

Transient Expression of Recombinant PARS II Endonuclease Enzyme Using Agroinfiltration in Tobacco

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Farsi M.^{*1} PhD,
Mirzaei M.¹ MSc,
Zolala J.² PhD

How to cite this article

Farsi M, Mirzaei M, Zolala J, Hamidoghli Y. Transient Expression of Recombinant PARS II Endonuclease Enzyme Using Agroinfiltration in Tobacco. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):627-633.

¹Crop Biotechnology & Breeding Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Agricultural Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

*Correspondence

Address: Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 9177948974
Phone: +98 (51) 38805777
Fax: +98 (51) 38807140
farsi@um.ac.ir

Article History

Received: December 13, 2016

Accepted: June 13, 2017

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims The production of recombinant proteins in transgenic plants (molecular farming) is considered a functional aspect of genetic engineering. Unlike animal and bacterial cell-based production systems, proteins produced by plants are very safe and have low production costs due to the absence of common pathogens in humans and animals. The aim of this study was the transient expression of recombinant PARS II endonuclease enzyme using agroinfiltration in tobacco.

Materials & Methods In this experimental study, the possibility of producing a recombinant form of PARS II endonuclease was investigated, using transient expression system via *Agrobacterium*. The pBI-Pars expression construct (based on the binary vector pBI121) containing the full sequence of the PARS II encoder, upstream kozak, and a downstream 8x-His tag sequence, was infiltrated into *Nicotiana tabacum* leaves with Agroinfiltration method. After 72 hours, the expression of PARS II gene in agroinfiltrated leaf samples was confirmed through Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and protein Dot-blot, using Anti-His antibody at the levels of mRNA and protein, respectively.

Findings The accuracy of the constructed expression construct was confirmed, and the results of Dot-blot by Anti-His antibody confirmed the expression of the recombinant PARS II protein, while no recombinant protein expression was observed in agroinfiltrated control plants with pBI121 construct. Significant amounts of recombinant PARS II nucleases were produced in tobacco leaves.

Conclusion Agroinfiltration is an effective and short-term method for mass production of pure recombinant PARS II nucleases in tobacco.

Keywords Single-Strand-Specific Nucleases; PARS II Endonuclease; Agroinfiltration; Tobacco

CITATION LINKS

[1] Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard ... [2] Enzymatic mutation detection ... [3] Screening human genes for small alterations ... [4] Development of a rapid, reliable genetic ... [5] Discovery of single-nucleotide mutations in ... [6] EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus ... [7] Plant comparative genetics ... [8] Detection of simple mutations and ... [9] Efficient discovery of DNA polymorphisms ... [10] TILLING: Practical single-nucleotide mutation ... [11] Differential integrity of TALE nuclease genes following ... [12] Efficient clinical scale gene modification ... [13] Single-strand-specific ... [14] Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm ... [15] Mutation detection using a novel ... [16] Characterization of *Arabidopsis thaliana* ... [17] Comparison of CEL I gene expression ... [18] Isolation, cloning and molecular characterization of genes ... [19] Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana* ... [20] An *Agrobacterium*-mediated transient gene ... [21] pEAQ: Versatile expression vectors for easy ... [22] Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated ... [23] Purification, cloning, and characterization ... [24] Appendix 1, Reagents and buffers. Molecular cloning: A laboratory ... [25] Identification and molecular mapping of a dwarfing gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its correlation with ... [26] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye ... [27] Mutated nucleic acid of a CEL I-endonuclease and method for producing the ... [28] Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation ... [29] Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases ...

بیان موقت فرم نو ترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با روش آگرواینفیلتراسیون در گیاه توتون

محمد فارسی * PhD

گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مهدیه میرزایی MSc

گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

جعفر ذوالعلی PhD

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اهداف: تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان تراریخته (زراعت مولکولی)، یکی از جنبه‌های کاربردی مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود. پروتئین‌های تولید شده توسط گیاهان بر خلاف سیستم‌های تولید مبتنی بر سلول‌های جانوری و باکتریایی به علت عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند و هزینه تولید پایینی دارند. هدف این پژوهش، بیان موقت فرم نو ترکیب آنزیم اندونوکلئاز PARS II با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون در گیاه توتون بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، امکان تولید فرم نو ترکیب اندونوکلئاز PARS II با استفاده از سیستم بیان موقت به واسطه آگروباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت. سازه بیانی pBI-Pars (مبتنی بر ناقل دوگانه pBI121 حاوی توالی کامل رمزکننده PARS II، توالی کوتاه کوزاک در بالادست و توالی رمزکننده هشت آمینواسید هیستیدین در پایین دست ژن، ساخته و با روش آگرواینفیلتراسیون به برگ‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) تزریق شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، بیان ژن مورد نظر در نمونه‌های آگرواینفیلتره شده با واکنش RT-PCR و بلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضد هیستیدین به ترتیب در سطح mRNA و پروتئین انجام شد.

یافته‌ها: صحت سازه بیانی ساخته شده تایید شد و نتایج بلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضد هیستیدین، بیان پروتئین نو ترکیب PARS II را مورد تایید قرار داد. در حالی که هیچ نشانی از بیان پروتئین نو ترکیب در گیاهان شاهد آگرواینفیلتره شده با سازه pBI121 مشاهده نشد. مقادیر قابل توجهی از نوکلئاز نو ترکیب PARS II در برگ‌های توتون تولید شد.

نتیجه‌گیری: روش آگرواینفیلتراسیون یک روش موثر و کوتاه مدت برای تولید انبوه نوکلئاز خالص نو ترکیب PARS II در گیاه توتون است.

کلیدواژه‌ها: نوکلئازهای اختصاصی تک رشته، اندونوکلئاز PARS II، آگرواینفیلتراسیون، توتون

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۳

* نویسنده مسئول: farsii@um.ac.ir

مقدمه

شناسایی تغییرات ناشناخته DNA اعم از چند شکلی‌ها و جهش‌ها، در بسیاری از عرصه‌های تحقیقات ژنتیک از جنبه‌های مختلف حایز اهمیت است. تکنیک‌های غربالگری متعددی همچون تعیین توالی قطعات DNA، آزمون Taq-man، استفاده از شعاع نور مولکولی (molecular beacons) در Real time-PCR، آزمون اتصال الیگونوکلئوتید، چپ‌های DNA و ریزآرایه‌ها برای آشکارسازی جهش‌های ژنتیکی محدود ابداع شده است، ولی هیچ یک از این روش‌ها نتوانسته‌اند هم از بُعد سادگی و هم از نقطه نظر حساسیت، انتظارات غربالگر را برآورده سازند^[1]. با این حال، تکنیک هضم آنزیمی به واسطه جفت‌شدگی ناجوریاها (EMC) توانسته است تمام معیارهای یک روش غربالگری ایده‌آل را به صورت بالقوه برآورده سازد. این روش بسیار انعطاف‌پذیر و با قابلیت استفاده

گسترده بوده و مبتنی بر فعالیت گروهی از نوکلئازهای خانواده S1/P1 تحت عنوان نوکلئازهای اختصاصی تک رشته (SSS) است. این آنزیم‌ها قادر به برش مولکول‌های DNA جهش‌یافته در محل لوپ هترو دوپلکس هستند و با عملکرد بسیار مطلوب در شرایط آزمایشگاه، محققان را قادر می‌سازند که ضمن کشف یک جهش یک یا چند نوکلئوتیدی به مکان آن نیز در قطعه DNA مورد نظر پی ببرند^[2].

در حال حاضر، محققان از این تکنیک برای تشخیص جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی و درج و حذف‌های کوچک در جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک پزشکی شامل پیداکردن آلل‌های جهش‌یافته مرتبط با بیماری‌های لاعلاج نظیر سرطان^[3]، تفسیر وقایع مولکولی عامل ناهنجاری‌های ژنتیکی^[4]، شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کیفی^[5, 6]، اصلاح مبتنی بر نشانگرهای مولکولی^[7]، تعیین تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیک^[8]، پروژه‌های هدف‌قراردادن آسیب‌های موضعی القاشده در ژنوم‌ها (TILLING)، اکوتیلینگ^[9, 10] و ردیابی جهش‌های القاشده توسط نوکلئازهای مهندسی‌شده‌ای همچون زینک‌فینگر نوکلئازها (ZFNs)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs) و تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (CRISPR/Cas)^[11, 12] استفاده می‌نمایند.

نوکلئازهای اختصاصی تک رشته از منابع متعددی شامل میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران جداسازی شده‌اند. خصوصیات برخی از این آنزیم‌ها از قبیل نوکلئاز S1 *آسپیریلوس اوریزا* (*Aspergillus oryzae*)، نوکلئاز P1 *پنیسیلیوم سیتترینوم* (*Penicillium citrinum*)، نوکلئاز BAL31 *تروموناس اسپریانا* (*Alteromonas espejiana*)، نوکلئاز مانگ‌بین و نوکلئاز میکروکوکسال *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) به‌خوبی مورد بررسی قرار گرفته است و اکنون به‌صورت تجاری در دسترس هستند^[13]. البته فعالیت این نوکلئازها در شناسایی لوپ‌های کوچک روی ژل آکریل‌آمید قابل ردیابی نیست^[14]. در تکنیک EMC، اندونوکلئازهای گیاهی اختصاصی تک رشته از قبیل نوکلئازهای CEL و ENDO تاکنون بیش از بقیه مورد توجه و استفاده قرار گرفته‌اند. نوکلئازهای CEL I و CEL II (نام تجاری Surveyor®؛ IDT؛ ایالات متحده) و ENDO I روی DNA و RNA تک رشته‌ای فعال هستند. این نوکلئازها تشکیل دایمر نمی‌دهند و تنها یک رشته DNA در انتهای سه لوپ هترو دوپلکس را برش می‌دهند^[15, 16].

شناسایی فعالیت‌های آنزیمی جدید در عصاره‌های مختلف گیاهی و توصیف آنزیم‌های متناظر، دانش موجود در مورد ساختار و مکانیزم عمل این گروه آنزیمی را افزایش داده است و ابزارهای جدید با ویژگی‌های عملکردی جدید را به خزانه آنزیمی مورد استفاده در تحقیقات غربال جهش اضافه می‌نماید. در این راستا، ذوالعلی و همکاران فعالیت اندونوکلئازی قوی‌تر عصاره آنزیمی گیاه جعفری را در مقایسه با گیاه کرفس (منبع دو آنزیم CEL I و CEL II) در برش DNA هترو دوپلکس گزارش نموده‌اند^[17]. پس از آن، میرزایی و همکاران، توالی‌های ژنی مربوط به دو اندونوکلئاز PARS I و PARS II را از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*) جداسازی نموده‌اند. میان کلیه نوکلئازهای اختصاصی تک رشته، نوکلئاز PARS II با داشتن ۹۵% همولوژی، بیشترین شباهت ترادف را نسبت به نوکلئاز CEL II نشان داده است. مطالعه خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و ساختار مولکولی نشان داده است که

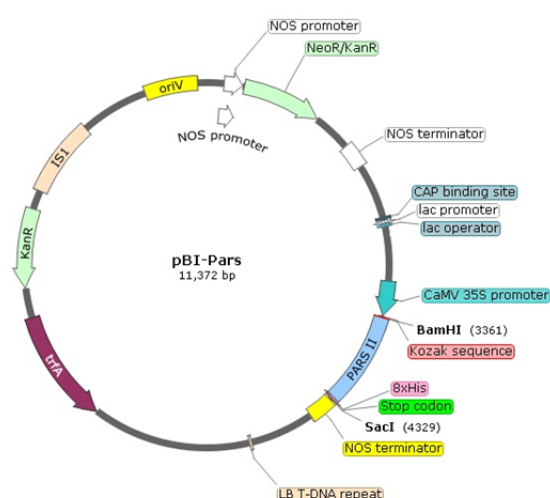
بیان موقت فرم نو ترکیب آنزیم اندونوکلاز PARS II با روش آگرواینفیلتراسیون در گیاه توتون ۶۲۹

35s (pBI-F) و ترمیناتور نوپالین سنتاز (pBI-R؛ جدول ۱) مورد تایید قرار گرفت. نهایتاً با تایید صحت سازه بیانی ساخته شده از طریق توالی یابی، پلاسمید نو ترکیب pBI-Pars با استفاده از روش انجماد- ذوب به سلول های آگروباکتریوم در سویه GV3101 انتقال داده شد.

جدول ۱) توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	طول قطعه مورد نظر (جفت باز)	توالی ۵' به ۳'
PII-F	۹۶۸	TAT CGT GGA TCC GGG AAT GGG TAT GTT GAC TTA TAC
PII-R-full	۹۶۸	GGT GGT GAG CTC TTA ATG GTG ATG GTG GTG ATG GTG ATG CAC TAT TTC AAT ATT GTT AC
pBI-F	۱۱۶۵	GAT GTG ATA TCT CCA CTG AC
pBI-R	۱۱۶۵	TGA TAA TCA TCG CAA GAC CG

جایگاه آنزیم های برشی با خط مشخص شده است



شکل ۱) تصویر شماتیک از سازه بیانی ساخته شده با استفاده از نرم افزار SnapGene. Nos promoter: پروموتور ژن نوپالین سنتاز، Nos terminator: ترمیناتور ژن نوپالین سنتاز، CaMV 35S: پروموتور ویروس موزایک گل کلم، Kozak sequence: توالی افزایش دهنده بیان (GCAACA)، 8xHis: برچسب هیستیدین و Stop codon: کدون خاتمه TAA است

تهیه مایه تلقیح و انجام آگرواینفیلتراسیون: کلونی آگروباکتریوم واجد ناقل نو ترکیب در محیط کشت لیزوژنی برات (LB) مایع (۱۰ گرم در لیتر تربیتون، ۱۰ گرم در لیتر سدیم کلرید و ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر) [25] حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر ریفامپیسین، کشت و در شیکر انکوباتور با شرایط ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ °C به مدت ۲۲ ساعت نگهداری شد. سلول های باکتری با سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه رسوب داده شدند و بلافاصله در محلول اینفیلتراسیون شامل ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱۰ میلی مولار مورفولینواتان سولفونیک اسید (MES) با pH برابر با ۵/۶ و ۱۵۰ میکرومولار استوسرینگون تا رسیدن به ۰/۵ در دانسیته نوری ۶۰۰ رقیق شدند. سلول های آگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی ناقل pBI121 نیز به صورت جداگانه برای تزریق به گیاهان شاهد به روش ذکر شده آماده شدند. سوسپانسیون های باکتریایی حاصل پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، با استفاده از سرنگ یک میلی لیتری فاقد سوزن به پشت برگ های توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) در سن ۶ هفتگی تزریق شدند (شکل ۲).

این نوکلئاز می تواند به عنوان رقیبی ارزشمند برای اندونوکلاز CEL II مطرح باشد [18].

تولید پروتئین های نو ترکیب در گیاهان تراریخته (زراعت مولکولی)، یکی از جنبه های کاربردی مهندسی ژنتیک محسوب می شود. پروتئین های تولید شده توسط گیاهان بر خلاف سیستم های تولید مبتنی بر سلول های جانوری و باکتریایی، به علت عدم وجود عوامل بیماری زای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند و هزینه تولید پایینی دارند [19]. استفاده از آگروباکتریوم *تومفاسینس (Agrobacterium tumefaciens)* برای بیان اپی کروموزومی پروتئین های هترولوگ از طریق تزریق سوسپانسیون باکتریایی در بافت های برگ تازه، اصطلاحاً آگرواینفیلتراسیون نامیده می شود. این روش، نوعی سیستم بیان موقت است که می توان با استفاده از آن، پروتئین خارجی را در مدت کوتاه چند روز پس از ورود آگروباکتریوم به بافت گیاهی تولید نمود [20, 21]. در این روش نیازی به بازایی گیاهان تراریخته از کالوس نیست و از آنجایی که ژن مورد نظر در ژنوم درج نخواهد شد، بیان تحت تاثیر اثر مکانی قرار نخواهد گرفت. همچنین این روش، برای ایجاد امکان بیان ژن در گونه هایی کاربرد دارد که دستورالعمل بازایی گیاه یا ترانسفورماسیون پایدار در آنها استقرار پیدا نکرده یا مواردی که هدف، بیان یک پروتئین سمی است [20, 22].

تعیین مکانیزم فعالیت و ترجیح سوبسترای نوکلئاز PARS II مستلزم بررسی فعالیت نمونه خالص طبیعی یا نو ترکیب آن روی سوبسترای DNA هترو دوپلکس است. با توجه به بازده پایین روش های خالص سازی موجود [15, 23]، این پژوهش به منظور زمینه سازی برای تولید فرم نو ترکیب این نوکلئاز انجام گرفت. بنابر مطالب ذکر شده، هدف پژوهش حاضر بیان موقت فرم نو ترکیب آنزیم اندونوکلاز PARS II با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون در گیاه توتون بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش تجربی، به منظور ساخت سازه بیانی pBI-Pars مبتنی بر پلاسمید ناقل دوگانه pBI121، توالی کامل رمز کننده نوکلئاز PARS II (شماره دستیابی JN974459 در بانک ژن) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PII-F و PII-R-full (جدول ۱)، آنزیم پلیمرز Pfu (Bioron؛ آلمان) و پلاسمید نو ترکیب pTZ-ParsII به عنوان الگو [18] تکثیر شد. آغازگر رفت به نحوی طراحی شد که دارای جایگاه برشی *Bam*HI و توالی *کوزاک* [24] درست قبل از کدون شروع باشد. همچنین به ترتیب، توالی رمز کننده ۸ آمینو اسید هیستیدین برای تسهیل خالص سازی آنزیم نو ترکیب از طریق کروماتوگرافی تمایلی، کدون خاتمه و جایگاه برشی *Sac*I در آغازگر برگشت تعبیه شد و شماتیک بیان ساخته شده با استفاده از نرم افزار SnapGene 3.3.2 رسم شد (شکل ۱). طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Primer Premier 3.5 انجام شد. با توجه به حضور توالی سیگنال پپتید (۲۲ آمینو اسید) در انتهای آمینی نوکلئاز PARS II، نیازی به اضافه کردن سیگنال ترشحی نبود. قطعه تکثیر شده (۹۶۸ نوکلئوتید) پس از هضم آنزیمی و انجام واکنش اتصال، جایگزین توالی رمز کننده آنزیم بتا گلوکونیداز (*GUS*) شد. با انتقال پلاسمید ناقل به سلول های باکتری *شریشیا کلی (Escherichia coli)* سویه DH5- α ، صحت سازه بیانی با استفاده از واکنش های هضم آنزیمی و PCR با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای طراحی شده از نوای پروموتور CaMV-

استخراج RNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR): پس از گذشت ۷۲ ساعت از آگرواینفیلتراسیون و اطمینان از بیان ژن، RNA کل با استفاده از کیت استخراج ستونی (دنازیست؛ ایران) از نمونه‌های بافت برگ، استخراج و پس از تیمار با DNaseI (Thermo Scientific؛ ایالات متحده)، رشته اول cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA کل و کیت سنتز cDNA رشته اول معکوس (Thermo Scientific؛ ایالات متحده)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. سپس واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و تمام واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل T1 (Biometra؛ آلمان) انجام گرفت.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش بلات نقطه‌ای: از آنجایی که نسخه‌برداری از یک ژن همواره به معنی ترجمه و تولید پروتئین متناظر آن نیست، از آزمون بلات نقطه‌ای برای تایید ترجمه ژن *PARS II* استفاده شد. نمونه‌های یک‌گرمی از برگ‌های اینفیلتره‌شده در ازت مایع پودر شدند و پس از اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید با pH برابر با ۸، ۱۰ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید (EDTA) با pH برابر با ۸، ۵٪ بتامرکاپتواتانول و ۱۵۰ میکرومولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF) و سپس سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C، فاز رویی برداشته شد. غلظت کل پروتئین خالص‌شده با آزمون بردفورد^[26] و با استفاده از پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد تخمین زده شد.

مقادیر یکسان جرمی از نمونه‌های پروتئینی استخراج‌شده روی کاغذ نیتروسلولزی لکه‌گذاری شدند. پس از خشک شدن در دمای اتاق، کاغذ به مدت یک ساعت در محلول BSA ۱٪ و در دمای ۳۷°C، به منظور بلوکه کردن نواحی غیراختصاصی قرار داده شد. با انجام سه مرحله شست‌وشوی ۵ دقیقه‌ای با بافر نمکی فسفات-توتین (PBS-T)، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد هیستیدین متصل به آنزیم هورس‌رادی‌ش پراکسیداز (HRP؛ Sigma؛ ایالات متحده) با غلظت ۱:۱۰۰۰ به کاغذ نیتروسلولزی اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. مجدداً سه مرحله شست‌وشوی ۵ دقیقه‌ای انجام گرفت و نهایتاً در حضور سوپسترای رنگی دی‌آمینوبنزیدين (DAB) و پراکسید هیدروژن، بیان پروتئین مورد نظر بررسی شد. از نمونه پروتئین پوششی ویروس موزاییک توتون یا تنباکو (TMV) خالص‌شده از ستون کروماتوگرافی نیکل (مقاله منتشر نشده) و پروتئین استخراج‌شده از برگ گیاه شاهد، به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

یافته‌ها

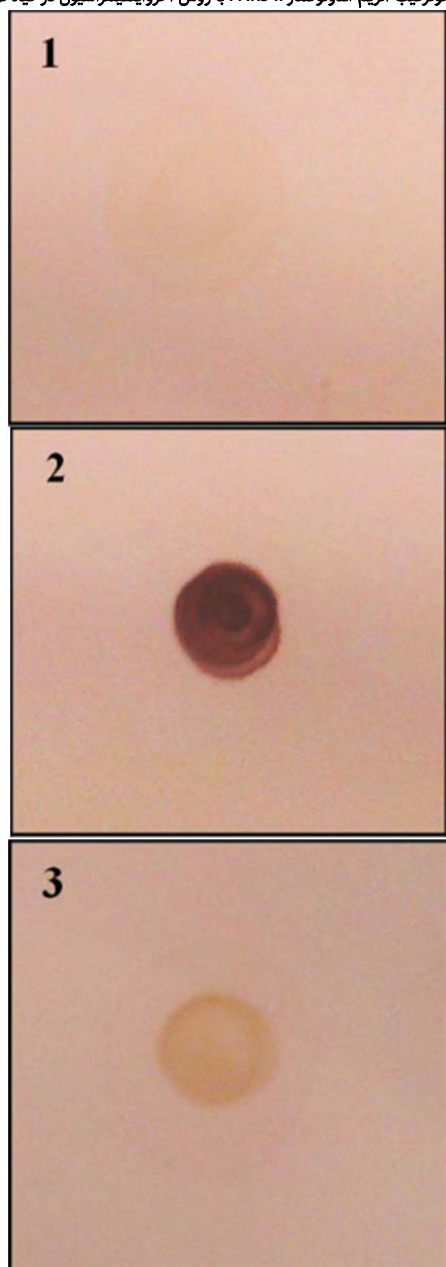
با استخراج پلاسمید از باکتری‌های ترانسفورم‌شده و انجام آزمایشات PCR با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱)، تکثیر باندهای منطبق بر اندازه مورد نظر، صحت سازه بیانی ساخته‌شده را مورد تایید قرار داد (شکل A-۳). همچنین واکنش هضم با استفاده از ترکیب دو آنزیم برشی *BamHI* و *SacI* روی نمونه‌های پلاسمید تایید شده در واکنش PCR انجام و قطعات برش‌یافته منطبق بر اندازه مورد نظر مشاهده شدند (شکل B-۳). نتایج توالی‌یابی، میزان ۱۰۰٪ همولوژی با توالی ژن *PARS II* (شماره دستیابی JN974459 در بانک ژن) را نشان داد.

با تکثیر قطعه ۹۶۸ جفت‌بازی از cDNA حاصل از mRNA

سپس گیاهان با محفظه پلاستیکی پوشانده و در اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۳±۲°C و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. روز بعد محفظه پلاستیکی حذف شد و گیاهان به مدت حداقل دو روز دیگر در همان محیط باقی ماندند. تعیین مکانیزم فعالیت و ترجیح سوپسترای نوکلئاز *PARS II* مستلزم تولید فرم خالص نوترکیب و تعیین مکانیزم فعالیت آن روی سوپسترای DNA هتروپولکس است. لذا در این مطالعه با استفاده از سیستم بیان موقت مبتنی بر آگرواینفیلتراسیون، امکان تولید فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلئاز *PARS II* در سیستم گیاهی بررسی شد. در ابتدا به منظور ساخت سازه بیانی pBI-Pars، توالی کامل رمزکننده *PARS II* به همراه توالی کوتاه کوزاک در بالادست و توالی رمزکننده ۸ آمینواسید هیستیدین در پایین دست ژن، جایگزین توالی *GUS* در ناقل دوگانه pBI121 شد (شکل ۱). برای اطمینان از صحت توالی، سازه ژنی به دست‌آمده براساس آغازگرهای pBI-F/pBI-R توالی‌یابی شد.



شکل ۲ آگرواینفیلتراسیون برگ‌های توتون با استفاده از سرنگ بدون سوزن: (a) ایجاد خراش کوچک با سوزن در پشت برگ، (b، c) تزریق سوسپانسیون باکتریایی در محل خراش به درون بافت پاراننشیم برگ

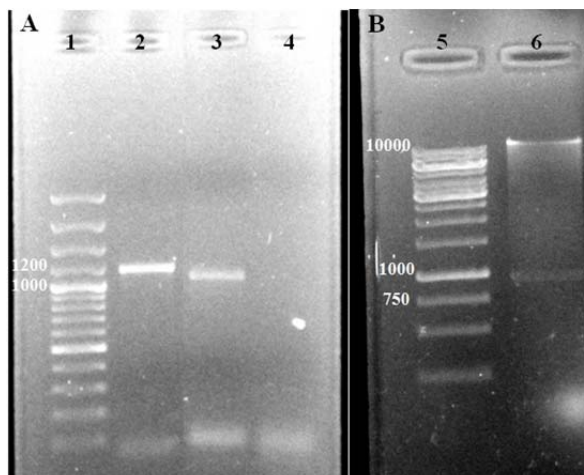


شکل ۵) نتیجه آزمون پلات نقطه‌ای به منظور ردیابی بیان پروتئین نوترکیب PARS II: ۱: گیاه شاهد، ۲: کنترل مثبت (نمونه خالص شده پروتئین پوششی ویروس TMV دارای برجسب هیستیدین)، ۳: گیاه آگرواینفیلتره شده با سازه بیانی pBI-Pars

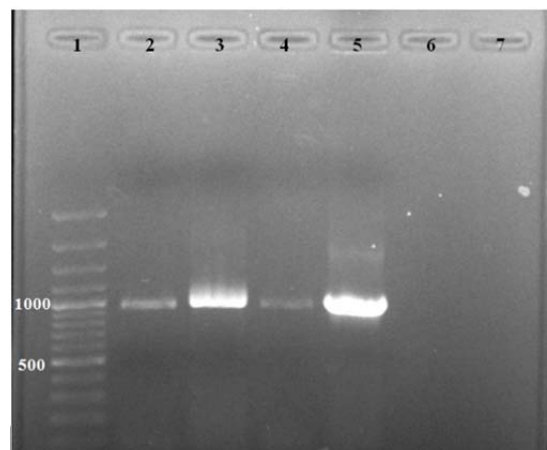
بحث

پژوهش حاضر با هدف بیان موقت فرم نوترکیب آنزیم اندونوکلاز PARS II با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون در گیاه توتون انجام شد. دستیابی به آنزیم‌های نوترکیب با قابلیت خالص‌سازی آسان، گامی بزرگ در راستای تولید آنزیم‌های ارزشمند و ایجاد امکان تولید تجاری آنها است. تاکنون تلاش‌های زیادی در زمینه تولید نوترکیب مهم‌ترین نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس انجام گرفته است. از جمله می‌توان به تولید نوکلئاز CEL I نوترکیب در سیستم‌های بیان مخمر^[27]، سیستم باکولوویروس^[28]، و آگرواینفیلتراسیون^[29]، تولید نوکلئاز SPI نوترکیب در سیستم باکولوویروس^[28]، تولید نوکلئاز ENDO1 نوترکیب از طریق آگرواینفیلتراسیون^[16] و تولید نوکلئاز CEL II نوترکیب در لارو کرم ابریشم^[14] اشاره کرد.

نمونه‌های آگرواینفیلتره شده با سازه pBI-Pars، رونوشت‌برداری از ژن به اثبات رسید (شکل ۴). نتایج پلات نقطه‌ای با آنتی‌بادی ضد هیستیدین، بیان پروتئین نوترکیب PARS II را مورد تایید قرار داد، در حالی که هیچ نشانی از بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان شاهد آگرواینفیلتره شده با سازه pBI121 مشاهده نشد (شکل ۵). مقادیر قابل توجهی از نوکلئاز نوترکیب PARS II در برگ‌های توتون تولید شد که نشان‌دهنده صحت سازه بیانی ساخته شده و موفقیت روش آگرواینفیلتراسیون برای بیان کارآمد و سریع نوکلئاز بود.



شکل ۳) الکتروفورز محصولات واکنش PCR و هضم آنزیمی نمونه‌های پلاسمید با آنزیم‌های *SacI* و *BamHI* به منظور تایید پلاسمیدهای ناقل (A) الکتروفورز محصولات واکنش PCR: تکثیر قطعه منطبق بر اندازه مورد نظر (۱۶۵ جفت‌باز) در چاهک ۲ با استفاده از آغازگرهای pBI-F/pBI-R و قطعه منطبق بر اندازه مورد نظر (۱۰۸۵ جفت‌باز) با استفاده از آغازگرهای PII-R-pBI-F/full در چاهک ۳ مبین حضور قطعه مورد نظر در پلاسمید ناقل pBI-Pars بود؛ چاهک ۱ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) و چاهک ۴ نشانگر کنترل منفی است؛ B) هضم آنزیمی نمونه‌های پلاسمید با آنزیم‌های *SacI* و *BamHI* به منظور تایید پلاسمیدهای ناقل، چاهک ۵ نشانگر مولکولی یک کیلو باری (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) است؛ قطعات برش‌یافته منطبق بر اندازه‌های مورد نظر (۹۶۸ جفت‌بازی + ۱۰۴۰۰ جفت‌بازی) در چاهک ۶، حضور پلاسمید ناقل را مورد تایید قرار داد



شکل ۴) تایید رونویسی ژن *parsII* در برگ‌های آگرواینفیلتره شده توتون با واکنش RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PII-F/PII-R-full؛ چاهک ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، چاهک ۲-۴: سطح نسبی بیان در نمونه‌های آگرواینفیلتره شده با سازه pBI-Pars، چاهک ۵: کنترل مثبت (پلاسمید خالص شده pBI-Pars به عنوان الگو)، چاهک ۶: گیاه شاهد و چاهک ۷: کنترل منفی (بدون الگو)

نوکلئازهایی با خواص آنزیمی بهتر تولید می‌کنند. لذا روش‌های تولید نوترکیب، جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های خالص‌سازی موجود خواهند بود. از آنجایی که نوکلئاز PARS II، شباهت بالایی به آنزیم اصلی کیت‌های Surveyor® برای تشخیص جهش آنزیم CEL II (IDT؛ ایالات متحده) نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که فرم نوترکیب این آنزیم نیز بتواند به‌طور موثری لوپ‌های DNA هتروودپلکس را شناسایی کند و برش دهد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به کمیت پایین پروتئین تخلیص‌شده به‌منظور استفاده در مقیاس تجاری اشاره نمود. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای به حداقل رساندن تاثیر خاموشی ژن و بالابردن میزان بیان در این سیستم، از بیان توام بازدارنده‌های ویروسی خاموشی ژن استفاده شود.

نتیجه‌گیری

روش آگرواینفیلتراسیون یک روش موثر و کوتاه‌مدت برای تولید انبوه نوکلئاز خالص نوترکیب PARS II در گیاه توتون است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد اعلام می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: محمد فارسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ مهدیه میرزایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ جعفر ذوالعلی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی به شماره ۲/۲۹۶۵۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

منابع

- 1- Tsuji T, Niida Y. Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories. *Electrophoresis*. 2008;29(7):1473-83.
- 2- Yeung AT, Hattangadi D, Blakesley L, Nicolas E. Enzymatic mutation detection technologies. *Biotechniques*. 2005;38(5):749-58.
- 3- Vogiatzakis N, Kekou K, Sophocleous C, Kitsiou S, Mavrou A, Bakoula C, et al. Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol. *Mol Biotechnol*. 2013;55(1):1-9.
- 4- Shi Y, Terry SF, Terry PF, Bercovitch LG, Gerard GF. Development of a rapid, reliable genetic test for pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Diagn*. 2007;9(1):105-12.
- 5- Wang GX, Tan MK, Rakshit S, Saitoh H, Terauchi R, Imaizumi T, et al. Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase genes by EcoTilling. *Pestic Biochem Physiol*. 2007;88(2):143-8.
- 6- Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco CF, Moriones E, Gómez-Guillamón ML, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol*. 2007;7:34.
- 7- Brady SM, Provart NJ. Extreme breeding: Leveraging

علی‌رغم پُرطرفداربودن سیستم‌های باکتریایی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، به‌دلیل ماهیت گلیکوپروتئینی اغلب نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته در حالت فعال، تولید این نوکلئازها در سیستم‌های پروکاریوتی با موفقیت همراه نبوده است. به‌عنوان مثال، تلاش‌های اولیه تریکوز و همکاران به‌منظور بیان ENDO1 و CEL I در سیستم پروکاریوتی/شریشیاکلی با موفقیت همراه نبوده و حتی پس از موفقیت نیز، پروتئین به‌دست‌آمده، فعالیت نوکلئازی نشان نداده است^[16]. همچنین پیمکین و همکاران، در تولید CEL I نوترکیب در سیستم‌های بیان پروکاریوتی موفق نبوده‌اند^[28]. از سوی دیگر، تلاش‌های انجام‌شده برای تولید فرم نوترکیب از طریق بیان پایدار به‌دلیل سمی‌بودن این نوکلئازها برای گیاه با موفقیت همراه نبوده است. لذا در حال حاضر، تکنیک‌های بیان موقت به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای بررسی و ارزیابی فرم نوترکیب اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته و تولید تجاری آنها محسوب می‌شوند.

مطالعات متعددی مبنی بر کارآمدبودن روش آگرواینفیلتراسیون برای تولید نوترکیب اندونوکلئازهای خانواده S1/P1 گزارش شده است. به‌عنوان مثال، تریکوز و همکاران با آگرواینفیلتراسیون توام ENDO1 و p19 (نوعی پروتئین ویروسی به‌منظور ممانعت از خاموشی ژن) در برگ‌های توتون *نیکوتیانا بنتامیانا* (*Nicotiana benthamiana*) به حد بالایی از بیان دست یافته‌اند. از ۱۰ گرم ماده گیاهی، آنزیم کافی برای انجام بیش از میلیون‌ها آزمایش تشخیص جهش به دست آمده است. ENDO1 خالص‌شده خام از ثبات بالایی برخوردار بوده است و توانسته‌اند آن را به‌مدت حداقل چهار ماه در دمای ۲۰°C- نگهداری نمایند. به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت، این محققان توصیه کرده‌اند که آنزیم نشاندارشده با هیستیدین با استفاده از ستون دارای نیکل (Ni-NTA) خالص‌سازی شود. آنزیم ENDO1 خالص‌شده و نشاندار با هیستیدین، بسیار باثبات بوده است و می‌توان آن را به‌مدت دو سال در دمای ۸۰°C-، یک سال در دمای ۲۰°C- یا بیش از چهار ماه در دمای ۴°C- نگهداری نمود. ENDO1 تولیدشده به‌طور موفقیت‌آمیزی در تشخیص جهش‌ها در ژنوم‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته و از ENDO1 نوترکیب حاصل به‌منظور تشخیص جهش ژنتیکی شناخته‌شده G1691A در ژن فاکتور V که اغلب همراه با فعال‌شدن مقاومت پروتئین C به‌عنوان نوعی فاکتور خطر در بیماری ترومبوز وریدی است، با موفقیت استفاده شده است^[16].

همچنین با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون، آنزیم CEL I نوترکیب توسط *بند/مان* و همکاران در برگ‌های *نیکوتیانا بنتامیانا* بیان و آنزیم نوترکیب تولیدشده با استفاده از روش رسوب‌دهی سولفات‌آمونیم از عصاره برگ‌های توتون خالص‌سازی شده است. این محققان اظهار داشته‌اند که CEL I نوترکیب به‌دست‌آمده، کمیت و کیفیت بسیار بالاتری نسبت به CEL I غیرنوترکیب داشته و سنجش ترجیح سوبسترای نوکلئاز نوترکیب به‌دست‌آمده نشان داده است که این آنزیم می‌تواند تمام انواع لوپ‌های جفت‌شدگی ناجور را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالاتر نسبت به CEL I خالص‌شده از ساقه کرفس شناسایی کند و برش دهد. همچنین این آنزیم توانست لوپ‌های T/T را که به‌ندرت توسط CEL I غیرنوترکیب شناسایی می‌شوند، تشخیص دهد^[29].

بررسی فعالیت نوکلئازهای تولیدشده نشان داده است که روش‌های نوترکیب، علاوه بر تولید مقادیر زیاد آنزیم در مدت‌زمان کم،

- 2015;7(1):201-15. [Persian]
- 19- Huang FC, Studart-Witkowski C, Schwab W. Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnol J*. 2010;8(7):783-95.
- 20- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*. 1997;122(1):101-8.
- 21- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP. pEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(7):682-93.
- 22- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(2):289-98.
- 23- Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, et al. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry*. 2000;39(13):3533-41.
- 24- Kozak M. The scanning model for translation: An update. *J Cell Biol*. 1989;108(2):229-41.
- 25- Sambrook J, Green MR. Appendix 1, Reagents and buffers. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1st Volume. 4th Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. p. A2.2.
- 26- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
- 27- Baron U, Imhoff U, Koch J, Leuer M, Weber J, Olek K, inventors; Biopsytec Analytik GmbH, assignee. Mutated nucleic acid of a CEL I-endonuclease and method for producing the recombinant, full-length CEL I-protein. WO2004035771. 2003 Oct 9.
- 28- Pimkin M, Caretti E, Canutescu A, Yeung JB, Cohn H, Chen Y, et al. Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection. *BMC Biotechnol*. 2007;7:29.
- 29- Bendahmane A, Sturbois B, Triques K, Caboche M, inventors; Genoplante-Valor, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), assignees. Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases and uses thereof. US20120009583A1. 2004 Jul 30.
- genomics for crop improvement. *J Sci Food Agric*. 2007;87(6):925-9.
- 8- Sokurenko EV, Tchesnokova V, Yeung AT, Oleykowski CA, Trintchina E, Hughes KT, et al. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(22):e111.
- 9- Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J*. 2004;37(5):778-86.
- 10- Comai L, Henikoff S. TILLING: Practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J*. 2006;45(4):684-94.
- 11- Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):e63.
- 12- Maier DA, Brennan AL, Jiang S, Binder-Scholl GK, Lee G, Plesa G, et al. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Hum Gene Ther*. 2013;24(3):245-58.
- 13- Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;26(5):457-91.
- 14- Mon H, Lee J, Fukushima M, Nagata Y, Fujii M, Xu J, et al. Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(15):6813-22.
- 15- Oleykowski CA, Mullins CRB, Godwin AK, Yeung AT. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(20):4597-602.
- 16- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmis M, Chauvin S, Clepet C, et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: Application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J*. 2007;51(6):1116-25.
- 17- Zolala J, Bahrami AR, Farsi M, Matin MM, Yassaee VR. Comparison of CEL I gene expression and mismatch-cleavage activity in some Apiaceae plants. *Mol Breed*. 2009;24(1):17-24.
- 18- Mirzaei M, Zolala J, Shalouzad A. Isolation, cloning and molecular characterization of genes encoding single-strand specific endonucleases from Parsley (*Petroselinum crispum* L.). *J Agric Biotechnol*.