Assessment of Different Promoters (CaMV35s, E8, 2A11) in Transient Expression of Hepaptitis B Surface Antigene (HBsAg) in Tomato Plant

Hassan Rahnama [*1], Nahid Ahmadi [1], Arash Arashkia [2] and Mohammad Reza Safarnejad [1]

[1] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[2] Pasteur Institute of Iran, Virology Research Group, Tehran, Iran

Abstract
Transient gene expression experiments are especially useful to confirm the efficiency of promoters used for expression of foreign molecule in plants. In this study, the expression of the hepatitis B surface antigene (HBsAg) under the control of the *CaMV35S* and fruit tissue-specific (*E8* and *2A11*) promoters were studied in the leaf tissues of tobacco and tomato plants and tomato fruits using agroinfilteration technique. The results showed that fruit-specific promoters as the constutative *CaMv35S* promoter cause over-expression of the antigen in tomato plant fruits. However, HBsAg antigen was expressed in the leaf tissues, but its rate was lower than the fruits. Ethylene produced by the wounded leaf parts may induce fruit-specific promoter, which in turn is related antigen expression. The results show that the tomato fruit specific promoters (*E8* and *2A11*) can be used as for efficient expression of HBsAg antigen in transgenic tomato plants.
Keywords: HBsAg, Hepatitis B, Specific promoters, Tomato, Transient Expression.

* Corresponding Author: hrahnama@abrii.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و یکم، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۸۶-۷۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۴/۰۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷

ارزیابی کارایی پیشبرهای مختلف (*CaMV35s, E8, 2A11*) با بیان موقت آنتی‌ژن سطحی هپاتیت ب (HBsAg) در گیاه گوجه‌فرنگی

حسن رهنما [1]*، ناهید احمدی [1]، آرش آرش‌کیا [2]، محمدرضا صفرنژاد [1]

[1] پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[2] انسیتو پاستور ایران، بخش ویروس‌شناسی، تهران، ایران

چکیده

بیان موقت، یکی از روش‌های موثر برای تایید کارایی پیشبرها در بیان ژن هدف در گیاهان است. در پژوهش حاضر، بیان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت ب (HBsAg) در کنترل پیشبر دایمی *CaMV35S* و همچنین پیشبرهای اختصاصی بافت میوهٔ گیاه گوجه‌فرنگی (*E8* و *2A11*) بررسی شد. بدین‌منظور از روش آگروانفیلتریشن در بافت‌های برگی گیاه توتون و گوجه‌فرنگی و همچنین میوهٔ گیاه گوجه‌فرنگی استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که دو پیشبر اختصاصی میوه، همانند پیشبر قدرتمند و دایمی *CaMv35S*، بیان زیاد آنتی‌ژن را در میوه‌های گیاه گوجه‌فرنگی باعث می‌شوند. اگرچه آنتی‌ژن HBsAg در بافت‌های برگی هم بیان شد، میزان آن نسبت به بافت میوه کمتر بود. شاید تولید اتیلن بر اثر زخمی‌شدن قطعات برگی، القای پیشبرهای اختصاصی میوه را باعث شده که خود بیان آنتی‌ژن مربوط را سبب شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که از پیشبرهای اختصاصی میوهٔ گوجه‌فرنگی (*E8* و *2A11*) می‌توان به‌طور موثری برای بیان دایمی آنتی‌ژن HBsAg در گیاه گوجه‌فرنگی تراریخت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیان موقت، پیشبر اختصاصی، گوجه‌فرنگی، هپاتیت ب، HbsAg.

مقدمه

استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌ها و ترکیبات ارزشمند دارویی و صنعتی در سال‌های گذشته به یکی از فناوری‌های امیدبخش در صنعت زیست‌فناوری گیاهی تبدیل شده است. این فناوری که به کشاورزی مولکولی معروف است، در حال حاضر اهمیت زیادی در تولید انواع ترکیبات از جمله پروتئین‌های نوترکیب دارد. در سال ۱۹۸۶، هورمون رشد انسانی، نخستین پروتئین دارویی بود که در گیاهان تراریخت توتون تولید شد. مطالعات بعدی نشان داد که امکان تولید سایر

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: hrahnama@abrii.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۶۳۲۷۰۳۵۳۶

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

پروتئین‌های ارزشمند مانند انواع آنتی بادی، واکسن‌ها، هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد انسانی و آنزیم‌های صنعتی در گیاهان وجود دارد. در حال حاضر، برخی از محصولات فناوری کشاورزی مولکولی وارد بازار شده‌اند و بسیاری دیگر هم در مراحل ورود به بازار هستند (Glenz and Warzecha, 2006).

برای به بیشینه رساندن میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت عوامل مختلفی دخالت دارند که از آن جمله به ترجیح کدونی، بیان پایدار و کارای ژن خارجی و ... اشاره می کنیم. با وجود این، چگونگی، زمان و محل بیان ژن با مجموعه‌ای از ساز و کارهای کنترلی تنظیم می‌شود. پیشبرها، انواعی از عوامل تنظیمی اصلی، نقش مهمی در بیان ژن دارند (He *et al*., 2008).

پیشبر عمومی ویروس موزائیک گل کلم (*CaMV35S*) پیشبر بسیار قدرتمندی برای بیان ژن‌های خارجی در سلول‌های گیاهی است؛ با وجود این، این پیشبر هیچ‌نوع ویژگی خاصی در بیان ژن ندارد؛ بنابراین، بیان ژن در زمان یا مکان ویژه انجام نمی‌شود. در تولید واکسن‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت، بیان اندک ژن به کاهش ایمنی‌زایی واکسن و در نتیجه، ناکارایی سیستم حفاظتی یا تحمل ایمونولوژیک بدن انسان منجر می‌شود. یکی از مزایای اصلی هدفمندسازی بیان پروتئین‌های نوترکیب در میوه‌های گیاهان این است که بخش‌های خوراکی گیاه را می‌توان بدون پختن یا فراوری مصرف کرد؛ این موضوع، چنین بافت‌هایی را برای تولید واکسن مناسب می کند. در گوجه‌فرنگی، پیشبرهای مختلفی مانند *E4*، *E8*، *PG* و *2A11* که اختصاصی میوه هستند شناسایی شده است.

این پیشبرها بیشتر برای تعیین نقش اتیلن در رسیدگی میوه‌ها بررسی شده‌اند. پیشبر *E8* یکی از شناخته‌شده‌ترین پیشبرهای اختصاصی گیاه گوجه‌فرنگی است. در پژوهش‌های متعدد، از این پیشبر برای بیان اختصاصی ژن در میوه‌های گوجه‌فرنگی استفاده شده است (Sandhu *et al*., 2000; Krasnyaski *et al*., 2001; Mehta *et al*., 2002; Yakoby *et al*., 2006; He *et al*., 2008). برخی محققان، پیشبر *E11* را نیزبرای بیان هدفمند ژن در گوجه‌فرنگی استفاده کرده‌اند (Yin-Hua *et al*., 2006).

میوه‌های گوجه‌فرنگی، سیستم تولید عمومی در کشاورزی مولکولی به شمار می‌روند و برای تولید انواع آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های دارویی استفاده می شوند. نخستین گزارش در این زمینه، تولید واکسن هاری در این گیاه است که میزان بیان آن بیش از ۱ درصد پروتئین کل بوده است (McGarvey *et al*., 1995). سایر واکسن‌های تولیدشده در گوجه‌فرنگی عبارتند از: زیر واحدهای کلراتوکسین ب (واکسن وبا) (Jani *et al*., 2002)، پروتئین F ویروس سینستیال تنفسی (Sandhu *et al*., 2000)، پس از آن هم واکسن هپاتیت E (Ma *et al*., 2003)، هپاتیت ب (Srinivas *et al*., 2008) و انتروتوکسین حساس به گرمای *E. coli* (Walmsley *et al*., 2003). از مزایای گوجه‌فرنگی نسبت به سیب‌زمینی این است که برای مصرف نیاز به پختن ندارد؛ درحالی‌که مصرف خام سیب‌زمینی چندان مرسوم نیست و حرارت‌دهی و پختن آن، بیشتر آنتی‌ژن‌های تولید شده را از بین می‌برد (Fischer and Schillberg, 2004). بیان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت ب (HBsAg) در گیاهان توتون (Mason *et al*., 1992)، سلول‌های توتون (Kumar *et*

al., 2007)، کاهو (Pniewski *et al.*, 2012)، هویج (Imani *et al.*, 2002)، سیب‌زمینی (Richter *et al.*, 2000)، موز (Kumar *et al.*, 2005) و گوجه‌فرنگی (Srinivas *et al.*, 2008) گزارش شده است.

یکی از روش‌های بررسی کارایی پیشبرها در بیان ژن‌ها، استفاده از روش‌های بیان موقت با کمک آگروانیفیلتریشن است. این روش علاوه بر تحلیل پیشبرهای گیاهی و رونویسی در گیاهانی مانند برنج و توتون (Yang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2012)، در جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری در سیب‌زمینی (Bendahmane *et al.*, 2000) و تحلیل کارکردی سایر ژن‌ها در گیاهان در مدت کوتاه چند روز استفاده شده است (Bertazzon *et al.*, 2012; Leckie and Neal Stewart, 2011; Figueiredo *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2006). قدرت بیماری‌زایی *Agrobacterium tumefacience* و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه بر کارایی بیان موقت ژن بسیار اثرگذار است (Wroblewski *et al.*, 2005). نکتهٔ شایان توجه این است که، روش بیان موقت ژن، بسیار ساده است؛ نیازمند تجهیزات گران قیمت نیست و این امکان را فراهم می‌کند که فعالیت ژن را درون بافت برگ به‌سرعت غربال‌گری کنیم (Faizal and Geelen, 2012). به علاوه، نشان داده شده است که از این روش می‌توان در سیستم‌های مختلف گیاهی مانند آرابیدوپسیس، توتون، گوجه فرنگی، سیب‌زمینی، انگور و رز استفاده کرد (Tsuda *et al.*, 2012; Yasmin and Debener, 2010; Zottini *et al.*, 2008; Koscianska *et al.*, 2005; Bhaskar *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009).

در پژوهش حاضر، از ژن‌های سنتزی HBsAg بهینه‌سازی شده بر اساس توالی ترجیحی گیاه گوجه‌فرنگی استفاده شده است. باتوجه به توالی ژنتیکی جدید ژن HBsAg، برای بررسی عملکرد ژن، لازم است کارایی آن با سیستم‌های بیان موقت کنترل شده با پیشبرهای اختصاصی بررسی شود. بدین منظور، ژن هپاتیت ب HBsAg کنترل‌شده با پیشبرهای اختصاصی میوهٔ گوجه‌فرنگی (*E8* و *2A11*) و پیشبر دایمی *CaMV35S* در برگ و میوهٔ گیاه گوجه‌فرنگی و همچنین برگ توتون بررسی شده است. پس از موفقیت عملکرد ژن، از این سازهٔ ژنی برای بیان دایمی آن و تولید گیاهان تراریخت استفاده خواهد شد.

مواد و روش‌ها

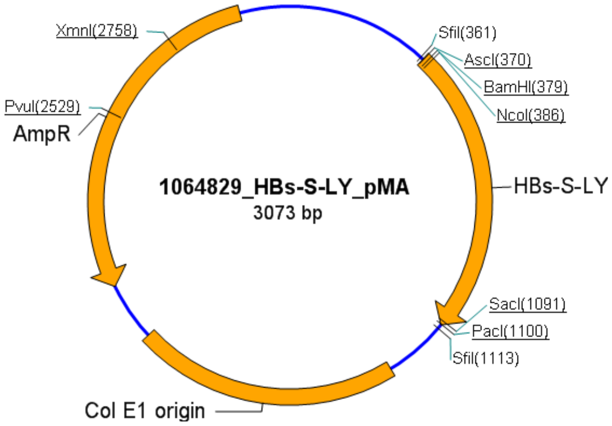
همسانه‌سازی پیشبرهای *E8* و *2A11*: بذرهای گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) پس از شستشو، در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت شدند. از برگ‌های جوان این گیاه در مرحلهٔ ۸ تا ۱۰ برگی برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد (Dellaporta *et al.*, 1983). DNA استخراج‌شده، الگوی جداسازی پیشبرهای *E8* و *2A11*، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی به کار گرفته شد. از دمای ۹۴ درجهٔ سانتیگراد برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه استفاده شد. ۳۵ چرخه برای PCR بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی (یک دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتیگراد)؛ اتصال (یک دقیقه در دمای ۶۳ درجهٔ سانتیگراد برای *2A11* و ۵۹ درجهٔ سانتیگراد برای *E8*)؛ بسط (یک دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتیگراد) و در

پایان، ۴ دقیقهٔ اضافه برای بسط نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتیگراد در نظر گرفته شد (Hooshyar *et al*., 2015). توالی آغازگرهای اختصاصی برای این پیشبرها عبارتند از: F*2A11*: 5′-caagctttaaaaagtatagtcaatatttac-3 و R*2A11*: 5′-ggatccggttttggattaattgctaattgatg-3′ برای پیشبر *2A11* و F*E8*: 5′-aagcttctagaaatttcacgaaat-3′ و R*E8*: 5′-ggatccttcttttgcactgtgaatgat-3′ برای پیشبر *E8*. این آغازگرها بر اساس توالی ژنی موجود در پایگاه NCBI با شمارهٔ دسترسی X13743.1 برای *2A11* و AF515784 برای *E8* با نرم افزار Oligo طراحی شدند. پیشبرهای مد نظر پس از تعیین توالی، جایگزین پیشبر *CaMV35S* در ناقل دوگانهٔ pBI121 شدند (Ahmadi *et al*., 2012; Ahmadi and Rahnama, 2013).

سنتز توالی‌های HBsAg: پس از یافتن توالی‌های آنتی‌ژن HBsAg از پایگاه NCBI، توالی‌های نوکلئوتیدی این ژن به‌طور اختصاصی برای گوجه‌فرنگی بهینه‌سازی شد؛ سپس توالی قطعات KOZAK و توالی SEKDEL برای افزایش بیان و هدف‌گیری در شبکهٔ اندوپلاسمی به این مجموعه افزوده شد. علاوه بر آن، جایگاه‌های اختصاصی برای آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I در ابتدا و انتهای توالی HBsAg اضافه شد (شکل ۱). توالی‌های طراحی‌شده به طول حدود ۷۲۰ جفت باز در شرکت Millgene (فرانسه) سنتز و به‌صورت کلون‌شده در وکتورهای pMAT تحویل گرفته شد (شکل ۱).

HBs-LY

gcgga tcc acc atg gaa aat att act tct gga ttt ctt gga cca ctt ctt gtt ttg caa gct gga tct ttt ttg ttg act agg att ctt act att cca caa agt ctt gat tct tgg tgg act tct ctt aat ttt ctt gga gga act act gtt tgt ctt ggt caa aat tct caa tct cca act tct aat cat tct cca act tct tgt cct cca act tgt cct ggt tat cgt tgg atg tgt ctt cgt cgt ttt att att ttt ctt ttt att ctt ctt ctt tgt ctt att ttt ttg ttg gtt ctt ctt gat tat caa ggt atg ttg cca gtt tgt cct ctt att cca gga tct tct act act agt act gga cca tgt aga act tgt act act cct gct caa gga act tct atg tat cca tct tgt tgt tgt act aaa cct tct gat gga aat tgt act tgt att cca att cca tct tct tgg gct ttt gga aaa ttt ctt tgg gaa tgg gct tct gct cgt ttt tct tgg ctt agt ttg ctt gtt cca ttt gtt caa tgg ttt gtt gga ctt tct cca act gtt tgg ctt tct gtt att tgg atg atg tgg tat tgg gga cca agt ctt tat agt att ttg agt cca ttt ttg cca ctt ttg cca att ttt ttt tgt ctt tgg gtt tat att tct gaa aaa gat gaa ctt taa gag ctc acc



شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی اصلاح شدهٔ آنتی‌ژن HBsAg برای گیاهان گوجه‌فرنگی (*HBs-LY*) (بالا) و ناقل پلاسمیدی حاوی قطعهٔ سنتزشده (پایین)

ساخت سازه‌های pBI-E8HB، pBI-2A11HB، pBI-35SHB: برای ساخت سازه‌های بالا، ژن *gus* با ژن HBsAg در سازه‌های pBI-35SGus، pBI-E8Gus، pBI-2A11Gus جایگزین شد. بدین منظور ژن *gus* با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از سازه‌های بالا خارج و سپس قطعهٔ ۷۲۰ جفت بازی در همان جایگاه برشی وارد شد. همهٔ سازه‌ها با روش هضم اختصاصی با آنزیم‌های برشی و همچنین PCR تایید شدند. سازه‌های نهایی با روش انجماد - ذوب به آگروباکتریوم *A. tumefacience* LBA4404 منتقل شدند.

بیان موقت آنتی‌ژن HBsAg با روش آگرواینفیلتریشن: *Agrobacterium* حاوی سازه‌های pBI-E8HB، pBI-2A11HB و pBI-35SHB به‌طور جداگانه در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به‌صورت شبانه در ۲۸ درجهٔ سانتیگراد کشت شدند. برای تلقیح، ابتدا نمونه‌های میوه و برگ گوجه‌فرنگی و برگ توتون در اندازه‌های کوچک برش زده شدند. نمونه‌ها در محیط کشت LB حاوی سویه‌های *Agrobacterium* (AM- محیط تلقیح ۱) غوطه‌ور شدند. علاوه بر محیط کشت یادشده، در آزمایشی دیگر ابتدا کشت شبانهٔ *Agrobacterium* با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند. رسوب باکتریایی در محیط تلقیح (۱/۲ محیط MS (IM- محیط تلقیح ۲) به حالت سوسپانسیون تبدیل شد و نمونه‌های گیاهی در این محیط هم تلقیح شدند؛ سپس مجموعهٔ حاوی نمونه‌های گیاهی غوطه‌ور در سوسپانسیون باکتری برای نفوذ بهتر باکتری‌ها در بافت‌ها در دسیکاتور و در خلا به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. این کار ۳ بار انجام شد. نمونه‌ها در پتری‌دیش‌های استریل حاوی سه لایه کاغذ صافی منتقل شدند و به مدت ۴ روز در تاریکی قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی آمادهٔ ارزیابی بیان آنتی ژن HBsAg، در دمای ۷۰- نگهداری شدند.

سنجش آنتی‌ژن HBsAg: نمونه‌های گیاهی تیمارشده با لیوفیلایزر (مدل FDB5502، شرکت Opran، کرهٔ جنوبی) خشک و سپس در هاون ساییده شدند. برای استخراج پروتئین از نمونه‌های گیاهی، بافر استخراج پروتئین (0.05M $NaHPO_4$ pH 7.5, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, 0.3% Tween 20, and 4mM PMSF) به آن‌ها افزوده شد و به مدت یک شب در ۴ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. روشناور حاوی پروتئین، در آزمون الایزا استفاده شد.

آزمون الایزا براساس راهنمای موجود در کیت HBsAg ONE (شرکت DIA-PRO، ایتالیا) انجام شد. جذب نمونه‌ها با دستگاه الایزا (مدل SUNRISE، شرکت Tican، سوئیس) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در بررسی حاضر، میزان تولید آنتی‌ژن HBsAg براساس کنترل مثبت و منفی کیت الایزا محاسبه شد.

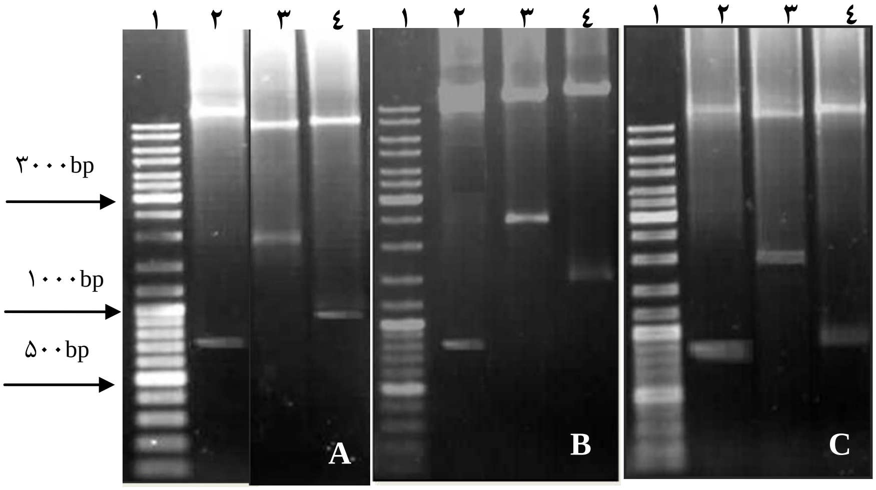
تحلیل آماری: همهٔ آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS انجام شد. همچنین مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

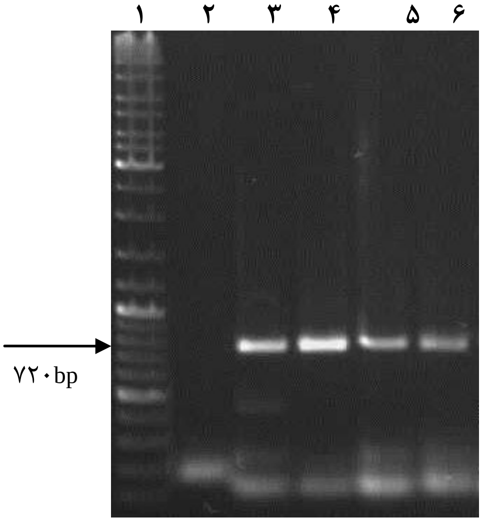
پروتئین‌ها با اهداف مختلفی در پزشکی، صنایع و پژوهش‌ها استفاده می‌شوند؛ اما استخراج آن‌ها از منابع

طبیعی اغلب مشکل و پرهزینه است. روش معمول در تولید پروتئین‌های دارویی از جمله واکسن‌ها در مقیاس صنعتی، مبتنی بر تخمیر میکروبی یا سیستم های کشت سلول‌های جانوری است؛ اما در دهۀ گذشته، گیاهان، سیستم بیانی جایگزین ارزان، ایمن و کارآمد، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب معرفی شده‌اند. برای افزایش کارایی سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان، استفاده از پیشبرهای مناسب ژنی اهمیت زیادی دارند. ارزیابی این پیشبرها در سیستم بیانی موقت، روشی سریع و ارزان قیمت است. از سوی دیگر، درحال‌حاضر سیستم بیان موقت، روشی جایگزین گیاهان تراریخت پایدار، برای تولید واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌رود (Chen *et al*., 2013; 2016). در پژوهش حاضر، برای بررسی کارایی سازۀ ژنی حاوی HBsAg و همچنین انتخاب یک پیشبر مناسب برای بیان آنتی‌ژن مربوط در گیاه گوجه‌فرنگی از روش آگرواینفیلتریشن استفاده شده است.

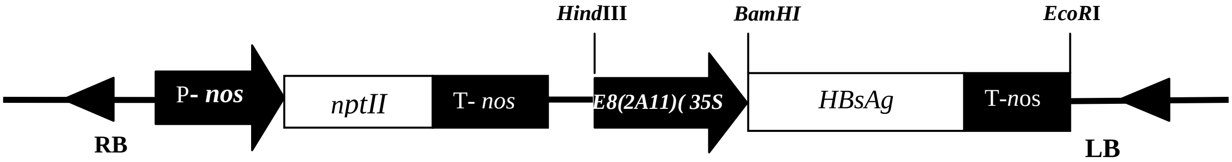
سازه‌های ژنی: ژن‌های سنتزی اصلاح شدۀ HBsAg برای گوجه‌فرنگی، با روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از پلاسمیدهای pMA-T حاوی HBsAg جدا شد و در جایگاه‌های برشی مناسب خود در ناقل‌های دوگانۀ pBI121، pBIE8GUS و pBI2A11GUS آماده شده در تحقیقات قبلی قرار گرفت (Ahmadi *et al*., 2012; Ahmadi and Rahnama, 2013). برای درستی همسانه‌سازی، سازه‌های جدید با روش‌های هضم آنزیمی و PCR با پرایمرهای اختصاصی تایید شدند (شکل‌های ۲ و ۳). سازه‌های جدید به ترتیب با نام‌های pBI35SHB، pBIE8HB و pBI2A11HB معرفی شدند (شکل ۴).



شکل ۲- تایید سازه‌های pBI35SHB (A)، pBI2A11HB (B) و pBIE8HB (C) با هضم آنزیمی- ۱) نشانگر مولکولی تعیین اندازۀ DNA (GeneRuler DNA Ladder)، ۲) هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I، ۳) هضم آنزیمی سازه با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI، ۴) هضم آنزیمی با دو آنزیم *Hin*dIII و *Bam*HI

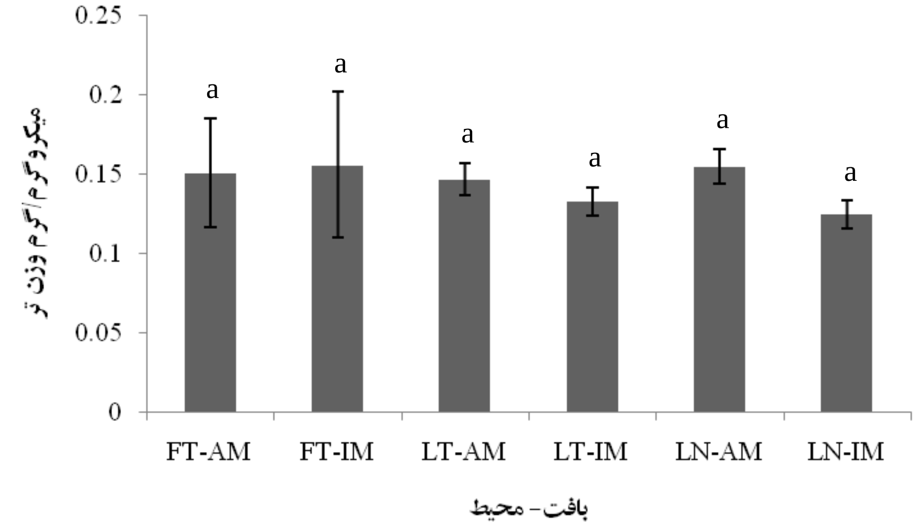


شکل ۳- تایید سازه‌های پلاسمیدی مختلف با آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی *HBsAg*- ۱) نشانگر مولکولی تعیین اندازهٔ DNA (GeneRuler DNA Ladder)، ۲) کنترل منفی آب، ۳) کنترل مثبت (سازهٔ pMA-T)، ۴) pBIE8HB، ۵) pBI2A11HB، ۶) pBI35sHB



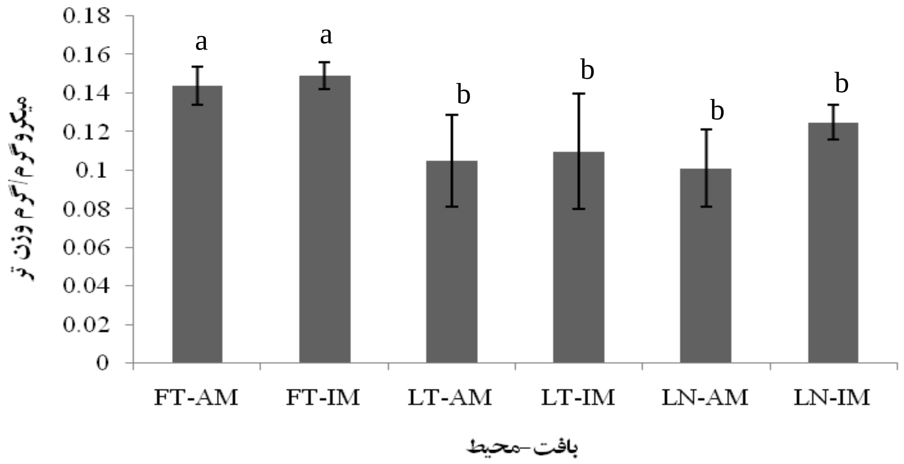
شکل ۴- نقشهٔ کلی سازه‌های ژنتیکی pBIE8HB، pBI2A11HB و pBI35SHB. RB و LB- به‌ترتیب ناحیهٔ سرحد مرزی راست و چپ، *P-nos*- پیشبر نئوپالین سنتاز، *nptII*- ژن مقاومت به کانامایسین، *T-nos*- پایانبر نئوپالین سنتاز، (*35S*)(*2A11*)(*E8*)- محل یکی از پیشبرهای اختصاصی *E8*، *2A11* و *CamV35S*، HBsAg- زیر واحد کوچک آنتی‌ژن سطحی هپاتیت ب، *Hind*III، *Bam*HI و *Eco*RI آنزیم‌های برشی

میزان بیان HBsAg: بررسی میزان بیان آنتی‌ژن پروتئینی HBsAg در بافت‌های مختلف گیاهی (برگ توتون، برگ گوجه‌فرنگی و میوهٔ گوجه‌فرنگی) نشان داد که بیان این آنتی‌ژن، زمانی‌که با پیشبر *CaMV35S* کنترل شود، در همهٔ بافت‌ها اتفاق می‌افتد (شکل ۵). تفاوت معنی‌داری بین بافت‌های مختلف از نظر میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg مشاهده نشد. این مشاهده با ویژگی غیراختصاصی پیشبر *CaMV35* مطابقت دارد. پیشبر *CaMV35S* یک پیشبر دایمی است که ژن‌های کنترل‌شده با آن در همهٔ بافت‌ها و در همهٔ وضعیت‌ها بیان می‌شوند (He *et al.*, 2008).

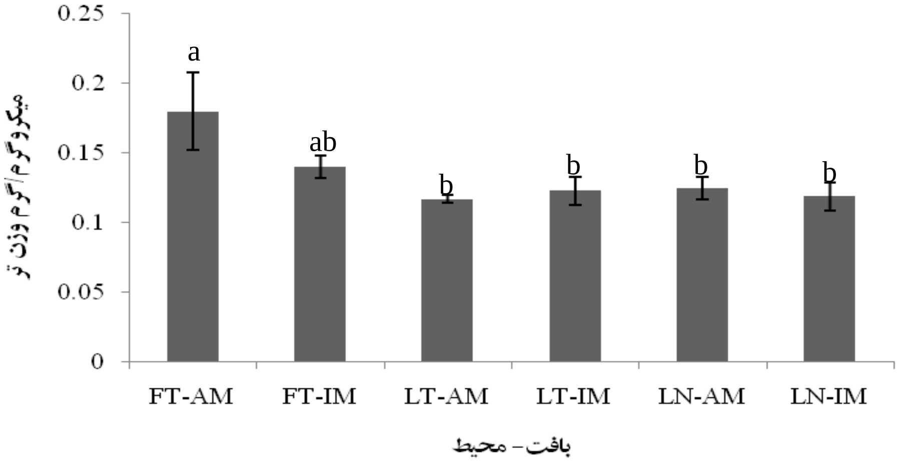


شکل ۵- میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg کنترل‌شده با پیشبر *CaMV35s* در سازهٔ ژنی pBI35SHB با آگروانیفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف- FT (میوهٔ گوجه‌فرنگی)، LT (برگ گوجه‌فرنگی)، LN (برگ توتون)- AM (محیط تلقیح ۱)، IM (محیط تلقیح ۲)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

یکی از مزایای بیان هدفمند پروتئین‌ها در میوه‌ها این است که بخش‌های خوراکی گیاه را می‌توان بدون پختن یا با اندکی فراوری مصرف نمود؛ بنابراین چنین بافت‌هایی محل مناسب برای تولید واکسن‌ها هستند. یکی از راهکارهای هدفمندسازی بیان پروتئین، استفاده از پیشبرهای اختصاصی است. در پژوهش حاضر، دو پیشبر اختصاصی میوهٔ گوجه‌فرنگی *E8* و *2A11* برای بیان هدفمند آنتی‌ژن HBsAg بررسی شدند. نتایج نشان داد که هر دوی این پیشبرها بیان آنتی‌ژن هپاتیت ب را در میوه‌های گوجه‌فرنگی باعث می‌شوند (شکل‌های ۶ و ۷). از این نظر، کارایی بیان این دو پیشبر با پیشبر عمومی *CaMV35S* مشابه است. میزان بیان این آنتی‌ژن با دو پیشبر *CaMV35S* و *E8* حدود ۰/۱۵ میکروگرم برگرم وزن تر میوه است. این مقدار با پیشبر *2A11* در یکی از محیط‌های تلقیح، حدود ۰/۱۸ میکروگرم بر گرم وزن تر است. همان‌گونه که در شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می‌شود، دو پیشبر *E8* و *2A11* باوجود اختصاصی‌بودن، بیان آنتی‌ژن‌های HBsAg را در سایر بافت‌ها (مانند برگ گوجه‌فرنگی و برگ توتون) باعث شده‌اند، هر چند میزان بیان در برگ‌ها کمتر از میوه است. دو پیشبر *E8* و *2A11* از پیشبرهای اختصاصی میوهٔ گوجه‌فرنگی در مرحلهٔ رسیدگی میوه هستند؛ به‌همین‌دلیل یکی از عواملی که فعال‌شدن این پیشبر را سبب می‌شود، هورمون اتیلن است (He *et al.*, 2008). در پژوهش حاضر، از قطعات برش‌خوردهٔ برگ گوجه‌فرنگی و توتون برای تحلیل‌ها استفاده شد. زخمی‌شدن برگ، تولید اتیلن را در بافت‌ها موجب می‌شود؛ بنابراین تولید اتیلن در برگ‌های برش‌خورده ممکن است یکی از عوامل القایی این پیشبرها و در نتیجه بیان آنتی‌ژن مربوط، در بافت غیراختصاصی باشد.



شکل ۶- میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg کنترل‌شده با پیشبر *E8* در سازهٔ ژنی pBIE8HB با آگروواینفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف- FT (میوهٔ گوجه‌فرنگی)، LT (برگ گوجه‌فرنگی)، LN (برگ توتون). AM (محیط تلقیح ۱)، IM (محیط تلقیح ۲)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۷- میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg کنترل‌شده با پیشبر *2A11* در سازهٔ ژنی pBI2A11HB با آگروواینفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف- FT (میوهٔ گوجه‌فرنگی)، LT (برگ گوجه‌فرنگی)، LN (برگ توتون)- AM (محیط تلقیح ۱)، IM (محیط تلقیح ۲)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

سیستم بیان موقت آگروواینفیلتریشن نخستین بار در توتون به کار گرفته شد؛ ولی پس از آن در گیاهان مختلفی مانند کاهو، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و ... هم بررسی شده است (Yusibov and Rabindran, 2008). برای نمونه، آنتی‌ژن سل (TB) به طور موقت با سیستم آگروواینفیلتریشن برای تولید واکسن در برگ‌های گیاه توتون بیان شده است (Zeladaa *et al*., 2006). همچنین آنتی‌ژن‌های دیگری مانند *Ag85B*، *ESAT6* و *ESAT6:Ag85B* هم با روش آگروواینفیلتریشن در گیاهان بیان شده‌اند (Dorokhov *et al*., 2007). میزان بیان آنتی‌ژن Ag85b حدود ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر برگ گزارش شده است. به‌تازگی، Srinivas و

همکاران (۲۰۰۸) موفق شدند آنتی‌ژن سطحی واکسن هپاتیت ب را در برگ‌های لپه‌ای گیاه گوجه فرنگی بیان کنند (Srinivas *et al*., 2008). آنها برای بیان موقت این ژن از پیشبرهای مختلفی استفاده کردند. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین میزان بیان در این سیستم آگروانفیلتریشن ۴۸۹/۵ نانوگرم بر گرم وزن خشک است.

پیشبرهای اختصاصی میوهٔ گوجه فرنگی و سیب‌زمینی در تحقیقات مختلفی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب و همچنین آنتی‌ژن‌های هپاتیت ب استفاده شده‌اند. برای نمونه، Jiang و همکاران (۲۰۰۴) موفق شدند با پیشبر *E8*، ژن کلراتوکسین (*ctb*) وبا را در میوه‌های گوجه‌فرنگی بیان کنند (Jiang *et al*., 2004). آنها موفق شدند با این پیشبر میزان بیان را به ۴۵۵ نانوگرم بر گرم وزن تر میوهٔ گوجه‌فرنگی برسانند. همچنین Lou و همکاران (۲۰۰۷) با پیشبر اختصاصی *2A11* توانستند زیرواحد بزرگ آنتی‌ژن *HBV* (هپاتیت ب) را به‌طور دایم در میوه‌های گیاه گوجه‌فرنگی بیان کنند (Lou *et al*., 2007). آنها موفق شدند با این روش در میوه های رسیدهٔ گیاه گوجه‌فرنگی تا میزان ۵۲۳/۵ نانوگرم بر گرم وزن تر، تولید آنتی‌ژن داشته باشند. به‌تازگی، He و همکاران (۲۰۰۸) موفق شدند با پیشبر اختصاصی *E8* گیاه گوجه‌فرنگی، آنتی‌ژن HBsAg را به‌طور موقت و دایم در میوه‌های گیاه گوجه‌فرنگی تولید کنند (He *et al*., 2008). آنها نشان دادند که استفاده از این پیشبر بیان آنتی‌ژن را در برگ‌ها، گل‌ها و بذرهای گیاه توتون باعث نمی‌شود؛ درحالی‌که پیشبر دایمی *CaMV35S* در همهٔ بخش‌های گیاه توتون تولید این آنتی‌ژن را باعث می‌شود. همچنین بیان آنتی‌ژن Ctb کنترل‌شده با پیشبر *E8*، بیان این پروتئین را در میوه‌های رسیدهٔ گیاه گوجه‌فرنگی باعث شد. با وجود این، هیچ‌گونه بیانی در برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌های نارس این گیاهان مشاهده نشد. این محققان نتیجه گرفتند که پیشبر *E8*، نه‌تنها ویژهٔ بافتی است بلکه ویژهٔ جنس گیاهی نیز است.

به‌علت کارایی این پروموتورها، آنها در ناقل‌های مختلف برای انتقال سازه‌های ژنی به گیاهان (به‌ویژه گوجه فرنگی) برای بیان هدفمند ژنها در بافت‌های اختصاصی استفاده شده‌اند (Estornell *et al*., 2009; Enfissi *et al*., 2010).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از پیشبرهای اختصاصی میوهٔ گوجه‌فرنگی (*E8* و *2A11*) بیان آنتی‌ژن HBsAg را در میوه‌های گوجه‌فرنگی همانند پیشبر عمومی *CaMV35S* باعث می‌شود. میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg حدود ۱۵۰ تا ۱۸۰ نانوگرم بر گرم وزن تر به دست آمد. اگرچه بیان آنتی‌ژن هپاتیت ب کنترل شده با این پیشبرها در سایر بافت‌ها مشاهده شد، به نظر می‌رسد علت آن مربوط به تولید اتیلن در بافت‌های زخمی گیاه باشد که در سیستم بیان موقت استفاده شده‌اند و القای بیان ژن‌های کنترل‌شده با آن را سبب شده است.

از بررسی حاضر نتیجه گیری می شود که پیشبرهای اختصاصی گیاه گوجه‌فرنگی (*E8* و *2A11*) می‌توانند به‌طور موثری برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در بافت‌های هدف گیاهان مد نظر عمل کنند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و از محل طرح شمارهٔ ۹-۸۸۰۰-۰۵-۰۵-۲ انجام شده است. در اینجا از پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Ahmadi, N. and Rahnama, H. (2013) The cloning of tomato *2A11* promoter and its efficiency in transient expression system. Crop Biotechnology 4: 77-85 (in Persian).

Ahmadi, N., Rahnama, H. and Kazemi Tabar, S. K. (2012) Cloning of tomato *E8* promoter and its analysis in transient assays using agroinfilteration system. Journal of Agricultural Biotechnology 3: 1-14 (in Persian).

Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. Plant Journal 21: 73–81.

Bertazzon, N., Raiola, A., Castiglioni, C., Gardiman, M., Angelini, E., Borgo, M. and Ferrari, S. (2012) Transient silencing of the grapevine gene *VvPGIP1* by agroinfiltration with a construct for RNA interference. Plant Cell Reports 31: 133–143.

Bhaskar, P. B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ane, J. M. and Jiang, J. M. (2009) *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato. PLoS ONE 4: e5812.

Chen, Q., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K. and Dent, M. (2016) Transient protein expression by agroinfilteration in lettuce. In: Recombinant proteins from plants 55-67. Speringer, New York.

Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K. and Dent, M. (2013) Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. Advanced Techniques in Biology and Medicine 1: 103-124.

Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19- 21.

Dorokhov, Y. L., Sheveleva, A. A., Frolova, O. Y., Komarova, T. V., Zvereva, A. S., Ivanov, P. A. and Atabekov, J. G. (2007) Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. Tuberculosis 87: 218–24.

Enfissi, E. M. A., Barneche, F., Ahmed, I., Lichtle, C., Gerrish, C., McQuinn, R. P., James, J., Giovannoni, J. J., Lopez-Juez, E., Bowler, C., Peter M. Bramley, P. M. and Fraser, P. D. (2010) Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 downregulated tomato fruit. The Plant Cell 22: 1190–1215.

Estornell, L. H., Orzaez, D., Lopez-Pena, L., Pineda, B., Anton, M. T., Moreno, V. and Granell, A. (2009) A multisite gateway-based toolkit for targeted gene expression and hairpin RNA silencing in tomato fruits. Plant Biotechnology Journal 7: 298-309.

Faizal, A. and Geelen, D. (2012) Agroinfiltration of intact leaves as a method for the transient and stable transformation of saponin producing *Maesa lanceolata*. Plant Cell Reports 31: 1517-1526.

Figueiredo, J., Ro¨mer, P., Lahaye, T., Graham, J., White, F. and Jones, J. (2011) *Agrobacterium*-mediated transient expression in *citrus* leaves: a rapid tool for gene expression and functional gene assay. Plant Cell Reports 30: 1339–1345.

Fischer, R. and Schillberg, S. (2004) Molecular farming: plant- made pharmaceutical and technical proteins. 1th edition, Wiley-VCH Verlag GMBH and Co KGaA, Weinheim.

Glenz, K. and Warzecha, H. (2006) New medicinal plants for the production of vaccines. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1: 126-130.

He, Z. M., Jiang, X. L., Qi, Y. and Luo, D. Q. (2008) Assessment of the utility of the tomato fruit-specific *E8* promoter for driving vaccine antigen expression. Genetica 133: 207-214.

Hoffmann, T., Kalinowski, G. and Schwab, W. (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. Plant Journal 48: 818–826.

Hooshyar, S., Bagherieh-Najar, M. B., Aghdasi, M. and Abdolzadeh, A. (2015) Production of transgenic soybean by the half-seed explants. Iranian Journal of Plant Biology 7: 29-40 (in Persian).

Imani, J., Berting, A., Nitsche, S., Schaefer, S., Gerlich, W. H. and Neumann, K. H. (2002) The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. Plant Cell 71: 157–164.

Jani, D., Meena, L. S., Rizwan-ul- Haw, Q. M., Singh, A. K., Sharma, A. K. and Tyagi, A. K. (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. Transgenic Research 11: 447–454.

Jiang, Z. L., He, Z. M., Chen, Q., Peng, Z. Q., Qi, Y. and Shou, Y. (2004) Transgenic tomato plant expressing cholera toxin B protein specifically in fruit as edible vaccine. Scientica Agriculture Sinica 37: 1188-1192.

Kim, M. J., Baek, K. and Park, C. M. (2009) Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. Plant Cell Reports 28: 1159–1167.

Koscianska, E., Kalantidis, K., Wypijewski, K., Sadowski, J. and Tabler, M. (2005) Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology 59: 647–661.

Krasnyanski, S. F., Sandhu, J., Domier, L. L., Buetow, D. E. and Korban, S. S. (2001) Effect of an enhanced *CaMV35S* promoter and a fruits pecific promoter on *uida* gene expression in transgenic tomato plants. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 37: 427–433.

Kumar, G. B. S., Ganapathi, T. R. and Bapat, V. A. (2007) Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: An update. Biotechnology Progress 23: 532–539.

Kumar, G. B. S., Ganapathi, T. R., Revathi, C. J., Srinivas, L. and Bapat, V. A. (2005) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. Planta 222: 484-493.

Leckie, B. and Neal Stewart, C. (2011) Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. Plant Cell Reports 30: 325–334.

Lou, X. M., Yao, Q. H., Zhang, Z., Peng, R. H., Xiong, A. S. and Wang, H. K. (2007) Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. Clinical and Vaccine Immunology 14: 464-469.

Ma, Y., Lin, S. Q., Gao, Y., Li, M., Luo, W. X., Zhang, J. and Xia, N. S. (2003) Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. World Journal of Gastroenterology 9: 2211–2215.

Mason, H. S., Lamm, D. M. and Arntzen, C. J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 89: 11745–11749.

McGarvey, P. B., Hammond, J. and Dienelt, M. M. (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. Nature Biotechnology 13: 1484–1487.

Mehta, R. A., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A. K. and Mattoo, A. K. (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. Nature Biotechnology 20: 613–618.

Pniewski, T., Kapusta, J., Bociag, P., Kostrzak, A., Fedorowicz-Stronska, O., Czyz, M., Gdula, M., Krajewski, P., Wolko, B. and Plucienniczak, A. (2012) Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation. Plant Cell Reports 31: 585–595.

Richter, L. J., Thanavala, Y., Arntzen, C. J. and Mason, H. S. (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotechnology 18: 1167–1171.

Sandhu, J. S., Krasnyanski, S. F., Domier, L. L., Korban, S. S., Osadjan, M. D. and Buetow, D. E. (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. Transgenic Research 9: 127–135.

Srinivas, L., Sunil Kumar, G. B., Ganapathi, T. R., Revathi, C. J. and Bapat, V. A. (2008) Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Biotechnology Reports 2: 1-6.

Tsuda, K., Qim, Y., Nguyenm, L. V., Bethkem, G., Tsudam, Y., Glazebrookm, J. and Katagiri, F. (2012) An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis*. Plant Journal 69: 713–719.

Walmsley, A. M., Alvarez, M. L., Jin, Y., Kirk, D. D., Lee, S. M., Pinkhasov, J., Rigano, M. M., Arntzen, C. J. and Mason, H. S. (2003) Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. Plant Cell Reports 21: 1020-1026.

Wroblewski, T., Tomczak, A. and Michelmore, R. (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnology Journal 3: 259–273.

Yakoby, N., Garvey, A. and Raskin, I. (2006) Tobacco ribosomal DNA spacer element elevates Bowman–Birk inhibitor expression in tomato plants. Plant Cell Reports 25: 573–581.

Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. Plant Journal 22: 543-551.

Yasmin, A. and Debener, T. (2010) Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 245–250.

Yin-Hua, C., Bo, O. and Zhi-Biao, Y. (2006) Isolation and characterization of *El I* gene promoter from tomato. Agricultural Science in China 5: 661-669.

Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R. M. and Fischer, R. (2008) The potential of plant virus vectors for vaccine production. Drugs in R & D 7: 203–217.

Zeladaa, A. M., Calamanteb, G., de la Paz Santangelo, M., Bigi, F., Verna, F., Mentaberrya, A. and Cataldi, A. (2006) Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector. Tuberculosis 86: 263–267.

Zhang, Y. M., Zheng, Y. M., Xiao, N., Wang, L. N., Zhang, Y., Fang, R. X. and Chen, X. Y. (2012) Functional analysis of the HS185 regulatory element in the rice HSP70 promoter. Molecular Biology Reports 39: 1649–1657.

Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F. and Lo Schiavo, F. (2008) Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant Cell Reports 27: 845–853.