

انتقال ژن آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B به گیاه توتون

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

ماجده نیسی^۱، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی^{۲*}، سیروس قبادی^۳،حمید رجبی معماری^۴ و غزاله خاکسار^۵Majedeh Neisi¹, Badraddin Ebrahim Sayed Tabatabaei^{2*}, Cyrus Ghobadi³, Hamid Rajabi Memari⁴, Ghazaleh Khaksar⁵

۱- دانش آموخته ارشد بیوتکنولوژی ۲- استاد گروه بیوتکنولوژی ۳- استادیار گروه علوم باغبانی

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۴- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

۵- دانش آموخته دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

¹ MSc in Biotechnology, ² Prof, Department of Biotechnology,³ Assistance Prof, Department of Horticulture,

Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴ Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran⁵ Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sayedt@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۴)

چکیده

یکی از شایع ترین آلودگی های ویروسی انسانی در سراسر جهان آلودگی ویروس هپاتیت B است. مؤثرترین شیوه برای کنترل و درمان این بیماری، تزریق واکسن می باشد، اما با توجه به گران بودن داروهای شیمیایی، تولید پروتئین نو ترکیب ویروس هپاتیت B به عنوان واکسن خوراکی در گیاهان طی چند سال گذشته با بیورآکتورهای مناسب برای تولید ارزان و فراوان اهمیت یافته است. بنابراین در این پژوهش سعی شده است که ژن HBsAg با کمترین هزینه به گیاه مدل توتون منتقل شود. بدین منظور ابتدا ناقل دوگانه pCAMBIA 1304 حاوی ژن HBsAg در باکتری *Escherichia coli* سویه JM107 و آگروباکتریوم سویه LBA4404 کلون و به روش قطعات برگی به گیاه توتون منتقل شد. باززایی ریزنمونه های تلقیح شده در محیط کشت انتخابی MS حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین و همچنین تنظیم کننده های رشد در غلظت های یک میلی گرم در لیتر BAP و یک دهم میلی گرم در لیتر NAA انجام گرفت. در آخر پس از رسیدن گیاهچه های غربال شده به ارتفاع ۱۵ سانتیمتر، به روش CTAB از گیاهان تراریخته احتمالی DNA استخراج شد و جهت شناسایی و تأیید حضور ژن با آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR و جهت بررسی بیان ژن واکنش RT-PCR انجام گرفت و بدین ترتیب حضور و بیان این ژن در گیاهان تراریخته توتون تأیید شد

واژه های کلیدی

آگروباکتریوم

تراریختی

توتون

ژن HBsAg

واکسن خوراکی

مقدمه

هپاتیت B یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی است و نزدیک به یک سوم جمعیت جهان در خطر ابتلا به این بیماری و ۳۵۰ میلیون نفر حامل این بیماری می‌باشند. سالیانه بیش از یک میلیون نفر در اثر ابتلا به سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma) ناشی از این ویروس می‌میرند (Rizzetto and Ciancio 2008). ویروس هپاتیت B حاوی ژنوم DNA می‌باشد و بر این اساس عضو خانواده هپادناویریده (Hepadnaviridae) طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس در ساختار خود دارای یک DNAی منحصر به فرد کروی و دو رشته‌ای، به طول ۳۲۰۰ جفت باز می‌باشد. در قسمت خارجی ویروس پوشش لیپوپروتئینی (آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg)) و در قسمت مرکزی آن هسته نوکلئوکسیدی (آنتی-ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg)) به طول ۲۷ نانومتر موجود است (Ram Maya et al. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B مهم‌ترین قسمت پوشش خارجی ویروس و محصول ژن S می‌باشد. این آنتی‌ژن از سه گلیکوپروتئین کوچک، متوسط و بزرگ به نام‌های SHBs، MHBs و LHBs ساخته شده و به ترتیب توسط ناحیه pre-s₂، pre-s₁ و s و ژن S کد می‌شوند (Sunil Kumar et al. 2007). این آنتی‌ژن از ویروس HBV پاسخ ایمنی مناسب علیه بیماری را القا و موجب تولید آنتی‌بادی خنثی‌ساز (Neutralizing) می‌شود (Guan et al. 2012).

یکی از مؤثرترین و پیشرفته‌ترین روش‌های کنترل عفونت هپاتیت B واکسیناسیون می‌باشد (Guan et al. 2012). اولین واکسن نوترکیب HBV در مخمر تولید شد که از لحاظ اقتصادی گران و مقرون به صرفه نبود (Marcondes and Hasen 2008). در سال‌های گذشته گیاهان تراریخته به عنوان بیورآکتور-های مناسب برای تولید ترکیبات دارویی و نوترکیب متنوعی از جمله آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌های نوترکیب، آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی، فاکتورهای رشد، واکسن‌های خوراکی و انواع زیادی از پروتئین‌های نوترکیب جانوری و انسانی به کار برده شده‌اند (Shereen et al. 2009). واکسن‌های مشتق شده از گیاهان تراریخته از نظر امنیت زیستی، پایداری، راندمان بالا و هزینه تولید نسبت به واکسن‌های نوترکیب مشتق شده از سلول‌های

پستانداران و مخمر توجه زیادی را در سراسر جهان به خود جلب کرده‌اند (Baesi et al. 2011; Li et al. 2011). به طور کلی استفاده از گیاهان تراریخته برای تولید واکسن مزیت‌های زیادی نسبت به سیستم‌های سنتی دارد. گیاهان فقط بخش مختص عفونت یا مسمومیت ذاتی را بیان کرده و بدین ترتیب باعث کاهش دیگر عکس‌العمل‌های مضر می‌شوند (Shereen et al. 2009)؛ گیاهان میزبان پاتوژن‌های انسانی و جانوری نمی‌باشند بنابراین در اثر تولید واکسن، خود آلوده نمی‌شوند (Shereen et al. 2009)؛ هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰-۲ درصد سیستم فرمتاسیون باکتری‌ها و ۱/۰ درصد کشت سلول-های پستانداران بوده (Giddings 2001) و همچنین قیمت تمام شده تولید آنتی‌بادی در گیاهان حدود ۱/۰- ۰/۰۰۱ تولید آن در سیستم‌های دیگر است (Daniell 2003).

با توجه به قیمت گزاف داروهای شیمیایی، نیاز به سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت مناسب، در مقیاس بالا و بیشترین فعالیت زیستی و ایمنی در اختیار بیماران قرار دهد، امری ضروری می‌باشد. بنابراین در حال حاضر مؤثرترین روش در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب، واکسن‌های خوراکی مشتق شده از گیاهان تراریخته است. تولید واکسن هپاتیت B در گیاه می‌تواند روش مناسبی برای پیشگیری از این بیماری باشد و از نظر اقتصادی، امکان‌پذیر و عملی است (Sunil Kumar et al. 2007). گزارش‌های زیادی از انتقال و بیان ژن HBsAg در گیاهان مختلف وجود دارد (Shereen et al. 2009; Li et al. 2011; Choi et al. 2011; Guan et al. 2012). ولی توتون به جهت سهولت در انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخته، تولید بذر فراوان و تولید انبوه زیست توده (بیوماس)، کاندید مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نسبت به گیاهان دیگر می‌باشد (Daniell 2003; Ahangarzadeh et al. 2012). این مطالعه به منظور بررسی امکان انتقال ژن HBsAg به صورت پایدار و بیان آن در گیاهان تراریخته توتون در جهت تولید ارزان و انبوه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 انتقال یافت (Sambrook and Russel 2001).

ارزیابی میزان حساسیت ریزنمونه‌های برگ‌ی به هیگرومایسین

جهت بررسی میزان حساسیت ریزنمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین، ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت MS دارای غلظت‌های مختلفی از این آنتی‌بیوتیک (صفر، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) کشت و به مدت یک ماه در اتاق رشد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از یک ماه اثر این آنتی بیوتیک بر باززایی و نکروز شدن ریزنمونه‌های برگ‌ی بررسی شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم جهت انتقال ناقل به گیاه بدین‌منظور، یک همسانه از باکتری *A.tumefaciens* حاوی ناقل مورد مطالعه به محیط‌کشت LB مایع دارای 50 mg l^{-1} استرپتومایسین و 100 mg l^{-1} کانامایسین منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد روی شیکر (۱۸۰ دور در دقیقه) نگهداری شد تا باکتری به میزان مناسبی از رشد برسد. سپس جهت دست‌یابی به غلظت مناسبی از باکتری (0.8×10^8 - 0.6×10^8 OD₆₀₀)، باکتری رشد یافته به محیط‌کشت LB مایع جدید منتقل شد. پس از رسیدن باکتری به OD مناسب، لوله‌های حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در 6000 g و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. با حذف فاز رویی، سلول‌های ته‌نشین شده باکتری در محیط‌کشت MS مایع رقیق و حل شدند.

سویه‌های باکتری و ناقل‌های ژنی

در این پژوهش از دو باکتری *Escherichia coli* و *Agrobacterium tumefaciens* و ناقل بیانی pCambia1304 استفاده شد. از باکتری *E.coli* سویه JM107 به‌عنوان میزبان جهت نگهداری و تکثیر ناقل و از باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 و ناقل بیانی دوگانه pCambia1304 جهت انتقال ژن موردنظر و تراریختی گیاه توتون استفاده شد. این ناقل دارای نشانگر انتخابی کانامایسین جهت گزینش باکتریایی و نشانگر هیگرومایسین جهت گزینش گیاهان تراریخته می‌باشد (شکل ۱).

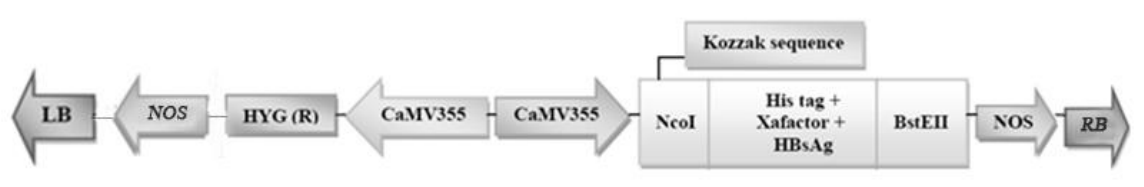
آغازگرهای اختصاصی ژن

به‌منظور شناسایی و تکثیر ژن مورد نظر از نوکلئوتیدهای ابتدا و انتهای توالی ژن *HBsAg*، آغازگرهای اختصاصی با رعایت شرایطی همچون عدم تشکیل حلقه، عدم تشکیل دو رشته‌ای و درصد GC توسط نرم افزار oligoanalyzer طراحی شد. توالی این آغازگرها عبارتند از: آغازگر رفت:

5'-ATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA-3' و آغازگر برگشت:
5'-TCATCCATATAGCTGAAAGCCAAACAG-3'

انتقال ناقل به باکتری *Agrobacterium tumefaciens*

در این مطالعه ناقل pCambia - HBsAg تحت کنترل پیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35s)، به روش انجماد و ذوب



شکل ۱- ناحیه T-DNA ناقل pCambia1304 حاوی ژن *HBsAg*

Figure 1. T-DNA Region of pCambia1304 containing *HBsAg* gene.

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

در این پژوهش، ابتدا بذره‌های توتون با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد به همراه یک قطره تویین ۸۰ (جهت افزایش چسبندگی سطحی مواد ضد عفونی کننده با بذور) به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، ضد عفونی شده و در محیط جوانه‌زنی MS بدون هورمون (Murashige and Skoog 1962) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از سه هفته برگ‌های جوان توتون به عنوان ریزنمونه برای انتقال ژن انتخاب شده و به مدت سه روز در محیط کشت MS دارای هورمون ($1 \text{ BAP} + 0.1 \text{ NAA}$) قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون اگروباکتریوم ($0.6 - OD_{600nm} = 0.8$) جهت انتقال ژن مورد نظر تلقیح شدند. برای مایه‌کوبی، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در پتری دیش‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اگروباکتریوم و در دمای اتاق قرار گرفته و پس از خشک شدن نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل به ظروف دارای محیط کشت ($1 \text{ BAP} + 1 \text{ mg l}^{-1} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$) منتقل و به مدت سه روز در این محیط در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده و دارای 500 mg l^{-1} سفوتاکسیم شسته و روی کاغذ صافی استریل خشک گردید. سپس، نمونه‌ها به محیط کشت انتخابی (محیط کشت $1 \text{ BAP} + 1 \text{ mg l}^{-1} + 0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ + سفوتاکسیم 500 mg l^{-1} + هیگرومایسین) منتقل و به مدت دو هفته در این محیط و در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول بر ثانیه بر مترمربع) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از باززایی ریزنمونه‌ها، جوانه‌های باززا شده از کالوس انتخاب شده و برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شد (Ahangarzadeh et al. 2012). در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان‌های حاوی پرلایت و پیت‌ماس انتقال یافته و برای انجام مطالعات بعدی نگهداری شدند.

تأیید حضور ژن HBsAg در گیاهان با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جهت شناسایی و تکثیر ژن HBsAg از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Murray and Thompson 1998) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن انجام گرفت. بدین منظور ابتدا واسرشت‌سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس واکنش در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی، اتصال و تکثیر هریک به مدت یک دقیقه به ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT-PCR

به منظور بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته احتمالی و غیرتراریخته، استخراج RNA توسط کیت (Rneasy Micro Kit شرکت QIAGEN، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت (شرکت Fermentas، آلمان) استفاده شد. سپس واکنش RT-PCR با همان شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) صورت گرفت.

نتایج

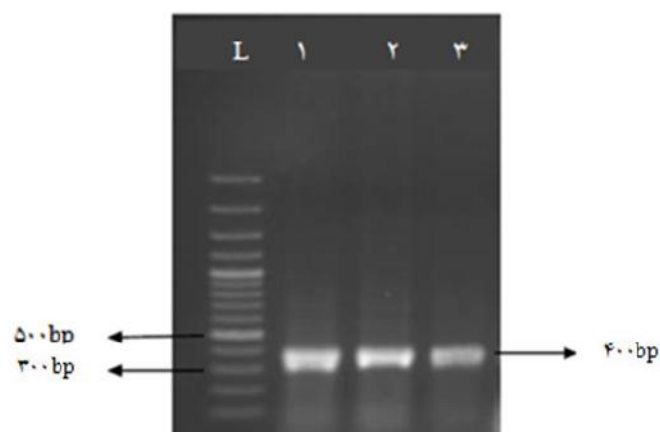
تأیید مولکولی حضور ناقل در اگروباکتریوم با انجام Colony PCR

کلونی‌های رشد یافته در محیط کشت LB حاوی کانامایسین و استرپتومایسین صحت انتقال را تأیید کرد. همچنین با انجام واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر و الگوی همسانه‌های حاوی ناقل pCambia 1304-HBsAg، قطعه DNA به طول تقریبی ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد. (شکل ۲).

شدند در حالی که در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر، نمونه‌ها قهوه‌ای و نکروز شده و باززا نشدند. بنابراین غلظت 15mg l^{-1} هیگرومایسین به عنوان سطح مؤثر انتخاب شد به گونه‌ای که نمونه‌هایی که پس از تلقیح در این غلظت باززا شدند به علت دریافت ژن مقاومت به هیگرومایسین که در ناحیه T-DNA و در مجاورت ژن *HBsAg* قرار دارد، به عنوان نمونه‌های تراریخته احتمالی انتخاب شدند (Ahangarzadeh et al. 2012).

انتقال ژن و باززایی ریزنمونه‌ها

پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون با آگروباکتریوم حاوی ژن مورد مطالعه و انتقال آن‌ها به محیط کشت انتخابی، برگ‌های توتون در حدود دو هفته، متورم و بزرگ شده و آثار کالوس‌زایی در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۳-الف). پس از دو هفته جوانه‌ها از کالوس، باززا شده (شکل ۳-ب) و سه هفته بعد، ریشه‌ها ظاهر شد (شکل ۳-ج). گیاهچه‌هایی با ارتفاع مناسب (۱۵ سانتیمتر) (شکل ۳-د)، به عنوان گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به خاک منتقل شدند (شکل ۳-ه).

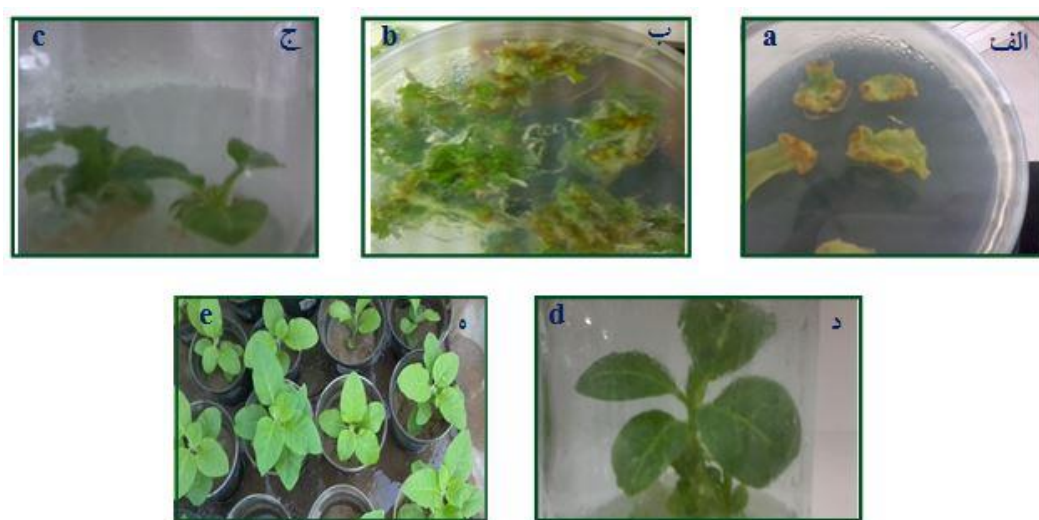


شکل ۲- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام واکنش Colony PCR با آغازگرهای *HB_R* و *HB_F*. L- نشانگر اندازه ۱۰۰ bp تا ۳- همسانه‌های آگروباکتریوم نو ترکیب

Figure 2- Confirmation of Cloning of *HBsAg* Gene in *A. tumefaciens* by Colony PCR Technique. L: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentase), Lane 1-3: Transformed Colonies.

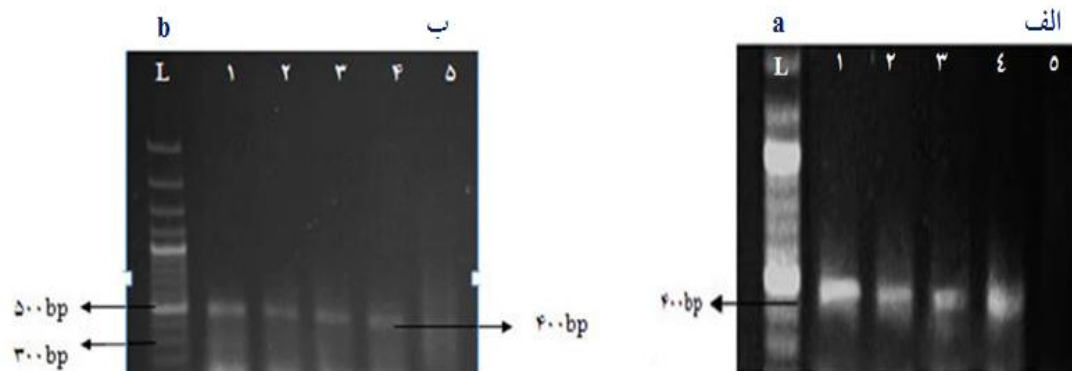
تعیین سطح مؤثر هیگرومایسین بر ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون

نتایج این بررسی نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین نمونه‌ها همچنان سبز مانده و باززا



شکل ۳- مراحل باززایی ریزنمونه‌های برگ‌ی توتون پس از تلقیح با آگروباکتریوم: الف- بزرگ و متورم شدن ریزنمونه‌های برگ‌ی و ظهور کالوس. ب- باززایی جوانه‌ها ۱۰ روز پس از کالوس‌زایی. ج- ریشه دار شدن جوانه‌ها در محیط کشت بدون هورمون. د- رسیدن گیاهچه‌ها به حد مناسبی از رشد. ه- انتقال گیاهچه‌ها به خاک.

Figure 3- Regeneration of tobacco explants following co-culture with *Agrobacterium*. a: callus formation, b: shoot formation (2 weeks old), c: root formation (4-6 weeks old), d: transgenic plantlets, e: plants were transferred to soil.



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام PCR (الف) و RT-PCR (ب) در گیاهان تراریخته توتون. L- نشانگر اندازه ۱۰۰bp، ۱- پلاسمید حاوی قطعه موردنظر، ۲ تا ۴- گیاهان توتون تراریخته، ۵- گیاه توتون غیرتراریخته

Figure 4- PCR and RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants. a: PCR, b: RT-PCR. L: TM 100 bp DNA Ladder (Fermentase), 1: Positive Control (pCAMBIA-HBsAg), 2-4: transgenic plants, 5: untransformed plant (negative control).

بیماری‌های کبدی بوده و شدت آن از فردی به فرد دیگر متغیر است (Ram Maya 2008).

زراعت مولکولی و تکنولوژی گیاه تراریخته در ابتدا به عنوان راهی جهت رسیدن به مقاومت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفت، اما ظرفیت بالای سلول‌های گیاهی برای تاخوردگی صحیح و سریع پروتئین‌های بیگانه با ساختارهای پیچیده و همچنین حفظ ساختار اصلی آن‌ها در گیاهان نشان داد که گیاهان دارای پتانسیل بالقوه‌ای جهت تولید بهینه و مقرون به صرفه پروتئین‌های نو ترکیب دارویی و صنعتی می‌باشند (Lopez et al. 2008). آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B تولید شده در گیاهان تراریخته از نظر صفات آنتی‌ژنی و فیزیکی شباهت بسیاری به ذرات HBsAg مشتق شده از سرم انسانی و مخمر نو ترکیبی دارد که تاکنون به عنوان واکسن استفاده شده‌اند (Mason et al. 1992).

ژن HBsAg در سیستم‌های گیاهی مختلفی از جمله گوجه‌فرنگی (Srinivas et al. 2008)، سیب زمینی (Richter et al. 2000; Shulga et al. 2004)، موز (Sunil Kumar et al. 2005)، هویج (Imani et al. 2002)، لوبین و کاهو (Kapusta et al. 1999) بیان شده است. در سال‌های گذشته نیز گزارش‌های بسیاری از های-پنگ و همکاران (۲۰۰۹)، شرین و همکاران (۲۰۰۹)، لی و همکاران (۲۰۱۱)، چوی و همکاران (۲۰۱۱) و گوان و همکاران (۲۰۱۲) وجود دارد که در آن‌ها انتقال و بیان ژن HBsAg

بررسی حضور ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش PCR

نتایج حاصل از تکثیر ژن مورد مطالعه با الگوی DNA حاصل از گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و غیرتراریخته و آغازگرهای اختصاصی ژن نشان داد که حداقل یک نسخه از ژن HBsAg در ژنوم گیاهان تراریخته وجود دارد. عدم مشاهده باند در گیاهان شاهد نیز این مطلب را تأیید کرد (شکل ۴-الف).

بررسی بیان ژن HBsAg در گیاهان تراریخته با انجام واکنش RT-PCR

طبق نتایج حاصل از واکنش RT-PCR و مشاهده قطعه‌ای با اندازه ۴۰۰ جفت باز، بیان ژن مورد مطالعه در گیاهان تراریخته تأیید شد (شکل ۴-ب). اما در گیاهان شاهد، عدم مشاهده تکثیر قطعه فوق بیانگر فقدان بیان ژن HBsAg در این گیاهان بود.

بحث

کارسینوم سلول کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است که علت حداقل ۷۵ درصد از این سرطان‌ها ویروس هپاتیت B (HBV) می‌باشد (Rizzetto and Ciancio 2008). این ویروس عامل اصلی

پیشبر CaMV 35S در گیاهان دو لپه انتخابی مناسب، قوی و سازنده بوده و باعث افزایش بیان ژن انتقال یافته در بخش‌های مختلف گیاه می‌شود به طوری که استفاده از این پیشبر در توتون می‌تواند میزان بیان را در مقایسه با پیشبرهای دیگر چندین برابر افزایش دهد (Sunil Kumar et al. 2003). همچنین از توالی کوزاک (Kozak sequence) جهت افزایش بیان ژن (Rajabi Memari et al. 2010)، از توالی His tag جهت سهولت شناسایی و تخلیص پروتئین موردنظر از سایر پروتئین‌ها در پژوهش‌های آنتی و از فاکتور هگزا (X) به منظور حذف توالی His tag بعد از تخلیص پروتئین، استفاده شد (Leelavathi and Reddy 2003).

در این مطالعه ریزنمونه‌های برگ توتون به طور موفقیت‌آمیزی توسط ناقل گیاهی بیانی pCAMBIA1304 و با واسطه‌گری آگروباکتریوم تراریخته شدند. حضور ژن *HBsAg* و بیان آن در گیاهان تراریخته نیز توسط بررسی‌های مولکولی PCR و RT-PCR تأیید شد. در گزارشاتی از گوان و همکاران، شرین و همکاران، باعث و همکاران، لی و همکاران و سرینیواس و همکاران نیز حضور ژن *HBsAg* به ترتیب در گیاهان تراریخته گیلاس، موز و گوجه فرنگی با انجام واکنش PCR تأیید شده است (Guan et al. 2012; Li et al. 2011; Srinivas et al. 2008; Baesi et al. 2011; Shereen et al. 2011). سرینیواس و همکاران نیز بیان این ژن را در گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی با RT-PCR تأیید کردند (Srinivas et al. 2008). اما براساس نتایج این پژوهش استفاده از ناقل فوق به‌تنهایی برای افزایش بیان ژن *HBsAg* و تولید پروتئین به‌عنوان واکسن خوراکی کافی نبوده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد در مطالعات آینده باید از توالی‌های افزایش‌دهنده در ناقل ژن موردنظر برای افزایش بیان و در نتیجه تولید انبوه پروتئین *HBsAg* استفاده کرد.

سلول‌های گیاه جینسنگ، موز، گوجه فرنگی، یونجه و گوجه-فرنگی مینیاتوری تأیید شده است (Hai-peng et al. 2009; Shereen et al. 2009; Li et al. 2011; Choi et al. 2011; Guan et al. 2012). علاوه بر این در گزارشی از های‌پنگ و همکاران (۲۰۰۹) و ریشتر و همکاران (۲۰۰۰)، *HBsAg* مشتق شده از گیاه جینسنگ و سیب زمینی تراریخته به طور موفقیت‌آمیزی در موش پاسخ ایمنی ایجاد کرد (Hai-peng et al. 2009; Richter et al. 2000). در گزارشی از کاپوستا و همکاران نیز پس از بیان این ژن در کاهو و لوبین و تغذیه موش از کالوس‌های تراریخته، آنتی‌بادی خاصی در آن‌ها حاصل گردید (Kapusta et al. 1999). اما آنچه حایز اهمیت است بیان متغیر ژن *HBsAg* در گیاهان تراریخته در شرایط محیطی متفاوت می‌باشد. بنابراین میزان تولید پروتئین فوق و در نتیجه پاسخ ایمنی پس از مصرف گیاهان تراریخته در موش و انسان، متفاوت است.

استفاده از سیستم گیاهی به‌عنوان بیوراکتورهای طبیعی، راه حل مناسبی برای تولید در مقیاس زیاد پروتئین *HBsAg* و تولید واکسن خوراکی می‌باشد. این پروژه با هدف گسترش زراعت مولکولی واکسن هپاتیت B (*HBsAg*) در گیاه توتون انجام پذیرفت. توتون گیاهی غیرعلوفه‌ای بوده و در مقایسه با گیاهان دیگر کشت بافت و باززایی آن راحت‌تر، انتقال ژن به آن ساده‌تر و نسبت به دستورزی ژنتیکی دارای انعطاف‌پذیری نسبی می‌باشد. با تکثیر توتون تراریخته در مدت زمان کوتاهی می‌توان محصول پروتئین نو ترکیب موردنظر را در سطح وسیع و به طور بهینه و ارزان تولید و وارد بازار کرد (Daniell 2003). از این رو در مطالعه حاضر از گیاه توتون و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 استفاده شد تا بر بیان ژن *HBsAg* افزوده شود. این ناقل دارای پیشبر CaMV 35S و ترمیناتور NOS می‌باشد.

منابع

- Ahangarzadeh Sh, Daneshvar MH, Rajabi-Memari H, Galehdari H, Alamisaied Kh. 2012. Cloning, Transformation and Expression of Human Interferon $\alpha 2b$ Gene in Tobacco Plant (*Nicotianatabacum* cv. *xanthi*). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 7:111-116.
- Baesi M, NabatiAhmadi D, Rajabi-Memari H, Siahpoosh MR, Abdollahi MR, Jaberolansar N. 2011. Cloning and Transformation of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Gene to Tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill.). Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 6:32-41.
- Choi JW, Park HS. 2011. Development of Transient Gene Expression System using Seedlings. Journal of Agricultural Science 45:193-199.
- Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 371-376.
- Giddings G. 2001. Transgenic plants as protein factories. Current Opinion in Biotechnology 12: 450-454.
- Guan ZJ, Guo B, Hao HY, Huo YL, Dai JK, Wei YH. 2012. Expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene in transgenic cherry tomato. African Journal of Biotechnology 11:7186-7192.
- Hai-peng YU, Yan XUE, Wei AN, Dan LIU, Shu-mei HAO, Jun SH. 2009. Expression of Hepatitis B Surface Antigen Gene in Ginseng Cells. Chemical Research in Chinese Universities 25: 695-698.
- Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich WH, Neumann KH. 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 Tissue And Organ Culture 71:157-164.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M. 1999. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. The Faseb Journal 13:1796-1799.
- Leelavathi S, Reddy VS. 2003. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Molecular Breeding 11:49-58.
- Li T, Sun JK, Lu ZH, Liu Q. 2011. Transformation of HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) Gene into Tomato Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 47: 69-77.
- Lopez A, Rosabal Y, Hernandez A, Gonzalez B, Rios J, Perez M, Clark Y, Boffill R, Fuentes A, Rodriguez L, Penton E, Falcon V, Menendez I, Rosa MCDL, Enriquez G. 2008. Expression of the Hepatitis A virus empty capsids in suspension cells and transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Biotechnologia Aplicada 25:42-46.
- Marcondes J, Hasen E. 2008. Transgenic lettuce carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. Brazilian Journal of Infectious Diseases 12:469-471.
- Mason SH, Lam DMK, Arntzen CJ. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. The Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 89:11745-11749.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 5:473-479.
- Murray MG, Thompson WF. 1998. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.
- Rajabi-Memari H, Ramanan RN, Ariff AB. 2010. Comparison of expression systems for the production of human interferon- $\alpha 2b$. Central European Journal of Biology 5:446-55.
- Ram-Maya M, Gershwin E, Shoenfeld Y. 2008. Hepatitis B Virus (HBV) and Autoimmune Disease. Clinical Reviews in Allergy and Immunology 34:85-102.
- Richter L, Thanavala JY, Arntzen CJ, Mason HS. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotechnology 18:1167-1171.
- Rizzetto M, Ciancio A. 2008. Chronic HBV-related liver disease. Molecular Aspects of Medicine 29:72-84.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 1448.
- Shereen FE, Roba MI, Bahieldin A, Sadik AS, Madkour MA. 2009. Expression of Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) gene in transgenic banana (*Musa* Sp.). Arab Journal of Biotechnology 12:291-302.
- Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, Melnikov VA, Bykov VA. 2004. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. Biochemical 69:1158-1164.
- Srinivas L, Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathia CJ, Bapat VA. 2008. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Biotechnology Reports 2:1-6.
- Sunil P, Sanjay Y, Vinod S. 2012. Pharmacognostical investigation and standardization of *capsicum annum* L. Roots. International Journal of Pharmacogn Phytochem 4:21-24.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KSN, Bapa VA. 2003. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. Science direct, Protein Expression and Purification 32:10-17.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. Planta 222:484 -493.

Transformation of Hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) gene into Tobacco plants

Majedeh Neisi¹, Badraddin Ebrahim Sayed Tabatabaei^{2*}, Cyrus Ghobadi³, Hamid Rajabi Memari⁴,
Ghazaleh Khaksar⁵

¹ MSc in Biotechnology, ² Prof, Department of Biotechnology, ³ Assistance Prof, Department of Horticulture,
Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴ Assistance. Prof, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University,
Ahvaz, Iran

⁵ Phd in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

*Corresponding Author, Email: sayedt@cc.iut.ac.ir

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most widespread viral infections of humans. An effective way to treat and prevent the disease is vaccination. Since production of conventional HBV vaccines is very expensive, use of transgenic plants as an alternative bioreactor has recently become of interest to many researchers. In this study, the *HBsAg* gene has been transferred to pepper plants (*Nicotiana tabacum*) through the leaf disk technique. The recombinant plant expression vector, pCAMBIA containing *HBsAg* was cloned into *E. coli* strain JM107 and was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Young tobacco leaves were used as explants and co-cultivated with *A. tumefaciens*. The transformants were regenerated on selection medium containing 1mg.l⁻¹ BAP, 0/1mg.l⁻¹ NAA, 500 mg.l⁻¹ cephotaxim and 15 mg.l⁻¹ hygromycin. After the growth of plantlets (about 15 cm), genomic DNA was extracted from putatively regenerated plants by the CTAB method. The presence of *HBsAg* gene in transgenic plants was detected using PCR analysis. Finally expression of *HBsAg* gene was tested via RT-PCR analysis.

Key Words

Agrobacterium, Edible Vaccine, Gene Transformation, *HBsAg* Gene, Transgenic Tobacco