

ساخت و آنالیز بیان ناقل جفتی گیاهی pCaBGi

فرهاد شکوهی فر^{۱*}، ناهید عباسپور^۲، صهبا طوسی^۳، نیره سادات غفاریان نیا^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۷

تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۳

چکیده

بیان موقت مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم در برگ گیاه روش نسبتاً سریع و قابل اعتمادی برای آنالیز توالی‌های تنظیمی است. به منظور بهره‌گیری از مزایای این تکنیک یک ناقل بیانی مناسب برای انجام آزمون بیان موقت عناصر تنظیمی مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم مورد نیاز است. در این مطالعه بمنظور ساخت یک ناقل بیانی گیاهی، جایگاه‌های آنزیمی مناسب از وکتور pBGi به عنوان قطعه در نظر گرفته شد و وکتور pCAMBIA3301 حامل ژن گزارشگر GUS پس از حذف پرموتر 35S CaMV به عنوان توالی پایه استفاده شد. وکتور جدید به نام pCaBGi از طریق وارد نمودن قطعه BamHI/SnaBI از وکتور pBGi به جای قطعه BamHI/SnaBI در وکتور pCAMBIA3301 ساخته شد. تایید ناقل جدید با استفاده از روش کلنی PCR و توالی‌یابی بوسیله آغازگرهای R/F2-PSh4 انجام شد. عدم بیان ژن گزارشگر در میزبان پروکاریوتی با سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در سویه GV3101 اگروباکتریوم به عنوان یک سیستم پروکاریوتی

*- استادیار، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

(نویسنده مسئول: Shokouhifar@um.ac.ir)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه بین‌المللی قزوین

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد،

۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تایید شد. تزریق سلول‌های اگروباکتریوم حامل وکتور pCaBGi در برگ توتون بیان پایه بسیار جزئی ناشی از فعالیت توالی حداقل پروموتری مشاهده شد. توالی وکتور pCaBGi با استفاده از برنامه SequIn با شماره بازیابی MG719235 در بانک ژن ثبت شد.

واژه های کلیدی: وکتورهای جفتی، ساخت وکتور، بیان موقت،

مقدمه

آنالیز توالی‌های تنظیمی با قرار دادن آنها در سازه‌های مناسب در سیستم‌های بیانی قابل انجام است. انتقال این سازه‌ها به گیاه و تولید گیاهان تراریخت حامل مجموعه توالی تنظیمی متصل شده به ژن گزارشگر در مطالعات متعددی جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی بکار گرفته شده است (Shokouhifar et al., 2011a; Shokouhifar et al., 2011b). مزایا و معایب این روش در مقالات مروری مورد بررسی قرار گرفته است (Gurr and Rushton 2005; Cazzonelli and Velten, 2008; Gupta et al., 2011; Blazeck and Alper, 2013). از جمله معایب این روش می‌توان به زمانبر بودن مراحل کار و هزینه بالای آن اشاره نمود. هرچند به دلیل تولید گیاه تراریخت امکان تکرار آزمایش با کشت مجدد گیاه تراریخت ممکن خواهد بود. ولی از آنجا که وارد شدن مجموعه ژنی در ژنوم گیاه می‌تواند به دلیل موقعیت ورود آن در ژنوم و تعداد نسخه وارد شده تحت تاثیر قرار گیرد بیان موقت با توجه به دیگر مزایای آن می‌تواند جایگزین مناسبی جهت تولید گیاهان تراریخت باشد (Liu et al., 2011; Bahrabadi et al., 2014).

بمنظور انجام آنالیز توالی‌های تنظیمی با استفاده از روش اگرواینجکشن به عنوان یکی از ساده‌ترین روش‌های بیان موقت به یک وکتور جفتی با ویژگی‌های خاص مورد نیاز است. از زمان ابداع روش استفاده از وکتورهای جفتی (Hoekema et al., 1983) در سال ۱۹۸۳ تا کنون وکتورها جفتی مفید زیادی ساخته شده است (Chen et al., 2003; Gynheung, 1987; Hellens et al., 2005; Hellens et al., 2000; Hoekema et al., 1983; Lee and Gelvin, 2008; PCAMBIA; Sainsbury et al., 2009; Xiang et al., 1999) که هر یک با مهیا نمودن امکانات جدید شرایط انتقال ژن را به گیاه تسهیل نموده‌اند. در این بین وکتورهایی به منظور استفاده در آزمایشات بیان موقت (Hellens et al., 2005; Sainsbury et al., 2009) و آنالیز توالی‌های تنظیمی (Hellens et al., 2005; PCAMBIA; Sprenger Haussels and Weisshaar, 2001) بطور جدی طراحی و معرفی شده‌اند. ولی با توجه به ویژگی‌های مورد انتظار از یک وکتور

جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی در آزمایشات بیان موقت ضرورت دارد تا ویژگی‌های مورد نیاز از هر دو هدف در یک وکتور وجود داشته باشد. از جمله این ویژگی‌ها به حضور یک ژن گزارشگر اینترون دار می‌توان اشاره کرد که امکان تمایز بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی ژن گزارشگر را مهیا نماید (Yang et al., 2000). از سوی دیگر باید در بالا دست این ژن گزارشگر یک توالی حد اقل پروموتری قرار گرفته باشد و در فاصله ای مناسب از آن جایگاه‌های آنزیمی جهت کلونینگ توالی‌های تنظیمی وجود داشته باشد (Gurr and Rushton, 2005; Rushton et al., 2002). همچنین حضور یک ژن پائین دست یک پروموتر با بیان ثابت بعنوان کنترل می‌تواند در نرمال کردن بیان ژن گزارشگر در آزمون کمی سنجی فعالیت ژن گزارشگر مفید باشد (Hollon and Yoshimura, 1989).

از بین وکتورهای مختلفی که تا کنون بمنظور آنالیز بیان توالی‌های تنظیمی طراحی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند، وکتور pGPTV (Thompson et al., 1987) به دلیل دارا بودن جایگاه کلونینگ مناسب جهت قرار گرفتن توالی‌های تنظیمی کاربرد زیادی داشته است (Heise et al., 2002; Kirsch et al., 2001; Mazarei et al., 2008; Rushton et al., 2002; Shokouhifar et al., 2011b; al., 2011a). با این حال ژن گزارشگر این وکتور فاقد اینترون است و به همین دلیل استفاده آن در روش اگرواینجکشن می‌تواند سبب تداخل بیان پروکاریوتی ژن گزارشگر با بیان یوکاریوتی شود و در نتیجه نتایج را غیر قابل اعتماد نماید. از سوی دیگر تعداد نسخه این وکتور در *E. coli* بسیار کم است (Sprenger Haussels and Weisshaar, 2001). این موضوع مراحل کلونینگ این وکتور را با مشکل می‌سازد. لذا رفع این نواقص می‌تواند کارایی این وکتور را در مطالعات آنالیز بیان افزایش دهد. نسل جدید وکتورهای جفتی دارای دو منشاء همانندسازی می‌باشند که یکی مسئول تکثیر وکتور در سلول *E. coli* است و دیگری به سلول اگروباکتریوم مربوط می‌شود (An et al., 1985). منشاء همانند سازی Cole1 می‌تواند تعداد نسخه بالائی از وکتور را در *E. coli* تکثیر نماید. همچنین منشاءهای همانند سازی در پلاسمیدهای pVS1 و pRI به ترتیب با تعداد ۷ تا ۱۰ و ۱۰ تا ۱۵ نسخه در سلول اگروباکتریوم در مقایسه با منشاءهای همانندسازی دیگر مانند منشاء همانندسازی در پلاسمید pSa با دو تا چهار نسخه اختلاف قابل توجهی دارند (Lee and Gelvin, 2008). در وکتورهای مربوط به گروه pCAMBIA منشاء همانند سازی مربوط به *E. coli* و اگروباکتریوم به ترتیب Cole1 و pVS1 است (PCAMBIA). این دو منشاء سبب می‌شود تا این دسته از وکتورها در *E. coli* به تعداد زیاد تکثیر شده و در اگروباکتریوم در تعداد ۷ تا ۱۰ نسخه بطور پایدار حضور داشته باشند. ترتیب مجموعه‌های ژنی روی منطقه T-DNA از نکات مهم دیگری به شمار می‌رود که در یک ناقل بیانی باید مورد توجه قرار گیرد. این مسئله از آن جهت اهمیت دارد که در هنگام انتقال

T-DNA توسط سلول اگروباکتریوم به گیاه بطور جهت دار ابتدا ناحیه برش خورده بازوی راست به درون سلول گیاه تزریق می‌شود. در نتیجه در صورتیکه ژن گزینشگر که جهت غربالگری سلول‌های تراریخت استفاده می‌شود در سمت بازوی راست باشد تعداد زیادی از سلول‌ها که تنها این بخش از T-DNA را دریافت نموده اند قابلیت رشد روی محیط حاوی ماده گزینشی مانند آنتی بیوتیک و یا علف کش خواهند داشت بدون اینکه ژن گزارشگر را که هدف تراریختی است را دریافت نموده باشند. این نکته سبب می‌شود تا تعداد زیادی از نمونه‌های گزینش شده مثبت کاذب باشند. این آرایش منطقه T-DNA در بسیاری از وکتورهای جفتی مانند pBI121 قابل مشاهده است (Chen et al., 2003).

در صورتیکه بتوان ویژگی‌های مناسبی از جمله حضور ژن گزارشگر اینترون دار، توالی پروموتور حداقل، جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی، منشاء همانندسازی با نسخه بالا در *E. coli* جهت تسهیل مراحل کلونینگ و منشاء همانندسازی با ثبات در سلول‌های اگروباکتریوم را در یک وکتور جمع نمود می‌توان وکتور مناسبی را جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی در سیستم بیان موفقیت در اختیار داشت. لذا مطالعه حاضر با هدف ساخت وکتوری بر پایه وکتورهای pCambia با ویژگی‌هایی از جمله حضور ژن گزارشگر واجد اینترون و حامل جایگاه‌های کلونینگ در فاصله مناسب از جایگاه شروع نسخه برداری، انجام شد. این وکتور در آزمایش‌های آنالیز توالی‌های تنظیمی و الگوی بیان آنها در شرایط مختلف و در پاسخ به عوامل القائی متفاوت کاربرد خواهد داشت. بخصوص در زمانی که از روش بیان موقت مبتنی بر تزریق باکتری بخواهیم استفاده نماییم.

مواد و روش

مواد باکتریائی و وکتورها: در این تحقیق از سویه DH5α از باکتری *E. coli* جهت انجام مراحل کلونینگ استفاده شد. وکتورهای pGPTV(Sprenger Haussels), pCambia3301, pCambia, pBGi(Shokouhifar 2009) و (2001 and Weisshaar) جهت ساخت و تایید وکتور جدید مورد استفاده قرار گرفت. از واریته *Xantin* توتون و سویه GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و وکتورهای pBI121 (Chen et al., 2003)، جهت آنالیز بیان موقت استفاده شد.

مراحل ساخت وکتور pCaBGi: مراحل ساخت وکتور pCaBGi با استفاده از نرم افزار Vector Nti, V11 بطور کامل شبیه سازی شد. بمنظور جداسازی قطعه حامل جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی - توالی پروموتور از وکتور pBGi با استفاده از آنزیم‌های BamHI/SnaBI بطور مضاعف در شرایط واکنش حاوی یک میکروگرم وکتور، ۲ واحد آنزیم BamHI و ۲ واحد آنزیم SnaBI-3 در حضور غلظت یک برابر از بافر (Tango) Thermo Fisher Scientific Inc در حجم ۲۰

میکرولیتر هضم شد. همچنین وکتور pCAMBIA3301 در واکنش مشابهی هضم شد تا قطعه در برگیرنده توالی کامل وکتور جفتی به استثنای توالی پروموتور بالادست ژن گزارشگر از آن جداسازی گردد. محصول واکنش هضم هر دو وکتور در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد. باند های مربوط به قطعه '3-BamHI::SnaBI-5' به اندازه ۷۲۰ جفت باز از الگوی الکتروفورزی وکتور pBGi و باند مربوط به قطعه '3-SnaBI::BamHI-5' به ترتیب ۹۹۲۷ جفت باز مربوط به وکتور pCAMBIA3301 از روی ژل جداسازی شد و با استفاده از کیت خالص سازی از ژل (AccuPrep Gel Purification Kit, Bioneer, Korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده قطعات خالص سازی شدند. غلظت قطعات خالص شده پس از الکتروفورز روی ژل یک درصد با استفاده از روش تخمین غلظت باندها در مقایسه با غلظت نزدیکترین باند در اندازه مارکر DNA تعیین شد و مقادیر مورد نیاز از هر قطعه جهت تهیه واکنش اتصال با استفاده از برنامه تحت شبکه (ligation calculator (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)) محاسبه شد. واکنش اتصال شامل ۱۵ نانوگرم از قطعه '3-BamHI::SnaBI-5'، ۵۰ نانوگرم از قطعه '3-SnaBI::BamHI-5'، ۱ واحد آنزیم T₄ لیگاز (Thermo Fisher Scientific Inc) و ۲ میکرولیتر از بافر T₄ ۱۰ برابر غلظت (Thermo Fisher Scientific Inc) در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۶ درجه نگهداری شد. مرحله تراریختی سلول های Dh5 α با اضافه نمودن ۲ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به تیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد و بر اساس روش شوک حرارتی (Sambrook and Russel, 2001) انجام شد. سلول های تراریخت شده جهت انتخاب کلنی های نوترکیب روی محیط LB (۱۰ گرم بر لیتر Bacto-tryptone، ۵ گرم بر لیتر Bacto-yeast extract، ۱۰ گرم بر لیتر NaCl و ۱۵ گرم بر لیتر آگار (Microbiology Agar, Sigma) حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین پخش شدند. با توجه به حضور ژن انتخابگر مقاومت به آمپی سیلین در وکتور pBGi و ژن مقاومت به کانامایسین در وکتور pCAMBIA3301 لذا انتظار می رفت تنها کلنی های نوترکیب حاوی توالی پایه وکتور pCAMBIA3301 روی محیط انتخابی قادر به رشد باشند.

تایید مولکولی کلنی های نوترکیب: کلنی های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR (Sambrook and Russel, 2001) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تایید شدند. پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer premier V5 طراحی و توسط شرکت Macrogen (South Korea) سنتز شدند. محتویات واکنش شامل یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت پارس توس)، ۱X PCR buffer، ۲۰۰ میکرومولار از مخلوط dNTPs (Genet Bio. Co, South Korea)، ۱/۵ میلی مولار MgCl₂ و ۵ پیکومولار پرایمرهای 2F-PSH4 با توالی 5'-CAC CAT GTT GGC-

CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC-5' R-PSh4 باتوالی و پرایمر 3-AAG CTG CTC TA '3-A در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و با استفاده از نوک سمپلر استریل هریک از کلنی‌های انتخاب شده بعنوان الگو در واکنش اضافه شدند و بصورت موازی روی محیط LB حاوی کانامایسین کشت شدند. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Personal Thermocycler, MWG Co. Germany) با ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۵ چرخه بابرنامه ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد (دمای اتصال)، یک دقیقه در ۶۸ درجه سانتیگراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمرزیراساس توصیه شرکت پارس توس) و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد (بسط نهایی) انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۱ هزارم غلظت از رنگ green viewer (شرکت پارس توس) جهت رنگ آمیزی استفاده شد. تصویر ژل‌ها با استفاده از دستگاه Geldoc تهیه شد.

استخراج پلاسمید، توالی یابی و آنالیزها: کلنی‌های گزینش شده جهت استخراج پلاسمید در ۳ میلی لیتر محیط LB مایع بصورت شبانه کشت شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (AccuPrep[®] Plasmid Extraction Kit, Bioneers Co. South Korea) انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده بر اساس دستور العمل شرکت MacroGen آماده شد و با استفاده از پرایمرهای 2F-PSh (باتوالی 5'-GGTGTTCATGCTTTCAAGATAC) و R-PSh3 (با توالی 5'-3-CCATCAGCACGTTATCGAATCCT) به ترتیب از بالا دست و پائین دست منطقه کلونینگ توالی یابی شدند. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزار Chromas, V 2.0 مورد بررسی قرار گرفت. صحت توالی کلنی‌ها با توالی شبیه سازی شده با استفاده از برنامه Vector Nti, V11 مورد بررسی قرار گرفت. جهت نمایش منطقه T-DNA وکتور ساخته شده از نرم افزار Seqbuilder از مجموعه نرم افزاری Lasergen V 7.0 استفاده شد. توالی کامل وکتور با استفاده از نرم افزار Sequin, V 12/3 در پایگاه داده های زیستی بانک ژن ثبت شد.

تهیه سلول مستعد از سویه GV3101 اگروباکتریوم و انتقال وکتورهای pGCGi, pBI121 و pCAMBIA3301 به آن با استفاده از روش انجماد آنی انجام شد (Hofgen & Willmitzer, 1988). در سلول‌های تراریخت شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR و با استفاده از پرایمرهای F-PSh3 (با توالی 5'-GCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGA) و R-PSh3 تایید شد. کلنی‌های تایید شده در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت و به مدت یک شب در ۲۸ درجه سانتیگراد و با ۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر نگهداری شد. حجم یک میلی لیتر از کشت شبانه کلنی‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سلول‌های رسوب داده شده پس از حذف محلول روئی جهت سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونید

از مورد استفاده قرار گرفت.

بیان پایه توالی پروموتور حداقل تعیبه شده در وکتور pCaBGi مطابق با استفاده از روش تزریق سوسپانسیون آگروباکتریوم در برگ توتون مورد بررسی قرار گرفت (Yang et al., 2000). از سویه‌های حامل وکتورهای pCAMBIA3301 و pBI121 نیز بعنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

گیاهچه‌ها بعد از تزریق بوسیله پوشش‌های پلاستیکی پوشانده شدند و در دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پوشش‌های پلاستیکی حذف گردید و برگ‌های تزریق شده بعد از ۲۴ ساعت جهت سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن^۱ GUS مورد استفاده قرار گرفتند. سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز و تصویربرداری از نمونه‌ها مطابق با روش Bahrabadi و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد (Bahrabadi et al., 2014).

نتایج

به منظور ساخت وکتور بیانی مناسب جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی وکتور pCaBGi طراحی و ساخته شد. در ساخت این وکتور از دو وکتور pCAMBIA3301 و pBGi(Shokouhifar, 2009) استفاده شد. وکتور pCAMBIA3301 بعنوان توالی پایه دارای منشاء تکثیر با تعداد نسخه بالا در سویه‌های اشرشیاکلی، منشاء تکثیر با پایداری بالا در سویه‌های آگروباکتریوم، حامل ژن مقاومت به کاناماسین جهت گزینش در سلول‌های پروکاریوتی و ژن^۲ bar جهت مقاومت به علفکش مورد استفاده قرار گرفت. وکتور pBGi به عنوان دهنده جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و همچنین توالی پروموتور حداقل بگارگرفته شد. از آنجا که در وکتور pCAMBIA3301 ژن گزارشگر GUS تحت کنترل پروموتور 35S CaMV قرار دارد با حذف توالی این پروموتور و قرار دادن توالی پروموتور حداقل و جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در بالادست ژن گزارشگر می‌توان وکتور مناسبی جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی بدست آورد. مقایسه توالی دو وکتور نشان داد آنزیم BamHI در هر دو وکتور در بالادست توالی پروموتوری دارای جایگاه برشی است. در وکتور pCAMBIA3301 این جایگاه در بالادست پروموتور 35S CaMV و در پائین دست پروموتور مربوط به ژن گزینشگر bar (به عنوان مسئول مقاومت به علف کش سیستمیک گلوکوسینیت^۳) قرار دارد. لذا با این آنزیم می‌توان توالی پروموتور مربوط به ژن GUS را از وکتور pCAMBIA3301 جدا نمود. در وکتور pBGi آنزیم BamHI در بالادست جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی قرار دارد و با استفاده از آن می‌توان قطعه در برگیرنده جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و توالی پروموتور

^۱- β -glucuronidase

^۲-Bialaphos Resistance (bar) gene

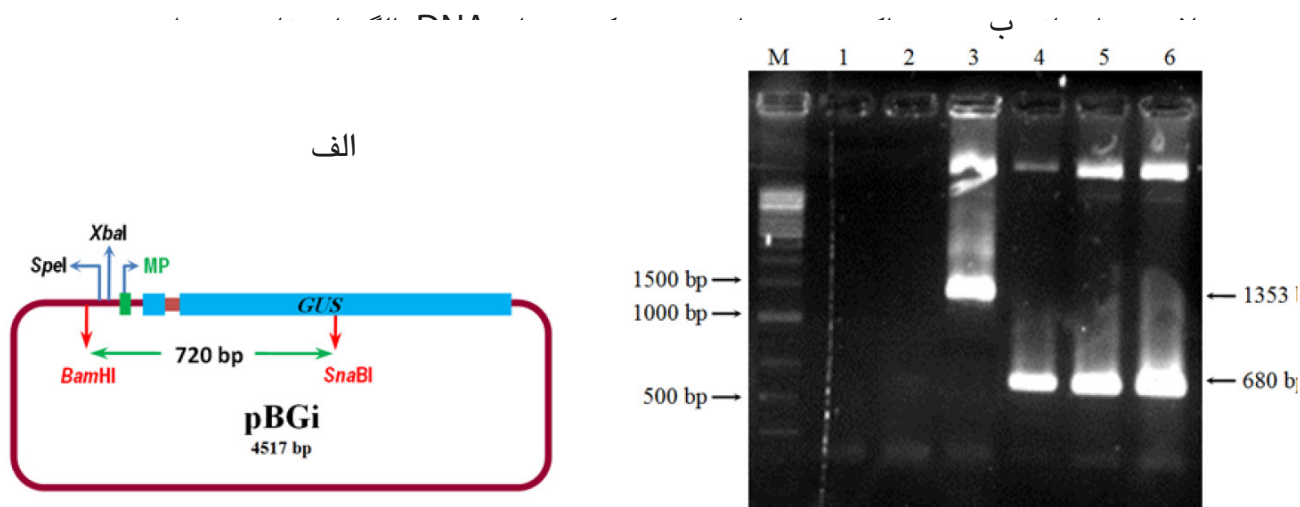
^۳-Glufosinate

حداقل را بدست آورد. مقایسه توالی هر دو وکتور در مناطق پائین دست توالی پروموتری نشان داد آنزیم SnaBI در موقعیت مشابهی درون ژن گزارشگر GUS قرار گرفته است. هضم آنزیمی دو وکتور pBGi و pCAMBIA3301 با جفت آنزیم BamHI/SnaBI به ترتیب به تولید قطعات (۷۲۰-۳۷۹۷) و (۱۳۹۲-۹۹۲۷) منتج شد (نتایج هضم آنزیمی ارائه نشده است). در این بین قطعات '3-BamHI::SnaBI' و '3-SnaBI::BamHI' به ترتیب به اندازه های ۷۲۰ و ۹۹۲۷ جفت باز از محصول هضم آنزیمی وکتورهای pBGi و pCAMBIA3301 جداسازی شد و با اتصال این دو قطعه وکتور pCaBGi به اندازه ۱۰۶۴۷ جفت باز ساخته شد.

محصول واکنش اتصال به سلول‌های مستعد منتقل و سلول‌های تراریخته با توجه به ژن گزینشگر پروکاریوتی (کانامایسین) موجود در توالی پایه مربوط به وکتور pCAMBIA3301 روی محیط حاوی کانامایسین گزینش شدند. وکتور pBGi حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین است لذا سلول‌های حاوی این وکتور و یا پلاسمید حاصل از باز اتصال آن قادر به رشد روی محیط کشت نخواهند بود. لذا تنها کلنی‌های حاوی وکتور pCAMBIA3301 و سازه نو ترکیب pCaBGi قادر به رشد روی محیط کشت خواهد بود. بمنظور تمایز این کلنی‌ها و در نهایت انتخاب کلنی‌های حامل سازه نو ترکیب pCaBGi یک جفت پرایمر اختصاصی برای منطقه بالادست جایگاه BamHI و دیگری در بالادست جایگاه آنزیم SnaBI و درون قطعه جدا شده از pBGi به ترتیب به نام‌های F2-PSh4 و R-PSh4 طراحی شد (شکل ۱-الف). به دلیل اختصاصی بودن پرایمر F2-PSh4 با توالی وکتور pCAMBIA3301 امکان اتصال آن به وکتور pBGi وجود ندارد، لذا انتظار می‌رود از کلنی‌های حاوی این وکتور باندی تکثیر نشود. در مقابل هر دو پرایمر شانس اتصال به کلنی‌های حاوی pCAMBIA3301 و سازه نو ترکیب pCaBGi را دارند ولی به دلیل تفاوت اندازه قطعه حد فاصل این دو جایگاه در این دو وکتور باند های حاصل از هریک کاملاً متفاوت است. همانگونه که در نمای شماتیک وکتور pCaBGi (شکل ۱-الف) مشاهده می‌شود با استفاده از جفت پرایمر PSh4-R/F2 انتظار می‌رود باندی به اندازه ۶۸۰ جفت باز در محصول PCR مربوط به کلنی‌های حاوی سازه نو ترکیب pCaBGi تکثیر شود، در حالیکه طول قطعه قابل تکثیر در وکتور pCAMBIA3301 به دلیل حضور توالی کامل پروموتور CaMV35S در بالادست ژن گزارشگر GUS بیش از ۱۳۰۰ جفت باز خواهد بود. بر این اساس با استفاده از تکنیک کلنی PCR کلنی‌های حاوی سازه نو ترکیب انتخاب شدند. پس از کشت شبانه و استخراج پلاسمید از کلنی‌های نو ترکیب نتایج الکتروفورز نشان داد غلظت پلاسمید استخراج شده مانند وکتور pCAMBIA3301 بسیار بالاتر از غلظت مشاهده شده از استخراج کلنی‌های حاوی وکتور pGPTV است.

بمنظور تایید مجدد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی R/F2-PSh4 صحت سازه جدید تایید

شد. بدین منظور از پلاسمید های مربوط به وکتورهای pBGI و pCAMBIA3301 بعنوان کنترل استفاده شد. همانگونه که در شکل ۱-ب مشاهده می شود در چاهک مربوط به وکتور pBGI مشابه با نمونه کنترل منفی باندی قابل مشاهده نبود در حالیکه در چاهک مربوط به وکتور pCAMBIA3301 باندی حد واسط باند های ۱ و ۱,۵ کیلوباز مربوط به مارکر تکثیر شده بود که با اندازه مورد انتظار انطباق داشت. در چاهک های ۵ تا ۸ که مربوط به کلنی های مورد ارزیابی است تکثیر باندی در حدواسط باند های ۵۰۰ و ۷۵۰ جفت باز مربوط به مارکر قابل مشاهده است که با اندازه قطعه قابل تکثیر از سازه نو ترکیب pCaBGI به اندازه ۶۸۰ جفت باز انطباق دارد. باند های سنگین که در گولی الکتروفورزی نمونه ها در محدوده بالاتر از ۱۰ کیلوباز مشاهده می شوند به



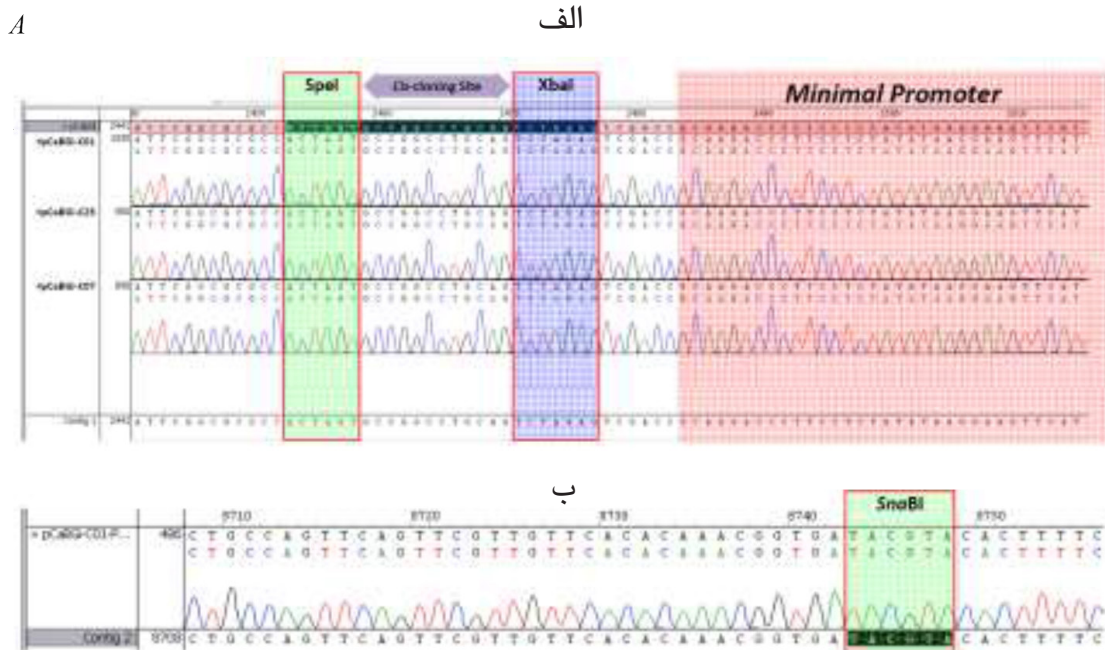
شکل ۱: نمای شماتیک وکتور pCaBGI (الف) و نتایج کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای PSh4- (ب) R/F2.

الف: منطقه T-DNA وکتور pCaBGI نشان دهنده جایگاه کلونینگ توالی های تنظیمی، توالی پروموتور حداقل مربوط به CaMV35S متصل شده به ژن گزارشگر GUS واجد اینترون.

ب: تایید کلنی های نو ترکیب با استفاده از تکنیک کلنی PCR، ۱- کنترل منفی PCR ۲ و ۳- به ترتیب محصول PCR مربوط به وکتورهای pBGI و pCAMBIA3301 بعنوان کنترل منفی و مثبت؛ ۴، ۵ و ۶- کلنی های نو ترکیب منتخب. M- مارکر وزنی DNA.

با توجه به اهمیت جایگاه های آنزیمی XbaI و SpeI و همچنین اطمینان از عدم وجود جهش در محل های اتصال پلاسمید های استخراج شده از کلنی های نو ترکیب به نام های pCaBGI-C1, ۷, ۲۵ با استفاده از پرایمر R-PSh4 توالی یابی شدند. مقایسه نتایج توالی یابی سازه های نو ترکیب با توالی شبیه سازی شده مربوط به وکتور pCaBGI صحت توالی این سازه ها را در ناحیه

بالادست ژن GUS کاملاً تایید نمود (شکل ۲-الف). این نتایج نشان داد این ناحیه فاقد توالی پروموتر CaMV35S است و توالی مربوط جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در حد فاصل جایگاه آنزیم‌های '3-SpeI::XbaI-5' بطور صحیح در بالادست توالی مربوط به پروموتر حداقل قرار گرفته است. از میان سه کلنی تایید شده کلنی pCaBGi-C1 انتخاب و صحت توالی آن در محل جایگاه آنزیم SnaBI مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پرایمر R-PSh3 با فاصله حدود ۲۰۰ جفت باز در پائین دست جایگاه این آنزیم طراحی شد (شکل ۱-الف) و پلاسمید pCaBGi-C1 بوسیله آن توالی یابی شد. نتایج توالی یابی نشان داد در این ناحیه نیز توالی کلنی نو ترکیب انتخاب شده با توالی مورد انتظار کاملاً انطباق دارد (شکل ۲-ب). این نتایج نشان داد مراحل کلونینگ صحیح انجام شده است و سازه نو ترکیب انتخاب شده دارای توالی مورد انتظار است.



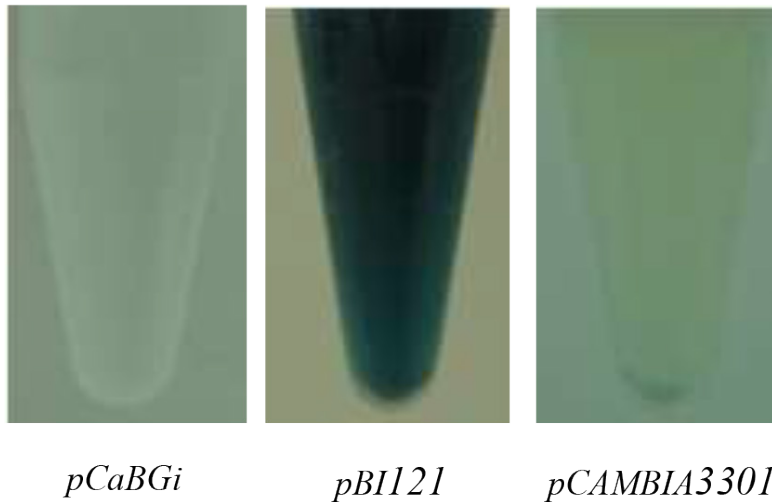
B

شکل ۲: آنالیز نتایج توالی یابی کلنی‌های pBCaF1 و pBCaF25، pBCaF7

الف: نتایج توالی یابی با پرایمر R-PSh4 نشان دهند صحت توالی کلنی‌های توالی یابی شده در منطقه میان آنزیم‌های SpeI و XbaI

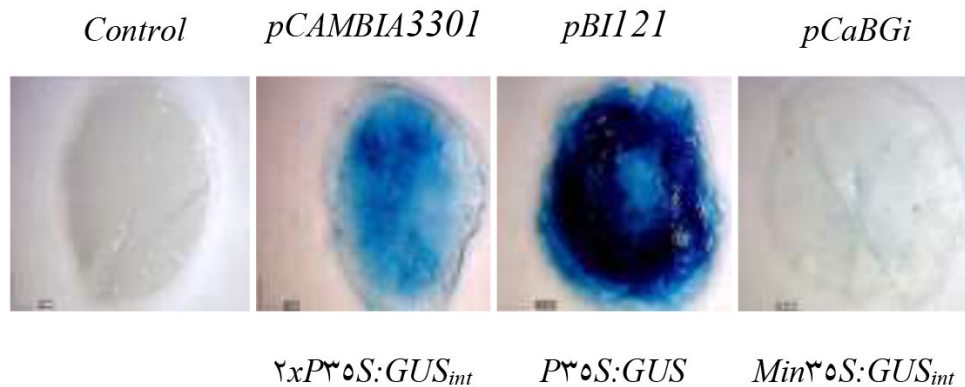
ب: نتیجه توالی یابی کلنی pCaBGi-C01 با پرایمر R-PSh3 تایید کننده صحت جایگاه کلونینگ SnaBI

عدم بیان ژن GUS اینترون دار در سلول‌های اگروباکتریوم با سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در سلول‌های ترایخت شده با وکتور pCaBGi در مقایسه با سلول‌های حامل سازه‌های pCAMBIA3301 و pBI121 مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج نشان داد سلول‌های حامل وکتور pBI121 که دارای ژن GUS فاقد اینترون است بخوبی و با شدت در سیستم پروکاریوتی قادر به بیان می‌باشد. در مقابل در سلول‌های حامل وکتور pCAMBIA3301 که دارای ژن GUS اینترون دار است فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز مشاهده نشد. در سلول‌های حامل وکتور pCaBGi نیز مشابه با وکتور pCAMBIA3301 فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز مشاهده نشد (شکل ۳). این نتایج نشان داد حضور اینترون در ژن گزارشگر GUS مانع از بیان آنزیم بتاگلوکورونیداز در سیستم‌های پروکاریوتی می‌شود که کاملاً مورد انتظار بود.



شکل ۳: سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در سلول‌های سویه GV3101 حامل وکتورهای pCaBGi، pCAMBIA3301 و pBI121

عدم بیان پایه پروموتور حد اقل وکتور pCaBGi در مقایسه با بیان پروموتور کامل 35S CaMV با استفاده از روش تزریق اگروباکتریوم در برگ گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). نمونه‌های تزریق شده با استفاده از سویه GV3101 اگروباکتریوم حامل وکتور pBI121 دارای پروموتور کامل و ژن GUS فاقد اینترون به شدت فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز را ۲۴ ساعت پس از تزریق کاملاً نشان دادند. در حالیکه در نمونه مربوط به سازه pCAMBIA3301 شدت بیان اندکی کمتر بود. بیان پایه در نمونه‌های مربوط به وکتور pCaBGi بسیار اندک بود (شکل ۴).



شکل ۴: آنالیز عملکرد وکتورهای pCaBGi، pCAMBIA3301 و pBI121 با استفاده از روش بیان موقت ژن GUS مبتنی بر تزریق آگروباکتریوم در برگ توتون ۲۴ ساعت پس از تزریق.

Control: دیسک‌های برگ‌گی تزریق شده با سویه فاقد وکتور بعنوان کنترل منفی، *2xP35S:GUS_{int}*: مجموعه بیان حامل د و نسخه پروموتور CaMV35S و ژن گزارشگر GUS اینترون دارند، *P35S:GUS*: مجموعه بیانی حامل پروموتور CaMV35S و ژن گزارشگر GUS فاقد اینترون، *Min35S:GUS_{int}*: مجموعه بیانی حامل توالی حد اقل پروموتور CaMV35S و ژن گزارشگر GUS اینترون دارند.

بحث و نتیجه گیری

آنالیز بیان موقت مبتنی بر تزریق سلول‌های آگروباکتریوم روش بسیار ساده و در دسترس برای بررسی کارکرد ژن‌ها و پروموتورها بشمار می‌رود. این مطالعه با هدف ساخت وکتور مناسب جهت آنالیز توالی‌های تنظیمی در روش تزریق سلول‌های آگروباکتریوم انجام شد. اجزاء مورد نیاز برای آنالیز توالی‌های تنظیمی از وکتور pBGi گرفته شد و در بالادست توالی ژن گزارشگر pCAMBIA3301 قرار داده شد. پس از تایید مراحل کلونینگ با استفاده از روش‌های مولکولی و صحت توالی وکتور در منطقه جایگزین شده با توالی یابی مورد تایید قرار گرفت و وکتور جدید به نام pCaBGi نام گذاری شد. آنالیز بیان وکتور جدید با استفاده از روش تزریق سلول‌های آگروباکتریوم در برگ گیاه توتون انجام شد و میزان بیان پایه در وکتور جدید در گیاه مدل توتون مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نتایج مطالعه نشان می‌دهد با توجه به مهیا بودن شرایط جهت بیان موقت ژن بتاگلوکورونیداز، بیان پایه پروموتور حداقل بکاربرده شده در ساختار وکتور pCaBGi در مقایسه با پروموتور کامل CaMV35S بسیار جزئی است. بیان پایه اندک در انتخاب وکتورهای آنالیز پروموتور بسیار ضروری است (Gurr and Rushton 2005; Yang et al., 2000). جهت ساخت پروموتورهای مصنوعی با شرایط بیان اختصاصی از وکتورهای دارای بیان پایه اندک استفاده شده است (Rushton et

Shokouhifar et al., 2011a; al., 2002). بر اساس نتایج بدست آمده وکتور pCaBGi ساخته شده در مطالعه حاضر با توجه به بیان پایه بسیار اندک قابلیت بالائی جهت ساخت پرموترهای مصنوعی با بیان اختصاصی خواهد داشت. همچنین این وکتور بخوبی می‌تواند جهت استفاده در مطالعات آنالیز توالی‌های تنظیمی مورد استفاده قرار گیرد.

مشخصات وکتور pCaBGi: وکتور pCaBGi یک وکتور بیانی جفتی فاقد توالی پرموتری است. این وکتور ۱۰۶۴۷ جفت باز طول دارد و توالی کامل آن در پایگاه داده های زیستی NCBI با شماره بازیابی MG719235 در دسترس می‌باشد. اجزاء تشکیل دهنده منطقه T-DNA وکتور در شکل ۵ ارائه شده است. این ناحیه با طول ۴۴۱۴ جفت باز در حدفاصل بازوی چپ در انتهای 5' و بازوی راست در انتهای 3' محدود شده است و حامل دو مجموعه ژنی است. مجموعه ژن گزینشگر bar تحت کنترل پرموتر کامل مضاعف شده CaMV35S و خاتمه دهنده poly A روی رشته آنتی سنس و در سمت بازوی چپ قرار گرفته است. مجموعه دوم شامل ژن گزارشگر GUS که فاقد توالی پرموتری بوده و در پائین دست جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی و توالی پرموتر حد اقل قرار گرفته است و در پائین دست آن توالی خاتمه دهنده Nos poly A قرار گرفته است. ژن گزارشگر GUS واجد توالی اینترونی است. این مجموعه روی رشته سنس و در بالادست بازوی راست قرار گرفته است.

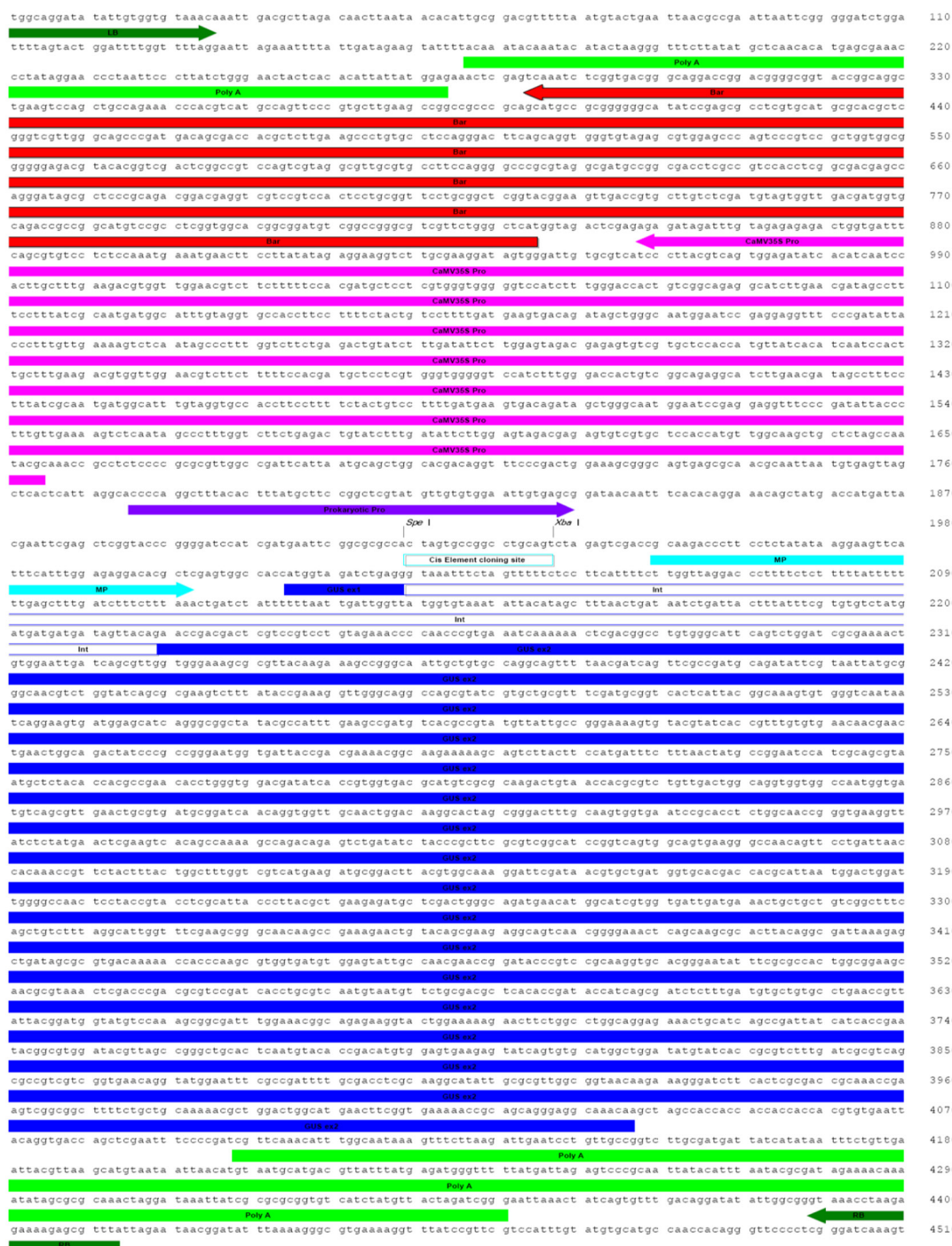
ترتیب ژن گزارشگر و گزینشگر در وکتور pCaBGi بگونه ای در نظر گرفته شده است که ژن گزینشگر در انتهای قطعه T-DNA باشد و لذا گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک و یا علف کش با احتمال زیادی ژن گزارشگر را نیز دریافت نموده اند. این ساختار در وکتورهای جفتی مانند مجموعه وکتورهای مربوط به خانواده VTPGp (raahssieW dna slessuaH regnerpS) (Hellens et al., 2005) و pCambia (PCAMBIA) همچنین در وکتورهای جدیدتر (Xiang et al., 1999) نیز رعایت شده است.

یکی دیگر از ویژگی‌های وکتور pCaBGi لحاظ نمودن جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در حدفاصل آنزیم‌های 3'-XbaI::SpeI-5' است. این دو آنزیم به دلیل دارا بودن انتهای سازگار پس از برش امکان مضاعف سازی و ساخت ترکیبات مختلفی از توالی‌های تنظیمی را مهیا می‌نمایند. این ویژگی در ساخت پرموترهای مصنوعی مختلفی بکار گرفته شده است (Mazarei et al., 2008; Rushton et al., 2002; Shokouhifar, 2009; Shokouhifar et al., 2011a; Shokouhifar et al., 2011b). این ویژگی از وکتور pBGi (Shokouhifar, 2009) به وکتور pCaBGi منتقل شده است. جایگاه کلونینگ توالی‌های تنظیمی در فاصله حدود ۲۰ نوکلئوتیدی از توالی TATA Box موجود در توالی پرموتر حد اقل قرار گرفته است. حضور ژن گزارشگر

GUS واجد اینترون یکی دیگر از ویژگی‌های وکتور pCaBGi است. حضور اینترون تنها بیان ژن GUS را به سلول‌های یوکاریوتی محدود می‌نماید. در نتیجه تنها سلول‌های گیاهی تراریخت شده قادر به بیان این ژن و در نتیجه تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز خواهند بود. به همین دلیل در هنگام سنجش فعالی این آنزیم و بررسی عملکرد توالی‌های تنظیمی بالادست آن از تداخل بیان پروکاریوتی که ناشی از بیان ژن در سلول اگروباکتریوم است ممانعت می‌شود. مطالعات نشان داده است در وکتورهای حامل ژن GUS فاقد اینترون مانند pBI121 و pGPTV در هنگام سنجش فعالیت آنزیم مشکلاتی بروز می‌نماید که ناشی از بیان باکتریائی این ژن و تداخل آن در نتایج کمی و کیفی است (Shokouhifar, 2009).

ویژگی مهم دیگر وکتور pCaBGi بهره‌گیری از ژن گزینشگر bar است. ژن bar قادر است علف کش بیولافوس با نام تجاری گلیفوسینیت را تجزیه نماید (Thompson et al., 1987) و اولین بار در سال ۱۹۸۷ جهت تولید گیاهان مقاوم به علفکش مورد استفاده قرار گرفته است (De Block et al., 1987). استفاده از این ژن علاوه بر افزایش ضریب اطمینان در گزینش گیاهان تراریخت سبب می‌شود تا گیاهان تراریخت تولید شده علاوه بر دریافت ژن هدف در برابر یک علف کش نیز مقاوم شوند.

وکتور pCaBGi به دلیل دریافت توالی پایه خود از وکتور pCambia3301 نقاط قوت این وکتور را نیز دریافت نموده است. از جمله این نقاط قوت می‌توان به تکثیر آن در تعداد نسخه بسیار بالا در باکتری اشرشیاکلی اشاره نمود که ناشی از حضور منشاء تکثیر مربوط به وکتور pBR322 در این وکتور است. این ویژگی سبب می‌شود کار با این وکتور در مراحل کلونینگ برخلاف وکتورهایی کم نسخه مانند pGPTV و pBI121 تسهیل گردد. از سوی دیگر به دلیل وجود منشاء تکثیر مربوط به وکتور pVS1 ای وکتور در سلول اگروباکتریوم با تعداد نسخه کم تکثیر ولی بطور پایداری در مراحل تکثیر در باکتری حفظ می‌شود و احتمال حذف شدن آن بسیار اندک است. توالی و اجزاء وکتور pCaBGi به شماره بازیابی MG719235 به طور کامل در شکل ۵ نمایش داده شده است.



شکل ۵: توالی کامل منطقه T-DNA مربوط به وکتور pCaBGi

بر اساس مجموعه ویژگی‌های فوق می‌توان وکتور pCaBGi را بعنوان یک وکتور بیانی فاقد توالی پروموتری جهت استفاده در مراحل کلونینگ و ساخت پروموتر مصنوعی مورد استفاده قرار داد و پس از تایید صحت توالی پروموتری بدون دستورزی بیشتر از آن جهت انتقال به سلول اگروباکتریوم و در نهایت بیان موقت در گیاه مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مهیا نمودن فضای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود. از همکاران پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به جهت در اختیار قرار دادن سویه‌های باکتری و وکتورهای مورد استفاده تشکر می‌نمائیم. منابع مالی این تحقیق از محل طرح شماره ۱۵۲۸۵ معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شد.

منابع

- An, G., Watson, B., Stachel, S., Gordon, M. and Nester, E. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *The EMBO journal* 4: 277.
- Bahrabadi, M., Shokouhifar, F. and Ebrahimi, M.A. (2014) Functional analysis of sp-dd synthetic promoter using agroinjection method in tobacco plant. *Crop Biotech.* 6 11-20.
- Blazek, J. and Hal, S. A. (2013) Promoter Engineering: Recent Advances in Controlling Transcription at the Most Fundamental Level. *Biotechnology journal* 8: 46-58.
- Cazonelli, C. I. and Velten, J. (2008) In Vivo Characterization of Plant Promoter Element Interaction Using Synthetic Promoters. *Transgenic Research* 17: 437-457.
- Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong, S.C. and To, K.Y. (2003) Complete sequence of the binary vector pbi121 and its application in cloning t-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 11: 287-293.
- De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1987) Engineering her-

- bicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. The EMBO journal 6: 2513.
- Gurr, S.J. and Rushton, P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: How are we going to express it? Trends in Biotechnology 23: 283-290.
- Gynheung, A. (1987) Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods in enzymology 153: 292-305.
- Heise, A., Lippok, B., Kirsch, C. and Hahlbrock, K. (2002) Two immediate-early pathogen-responsive members of the atcmpg gene family in *Arabidopsis thaliana* and the w-box-containing elicitor-response element of atcmpg1. Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 9049.
- Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairatnam, S., Gleave, A.P. and Laing, W.A. (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and rna silencing in plants. Plant Methods 1: 13.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000) Pgreen: A versatile and flexible binary ti vector for agrobacterium-mediated plant transformation. Plant molecular biology 42: 819-832.
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P. and Schilperoort, R. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir-and t-region of the agrobacterium tumefaciens ti-plasmid.
- Hollon, T. and Yoshimura, F.K. (1989) Variation in enzymatic transient gene expression assays. Analytical biochemistry 182: 411-418.
- Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated cmpg1 gene in *petroselinum crispum*. The Plant Journal 26: 217-227.
- Lee, L.-Y. and Gelvin, S.B. (2008) T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiology 146: 325-332.
- Liu, W., Mazarei, M., Rudis, M., Fethe, M. and Stewart, C. (2011) Rapid in vivo analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytoensing. BMC biotechnology 11: 108.

- Mazarei, M., Teplova, I., Hajimorad, M.R. and Stewart, C.N. (2008) Pathogen phyto-sensing: Plants to report plant pathogens. *Sensors* 8: 2628-2641.
- Mehrotra, R., G., Gupta, R., Sethi, P., Bhalothia, N., Kumar and S., Mehrotra. (2011) Designer Promoter: An Artwork of Cis Engineering. *Plant molecular biology* 75: 527-536.
- PCAMBIA. <http://www.cambia.org>
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B. and Somssich, I.E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. *The Plant Cell Online* 14: 749-762.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E.C. and Lomonosoff, G.P. (2009) Peaq: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7: 682-693.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual* CSHL press.
- Shokouhifar, F. (2009) National Institute of Genetic engineering and Biotechnology Tehran.
- Shokouhifar, F., Zamani, M., Motallebi, M., Mousavi, A. and Malboobi, M. (2011a) Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in brassica napus. *Biologia Plantarum* 55: 689-695.
- Shokouhifar, F., Zamani, M.R. and Motallebi, M. (2011b) Expression pattern of the synthetic pathogen-inducible promoter (synp-ff) in the transgenic canola in response to sclerotinia sclerotiorum. *Iranian Journal of Biotechnology* 9.
- Sprenger Haussels, M. and Weisshaar, B. (2001) Transactivation properties of parsley proline-rich bzip transcription factors. *The Plant Journal* 22: 1-8.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from streptomyces hygroscopicus. *The EMBO journal* 6: 2519.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. and Oliver, D.J. (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant molecular biology* 40: 711-717.

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