مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

هدفمند سازی بیان آنتی ژن سطحی هپاتیت ب (HBsAg) به‌وسیله پیش‌بر اختصاصی Pat1 در غده‌های سیب زمینی با روش بیان موقت

حسن رهنما .Ph.D*، لیلا هلالی .M.Sc، ناهید احمدی .M.Sc

- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hrahnama@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۰

چکیده

هدف: به‌منظور بررسی کارایی پیش‌بر اختصاصی غده (Patatin1)، بیان آنتی‌ژن HBsAg واکسن هپاتیت ب در گیاه سیب‌زمینی با استفاده از روش بیان موقت (اگروواینفیلتریشن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پیش‌بر اختصاصی غده (Pat1) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) از گیاه سیب زمینی جدا شد. این پیش‌بر در بالادست ژن بهینه‌سازی شده سنتزی HBsAg در ناقل دوگانه pBI121 همسانه‌سازی شد. به‌منظور مقایسه کارایی پیش‌بر اختصاصی Pat1، ژن HBsAg تحت کنترل پیش‌بر دایمی CaMV35S هم قرار داده شد. سازه‌های تهیه شده پس از انتقال به اگروباکتریوم با استفاده از روش اگروواینفیلتریشن به غده‌ها و برگ‌های گیاه سیب‌زمینی انتقال یافتند. بیان موقت آنتی‌ژن HBsAg با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد.

نتایج: بررسی بیان آنتی‌ژن HBsAg در برگ‌ها و غده‌های گیاه سیب‌زمینی نشان داد که پیش‌بر Pat1 به‌طور اختصاصی باعث بیان بالای آن در بافت‌های غده‌ای می‌شود. بیان اندک این آنتی‌ژن تحت کنترل پیش‌بر Pat1 در بافت‌های برگی هم گزارش شده و می‌تواند تاحدی به عوامل القاکننده در محیط تلقیح بستگی داشته باشند. در حالی‌که بیان آنتی‌ژن تحت پیش‌بر دایمی CaMV35S در تمامی بافت‌های برگی و غده‌ای اتفاق می‌افتد. همچنین نتایج حاصل نشان داد که ژن HBsAg بهینه‌شده کدنی برای گیاه سیب‌زمینی به‌خوبی عمل کرده و آنتی‌ژن مربوط را بیان می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که از پیشبر اختصاصی غده سیب‌زمینی Pat1 همسانه‌سازی شده می‌توان به‌طور موثری برای بیان دایمی آنتی‌ژن سنتزی بهینه‌سازی شده کدنی HBsAg در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: بیان موقت، پیشبر غده Pat1، سیب‌زمینی، هپاتیت ب، HBsAg

مقدمه

در طی ۲۰ سال گذشته سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان تراریخت به‌عنوان یک سیستم جایگزین ارزان، ایمن و موثر برای تولید مقادیر بالای پروتئین‌های نوترکیب توجه فراوانی را به خود جلب کرده‌اند (۱و ۲). پیش بینی شده است که این سیستم بتواند جایگزین سیستم‌های موجود مبتنی بر میکروارگانیسم‌ها، کشت سلول‌های حیوانی و یا حیوانات تراریخت شود (۳ و ۴). بنابراین، گیاهان می‌توانند به‌عنوان بیوراکتوری برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند (۵ و ۶). امروزه برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان به مرحله تجاری رسیده‌اند که از آن جمله می‌توان به کلاژن نوع ۱ انسانی تولید شده در توتون (۷)، تریپسین گاوی تولید شده در ذرت (TrypZean, Sigma-Aldrich) (۵)، لیزوزیم و لاکتوفرین انسانی تولید شده در برنج (۸ و ۹) و .... اشاره کرد (۵).

امروزه تولید واکسن های خوراکی در سیستم‌های تولید مبتنی بر گیاهان اهمیت پیدا کرده است (۲ و ۱۰-۱۵). بیان آنتی‌ژن‌ها در بافت‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین مهمی برای برآوردن نیازهای جهانی به واکسن‌های ارزان‌تر، ایمن‌تر و با کیفیت‌تر مطرح شده‌اند. تعداد زیادی واکسن مبتنی بر گیاهان تولید شده‌اند که برخی از آن‌ها در مراحل آزمایش‌های بالینی قرار دارند. به‌منظور تولید واکسن‌های نوترکیب خوراکی در گیاهان انتخاب گیاه میزبان و نوع پیش‌بر برای بیان کارآمد آنتی‌ژن در گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است (۶). در بین گیاهانی که به‌عنوان بیوراکتور برای تولید واکسن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به توتون، سیب زمینی، گوجه فرنگی، ذرت، برنج، موز، سیب، کاهو و... اشاره نمود. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک از این گیاهان برای تولید انواع واکسن‌های باکتریایی، ویروسی، انگلی و سیستم ایمنی استفاده شده است (۴). در اغلب این گیاهان آنتی‌ژن‌ها به‌طور هدفمند در بافت‌های خوراکی بیان شده اند. انتخاب نوع پیش‌بر در بیان هدفمند و بالای آنتی‌ژن در بافت‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). انتخاب پیش‌بر در میزان رونویسی و بیان تراژن موثر بوده و علاوه بر آن بر مرحله بیان، و محل بیان (نوع بافت) هم تاثیر دارد. پیش‌بر عمومی ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) به دلیل قدرت بالا و بیان دایمی کاربرد زیادی در روش‌های مهندسی ژنتیک دارد. اگرچه بیان بالای یک پروتئین نوترکیب از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد ولی بیان پروتئین در بافت‌های غیرهدف گیاهان از نظر کاربردی چندان مطلوب نیست. بنابراین انتخاب پیش‌بری با کارایی بالا و همچنین بیان هدفمند در بافت‌ها می‌تواند در کارایی تولید واکسن‌های نوترکیب در سیستم‌های گیاهی بسیار موثر باشد (۱۶ و ۱۷).

سیب زمینی به‌عنوان یکی از گیاهانی است که در تولید واکسن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفته است (۳ و ۵ و ۱۸). انتخاب پیش‌بر مناسب برای بیان آنتی‌ژن در غده‌های خوراکی گیاه سیب‌زمینی می‌تواند در تولید واکسن بسیار کارآمد باشد. پاتاتین یکی از پروتئین‌های مهم ذخیره‌ای در غده‌های سیب‌زمینی است. پیش‌بر پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذرها و اندام‌های تولید مثلی رویشی (مانند غده‌ها) گیاهان، پیش‌برهای قدرتمندی هستند که باعث سنتز فراوان پروتئین مربوط در آن بافت یا اندام خاص می‌شوند (۱۹ و ۲۰). ژن‌های رمز کننده پروتئین پاتاتین به‌دو دسته تقسیم می‌شوند: دسته اول (Class I) آن‌هایی هستند که در غده‌های در حال تشکیل بیان می‌شوند. بیان این دسته از ژن‌های پاتاتین در برگ‌ها هم توسط سوکروز القا می‌شود. دسته دوم ژن‌های پاتاتین (Class II) نه تنها در غده‌ها بلکه در ریشه‌ها هم بیان می‌شوند. بیان این دسته از ژن‌ها توسط سوکروز القا نمی‌شود (۲۰). بنابراین، استفاده از پیش‌بر ژن‌های پاتاتین دسته اول (Class I) می‌تواند در بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در غده‌ها موثر باشد.

قبل از انتقال دایمی یک تراژن به گیاه ارزیابی اجزای سازه ژنی و کارایی بیان آن می‌تواند شانس موفقیت تولید گیاه تراریخت و در نتیجه تولید محصول نهایی (واکسن)

را افزایش دهد. بدین منظور از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که معمول‌ترین آن‌ها استفاده از بیان موقت با روش اگروانیفیلتریشن است. از این روش برای آنالیز کارکردی ژن‌ها و پیش‌برهای مختلف در زمان کوتاه استفاده می‌شود (۲۱-۲۴). اگروانیفیلتریشن روشی بسیار ساده و ارزان است و با استفاده از آن می‌توان فعالیت ژن را در بافت‌های گیاهان مختلف غربالگری کرد (۲۵).

در این پژوهش کارایی پیش‌براختصاصی غده سیب زمینی (پاتاتین- Pat1) در مقایسه با پیش‌بر دایمی CaMV35S با بیان زیرواحد کوچک آنتی‌ژن هپاتیت ب HBsAg در برگ و غده‌های گیاه سیب زمینی با استفاده از روش اگروانیفیلتریشن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

همسانه‌سازی پیشبر Pat: جهت جداسازی پیشبر اختصاصی پاتاتین (Pat1) از گیاه سیب‌زمینی (رقم مارفونا)، ابتدا غده‌های گیاه سیب‌زمینی در شرایط گلخانه کشت شدند. از نمونه‌های برگی برای استخراج DNA ژنومی با روش اصلاح شده دلاپورتا استفاده شد (۲۶).

برای جدا کردن پیش‌بر Pat1 از DNA استخراج شده از واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) با استفاده از آنزیمPfu پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی (F-Pat1: 5′-cggaagcttgagtctagaaatcataatgtt-3′; R-Pat1: 5′-cgcggatccttttgttggtgctttgagcatataac-3′) استفاده شد. شرایط و چرخه‌های PCR عبارت بودند از : دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه [۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ، ۱ دقیقه] و دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه. آغازگرها بر اساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI با شماره دسترسی A0825.1 و با استفاده از نرم افزار Oligo نسخه ۶ طراحی شد.

این پیش‌بر بعد از جداسازی و توالی یابی و تایید نهایی با استفاده از آنزیم‌های برشی HindIII و BamHI بریده شده و جایگزین پیش‌بر CaMV35 در ناقل دوگانه pBI121 شدند. سازه حاصل pBI-Pat1-Gus نامیده شد.

سنتز توالی اختصاصی HBsAg برای سیب زمینی و ساخت سازه های pBI-Pat-HBP و pBI-35S-HBP

توالی نوکلئوتیدی آنتی‌ژن HBsAg از سایت NCBI برای سیب‌زمینی با استفاده از نرم افزار OPTIMIZER (http://genomes.urv.es/OPTIMIZER) بهینه‌سازی کدنی شد. به‌منظور افزایش کارایی بیان ژن و هدف‌گیری در شبکه اندوپلاسمی توالی قطعات KOZAK و SEKDEL به آن اضافه شد. همچنین جایگاه‌های اختصاصی برای آنزیم‌های BamHI و SacI در ابتدا و انتهای توالی اضافه شد (شکل ۱). توالی‌های طراحی شده توسط شرکت Millgene فرانسه سنتز شده و به‌صورت کلون‌شده در وکتورهای pMAT تحویل گرفته شد (شکل ۱).

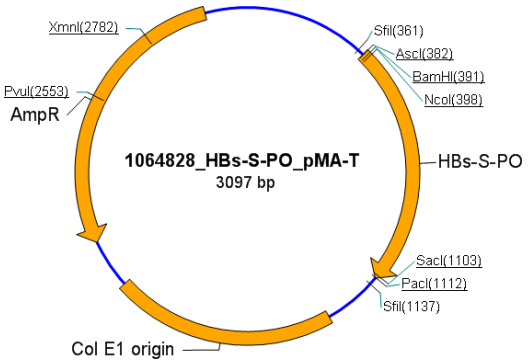
به‌منظور ساخت سازه‌های ژنی pBI-PatHBP و pBI-35SHBP که به‌ترتیب در آن‌ها ژن بهینه‌سازی شده HBsAg برای سیب‌زمینی تحت کنترل پیش‌بر اختصاصی غده (Pat1) و پیش‌بر دایمی CaMV35S قرار دارند ژن HBsAg جایگزین ژن gus در سازه‌های pBI-35S-Gus (pBI121) و pBI-Pat1-Gus شد. بدین‌منظور ژن gus توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از سازه‌های فوق خارج و سپس قطعه ۷۲۰ جفت بازی HBP در همان جایگاه برشی وارد شد. سازه‌ها با روش هضم اختصاصی با آنزیم‌های برشی و همچنین PCR تایید شدند. سازه‌های نهایی با استفاده از روش انجماد-ذوب به اگروباکتریوم *A. tumefacience* LBA4404 منتقل شدند.

HBs-PO

*Bam*HI *Kozak*

gcgga tcc **acc atg** gaa aat att act tct gga ttt ctt gga cct ctt ctt gtt ttg caa gct gga tct ttt ttg ttg act aga atc ctt act att cca caa agt ctt gat tcg tgg tgg act tct ctt aat ttt ctt gga gga act act gtt tgt ctt gga caa aat tcg caa tct cca act tct aat cat tct cca act tct tgt cct cca act tgt cct gga 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 gga atg ttg cct 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 cct tct tgt tgt tgt act aaa cct tcg gat gga aat tgt act tgt att cct 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 cct act gtt tgg ctt tct gtt att tgg atg atg tgg tat tgg gga cca agt ctt tat agt att ttg agt cct 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

*Sac*I *SEKDE*



شکل ۱: توالی نوکلئوتیدی اصلاح‌شده آنتی‌ژن HBsAg برای گیاه سیب‌زمینی (HBs-PO) (بالا) و ناقل پلاسمیدی حاوی قطعه سنتز شده (پایین)

ارزیابی بیان موقت و سنجش آنتی ژن HBsAg

برگ‌ها و غده‌های گیاه سیب‌زمینی به قطعات کوچک ۱ سانتی‌متری برش خورده و در سوسپانسیون اگروباکتریوم حاوی سازه‌های pBI-Pat-HBP و pBI-35S-HBP به‌طور جداگانه غوطه‌ور شدند. علاوه بر محیط LB از محیط Infection (محیط MS ½) هم به‌عنوان محیط سوسپانسیون باکتریایی برای تیمار استفاده شد. بدین‌منظور کشت شبانه باکتریایی در محیط LB با استفاده از سانتریفوژ رسوب داده شد و سپس در حجم برابری از محیط MS ½ حل شد. به‌منظور نفوذ بهتر باکتری‌ها در نمونه‌های گیاهی از دسیکاتور تحت خلا به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. این کار ۳ بار انجام شد. نمونه‌ها به ظروف پتری حاوی سه لایه کاغذ صافی استریل منتقل شده و به‌مدت ۴ روز در تاریکی قرار گرفتند.

نمونه‌های تیمار شده لیوفیلایز شده و سپس در بافر استخراج پروتئین (0.05M NaHPO4 PH 7.5, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, 0.3% Tween 20, and 4mM PMSF) ساییده شده و به‌مدت یک شب در۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. روشناور حاوی پروتئین جهت اندازه‌گیری مقدار آنتی‌ژن HBsAg در آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفت. آزمون الایزا با استفاده از کیت HBsAg ONE شرکت DIA-PRO ایتالیا و دستورالعمل مربوط انجام شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار تولید آنتی‌ژن HBsAg براساس کنترل مثبت و منفی کیت الایزا محاسبه شد.

آنالیز آماری

آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS صورت گرفت. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

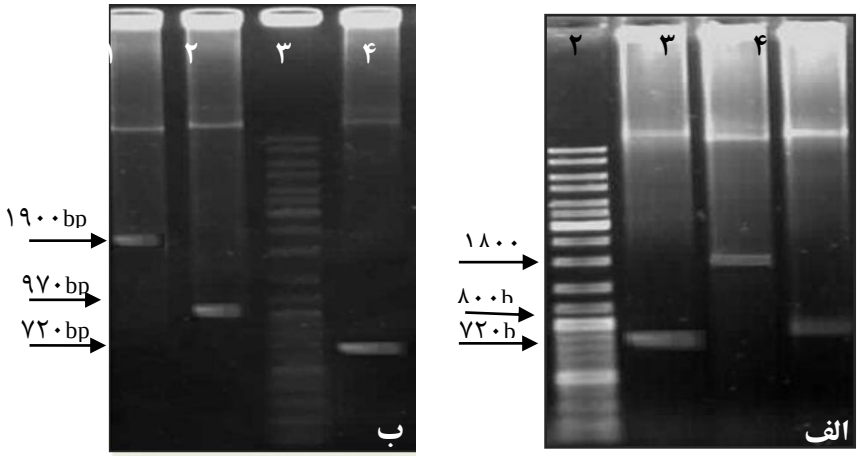
نتایج

یکی از مزایای سیستم بیان موقت اگروایفیلتریشن در مقایسه با تولید گیاهان تراریخت، بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب در آنها است (۲۷). این امر به‌دلیل حذف "اثرات مکانی" در سیستم بیان موقت است چون در این سیستم تراژن به‌طور تصادفی وارد مناطقی از ژنوم هسته‌ای که دارای فعالیت‌های رونویسی نامعلومی هستند نمی‌شود. زمان کوتاهتر و سطوح بالای انباشت پروتئین‌های نوترکیب، سیستم بیان موقت را پلتفرمی برای تولید ترکیبات دارویی در گیاهان تبدیل کرده است. علاوه برآن سیستم‌های بیان موقت روشی سریع و ارزان برای بررسی کارایی اجزای ژن‌ها به‌حساب می‌آیند (۲۷).

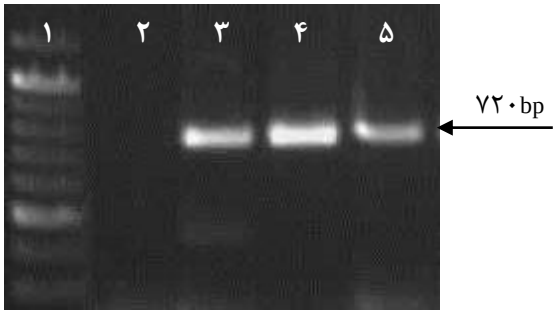
دستیابی به بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت به‌عوامل مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به ترجیح کدونی، بیان پایدار و کارامد ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این وجود، چگونگی، زمان و محل بیان ژن به‌وسیله مجموعه‌ای از مکانیسم‌های کنترلی تنظیم می‌شود. پیش‌برها به‌عنوان یکی از عوامل تنظیمی اصلی نقش مهمی در بیان ژن دارند. بنابراین، قبل از انتقال دایمی یک سازه ژنی به گیاهان، بررسی کارایی اجزای سازه به‌ویژه پیش‌برها و ژن هدف بسیار اهمیت دارد. در این مطالعه کارایی پیش‌بر اختصاصی غده پاتاتین و ژن اصلاح کدون شده HBsAg برای سیب‌زمینی در سیستم بیان موقت مورد بررسی قرار گرفته است.

سازه‌های ژنی

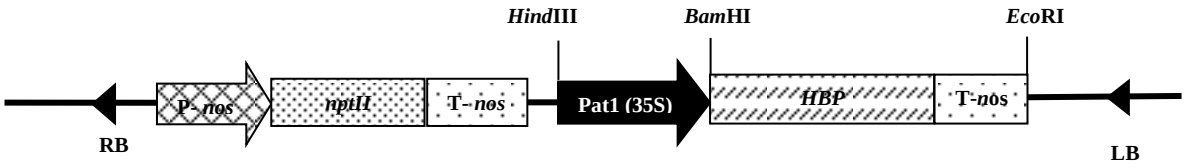
ژن سنتزی اصلاح شده *HBsAg* برای سیب زمینی با هضم توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I از پلاسمیدهای pMA-T حاوی HBsAg (شکل ۱) جدا شده و در جایگاه‌های برشی مناسب خود در ناقل های دوگانه pBI121، pBIPat1GUS جایگزین ژن *Gus* شدند. به‌منظور درستی همسانه‌سازی، سازه‌های جدید با روش‌های هضم آنزیمی و PCR با پرایمرهای اختصاصی تایید شدند (شکل ۲ و ۳). سازه‌های جدید به‌ترتیب pBI35S-HBP و pBIPat-HBP نامیده شدند (شکل ۴).



شکل ۲: تائید سازه pBI-35S-HBT (الف) و pBI-Pat1-HBP (ب) با هضم آنزیمی. ۱ (الف) و ۳ (ب) نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (GeneRuler DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)، ۲ (الف) و ٤ (ب) هضم آنزیمی با دو آنزیم BamHI و SacI ؛ ۳ (الف) و ۱ (ب) هضم آنزیمی سازه با دو آنزیم HindIII و EcoRI، ٤ (الف) و ۲ (ب)- هضم آنزیمی با دو آنزیم HindIII و BamHI .



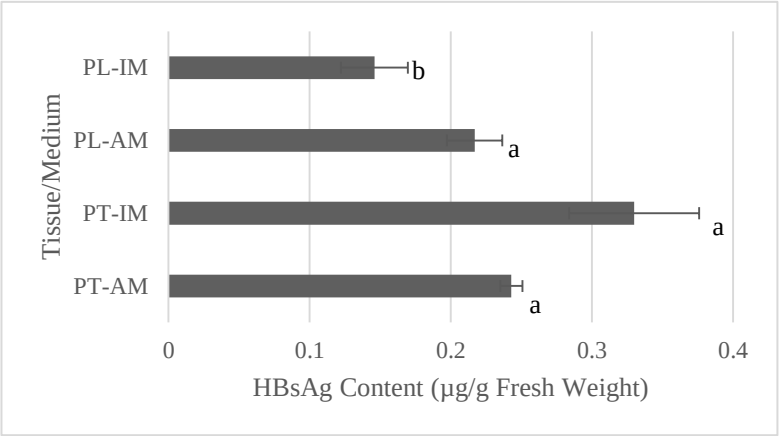
شکل ۳: تائید سازه‌های پلاسمیدی با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HBsAg. ۱- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (GeneRuler DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)، ۲- کنترل منفی آب، ۳- کنترل مثبت (سازه pMA-T). ٤- pBI-35S-HBP ٥- pBI-Pat1-HBP



شکل ٤: نقشه سازه‌های pBI-Pat-HBP و pBI-35S-HBP. RB و LB- بترتیب ناحیه سرحد مرزی راست و چپ، P-nos- پیشبر نئوپالین سنتاز، nptII- ژن مقاومت به کانامایسین، T-nos- پایانبر نئوپالین سنتاز، Pat1 و 35S به‌ترتیب پیشبر Patatin و CaMV35S، HBP – توالی آنتی ژن HBsAg و HindIII، BamHI و EcoRI آنزیم‌های برشی.

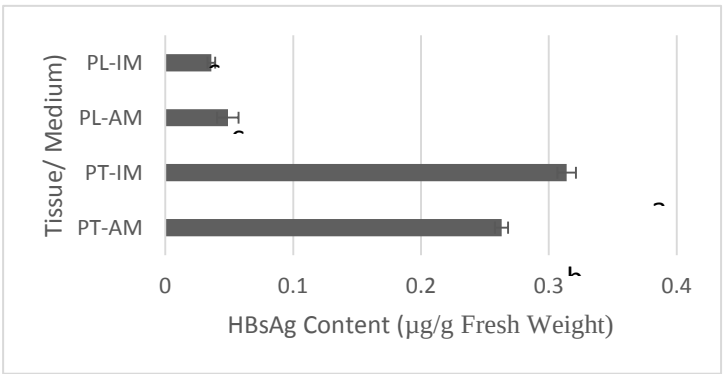
بیان HBsAg

سنجش میزان بیان آنتی‌ژن پروتئینی HBsAg در بافت‌های برگی و غده‌ای سیب زمینی نشان داد که بیان این آنتی ژن تحت کنترل پیشبر CaMV35S در همه بافت‌های برگی و غده‌ای اتفاق می‌افتد (شکل ۵) و از این جهت تفاوت معنی‌داری بین بافت‌های مختلف مشاهده نمی‌شود. میزان بیان آنتی‌ژن در بافت‌های غده در دو محیط تلقیح مختلف یکسان است که این وضعیت در برگ‌ها هم قابل مشاهده بود. با توجه به غیر اختصاصی بودن پیش‌بر CaMV35 این نتیجه دور از انتظار نیست. پیش‌بر CaMV35S یک پیشبر دایمی است که ژن‌های تحت کنترل آن در همه بافت‌ها و در همه شرایط بیان می‌شوند (۲۸).



شکل ۵: میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg تحت کنترل پیشبر CaMV35s در سازه ژنی pBI-35S-HBP با استفاده از اگروایفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف. PT- غده سیب زمینی، PL- برگ سیب زمینی. AM- محیط تلقیح اگروباکتریوم، IM، محیط تلقیح آلوده‌سازی. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

بررسی بیان آنتی‌ژن واکسنی HBsAg تحت کنترل پیش‌بر اختصاصی غده پاتاتین نشان داد که این پیش‌بر باعث بیان آنتی‌ژن در غده‌های سیب زمینی می‌شود (شکل ۶). کارایی بیان این پیشبر مشابه پیشبر عمومی CaMV35S است چون میزان بیان آنتی‌ژن توسط هر دو پیش‌بر حدود ۳ میکروگرم/گرم وزن تر غده‌ها است. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود پیش‌بر پاتاتین با وجود اختصاصی بودن، بیان آنتی ژن HBsAg را در برگ‌های گیاهان سیب‌زمینی هم القا می‌نماید، هر چند میزان بیان در برگ‌ها بسیارکمتر از غده‌ها است. براساس گزارش‌های موجود پیش‌بر پاتاتین کلاس I به‌عنوان یک پیش‌بر اختصاصی غده شناخته شده است اما در سایر اندام‌های گیاه سیب زمینی مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها هم تا حدی باعث بیان ژن‌ها می‌شود (۲۹-۳۱). از طرف دیگر گزارش شده است که ساکارز باعث القای پیش‌بر پاتاتین نوع I در برگ‌ها می‌شود (۲۰).



شکل ٦: میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg تحت کنترل پیشبر Pat1 در سازه ژنی pBI-Pat1-HBP با استفاده از اگروایفیلتریشن در بافت‌ها و محیط‌های تلقیح مختلف.PT – غده سیب زمینی،PL- برگ سیب زمینی، AM- محیط تلقیح اگروباکتریوم، IM، محیط تلقیح آلوده‌سازی. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داربودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد است.

بحث

بعد از گیاه توتون، سیب‌زمینی به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب برای تولید واکسن‌های خوراکی شناخته شده است (۳۲). در سال ۱۹۹۵ ژن رمز کننده HBsAg تحت کنترل پیش‌بر CaMV35S به گیاهان سیب‌زمینی منتقل شد که در این مطالعه میزان بیان آنتی‌ژن در ریشه‌های گیاه ۵-۱۰ برابر بیش از بافت‌های برگی بود. بعد از آن زیر واحدهای M و S آنتی ژن HBsAg هم به‌طور موفقیت آمیزی به سیب‌زمینی انتقال یافت (۳۳). در تحقیقی دیگر Richter و همکاران (۳۴) توانستند با انتقال آنتی‌ژن HBsAg به گیاه سیب زمینی میزان تولید آن را به حدود ۱/۱ میکروگرم/گرم وزن تر غده برسانند. اخیرا Rukavtsova و همکاران (۳) هم تولید آنتی‌ژن HBsAg با استفاده پیش‌بر CaMV35S را در غده‌های سیب‌زمینی تراریخت تا حدود ۱ میکروگرم/گرم وزن تر گزارش کرده‌اند.

پیش‌بر پاتاتین (Pat1) برای بیان هدفمند ژن سنتز اکسین (tms1) و ژن ترابرنده سوکروز OsSUT برای القای تولید غده در گیاهان سیب‌زمینی به‌کار گرفته شده است (۳۱ و ۳۵). از این پیش‌بر برای تولید کارتنوئید (۳۶)، تولید سرم آلبومین انسانی (۳۷)، تولید اریتروپویتین (۱)، تولید آنتی ژن HBsAg (۱۹ و ۳۴ و ۳۸) و تولید واکسن اسهال (LTB) (۳۹) در غده‌های سیب‌زمینی هم استفاده شده است.

بیان آنتی‌ژن HBsAg در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی تحت کنترل پیش‌برPat1 نشان داده است که مقدار این آنتی ژن از ۰/۲۵ تا حدود ۱ میکروگرم/گرم وزن تر رسیده است و از این نظر مشابه پیش‌بر CaMV35S است (۱۹).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر هم میزان بیان آنتی‌ژن HBsAg در سیستم بیان موقت در گیاه سیب‌زمینی حدود ۰/۳۲ میکروگرم/ گرم وزن تر گزارش شد که با توجه به روش و سیستم بیان موقت به‌کار رفته در محدوده مقدار گزارش شده توسط سایر محققان است. بدیهی است با بهینه‌سازی روش انتقال موقت بتوان میزان بیان آن را افزایش داد. نتایج این پژوهش کارایی سازه ژنی در بیان هدفمند آنتی‌ژن HBsAg تحت کنترل پیش‌بر Pat1 را نشان می‌دهد. با انتقال دایمی این سازه ژنی به گیاهان سیب‌زمینی می‌توان گیاهان تراریختی ایجاد کرد که قادر به تولید واکسن هپاتیت ب در خود هستند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پروژه شماره ۷-۰۵-۰۵-۹۰۰۸ پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشگاه به‌جهت فراهم کردن امکانات و تجهیزات لازم اعلام می‌دارند.

منابع

1. Desai PN, Padh H. Expression of erythropoietin in Indian tetraploid potato variety. F1000Research 2012, 1:26 Last updated: 27 DEC. doi: 10.3410/f1000research.2012; 1(6): 26.v1

2. Ledl K, Luthar Z. Production of vaccines for treatment of infectious diseases by transgenic plants. Acta agric Slov. 2016; 107: 191- 217.

3. Rukavtsova EB, Rudenko NV, Puchko EN, Zakharchenko NS, et al. Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety. J Biotechnol. 2015; 10(203): 84-88.

4. Laere E, Ling APK, Wong YP, Koh RY, et al. Plant-Based Vaccines: Production and Challenges. J Bot. Volume 2016, Article ID 4928637, 11 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2016/4928637.

5. Takeyama N, Kiyono H, Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent

advances in technology and clinical trials. biopharmaceuticals. Curr Opin Plant Biol. 2004; 7(2): 152-8.

17. Stoger E, Ma JK-C, Fischer R, Christou P. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Curr Opin Biotechnol. 2005; 16(2): 167-73.

18. Kumar BV, Raja TK, Wani MR, Sheikh SA, et al. Transgenic plants as green factories for vaccine production. Afr J Biotechnol. 2013; 12: 6147-6158.

19. Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, et al. Expression and Characterization of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Potato Plants. Biochem. (Moscow), 2004; 69(10): 1158-1164.

20. Naumkina EM, Bolyakina YP, Romanov GA. Organ-Specificity and Inducibility of Patatin Class I Promoter from Potato in Transgenic Arabidopsis Plants. Russ J Plant Physiol., 2007; 54(3): 350-359.

21. Figueiredo J, Ro¨mer P, Lahaye T, Graham J, et al. Agrobacterium-mediated transient expression in citrus leaves: a rapid tool for gene expression and functional gene assay. Plant Cell Rep. 2011; 30(7): 1339–1345.

22. Bertazzon N, Raiola A, Castiglioni C, Gardiman M, et al. Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference. Plant Cell Rep. 2012; 31(1): 133–143.

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

24. Leckie B, Neal Stewart C. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. Plant Cell Rep. 2011; 30(3): 325–334.

25. Faizal A, Geelen D. Agroinfiltration of intact leaves as a method for the transient and stable transformation of saponin producing Maesa lanceolata. Plant Cell Rep. 2012; 31(8): 1517-26.

Ther Adv Vaccines. 2015; 3(5-6): 139- 154.

6. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. Biotechnol Adv. 2009; 27(4): 449-467.

7. Shoseyov O, Posen Y, Grynspan F. Human collagen produced in plants, More than just another molecule. Bioengineered. 2014; 5(1): 49–52.

8. Hennegan K, Yang D, Nguyen D, Wu L, et al. Improvement of human lysozyme expression in transgenic rice grain by combining wheat (Triticum aestivum) puroindoline b and rice (Oryza sativa) Gt1 promoters and signal peptides. Transgenic Res. 2005; 14: 583–592.

9. Yang D, Guo F, Liu B, Huang N, et al. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. Planta. 2002; 216(4): 597–603.

10. Ma JK-C, Drake PMW, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat Rev Genet. 2003; 4(10): 794-805.

11. Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, et al. Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. EMBO Rep. 2005; 6(7): 593-9.

12. Koprowski H. Vaccines and sera through plant biotechnology. Vaccine. 2005; 23(15): 1757-63.

13. Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. Edible vaccines: current status and future. Ind J Med Microbiol. 2007; 25(2): 93-102.

14. Mishra N, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, et al. Edible vaccines: a new approach to oral immunization. Ind J Biotechnol, 2008; 7: 283-94.

15. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2009; 32(2): 107-21.

16. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, et al. Plant-based production of

26. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA minipreparation: version II, Plant Mol Biol Rep. 1983; 1: 19-21.

27. Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, et al. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. Adv Tech Biol. Med., 2013; 1: doi:10.4172/atbm.1000103.

28. He ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ.) Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. Genetica. 2008; 133: 207-214.

29. Deryabin AN, Trunova TI, Dubinina IM, Burakhanova EA, et al. Chilling tolerance of potato plants transformed with a yeast-derived invertase gene under the control of the B33 patatin. Russ J Plant Physiol. 2003; 50(4): 449–454.

30. Romanov GA, Naumkina EM, Ashapkin VV, Vanyushin BF. Methylation of GCGG sites of the patatin promoter is organspecific and inversely correlates with its activity. Dokl Biochem Biophys. 2007; 417(1): 327-330.

31. Kolachevskaya OO, Alekseeva VV, Sergeeva LI, Rukavtsova EB, et al. Expression of auxin synthesis gene tms1 under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization in vitro. J Integr Plant Biol. 2015; 57(9): 734-44. doi: 10.1111/jipb.12314.

32. Guan ZJ, Guo B, Huo YI, Guan ZP, et al. Overview of expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Vaccine, 2010; 28(46): 7351-7362.

33. Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN. Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. Gene. 1997; 190(1): 107-11.

34. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nat Biotechnol.2000; 18:1167-71.

35. Sun A, Dai Y, Zhang X, Li C, et al. A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes OsSUT5Z and OsSUT2M. J Integr Plant Biol. 2011; 53(7): 586-595.

36. Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, et al. Metabolic Engineering of Potato Carotenoid Content through Tuber-Specific Overexpression of a Bacterial Mini-Pathway. PLoS ONE. 2007; 2(4): e350. doi:10.1371/journal.pone.0000350.

37. Farran I, S´anchez-Serrano JJ, Medina JF, Prieto J, et al. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. Transgenic Res. 2002; 11(4): 337-346.

38. Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, et al. Expression of the hepatitis B Surface S and preS2 antigens in tubers of Solanum tuberosum. Plant Cell Rep. 2004; 22: 925-30.

39. Lauterslager TGM, Florack DEA, van derWal TJ,Molthoff JW, et al. Oral immunization of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. Vaccine. 2001; 19(17-19): 2749-55.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2018; 9(1) *Original Article*

Targeted expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by tissue specific promoter Pat1 in potato tubers using transient expression system

Rahnama H. Ph.D.*, Helali L. M.Sc., Ahmadi N. M.Sc.

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* Email corresponding author: hrahnama@abrii.ac.ir

Received: 19 Dec. 2017 Accepted: 11 Sep. 2018

Abstract

Aim: In order to study the efficiency of the tuber specific promoter (Patatin1), the expression of the HBsAg antigen of the hepatitis B vaccine was evaluated using a transient expression method (AgroInfiltration) in the tubers and leaves of potato plants.

Material and Methods: A tuber specific promoter (Pat1) was isolated from the potato plant using a specific primer pairs by Polymerase Chain Reaction (PCR). It was cloned in the upstream of a synthetic optimized codon of the HBsAg gene in the binary plant vector pBI121. In order to compare the tissue specificity of Pat1, the HBsAg gene also was used under the control of a consultative CaMV35S promoter. The genetic constructs were transferred to the tubers and leaves of potato plants using the Agroinfiltration method. An HBsAg antigen content was measured using ELISA method.

Results: The level of HBsAg antigens in the leaves and tubers of potato plants indicated that Pat1 promoter specifically induced HBsAg high expression in the tuber tissues. Very low expression by the Pat1 promoter in the leaf tissues has been also reported and can be partly dependent on the presence of inducing factors in the inoculation media. However, the expression of HBsAg antigen occurs in both leaf and tuber tissues under the consultative promoter CaMV35S. The results showed that the codon optimized HBsAg gene for potato plant was expressed properly in plant tissues.

Conclusion: findings indicate that potato tuber specific promoter Pat1 can be used effectively to express the synthetic optimized HBsAg antigen in the transgenic potato plants.

Keywords: HbsAg, Hepatitis B, Potato, Transient expression, Tuber specific promoter Pat1