌های کنترل کننده ترجمه ممکن است نواحی بدون ترجمه ۵' از mRNA (5'UTR) و یا ناحیه کنترل ترجمه ۵' (TCR, Translation Control Region) باشند که شامل ۵'UTR و یک قطعه پایانه N از ناحیه کد کننده را شامل می‌شود. ناحیه ۵'UTR از mRNA معمولاً شامل یک ساختار ساقه-حلقه (Stem-Loop) است که برای پایداری mRNA مورد نیاز می‌باشد و توالی‌هایی دارد که حرکت mRNA‌ها را روی ریبوزوم تسهیل می‌کند. کاست T، ناحیه بدون ترجمه ۳' از mRNA (3'UTR) را کد می‌کند که این قسمت نیز یک ساختار ساقه-حلقه را شامل می‌شود. ناحیه بدون ترجمه ۳' به عنوان یک mRNA پایانبر رونویسی عمل می‌کند و برای پایداری موردنیاز است (Monde et al., 2000).

با توجه به اینکه همولوژی بالای توالی‌های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی همولوگ و برای هدف‌گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی، از عوامل مهم موقیت در انتقال ژن به یک پلاستوم محسوب می‌شود (Dufourmantel et al., 2004; Kumar et al., 2004a; Kumar et al., 2004b)، هدف از این تحقیق آنالیز و شناسایی توالی ژنوم‌های پلاستیدی گیاهان مختلف به منظور یافتن ناحیه مناسبی از ژنوم پلاستومی برای هدف‌گیری و الحق ژن خارجی و جداسازی و کلون کردن آنها جهت انتقال ژن کارا به کلروپلاست دامنه گسترده‌ای از گیاهان بوده است.

ساخت به شرکت MilleGen سفارش داده شد و پس از دریافت قطعه از شرکت، دستکاری های لازم برای حذف و اضافه کردن قطعات موردنظر به منظور مشتق نمودن چندین ناقل کاربردی مختلف از آن انجام گردید. توالی های مشتق شده در ناقل pJET1.2. pJET1.2 هدف گیری کننده به پلاستیدر ناقل نوتر کیب- FR که مراحل ساخت آن قبلاً ذکر شد، کلون سازی مجدد شدند. تعدادی از ناقل های ساخته شده در این تحقیق در ادامه شرح داده شده است.

طراحی و ساخت کاست ژن نشانگر *neo* ادغام شده با زیروحد بزرگ *loxP* بین توالی های *atpB*

در این تحقیق از ژن نومایسین فسفو ترانسفراز II (APH(3')-II; NPTII) موسوم به *neo* در ساخت حامل کلروپلاستی استفاده گردید. نتایج آزمایش ها نشان داده است که اضافه کردن اسید آمینه های پایانه N از *atpB* به عنوان 5'UTR باعث افزایش بیان ژن *neo* در پلاستیدها می شود (Maliga, 2003)، لذا پس از حذف دو جایگاه آنزیمی داخلی *Pvu*II و *Sph*I از ژن مذکور، ۹۰ جفت *neo* باز از ناحیه بدون ترجمه 5'UTR به ابتدای ژن *neo* اضافه شد و پس از قرار دادن ۸ نوکلئوتید ایجاد کننده ۱۴ یک جایگاه آنزیمی، ۴۲ جفت باز کد کننده ۱۶ اسید آمینه پایانه N زیروحد بتای پروتئین ATP سیتیاز توتون که کدون آغازین ATG را دربرداشت به صورت همچوش با *neo* قرار داده شد. توالی به دست آمده تحت پیشبر و پایانبر *psbA* کلروپلاستی و در میان دو توالی تکرار شده مستقیم ۳۴ جفت بازی *loxP* و در حامل pJET1.2 (شرکت Fermentas) کلون سازی اولیه گردید. یک جایگاه اتصال به ریوزوم کلروپلاستی نیز پس از ژن *neo* و قبل از پایانبر *TpsbA* برای کلون سازی ژن های دلخواه به صورت پلی سیسترونی با *neo* در این *neo* حامل کلروپلاستی در نظر گرفته شد. صحت مراحل کلون سازی حامل نوتر کیب حاصل توسط هضم آنزیمی و PCR مورد بررسی قرار گرفت. به منظور

پنبه، کلزا، گوجه فرنگی، هویج، کاهو، ذرت و لیموترش با حامل pJET1.2 (شرکت Fermentas)، به صورت کلون کردن انتهای صاف انجام گرفت. اثبات تراریختی پس از استخراج پلاسمید از کلونی های حاصل، با استفاده از هضم آنزیمی و PCR انجام شد. پلاسمیدهای نوتر کیب حاصل که ناحیه مجاور کلروپلاستی (FR) را دربرداشتند، به pJET-FR موسوم شدند. کلیه مراحل همسانه سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل های سمبروک و راسل (Sambrook and Russel, 2001) انجام گرفت.

طراحی نواحی تنظیمی و ژن های نشانگر و گزارشگر برای حامل های پلاستیدی

یک توالی شامل نواحی تنظیمی کلروپلاستی، ژن های نشانگر و جایگاه های مناسب آنزیمی برای وارد کردن ژن های خارجی موردنظر و دستکاری های ژنتیکی لازم به شرح زیر طراحی گردید. این توالی ساختگی طوری طراحی شد که بتوان چندین ناقل کلروپلاستی مختلف را با توالی های تنظیمی و نشانگر های موردنیاز از آن مشتق نمود. برای طراحی این توالی ساختگی، ردیف های نوکلئوتیدی زیر از NCBI دریافت شدند: ۱) پیشبرهای *Prrn* و *PpsbA*؛ ۲) نواحی بدون ترجمه Un-Translated Region ' ۵(UTR) و ۵'UTR (5'UTR)؛ ۳) نواحی بدون ترجمه ' ۳'UTR (3'UTR) یا پایانبر های *atpB*؛ ۴) نواحی بدون ترجمه ' ۳'UTR (3'UTR) یا پایانبر های *TpsbA*، *Trbcl* و *rbcl*؛ ۵) جایگاه آنزیمی (RBS) کلروپلاستی؛ ۶) ژن های نشانگر اتصال ریوزوم (RBS) کلروپلاستی؛ ۷) ژن های نشانگر *badh* و ژن گزارشگر *gfp*. ژن های نشانگر به منظور حذف جایگاه های آنزیمی های برشی موجود در داخل توالی ژن تغییر داده شدند. این بهینه سازی کدونی با تغییر نوکلئوتید بدون تغییر اسید آمینه انجام شد. علاوه بر پیشبرهای کلروپلاستی همیشگی (Constitutive) *E. coli* و *PpsbA*، پیشبر القایی شوک حرارتی *Prrn* در این تحقیق برای طراحی حامل های پلاستیدی در نظر گرفته شد. این توالی ساختگی پس از طراحی، برای

آنژیم *SphI* تحت هضم آنژیمی قرار گرفت. باندهای مورد انتظار ۲۹۸۸bp و ۲۵۵۵bp بودند (شکل ۴a) که باند ۲۵۵۵ جفت بازی مربوط به قطعه *neogfp* از روی ژل آگارز خالص‌سازی گردید. در مرکز توالی هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی با طول حدود ۴Kb از ناقل pJET-FR که با آنژیم مذکور برش خورده و با استفاده از تیمار با آنژیم آکالین فسفاتاز برای جلوگیری از خوداتصالی پلاسمیدی فسفرزداشی شده بود، کلونسازی مجدد گردید. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با رشد روی محیط انتخابی حاوی هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کاناامایسین انتخاب شدند. آنالیزهای PCR و هضم آنژیمی به منظور اثبات صحت کلونسازی و تعیین جهت ورود توالی‌های ژنی در مرکز توالی هدف گیری کننده کلروپلاستی انجام گردید. حامل پلاسمیدی نوترکیب حاصل pFNGi نامیده شد و ۹۳۹۶ جفت باز طول دارد.

بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پرومومتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب

برای اثبات عملکردی بودن جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) کلروپلاست که بعد از ژن *neo* و قبل از پایانبر *psbA* در نظر گرفته شده بود و اثبات بیان ژن موردنظر به صورت پلی‌سیسترونی بعد از ژن نشانگر *neo* بدین ترتیب عمل شد که حامل *pNGi* با آنژیم‌های *XbaI* و *XhoI* تحت هضم آنژیمی ناقص قرار گرفت. قطعه موردنظر با طول ۵۱۰۲bp پس از الکتروفورز از روی ژل آگارز خالص‌سازی گردید. این قطعه که در اثر خروج پایانبر *psbA* و پیشبر *groE* ایجاد شده بود، با استفاده از آنژیم کلنو (Roche) تیمار شد تا پایانه‌های چسبنده آن به پایانه‌های صاف تبدیل شوند. حلقوی کردن مجدد قطعه مذکور با انجام واکنش اتصال، منجر به قرار گرفتن ژن *gfp* به صورت پلی‌سیسترونی پس از ژن *neo* گردید، به طوری که ژن‌های *neo* و *gfp* هر دو تحت پیشبر مشترک *psbA* بیان شوند و هر یک RBS جداگانه‌ای داشته باشند.

بررسی عملکردی بودن بیان ژن *neo* تغییریافته، کلونی باکتری‌های نوترکیبی که تحت ترازیش با این حامل قرار گرفته بودند، روی محیط حاوی ترکیبی از دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کاناامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد داده شدند.

طراحی و ساخت حامل بیانی Expression vector

کلروپلاستی دارای پیشبر باکتریایی *groE*
پیشبر *groE* باکتری *E. coli* به همراه جایگاه اتصال به ریبوزوم، پایانبر ترئونین و جایگاه‌های آنژیمی مناسب در پلاسمید pJET1.2 کلونسازی گردید و صحت مراحل کلونسازی حامل نوترکیب حاصل با هضم آنژیمی و PCR تأیید گردید. به منظور اثبات عملکردی بودن بیان ژن، تحت پیشبر *groE* در این حامل نوترکیب، ژن مربوط به پروتئین فلورسنت سبز پس از تغییر در چهار جایگاه از توالی نوکلئوتیدی برای حذف جایگاه‌های آنژیمی داخلی *PvuII*, *ClaI*, *AflIII*, *NdeI* و *Tombolini* بدون تغییر اسید‌آmine، تحت پیشبر مذکور قرار داده شد. القای بیان ژن *gfp* در باکتری *E. coli* نوترکیب پس از اعمال شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مشاهده باکتری‌ها زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت (and Jansson, 1998) به اثبات رسید.

طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای

کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القابی *gfp*
ژن *gfp* که تحت پیشبر *groE* و پایانبر ترئونین قرار داده شده بود، در فرودست کاست ژنی *neo* تحت پیشبر و پایانبر کلروپلاستی *psbA* کلونسازی شد. کلونی‌هایی که پس از ترازیش باکتری مستعد *E. coli* سویه XLI-Blue روی محیط انتخابی حاوی هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کاناامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کرده بودند، پس از استخراج پلاسمید تحت آنالیزهای PCR و هضم آنژیمی قرار داده شدند. پلاسمید نوترکیب حاصل که ۵۵۴۳ جفت باز طول داشت، به *pNGi* نامیده شد. در مرحله بعد، کاست هر دو ژن *neo* و *gfp* با استفاده از

انتقال ژن به پلاستید بدون نشانگر انتخابی آنتی بیو تیکی
امکان پذیر می گردد.

نتایج و بحث

پس از جستجو برای انتخاب ناحیه هدف گیری کننده کلروپلاستی که ori پلاستیدی را نیز دربرداشته باشد، ناحیه ۲۳SrRNA/16SrRNA قطعه دوم (Spacer2) ژن های *tm* ایزولوسین و آلانین، به عنوان ناحیه الحق ژن های خارجی انتخاب شد. این ناحیه در قسمت تکرار معکوس ژنوم کلروپلاستی قرار داشته و بنابراین الحق قطعات در این ناحیه منجر به حضور دو نسخه از ژن مورد نظر در هر پلاستوم خواهد شد.

هم ردیفی (Align) این ناحیه هدف گیری کننده کلروپلاستی در ژنوم های توتوون، پنبه، گوجه فرنگی، کاهو و هویج و ذرت، که با استفاده از نرم افزار VectorNTI انجام شد، نشان داد که ناحیه *ori* در حدود ۷۰۰ bp با ناحیه بین ژنی *trnI/trnA* فاصله دارد و نقاط با شباهت کامل (Identity positions) در بین این شش گیاه ۹۵/۹ درصد محاسبه شد. ناحیه *Spa2* به عنوان مرکز توالي هدف گیری کننده درنظر گرفته شد و جستجو برای یافتن نقاط حفاظت شده برای طراحی پرایمر از حدود ۲kb بالا دست این ناحیه برای طراحی پرایمر رو به جلو (Forward) و ۲kb پایین دست این ناحیه برای طراحی پرایمر رو به عقب (Reverse) با استفاده از نرم افزار Vector NTI انجام شد. پرایمرهای طراحی شده، در شش گیاه مذکور دارای شباهت صد درصدی بودند و علاوه بر این توالي پرایمرهای مذکور روی توالي سایر ژنوم های کلروپلاستی موجود در بانک ژن نیز مورد آنالیز قرار گرفت و شباهت صد درصدی نشان داد.

قطعاتی با طول مورد انتظار ۴۱۸۴bp از هویج، ۴۲۲۷bp از پنبه، ۴۲۰۵bp از کاهو، ۳۹۸۵bp از گوجه فرنگی، ۴۲۰۸bp از ذرت و ۳۸۶۷bp از توتوون

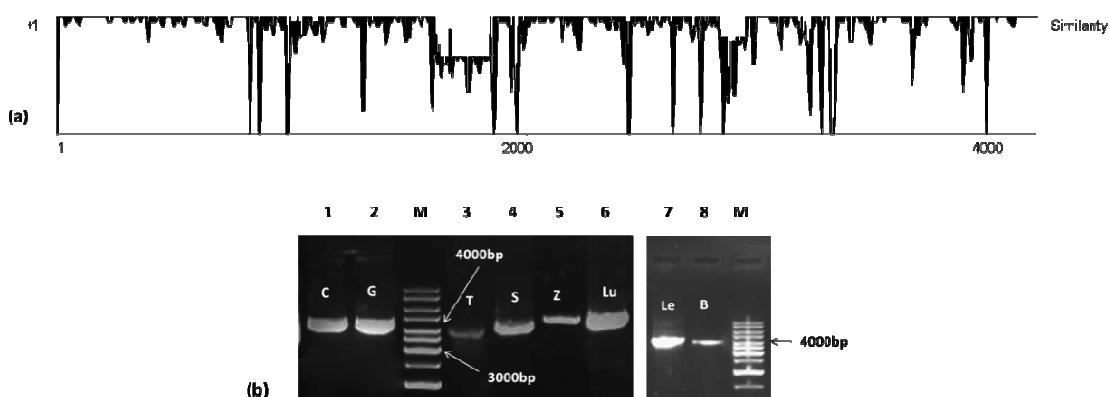
عملکردی بودن بیان پروتئین به صورت پلی سیسترونی و تحت RBS کلروپلاستی در این حامل نوترکیب موسوم به pNG، با مشاهده پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت بررسی گردید. سپس کاست مربوط به *neogfp* پلی سیسترونی با استفاده از آنزیم *SphI* تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و پس از خالص سازی قطعه ۲۱۱۸ جفت بازی از روی ژل آگارز، این قطعه در مرکز توالي هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی در حامل نوترکیب pJET-FR پس از هضم و فسفرزدایی کلون سازی مجدد گردید. حامل پلاسمیدی حاصل موسوم به pFNG به منظور اثبات صحت کلون سازی تحت آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی قرار داده شد.

استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی بیو تیکی بتائین آلدھید دیهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی

توالی ژن بتائین آلدھید دیهیدروژناز (*badh*) از منشأ اسفناج (*Spinacia aleracea*) از NCBI دریافت شد. با تغییر توالي نوکلئوتیدی بدون تغییر در اسید آمینه، جایگاه های آنزیمی داخلی ناحیه کد کننده این ژن حذف گردید. جایگاه های شناسایی آنزیم های اندونوکلئاز نوع دوم که از توالي مذکور حذف شدند عبارت بود از: آنزیم های *PvuII* و *XbaI* که هر کدام دو جایگاه و آنزیم های *AflIII*, *EcoRI*, *HindIII* و *EcoRV* که هر کدام یک جایگاه شناسایی در توالي مذکور دارا بودند. افزایش درصد آدنین-تیمین نیز در این بهینه سازی کدونی مورد توجه قرار گرفت. توالي نهایی ژن *badh* به ناحیه بدون ترجمه، ۵ مربوط به *T7 gene10* فاژی متصل گردید و تحت پیشبر کلروپلاستی *Prm* (پیشبر قوی اپرون rRNA ریبوزومی) قرار داده شد. بین پیشبر و ژن *badh* محلی برای اتصال به ریبوزوم با توالي GGAGG تعییه و جایگاه های آنزیمی برای کلون سازی ژن های دلخواه دیگر در نظر گرفته شد. با کلون سازی ژن های موردنظر در این مکان، این ژن ها به صورت پلی سیسترونی با ژن *badh* بیان خواهند شد و

داشت. با وجود اینکه آنالیز هم ردیفی ناحیه جداشده از پلاستوم گیاهان مختلف نشان داد که این ناحیه در ژنوم‌های کلروپلاستی گیاهان مختلف دارای شباهت بالایی است (شکل ۱)، ولی در بعضی از قسمت‌ها این تفاوت توالی قابل توجه بود. به عنوان مثال نوکلتوئیدهای حدود ۱۶۰۰ تا ۱۸۶۰ از توالی نوکلتوئیدی مشترک (Consensus) در پلاستوم توتوون وجود ندارد.

جدا شد. توالی ژنوم کلروپلاستی کلزا و لیموترش در بانک ژن موجود نبود و استفاده از آغازگرهای مذکور برای تکثیر ناحیه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی از این گیاهان نیز باند حدود ۴kb را ظاهر نمود. تمامی قطعات حاصل پس از تکثیر و خالص‌سازی به صورت جداگانه در ناقل pJET1.2 pکلون‌سازی شدند. با توجه به اینکه کلون‌سازی به صورت انتهای صاف انجام شد. امکان ورود قطعات در دو جهت در ناقل مذکور وجود



شکل ۱- (a) آنالیز شباهت ناحیه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی جداشده از ژنوم‌های پلاستیدی هویج، کاهو، پنبه، گوجه‌فرنگی، توتوون و ذرت در نرم افزار Vector NTI

Fig. 1. (a) Similarity analysis of flanking regions that isolated from chloroplast genomes of carrot, lettuce, cotton, tomato, tobacco and maize in Vector NTI software

خط افقی طول توالی جداشده از پلاستوم‌های گیاهان مذکور را نشان می‌دهد که بیش از ۴۰۰۰ جفت باز هستند و خط عمودی میزان شباهت توالی‌ها را نشان می‌دهد. قسمت‌هایی که خطوط داخل نمودار پایین آمده است، نشان می‌دهد که میزان شباهت در این قسمت از توالی‌های مذکور نسبت به یکدیگر کم شده است.(b): تکثیر ناحیه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی یا ناحیه مجاور (Flanking region) از پلاستوم گیاهان مختلف با پرایمرهای طراحی شده در این آزمایش. ۱. هویج (C=Carrot)؛ ۲. پنبه (G=Gossypium)؛ ۳. توتوون (T=Tobacco)؛ ۴. گوجه‌فرنگی (S=Solanum)؛ ۵. کاهو (Z=Zea)؛ ۶. کاهو (Lu=Lactuca)؛ ۷. لیموترش (B=Brassica)؛ ۸. کلزا (Le=Lemon)

Horizontal line indicates the sequences length that is isolated from above plant plastoms that are about 4000 bp. The vertical line indicates the similarity of sequences. Lines that come down in the chart mean that the similarity of this part of sequences is low relative to each other.
(b): Amplification of plastid flanking regions of different plants using primers designed in this research. 1. Carrot (C); 2. Cotton (G=Gossypium); 3. Tomato (T); 4. Tomato (S=Solanum); 5. Corn (Z=Zea); Lactuca (Lu); 7. Lemon (Le); 8. Canola (B=Brasica)

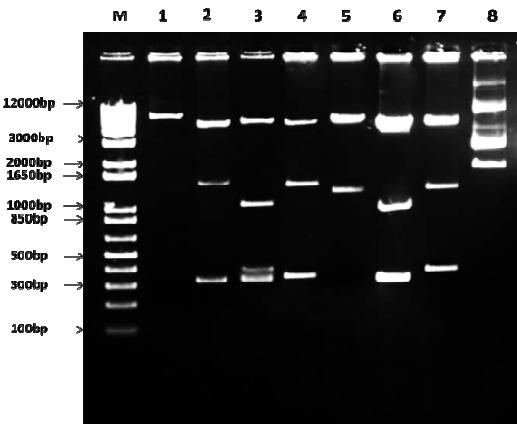
نشان داد که جایگاه شناسایی آنزیم *Pvu*II در تمامی گیاهان مورد بررسی در این ناحیه وجود دارد و در کل ناحیه هدف گیری کننده، منحصر به فرد می‌باشد. بررسی‌های بیشتر از طریق Blast نوکلتوئیدی، حضور و منحصر به فرد بودن این جایگاه را در سایر ژنوم‌های کلروپلاستی موجود در بانک ژن نیز به اثبات رساند. لذا *Pvu*II به عنوان محل مناسبی برای العاق توالی مورد نظر

آنالیزهای ناحیه هدف گیری کننده کلون شده

بررسی توالی فاصله دوم (Spacer2) ناحیه بین ژنی *trnI/trnA* با طول ۶۴bp در ۵ گیاه توتوون، پنبه، گوجه‌فرنگی، هویج و کاهو نشان داد که این ناحیه ۸۳/۱ درصد از توالی نوکلتوئیدی کاملاً یکسان در این گیاهان درخوردار است. سپس ناحیه مذکور از نظر جایگاه‌های آنزیمی محدود کننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج

توتون، پنبه، هویج و کاهو نشان داد. این جایگاه در گیاهان مذکور در فاصله بین محل طراحی آغازگرهای این تحقیق منحصر به فرد بوده ولی در تمامی ژنوم‌های کلروپلاستی به صورت حفاظت شده

در مرکز ناحیه هدف گیری کننده شناخته شد. از آنجایی که آنزیم مذکور صاف بُر بوده و کلون کردن ژن آن مشکل می‌باشد، جستجو برای سایر جایگاه‌های آنزیمی در این ناحیه، حضور جایگاه برشی آنزیم *SphI* را در



شکل ۲- آنالیز هضم آنزیمی حامل‌های اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای هشت نوع گیاه با آنزیم *BamHI*

Fig. 2. Enzymatic digestion analysis of plastid vectors that constructed for 8 plants using *BamHI* (Invitrogen) 1Kb Plus Ladder, DNA.

(۱) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_T, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای توتون (وجود یک جایگاه و خطا شدن پلاسمید با اندازه ۶۸۴۱bp مورد تایید قرار گرفت); (۲) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_G, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای پنبه (سه قطعه مورد انتظار با اندازه‌های ۵۳۴۸، ۱۵۰۷ و ۳۴۶ و ۳۴۹ جفت‌بازی را ظاهر نمود); (۳) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_{Lu}, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای کاهو (چهار قطعه مورد انتظار با اندازه‌های ۵۳۲۲، ۱۱۳۰، ۳۷۸ و ۳۴۹ جفت‌بازی را ظاهر نمود); (۴) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_C, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای هویج (سه قطعه مورد انتظار با اندازه‌های ۵۱۹۶، ۱۴۴۸ و ۳۷۸ و ۳۴۹ جفت‌بازی را ظاهر نمود); (۵) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_S, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای گوجه‌فرنگی (سه قطعه مورد انتظار با اندازه‌های ۵۳۲۸، ۱۲۵۳ و ۳۷۸ و ۳۴۹ جفت‌بازی را ظاهر نمود); (۶) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_Z, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای ذرت (سه قطعه مورد انتظار با اندازه‌های ۵۶۸۴، ۱۱۲۲ و ۳۷۸ و ۳۴۹ جفت‌بازی را ظاهر نمود); (۷) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_B, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای کلزا (سه باند با اندازه‌های تقریبی ۵۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۵۰۰ را نشان داد); (۸) پلاسمید نوترکیب pJET-FR_L, ناقل اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده برای لیموترش (الگوی هضم نشان می‌دهد که این پلاسمید نوترکیب قادر جایگاه آنزیمی *BamHI* بوده و پلاسمید برش نخورده است).

M. DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1. Recombinant plasmid pJET-FR_T, specific chloroplast vector for Tobacco (appearance of one site and linearization of plasmid 6841bp was confirmed); 2. Recombinant plasmid pJET-FR_G, specific chloroplast vector for Cotton (Three expected band, 5348bp, 1507bp and 346bp was appeared); 3. Recombinant plasmid pJET-FR_{Lu}, specific chloroplast vector for Lettuce (Four expected band, 5322bp, 1130bp, 378bp and 349bp was appeared); 4. Recombinant plasmid pJET-FR_C, specific chloroplast vector for Carrot (Three expected band, 5196bp, 1448bp and 378bp was appeared); 5. Recombinant plasmid pJET-FR_S, specific chloroplast vector for Carrot (Three expected band, 5328bp, 1253bp and 378bp was appeared); 6. Recombinant plasmid pJET-FR_Z, specific chloroplast vector for Maize (Three expected band, 5684bp, 1122bp and 378bp was appeared); 7. Recombinant plasmid pJET-FR_K, specific chloroplast vector for Carrot (Three band by length about 5000bp, 1500bp and 500bp was appeared); 8. Recombinant plasmid pJET-FR_L, specific chloroplast vector for Lime (Digestion pattern indicates that this recombinant plasmid has no *BamHI* recognition site and plasmid has not digested)

مراحل کلون‌سازی و استخراج پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت، آنزیم *HindIII* بود. این آنزیم که دارای یک جایگاه شناسایی در فرادست محل کلون‌سازی روی پلاسمید pJET1.2 می‌باشد، روی قطعات هدف گیری کننده جدا شده از پلاستوم گیاهان مختلف نیز دارای جایگاه‌های شناسایی مختلفی است. آنالیز هضم آنزیمی

وجود ندارد. از آنجایی که این آنزیم انتهای چسبنده ایجاد می‌کند، کلون کردن کاست ژنی موردنظر در مرکز ناحیه هدف گیری کننده، با استفاده از این جایگاه ساده‌تر است. یکی از آنزیم‌هایی که برای آنالیز صحت کلون‌سازی و کامل بودن قطعه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی در حامل‌های نوترکیب حاصل پس از انجام

ناقل‌های *E. coli* به ناقل کلروپلاستی منتقل نمود.
طراحی و ساخت حامل کلروپلاستی دارای نشانگر *neo*
ادغام شده با زیرو واحد بزرگ *atpB* *loxP* بین توالی‌های
اکثر حامل‌هایی که برای انتقال ژن به کلروپلاست
ساخته می‌شوند دارای ژن *aadA* ایجاد کننده مقاومت به
استرپتومایسین و اسپکتینومایسین به عنوان نشانگر
انتخابی هستند، ولی از آنجایی که mRNAهای پلاستیدی
برخی از گیاهان به طور طبیعی جهش‌هایی دارند که از
اتصال اسپکتینومایسین جلوگیری می‌کند و از سویی
دیگر نگرانی‌هایی که در ارتباط با مسائل اینمی‌زیستی
این نشانگر انتخابی وجود دارد (Anonymous, 2004،
لذا در این تحقیق از ژن نومایسین فسفو ترانسفراز II
(APH(3')-II; NPTII) با نام اختصاری *neo* در ساخت
حامل کلروپلاستی استفاده گردید. صحت مراحل
کلون‌سازی حامل نوترکیب حاصل توسط هضم
آنزیمی و PCR تأیید گردید (شکل ۴). عملکردی بودن
ییان ژن *neo* تغییریافته، با رشد و تشکیل کلونی
باکتری‌های نوترکیبی که تحت تراریزیش با این حامل
قرار گرفته بودند روی محیط حاوی ترکیبی از دو
آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین و کانامایسین به اثبات رسید.
امکان انتشار ژن نشانگر *neo* از طریق دانه گرده در
انتقال ژن به کلروپلاست وجود نداشته و این نشانگر از
نظر اینمی‌زیستی مورد تأیید می‌باشد ولی با این حال
امکان حذف ژن نشانگر مذکور پس از تولید گیاهان
تراپلاستی توسط آنزیم ریکامینیاز Cre که توالی‌های
loxP را شناسایی می‌کند امکان پذیر خواهد بود.
استفاده از پیشبر باکتریایی *groE* برای بیان القایی یا

مختص بافت ژن‌های موردنظر

از آنجایی که تاکنون هیچ پرومودر مناسب
اختصاصی به بافت و یا القایی که قادر به بیان در
کلروپلاست باشد شناخته نشده است، در این تحقیق
تلاش شد تا ناقل‌های کلروپلاستی طوری طراحی و
ساخته شوند که با دربرداشتن توالی‌های تنظیمی مناسب
بتوان بیان ژن موردنظر را در یک مرحله اختصاصی از

حامل‌های اختصاصی کلروپلاستی ساخته شده در این
تحقیق برای هشت گیاه مختلف با آنزیم *BamHI* در
شکل ۲ نشان داده شده است. کلون‌سازی و کامل بودن
قطعه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی توتون با
مشاهده باندهای ۵۴۶۰، ۵۴۶۱ و ۵۲۷ جفت باز حاصل از
هضم با آنزیم *HindIII* به اثبات رسید (شکل ۳) و
مشخص شد که قطعه FR به صورت همسو در پلاسمید
pJET کلون‌سازی شده است این در حالی است که اگر
قطعه مذکور به صورت غیرهمسو در پلاسمید pJET
کلون می‌گردید، مشاهده باندهای ۳۰۰۴، ۲۹۹۱ و ۸۴۶
جفت بازی مورد انتظار بود. آنالیز با آنزیم مذکور در
قطعه هدف گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی ذرت نیز با
مشاهده باندهای ۶۶۵۶ و ۵۲۵ جفت باز، حضور قطعه
FR را به صورت همسو در پلاسمید نشان داد. در ارتباط
با حامل اختصاصی کاهو حضور قطعه FR هم به
صورت همسو (کلونی شماره ۱) و هم به شکل
غیرهمسو (کلونی شماره ۲) در پلاسمیدهای نوترکیب
حاصل به اثبات رسید. این موضوع با مشاهده باندهای
۴۱۸۸ و ۲۹۹۱ جفت باز در کلونی ۱ و باندهای ۶۶۵۲ و
۵۲۷ جفت باز در کلونی شماره ۲ تأیید گردید.

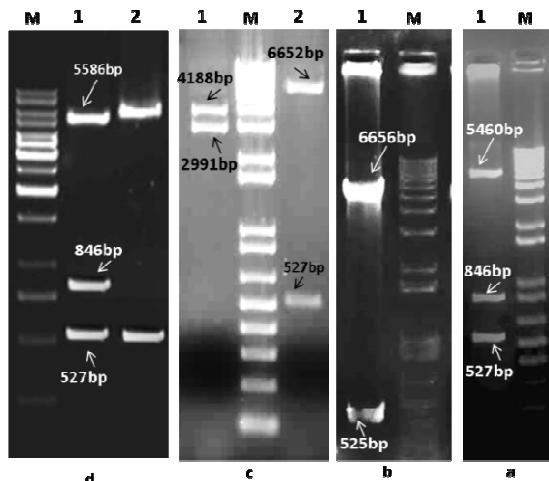
طراحی نواحی تنظیمی و ژن‌های نشانگر و گزارشگر برای حامل‌های پلاستیدی

در اتصال توالی‌های تنظیمی چارچوب باز خواندنی
(ORF) ژن‌ها حفظ شد و از سویی دیگر جایگاه‌های
آنزیم‌های برشی به کار رفته طوری طراحی و انتخاب
شدند که اولاً بتوان ژن‌های خارجی موردنظر را به
درستی تحت توالی‌های تنظیمی همسانه‌سازی نمود، ثانیاً
جداسازی کاست‌های کامل ژنی در صورت نیاز با
آنزیم‌های برشی امکان پذیر باشد، ثالثاً امکان حذف
نشانگرهای آنتی‌بیوتیکی پس از دستیابی به گیاهان
تراریخته پیش‌بینی گردد و مهم‌تر از همه اینکه
جایگاه‌های آنزیمی در نظر گرفته شده با جایگاه‌های
آنزیمی ناقل‌های رایج همسانه‌سازی هماهنگ باشد تا
بتوان ژن‌های موردنظر را پس از همسانه‌سازی اولیه در

نواحی تنظیمی القایی باکتریایی قرار دارد با آنزیم *Bgl*II دو باند مورد انتظار ۲۹۲۸ و ۲۶۱۵ جفت بازی را ظاهر نمود (شکل ۴-ب). سپس کاست ژنی کامل *neogfpi* با استفاده از جایگاه آنزیم *Sph*I (شکل ۴-الف) که در دو سوی این قطعه با استفاده از دنباله آغازگری اضافه گردیده بود جدا و در مرکز ناحیه FR کلون سازی گردید (شکل های ۵ و ۶). هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب پلاستیدی حاصل با آنزیم *Bam*HI صحت کلون سازی را تأیید نمود (شکل ۴-ج). ظهور باند ۲۳۰۳ جفت بازی در واکنش PCR با آغازگرهای R و *FRI* و *GFP* و عدم تکثیر توسط آغازگرهای F و *FRI* *GFP* نشان دهنده آن بود که نواحی ژنی به همراه نواحی تنظیمی به صورت غیرهمسو وارد ناحیه هدف گیری کننده پلاستیدی

نمود یا در یک بافت خاص گیاهی و یا به صورت القایی امکان پذیر نمود. بدین منظور از پیشبر شوک RNA حرارتی *E. coli* *groE* باکتری که توسط آنزیم *RNA* پلیمراز پلاستیدی شناسایی نمی شود، استفاده گردید. شکل ۴ نتایج کلون سازی را نشان می دهد. اثبات عملکردی بودن بیان ژن تحت پیشبر *groE* در این حامل نوترکیب، با مشاهده باکتری های حاوی ژن مربوط به پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ ابی فلورسنت پس از القای بیان با اعمال شوک حرارتی به اثبات رسید.

طراحی و ساخت حامل ییانی کلروپلاستی دارای کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp*
کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp* هضم آنزیمی پلاسمید pNGI که در آن ژن *psbA* تحت پیشبر و پایانبر کلروپلاستی *psbA* و ژن *gfp* تحت

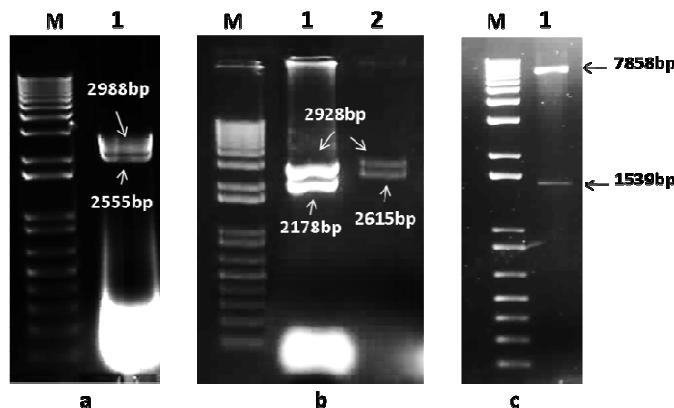


شکل ۳- آنالیز هضم آنزیمی با آنزیم *Hind*III، به منظور آنالیز حضور و صحت قطعه FR در حامل های اختصاصی پلاستیدی ساخته شده برای گیاهان توتون، ذرت، کاهو، کلزا و گوجه فرنگی

Fig. 3. Enzymatic Digestion analysis using *Hind*III, in order to analysis of present and accuracy of FR fragment in specific plastid vectors that constructed for tobacco, maize, lettuce, canola and tomato

a: M: DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1.pJET-FR_T (FR fragment was cloned in direct side with vector MCS); b: M: DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), 1: pJET-FR_Z (FR fragment was cloned in direct side); c: M: DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), 1. pJET-FR_{L1} (FR fragment was cloned in direct side), 2. pJET-FR_{L2} (FR fragment was cloned indirect side); d: M: DNA molecular weight marker, 1Kb Ladder (Fermentas), 1. pJET-FR_S (FR fragment was cloned in direct side), 2. pJET-FR (FR fragment was cloned in direct side); e: M: DNA molecular weight marker, 1Kb Ladder (Fermentas), 1. pJET-FR_K (FR fragment was cloned in direct side)

a. M: DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); 1.pJET-FR_T (FR fragment was cloned in direct side with vector MCS); b. M: DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), 1: pJET-FR_Z (FR fragment was cloned in direct side); c: M. DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), 1. pJET-FR_{L1} (FR fragment was cloned in direct side), 2. pJET-FR_{L2} (FR fragment was cloned indirect side); d: M. DNA molecular weight marker, 1Kb Ladder (Fermentas), 1. pJET-FR_S (FR fragment was cloned in direct side), 2. pJET-FR (FR fragment was cloned in direct side)



شکل ۴- آنالیزهای هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pNGi و pNG به منظور تأیید صحت کلونسازی

Fig. 4. Enzymatic digestion analysis of recombinant pNGi, pNG and pFNGi in order to accuracy of cloning

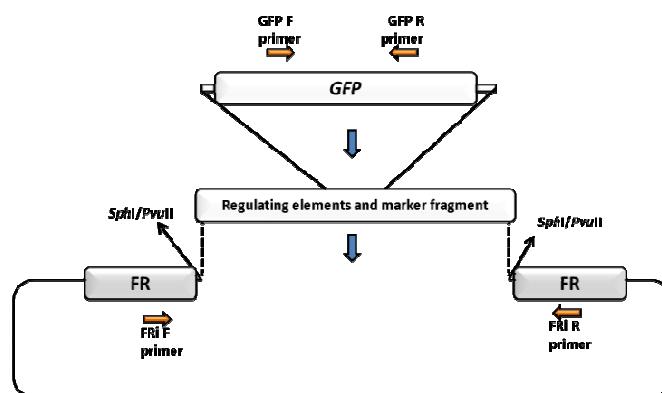
M. نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (Invitrogen) 1Kb Plus Ladder

a: هضم آنزیمی پلاسمید pNGi دارای کاست کلروپلاستی ژن *neo* و کاست القابی ژن *gfp* با استفاده از آنزیم *SphI* در دو سوی این قطعه با استفاده از دنباله پرایمری الحق گردیده بود تا امکان جداسازی کاست کامل این دو ژن و کلونسازی آن در مرکز ناحیه FR امکان پذیر گردد. قطعات مورد انتظار ۲۹۸۸ و ۲۵۵۵ جفت بازی ظاهر شدند و در نهایت قطعه ۲۵۵۵ جفت بازی از روی ژل آگارز جدا و خالص سازی گردید. b: آنالیز هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pNG و pNGi با آنزیم *BglIII* به منظور اثبات ایجاد حالت پلی سیسترونی ژن‌های *neo* و *gfp* در پلاسمید pNG. c: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pNGi با آنزیم *BamHI*

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pNGi با آنزیم *BglIII*؛ c: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب پلاستیدی pNGi با آنزیم *BamHI*

M. DNA molecular weight marker, 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); a. Enzymatic digestion of pNGi plasmid harboring chloroplast *neo* gene cassette and inducible cassette of *gfp* using *SphI* enzyme. *SphI* recognition site have been added using primer tail for after isolation of whole cassette and its cloning in the center of FR. Expected 2988bp and 2555bp band was appeared and finally 2555bp fragment was isolated from agarose gel.

b. Enzymatic digestion analysis of pNG and pNGi recombinant plasmids using *BglII* in order to verify polycistronic placing of *neo* and *gfp* genes in pNG plasmid. 1. Enzymatic digestion of pNG recombinant plasmid using *BglII*, 2. Enzymatic digestion of pNGi recombinant plasmid using *BglII*. C. Enzymatic digestion of pFNGi recombinant plasmid using *BamHI*.



شکل ۵- نمای شماتیک کلونسازی ناحیه هدف گیری کننده به ژنوم پلاستیدی (FR) در حامل pJET و ورود نواحی تنظیمی و ژن گزارشگر به مرکز پلاسمید نوترکیب pJET-FR و ساخت حامل‌های اختصاصی پلاستیدی

Fig. 5. Schematic view of cloning of plastid flanking region (FR) in pJET vector and introduction of regulation regions and reporter gene into the center of recombinant pJET-FR plasmid and construction of specific plastid vector

مراحل کلونسازی حامل نوترکیب حاصل توسط هضم آنزیمی و PCR تأیید گردید (شکل ۴). آنالیز پلاسمید pFNG توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای F_{RI} F و gfpR با ظهور قطعه ۲۱۸۰ جفت باز نشان داد که قطعه پلی‌سیسترونی neogfp به صورت همسو وارد پلاسمید pJET1.2 p شده است. حامل‌های پلاستیدی حاصل موسوم به pFNG و pFNGi مناسب برای انتقال ژن به کلروپلاست بوده و به ترتیب با جایگزینی ژن‌های دلخواه به جای gfp در آنها می‌توان بر حسب نیاز، پروتئین موردنظر را به صورت القایی و غیر القایی در پلاستیدها بیان نمود.

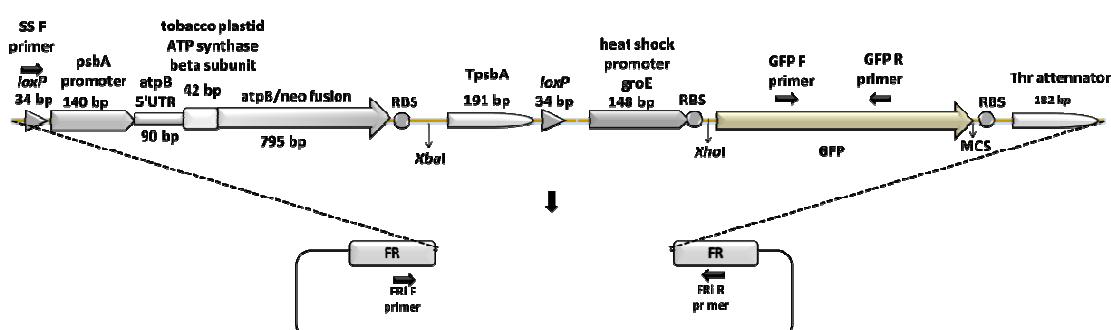
استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز (BADH) به عنوان یک نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی برای استفاده در ناقل‌های پلاستیدی طراحی شده در این تحقیق در نظر گرفته شد (شکل ۷). توالی حاصل پس از بهینه‌سازی و تغییرات توالی (حذف جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های *Pvu*II، *Eco*RV و *Hind*III، *Eco*RI، *Af*II، *Xba*I) به همراه توالی اولیه آن به اسید آمینه ترجمه و هم‌ردیف گردیدند و صحت عدم تغییرات توالی پروتئین در اثر دستکاری توالی نوکلئوتیدی تأیید گردد.

در این تحقیق توالی حفاظت شده بین ژنی 16S rRNA/23S rRNA اختصاصی ژنوم به چند دلیل انتخاب شد: قرارداشتن در ناحیه تکرار معکوس کلروپلاستی که باعث می‌شود در هر دو نسخه

گردیده‌اند. بیان پروتئین فلورسنت سبز در پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pNGi پس از ایجاد شوک حرارتی باکتری‌های نوترکیبی که با این پلاسمید تراریزش شده بودند در ۴۲ درجه سانتیگراد و زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت به اثبات رسید. از حامل پلاسمیدی نوترکیب حاصل موسوم به pFNGi می‌توان برای کلون کردن ژن‌های دلخواه و انتقال ژن به پلاستیدهای گیاهی استفاده نمود. بیان ژن‌هایی که بدین صورت به پلاستیدها منتقل می‌شوند با انتقال ژن سیگما‌اکتورهای گیاه/باکتری تحت پیشبر مختص بافت یا القایی به هسته گیاه میسر خواهد گردید.

بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پرمونتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب

با حذف پایانبر psbA و پیشبر groE توسط هضم ناقص با آنزیم‌های *Xba*I و *Xho*I، *Xba*I، *Xho*I ۴۳۷ جفت باز از پلاسمید pNGi p خارج و پس از حلقوی ساختن مجدد حامل، پلاسمید نوترکیب pNG حاصل گردید. در این حامل ژن gfp به صورت پلی‌سیسترونی پس از ژن neo قرار گرفته است. هضم آنزیمی پلاسمید pNG با آنزیم *Bgl*II نیز دو باند مورد انتظار ۲۹۲۸ و ۲۱۷۸ جفت بازی را نشان داد که صحت کلونسازی را تأیید می‌نمود (شکل ۴-ب). عملکردی بودن بیان پروتئین به صورت پلی‌سیسترونی و تحت RBS کلروپلاستی در این حامل نوترکیب با مشاهده پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت اثبات گردید. سپس در مرکز توالی هدف گیری کننده قرار داده شد. صحت



شکل ۶- نمای شماتیک حامل پلاسمیدی نوترکیب

Fig. 6. Schematic view of recombinant pFNGi



شکل ۷-نمای شماتیک کاست ژنی طراحی شده برای نشانگر انتخابی غیر آنتی بیوتیکی بتائین آلدھید دهیدروژناز (BADH)
Fig. 7. Schematic view of designed cassette gene for non-antibiotic betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) selectable marker gene

جداسازی توالی‌های اختصاصی ژنوم کلروپلاستی گونه‌های مهم گیاهی و همسانه‌سازی این توالی‌ها برای ساخت حامل کلروپلاستی خاص گونه که در این تحقیق انجام گرفت نیازنظامی رود با افزایش کارایی نوترکیبی همولوگ و الحاق تراژن همراه بوده و بتواند کارایی تراریزش پلاستیدی خاص گونه را به میزان زیادی افزایش دهد.

در تحقیقات گذشته حامل‌های طراحی شده برای تراریزش ژنوم پلاستیدی توتون با موفقیت برای انتقال ژن به پلاستید سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی استفاده شدند، زیرا توالی‌های مجاور همولوگ موجود در این حامل‌ها همولوژی کافی با توالی‌های مربوط به ژنوم پلاستیدی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی نشان دادند، اما بازده تراریزش به طور معنی‌داری از توتون کمتر بود (Ruf *et al.*, 1999; Sidorov *et al.*, 2001; Daniell *et al.*, 1998). برای مثال فقط یک لاین تراریخته کلروپلاستی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی به ترتیب از ۳۵ و ۸۵ پلیت بمباران شده به دست آمد. در حالی که حدود ۱۵ لاین تراریخته کلروپلاستی توتون، اغلب از یک پلیت بمباران شده تولید می‌شود (Dufourmantel *et al.*, 2004). علاوه بر این موارد، در تحقیق دیگری نیز کم‌شدن کارایی تراریزش وقتی مشاهده شد که توالی‌های مجاور پتونیا (که تقریباً دارای ۹۸ درصد شباهت با توالی توتون بودند) برای تراریزش ژنوم پلاستید توتون استفاده گردید (DeGray *et al.*, 2001). مقایسه ناحیه جداگر بین ژنی در میان اعضای خانواده سولاناسه نشان داد که فقط در ۴ ناحیه مشابه هستند (Daniell, 2006). مقایسه نواحی بین ژنی

از ژن مورد نظر الحق شود؛ در برداشتن *ori* کلروپلاستی که باعث می‌شود پلاسمید حاوی ژن تا زمانی که بتواند ژن مورد نظر را در ژنوم کلروپلاستی الحق کند در ژنوم حفظ شود؛ حفاظت شدگی زیاد توالی در بین گیاهان مختلف وجود جایگاه‌های آنزیمی منحصر به فرد و حفاظت شده، در وسط این توالی، به منظور کلون کردن ژن مورد نظر. پیشنهاد یک حامل همگانی (*tm1 atmA*) که ژن‌های Universal vector از ناحیه IR ژنوم کلروپلاستی توتون را به عنوان توالی‌های مجاور به منظور نوترکیبی همولوگ شامل شود و استفاده از آن برای انتقال ژن به ژنوم کلروپلاستی گونه‌های گیاهی دیگر (که توالی ژنوم پلاستیدی آنها تعیین نشده است) چندین سال پیش پیشنهاد گردید (Daniell *et al.*, 1998). در این تحقیق میزان همولوژی نواحی مورد نظر برای هدف گیری ژن به ژنوم کلروپلاستی گیاهان مختلف با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. این مقایسات نشان داد که علی‌رغم شباهت بالای این قطعات، تفاوت‌های زیادی نیز قبل مشاهده است. با توجه به اینکه وجود شباهت صد در صد توالی کلروپلاستی مورد استفاده در حامل، در بالا رفتن کارایی انتقال ژن، تأثیر به سزاگی دارد و علت آن نیز بالا رفتن ایجاد نوترکیبی همولوگ برای ورود قطعات به داخل ژنوم کلروپلاستی می‌باشد، بنابراین علاوه بر اینکه حامل‌های پلاسمیدی ساخته شده در این تحقیق، به دلیل دارا بودن توالی حفاظت شده بین ژنی، قابل استفاده برای انتقال ژن به کلروپلاست دائمی گستره‌ای از گیاهان، از دو پله تا تک لپه می‌باشد،

نگردید.

استفاده از نشانگر *badh* در حامل کلروپلاستی طراحی شده در این تحقیق قادر است علاوه بر اینکه نگرانی‌های ایمنی زیستی نشانگرهای آنتی بیوتیکی را کاهش دهد، در گیاهانی که این ژن را دریافت می‌کنند صفت مقاومت به سوری، خشکی و سرما را نیز ایجاد نماید. مراحل انتخاب شامل تبدیل بتائین آلدھید (BA) سمتی، توسط آنزیم BADH به گلایسین بتائین غیرسمی است که به عنوان یک تنظیم کننده اسمرزی نیز عمل می‌کند. دانیل و همکاران (Daniell *et al.*, 2001) گزارش کرده بودند که تکثیر سریع گیاهان حاصل از کلروپلاست تاریخت، تحت انتخاب BA و کارایی بالای تراریزش که ۲۵ برابر بالاتر از زمانی بود که اسپکتینومایسین به عنوان نشانگر استفاده می‌شد، از جمله مزایای استفاده از BADH به عنوان ژن Daniell *et al.*, 2001a; (Daniell *et al.*, 2001b).

از سوی دیگر در این تحقیق با افزودن نواحی تنظیمی مختلف شامل پیشبرها و پایانبرهای دائمی کلروپلاستی (*rbcL* *psbA* *rrn*) و القایی (*groE*، *groL*)، نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاههای آنزیمی مناسب ورود ژن برای بیان انفرادی و یا پلی‌سیسترونی، ژن‌های گزارشگر و ژن‌های نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی و غیرآنتی‌بیوتیکی و توالی‌هایی برای حذف ژن نشانگر پس از انتقال ژن، تلاش شد تا انواع مختلفی از حامل‌های کلروپلاستی ساخته شوند تا بتوان بیان هر ژن خارجی را به طور دلخواه در ژنوم‌های پلاستیدی گیاهان مختلف به صورت کارا امکان‌پذیر نمود. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که در این تحقیق راه برای تهیه حامل‌های پلاستیدی اختصاصی و دارای کارایی بالا برای هر گونه گیاهی هموار شده باشد که راه را برای مهندسی پلاستید گیاهان باز خواهد نمود. حامل‌های pFNGi و pFNGj ساخته شده در این تحقیق مناسب

ژنوم‌های کلروپلاستی گندمیان نیز ثابت کرد که حتی یک ناحیه بین ژنی منفرد نیز در میان ژنوم‌های کلروپلاستی توالی بابی شده، مشابه نیست (Saski *et al.*, 2007)، بنابراین مفهوم یک حامل همگانی وقتی کاربردی است که سطح بالایی از همولوژی در میان گونه‌های گیاهی موجود باشد، اما دارای کارایی کمتری نسبت به حامل‌های کلروپلاستی مختص گونه خواهد بود. نتایج تحقیقات مذکور نشان دادند که فقدان همولوژی کامل می‌تواند کارایی انتقال ژن را به میزان زیادی کاهش دهد، لذا این تحقیق با جداسازی ناحیه هدف گیری کننده به کلروپلاست گیاهان مختلف و تنها با یک جفت آغازگر با جایگاه حفاظت شده اتصال در پلاستوم گیاهان مختلف راه را برای ساخت حامل‌های کلروپلاستی مختص گونه هموار نموده است و مشکل استفاده از حامل‌های عمومی را که با کاهش کارایی انتقال ژن همراه است را برطرف خواهد نمود.

در این تحقیق با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژنوم‌های پلاستیدی موجود در بانک‌های اطلاعاتی، یک جفت آغازگر طوری برای جداسازی ناحیه هدف گیری کننده به پلاستوم طراحی شد که دارای شباهت صد در صدی در تمامی پلاستوم‌های گیاهی توالی بابی شده موجود در بانک ژن باشد، لذا انتظار بر این است که بتوان با موفقیت از این جفت آغازگر برای جداسازی ناحیه هدف گیری کننده به پلاستوم سایر گیاهانی که توالی ژنوم پلاستیدی آنها در دسترس نیست نیز استفاده نمود، به طوری که با استفاده از این آغازگرها ناحیه مذکور از کلزا و لیموترش که توالی ژنوم کلروپلاستی آنها در بانک ژن موجود نبود، جداسازی و کلون شد. این آغازگرها حتی برای چند گیاه دیگر نیز مورد آزمایش قرار گرفت (از جمله درختچه زینتی ملچ) و در تمامی موارد ناحیه مذکور با موفقیت تکثیر گردید، ولی با توجه به اینکه در حال حاضر ساخت حامل کلروپلاستی برای آنها مدنظر نبود، تحت کلون‌سازی قرار نگرفته و اطلاعات آنها نیز ارائه

می‌کند که می‌توان از آن به عنوان یک روش کارآمد و سازگار با مسائل زیست محیطی، برای ایجاد صفات با ارزش زراعی و نیز استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورهایی مناسب برای تولید پروتئینهای درمانی، واکسن‌ها و مواد زیستی، استفاده نمود.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

برای انتقال ژن به کلروپلاست بوده و به ترتیب با جایگزینی ژن‌های دلخواه به جای *gfp* در آنها می‌توان بر حسب نیاز، پروتئین مورد نظر را به صورت القایی و غیر القایی در پلاستیدها بیان نمود. اگر بیان مختص بافت پروتئین نوتروکیپ مدنظر باشد، می‌توان پیشبر *groE* را در pFNGi با پیشبر مختص بافت دلخواه جایگزین نمود. مهندسی ژنتیک کلروپلاست، نوید بزرگی برای بیوتکنولوژی گیاهی است. پیشرفت‌های اخیر انتقال ژن به پلاستید، فناوری مهندسی پلاستید را به عنوان گرینهای جایگزین برای ترازیزش هسته‌ای مطرح

References

منابع مورد استفاده

- Clarke, J. L., H. Daniell.** 2011. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.* 77(1-2): 203.
- Daniell, H.** 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotech.* J. 1: 1071–1079.
- Daniell, H., R. Datta, S. Varma, S. Gray and S. B. Lee.** 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Natur. Biotechnol.* 16: 345–348.
- Daniell, H.** 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Natur. Biotechnol.* 20: 581–586.
- Daniell, H. and A. Dhingra.** 2002. Multigene engineering: Dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr. Opinion Biotechnol.* 13(2): 136–141.
- Daniell, H., M. Khan and L. Allison.** 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7(2): 84–91.
- Daniell, H., B. Muthukumar and S. B. Lee.** 2001a. Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet.* 39: 109–116.
- Daniell, H., P. Wiebe and A. Fernandez-San Millan.** 2001b. Antibiotic-free chloroplast genetic engineering—an environmentally friendly approach. *Trends Plant Sci.* 6: 237–239.
- De Cosa, B., W. Moar, S. B. Lee, M. Miller and H. Daniell.** 2001. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Natur. Biotechnol.* 19: 71–74.
- DeGray, G., K. Rajasekaran, F. Smith, J. Sanford and H. Daniell.** 2001. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127: 852–862.
- Dufourmantel, N., B. Pelissier, F. Garcon, J. M. Peltier and G. Tissot.** 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* 55(4): 479–89.

- Kumar, S., A. Dhingra and H. Daniell.** 2004a. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136(1): 2843–2854.
- Kumar, S., A. Dhingra and H. Daniell.** 2004b. Manipulation of gene expression facilitates cotton plastid transformation of cotton by somatic embryogenesis and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol. Biol.* 56(2): 203–216.
- Lee, S. B., H. B. Kwon., S. J. Kwon., S. C. Park, M. J. Jeong, S. E. Han and H. Daniell.** 2003. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breed.* 11: 1–13.
- Maliga, P.** 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol.* 21: 21-28.
- Maliga, P.** 2004. Plastid transformation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55:289-313.
- Maliga, P.** 2005. New vectors and marker excision systems mark progress in engineering the plastid genome of higher plants. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4: 971-976.
- Monde, R. A., J. C. Greene and D. B. Stern.** 2000. The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 30-end maturation. RNA accumulation and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 44: 529–542.
- Ruf, S., M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer and R. Bock.** 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Natur. Biotechnol.* 19: 870–875.
- Ruhlman, T., D. Verma, N. Samson and H. Daniell.** 2010. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiol.* 152: 2088–2104.
- Ruiz, O. N., H. Hussein, N. Terry and H. Daniell.** 2003. Phytoremediationof organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.* 132: 1344–1352.
- Sambrook, J. and D. W. Russel.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Saski, C., S. B. Lee, S. Fjellheim, C. Guda, R. K. Jansen, H. Luo, J. Tomkins, O. A. Rognli, H. Daniell and J. L. Clarke.** 2007. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera* and comparative analyses with other grass genomes. *Theor. Appl. Genet.* 115: 571–590.
- Sidorov, V. A., D. Kasten, S. Z. Pang, P. T. J. Hajdukiewicz, J. M. Staub and N. S. Nehra.** 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19: 209–216.
- Anonymous.** 2004. Opinion of the scientific panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N° EFSA-Q-2003-109). The EFSA J. 48: 1-18.
- Tombolini, R. and J. K. Jansson.** 1998. Monitoring of GFP-Tagged Bacterial Cells. In: LaRossa R. A. *Bioluminescence Methods and Protocols*, Humana Press, 285-298.
- Verma, D. and H. Daniell.** 2007. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol.* 145: 1129-1143.

Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation

Mohsenpour, M¹, M. Tohidfar² and N. A. Babaian-Jelodar³

ABSTRACT

Mohsenpour, M., M. Tohidfar and N. A. Babaian-Jelodar. 2012. Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 14(3): 218-234. (In Persian).

Integration of foreign genes into plastid genomes occur through homologous recombination between flanking sequences of gene in plastid vectors. In this study, by analysis of plastid genomes using bioinformatics databases, we succeed to select a region of plastome as alien gene targeting sequence including the appropriate length for homologous recombination and integration in plastome, specific plastid origin of replication, targeting gene to inverted repeat region of plastid genome and unique restriction enzymes recognition sites in the center of flanking region sequences for alien gene integration. Since similarity (%) of the flanking region sequences would increase transformation efficiency of plastome dramatically, therefore, a pair of primers was designed to isolate the plastome flanking regions. These primers were 100% similar to all plant plastomes, but the length and sequence of their amplified fragments were variable in different plant plastomes. Flanking region sequence from tobacco, cotton, corn, lettuce, tomato, carrot, and even the canola and lemon plastomes that still their plastome sequences are not available in Gene Bank were isolated and cloned. The accuracy of cloning, present and direction of flanking regions fragment from different plant plastomes were confirmed by enzymatic digestion analysis using *HindIII* and *BamHI*. Then different types of chloroplastid vectors using different regulation elements were constructed. The regulation elements that could be used for efficient expression of any alien genes in different plastids were including plastid constitutive or inducing promoters and terminators, suitable untranslated regions, Ribosome binding sites of plastid, suitable restriction enzyme recognition sites for cloning and expression of desired gene in single or polycistronic status, reporter genes, antibiotic or non-antibiotic markers and sequences for removing of marker gene. These recombinant chloroplast plasmids including pFNGi and pFNG can be used as universal and specific vectors for chloroplast transformation. Thus, in this study we succeeded to design the high efficient and specific plastid vectors, not only for plants which their plastomes were completely sequenced, but also for other plant species that there is not any sequence of their plastomes availaable in databanks.

Keywords: Plastome, Specific chloroplastic vectors and Transformation.

Received: November, 2011 Accepted: April, 2012

1- Ph.D. in Plant Breeding, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
(Corresponding author) (Email: mthrm@yahoo.com)

2- Assistant Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
3- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran