

انتقال ژن به سلول‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) به وسیله

نانولوله‌های کربن: ناقلی جدید برای انتقال ژن

آرزو گلستانی پور¹، علی اعلمی^{2*}، مریم نیکخواه³، سامان حسینخانی⁴

1- دانش آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

2- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

3- دانشیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

4- استاد، 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 از جمله 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) و DNA پلاسمیدی دارای ژن گزارشگر GFP (کدکننده پروتئین نشردهنده نور سبز) به سلول‌های توتون (در شرایط سوسپانسیون) انتقال داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره (SWNT) توانستند درحالی‌که DNA پلاسمیدی به آنها متصل بود از دیواره سلولی و غشای پلاسمایی توتون عبور کنند. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت موفقیت در انتقال ژن به کمک Arg-SWNT را تأیید می‌کند.

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

مقدمه

نانولوله‌های کربنی (Carbon nanotubes: CNT) به دلیل ویژگی‌های خاص خود بسیار مورد توجه هستند و از پرکاربردترین نانومواد محسوب می‌شوند. CNT به دلیل توانایی عبور از موانع سلولی، تاکنون برای انتقال ماکرومولکول‌هایی همچون siRNA، DNA و دارو به سلول‌های پستانداران استفاده شده است [1، 2، 3]. نانولوله‌های کربن چون در سلول سبب ایجاد سم می‌شوند [4، 5، 6] تلاش شد با روش‌های مختلف و با ایجاد تغییر در سطح نانولوله‌ها و پوشش‌دار کردن آنها با مولکول‌های غیرسمی (به صورت کووالان یا غیر کووالان) میزان زیست‌سازگاری آنها افزایش یابد [7]. عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربن با مولکول‌ها و یون‌های بار مثبت نه تنها باعث کاهش سمی بودن و افزایش زیست‌سازگاری نانولوله‌ها می‌شود بلکه امکان برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک با ماکرومولکول‌های دارای بار منفی همچون DNA را نیز فراهم می‌کند. در سال 2004 از نانولوله‌های کربن عامل‌دار شده با یون آمونیوم جهت انتقال DNA به سلول‌های پستانداران استفاده شد [8]. همچنین نانولوله‌های عامل‌دار شده با پلی‌مرهای بار مثبتی مثل پلی‌اتیلن‌ایمین هم موفق شدند DNA پلاسمیدی و siRNA را به سلول‌های پستانداران منتقل کنند [9، 10]. در بررسی نانولوله‌های تک‌دیواره و چنددیواره‌ای که با آمونیوم و لیزین عامل‌دار شده بودند مشخص شد سطح نانولوله و میزان بار سطحی در برهم‌کنش با DNA تأثیرگذار هستند [11].

اگرچه گزارش‌های متعددی به توانایی نفوذ نانولوله‌های کربنی به داخل سلول‌های گیاه و تحریک رشد آنها اشاره می‌کنند [12، 13، 14] تاکنون گزارشی مبنی بر انتقال ژن به کمک نانولوله‌های کربنی در گیاهان وجود نداشته و تنها موفقیت در این زمینه انتقال یک تک‌رشته کوچک DNA به سیتوپلاسم سلول‌های توتون

بوده است [15]. با توجه به توانایی نانولوله‌های کربن در عبور از موانع سلول گیاهی (دیواره سلولی و غشای پلاسمایی) و ورود به سیتوپلاسم و باتوجه به اینکه در صورت عامل‌دار کردن نانولوله‌ها با مولکول‌های بار مثبت امکان اتصال الکترواستاتیک آنها به DNA وجود دارد، در این پروژه تلاش شد به کمک نانولوله‌های کربنی که با اسید آمینه بار مثبت آرژنین عامل‌دار شده بودند DNA پلاسمیدی کدکننده پروتئین نشردهنده نور سبز (GFP) به سلول‌های توتون در شرایط سوسپانسیون وارد شود. نتایج این کار نیز به کمک میکروسکوپ فلورسنس بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون سلولی

برای تهیه سوسپانسیون سلولی توتون، 2 گرم کالوس در 30 میلی‌لیتر محیط کشت MS (Murashige and Skoog) با سرعت 120rpm در دمای 25°C هم زده شد. سلول‌های تکثیر شده چندین بار واکشت شدند. سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند برای بررسی موفقیت در انتقال ژن توسط Arg-SWNT (Arginine-single-walled carbon nanotube) استفاده شدند.

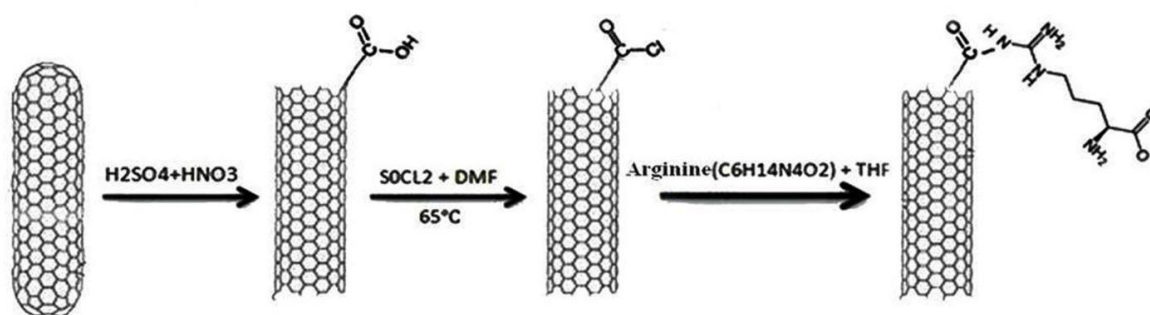
عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربن تک دیواره با

اسید آمینه آرژنین

برای عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربن 80 میلی‌گرم SWNT خام (US Research Nanomaterials) با 30 میلی‌لیتر مخلوط اسید سولفوریک و اسید نیتریک غلیظ (به ترتیب به نسبت 3 به 1) به مدت 20 ساعت در دمای 45°C و در شرایط رفلاکس انکوبه شد. نانولوله‌های کربن پس از تیمار اسیدی به وسیله سانتریفیوژ با دور 16000rpm به مدت 30 دقیقه رسوب و پس از حذف اسید چندین بار با آب دیونیزه شستشو داده شدند. چون

(Sigma) به مدت 50 دقیقه به وسیله 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 در شرایط رفلاکس انکوبه شد [17]. پس از سانتریفیوژ کردن (با دور rpm16000 به مدت 30 دقیقه)، رسوب نانولوله‌های عامل‌دار شده مجدداً درون آب دیونیزه پراکنده و برای حذف آرژنین اضافه (آرژنین وارد نشده در واکنش) به مدت 24 ساعت در آب دیونیزه دیالیز شد. پس از دیالیز، سوسپانسیون نانولوله‌های کربن برای نگهداری طولانی مدت لیوفلیزه شد.

با حذف اسید میزان رسوب‌دهی نانولوله‌ها کمتر می‌شود و به دور بالاتر سانتریفیوژ نیاز هست، جهت شستشو و حذف کامل اسید به جای سانتریفیوژ از کیسه دیالیز 2 کیلویی دالتونی (Sigma) استفاده شد و عمل دیالیز در آب دیونیزه به مدت 24 ساعت با 3-5 بار تعویض آب انجام گرفت. پس از خشک شدن SWNT توسط روتاری خلاء و برای فعال کردن گروه کربوکسیل متصل به آن، به 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 (آسیله شدن) مقدار اضافه SOCl₂ با روتاری خلاء حذف شد. نانولوله‌های کربنی آسیله شده با 40 میلی‌لیتر تترا هیدروفوران (Merck) (THF) و 3 گرم آرژنین



شکل 1 شماتیک از پروسه عامل‌دار کردن نانولوله کربن با آرژنین. قرار گرفتن گروه کربوکسیل روی نانولوله، جایگزینی گروه کربوکسیل با گروه آسید و نهایتاً برقراری پیوند آمیدی و اتصال آرژنین.

اندازه‌گیری پتانسیل زتا

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

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 استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

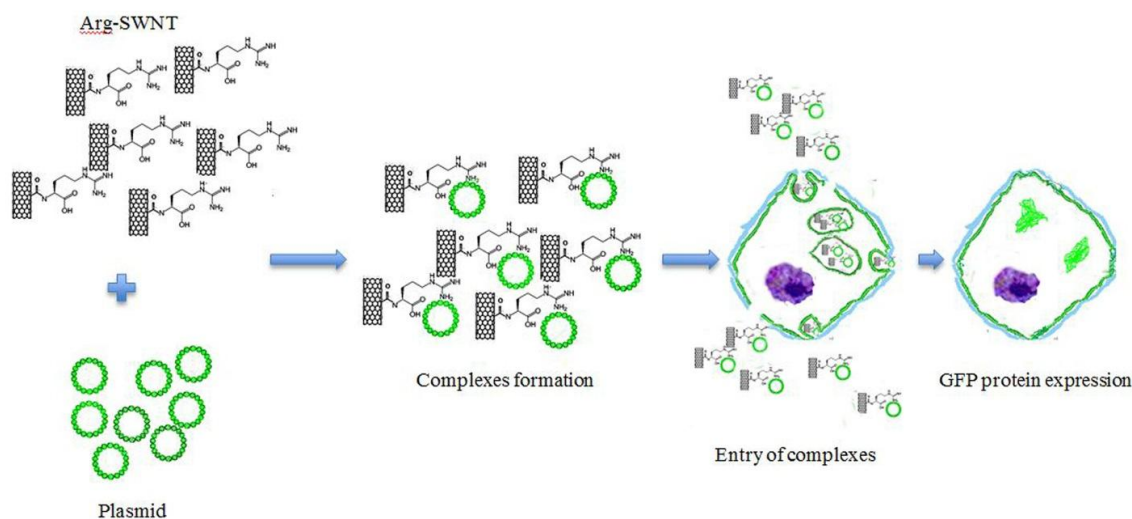
مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss-TEM) EM10C-80KV بررسی شد.

تشکیل کمپلکس و انتقال ژن

10 میکروگرم پلاسمید با 10، 20، 40 و 80 میکروگرم نانولوله کربن عامل دار شده مخلوط و برای تشکیل کمپلکس به مدت 24 ساعت در دمای 4°C انکوبه شد. سامانه آماده شده به سوسپانسیون سلولی لگاریتمی رشد بود اضافه شد. سوسپانسیون سلولی تیمار شده 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 (BioTek Instruments, Winooski, VT) Cytation3) Cell Imaging Multi-Mode Reader بررسی شد (شکل 2).

آماده سازی و بررسی کمپلکس Arg-SWNT-pDNA 200 نانوگرم DNA پلاسمیدی، جداگانه با 200، 400، 800 و 1600 نانوگرم نانولوله های کربنی عامل دار شده مخلوط و به مدت 24 ساعت در دمای 4°C انکوبه شدند [18] تا کمپلکس های Arg-SWNT-pDNA تشکیل شوند. برای اطمینان از برهم کنش الکترواستاتیک بین آرژنین و پلاسمید و اتصال پلاسمید به نانولوله های کربن، حرکت کمپلکس های آماده شده روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

بررسی مورفولوژیک نانولوله های عامل دار شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) پس از ایجاد تغییرات در سطح نانولوله ها و اتصال آرژنین به آنها ابتدا جهت پراکندگی بیشتر ذرات مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در سونیکاتور حمام دار قرار گرفت و سپس چند قطره از آن روی گرید کربن منتقل شد. برای تبخیر حلال، نمونه به



شکل 2 خلاصه تصویری مراحل انتقال ژن به کمک سامانه Arg-SWNT-pDNA: تشکیل سامانه، ورود سامانه به سلول و بیان پروتئین

همان طور که اشاره شد در فرایند عامل دار کردن نانولوله های کربن با آرژنین ابتدا نانولوله ها تیمار

نتایج و بحث
بررسی عامل دار شدن نانولوله های کربن

اسیدی می‌شود و گروه‌های کربوکسیل روی نانولوله‌ها قرار می‌گیرد و پس از فعال‌شدن گروه‌های کربوکسیل، آرژنین به آنها متصل می‌شود. در شکل 3

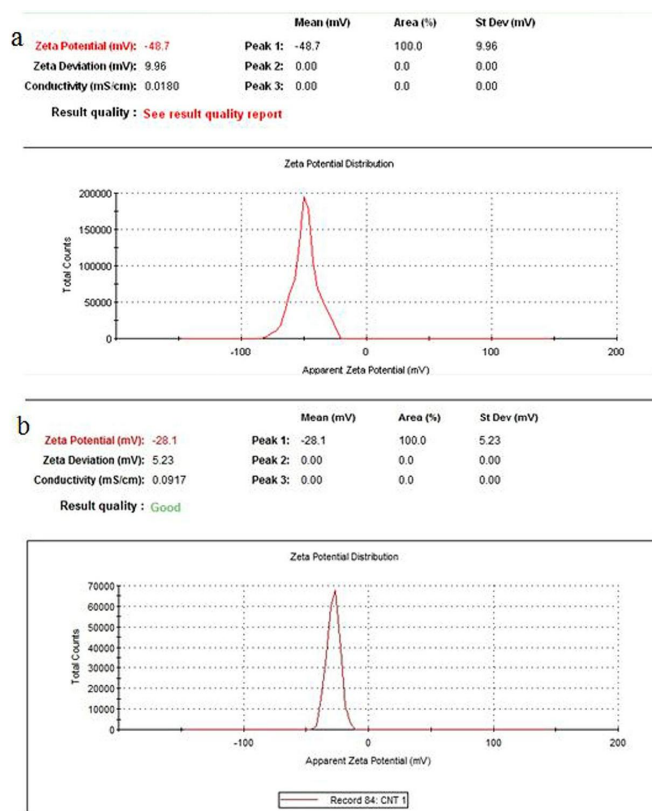
افزایش مخلوط‌پذیری نانولوله‌های تک‌دیواره کربن در آب را پس از عامل‌دارشدن با آرژنین می‌توان مشاهده کرد.



شکل 3 افزایش میزان پراکندگی نانولوله‌های کربن در آب پس از عامل‌دار 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

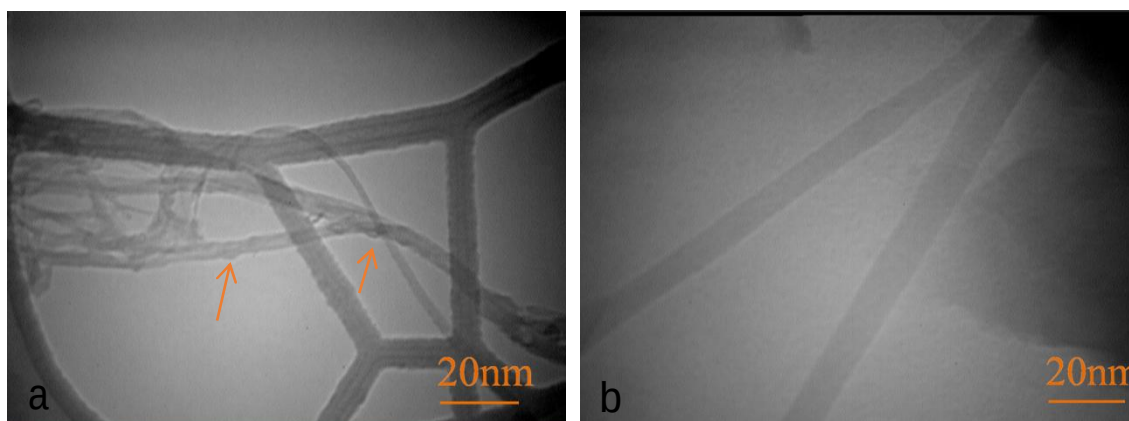
اندازه‌گیری پتانسیل زتا نشان می‌دهد پس از اضافه کردن آرژنین به محیط واکنش، بار منفی نانولوله‌های کربنی دارای گروه کربوکسیل از $-48/7$ به $-28/1$ کاهش یافته است که این امر نشان‌دهنده اتصال آرژنین به گروه‌های کربوکسیل و تعدیل بار سطحی نانولوله‌هاست (شکل 4).



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

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].

تأیید عامل‌دارشدن نانولوله‌های کربن به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نانولوله‌های کربنی خام (کنترل) و تیمارشده به‌وضوح



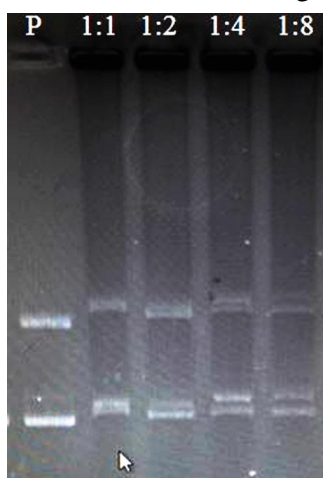
شکل 5 تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): a: نانولوله‌های کربن عامل‌دار شده b: نانولوله‌های کربن خام. برآمدگی‌هایی که با فلش قرمز مشخص شده‌اند محل اتصال آرژنین به نانولوله می‌باشند.

بررسی توانایی نانولوله‌های عامل‌دار شده در پذیرش

DNA پلاسمیدی

برای بررسی توانایی نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده 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، 2 برابر، 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 حرکت نکردن 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 سنگین شدن امکان خروج از چاهک را نیافته است.

مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت در تأیید انتقال موفق

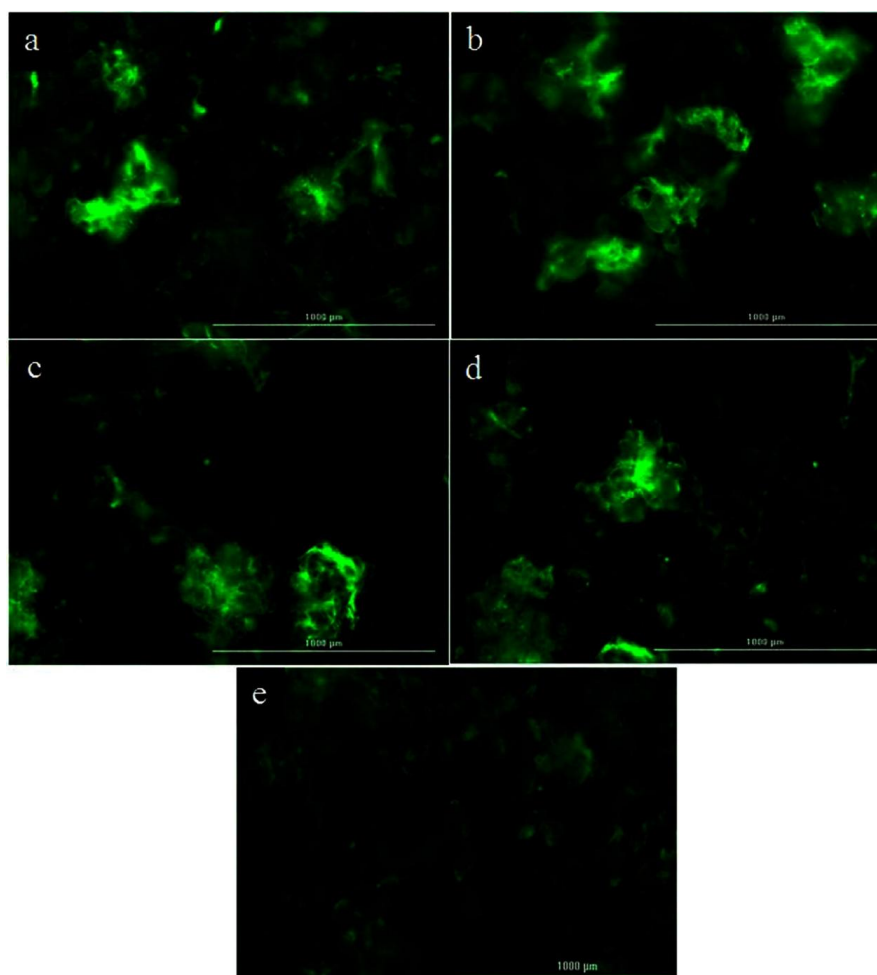
ژن به سلول‌های توتون

با توجه به نتایج ژل آگارز و اتصال موفقیت‌آمیز پلاسمید به مقادیر مختلف Arg-SWNT (شکل 4)، سوسپانسیون سلولی توتون با سامانه‌هایی که از مخلوط کردن 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 تیمار شده با سامانه‌ها و نمونه کنترل (سلول‌های تیمار شده با Arg-SWNT) در شکل 7 نشان داده شده است. وجود درخشندگی در سیتوپلاسم سلول‌های تیمار شده با کمپلکس‌های Arg-SWNT-pDNA بیانگر حضور پروتئین GFP و موفقیت تمام کمپلکس‌ها در انتقال ژن به سلول‌های توتون است. اگر باکتریوم که باکتری گرم منفی و پاتوژن

می‌شود به تکنیک‌های کارا تر نیاز هست. برخی از نانومواد به علت سایز کوچک خود و احتمال ورودشان به سلول، ناقلان مناسبی به نظر می‌رسند. نانولوله‌های کربن تک‌دیواره به علت شکل استوانه‌ای و قطری حدود 2-3 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 سمی بودن آنهاست که بر اساس گزارش‌های متعدد با تغییر در سطح نانولوله‌ها و عامل‌دار کردن آنها، مخلوط‌پذیری با آب، افزایش و در مقابل سمی بودن کاهش می‌یابد [23].

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 آگروباکتریوم نیستند و هدف حمله این باکتری قرار نمی‌گیرند. انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم اگرچه در گیاهان دولپه موفقیت‌آمیز هستند اما در گیاهان تک‌لپه (به دلیل میزبان نبودن) کارایی چندانی نداشته است [19]. گیاهان تک‌لپه (از جمله غلات) چون از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت هستند بهبود کیفیت و کمیت آنها به واسطه اصلاح ژنتیکی مورد توجه خاصی قرار دارد و احساس



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

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.

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 pK_a 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 تک‌ رشته‌ای 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 در نتیجه 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 سمی بودن 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 آگروباکتریوم است ضمن اینکه

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. Mirzapoor, 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., Sabulase, 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.
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.

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

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

Arezoo Golestanipour¹, Ali Aalami^{2*}, Maryam Nikkhah³, Saman Hosseinkhani⁴

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