انتقال ژن به سلول‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) به‌وسیله نانولوله‌های کربن: ناقلی جدید برای انتقال ژن

آرزو گلستانی پور[1]، علی اعلمی[*2]، مریم نیکخواه[3]، سامان حسینخانی[4]

1ـ دانش آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
2ـ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
3ـ دانشیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4 ـاستاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1396/8/25 تاریخ پذیرش: 1396/12/25

*نویسنده مسئول: ali_aalami@guilan.ac.ir، تلفن:0136690282، کد پستی:4199613776

چکیده:

یکی از اهداف اصلی زیست فناوری گیاهی ارائه تکنیکی ایمن و کارا جهت انتقال ژن به سلول‌های گیاه است. تا به امروز متداول‌ترین و موفق‌ترین روش انتقال ژن در گیاهان، انتقال به کمک اگروباکتریوم بوده که البته با محدودیت‌هایی ازجمله نوع گیاه میزبان روبه‌رو است. برای رفع این محدودیت‌ها و بهینه‌کردن انتقال ژن، تکنیک‌های مختلفی پیشنهاد شده است اما هیچ‌یک از آنها جایگزین مناسبی برای اگروباکتریوم نبوده‌اند. در سال‌های اخیر به فناوری نانو به‌عنوان راهکار جدیدی برای فائق‌آمدن بر محدودیت‌های زیست فناوری توجه شده است. طراحی و استفاده از نانوساختارهای زیست سازگاری که توانایی عبور از موانع سلولی و قابلیت انتقال هدفمند مواد را دارند دستاوردهای زیستی را بهبود بخشیده است. در این تحقیق، از نانولوله کربن که یکی از نانوذرات‌های موفق برای انتقال ماکرومولکول‌ها به سلول‌های پستانداران است برای نخستین‌بار جهت انتقال ژن به سلول گیاهی استفاده شد. به این منظور نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره‌ای با آرژنین عامل‌دار شد (Arg-SWNT) وDNA پلاسمیدی دارای ژن گزارشگر GFP (کدکننده پروتئین نشردهنده نور سبز) به سلول‌های توتون (در شرایط سوسپانسیون) انتقال داده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره (SWNT) توانستند درحالی‌که DNA پلاسمیدی به آنها متصل بود از دیواره سلولی و غشای پلاسمایی توتون عبور کنند. تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ فلورسنت موفقیت در انتقال ژن به کمک Arg-SWNT را تأیید می‌کند.

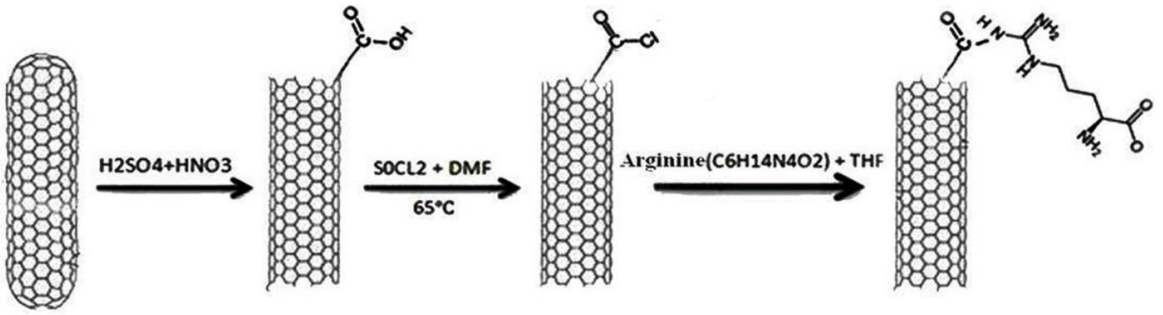
کلید واژگان: آرژنین، پروتئین نشردهنده نور سبز، نانولوله کربنی تک‌دیواره

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

با حذف اسید میزان رسوب‌دهی نانولوله‌ها کمتر می‌شود و به دور بالاتر سانتریفیوژ نیاز هست، جهت شستشو و حذف کامل اسید به‌جای سانتریفیوژ از کیسه دیالیز 2کیلویی دالتونی (Sigma) استفاده شد و عمل دیالیز در آب دیونیزه به مدت 24 ساعت با 5-3 بار تعویض آب انجام گرفت. پس از خشک‌شدن SWNT توسط روتاری خلاء و برای فعال‌کردن گروه کربوکسیل متصل به آن، به SWNT 25 میلی‌لیتر مخلوط تیونیل کلراید (Merck) (SOCl2) و دی‌متیل‌فرم‌آمید (DMF) (Merck) به ترتیب به نسبت 24 به 1 اضافه شد و به مدت 24 ساعت در دمای 65°c و در شرایط رفلاکس انکوبه شد. پس از پایان واکنش (آسیله‌شدن) مقدار اضافه SOCl2 با روتاری خلاء حذف شد. نانولوله‌های کربنی آسیله‌شده با 40 میلی‌لیتر تتراهیدروفوران (Merck) (THF) و 3 گرم آرژنین (Sigma) به مدت 50 دقیقه به‌وسیله سونیکاتور پروب‌دار مخلوط و برای تکمیل واکنش به مدت 5 روز در دمای اتاق و در شرایط رفلاکس انکوبه شدند [16] (شکل 1). برای افزایش راندمان واکنش، تری پتاسیم فسفات (Merck) با غلظت نهایی 750 میلی مولار به محیط واکنش اضافه و به مدت 24 ساعت در دمای اتاق و درشرایط رفلاکس انکوبه شد [17]. پس از سانتریفیوژکردن (با دور rpm16000 به مدت 30 دقیقه)، رسوب نانولوله‌های عامل‌دارشده مجدداً درون آب دیونیزه پراکنده و برای حذف آرژنین اضافه (آرژنین واردنشده در واکنش) به مدت 24 ساعت در آب دیونیزه دیالیز شد. پس از دیالیز، سوسپانسیون نانولوله‌های کربن برای نگهداری طولانی‌مدت لیوفلیزه شد.



شکل1 شکلی شماتیک از پروسه عامل‌دار کردن نانولوله کربن با آرژنین. قرار گرفتن گروه کربوکسیل روی نانولوله، جایگزینی گروه کربوکسیل با گروه آسیل و نهایتاً برقراری پیوند آمیدی و اتصال آرژنین. اتصال آرژنین.

استخراج و آماده‌سازی پلاسمید

پلاسمید pHBT-sGFP(S65T) (حاوی ژن کدکننده پروتئین GFP) در میزبان *E. coli* از مرکز ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) تهیه شد. استخراج پلاسمید به کمک کیت استخراج پلاسمید (GeneAll Company) انجام و کیفیت پلاسمید استخراج‌شده روی ژل آگارز یک‌درصد بررسی شد.

اندازه‌گیری پتانسیل زتا

پتانسیل سطحی نانولوله‌های کربن در دو زمان یکی پس از تیمار اسیدی و دیگری پس از عامل‌دارشدن با آرژنین به‌وسیله دستگاه Zetasizer (Malvern Instrument, UK) اندازه‌گیری و مقایسه شد. به این منظور نانولوله‌های کربن برای پراکنده‌شدن در آب، به مدت دو ساعت درسونیکاتور حمام‌دار قرار داده شدند، سپس بار سطحی آنها با دستگاه زتا سایزر اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

آماده‌سازی و بررسی کمپلکس *Arg*-SWNT-pDNA

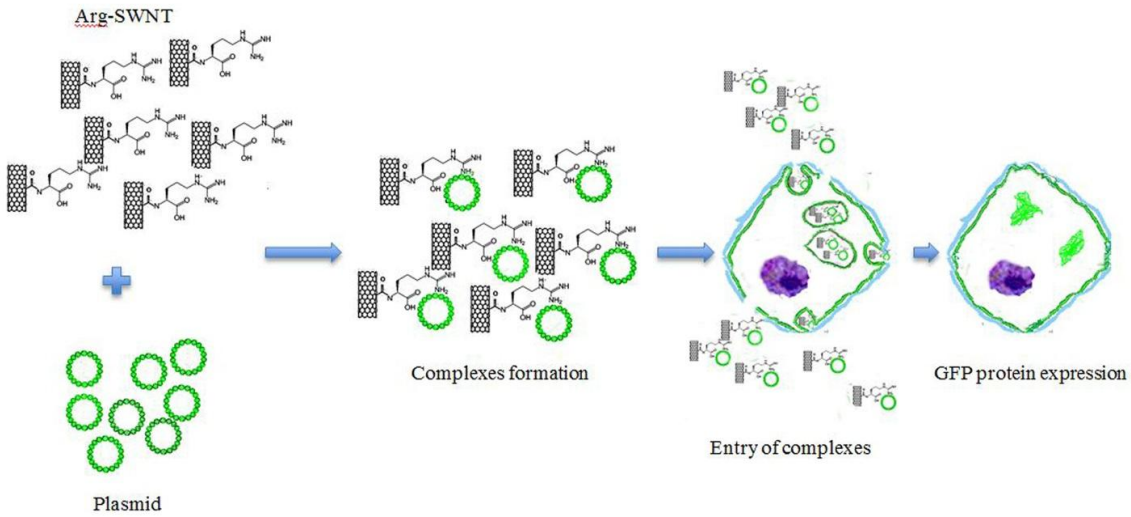
200 نانوگرم DNA پلاسمیدی، جداگانه با 200، 400، 800 و 1600 نانوگرم نانولوله‌های کربنی عامل‌دارشده مخلوط و به مدت 24 ساعت در دمای 4°c انکوبه شدند [18] تا کمپلکس‌های Arg-SWNT-pDNA تشکیل شوند. برای اطمینان از برهم‌کنش الکترواستاتیک بین آرژنین و پلاسمید و اتصال پلاسمید به نانولوله‌های کربن، حرکت کمپلکس‌های آماده‌شده روی ژل آگارز یک‌درصد بررسی شد.

بررسی مورفولوژیک نانولوله‌های عامل‌دارشده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

پس از ایجاد تغییرات در سطح نانولوله‌ها و اتصال آرژنین به آنها ابتدا جهت پراکندگی بیشتر ذرات مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در سونیکاتور حمام‌دار قرار گرفت و سپس چند قطره از آن روی گرید کربن منتقل شد. برای تبخیر حلال، نمونه به مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss- TEM) EM10C-80KV بررسی شد.

تشکیل کمپلکس و انتقال ژن

10 میکروگرم پلاسمید با 10، 20، 40 و 80 میکروگرم نانولوله کربن عامل‌دارشده مخلوط و برای تشکیل کمپلکس به مدت 24 ساعت در دمای 4°c انکوبه شد. سامانه آماده‌شده به سوسپانسیون سلولی که در فاز لگاریتمی رشد بود اضافه شد. سوسپانسیون سلولی تیمارشده به مدت 24 ساعت در دمای 25°c با سرعت 120rpm هم زده شد. موفقیت در انتقال ژن و حضور پروتئین GFP توسط میکروسکوپ فلورسنت (Cytation3 BioTek Instruments, Winooski, VT) Cell Imaging Multi-Mode Reader بررسی شد (شکل 2).



شکل2 خلاصه تصویری مراحل انتقال ژن به کمک سامانه Arg-SWNT-pDNA : تشکیل سامانه، ورود سامانه به سلول و بیان پروتئین

نتایج و بحث

بررسی عامل‌دارشدن نانولوله‌های کربن

همان‌طور که اشاره شد در فرایند عامل‌دارکردن نانولوله‌های کربن با آرژنین ابتدا نانولوله‌ها تیمار

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

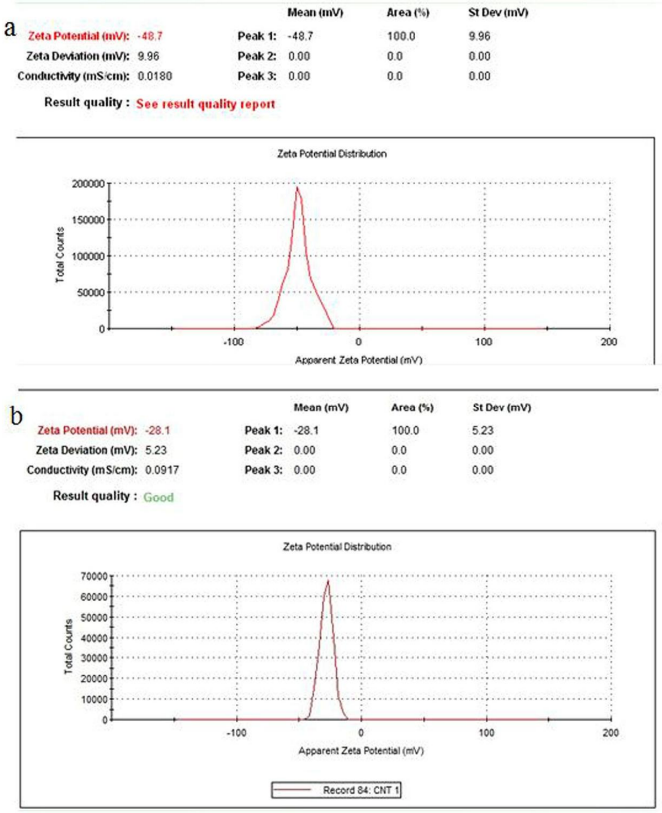
اسیدی می-شود و گروه‌های کربوکسیل روی نانولوله‌ها قرار می‌گیرد و پس از فعال‌شدن گروه‌های کربوکسیل، آرژنین به آنها متصل می‌شود. در شکل 3 افزایش مخلوط‌پذیری نانولوله‌های تک‌دیواره کربن در آب را پس از عامل‌دارشدن با آرژنین می‌توان مشاهده کرد.

شکل 3 افزایش میزان پراکندگی نانولوله‌های کربن در آب پس ازعامل‌دار کردن با آرژنین a: نانولوله کربنی در آب b: Arg-SWNT مخلوط در آب.

همان‌طور که در گزارش‌های پیشین بر تغییر پتانسیل زتا در راستای تغییرات سطحی نانولوله‌ها تأکید شده است [26، 27] انتظار می‌رود بار سطحی نانولوله‌ها پس از تیمار اسیدی به واسطه وجود گروه کربوکسیل به شدت منفی شود و با اتصال آرژنین که اسید آمینه‌ای بار مثبت است از شدت بار منفی سطحی نانولوله کاسته شود. نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری پتانسیل زتا نشان می‌دهد پس از اضافه-کردن آرژنین به محیط واکنش، بار منفی نانولوله‌های کربنی دارای گروه کربوکسیل از 48/7- به 28/1- کاهش یافته است که این امر نشان‌دهنده اتصال آرژنین به گروه‌های کربوکسیل و تعدیل بار سطحی نانولوله‌هاست (شکل 4).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

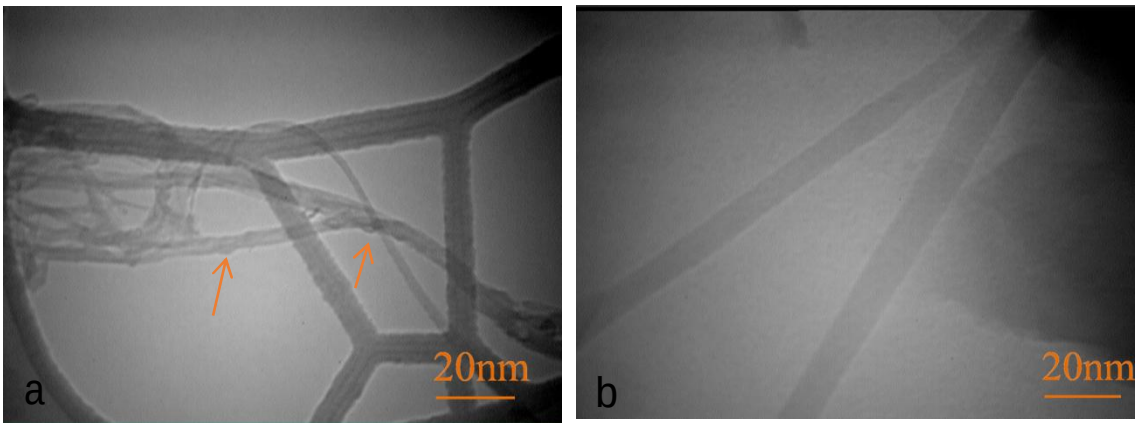
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]



شکل 4 پتانسیل زتا. a: SWNT-COOH, b: Arg-SWNT. کاهش بار منفی نشانه اتصال آرژنین است.

تأیید عامل‌دارشدن نانولوله‌های کربن به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری

مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نانولوله‌های کربنی خام (کنترل) و تیمارشده به‌وضوح نشان‌دهنده عامل‌دارشدن نانولوله‌های کربن به صورت برجستگی‌هایی در سطح نانولوله‌هاست (شکل 5). تغییرات سطحی مشاهده‌شده با گزارش‌های پیشین درباره اتصال آرژنین به نانولوله‌های کربن مطابقت دارد [28] .



شکل 5 تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): a: نانولوله‌های کربن عامل‌دار شده b: نانولوله‌های کربن خام. برآمدگی‌هایی که با فلش قرمز مشخص شده‌اند محل اتصال آرژنین به نانولوله می‌باشند.

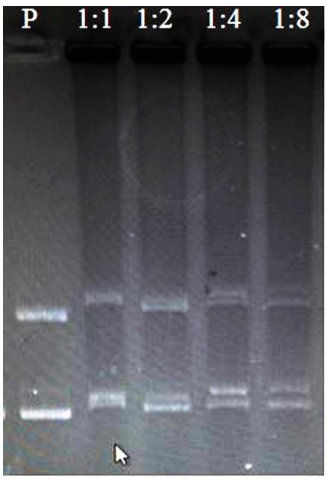
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

بررسی توانایی نانولوله‌های عامل‌دارشده در پذیرش DNA پلاسمیدی

برای بررسی توانایی نانولوله‌های کربنی عامل‌دارشده در اتصال به پلاسمید، از تکنیک ژل تأخیری استفاده شد. بر اساس اصول الکتروفورز، حرکت مولکول‌ها در منافذ ژل آگارز، تابع شکل، اندازه و وزن است و با تغییر این ویژگی‌های فیزیکی میزان حرکت روی ژل تغییر می‌یابد به‌طوری‌که با اتصال مولکول‌ها به یکدیگر و افزایش سایز و وزن مولکولی میزان حرکت روی ژل آگارز کاهش می‌یابد.

شکل 6 حرکت پلاسمید و سامانه‌های Arg-SWNT-pDNA روی ژل آگارز یک‌درصد را نشان می‌دهد. کاهش حرکت پلاسمید موجود در سامانه‌های Arg-SWNT-pDNA روی ژل آگارز در مقایسه با پلاسمید آزاد (کنترل) نشانه بزرگ‌شدن اندازه، تغییر شکل و افزایش وزن به دلیل اتصال نانولوله‌های کربن به پلاسمید است. پیش از این نیز تأخیر در حرکت DNA متصل به نانولوله‌های تک‌دیواره و چند دیواره روی ژل آگارز گزارش شده بود [29].



شکل 6 کاهش حرکت پلاسمید بر روی ژل آگارز به دلیل اتصال به نانولوله‌های کربن. چاهک‌ها از چپ به راست، پلاسمید، سامانه‌های Arg-SWNT-pDNA با مقادیر وزنی مساوی، 2برابر، 4 برابر و 8 برابر نانولوله به نسبت پلاسمید

از سوی دیگر در مقایسه با میزان درخشندگی باند مربوط به پلاسمید آزاد، کاهش درخشندگی باندهای پلاسمید موجود در سامانه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده حرکت‌نکردن از پلاسمید در روی ژل و باقی‌ماندن درون چاهک باشد. احتمالاً این بخش از پلاسمید با تعداد بیشتری Arg-SWNT اتصال یافته و به علت بزرگ و سنگین‌شدن امکان خروج از چاهک را نیافته است.

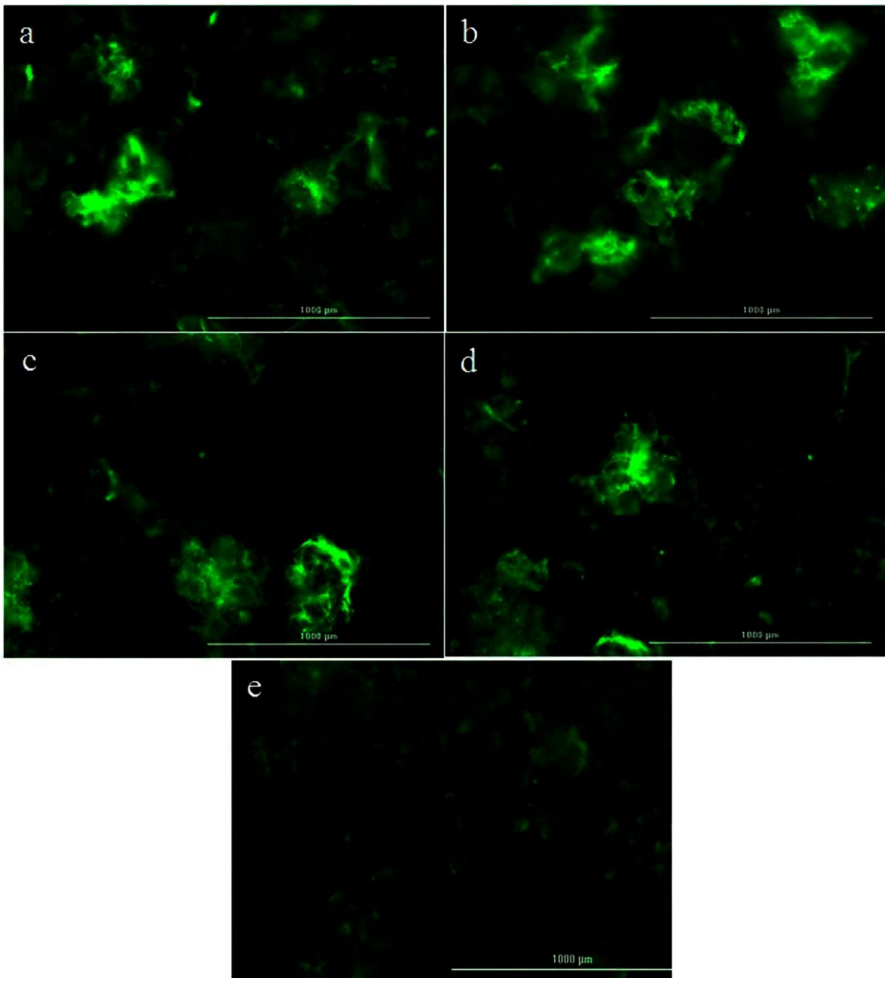
مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت در تأیید انتقال موفق ژن به سلول‌های توتون

با توجه به نتایج ژل آگارز و اتصال موفقیت‌آمیز پلاسمید به مقادیر مختلف Arg-SWNT (شکل 4)، سوسپانسیون سلولی توتون با سامانه‌هایی که از مخلوط‌کردن 10 میکروگرم پلاسمید با Arg-SWNT (10، 20، 40 و 80 میکروگرم) تهیه شده بودند، تیمار شد. در صورت موفقیت سامانه انتقال ژن در عبور از موانع سلولی و ورود به سیتوپلاسم و نهایتاً هسته، ژن کدکننده پروتئین نشردهنده نور سبز بیان می‌شود و می‌توان وجود پروتئین مربوط (GFP) را در سیتوپلاسم شناسایی کرد. تصاویر میکروسکوپی مربوط به سلول‌های تیمارشده با سامانه‌ها و نمونه کنترل (سلول‌های تیمارشده با Arg-SWNT) در شکل 7 نشان داده شده است. وجود درخشندگی در سیتوپلاسم سلول‌های تیمارشده با کمپلکس‌های Arg-SWNT-pDNA بیانگر حضور پروتئین GFP و موفقیت تمام کمپلکس‌ها در انتقال ژن به سلول‌های توتون است. اگروباکتریوم که باکتری گرم منفی و پاتوژن

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

گیاهان دولپه است با ترشحات قندی و فنلی همچون استوسیرینگون که از محل زخم‌ها در گیاهان دولپه ترشح می‌شود تحریک می‌شود و به گیاه میزبان حمله می‌کند. نبود این ترکیبات در گیاهان تک‌لپه سبب می‌شود که این گیاهان به طور طبیعی میزبان اگروباکتریوم نیستند و هدف حمله این باکتری قرار نمی‌گیرند. انتقال ژن به کمک اگروباکتریوم اگرچه در گیاهان دولپه موفقیت‌آمیز هستند اما در گیاهان تک‌لپه (به دلیل میزبان نبودن) کارایی چندانی نداشته است [19]. گیاهان تک‌لپه (ازجمله غلات) چون از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت هستند بهبود کیفیت و کمیت آنها به‌واسطه اصلاح ژنتیکی مورد توجه خاصی قرار دارد و احساس می‌شود به تکنیک‌های کاراتر نیاز هست. برخی از نانومواد به علت سایز کوچک خود و احتمال ورودشان به سلول، ناقلان مناسبی به‌نظر می‌رسند. نانولوله‌های کربن تک‌دیواره به علت شکل استوانه‌ای و قطری حدود 3-2 نانومتر توانایی عبور از منافذ دیواره که معمولاً حدود 5 نانومتر هستند [20] را داشته و تحقیقات متعددی ورود آنها به داخل سلول گیاه را تأیید کرده است [21، 22] مشکل اصلی استفاده از نانولوله‌های کربن آب‌گریزی و سمی‌بودن آنهاست که بر اساس گزارش‌های متعدد با تغییر در سطح نانولوله‌ها و عامل‌دارکردن آنها، مخلوط‌پذیری با آب، افزایش و در مقابل سمی‌بودن کاهش می‌یابد [23].



شکل 7 تصاویر میکروسکوپ فلورسنت. d, c, b, a: سلول‌های تیمار شده با کمپلکس‌های Arg-SWNT-pDNA (مقدار نانولوله به ترتیب 1، 2، 4 و 8 برابر مقدار پلاسمید). e: سلول‌های تیمار شده با Arg-SWNT. نقاط درخشان درون سلول‌ها بیان‌گر حضور پروتئین GFP و انتقال موفقیت‌آمیز ژن است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

در این پروژه با قراردادن آرژنین روی نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره علاوه بر زیست‌سازگارکردن آنها [24] امکان اتصال پلاسمید به نانولوله‌ها فراهم شد که از این کمپلکس برای انتقال ژن به سلول‌های توتون استفاده شد. آرژنین با داشتن دو pKa 9 و 12 در pH فیزیولوژیک دارای بار مثبت است، به همین دلیل امکان اتصال الکترواستاتیک با پلاسمید بار منفی را دارد. بنابراین، قرارگرفتن آرژنین روی SWNT به صورت واسطه‌ای برای اتصال پلاسمید عمل می‌کند. از سوی دیگر، بر اساس گزارش چن و همکاران در سال 2007 که توالی پلی‌آرژنین را همانند یک سیگنال هسته‌یابی (SV40) در رسیدن به هسته موفق می‌داند [25] پیش‌بینی می‌شود عامل‌دارکردن نانولوله‌ها با آرژنین در هدایت سامانه Arg-SWNT-pDNA به سمت هسته مؤثر واقع شود.

گرچه سال‌ها از اولین انتقال ژن توسط نانولوله‌های کربنی به سلول‌های پستانداران می‌گذرد، این اولین تجربه گزارش‌شده از انتقال موفق ژن با کمک نانولوله‌های کربن به سلول گیاهی است، البته همان‌طور که پیش از این هم اشاره شد گزارشی مبنی بر انتقال قطعه کوچکی از DNA تک‌رشته‌ای به سوسپانسیون سلولی توتون وجود دارد. با توجه به موفقیت نانولوله‌های پیشنهادی در انتقال ژن، به‌نظر می‌رسد بهینه‌سازی در عامل‌دارکردن نانولوله‌ها امکان اتصال پلاسمید بیشتر و درنتیجه افزایش کارایی انتقال را به دنبال خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

استفاده از نانولوله‌های کربن برای انتقال ژن روشی سریع، آسان و کم هزینه است و برعکس بسیاری از تکنیک‌های پیشنهادی نه‌تنها در گیاه سبب سمی‌بودن نمی‌شود بلکه بر اساس گزارش‌های پیشین رشد سلولی را نیز تحریک می‌کند. نبود محدودیت در نوع گیاه (تک‌لپه و دولپه) از مزایای این روش نسبت به اگروباکتریوم است ضمن اینکه مشکلات تهیه باکتری نوترکیب را نداشته و در پروسه زمانی بسیار کوتاه‌تر اجراشدنی‌ست. این تکنیک در مقایسه با روش بایولیستیک (دومین تکنیک انتقال ژن)، بسیار کم‌هزینه و مقرون به صرفه است. با توجه به این مزایا انتظار می‌رود در صورت بهبود کارایی انتقال، در آینده‌ای نزدیک نانولوله‌های کربن به‌عنوان یکی از ناقلان پرکاربرد انتقال ژن در گیاهان مطرح شوند. با موفقیت نانولوله‌های کربن در انتقال ژن به سلول‌های گیاه، امکان انتقال هدفمند ژن و ماکرومولکول‌های دیگر با کمی تغییر در سطح نانولوله‌ها امیدبخش به نظر می‌رسد.

قدردانی و تشکر

سوسپانسیون سلولی توتون در آزمایشگاه بیوشیمی و فیزیولوژی سلولی خانم دکتر قناتی (گروه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس) تهیه شد که بدینوسیله از ایشان تشکر می‌شود.

منابع

1. Ahmed, M., Jiang, X., Deng, Z., and Narain, R. (2009) Cationic Glyco-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as Efficient Gene Delivery Vehicles. Bioconjug. Chem. 20, 2017-2022.

2. Bianco, A., Kostarelos, K., and Prato, M. (2005) Applications of carbon nanotubes in drug delivery. Curr. Opin. Chem. Bio. 9, 674- 679.

3. Wang, M., Ya, S., Wang, C., and Kong, J. (2010) Tracking the endocytic pathway of recombinant protein toxin delivered by multiwalled carbon nanotubes. ACS Nano. 4, 6483- 6490.

4. Esfandiary, E., Valiani, A., Hashemibeni, B., Moradi, I., and Narimani, M. (2014) The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells in-vitro. Adv. Biomed. Res. 3, 40.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

5. Lin, D., and Xing, B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut. 150, 243- 250.

6. Patlolla, A., Knighten, B., and Tchounwou, P. (2010) Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. National Institutes of Health. 20, 65- 72.

7. Vardharajula, S., Ali, SK., Tiwari, P. M., Eroglu, E., Vig, K., Dennis, V. A., and Singh, S. R. (2012) Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. Int. J. Nanomedicine. 7, 5361- 5374.

8. Pantarotto, D., Singh, R., McCarthy, D., Erhardt, M., Briand, J. P., Prato, M., Kostarelos, K., and Bianco, A. (2004). Functionalized Carbon Nanotubes for Plasmid DNA Gene Delivery. Angew. Chem. Int. Ed. 43, 5242– 5246.

9. Foillard, S., Zuber, G., and Doris, E. (2011) Polyethylenimine–carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. Nanoscale. 3, 1461–1464.

10. Liu, Y., Wu, D. C., Zhang, W. D., Jiang, X., He, C. B., Shung, C. T., Hong, G. S., and Leong, K. W. (2005) Polyethylenimine-Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes for Secure Noncovalent Immobilization and Efficient Delivery of DNA. Angew. Chem. Int. Ed. 44, 4782 – 4785.

11. Singh, R., Pantarotto, D., McCarthy, D., Chaloin, O., Hoebeke, J., Partidos, C. D., Briand, J. P., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. (2005) Binding and Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward the Construction of Nanotube-Based Gene Delivery Vectors. J. Am. Chem. Soc. 127, 4388-4396.

12. Khodakovskaya, M., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., and Villagarcia, H. (2012) Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. ACS Nano. 6, 2128–2135.

13. Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., and Biris, A. S. (2009) Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. ACS Nano. 3, 3221-3227.

14. Zhai, G., Gutowski, S. M., Walters, K. S., Yan, B., and Schnoor, J. L. (2015) Charge, Size, and Cellular Selectivity for Multiwall Carbon Nanotubes by Maize and Soybean. Environ. Sci. Technol. 49, 7380-7390.

15. Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., and Fang, X. (2009) Carbon Nanotubes as Molecular Transporters for Walled Plant Cells. Nano Lett. 9, 1007-1010.

16. Pompeo, F., and Resasco, D. E. (2002) Water solubilization of single-walled carbon nanotubes by functionalization glucosamine. Nano Letter. 2, 369-373.

17. Zhang, L., Wang, X. J., Wang, J., Grinberg, N., Krishnamurthy, D., and Senanayake, C. H. (2009) An improved method of amide synthesis using acyl chlorides. Tetrahedron Lett. 50, 2964-2966.

18. Mirzapoora, A., and Ranjbar, B. (2017) Biophysical and electrochemical properties of Self-assembled noncovalent SWNT/DNA hybrid and electroactive nanostructure. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures. 93, 208-215.

19. Usami, S., Morikawa, S., Takebe, I., and Machida, Y. (1987) Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and vir gene expression in Agrobacterium. Mol. Gen. Genet. 209, 221- 226.

20. Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D., and Delmer, D. P. (1979) Determination of the pore size of the cell walls of living plant cells. Science. 205, 1144-1147.

21. Serag, M., Kaji, N., Gaillard, C., Okamoto, Y., Terasaka, K., Jabasini, M., Tokeshi, M., Mizukami, H., Bianco, A., and Baba, Y. (2011) Trafficking and Subcellular Localizatio of Multiwalled Carbon Nanotubes in Plant Cells. ACS Nano. 5, 493-499.

22. Serag, M., Kaji, N., Tokeshi, M., and Baba, Y. (2012) Introducing carbon nanotubes into living walled plant cells through cellulase-induced nanoholes. The Royal Society of Chemistry. 2, 398-400.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

23. Madani, S. Y., Mandel, A., and Seifalian, A. M. (2013) A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano Rev. 4, 21521.

24. Charbgoo, F., Behmanesh, M., and Nikkhah, M. (2015) Enhanced reduction of single-wall carbon nanotube cytotoxicity in vitro: Applying a novel method of arginine functionalization. Biotechnol. Appl. Biochem. 62, 598-605.

25. Chen, C. P., Chou, J. C., Liu, B. R., Chang, M., and Lee, H. (2007) Transfection and expression of plasmid DNA in plant cells by an arginine-rich intracellular delivery peptide without protoplast preparation. FEBS Lett. 581, 1891-1897.

26. Montanheiro, T. L., and Cristovan, F. H. (2014) Effect of MWCNT functionalization on thermal and electrical properties of PHBV/MWCNT nanocomposites. J. Mater. Res. 30, 55-65.

27. Sarpong, L. K., Bredol, M., and Schonhoff, M. (2017) Heteroaggregation of multiwalled carbon nanotubes and zinc sulfide nanoparticles. Carbon.

28. Charbgoo, F., Behmanesh, M., Nikkhah, M., and Kane, E. G. (2017) RNAi mediated gene silencing of ITPA using a targeted nanocarrier: apoptosis induction in SKBR3 cancer cells. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 44, 888-894.

29. Richard, C., Mignet, N., Largeau, C., Escriou, V., Bessodes, M., and Scheman, D. (2009) Functionalization of single- and multi-walled carbon nanotubes with cationic amphiphiles for plasmid DNA complexation and transfection. Nano Res. 2, 638-647.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Gene delivery to tobacco cells using single walled carbon nanotubes: a new generation of gene transfer vehicles

Arezoo Golestanipour[1], Ali Aalami[2]*, Maryam Nikkhah[3], Saman Hosseinkhani[4]

1-Ph.D. graduated, Department of Plant Biotechnology, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran
2-Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3-Associate Professor, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4-Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 2017/11/16 Accepted: 2018/3/16

*Corresponding author: ali_aalami@guilan.ac.ir, Tel. No.: +98 (13) 6690282. Postal code:4199613776
ORCID: 0000-0002-6791-833X

Abstract:

Developing a technique for efficient and safe gene delivery to plant cells is a fundamental aim of plant biotechnology. Agrobacterium mediated transformation as the most common and practical method in plant gene delivery has considerable difficulties such as limitation in applicable for some plant species. In recent years several new methods have been suggested, although none of them could be a good replacement. The use of nanotechnology has been provided new solutions to overcome some limitations in biotechnology. Development of biocompatible nanostructures for passing cell barriers and targeted delivery of cargo has improved the biological achievements. In this research the capability of arginine functionalized single-walled carbon nanotube (Arg-SWNT) to transfer plasmid DNA, which codes green fluorescent protein (GFP) to tobacco suspension cells, has been investigated. The results showed that single-walled carbon nanotubes in complex with the plasmid could pass through cell wall pores and plasma membrane. The fluorescence microscopy images illustrated the success of gene delivery by Arg-SWNT to tobacco cells.

Keywords: Arginine, Green fluorescent protein, Single-walled carbon nanotube

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.9.4]