در
پژوهش سازندگی
زراعت و باغبانی شماره ۷۵، تابستان ۱۳۸۶

جداسازی ترادف نشانه زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو ازگیاه کلزا و ارزیابی عملکرد آن در گیاه تراریخت توتون

● **امیری نودیجه علیرضا**
دانش‌آموخته علوم سلولی و مولکولی - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران و دانشگاه خاتم - تهران
● **سلمانیان علی هاتف**
عضو هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فناوری- تهران(نویسنده مسئول)
● **موسوی امیر**
عضو هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فناوری- تهران
تاریخ دریافت: اردیبهشت‌ماه۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذرماه ۱۳۸۵
Email: salman@nigeb.ac.ir

چکیده

روبیسکو، آنزیم کلیدی واکنش‌های تاریکی فتوسنتز در استرومای کلروپلاست است. زیر واحد کوچک این آنزیم که توسط ژنوم هسته کنترل می‌شود، پس از بیان در سیتوپلاسم توسط پپتید نشانه اختصاصی به کلروپلاست هدفمند می‌گردد. به منظور به کارگیری این ترادف نشانه در هدفمندکردن محصولات دیگر به داخل کلروپلاست، ابتدا DNA ژنومی از برگ گیاه کلزا(*Brassica napus* L.) استخراج گردید. تکثیر ترادف نشانه مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن کد کننده پپتید نشانه انجام شد. قطعه تکثیر شده به طول ۱۷۰bp درپلاسمید عمومی ۱۸ pUC و سپس در پلاسمید بیانی گیاه ۱۲۱ pBIکلون شد. در مرحله بعد انتقال ژن به گیاه توتون با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویهٔ ۴۴۰۴ LBA انجام گرفت. انتخاب اولیه سلول‌های تراریخت گیاه توتون بر روی محیط حاوی کانامایسین صورت پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و نیز رنگ آمیزی برگ‌ها با محلول GUS تراریختی احتمالی گیاهان را اثبات کرد. در عین حال، رنگ آمیزی GUS بر روی کلروپلاست‌های جدا شده از گیاهان تراریخت و مقایسه آن با کلروپلاست‌های گیاهان شاهد نشان داد که محصول ژن GUS به خوبی به کلروپلاستها هدفمند شده است. نتایج این بررسی عملکرد عمومی ترادف نشانه زیرواحد کوچک روبیسکو گیاه از کلزا را برای انتقال پروتئین‌های هترولوگ (نظیر GUS) و در میزبان هترولوگ (نظیر توتون) نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: پپتید نشانه، کلروپلاست، روبیسکو، کلزا، توتون، ژنGUS

Pajouhesh & Sazandegi No:75 pp: 175-181

Isolation of transit peptide from small subunit of rubisco enzyme from rapeseed and its analysis in Ttransgenic tobacco plants

By: Amiri Noodije A., National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Tehran , Iran
Khatam University, Tehran , Iran
Salmanian A. H., National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Tehran , Iran
Mousavi Amir, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Tehran , Iran

Rubisco is the key enzyme in photosynthesis reactions in chloroplast stroma. The small subunit of this enzyme which is encoded by the nuclear genome is targeted into the chloroplast by the activity of its signal peptide. In order to utilize the efficiency of this transit peptides in specific targeting of foreign proteins to chloroplast, the genomic DNA from rapeseed (*Brassica napus* L.) leaves was isolated. By using the specific primers and PCR methods, the signal sequance (170bp) was isolated and cloned into pUC18 as a cloning and pBI121 as a plant expression vectors. The constract was transfered into tobaccosterile explants via *Agrobacterium tumefaciens* (strain LBA4404) mediated transformation procedure.The selection of transformed cells were done on kanamycine containing media. PCR with specific primers on the DNA isolated from transgenic plant and GUS staining on leaves of the same samples confirm the presence of the recombinant construct and its activity.Further more, the GUS staining on isolated chloroplast from putative transgenic and control plants show that the product of gus gene targeted to chloroplast succesfully. These results show the general ability of rubisco small subunit transit peptide from *Brassica napus* in targeting of the heterologus protein (GUS reporter gene) to chloroplast of a heterologus host (tobacco).

Key words: Signal peptide, Chloroplast , Rubisco, Rapeseed, Tobacco, GUS gene

مقدمه

در سلولهای یوکاریوت پروتئین‌ها پس از ساخته‌شدن در سیتوپلاسم طی مکانیسم بسیار اختصاصی، به سمت جایگاه عملکرد خود هدفمند می‌شوند(۱۵). اطلاعات لازم برای هدفمندشدن پروتئین[۱] به سمت اندامک هدف، توسط بخشی از توالی پپتیدی مهیا می‌گردد که به طور معمول در انتهای آمینی پروتئین قرار داشته و پپتید نشانه[۲] نام دارد(۱۲). علاوه بر آن مکانیسمهای کمکی دیگری نظیرپروتئینها و گاه لیپیدهای سطحی اندامک، مانند علائمی باعث ورود محصولات به اندامک می‌شوند(۱، ۲، ۵).

پروتئین پیش ساز زیرواحدکوچک آنزیم روبیسکو که در هسته کد می‌شود توسط پپتید انتهای آمینی خود به کلروپلاست هدایت می‌شود. این پروتئین که بیشترین پروتئین تولید شده در گیاه به حساب می‌آید، پس از رونویسی ژن در هسته و تولید محصول در سیتوپلاسم، توسط پپتیدهای ترابری[۳] که از اختصاصی‌ترین و قوی‌ترین این پپتیدها محسوب می‌شود، همراه با مصرف انرژی (ATP) به سمت کلروپلاست هدایت می‌گردد. انتقال از عرض غشاء توسط پروتئین‌های جابجا کننده پوشش خارجی و داخلی غشاء کلروپلاست(TIC، TOC) صورت می‌گیرد. در این مسیر ابتدا پروتئین پیش ساز به فضای بین دو غشا کلروپلاست وارد شده وسپس از محل اتصال TIC وTOC به فضای استرومائی وارد می‌شود (۷، ۱۷، ۱۸). پپتیدهای نشانه هر اندامک می‌تواند پروتئین‌ها را به صورت اختصاصی به شبکه آندوپلاسمی، واکوئل، پراکسی زوم و میتوکندری هدفمند نمایند. در مهندسی ژنتیک و به ویژه گیاهان تاریخت این توالی‌های نشانه به منظور هدایت پروتئین‌های نوترکیب به اندامک‌های خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند. کارهای اولیه در این زمینه در اواخر دهه ۸۰ میلادی و با انتقال محصول پروتئین ژن مقاومت به کانامایسین (nptII) به داخل کلروپلاست انجام پذیرفت (۶). در مطالعه‌ای دیگر انتقال پروتئین مربوط به ژن گزارشگر GFP به داخل کلروپلاست با استفاده از توالی انتهای آمینی پروتئین‌های FtsZ گزارش شده است (۱۴). نمونه‌ای کاربردی از هدفمندکردن پروتئین به کلروپلاست با استفاده از پپتیدهای نشانه، انتقال ژن کلسترول اکسیداز (ChoM) به کلروپلاست است. کلسترول اکسیداز، یک آنزیم باکتریایی است که فعالیت حشره‌کشی قوی در مقابل کرم غوزه خوار پنبه دارد. نتایج این بررسی نشان داد که درگیاهان توتون که ژن کلسترول اکسیداز(ChoM) به کلروپلاست هدفمند نشده بود، جوانه‌های گلدار رشد نکرده، برگ‌ها ضخیم و چروک خورده بودند و رشد گیاهان متوقف شد. اما گیاهانی که در آنها کلسترول اکسیداز به داخل کلروپلاست هدفمند شده بود، از نظر رشد و مورفولوژی، طبیعی و گلدار بودند. همچنین میزان بیان این ژن زمانی که به کلروپلاست هدفمند شده بود تقریباً ۴ برابر بیشتر از ChoM هدفمند نشده بود(۴).

همچنین انتقال ژن EPSPS گیاه *Arabidopsis thaliana* L. که با پپتید نشانه از گیاه اطلسی[۴] ترکیب شده بود نشان داد که محصول ژن مورد نظر توانسته به خوبی به کلروپلاست منتقل شده و در گیاه ایجاد مقاومت به علف کش گلایفوسیت نماید (۸). بنابراین شناسایی، جداسازی و استفاده از ترادف پپتیدهای نشانه به منظور کنترل بیشتر روی مکانیسم‌های موجود

در اندامک‌ها، جمع آوری پروتئین‌های نوترکیب از سطح سیتوپلاسم موجود تراریخت وتجمع آنها در یک مکان خاص و در نهایت تسهیل فرآیندهای پایین دست[۲] و استخراج پروتئین نوترکیب از مزایای کار بر روی این پپتیدها به شمار می‌رود. ترشحی نمودن پروتئین‌های نوترکیب یا هدایت آنها به پلاستیدها و میتوکندری، ایجاد تحمل به علف کشها، مقاومت به حشرات یاسایر تنشهای زیستی و تولید فرآورده‌های داروئی درگیاهان نمونه‌ای از کاربردهای عملی استفاده از ترادف پپتیدهای نشانه است (۴).

در این تحقیق ترادف نشانه[۵] زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو به عنوان یک پپتید ترابری قوی و اختصاصی از گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) جدا شده و به همراه یک ژن گزارشگر (GUS) و از طریق آگروباکتریوم به گیاه توتون منتقل گردید. هدفمندشدن محصول ژن گزارشگر GUS به عنوان یک پروتیین عمومی به داخل کلروپلاست گیاه مدل (توتون) صحت ترادف جدا شده ازگیاه کلزا وعملکرد عمومی آن را در گیاهان دیگر اثبات می‌کند.

مواد و روش‌ها

گیاه کلزای پاییزه (رقم Westar) و گیاه توتون رقم Xanti مورد استفاده قرار گرفت. استخراجDNA از برگ گیاه کلزا و توتون به روش CTAB انجام شد (۱۹). بر اساس اطلاعات بدست آمده از بانک‌های اطلاعاتی در مورد پپتید نشانه زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو از گیاه کلزا (Accession No: X۰۷۳۶۷) آغازگرهای اختصاصی رفت BRT ۱ (۵-GAAGGATCCATGGCTTACTCTATGC) و برگشت $BRT_{۲}$ (۵-CACGGATCCCGAGTTAACTCTTCCT) با جایگاه برشی برای آنزیم *Bam*HI (در ترادف مشخص شده است) طراحی و ساخته شدند. واکنش زنجیره ایی پلیمراز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱ میکرولیتر ازغلظت ۱۰ پیکو مولار از هر پرایمر، ۲ میلی مولار $۲۰۰MgCl_{۲}$ میکرومولار dNTP (deoxy nucleotide tri-phosphate) و ۲/۵ واحد آنزیم pfu DNA polymerase (Fermentas) انجام گرفت. به منظور آنالیزهای مولکولی برای اثبات حضور ساختار ژنی مورد نظر در گیاه تراریخت احتمالی پرایمر برگشتی برای ژن GUS با نام GUSR (۵'-CCGGCATAGTTAAAGAAATCATG) نیز طراحی و ساخته شد. از این پرایمر به همراه پرایمر BRT۱ به عنوان پرایمر رفت، می‌توان حضور توام ترادف نشانه کلروپلاستی و ژنGUS را در ژنوم گیاه تراریخت اثبات کرد. به منظور تعیین ترادف[۶] با پرایمرهای استاندارد وسهولت در مراحل کلون کردن، قطعه مورد نظر در پلاسمید pUC ۱۸ و در محل *Bam*HI وارد شد. صحت کلونینگ در پلاسمید pUC ۱۸ با روش PCR و آنالیزهای آنزیمی تأیید شده وپلاسمید نوترکیب برای توالی یابی ارسال شد. به منظور انتقال ژن به گیاه، پلاسمید pUC ۱۸ حاوی ترادف نشانه روبیسکو با دو آنزیم *Cfr*۹I و *Xba*I بریده شد و قطعه برش داده شده درون پلاسمید pBI ۱۲۱ که با همان آنزیمها برش خورده بود کلون گردید. پلاسمید حاصله تحت عنوان pBI ۱۲۱ +۱۷۰ نامگذاری گردید.

انتقال ژن به گیاه توتون با استفاده از آگروباکتریوم

پلاسمید pBI ۱۲۱ +۱۷۰ با استفاده از روش انجماد و ذوب[۷] (۱۹) به باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، سویه LBA ۴۴۰۴ منتقل گردید. تراریختی گیاه توتون با آگروباکتریوم توسط روش استاندارد قطعات برگی(Leaf disk) وبا استفاده ازبرگهای جوان گیاهان یک الی ۲ ماهه استریل صورت گرفت. قطعات برگی پس از آلودگی با آگروباکتریوم بر روی محیط MS (۱۶) حاوی هورمون نفتالن استیک اسید(NAA) با غلظت ۰/۱mg/L وهورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) با غلظت mg/L ۳ منتقل شدند. نمونه‌ها بر روی محیط باززایی، در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اتاق رشد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، بافت‌های تلقیح شده به محیط گزینشگر حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۲۰۰mg/l) و کانامایسین (۲۵mg/l) انتقال یافتند. در تمام مراحل شرایط اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی ودمای ۲۵ درجه سانتی گراد اعمال گردید. ساقه‌های باززایی شده از بافت اولیه جدا و به محیط‌های انتخابی جدید انتقال داده شدند. روش فوق برای انتقال ساختار پلاسمیدی pBI ۱۲۱ استاندارد (فاقد قطعه مورد نظر) به عنوان شاهد منفی نیز انجام شد.

انتخاب جوانه‌های تراریخت و ریشه‌زایی آنها

ریز نمونه‌ها به فاصله زمانی دو هفته یکبار به محیط گزینشگر جدید با همان ترکیب واکشت شدند. گیاهچه‌های باززایی شده در مرحله چهار برگی به محیط گزینشگر با غلظت کانامایسین ۵۰mgL منتقل شدند. غلظت کانامایسین در مرحله بعدی رشد به ۱۰۰mg/L افزایش یافت. به منظور ریشه زایی، گیاهچه‌های سبز و رشدیافته، به محیط محیط MS به همراه آنتی بیوتیک (سفوتاکسیم ۲۰۰mg/L و کانامایسین ۱۰۰mg/L) و فاقد هورمون انتقال داده شدند.

آنالیزهای ملکولی و هیستو شیمیایی

گیاهچه‌های تراریخت، پس از ریشه دار شدن، به درون خاک (گلدان) انتقال یافتند. استخراج DNA از برگ‌های جوان و سبز توتونهای تراریخت انجام شد. وجود قطعه ترادف نشانه (۱۷۰bp) در کنار ژن GUS، در گیاهان تراریخت با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای BRT۱ (پرایمر رفتی برای قطعه ۱۷۰) و GUSR (پرایمر برگشتی ژن GUS که در داخل آن طراحی شده بود) تایید شد. به منظور انجام آزمون هیستوشیمیایی GUS گیاهچه‌های حدود ۶ برگی انتخاب و با روش استاندارد مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند(۹). به منظور بررسی عملکرد مناسب قطعه ۱۷۰ جفت بازی در انتقال محصول ژن GUS به درون کلروپلاست، استخراج کلروپلاست از برگهای سبز و جوان توتونهای تراریخت و غیر تراریخت با استفاده از روش استاندارد صورت گرفت(۳). رنگ آمیزی GUS بلافاصله بر روی کلروپلاست‌های جدا شده انجام شد.

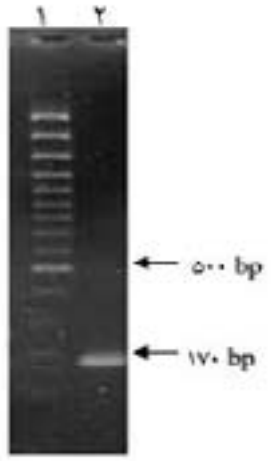
نتایج و بحث

نتیجه تکثیر قطعه مورد نظراز روی ژنوم گیاه کلزا و با استفاده از آنزیم *pfu* پلیمراز در شکل شماره ۱ قابل مشاهده است. به منظور اطمینان اولیه از قطعه تکثیر شده، آنالیز آنزیمی قطعه ترادف نشانه با آنزیم *Hae*III، که دارای

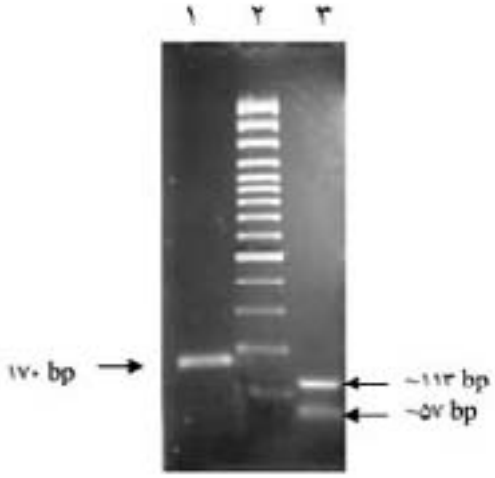
یـک جایگاه برش در داخل قطعه اسـت (تولید قطعاتی با انـدازه ۱۱۳ و ۵۷ جفـت باز) انجام گرفت. نتیجه این آنالیـز آنزیمی بر روی محصول PCR که تایید اولیه کار محسـوب می‌شود در شـکل ۲ ارائه شده است. در مراحل بعد قطعه تکثیر شـده در داخل یک ناقل همسانه سازی عمومی نظیر pUC ۱۸ قرار گرفت. به منظور تایید همسـانه سازی ژن در پلاسمیدpUC ۱۸ از هضم آنزیمی و PCR بر روی ساختارpUC ۱۸ حاوی قطعه ۱۷۰ جفت بازی صورت گرفت که نتیجه درشـکل ۳ ارایه شده است. همسانه سازی در پلاسمید ۱۸ pUC دو هدف اساسـی را دنبـال می‌کند؛ هدف اول اسـتفاده از پرایمرهای اسـتاندارد M۱۳ برای انجام تعیین ترادف است که محل اتصال این پرایمرها در دوطرف MCS این پلاسـمید قرار دارد. هدف دوم بهره بـرداری از MCS این ناقل به منظور آماده سازی دو انتهای این ساختار برای انتقال به پلاسمید بیان ژن گیاهی یعنی pBI ۱۲۱ می‌باشد. همسانه سازی ترادف نشانه مذکور در پلاسـمید pBI ۱۲۱ با اسـتفاده از روش PCR و به کار گیری پرایمرهای اختصاصی دو سـر ترادف نشـانه وهمچنین هضم با آنزیمهای*Xba*I و*Cfr*۹I که در دو سـر قطعه کلون شده وجود دارد، تایید گردید. نتایج تایید همسانه سازی قطعه در پلاسمید pBI ۱۲۱ در شکل ۴ آمده است. استفاده از جایگاه برش آنزیمی *Xba*I در ابتدای ترادف مورد نظر، علاوه بر امکان همسانه سازی در ناقـل pBI ۱۲۱ موجب میگردد که قبـل از کدون آغازین (AUG) بر روی mRNA ساخته شـده در داخل سلولهای یوکاریوت توالی بهینه برای اتصال ریبوزوم گیاهی وهمچنین عملکرد مناسب آن بوجود آید. بر اساس گزارشات ارایه شـده (۱۰، ۱۱، ۱۳) وجود یک باز پورین(R) و به ویژه نوکلیوتید A در موقعیت ۳- (بر مبنای شـروع AUG) اثر بسـیار مهمی در شناسایی کدون آغازین ودر نتیجه افزایش بیان ژن دارد. وجود این نوکلیوتید در مولکول‌های mRNA پستانداران و گیاهان کاملاً حفاظت شده است. به کار گیری جایگاه آنزیمی *Xba*I با ترادف شناسـایی TCTAGA که به طور دقیق قبل از کدون آغازین قرار گرفته است موجب میگردد که در موقعیت ۳- باز پورین (A) قرار گیرد.در حالیکه بهره برداری از سـایر جایگاههـای آنزیمی موجود در MCS پلاسمید pBI۱۲۱ این موقعیت را ایجاد نمی‌کند.

نوسـاقه‌های رشد یافته بر روی قطعات برگ ترا ریخت که در محیط MS حاوی کانامایسین بدست آمده بودند (شکل ۵ - الف) پس از رشد مناسب وبه منظور ریشـه زایی به محیط ریشـه زائی و درون ظروف بزرگتر انتقال یافتند (شـکل ۵ – ب). در تراریختی گیاه توتون و باززایی سـلولهای تراریخت نیز از استراتژی افزایش در غلظت‌های کانامایسین استفاده شد. کانامایسین قادر است بـا اتصال به بخش ۳۰S ریبوزوم در سـاختارهای پروکاریوتی موجود در گیاه، نظیر کلروپلاست، وبا ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین سازی، سلول تحت اثر را از بین ببرد. میزان مقاومت یک سلول گیاهی تراریخت شده بستگی کامل به تعداد نسـخه‌هایژن مقاومت به کانامایسین و جایگاه قرارگیری[۸] آن درون ژنوم هسته‌ای دارد. در این روش مرگ سلولهای غیر تراریخت و آزادشدن ترکیبات نا مطلوب از آنها تاثیری در حذف سلولهای تراریخت نداشته و سلولهای تراریختی که تعداد نسخه‌های وارد شده یا محل جاگیری ساختارهای ژنی مناسب نباشد تنها بخاطر فشار محیطی ناشی از آنتی بیوتیک حذف می‌شوند. بهره‌برداری از غلظت‌های فزاینده آنتی بیوتیک کانامایسین (۱۰۰mg/L، ۷۵، ۵۰) در انتخاب سلولهای گیاه تراریخت توتون موجب می‌گردد که گیاهچه‌های کاملا پایدار در برابر کانامایسین انتخاب گردد.

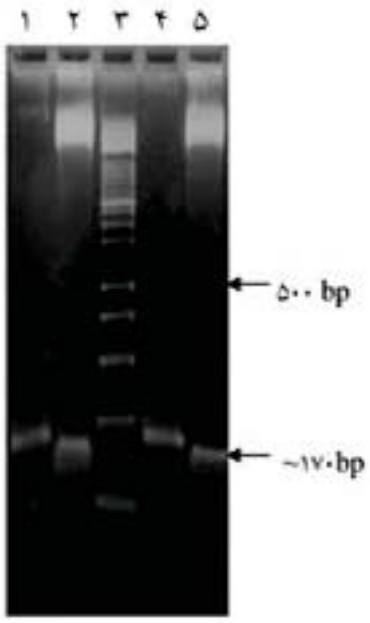
نتایج PCR بر روی DNA گیاهان تراریخت احتمالی توسط پرایمرهای اختصاصـی BRT ۱ (پرایمـر اختصاصی مربوط به ابتدای ترادف نشـانه) و GUSR (پرایمر برگشـتی که در داخل ژن GUS طراحی شـده بود) نشان داد کـه اتصـال این دو ترادف به خوبی انجام شـده وهنـگام جایگیری در داخل ژنوم گیاه نیز دچار آسیب‌های احتمالی نشده است. تکثیر یک قطعه ۷۱۵ جفت بازی که حد فاصل این دو پرایمر می‌باشـد و باید تنها در گیاه تراریخت تکثیرشـود دلیل اولیه برای حضور مناسـب این ساختار در ژنوم گیاه می‌باشد. نتایج این آنالیز در شکل شماره ۶ آمده است.



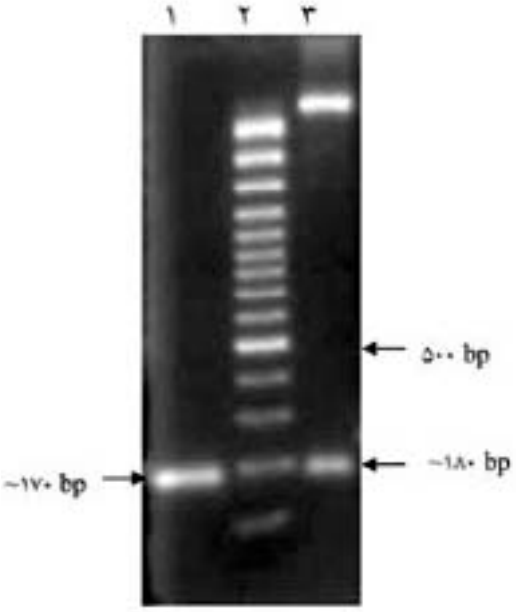
شکل۱) محصول تکثیر قطعه DNA مربوط به پپتید نشانه بر روی ژل آگارز ۲/۵٪
۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی
۲) تکثیر با آنزیم *Pfu* پلیمراز



شـکل۲) آنالیز قطعه DNA پپتید نشـانه (۱۷۰ جفت بازی) با هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲/۵٪
۱) قطعه ۱۷۰ جفت بازی (به عنوان کنترل)
۲) مارکر ۱۰۰ جفت بازی
۳) هضم با آنزیم *Hae*III



شکل ۳) بررسی حضور قطعه ترادف نشانه در دو پلاسمید pUC ۱۸ با هضم آنزیمی و PCR
۱و۴) محصولات PCR با پرایمرهای BRT۱ و BRT۲
۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی
۲و۵) محصولات هضم آنزیمی pUC ۱۸+۱۷۰ با آنزیم *Bam*HI



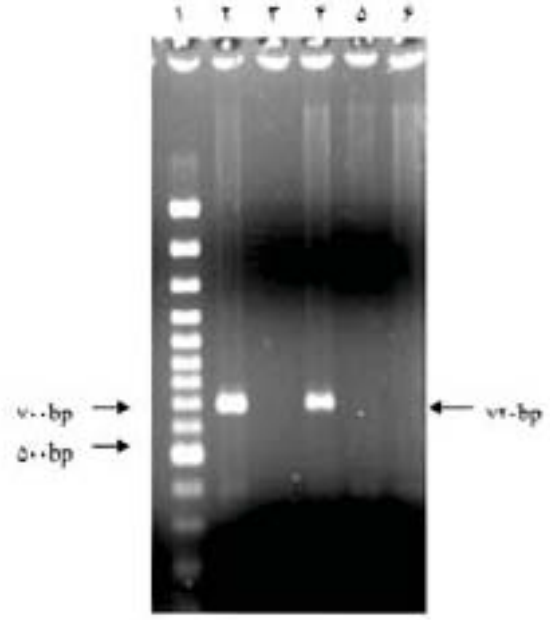
شکل۴) بررسی وجود قطعه ترادف نشانه در درون ناقل پلاسمیدی pBI ۱۲۱ +۱۷۰ به کمک PCR و هضم آنزیمی
۱) محصول PCR با پرایمرهای BRT۱ و BRT۲
۲) مارکر ۱۰۰ جفت بازی
۳) محصول هضم آنزیمی pBI ۱۲۱+۱۷۰ با آنزیمهای *Xba*I و *Cfr*۹I (قطعه حدود ۱۸۰ جفت باز است)

الف

ب

شکل۵) الف: گیاهچه‌های تراریخت با ساختا pBI ۱۲۱ +۱۷۰ در محیط گزینشگر حاوی ۵۰mg/l کانا مایسین و ۲۰۰mg/l سفو تاکسیم
ب: رشد و ریشه زایی گیاهچه‌های تراریخت در محیط حاوی آنتی بیوتیک(کانامایسین باغلظت ۱۰۰mg/l و بدون هورمون پس از یک ماه)

نتایج آزمون هیستو شیمیایی GUSبر روی برگ جدا شده از گیاه تراریخت احتمالی، نشـانگر بیان ژن GUS در آنها بود (شـکل ۷-الف) . تفاوت در میزان وبویژه تجمع رنگ مشاهده شـده می‌تواند ناشی از هدفمند شدن محصول ژن GUS به کلروپلاسـت‌ها (در گیاهان مورد نظر) در مقایسـه با گیاهانی باشـد کـه ترادف حاصل از ژنGUS به صورت عمومی در سیتوپلاسـم آنها پراکنده شـده است(شـکل ۷- ب) . در نمونه‌های کنتـرل (گیاه غیر تراریخـت) بیان ژن GUS مشـاهده نشد. به منظور اطمینان بیشـتراز عملکرد پپتید نشانه در

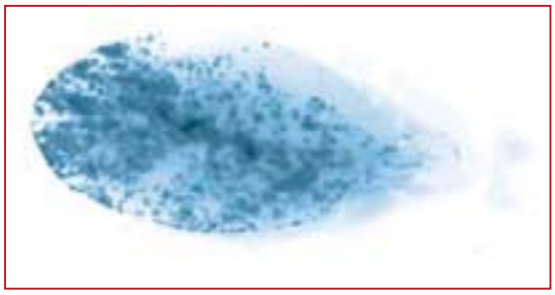


شـکل۶) نتایج آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت با واکنش PCR با استفاده ازپرایمرهای BRT۱ و GUSR بر روی ژل آگارز ۱٪
۱) مارکـر ۱۰۰ جفت بازی ۲و۴) گیاهان با سـاختار pBI ۱۲۱ حاوی قطعه ۱۷۰ جفت بازی
۳) گیاه حاوی سـاختار pBI۱۲۱ تنها ۵) گیاهان غیر تراریخت ۶) کنترل منفی (بدون الگو)

هدفمندکردن محصول ژن GUS به داخل کلروپلاسـت گیاهان تراریخت، باید از برگهای گیاهان تراریخت وغیر تراریخت کلروپلاسـت‌ها را جداسـازی کرده و آزمایش رنگ آمیزی GUS بر روی این اندامک‌ها انجام شود. جهت استخراج کلروپلاست از برگهای جوان و مسن (بطور جداگانه) استفاده شد. مقایسه بین نتایج نشـان داد که کیفیت و کمیت کلروپلاست‌های حاصل از برگ‌های جوان (کمتر از یک ماه) مناسـب‌تر می‌باشـد. به نظر میرسـد که وجود فراورده‌های ذخیره‌ای و به ویژه نشاسـته که در حین استخراج به همراه کلروپلاست‌ها باقی می‌ماند تاثیر مستقیمی بر محصول نهایی و به ویژه در رنگ آمیزی GUS دارد. انجام رنگ آمیزی GUS بر روی کلروپلاسـت‌ها نیازمند حذف رنگ ناشـی از کلروفیل اسـت تا رنگ حاصل ازعملکرد GUS قابل مشاهده باشد این عمل به طور معمـول با بهره برداری از اتانول مطلق انجام می‌پذیرد، اما مجاورت اتانول مطلق با کلروپلاستها موجب میگردد که علاوه بر رنگ بری، آب موجود در این اندامک ها نیز به سرعت خارج شده و کلروپلاستها به صورت توده‌های مجتمع در آیند. در این صورت انجام مراحل بعدی رنگ آمیزی بسـیار مشـکل خواهد شـد. برای جلوگیری از این عمل، رنگ بری با محلولهای رقیق‌تر اتانول و تکرار مراحل رنگ بری به عنوان روشـی جایگزین، مورد اسـتفاده قرار گرفت. نتایج سـنجش GUS بر روی کلروپلاست‌های جدا شده از گیاهان تراریخت احتمالی و مقایسـه آن با کلروپلاست‌های جدا شـده از گیاهان شاهد نیز هدفمندشدن پروتئین GUS را به درون کلروپلاست‌های خالص نشان می‌دهد. این نتیجه در شـکل ۸ به نمایش در آمده است. با این آزمایش مشخص شد که ترادف نشانه از زیر واحد کوچک آنزیم روبیسـکو که از گیاه کلزا جدا شـده است، قادر است یک پروتین هترولوگ را به داخل کلروپلاسـت هدایـت نماید. علاوه بر آن این عمل در یـک میزبان هترولوگ (گیاه تنباکو) روی داده اسـت. از این آزمایش می‌توان یک نقش عمومی‌تر برای این ترادف نشـانه متصور شد. از این یافته در بیوتکنولوژی گیاهی میتوان بـرای هدفمندکردن پروتیین‌های نوترکیب نظیر پروتینهای دارویی، موادی که در ایجاد مقاومت به استرس‌های زنده و غیر زنده در گیاه نقش دارند و محل عملکرد آنها در درون اندامک کلروپلاسـت اسـت و موارد مشابه بهره‌برداری کرد.

سپاسگزاری

از خانم‌ها محیات جعفری و دکتر فرزانه نجفی برای کمک‌های بسـیار



الف

ب

شکل۷) رنگ آمیزی برگهای گیاهان تراریخت برای حضور محصول ژن GUS
الف: گیاه حاوی ساختار۱۷۰+pBI ۱۲۱
ب: گیاه حاوی ساختارpBI ۱۲۱

الف ب ج

شکل۸) رنگ آمیزی GUS بر روی کلروپلاستهای جدا شده از گیاهان تراریخت و کنترل

الف: گیاه حاوی ساختار ۱۷۰ +pBI۱۲۱

ب: گیاهان حاوی ساختار pBI۱۲۱

ج: گیاه غیر تراریخت

مفید آزمایشــگاهی تشــکر و قدردانی می‌شــود. کلیه هزینه‌های انجام این تحقیق از محل اعتبارات پروژه شماره ۱۷۰ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تامین شده است.

پاورقی‌ها

1- Protien Targeting
2- Signal Peptide
3- Transit Peptides
4- Petunia
5- Signal Sequence
6- Sequencing
7- Freeze and thow
8- Positional effect

منابع مورد استفاده

1- Barry D. Bruce. 2000; Chloroplast transit peptids: Structure, function and evolution. Trends in Cell Biology, 10: 440-447.

2- Barry D.Bruce.1998; The role of lipids in plastid protein transport. Plant Molecular Biology. 38: 223-246.

3- Cerovic Zoran G., Cheesbrough John K., David A. Walker. 1987; Photosynthesis by intact isolated chloroplasts on solid support. Plant Physiol. 84: 1249-1251.

4- David R.Corbin , Robet J. Grebenok, thomas E. ohnmeiss, John T. Greenplate and john p.purcell. 2001; Expression and chloroplast targeting of cholestrol oxidase in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. 126: 1116-1128.

5- Gottfried schatz and Benhard Dobbersteih.1996; Common principles of protein translocation across membranes. Science. 271(5255):1519-1526.

6- Guido van den Broeck and Horsch, R. B.1985; Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Nature. 313:358-363

7- Gurgen sall. 2002; Protein import into chloroplast.Current Opinion in Plant Biology. 5: 529-535.

8- Harry J.Klee, Piet F.J.Woutors, Peter D. Verhaert, Paul prosst.1987; Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Mol.Gen. Genet. 210: 437-442.

9- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M.W.1987; GUS fusions: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal. 6: 3901-3907.

10- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell. 44(2):283-92.

11- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. Gene, 299: 1–34

12- Lao Demelo Madrazo and Tashio Shimizu. 2001; Methods for detecting the signal peptide in transmembrane and globular proteins. Genome informatics. 12: 310-312.

13- Lutcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F. and Scheele, G. A. 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. EMBO Journal. 6(1): 43-8.

14- Fugiwara,M.,Yashida S. 2001; Chloroplast targeting of chloroplast Division FtsZ proteins in Arabidopsis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 287: 462-467.

15- Marcio de castro silva filho and Cline, K. 1996; Mitochondrial and chloroplast targeting sequences in tandem modify protein import specificity in plant organelles. Plant Molecular Biology. 30:769-780.

16- Murashige, T. and skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology., 15: 473-497.

17- Olof E.; Gunnar V. H. 2001; Prediction of organellar targeting signals. Biochemica et Biophysica Acta.1541: 114-119.

18- Paul J.and Jurgen S. 2001; Toc, Tic and chloroplast protein import. Biochemica et Biophysica Acta., 154: 64-79.

19- Sambrook, J. and Russel D. W. 2001; Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. PP: 12.1-12.114.