"مجله علوم زراعی ایران"
جلد چهاردهم، شماره۳ پاییز ۱۳۹۱

طراحی و ساخت سازه‌های پلاسمیدی مختص انتقال هدفمند ژن به ژنوم کلروپلاستی

Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation

مطهره محسن‌پور[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. ۱۴(۳): ۲۳۴-۲۱۸.**

الحاق ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی از طریق نوترکیبی همتا بین توالی‌های مجاور آن ژن در حامل‌های کلروپلاستی، رخ می‌دهد. از آنجایی که شباهت صد در صدی توالی هدف‌گیری‌کننده کارایی تراریختی پلاستوم را به طور چشمگیری افزایش خواهد داد، یک جفت پرایمر برای جداسازی این ناحیه طوری طراحی گردید که دارای شباهت صد در صدی در تمامی پلاستوم‌های گیاهی باشد، ولی طول و توالی ناحیهٔ 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 توالی‌یابی نشده است، جداسازی و کلون‌سازی گردید. حضور و جهت ناحیه جداشده از پلاستوم گیاهان مختلف و صحت کلون‌سازی، توسط آنزیم‌های مختلف و از جمله *Hind*III و *Bam*HI مورد تایید قرار گرفت. سپس با افزودن نواحی تنظیمی مختلف شامل پیشبرها و پایانبرهای دائمی کلروپلاستی و القایی، نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاه‌های آنزیمی مناسبِ 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 مختلف به صورت کارآمد امکان‌پذیر نمود که سازه‌های کلروپلاستی pFNGi، pFNG 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 گونهٔ گیاهی دیگری که توالی پلاستومی آن در دسترس نیست نیز حامل پلاستیدی اختصاصی و دارای کارایی بالا تهیه شد.

واژه‌های کلیدی: پلاستوم، تراریزش 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:mthrhm@yahoo.com)
۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

مقدمه

ژنوم کلروپلاستی (پلاستوم) گیاهان دارای سازماندهی بسیار حفاظت‌شده‌ای است. این ژنوم یک کروموزوم منفرد حلقوی ودارای همانندسازی مستقل بوده که می‌توان چهار قسمت برای آن در نظر گرفت.این قسمت‌ها شامل دو نسخه یکسان از یک تکرار معکوس (Inverted repeat, IR) می‌باشد که نواحی تک نسخه‌ای بزرگ (LSC) و تک نسخه‌ای کوچک (SSC) را از هم جدا می‌کند. فقدان اطلاعات ژنومی کلروپلاستی در گذشته کاربرد تکنولوژی تراریزش پلاستید را در بسیاری از محصولات محدود کرده بود (Daniell *et a.l*, 2006; Ruhlman 2010; Clarke and Daniell 2011). در سال‌های اخیر با افزایش تعداد پلاستوم‌هایی که به طور کامل توالی‌یابی شده‌اند و در دسترس بودن آنها از طریق پایگاه‌های بیوانفورماتیک، 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 نگه‌داشتن ترانسژن از طریق وراثت مادری(Daniell, 2002)، فقدان خاموشی ژن (De Cosa *et al*, 2001; Lee *et al*, 2003)، فقدان اثرات مکانی (Daniell *et al*, 2002) و پلیوتروپیک (Lee *et al*, 2003) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد. برای اصلاح پایدار پلاستیدها لازم است که DNAی انتقالی، با استفاده از توالی‌های همولوگ به مکان مشخصی از ژنوم پلاستید هدف‌گیری شود. 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 موفقیت در انتقال ژن محسوب می‌شوند (Dufourmantel*et al*, 2004; Kumar *et al*, 2004a; kumar *et al*, 2004b). ناقل‌هایی که برای تراریزش کلروپلاست استفاده می‌شوند، دارای توالی‌های مجاور گرفته شده از توتون یا آرابیدوپسیس هستند که می‌تواند یکی از دلایل پایین بودن کارایی تراریزش در سایر محصولات باشد. در حالی که ساخت ناقل‌های اختصاصی هر گونه گیاهی که در آنها از توالی‌های اختصاصی همان گونه استفاده می‌شود، به طور چشمگیری کارایی تراریزش پلاستید را افزایش می‌دهد (Verma and Daniell, 2007). دفرمانتل (Dufourmantel,2004) و کومار (Kumar, 2004a,b) با ساخت ناقل‌های اختصاصی به ترتیب برای سویا، هویج و پنبه، افزایش کارایی انتقال ژن به پلاستید گیاهان مذکور را گزارش دادند.

ناقل‌های انتقال ژن به پلاستید از ناقل‌های *E. coli* مشتق شده‌اند که در آنها توالی‌های DNA کلروپلاستی با طول یک تا دو کیلوباز در هر دو طرف یک ژن نشانگر انتخابی کلون‌سازی می‌شود و محل‌هایی نیز برای کلون‌کردن ژن مورد نظر در آنها تعبیه خواهد شد. توالی‌های ژنوم کلروپلاستی(ptDNA) به عنوان نواحی مجاور (FR, Flanking region) یا توالی‌های هدف‌گیری‌کننده برای الحاق مستقیم قطعات مورد نظر به داخل ژنوم پلاستید عمل می‌کنند (Maliga, 2005) گزارش شده است که ورود ژن نشانگر هیچ تداخلی با بیان ژن‌های پلاستیدی مجاور ۱۴ ناحیه بین ژنی در پلاستوم نداشت. قطعات DNAی پلاستیدی که حاوی هر یک از این ۱۴ مکان ورود بین ژنی خنثی می‌باشند، این قابلیت را دارند که برای طراحی حامل‌های انتقال ژن به پلاستید از آنها استفاده شود (Maliga, 2005). اغلب ژن‌های کلروپلاست در گروه‌های ژنی رونویسی می‌شوند. این موضوع اجازه می‌دهد دو یا چند چارچوب بازخواندن (ORF)، به درون یک ناقل، در توالی‌هایی تحت یک پیشبر وارد شوند. نشانگر انتخابی و ژن‌های دلخواه بین پیشبر و

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

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 5'PL (Promoter&Leader) و یک کاست T (Terminator)، استفاده می‌شود. کاست PL شامل یک پیشبر و توالی‌های کنترل‌کنندهٔ ترجمه می‌باشد. توالی‌های کنترل‌کنندهٔ ترجمه ممکن است نواحی بدون ترجمهٔ ´۵ از mRNA (5'UTR) و یا ناحیهٔ کنترل ترجمهٔ ´۵ (TCR, Translation Control Region) باشند که شامل 5'UTR و یک قطعهٔ پایانهٔ N از ناحیهٔ کدکننده را شامل می‌شود. ناحیهٔ 5'UTR از mRNA معمولاً شامل یک ساختار ساقه–حلقه (Stem-Loop) است که برای پایداری mRNA مورد نیاز می‌باشد و توالی هایی دارد که حرکت mRNAها را روی ریبوزوم تسهیل می‌کنند. کاست T، ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ´۳ از mRNA (3'UTR) را کد می‌کند که این قسمت نیز یک ساختار ساقه – حلقه را شامل می‌شود. ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ´۳ به عنوان یک پایانبر رونویسی عمل می‌کند و برای پایداری mRNA موردنیاز است (Monde *et al.*, 2000).

با توجه به اینکه همولوژی بالای توالی‌های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی‌همولوگ و برای هدف‌گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی، از عوامل مهم موفقیت 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 ناحیهٔ مناسبی از ژنوم پلاستومی برای هدف‌گیری و الحاق ژن خارجی و جداسازی و کلون‌کردن آنها جهت انتقال ژن کارا به کلروپلاست دامنهٔ گسترده‌ای از گیاهان بوده است.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های بیوانفورماتیکی

برای یافتن بهترین محل الحاق ژن به ژنوم کلروپلاستی،توالی کامل ژنوم‌های کلروپلاستی چندین گونهٔ گیاهی از NCBI دریافت شد. مقایسهٔ نواحی بین ژنی پلاستوم برای هدف‌گیری ژن مورد نظر، انجام گرفت. آغازگرهای لازم برای جداسازی ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده به پلاستوم گیاهان مختلف، از محلی طراحی شدند که دارای همولوژی ۱۰۰ درصد توالی در ژنوم‌های کلروپلاستی تمامی گیاهانی باشند که توالی ژنوم پلاستیدی آنها از طریق بانک ژن در دسترس است. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار OligoTech انجام و در نرم‌افزار Vector NTI مورد آنالیز قرار گرفت. از آنجایی که طول ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده 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 کیلوبازاز پلاستید گیاهان مختلف تکثیر نماید که شامل ori و جایگاه منحصر به فرد آنزیمی باشد.

جداسازی ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده

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

کلون کردن ناحیهٔ هدف گیری‌کننده و ساخت حامل نوترکیب

واکنش اتصال قطعهٔ مربوط به ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده اختصاصی ژنوم کلروپلاستی توتون،

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

پنبه، کلزا، گوجه‌فرنگی، هویج، کاهو، ذرت و لیموترش با حامل pJET1.2 (شرکت Fermentas)، به صورت کلون‌کردن انتهای صاف انجام گرفت. اثبات تراریختی پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های حاصل، با استفاده از هضم آنزیمی و PCR انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل که ناحیهٔ مجاور کلروپلاستی (FR) را دربرداشتند، به pJET-FR موسوم شدند. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (Sambrook and Russel, 2001) انجام گرفت.

طراحی نواحی تنظیمی و ژن‌های نشانگر و گزارشگر برای حامل‌های پلاستیدی

یک توالی شامل نواحی تنظیمی کلروپلاستی، ژن‌های نشانگر و جایگاه‌های مناسب آنزیمی برای واردکردن ژن‌های خارجی موردنظر و دستکاری‌های ژنتیکی لازم به شرح زیر طراحی گردید. این توالی ساختگی طوری طراحی شد که بتوان چندین ناقل کلروپلاستی مختلف را با توالی‌های تنظیمی و نشانگرهای موردنیاز از آن مشتق نمود. برای طراحی این توالی ساختگی، ردیف‌های نوکلئوتیدی زیر از NCBI دریافت شدند:۱) پیشبرهای Prrn، P*psbA* و *groE*؛ ۲)نواحی بدون ترجمهٔ Un-Translated Region (UTR)۵ (5'UTR) شامل *rbcl*، *T7*gene10 و *atpB*؛۳)نواحی بدون ترجمهٔ ۳' (3'UTR) یا پایانبرهای T*rbcl*، T*psbA* و Thr attenator؛۴) توالی *loxP*؛۵) ناحیهٔ اتصال ریبوزوم (RBS) کلروپلاستی؛۶) ژن‌های نشانگر *badh*، *neo* و ژن گزارشگر *gfp*. ژن‌های نشانگر به منظور حذف جایگاه‌های آنزیم‌های برشی موجود در داخل توالی ژن تغییر داده شدند. این بهینه‌سازی کدونی با تغییر نوکلئوتید بدون تغییر اسیدآمینه انجام شد. علاوه بر پیشبرهای کلروپلاستی همیشگی (Constitutive) (Prrn و P*psbA*)، پیشبر القایی شوک حرارتی *E. coli* در این تحقیق برای طراحی حامل‌های پلاستیدی در نظر گرفته شد. این توالی ساختگی پس از طراحی،برای ساخت به شرکت MilleGen سفارش داده شد و پس از دریافت قطعه از شرکت، دستکاری‌های لازم برای حذف و اضافه کردن قطعات موردنظر به منظور مشتق‌نمودن چندین ناقل کاربردی مختلف از آن انجام گردید. توالی‌های مشتق‌شده در ناقل pJET1.2 همسانه‌سازی شدند و سپس در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده به پلاستیددر ناقل نوترکیب pJET-FR که مراحل ساخت آن قبلاً ذکر شد، کلون‌سازی مجدد شدند. تعدادی از ناقل‌های ساخته‌شده در این تحقیق در ادامه شرح داده شده است.

طراحی و ساخت کاست ژن نشانگر *neo* ادغام شده با زیرواحد بزرگ *atp*B بین توالی‌های *lox*P

در این تحقیق از ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز II (APH(3')-II; NPTII) موسوم به *neo* در ساخت حامل کلروپلاستی استفاده گردید. نتایج آزمایش‌ها نشان داده است که اضافه کردن اسیدآمینه‌های پایانهٔ N از *atpB* به عنوان 5'UTR باعث افزایش بیان ژن *neo* در پلاستیدها می‌شود (Maliga, 2003)، لذا پس از حذف دو جایگاه آنزیمی داخلی *Pvu*II و *Sph*I از ژن مذکور، ۹۰ جفت باز از ناحیهٔ بدون ترجمه *atpB* 5'UTR به ابتدای ژن *neo* اضافه شد و پس از قرار دادن ۸ نوکلئوتید ایجادکنندهٔ یک جایگاه آنزیمی، ۴۲ جفت‌باز کدکنندهٔ ۱۴ اسیدآمینهٔ پایانهٔ N زیرواحد بتای پروتئین ATP سینتاز توتون که کدون آغازین ATG را دربرداشت به صورت همجوش با *neo* قرار داده شد. توالی به دست آمده تحت پیشبر و پایانبر *psbA* کلروپلاستی و در میان دو توالی تکرار شدهٔ مستقیم ۳۴ جفت‌بازی *loxP* و در حامل pJET1.2 (شرکت Fermentas) کلون‌سازی اولیه گردید. یک جایگاه اتصال به ریبوزوم کلروپلاستی نیز پس از ژن *neo* و قبل از پایانبر T*psbA* برای کلون‌سازی ژن‌های دلخواه به صورت پلی‌سیسترونی با *neo* در این حامل کلروپلاستی در نظر گرفته شد. صحت مراحل کلون‌سازی حامل نوترکیب حاصل توسط هضم آنزیمی و PCR مورد بررسی قرار گرفت.به منظور

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

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

طراحی و ساخت حامل بیانی Expression vector کلروپلاستی دارای پیشبر باکتریایی *groE*

پیشبر *groE*ی باکتری *E. coli* به همراه جایگاه اتصال به ریبوزوم، پایانبر ترئونین و جایگاه‌های آنزیمی مناسب در پلاسمید pJET1.2 کلون‌سازی گردید و صحت مراحل کلون‌سازی حامل نوترکیب حاصل با هضم آنزیمی و PCR تأیید گردید. به منظور اثبات عملکردی‌بودن 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 آنزیمی داخلی *Nde*I، *Afl*II، *Cla*I و *Pvu*II، بدون تغییر اسیدآمینه، تحت پیشبر مذکور قرار داده شد. القای بیان ژن *gfp* در باکتری *E.coli* نوترکیب پس از اعمال شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مشاهدهٔ باکتری‌ها زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت (Tombolini and Jansson, 1998)به اثبات رسید.

طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp*

ژن *gfp* که تحت پیشبر *groE* و پایانبر ترئونین قرار داده شده بود، در فرودست کاست ژنی *neo* تحت پیشبر و پایانبر کلروپلاستی *psb*A کلون‌سازی شد. کلونی‌هایی که پس از تراریزش باکتری مستعد *E. coli* سویهٔ XLI-Blue روی محیط انتخابی حاوی هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کرده بودند، پس از استخراج پلاسمید تحت آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی قرار داده شدند. پلاسمید نوترکیب حاصل که ۵۵۴۳ جفت باز طول داشت، به pNGi نامیده شد. در مرحلهٔ بعد، کاست هر دو ژن *neo* و *gfp* با استفاده از آنزیم *Sph*I تحت هضم آنزیمی قرار گرفت. باندهای مورد انتظار ۲۹۸۸bp و ۲۵۵۵bp بودند (شکل ۴a) که باند ۲۵۵۵ جفت‌بازی مربوط به قطعهٔ *neogfpi* از روی ژل آگارز خالص‌سازی گردید. در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی با طول حدود ۴Kb از ناقل pJET-FR که با آنزیم مذکور برش خورده و با استفاده از تیمار با آنزیم آلکالین فسفاتاز برای جلوگیری از خوداتصالی پلاسمیدی فسفرزدایی شده بود، کلون‌سازی مجدد گردید. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با رشد روی محیط انتخابی حاوی هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین انتخاب شدند. آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی به منظور اثبات صحت کلون‌سازی و تعیین جهت ورود توالی‌های ژنی در مرکز توالی هدف‌گیری‌کنندهٔ کلروپلاستی انجام گردید. حامل پلاسمیدی نوترکیب حاصل pFNGi نامیده شد و ۹۳۹۶ جفت باز طول دارد.

بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پروموتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب

برای اثبات عملکردی بودن جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) کلروپلاست که بعد از ژن *neo* و قبل از پایانبر *psbA* درنظر گرفته شده بود و اثبات بیان ژن موردنظر به صورت پلی‌سیسترونی بعد از ژن نشانگر *neo*، بدین ترتیب عمل شد که حامل pNGi با آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I تحت هضم آنزیمی ناقص قرار گرفت. قطعهٔ موردنظربا 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 ستفاده از آنزیم کلنو (Roche) تیمار شد تا پایانه‌های چسبندهٔ آن به پایانه‌های صاف تبدیل شوند. حلقوی‌کردن مجدد قطعهٔ مذکور با انجام واکنش اتصال، منجر به قرارگرفتن 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

عملکردی بودن بیان پروتئین به صورت پلی‌سیسترونی و تحت RBS کلروپلاستی در این حامل نوترکیب موسوم به pNG، با مشاهدهٔ پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت بررسی گردید. سپس کاست مربوط به *neogfp* پلی‌سیسترونی با استفاده از آنزیم *Sph*I تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و پس از خالص‌سازی قطعهٔ ۲۱۱۸ جفت بازی از روی ژل آگارز، این قطعه در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی در حامل نوترکیب pJET-FR پس از هضم و فسفرزدایی کلون‌سازی مجدد گردید. حامل پلاسمیدی حاصل موسوم به pFNG به منظور اثبات صحت کلون‌سازی تحت آنالیزهای PCR و هضم آنزیمی قرار داده شد.

استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دِهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی

توالی ژن بتائین‌آلدهید دِهیدروژناز (*badh*) از منشأ اسفناج (*Spinacia aleracea*) از NCBI دریافت شد. با تغییر توالی نوکلئوتیدی بدون تغییر در اسیدآمینه، جایگاه‌های آنزیمی داخلی ناحیهٔ کدکنندهٔ این ژن حذف گردید. جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های اندونوکلئاز نوع دوم که از توالی مذکور حذف شدند عبارت بود از: آنزیم‌های *Pvu*II و *Xba*I که هر کدام دو جایگاه و آنزیم‌های *Afl*II، *Eco*RI، *Hind*III و *Eco*RV، که هر کدام یک جایگاه شناسایی در توالی مذکور دارا بودند. افزایش درصد آدنین-تیمین نیز در این بهینه‌سازی کدونی مورد توجه قرار گرفت. توالی نهایی ژن *badh* به ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ۵' مربوط به *T7* gene10 فاژی متصل گردید و تحت پیشبر کلروپلاستی P*rrn* (پیشبر قوی اپرون rRNAی ریبوزومی) قرار داده شد. بین پیشبر و ژن *badh* محلی برای اتصال به ریبوزوم با توالی GGAGG تعبیه و جایگاه‌های آنزیمی برای کلون‌سازی ژن‌های دلخواه دیگر در نظر گرفته شد. با کلون‌سازی ژن‌های موردنظر در این مکان، این ژن‌ها به صورت پلی‌سیسترونی با ژن *badh* بیان خواهند شد و انتقال ژن به پلاستید بدون نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی امکان‌پذیر می‌گردد.

نتایج و بحث

پس از جستجو برای انتخاب ناحیهٔ هدف‌گیری کنندهٔ کلروپلاستی که oriی پلاستیدی را نیز دربرداشته باشد، ناحیهٔ 16SrRNA\23SrRNA و فاصلهٔ دوم(Spacer2) ژن‌های *trn* ایزولوسین و آلانین، به عنوان ناحیهٔ الحاق ژن‌های خارجی انتخاب شد. این ناحیه در قسمت تکرار معکوس ژنوم کلروپلاستی قرار داشته و بنابراین الحاق قطعات در این ناحیه منجر به حضور دو نسخه از ژن مورد نظر در هر پلاستوم خواهد شد.

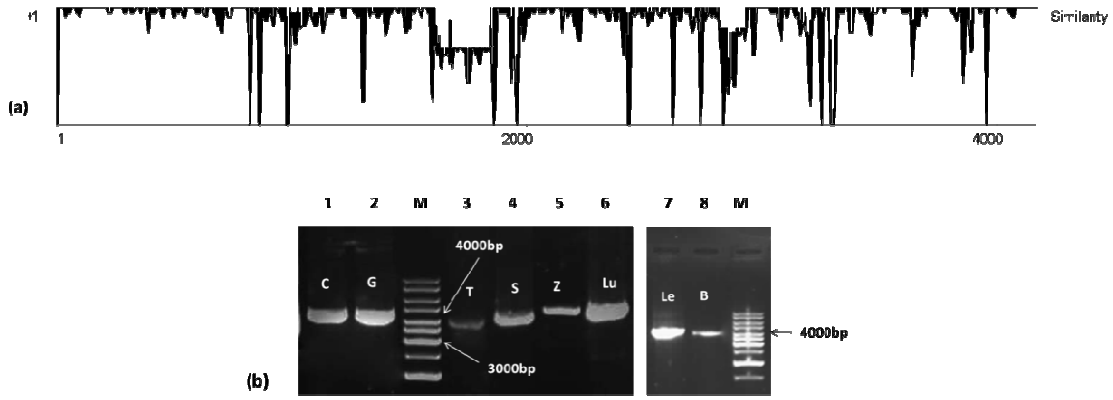
هم‌ردیفی (Align) این ناحیهٔ هدف‌گیری کنندهٔ کلروپلاستی در ژنوم‌های توتون، پنبه، گوجه‌فرنگی، کاهو و هویج و ذرت، که با استفاده از نرم‌افزار VectorNTI انجام شد، نشان داد که ناحیهٔ *ori* در حدود ۷۰۰bp با ناحیهٔ بین ژنی *trnI/trnA* فاصله دارد و نقاط با شباهت کامل (Identity positions) ناحیهٔ ori در بین این شش گیاه ۹۵/۹ درصد محاسبه شد. ناحیهٔ Spa2 به عنوان مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده درنظر گرفته شد و جستجو برای یافتن نقاط حفاظت‌شده برای طراحی پرایمر از حدود ۲kb بالادست این ناحیه برای طراحی پرایمر رو به جلو (Forward) و ۲kb پایین‌دست این ناحیه برای طراحی پرایمر رو به عقب (Reverse) با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI انجام شد. پرایمرهای طراحی شده، در شش گیاه مذکور دارای شباهت صد درصدی بودند و علاوه بر این توالی پرایمرهای مذکور روی توالی سایر ژنوم‌های کلروپلاستی موجود در بانک ژن نیز مورد آنالیز قرار گرفت و شباهت صد در صدی نشان داد.

قطعاتی با طول مورد انتظار ۴۱۸۴bp از هویج، ۴۲۲۷bp از پنبه، ۴۲۰۵bp از کاهو، ۳۹۸۵bp از گوجه‌فرنگی، ۴۲۰۸bp از ذرت و ۳۸۶۷bp از توتون

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

جدا شد. توالی ژنوم کلروپلاستی کلزا و لیموترش در بانک ژن موجود نبود و استفاده از آغازگرهای مذکور برای تکثیر ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده 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 کلون‌سازی شدند. با توجه به اینکه کلون‌سازی به صورت انتهای صاف انجام شد. امکان ورود قطعات در دو جهت در ناقل مذکور وجود داشت. با وجود اینکه آنالیز هم‌ردیفی ناحیهٔ‌جداشده 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 نوکلئوتیدهای حدود ۱۶۰۰ تا ۱۸۶۰ از توالی نوکلئوتیدی مشترک (Consensus) در پلاستوم توتون وجود ندارد.



شکل ۱- (a) آنالیز شباهت ناحیه هدف‌گیری کننده به ژنوم کلروپلاستی جداشده از ژنوم‌های پلاستیدی هویج، کاهو، پنبه، گوجه‌فرنگی، توتون 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): تکثیرناحیه هدف‌گیری 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. توتون (T=*Tobacco*)؛ ۴. گوجه فرنگی (S=*Solanum*)؛ ۵. ذرت (Z=*Zea*)؛ ۶. کاهو (Lu=*Luctoca*)؛ ۷. لیموترش (Le=*Lemon*)؛ ۸. کلزا (B=*Brassica*).

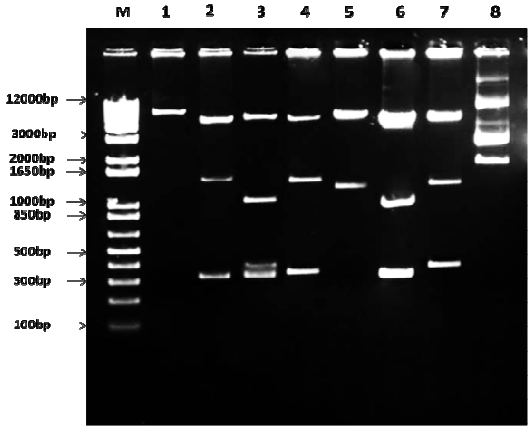
Horizontal lineindicates thesequences length thatisolatedfromabove plant plastoms that are about 4000 bp. Theverticallineindicates the similarity of sequences.Lines that come down in the chart meanthatthe similarity of this partofsequencesislowrelative to each other.
(b): Amplification of plastom flanking regions of different plants using primers designed in this research. 1. Carrot (C); 2. Cotton (G=*Gossypium*); 3. Tobacco (T); 4. Tomato (S=*Solanum*); 5. Corn (Z=*Zea*); *Luctoca* (Lu); 7. *Lemon* (Le); 8. Canola (B=*Brasica*)

آنالیزهای ناحیهٔ هدف‌گیری‌کنندهٔ کلون‌شده

بررسی توالی فاصلهٔ دوم(Spacer2) ناحیهٔ بین ژنی *trnI/trnA* با طول ۶۴bp در ۵ گیاه توتون، پنبه، گوجه‌فرنگی، هویج و کاهو نشان داد که این ناحیه ۸۳/۱ درصد از توالی نوکلئوتیدی کاملاً یکسان در این گیاهان برخوردار است. سپس ناحیهٔ مذکور از نظر جایگاه‌های آنزیمی محدودکننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جایگاه شناسایی آنزیم *Pvu*II در تمامی گیاهان مورد بررسی در این ناحیه وجود دارد و در کل ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده، منحصر به فرد می‌باشد. بررسی‌های بیشتر از طریق Blast نوکلئوتیدی، 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 الحاق توالی مورد نظر

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]
[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

در مرکز ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده شناخته شد. از آنجایی که آنزیم مذکور صاف‌بُر بوده و کلون‌کردن ژن آن مشکل می‌باشد، جستجو برای سایر جایگاه‌های آنزیمی در این ناحیه، حضور جایگاه برشی آنزیم *Sph*I را در توتون، پنبه، هویج و کاهو نشان داد. این جایگاه در گیاهان مذکور در فاصلهٔ بین محل طراحی آغازگرهای این تحقیق منحصر به فرد بوده ولی در تمامی ژنوم‌های کلروپلاستی به صورت حفاظت‌شده



شکل ۲- آنالیز هضم آنزیمی حامل‌های اختصاصی کلروپلاستی ساخته‌شده برای هشت نوع گیاه با آنزیم *Bam*HI.

Fig. 2. Enzymatic digestion analysis of plastid vectors that constructed for 8 plants using *Bam*HI

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

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

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

وجود ندارد. از آنجایی که این آنزیم انتهای چسبنده ایجاد می‌کند، کلون‌کردن کاست ژنی موردنظر در مرکز ناحیهٔ هدف‌گیری کننده، با استفاده از این جایگاه ساده‌تر است. یکی از آنزیم‌هایی که برای آنالیز صحت کلون‌سازی و کامل بودن قطعهٔ هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی در حامل‌های نوترکیب حاصل پس از انجام مراحل کلون‌سازی و استخراج پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت، آنزیم *Hind*III بود. این آنزیم که دارای یک جایگاه شناسایی در فرادست محل کلون‌سازی روی پلاسمید pJET1.2 می‌باشد، روی قطعات هدف‌گیری کنندهٔ جدا شده از پلاستوم گیاهان مختلف نیز دارای جایگاه‌های شناسایی مختلفی است. آنالیز هضم آنزیمی

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

حامل‌های اختصاصی کلروپلاستی ساخته‌شده در این تحقیق برای هشت گیاه مختلف با آنزیم *Bam*HI در شکل ۲ نشان داده شده است. کلون‌سازی و کامل بودن قطعهٔ هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی توتون با مشاهدهٔ باندهای ۵۴۶۰، ۸۴۶ و ۵۲۷ جفت باز حاصل از هضم با آنزیم *Hind*III به اثبات رسید (شکل ۳) و مشخص شد که قطعهٔ FR به صورت همسو در پلاسمید pJET کلون‌سازی شده است این در حالی است که اگر قطعهٔ مذکور به صورت غیرهمسو در پلاسمید pJET کلون می‌گردید، مشاهدهٔ باندهای ۳۰۰۴، ۲۹۹۱ و ۸۴۶ جفت بازی مورد انتظار بود. آنالیز با آنزیم مذکور در قطعهٔ هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی ذرت نیز با مشاهدهٔ باندهای ۶۶۵۶ و ۵۲۵ جفت باز، حضور قطعهٔ FR را به صورت همسو در پلاسمید نشان داد. در ارتباط با حامل اختصاصی کاهو حضور قطعهٔ FR هم به صورت همسو (کلونی شمارهٔ ۱) و هم به شکل غیرهمسو (کلونی شمارهٔ ۲) در پلاسمیدهای نوترکیب حاصل به اثبات رسید. این موضوع با مشاهدهٔ باندهای ۲۹۹۱ و ۴۱۸۸ جفت باز در کلونی ۱ و باندهای ۶۶۵۲ و ۵۲۷ جفت باز در کلونی شمارهٔ 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 به‌کار 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 امکان‌پذیر 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 ناقل‌های *E. coli* به ناقل کلروپلاستی منتقل نمود.

طراحی و ساخت حامل کلروپلاستی دارای نشانگر *neo* ادغام شده با زیرواحد بزرگ *atpB* بین توالی‌های *loxP*

اکثر حامل‌هایی که برای انتقال ژن به کلروپلاست ساخته می‌شوند دارای ژن *aadA* ایجادکنندهٔ مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین به عنوان نشانگر انتخابی هستند، ولی از آنجایی که rRNAهای 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 ایمنی زیستی این نشانگر انتخابی وجود دارد (Anonymous, 2004)، لذا در این تحقیق از ژن نئومایسین 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). عملکردی‌بودن بیان ژن *neo*ی تغییریافته، با رشد و تشکیل کلونی باکتری‌های نوترکیبی که تحت تراریزش 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 دانهٔ گرده در انتقال ژن به کلروپلاست وجود نداشته و این نشانگر از نظر ایمنی زیستی مورد تأیید می باشد ولی با این حال امکان حذف ژن نشانگر مذکور پس از تولید گیاهان تراپلاستی توسط آنزیم ریکامبیناز Cre که توالی های loxP را شناسایی می‌کند امکان‌پذیر خواهد بود.

استفاده از پیشبر باکتریایی *groE* برای بیان القایی یا مختص بافت ژن‌های موردنظر

از آنجایی که تاکنون هیچ پروموتر 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

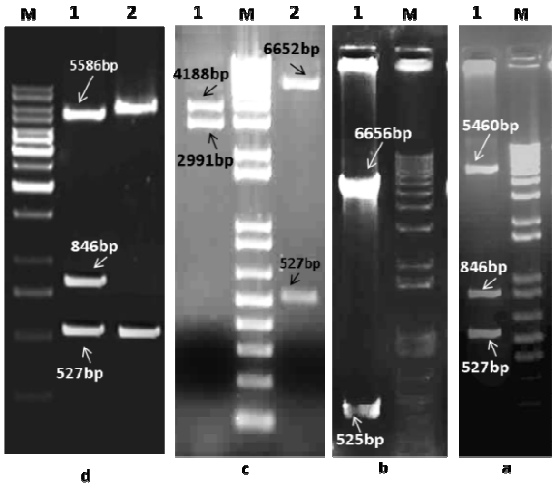
[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

نمو یا در یک بافت خاص گیاهی و یا به صورت القایی امکان‌پذیر نمود. بدین منظور از پیشبر شوک حرارتی *groE* باکتری *E. coli* که توسط آنزیم RNA پلیمراز پلاستیدی شناسایی نمی‌شود، استفاده گردید. شکل ۴ نتایج کلون‌سازی را نشان می‌دهند. اثبات عملکردی‌بودن بیان ژن تحت پیشبر *groE* در این حامل نوترکیب، با مشاهده باکتری‌های حاوی ژن مربوط به پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت پس از القای بیان با اعمال شوک حرارتی به اثبات رسید.

طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp*

هضم آنزیمی پلاسمید pNGi که در آن ژن *neo* تحت پیشبر و پایانبر کلروپلاستی *psbA* و ژن *gfp* تحت 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 دنبالهٔ آغازگری اضافه گردیده بود جدا و در مرکز ناحیهٔ FRکلون‌سازی گردید (شکل‌های ۵ و ۶).هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب پلاستیدی حاصل با آنزیم *Bam*HI صحت کلون‌سازی را تأیید نمود (شکل ۴- ج). ظهور باند ۲۳۰۳ جفت بازی در واکنش PCR با آغازگرهای R FRi و R GFP و عدم تکثیر توسط آغازگرهای F FRi و R GFP نشان‌دهنده آن بود که نواحی ژنی به همراه نواحی تنظیمی به صورت غیرهمسو وارد ناحیهٔ هدف‌گیری‌کنندهٔ پلاستیدی



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

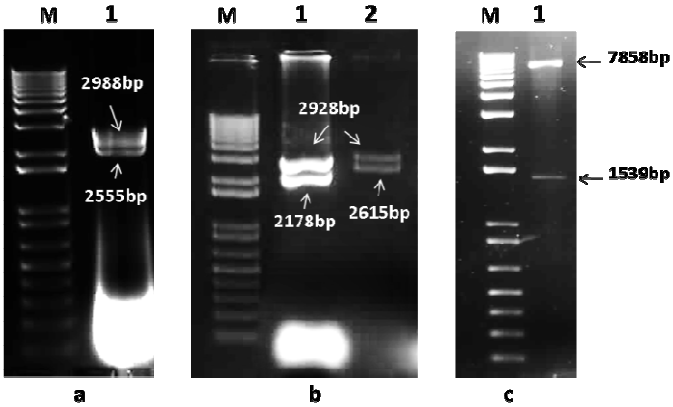
Fig. 3. Enzymatic Digestion analysis using *Hind*III, in order to analysis of present and accuracy of FR fragment in specific plastid vectors that constructed for tobacco, maize, lettuce, canola and tomato

a: M. نشانگر اندازهٔ وزن مولکولی DNA، 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)؛ ۱. $pJET\text{-}FR_T$ (قطعهٔ FR در جهت همسو با MCS ناقل کلون شده است)؛ b: M. نشانگر اندازهٔ وزن مولکولی DNA، 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)؛ ۱. $pJET\text{-}FR_Z$ (قطعهٔ FR در جهت همسو کلون شده است)؛ c: M. نشانگر اندازهٔ وزن مولکولی DNA، 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)؛ ۱. $pJET\text{-}FR_{L1}$ (قطعهٔ FR در جهت همسو کلون شده است). ۲. $pJET\text{-}FR_{L2}$ (قطعهٔ FR در جهت غیرهمسو کلون شده است)؛d: M. نشانگر اندازهٔ وزن مولکولی DNA، 1Kb Ladder (Fermentas)؛ ۱. $pJET\text{-}FR_S$ (قطعهٔ FR در جهت همسو کلون شده است)؛ ۲. $pJET\text{-}FR_K$ (احتمالاً قطعهٔ FR در جهت همسو کلون شده است)

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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]



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

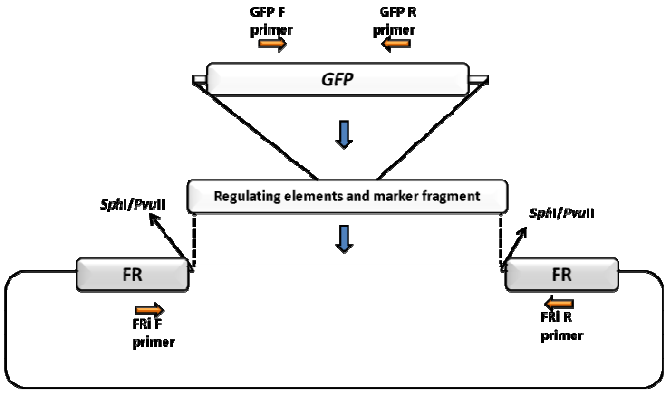
Fig. 4. Enzymatic digestion analysis of recombinant pNGi, pNG and pFNGi in order to accuracy of cloning

M. نشانگر اندازهٔ وزن مولکولی DNA، 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)؛

a: هضم آنزیمی پلاسمید pNGi دارای کاست کلروپلاستی ژن *neo* و کاست القایی ژن *gfp* با استفاده از آنزیم *Sph*I. جایگاه آنزیم *Sph*I در دو سوی این قطعه با استفاده از دنبالهٔ پرایمری الحاق گردیده بود تا امکان جداسازی کاست کامل این دو ژن و کلون‌سازی آن در مرکز ناحیهٔ FR امکان‌پذیر گردد. قطعات مورد انتظار ۲۹۸۸ و ۲۵۵۵ جفت بازی ظاهر شدند و در نهایت قطعهٔ ۲۵۵۵ جفت بازی از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. b: آنالیز هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pNG و pNGi با آنزیم *Bgl*II به منظور اثبات ایجاد حالت پلی‌سیسترونی ژن‌های *neo* و *gfp* در پلاسمید pNG. ۱. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pNG با آنزیم *Bgl*II. ۲. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pNGi با آنزیم *Bgl*II.؛ c: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب پلاستیدی pFNGi با آنزیم *Bam*HI

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 *Sph*I enzyme. *Sph*I 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 *Bgl*II in order to verify polycistronic placing of neo and *gfp* genes in pNG plasmid. 1. Enzymatic digestion of pNG recombinant plasmid using *Bgl*II, 2. Enzymatic digestion of pNGi recombinant plasmid using *Bgl*II. C. Enzymatic digestion of pFNGi recombinant plasmid using *Bam*HI.



شکل ۵- نمای شماتیک کلون‌سازی ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده 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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

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 اپی‌فلورسنت به اثبات رسید. از حامل پلاسمیدی نوترکیب حاصل موسوم به pFNGi می‌توان برای کلون‌کردن ژن‌های دلخواه و انتقال ژن به پلاستیدهای گیاهی استفاده نمود. بیان ژن‌هایی که بدین صورت به پلاستیدها منتقل می‌شوند با انتقال ژن سیگمافاکتورهیبرید گیاه/باکتری تحت پیشبر مختص بافت یا القایی به هستهٔ گیاه میسر خواهد گردید.

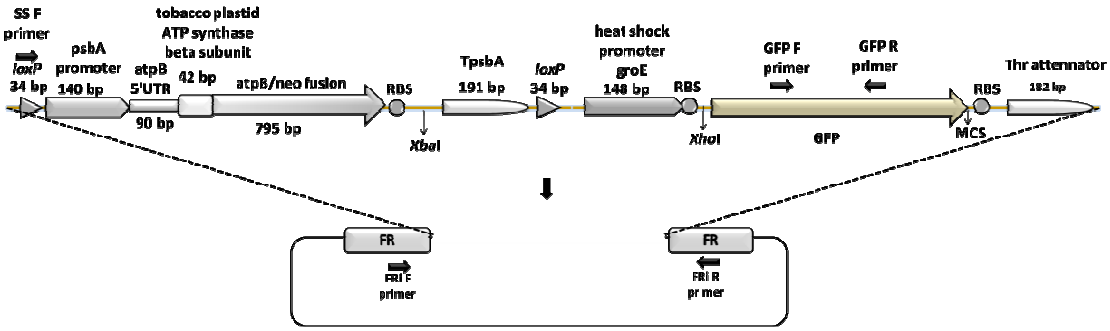
بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پروموتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب

با حذف پایانبر *psbA* و پیشبر *groE* توسط هضم ناقص با آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I، ۴۳۷ جفت‌باز از پلاسمید pNGi 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 جفت‌بازی 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 مشاهدهٔ پروتئین فلورسنت سبز زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت اثبات گردید. سپس در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده قرار داده شد. صحت مراحل کلون‌سازی حامل نوترکیب حاصل توسط هضم آنزیمی و PCR تأیید گردید (شکل ۴). آنالیز پلاسمید pFNG توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای FRi F و *gfp*R. با ظهور قطعهٔ ۲۱۸۰ جفت باز نشان داد که قطعهٔ پلی‌سیسترونی *neogfp* به صورت همسو وارد پلاسمید pJET1.2 شده است. حامل‌های پلاستیدی حاصل موسوم به pFNGi و pFNG 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 غیرالقایی در پلاستیدها بیان نمود.

استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی

ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز (BADH) به عنوان یک نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی برای استفاده در ناقل‌های پلاستیدی طراحی‌شده در این تحقیق در نظر گرفته شد (شکل ۷). توالی حاصل پس از بهینه‌سازی و تغییرات توالی (حذف جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های *Pvu*II، *Xba*I، *Afl*II، *Eco*RI، *Hind*III و *Eco*RV) به همراه توالی اولیهٔ آن به اسیدآمینه 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 16SrRNA\23SrRNA اختصاصی ژنوم به چند دلیل انتخاب شد: قرارداشتن در ناحیه تکرار معکوس کلروپلاستی که باعث می‌شود در هر ptDNA دو نسخه

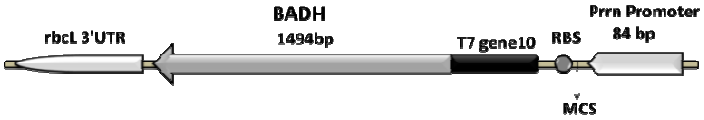


شکل ۶- نمای شماتیک حامل پلاسمیدی نوترکیب pFNGi

Fig. 6. Schematic view of recombinant pFNGi

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]



شکل ۷- نمای شماتیک کاست ژنی طراحی شده برای نشانگر انتخابی غیرآنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دِهیدروژناز (BADH)
Fig. 7. Schematic view of designed cassette gene for non-antibiotic betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) selectable marker gene

از ژن مـوردنظر الحـاق شـود؛ در برداشـتن *ori*ی کلروپلاستی که باعث می‌شود پلاسمید حاوی ژن تا زمانی که بتواند ژن موردنظر را در ژنوم کلروپلاستی الحاق کند در ژنوم حفظ شود؛ حفاظت‌شدگی زیاد توالی در بین گیاهان مختلف و وجود جایگاه‌های آنزیمی منحصر به فرد و حفاظت شده، در وسط این توالی، به منظور کلون‌کردن ژن موردنظر. پیشنهاد یک حامل همگانی (Universal vector) که ژن‌های *tmA*،*tmI* از ناحیهٔ 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 موردنظر برای هدف‌گیری 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 قابل مشاهده است. با توجه به اینکه وجود شباهت صد در صدی توالی کلروپلاستی مورد استفاده در حامل، در بالا رفتن کارایی انتقال ژن، تأثیر به سزایی دارد و علّت آن نیز بالا رفتن ایجاد نوترکیبی همولوگ برای ورود قطعات به داخل ژنوم کلروپلاستی می‌باشد، بنابراین علاوه بر اینکه حامل‌های پلاسمیدی ساخته‌شده در این تحقیق، به دلیل دارا بودن توالی حفاظت‌شده بین ژنی، قابل استفاده برای انتقال ژن به کلروپلاست دامنهٔ گسترده‌ای از گیاهان، از دو لپه تا تک لپه می‌باشند، جداسازی توالی‌های اختصاصی ژنوم کلروپلاستی گونه‌های مهم گیاهی و همسانه‌سازی این توالی‌ها برای ساخت حامل کلروپلاستی خاص گونه که در این تحقیق انجام گرفت نیزانتظار می‌رود با افزایش کارایی نوترکیبی همولوگ و الحاق تراژن همراه بوده وبتواند کارایی تراریزش پلاستیدی خاص گونه را به میزان زیادی افزایش دهد.

در تحقیقات گذشته حامل‌های طراحی‌شده 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*, 2001; Sidorov *et al.*, 1999). برای مثال فقط یک لاین تراریخته کلروپلاستی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی به ترتیب از ۳۵و۸۵ پلیت بمباران شده به دست آمد. در حالی که حدود ۱۵ لاین تراریخته کلروپلاستیِ 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 تقریبا دارای ۹۸ درصد شباهت با توالی توتون بودند) برای تراریزش ژنوم پلاستید توتون استفاده گردید (DeGray *et al.*, 2001). مقایسه ناحیهٔ جداگر بین ژنی در میان اعضای خانوادهٔ سولاناسه نشان داد که فقط در ۴ ناحیه مشابه هستند (Daniell, 2006). مقایسه نواحی بین ژنی

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]
[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

ژنوم‌های کلروپلاستی گندمیان نیز ثابت کرد که حتی یک ناحیهٔ بین ژنی منفرد نیز در میان ژنوم‌های کلروپلاستیِ توالی‌یابی 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 هدف‌گیری کننده به کلروپلاست گیاهان مختلف و تنها با یک جفت آغازگر با جایگاه حفاظت‌شده 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 ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده به پلاستوم طراحی شد که دارای شباهت صد در صدی در تمامی پلاستوم‌های گیاهی توالی‌یابی شدهٔ موجود در بانک ژن باشد، لذا انتظار بر این است که بتوان با موفقیت از این جفت آغازگر برای جداسازی ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده به پلاستوم سایر گیاهانی که توالی ژنوم پلاستیدی آنها در دسترس نیست نیز استفاده نمود، به طوری که با استفاده از این آغازگرها ناحیهٔ 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 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 شوری، خشکی و سرما را نیز ایجاد نماید. مراحل انتخاب شامل تبدیل بتائین‌آلدهید (BA) سمّی، توسط آنزیم BADH به گلایسین بتائین غیرسمی است که به عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ اسمزی نیز عمل می‌کند. دانیل و همکاران (Daniell *et al.*, 2001) گزارش کرده بودند که تکثیر سریع گیاهان حاصل از کلروپلاست تراریخت، 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 نشانگر گزینش‌گر می‌باشد (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 (***rrn***، ***psbA***، ***rbcL***) و القایی (***groE***)، نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاه‌های آنزیمی مناسبِ 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 تهیهٔ حامل‌های پلاستیدی اختصاصی و دارای کارایی بالا برای هر گونهٔ گیاهی هموار شده باشد که راه را برای مهندسی پلاستید گیاهان باز خواهد نمود. حامل‌های pFNGi و pFNG ساخته شده در این تحقیق مناسب

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

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 غیرالقایی در پلاستیدها بیان نمود. اگر بیان مختص بافت پروتئین نوترکیب 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 گزینه‌ای جایگزین برای تراریزش هسته‌ای مطرح 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.

منابع مورد استفاده

References

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. Wiebeand, 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

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, 3nd 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]

Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation

Mohsenpour, M[1]., M. Tohidfar[2] and N. A. Babaian-Jelodar[3]

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 were100% 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 *Hind*III and *Bam*HI. 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 untraslated 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: mthrhm@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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-20]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1391.14.3.2.7]