Archive of SID

طراحی و ساخت ناقلین بیانی گیاهی جدید با تعداد جایگاه‌های بیشتر شناسایی آنزیم‌های برشی

علی هاتف سلمانیان، کسری اصفهانی*
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
kasra13@nigeb.ac.ir

چکیده

ناقلین دوتایی به طور گسترده‌ای در انتقال ژن به گیاه به واسطه آگروباکتریوم به کار می‌روند. در بسیاری از پروژه‌های انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم از ناقلین مبتنی بر pBI121 استفاده می‌شود و علی رغم ارائه انواع ناقلین جدید، ناقل pBI121 هنوز محبوبیت و کارآیی خود را از دست نداده است. البته به دلیل تعداد محدود جایگاه‌های منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی در این ناقل، در برخی موارد ساخت سازه‌های انتقالی با مشکل مواجه می‌شود. در این مقاله ناقل $pBI121^{+3downGUS}$ که دارای سه جایگاه برشی منحصر به فرد جدید نسبت به ناقل pBI121 در پایین دست ژن *gus* (β-glucuronidase) می‌باشد و ناقلی با نام $pBI121^{GUS-9}$ دارای نه جایگاه منحصر به فرد آنزیم‌های برشی بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS معرفی می‌گردند. در ناقل $pBI121^{GUS-9}$ ژن گزارشگر GUS حذف شده است.

کلمات کلیدی: پلاسمید، ناقل، آگروباکتریوم، انتقال ژن، pBI121.

مقدمه

ناقلین دوتایی[1] به طور گسترده ای در انتقال ژن به گیاه به واسطه آگروباکتریوم به کار می روند. پلاسمید pBI121 از جمله اولین ناقلین دوتایی بود که معرفی شد (۴). استفاده از این ناقل و مشتقات آن به سرعت در بین محققان زیست شناسی مولکولی گسترش یافت و بر اساس بررسی های انجام شده، در ۴۰ درصد پروژه های انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم از ناقلین مبتنی بر pBin19 و pBI121 استفاده شده است (۵). بر این اساس و علی رغم ارائه انواع ناقلین جدید (۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰)، ناقل pBI121 هنوز محبوبیت و کارآیی خود را از دست نداده است. ناحیه T-DNA[2] این ناقل شامل دو توالی حاشیه ای راست و چپ مشخص کننده این ناحیه، کاست بیانی نشانگر انتخابی نئومایسین فسفوترانسفراز II و ژن گزارشگر GUS تحت کنترل پیشبر CaMV[3] 35S و خاتمه دهنده NOS[4] می باشد (۳). به دلیل تعداد محدود جایگاه‌های منحصر به فرد شناسایی آنزیم-های برشی در این ناقل و از آنجایی که در انتهای ژن *gus* در ناقل pBI121 و قبل از خاتمه دهنده NOS، تنها یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Sac*I وجود دارد، در برخی موارد ساخت سازه‌های انتقالی با مشکل مواجه می شود. برای رفع این مشکل، دو ناقل با نام‌های $pBI121^{+3downGUS}$ که دارای سه جایگاه برشی منحصر به فرد جدید نسبت به ناقل pBI121 شامل جایگاه شناسایی آنزیم‌های *Alw*44I (*Apa*LI)، *Bcu*I (*Spe*I) و *Sal*I در پایین دست ژن *gus* (β-glucuronidase) و بعد از جایگاه شناسایی آنزیم *Sac*I می‌باشد و $pBI121^{GUS-9}$ دارای نه جایگاه منحصر به فرد آنزیم‌های *Xba*I، *Bam*HI، *Sma*I، *Kpn*I، *Xho*I، *Sac*I، *Alw*44I، *Bcu*I و *Sal*I بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS ساخته شدند که در این مقاله معرفی می-شوند. بدین ترتیب این ناقلین واجد جایگاه های بیشتر منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی نسبت به ناقل pBI121 هستند و همسانه‌سازی ژن در آنها با سهولت بیشتری انجام خواهد شد.

[1] Binary Vectors
[2] Transfer DNA
[3] Cauliflower Mosaic Virus
[4] Nopaline Synthase

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

برای ساخت ناقل $pBI121^{+3downGUS}$، دو آغازگر F/DownGUS و RENOS طراحی و توسط شرکت TAG Copenhagen ساخته شد. این دو آغازگر یکی در پایین دست ژن *gus* یا بالا دست خاتمه دهنده NOS (مستقیم) و دیگری در پایین دست خاتمه دهنده NOS (معکوس) طراحی شده به طوری که آغازگر معکوس ۲۴ نوکلئوتیدی و عیناً مکمل توالی و واجد توالی شناسایی آنزیم برشی *Eco*RI بعد از خاتمه دهنده NOS بوده ولی آغازگر مستقیم (۳۸ نوکلئوتیدی) عیناً در ۱۸ نوکلئوتید ناحیه '3 خود مکمل توالی بعد از ژن *gus* و قبل از خاتمه دهنده NOS بوده و دنباله ای ۲۰ نوکلئوتیدی شامل جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی *Alw*44I، *Bcu*I، *Sal*I و *Sac*I را در انتهای '5 خود داشت (شکل ۱). قطعه تکثیر شده با این دو آغازگر از روی توالی الگوی pBI121 (مطابق برنامه PCR جدول ۱) با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA polymerase شرکت فرمنتاس، شامل خاتمه دهنده NOS و جایگاه شناسایی چهار آنزیم برشی (*Alw*44I، *Bcu*I، *Sal*I و *Sac*I) بالادست آن و جایگاه شناسایی یک آنزیم برشی (*Eco*RI) پایین دست آن می باشد. این قطعه با آنزیم های *Sac*I و *Eco*RI هضم شد (شکل ۱). ناقل pBI121 نیز با همین دو آنزیم هضم گردید. قطعات حاصل از هضم محصول PCR (Insert) و قطعه بدنه ناقل که ناحیه خاتمه دهنده NOS آن یعنی بین جایگاه شناسایی آنزیم های *Sac*I و *Eco*RI آن حذف شده بود از روی ژل آگارز با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification شرکت Roche خالص سازی شده و واکنش الحاق (اتصال)[5] با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاس انجام شده و محصول به باکتری های مستعد[6] منتقل شدند (۹). باکتری های رشد کرده بر روی محیط واجد کانامایسین (نشانگر گزینشگر ناقل) با استفاده از Colony PCR (شکل ۳) بررسی شده و نمونه های مثبت، مجدداً کشت شده و پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت Roche، صحت ساخت ناقل جدید با استفاده از PCR، الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی با آغازگر RENOS (شکل ۴) تایید شد.

برای ساخت ناقل $pBI121^{GUS-9}$، مجددا از دو آغازگر F/DownGUS و RENOS استفاده شد. قطعه تکثیر شده با این دو آغازگر داخل ناقل $pBI121^{GUS-6}$ (۱) قرار گرفت. ناقل مذکور شامل شش جایگاه آنزیم‌های *Xba*I، *Bam*HI، *Sma*I، *Kpn*I، *Xho*I و *Sac*I بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS می باشد. قطعه حاصل از تکثیر با استفاده از آنزیم *Pfu* DNA polymerase شرکت فرمنتاس (طبق برنامه جدول ۱)، شامل شامل خاتمه دهنده NOS و جایگاه شناسایی چهار آنزیم برشی (*Alw*44I، *Bcu*I، *Sal*I و *Sac*I) بالادست آن و جایگاه شناسایی یک آنزیم برشی (*Eco*RI) پایین دست آن می باشد. این قطعه با آنزیم های *Sac*I و *Eco*RI هضم شد (شکل ۲). ناقل $pBI121^{GUS-6}$ نیز با همین دو آنزیم هضم گردید. قطعات حاصل از هضم محصول PCR (Insert) و قطعه بدنه ناقل که ناحیه خاتمه دهنده NOS آن یعنی بین جایگاه شناسایی آنزیم های *Sac*I و *Eco*RI آن حذف شده بود از روی ژل آگارز خالص سازی شده و واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاس انجام شده و محصول به باکتری های مستعد منتقل شدند (۹). باکتری های رشد کرده بر روی محیط واجد کانامایسین (نشانگر گزینشگر ناقل) با استفاده از Colony PCR بررسی شده و نمونه های مثبت، مجدداً کشت شده و پس از استخراج پلاسمید، صحت ساخت ناقل جدید با استفاده از PCR، الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی با آغازگر 35S(-55) (شکل ۴) تایید شد.

نتایج و جمع بندی

صحت ساخت ناقلین جدید با استفاده از PCR، الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی (شکل ۴) تایید شد. کلونی هایی که نتیجه Colony PCR آنها مثبت بود (شکل ۳)، کشت شده و پس از استخراج پلاسمید از آنها، آزمون PCR با ترکیب آغازگرهای مختلف و الگوی هضم آنزیمی بررسی شد. به دلیل محدودیت حجم مطالب، تنها نتایج تعیین توالی منطقه مورد نظر از ناقل که

[5] Ligation
[6] Competent Cells

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات مورد نظر در آن ایجاد شده بود، ارائه می گردد (شکل ۴).

از آنجایی که در انتهای ژن *gus* ناقل pBI121 و قبل از خاتمه دهنده، تنها یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Sac*I وجود دارد، اگر ژن مورد نظر دارای جایگاه شناسایی آنزیم *Sac*I در توالی خود باشد، حذف ژن *gus* و همسانه‌سازی این ژن‌ها در ناقل pBI121 با استفاده از این آنزیم با مشکل مواجه می‌شود. ساخت ناقل $pBI121^{+3downGUS}$ با چهار جایگاه شناسایی آنزیم های برشی در پایین دست ژن *gus* این مشکل را تا حدود زیادی حل می نماید. این جایگاه ها از آنزیم های معمول و موجود در بازار بوده و در سایر بخش های توالی ناقل تکرار نمی شوند. ناقل $pBI121^{GUS-9}$ نیز فاقد ژن *gus* بوده و ضمن داشتن کاست کامل بیانی ژن مقاومت به کانامایسین، دارای نه جایگاه منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی *Xba*I، *Bam*HI، *Sma*I، *Kpn*I، *Xho*I، *Alw*44I، *Bcu*I، *Sal*I و *Sac*I برای همسانه سازی ژن‌های مورد نظر بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS (جایگزین ژن *gus* ناقل pBI121) می‌باشد.

از این سری ناقل ها، ناقل $pBI121^{GUS-}$ اولین ناقل بود که با حذف ژن *gus* از ناقل pBI121، ساخته شد و دارای جایگاه شناسایی تنها دو آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Bam*HI بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS بود (۲). دومین ناقل، $pBI121^{GUS-6}$ بوده که به جای این دو جایگاه، دارای تعداد بیشتری توالی شناسایی آنزیم های برشی می‌باشد (۱). در ادامه این پروژه، ناقل های دیگری با کارآیی متفاوت و وجود عناصر مختلف طراحی و معرفی خواهند شد. در مرحله بعد، کارآیی این ناقل‌ها در انتقال ژن مورد نظر به گیاه و میزان بیان آن مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

منابع:

۱. **اصفهانی، ک. (۱۳۹۱).** $pBI121^{GUS-6}$: ناقل جدید بیانی گیاهی با جایگاه شناسایی شش آنزیم برشی بین پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. تهران، سالن همایش های بین المللی دانشگاه شهید بهشتی.

۲. **اصفهانی، ک.، زمانی، م. ر.، مطلبی، م. (۱۳۹۱).** طراحی و ساخت سازه های بیانی گیاهی جهت انتقال ژن‌های *chit42* و *bgn13.1* قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توام. مجله زیست شناسی ایران (در حال چاپ).

3. **Chen, P. Y., C. K. Wang, et al. (2003).** "Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants." Molecular Breeding 11(4): 287-293.
4. **Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, et al. (1987).** "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." EMBO Journal 6(13): 3901-3907.
5. **Komori, T., T. Imayama, et al. (2007).** "Current status of binary vectors and superbinary vectors." Plant Physiology 145(4): 1155-1160.
6. **Lee, L. Y. and S. B. Gelvin (2008).** "T-DNA binary vectors and systems." Plant Physiology 146(2): 325-332.
7. **Lin, C. Y., H. M. Ku, et al. (2011).** "Construction of the binary vector with bi-selectable markers for generating marker-free transgenic plants." Botanical Studies 52(3): 239-248.
8. **Nakamura, S., S. Mano, et al. (2010).** "Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 74(6): 1315-1319.

www.SID.ir

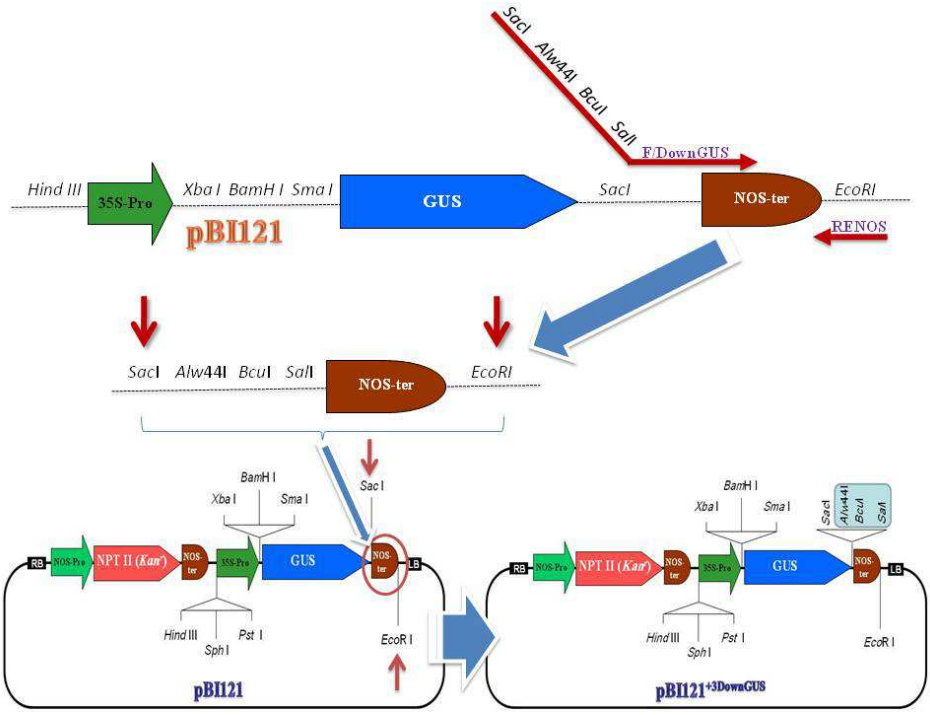
Archive of SID

9. **Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York. Sheerman S, Bevan MW (1988). A rapid transformation method for Solanum tuberosum using binary Agrobacterium tumefaciens vectors. Plant Cell Rep 7, 13-16.

10. **Tanaka, Y., S. Nakamura, et al. (2011).** "Development of a series of Gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for the transformation of Arabidopsis thaliana." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 75(4): 804-807.

جدول ۱: برنامه PCR تکثیر قطعه با دو آغازگر F/DownGUS و RENOS

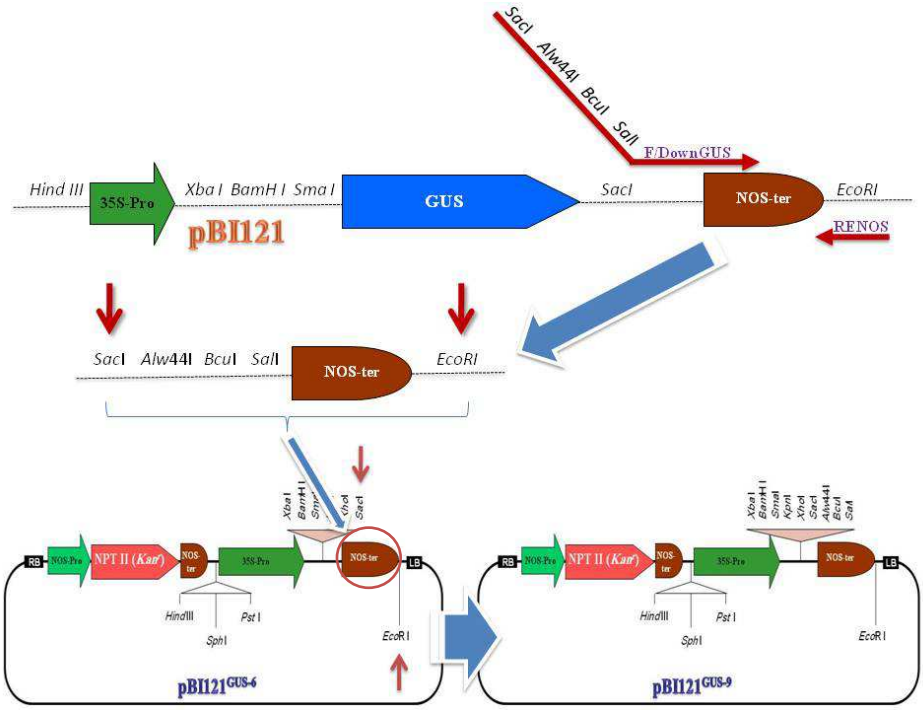
تکرار	دما (سلسیوس)	زمان (ثانیه)	تکرار	دما (سلسیوس)	زمان (ثانیه)
۱	۹۵	۱۸۰	۵	۹۵	۶۰
۱	۹۵	۶۰		۵۰	۶۰
	۴۸	۶۰		۷۲	۶۰
	۷۲	۶۰	۲۵	۹۵	۵۰
۱	۹۵	۶۰		۵۲	۶۰
	۴۹	۶۰		۷۲	۴۵
	۷۲	۶۰	۱	۷۲	۶۰۰



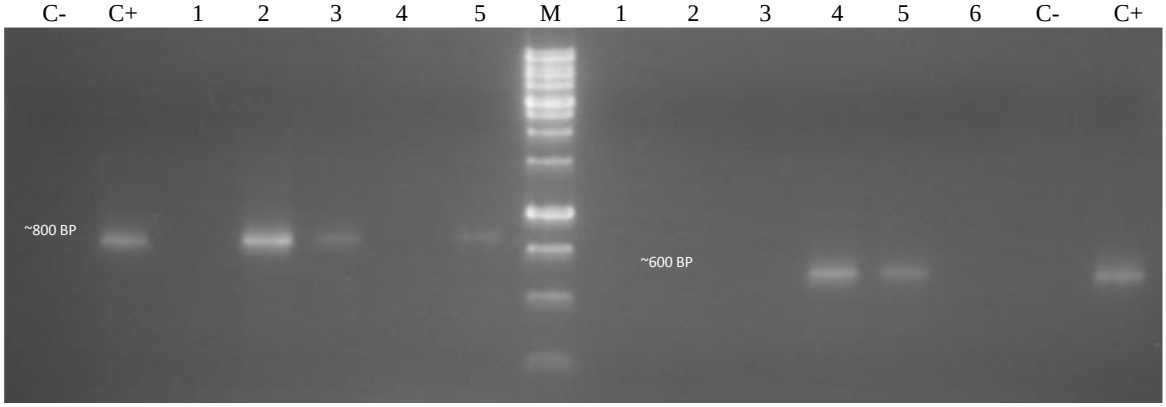
شکل ۱: مراحل ساخت ناقل $pBI121^{+3downGUS}$

www.SID.ir

Archive of SID



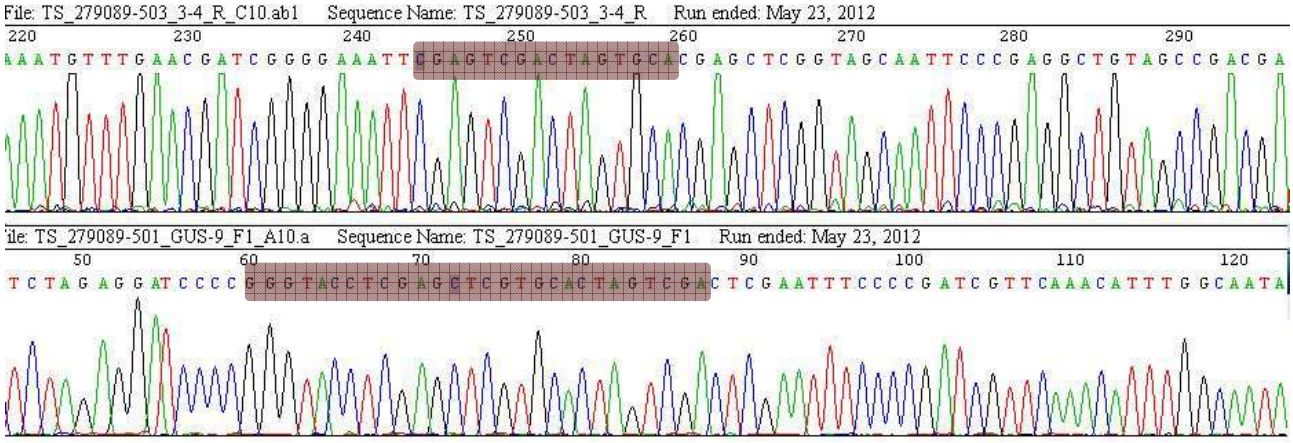
شکل ۲: مراحل ساخت ناقل $pBI121^{GUS-9}$



شکل ۳: نتیجه Colony PCR کلونی های دریافت کننده محصول واکنش الحاق برای ساخت ناقل $pBI121^{+3downGUS}$ (راست) با آغازگر انتهای پیشبر CaMV 35S (مستقیم) و داخل ژن *gus* (معکوس) و $pBI121^{GUS-9}$ (چپ) با آغازگر داخل پیشبر CaMV 35S (مستقیم) و انتهای خاتمه دهنده NOS (معکوس).
-C: کنترل منفی (واکنش PCR بدون DNA الگو)؛ +C: کنترل مثبت (DNA پلاسمیدی)؛ M: 1kb Ladder (Fermentas).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: نتیجه تعیین توالی مناطق تغییر یافته در ناقل $pBI121^{+3downGUS}$ (بالا) و $pBI121^{GUS-9}$ (پایین)

Designing and construction of new plant expression vectors with more recognition sites of restriction enzymes

Ali Hatef Salmanian, Kasra Esfahani*

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

English Abstract

Binary vectors are widely used for introducing genes of interest into plants via *Agrobacteriun*-mediated transformation method. One of the popular binary vectors is pBI121 which was widely distributed among plant molecular biologists and still appears to be good enough on many occasions. A major problem with pBI121 vector is low number of recognition sites which are often present within the sequences that wish to insert in the vector. New plant expression vectors based on pBI121 named $pBI121^{+3downGUS}$ and $pBI121^{GUS-9}$ with more restriction sites are introduced in this article. $pBI121^{+3downGUS}$ has more three recognition sites downstream of *gus* gene and $pBI121^{GUS-9}$ has nine recognition sites between CaMV 35S and NOS terminator while *gus* gene was deleted.

Key words: Plasmid, Vector, *Agrobacterium*, Transformation, pBI121.

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop