

طراحی، ساخت و تأیید مولکولی سازه جفتی بیان کننده ژن *MaSp1* و بیان گذرای آن در الیاف

پنبه

مریم بهنام^۱، سید جواد داورپناه^{۲*} و رامین کریمیان^۲

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۷؛ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳؛ چاپ: ۱۳۹۵/۹/۳۰

^۱گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران شرق، ایران

^۲مرکز تحقیقات زیست‌فناوری کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: davarpanah@bmsu.ac.ir

چکیده. پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) از محصولات مهم زراعی دنیا است و افزایش کیفیت الیاف آن از اهمیت فراوانی در صنایع نساجی برخوردار است. رشته‌های تار عنکبوت محکم‌ترین و کشسان‌ترین الیاف شناخته شده در طبیعت است. بدین جهت سازه‌ای طراحی گردید تا با بیان ویژه پروتئین تار عنکبوت در الیاف پنبه منجر به افزایش کیفیت آن جهت ریسندگی شود. پس از سنتز سازه مورد نظر که ترکیبی از پروموتور ویژه بیان در فیبر پنبه RD22-like1، توالی کوزاک مانند در گیاهان و توالی مصنوعی براساس ژن *Lh Major ampullate Spidroin1 (MaSp1)* بود، پلاسمید مورد نظر توسط دو آنزیم *EcoRI* و *NheI* برش دوگانه داده شد و پس از استخراج قطعه مورد نظر بین جایگاه‌های برش *EcoRI* و *NheI* در وکتور باینری pCambia1304 همسانه‌سازی شد. پس از تراریختی *E. coli* DH5 α توسط این پلاسمید و استخراج آن، پلاسمید جدید pCSP نام‌گذاری شد. با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط پرایمر اختصاصی ژن مورد نظر و ژن مقاومت به هیگرومایسین و همچنین برش آنزیمی دوگانه صحت واکنش اتصال به تأیید رسید. پس از تراریختی *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط pCSP، صحت تراریختی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تأیید گردید. سپس تخمک پنبه رقم ورامین توسط آن ترایخته شد و با اثبات بیان ژن *MaSp1* در تخمک و الیاف پنبه در محیط در شیشه مشخص شد پروموتور GaRDL1 که متعلق به گونه دیگری از پنبه است به خوبی توان کنترل بیان ژن مورد نظر در الیاف پنبه را دارد و توالی ژن سنتزی بدون بهینه‌سازی کدون در الیاف پنبه قابل بیان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی. اسپایدروین، تخمک، تراریختی، برش دوگانه، پروموتور

Designing and cloning a *MaSp1*-based synthetic gene in binary vector for transient expression in cotton fiber

Maryam Behnam¹, Seyed Javad Davarpanah^{2*} & Ramin Karimian²

Received 08.11.2015/ Accepted 12.06.2016/ Published 20.12.2016

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Payam Nour University, Tehran, Iran

²Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondent author: davarpanah@bmsu.ac.ir

Abstract. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is an important crop in the world and increasing its fiber quality is very crucial for textile industries. Spider silk is the strongest and most elastic fiber ever known in the nature. Cotton is one of the main crops in the world and increasing its fiber quality is very important for textile industries. In this regard, a synthetic construct has been designed to offer spider silk quality to cotton fibers by fiber-specific expression of Major ampullate spidroin1 (*MaSp1*) gene under control of core sequence of GaRD22-like1 promoter. The synthetic construct was double digested by the *EcoRI* and *NheI* and sub-cloned in pCambia1304 binary vector. *E. coli* DH5 α was transformed using new plasmid namely pCSP. Ligation and intact backbone of plasmid was conformed using *MaSp1* and hygromycin re-sistance genes specific primers and finally with *EcoRI/NheI* double digestion. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 was transformed with pCSP to transform cotton ovules of Varamin cultivar. The expression of *MaSp1* in cotton ovules and fibers showed that this synthetic sequence had been successfully expressed under control of GaRDL1 core promoter and this construct without codon optimization could be used for cotton transformation and its fiber quality manipulation.

Keywords. spidroin, ovule, transformation, double digestion, promoter

مقدمه

نه تنها از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند بلکه یک مدل تجربی خوب برای بررسی طویل شدن یاخته‌های گیاهی و بیوسنتز دیواره یاخته

پنبه *Gossypium hirsutum* L. از مهم‌ترین محصولات زراعی فیبری در جهان است (Memon et al., 2010). رشته‌های پنبه

(ler et al., 2001). بزرگ‌ترین موتیف‌های پروتئینی رشته تار عنکبوت (Gly-Pro - Gly - Gly- x)_n است که می‌تواند موجب شکل‌گیری مارپیچی شود که در تعداد زیادی از صفحات بتا به صورت انتها به انتها منظم شده‌اند (Vollrath & Knight, 2001). پروتئین آمپولی بزرگ (*MaSp1*) یادآور خشت‌های کوپلمری است که از کشش پلی آلانین و دیگر (GGx) ها با (GPGxx) ها (x به صورت تپیک شامل پرولین، تریپتوفان یا لوسین می‌باشد) تشکیل شده‌است که با دو بخش بسیار حفظ شده غیرتکراری C و N ترمنال احاطه می‌شود (Motriuk-Smith et al., 2005; Rising et al., 2006).

تاکنون ژن اسپایدروین در گیاهانی چون انواع توتون و سیب زمینی بیان شده است و کیفیت و کمیت بیان پروتئین تار عنکبوت و خواص آن مورد بررسی قرار گرفته‌است (Hauptmann et al., 2013; Menassa et al., 2004; Piruzian et al., 2003; Scheller et al., 2001). تولید الیاف پنبه با کیفیت بهتر جهت ریسندگی با استفاده از خواص تار عنکبوت می‌تواند طرحی راه‌گشا در صنایع نساجی باشد. انتظار می‌رود الیاف، خواص تار عنکبوت از جمله کشسانی و تحمل تنش کششی را داشته باشند، در این صورت می‌توان به راحتی الیاف پنبه تراریخت را در ریسندگی و صنایع وابسته به کار برد. برخی پروتئین‌های فیبر منحصر به فردند و به طور مشابه در توسعه ویژگی‌های پنبه نقش دارند. شروع فیبر- شدن نیازمند ترجمه است و بنابراین فاکتورهای ترجمه در آغاز فیبری شدن نقش مهمی دارند (John & Crow, 1992). دو عامل ترجمه در پنبه به نام‌های (F/F1) GaMYB2/fiber factor و RD22-like1 GHHOX3 قادر به فعال‌نمودن پروموتور ویژه (Wang et al., 2004). جهت بهبود کیفیت (RDL1) می‌باشد (Wang et al., 2004). انتقال صفات مؤثر رشته تار عنکبوت به گیاه پنبه، بعد از سنتز پروتئین موردنظر از توالی *MaSp1* که مسؤول کشسانی و مقاومت تنشی بالای رشته‌های تار عنکبوت بیوه سیاه *Latrodectus hesperus* می‌باشد، پروموتور RDL1 که بیان ویژه در الیاف را در گونه *Gossypium arboreum* در یاخته‌های فیبر در حال نمو هدایت می‌کند (Wang et al., 2004) به ابتدای ژن مورد نظر افزوده شد. تا آنجا که می‌دانیم برای نخستین بار است که این توالی سنتزی جهت تراریختی پنبه مورد استفاده قرار گرفته‌است و تنها در یک مورد پروتئین تارکرم ابریشم جهت تغییر کیفیت الیاف، در

ای هستند و از آنجا که فیبر بیش از ۹۰٪ ارزش پنبه را فراهم می‌کند، کیفیت فیبر و توسعه ژنتیکی بازده فیبر، هدف مهمی در بیوتکنولوژی فیبر می‌باشد (Kim et al., 2002). کرک‌های گیاه پنبه بیشترین فیبرهای مورد استفاده در طبیعت هستند (Wang et al., 2004). بخش عمده کرک‌های گیاهی چندیاخته‌ای هستند اما پنبه کرک‌های تک‌یاخته‌ای که دارای اهمیت اقتصادی هستند را تولید می‌کند. بهبود فیبرهای پنبه به عنوان وسیله‌ای برای اندازه‌گیری بیوسنتز سلولز در طول اصلاح دیواره ثانویه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Arpat et al., 2004). پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی، پژوهشگران را قادر به تراریختی ژنتیکی گونه‌های زیادی از گیاهان کرده‌است (Umbeck et al., 1987) و گیاهان گوناگونی به طور موفقیت آمیزی برای تولید محصولات تراریخته مختلف و به عنوان سیستم ارزان و مؤثر برای تولید پروتئین‌های رشته‌ای چون کلاژن، الاستین و پروتئین تار عنکبوت استفاده شده‌اند (Gutiérrez et al., 2013; Foo & Kaplan, 2002; Scheller et al., 2001). در این راستا توسعه سریع فناوری تراریختی پنبه نه تنها روش ارزشمندی برای انتقال ژن‌های مفید به پنبه برای توسعه اهداف آگرونومیک مهم را فراهم می‌آورد، بلکه کمک شایانی در بررسی عمل و تنظیم ژنی می‌کند (Keshamma et al., 2008).

پروتئین‌های تار عنکبوت به عنوان یک ماده خام برای تولید فیبرها و تراشه‌ها و در تکنولوژی پزشکی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در صنایع نساجی قابلیت انعطاف و وزن کم پارچه‌ها با استفاده از این پروتئین حاصل می‌شود (Scheller et al., 2001). تار عنکبوت یک مدل عالی از پروتئین‌های فیبری زیستی است که ساختار سلسله مراتبی دارد و با پیوندهای ضعیف هیدروژنی در مرکز در تنظیم رفتار رشته در پاسخ به تغییرات طولی تار عنکبوت نقش دارد (Tarakanova & Buehler, 2012)، همچنین حاوی پروتئین‌های بسیار متفاوت است که دارای تنها سه موتیف می‌باشند که به صورت مشابه بارها تکرار می‌شوند و توسط غده‌های فلاژلیفرم ترشح می‌شوند که موجب شکل‌گیری یک جزء عمده از رشته‌های الاستیکی از مارپیچ‌های شبکه عنکبوتی می‌شود (Vollrath & Knight, 2001). تار عنکبوت حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای آمینه آلانین و گلايسین است (Schel-

الیاف پنبه بیان ویژه شده‌است (Li et al., 2009). براین اساس در این پژوهش سازه‌ای طراحی شد تا با بیان فیبر-ویژه اسپایدروین در الیاف پنبه بتواند کیفیت الیاف پنبه را بهبود بخشد.

مواد و روش‌ها

طراحی مجموعه ژنی و سنتز آن

سازه‌ای به طول ۷۲۲ نوکلئوتید طراحی شد که دارای بخش‌هایی به این شرح می‌باشد: جایگاه برش EcoRI در ابتدای ۵'، پروموتور ویژه بیان در فیبر پنبه *GaRDL1* که پروموتور هسته‌ای آن به طول ۳۰۲ نوکلئوتید جهت کنترل بیان فیبر ویژه پروتئین تار عنکبوت برگزیده‌شد (Wang et al., 2004)، جایگاه برش HindIII، توالی حفاظت‌شده کوزاک مانند در گیاهان، توالی برگزیده از ژن کدکننده پروتئین *Lh MaSp1* به طول ۳۹۰ نوکلئوتید که براساس توالی کامل ژن *Lh masp1* طراحی شد (Ayoub et al., 2007)، جایگاه برش NheI و جایگاه برش NcoI در انتهای ۳' (شکل ۱). توالی سازه طراحی شده در بانک ژن NCBI به شماره دسترسی KP026918 ذخیره شد و سنتز و همسانه‌سازی آن در وکتور pUC57 توسط شرکت ShineGene Molecular Biotech, Inc. کشور چین انجام شد.

پرایمرهای اختصاصی قطعه ژنی *MaSp1* و ژن مقاومت به هیگرومایسین به کمک نرم افزار Oligo7، BioEdit 7.0.5.3 و سایت NCBI طراحی شد و سپس توسط شرکت سیناکلون، ایران سنتز شد.

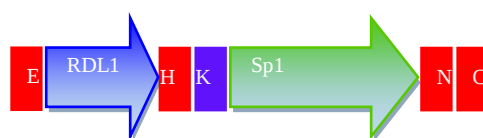
ساخت سازه بیانی با بازهمسانه‌سازی مجموعه ژنی از وکتور pUC57 به وکتور جفتی pCambia1304

پس از تراریختی *E.coli* DH5α توسط پلاسمید حاوی سازه سنتزی به وسیله دستگاه الکتروپوراتور Bio-Rad, Gene Pulser، Xcell™ modular electroporation systems، کلنی‌های تراریخت بر روی محیط جامد Lysogeny Broth (LB) حاوی ۵۰ mgL⁻¹ کانامایسین انجام گرفت. پس از کشت تک کلنی در طول شب در ۳ میلی لیتر محیط مایع LB حاوی ۵۰ mgL⁻¹ کانامایسین، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام گرفت (Maniatis et al., 1984). برای انجام فرآیند همسانه سازی ابتدا پلاسمید استخراج شده با دو آنزیم NheI و EcoRI برش داده شد. برای این کار پلاسمید تخلیص شده pUC57-

+MaSp1 با OD=۳/۵ به ۴۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر اضافه گردید. آنزیم‌های EcoRI و NheI هر کدام ۱ میکرولیتر نیز به ویال اضافه شده، حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس به مدت ۵ ساعت در ۳۷°C انکوبه گردید. سپس محصول هضم دوگانه آنزیمی در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X ران شد (۵۰ ولت، ۱ ساعت). پس از اتمام فرآیند الکتروفورز و جداسازی قطعه برش خورده شده به اندازه ۷۱۵bp از ژل، توسط کیت خالص سازی ژل (Bioneer) تخلیص شد. جهت تهیه وکتور خطی برای اتصال قطعه تخلیص شده Sp1، وکتور pCambia 1304 با OD=۳ توسط آنزیم‌های EcoRI و NheI برش داده شد. به میزان ۱۰-۹ ngμl⁻¹ از پلاسمید pCambia 1304 اضافه شد و آنزیم‌های EcoRI و NheI هر کدام ۱ میکرولیتر به ویال با حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر اضافه گردید و سپس به مدت ۵ ساعت در ۳۷°C نگهداری شد. محصول برش در ژل آگارز الکتروفورز ۰/۸٪ ران شد. پس از انجام فرآیند الکتروفورز قطعه ۶۳۷۹ bp از ژل برش داده شد و خالص سازی گردید.

فرایند واکنش اتصال

پس از برش و تخلیص قطعات موردنظر، فرآیند اتصال وکتور خطی شده pCambia1304 و سازه دارای Sp1 به شرح زیر انجام شد. نسبت وکتور خطی شده ۶۳۷۹ bp به قطعه ۷۱۵ bp Sp1، ۸/۹ بود. پس از تخلیص دو قطعه موردنظر از ژل برای انجام فرآیند چسباندن، غلظت دو قطعه تخلیص شده با دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) تعیین شد. غلظت وکتور خطی شده، ۲ ngμl⁻¹ بود. برای فرآیند اتصال میزان ۳۰ ng مورد نیاز بود که باتوجه به غلظت ذکر شده ۱۵ میکرولیتر از این وکتور خطی شده برای انجام فرآیند اتصال مورد نیاز بود. غلظت قطعه تخلیص شده Sp1، با دستگاه نانو دراپ ۵ ngμl⁻¹ تعیین شد. با توجه به نسبت وکتور به اینزرت که برابر با ۸/۹ بود، حجم مورد نیاز Sp1 ۰/۷ میکرولیتر محاسبه گردید. مقادیر محاسبه شده به ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۵°C انکوبه شد. سپس آنزیم T4 لیگاز به میزان ۰/۵ میکرولیتر و بافر اتصال ۱۰x به ویال حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی محلول واکنش افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۲°C نگهداری شد. برای انجام فرآیند نهایی، واکنش اتصال یک شب در دمای ۹°C-



شکل ۱- ساختار سازه سنتزی دارای ژن مصنوعی اسپایدرین. (E: جایگاه برش EcoRI در ابتدای ۵'، RDL1: پروموتور ویژه بیان در فیبر پنبه *MaSp1*، H: جایگاه برش HindIII، K: توالی حفاظت شده کوزاک-مانند در گیاهان، Sp1: توالی برگزیده از ژن کدکننده پروتئین *MaSp1*، N: جایگاه برش NheI، C: جایگاه برش NcoI در انتهای ۳').

Fig. 1. Structure of synthetic construct containing spidroin sequence. (E: EcoRI restriction site, RDL1: fiber-specific core promoter of *MaSp1*, H: HindIII restriction site, K: conserved kozak-like sequence in plants, Sp1: selected sequence of *MaSp1* gene, N: NheI restriction site, C: NcoI restriction site).

قرار داده شد.

تراریختی باکتری *E. coli* با محصول واکنش اتصال به روش تکنانه گرمایی

محصول واکنش اتصال در باکتری *E. coli* سویه DH5α تراریخت شد. پس از تهیه یاخته پذیرا از باکتری ذکر شده ۱۰۰ میکرولیتر از یاخته پذیرا در ویال ۱/۵ میلی لیتر روی یخ قرار داده شد. میزان ۸۰ نانوگرم از محصول فرایند اتصال به یاخته پذیرا اضافه شد و ۱۰ دقیقه روی یخ نگه داشته شد. سپس به سرعت ویال به مدت ۹۰ ثانیه به دمای ۴۲°C انتقال داده و سریعاً به مدت ۵ دقیقه به روی یخ منتقل گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به ویال اضافه شده و به مدت دو ساعت در ۳۷°C با ۱۵۰ rpm اینکوبه شد. پس از دو ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ساترifiوژ شده بر روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین 20 mgL^{-1} کشت داده و در طی شب در دمای ۳۷°C اینکوبه شد. سپس از کلنی های رشد کرده کشت مایع در محیط LB مایع دارای کانامایسین 50 mgL^{-1} رشد داده شد.

تأیید مولکولی کلنی های نو ترکیب

برای تأیید صحت فرآیند واکنش اتصال، واکنش زنجیره ای پلیمراز با شرایط زیر که برای قطعه ۴۰۰ جفت بازی *MaSp1* سنتزی طراحی شده بود، انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۲ چرخه با برنامه ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد (دمای اتصال)، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمراز) و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (بسط نهایی) انجام شد. برای انجام PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، بافر واکنش X

۱۰/۵ میکرولیتر، dNTP ۰/۷۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی سنتزی با توالی 5'-ctatccatgggaggtg-caggtcaa-3' و 3'-atatgctagcggctgctgctgctg-5' spR: ۱۰ pmol هر کدام از کشت مایع کلنی های تراریخت شده با محصول واکنش اتصال به میزان ۰/۵ میکرولیتر و در آخر آنزیم پلیمراز PrimeTaq (GeNetBio) به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر به ویال اضافه گردید. همچنین برای تأیید صحت انجام واکنش اتصال و انتقال کل T-DNA وکتور واکنش زنجیره ای پلیمراز توسط پرایمرهای اختصاصی برای ژن مقاومت به هیگرومایسین HygF-HygR-catatacgcccgaggtcg- و ctcggaggggcgaagaatctc tg صورت گرفت. ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۰ چرخه با برنامه ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (دمای اتصال)، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد (دمای بسط بهینه آنزیم پلیمراز) و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (بسط نهایی) انجام شد. حجم و میزان مواد واکنش مطابق واکنش بالا با پرایمرهای اختصاصی ژن مقاومت به هیگرومایسین صورت گرفت. پس از انجام فرآیند PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۰/۸٪ به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد.

هضم آنزیمی پلاسمید pCSP

پس از استخراج پلاسمید جدید، pCSP نام گذاری شد. جهت تأیید نهایی انجام واکنش اتصال، پلاسمید خالص هضم آنزیمی شد. ۴ نانوگرم از پلاسمید pCSP با ۱ میکرولیتر از آنزیم های EcoRI و NheI (Thermo Scientific) و ۲ میکرولیتر از Green 10x buffer fast (Thermo Scientific) و ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت نگه داری شد

مدت ۱۰ دقیقه تراریخته شدند. پس از تراریختی تخمک‌ها در محیط کشت قبلی دارای 70 mgL^{-1} سفوتاکسیم و بدون آگار کشت شدند.

جهت تأیید صحت روش تراریختی پس از یک هفته با استفاده از لامپ فرابنفش بیان گذرای ژن *gfp* در فیبر و تخمک مورد بررسی قرار گرفت. یک ماه پس از کشت در شرایط مایع، تخمک‌ها و فیبرها با استفاده از نیتروژن مایع و هاون آسیاب شدند و RNA آن با استفاده از روش لیتیم کلراید استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با الکتروفورز در بافر $0.5 \times \text{TBE}$ و نانودراپ تعیین شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (-) تعیین شد. *masp1* سنتزی PCR با استفاده از $10 \times \text{PCR buffer}$ از $2/5$ میکرولیتر، 2 dNTP mixture میکرولیتر، 1 DMSO میکرولیتر، هر پرایمر هر کدام 10 pmol ، 2 cDNA میکرولیتر، $25 \text{ Taq DNA polymerase}$ میکرولیتر با حجم نهایی 25 میکرولیتر و طبق شرایطی که پیشتر گفته شد انجام گرفت.

نتایج و بحث

سازه سنتز شده ترکیبی از هسته پروموتور *GaRDL-1* به طول 302 bp است که بیان فیبر ویژه *RDL-1* را $3-12$ روز پس از گرده افشانی در شرایط در زیوه تحت کنترل خود دارد (Wang et al., 2004) و همچنین توالی سنتزی براساس ژن *MaSp1* به طول 390 bp که در ساختار تار عنکبوت نقشی اساسی دارد (Ayoub et al., 2007) که در دو انتها توسط جایگاه برش آنزیم‌های *EcoRI* و *NheI* احاطه شده است (شکل ۱). از برش آنزیمی دوگانه این سازه و خالص سازی آن قطعه‌ای حدود 715 bp به دست آمد (شکل ۲). پس از برش و کتور *pCambia1304* توسط این دو آنزیم قطعه به دست آمده به طول 6379 bp که شامل سازه اصلی و کتور دارای بخش *T-DNA* و ژن مقاومت به کانامایسین توسط باکتری حامل بود (شکل ۳) توسط فرایند اتصال به سازه مورد نظر متصل شد. از آنجاکه سازه و کتور جدید با نام *pCSP* دارای هر دو ژن اسپایدروین و ژن مقاومت به هیگرومایسین بود کلنی‌های تراریخته *E. coli* توسط *pCSP* که توانسته بودند در محیط حاوی کانامایسین رشد کنند توسط پرایمرهای اختصاصی این دو ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی آنها صورت گرفت و براساس نتایج

و محصول هضم آنزیمی در ژل آگارز 0.8% به مدت 30 دقیقه با ولتاژ 90 ران شد.

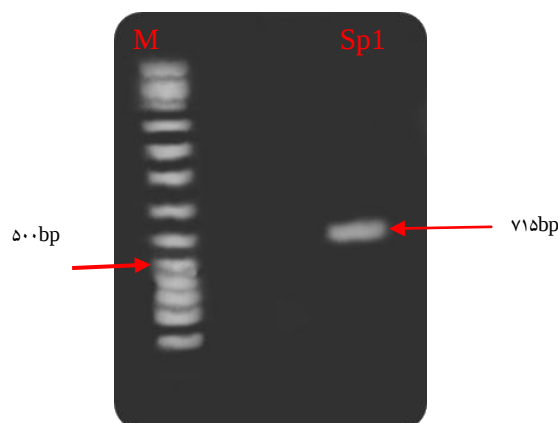
تراریختی آگروباکتریوم توسط پلاسمید pCSP

صدمیکرولیتر یاخته پذیرای *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط 1 میکروگرم پلاسمید *pCSP* به روش تکانه گرمایی تراریخته شد. پس از رشد کلنی‌ها بر روی محیط جامد YEP دارای 50 mgL^{-1} کانامایسین پس از دو روز در دمای 28°C تک کلنی‌ها در 1 میلی‌لیتر محیط مایع YEP دارای 50 mgL^{-1} کانامایسین، دمای 28°C ، 190 دور در دقیقه در طی شب اینکوبه شد. جهت تأیید تراریختی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق شرایطی که پیشتر گفته شد انجام گرفت.

تراریختی تخمک

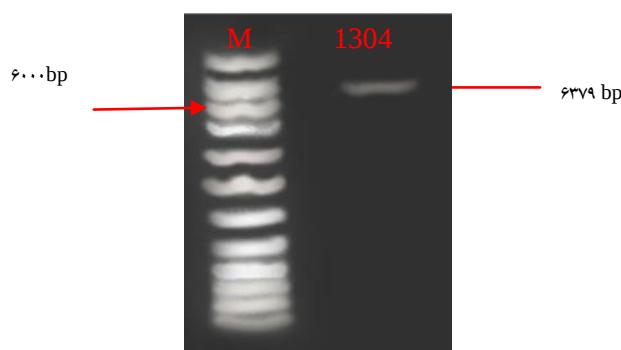
بذر پنبه زراعی رقم ورامین که از ایستگاه تحقیقات پنبه ورامین خریداری شده بود با استفاده از اسیدسولفوریک غلیظ دلیته شد و پس از شست‌وشوی فراوان با آب در مخلوطی از کوکوپیت و پیت‌ماس در گلدان در گلخانه تحقیقاتی مرکز بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله کشت شد تا گیاهان پنبه به مرحله گل‌دهی برسند. یک روز پس از گل‌دهی (1 DPA) گل‌ها جدا شدند و تخمدان‌ها پس از استریل شدن در اتانول و عبور از روی شعله، از محل برچه‌ها شکافته شدند و تخمک‌ها جدا شده، در محیط نمک‌های پایه موراشیگ-اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962)، ساکاروز 6 gL^{-1} ، گلوکز 14 gL^{-1} ، نفتالن استیک اسید (NAA) 5 میکرومولار، اسیدژیرلیک (GA_3) 0.5 میکرومولار، 0.4% آگار به مدت 5 روز در تاریکی و 30°C کشت شدند. همچنین تخمک‌ها 9 روز پس از گل‌دهی (9 DPA) مستقیماً برای تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت تراریختی ابتدا باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 دارای پلاسمید *pCSP* یا *pCambia 1304* و در طول شب در محیط مایع YEP دارای 50 mgL^{-1} کانامایسین کشت شدند تا به $\text{OD}_{600}=1$ برسد و پس از سانتریفوژ در محیط اینفیلتراسیون معلق شد تا $\text{OD}_{600}=0.3$ بدهد. محیط اینفیلتراسیون حاوی نمک‌های پایه موراشیگ-اسکوگ، ویتامین‌های محیط موراشیگ-اسکوگ، ساکاروز 5 gL^{-1} ، گلوکز $1/8 \text{ gL}^{-1}$ ، استوسیرینگون 100 میکرومولار، 0.001% IGE PAL[®] می‌باشد. تخمک‌ها در محیط اینفیلتراسیون تحت خلاء 200 mmHg به-



شکل ۲- قطعه ۷۱۵bp *MaSp1* جدا شده از پلاسمید pUC57 توسط برش آنزیمی دوتایی EcoRI/NheI (M: DNA ladder, BioBiz ۱ kb; Sp1: قطعه ۷۱۵bp *MaSp1*)

Fig. 2. 715bp sized *MaSp1* fragment cut from double digested pUC57 plasmid with EcoRI/NheI. (M: 1 kb DNA ladder, BioBiz, Sp1: 715bp sized *MaSp1* fragment).



شکل ۳- قطعه ۶۳۷۹ bp برش داده شده از وکتور pCambia 1304 توسط برش آنزیمی دوتایی EcoRI/NheI

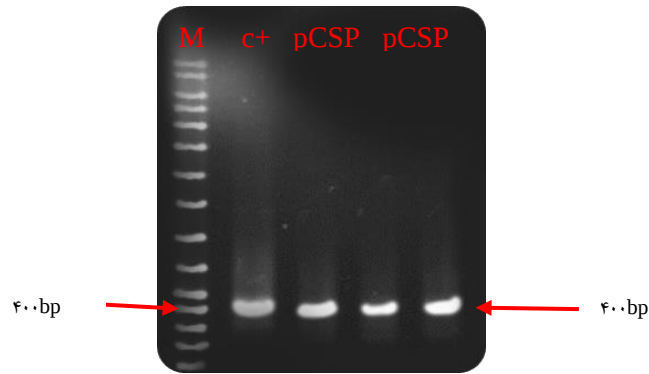
Fig. 3. 6379bp backbone of pCambia1304 double digested with EcoRI/NheI.

فرایند اتصال و اطمینان از قرارگیری سازه موردنظر در جایگاه دلخواه را مورد تأیید قرار می دهد (شکل ۶).

از آنجا که باکتری *E.coli* توانایی تراریختی گیاه را ندارد باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط pCSP تراریخته شد و جهت اطمینان از تراریختی باکتری های گزینش شده بر روی آنتی بیوتیک کانامایسین، واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط پرایمر اختصاصی ژن *MaSp1* انجام شد که نتایج به دست آمده تأیید می کند این باکتری حامل پلاسمید pCSP جهت انتقال ژن موردنظر به بافت گیاه می باشد (شکل ۷). در مجموع با توجه به نتایج بالا می توان گفت اکنون تراریختی گیاه به صوت گذرا و دائمی توسط پلاسمید pCSP امکان پذیر می باشد.

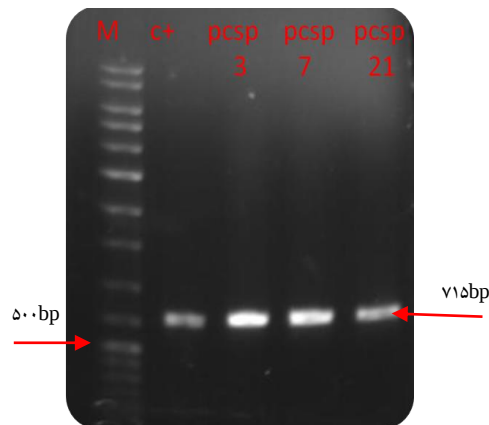
واکنش زنجیره ای پلیمرز تأیید شد که ژن موردنظر در وکتور جدید pCSP وجود دارد (شکل ۴). از طرفی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز با پرایمر ژن مقاومت به هیگرومایسین تأیید کرد که بخش پایه ای سازه جدید سالم متصل شده است و گزینش گیاهان تراریخته در مراحل بعدی بر پایه مقاومت به هیگرومایسین قابل اعتماد می باشد (شکل ۵). بنابراین انتظار می رود pCSP پلاسمیدی کارا جهت تراریختی گیاه و بیان فیبر ویژه پروتئین تار عنکبوت در الیاف گیاهی به ویژه الیاف پنبه باشد.

جهت اطمینان بیشتر از درستی جایگاه اتصال سازه موردنظر پلاسمید pCSP مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که باندهای مشاهده شده در اندازه های مورد نظر ۷۱۵ bp و ۶۳۷۹ bp درستی



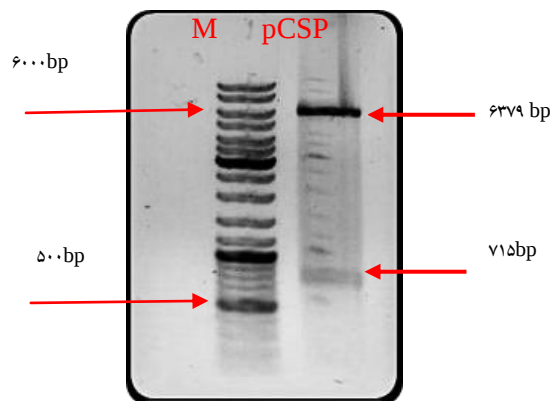
شکل ۴- تأیید فرایند اتصال توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر اختصاصی ژن سنتزی *MaSp1*. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: کنترل مثبت، pCSP: کلنی‌های *E.coli* رشد کرده روی محیط گزینش).

Fig. 4. Conformation of ligation using PCR with *MaSp1* specific primers. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: positive control, pCSP: selected *E.coli* colony on selection medium).



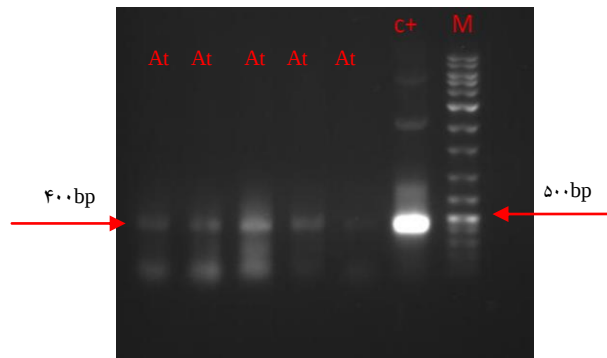
شکل ۵- تأیید فرایند اتصال توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر اختصاصی ژن مقاومت به هیگرومایسین. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: کنترل مثبت، pCSP: کلنی‌های *E.coli* رشد کرده روی محیط گزینش).

Fig. 5. Conformation of ligation using PCR with specific primers of hygromycin resistance gene. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: positive control, pCSP: selected *E.coli* colony on selection medium).



شکل ۶- تأیید فرایند اتصال توسط برش آنزیمی دوتایی پلاسمید pCSP استخراج شده از باکتری *E.coli* تراریخته توسط EcoR/NheI. (M: 1kb DNA ladder, pCSP: پلاسمید استخراج شده از *E.coli*).

Fig. 6. Conformation of ligation using enzymatic double digestion with EcoRI/NheI. (M: 1kb DNA ladder, pCSP: isolated plasmid from transformed *E.coli* culture).



شکل ۷- تأیید تراریختی *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 با pCSP توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر اختصاصی ژن سنتزی *MaSp1*. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: کنترل مثبت، At: کلنی‌های *Agrobacterium tumefaciens* رشد کرده روی محیط گزینش).

Fig. 7. Confirmation of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformation using PCR with *MaSp1* specific primers. (M: 1kb DNA ladder, c⁺: positive control, At: selected *Agrobacterium tumefaciens* colony on selection medium).

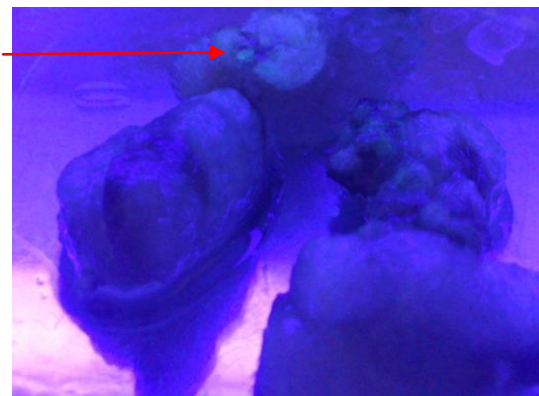
کنترل پروموتور *GhSCFP* (Hou et al., 2008) مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش پروتئین اسپایدریون *MaSp1* به صورت فیبر-ویژه در تخمک و الیاف پنبه رقم ورامین به صورت گذرا بیان شد. تا آنجا که می دانیم برای نخستین بار است که بیان اسپایدریون در الیاف پنبه صورت می گیرد. امید است در تراریختی دائم پنبه شاهد بهبود ویژگی‌های الیاف پنبه باشیم چرا که در بیان فیبر-ویژه فیبروین ابریشم تحت کنترل پروموتور *GAE6-3A* در الیاف پنبه زراعی مشاهده شد طول و استحکام الیاف افزایش یافته است و همچنین در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره مشخص شد ساختار سطحی فیبر رسیده به طرز قابل توجهی دچار واپسش شده است و تعداد تاب خوردگی رشته‌ها افزایش یافته است. در نتیجه مشخص شد بیان فیبروین باعث بهبود کیفیت الیاف شده است (Li et al., 2009). براین اساس انتظار می رود در تراریختی الیاف پنبه با اسپایدریون نیز بهبود ویژگی‌های آن مشاهده شود که لازم است در گام بعدی با تراریختی دائم پنبه زراعی توسط پلاسمید pCSP مورد تأیید قرار گیرد.

نتیجه گیری

سازه دارای ژن سنتزی *MaSp1* و پروموتور مخصوص فیبر پنبه *GaRDL-1* در جایگاه برش آنزیم‌های *EcoRI* و *NheI* و کتور *pCambia1304* همسانه سازی شد و صحت پلاسمید جدید توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و برش آنزیم دوگانه مورد تأیید قرار گرفت. پس از تراریختی باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط این پلاسمید و تأیید آن، تخمک

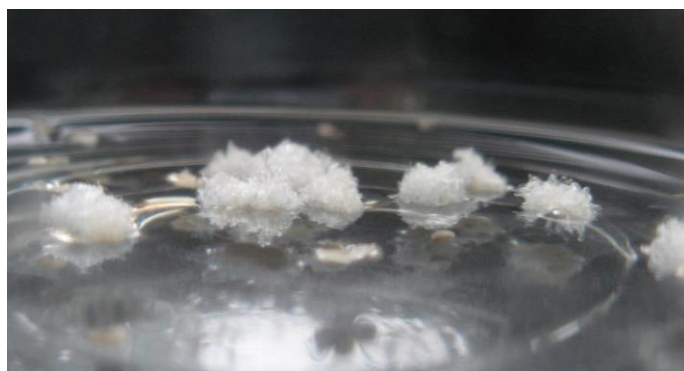
جهت اطمینان از کارایی هر سازه‌ای بهتر است قبل از ورود به فرایند تراریختی دائمی گیاه و تأیید آن، بیان گذرای آن ژن و سازه مورد بررسی قرار گیرد. جهت بهینه سازی و اطمینان از کارایی روش برگزیده جهت تراریختی تخمک و فیبر پنبه ابتدا تراریختی توسط آگروباکتریوم حاوی پلاسمید *pCambia1304* دارای ژن *gfp* گرفت. پس از یک هفته بیان *GFP* با لامپ فرابنفش دست ساز مورد بررسی قرار گرفت. فلئورسانس مربوط به *GFP* در نواحی مختلف از تخمک به ویژه در فیبرهای تازه رشد کرده مشاهده شد (شکل ۸). بنابراین با استفاده از این روش، تراریختی تخمک و بیان ژن در الیاف و تخمک امکان پذیر می باشد. برداشت تخمک‌های تراریخته توسط پلاسمید pCSP (شکل ۹) و استخراج RNA (شکل ۱۰) و سپس انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط cDNA و پرایمر اختصاصی ژن اسپایدریون نشان داد که تراریختی تخمک و الیاف پنبه با موفقیت انجام گرفته است و ژن مورد نظر *MaSp1* تحت کنترل پروموتور *GaRDL-1* در الیاف پنبه زراعی رقم ورامین به خوبی بیان شده است (شکل ۱۱).

تاکنون تلاش‌هایی جهت بیان فیبر-ویژه ژن‌هایی خاص تحت-کنترل پروموتورهای فیبر-ویژه به منظور بررسی زیست شناسی/ فیزیولوژی و یا بهبود کیفیت الیاف انجام گرفته است. بدین منظور بیان پروتئین اکستانسین هویج تحت کنترل پروموتور *E6* (John & Crow, 1992)، ژن *GUS* تحت کنترل پروموتور سلولز سنتاز *A4* پنبه، *CaMV 35S* (Kim et al., 2002)، اکتین پنبه تحت کنترل پروموتور *GhACT1* (Li et al., 2005)، *GUS* و *GFP* تحت



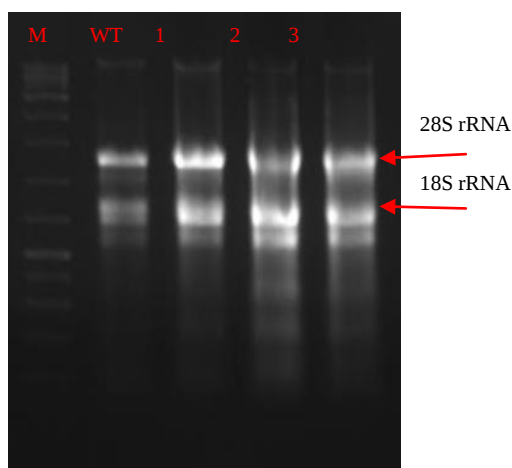
شکل ۸- فلورسانس GFP تحت پرتو فرابنفش در تخمک‌های ۹DPA تراریخته توسط pCAMBIA1304، ۷ روز پس از تراریختی.

Fig. 8. The GFP fluorescence of 9DPA ovules transformed with pCAMBIA1304, 7 days after transformation.



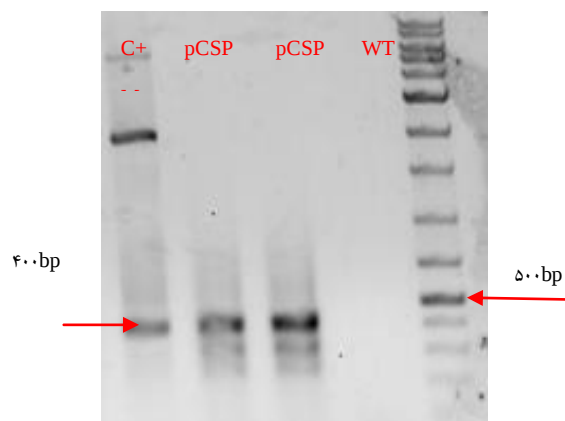
شکل ۹ - تولید فیبر از تخمک‌های تراریخته بر روی محیط کشت MS، ساکارز 6 gL^{-1} و گلوکز 14 gL^{-1} ، NAA 5 mM ، GA_3 0.5 mM و 70 mgL^{-1} سفوتاکسیم.

Fig. 9. Fiber growth of transformed ovules on MS medium containing sucrose 6 gL^{-1} , Glucose 14 gL^{-1} , NAA 5 mM , GA_3 0.5 mM , cefotaxime 70 mgL^{-1} .



شکل ۱۰- کیفیت RNA استخراج شده از الیاف و تخمک‌های رشد کرده در محیط مایع (WT: تخمک تراریخته نشده، 1-3: تخمک تراریخته شده).

Fig. 10. The RNA quality of developed fibers and ovules on liquid medium. (WT: Wild Type ovule, 1-3: Transformed ovule).



شکل ۱۱- بیان گذرای ژن *MaSp1* سنتزی در الیاف و تخمک پنبه (M: DNA ladder, C⁺: کنترل مثبت پلاسمید، pCSP: نمونه تراریخت شده با پلاسمید pCSP، WT: نمونه تراریخت نشده).

Fig. 11. Transient expression of *MaSp1* in cotton fibers and ovules. (M: DNA ladder, C⁺: positive control plasmid, pCSP: pCSP transformed samples, WT: non-transformed samples).

REFERENCES

- Arpat, A., Waugh, M., Sullivan, J.P., Gonzales, M., Frisch, D., Main, D., Wood, T., Leslie, A., Wing R., and Wilkins, T. 2004. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. – *Plant Mol. Biol.* 54: 911-929.
- Ayoub, N.A., Garb, J.E., Tinghitella, R.M., Collin, M.A. and Hayashi, C.Y. 2007. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. – *PLoS One.* 6:e514
- Foo, C.W.P. and Kaplan, D.L. 2002. Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. – *Adv. Drug Deliver. Rev.* 54: 1131-1143.
- Gutiérrez, S.P., Saberianfar, R., Kohalmi, S.E. and Menassa, R. 2013. Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. – *BMC Biotechnol.* 13: 40-48.
- Hauptmann, V., Weichert, N., Menzel, M., Knoch, D., Paegle, N., Scheller, J., Spohn, U., Conrad, U. and Gils, M. 2013. Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. – *Transgenic Res.* 22: 369-377.
- Hou, L., Liu, H., Li, J.B., Yang, X., Xiao, Y.H., Luo, M., Song, S.Q., Yang, G.W. and Pet, Y. 2008. SCFP, a novel fiber-specific promoter in cotton. – *Chinese Sci. Bull.* 52: 2639-2645.
- Kim, H.J., Williams, M.Y. and Triplett, B.A. 2002. A novel expression assay system for fiber-specific promoters in developing cotton fibers. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 20:7-18.
- Li, X.B., Fan, X.P., Wang, X.L., Cai, L. and Yang, W.C. 2005. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. – *Plant Cell.* 17: 859-875.
- Li, F., Wu, S., Lü, F., Chen, T., Ju, M., Wang, H., Jiang, Y., Zhang, J., Guo, W. and Zhang, T. 2009. Modified fiber qualities of the transgenic cotton expressing a silk-worm fibroin gene. – *Chinese Sci. Bull.* 54: 1210-1216.

و الیاف پنبه توسط آگروباکتریوم حامل پلاسمید بیانی تراریخته شد نتایج نشان داد ژن سنتزی *MaSp1* تحت کنترل پروموتور مخصوص فیبر پنبه *GaRDL-1* به خوبی بیان می شود. بنابراین بخش برگزیده هسته پروموتور *GaRDL-1* که متعلق به گونه دیگر پنبه *Gossypium arboreum* است به خوبی توان کنترل بیان ژن موردنظر در الیاف و تخمک پنبه را دارد و توالی ژن سنتزی بدون بهینه سازی کدون در الیاف پنبه قابل بیان می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله در قالب بخشی از طرح پژوهشی امکان سنجی تولید پروتئین *MaSp1* تار عنکبوت در کرک های دانه (الیاف پنبه) در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام شده است.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th Ed. Cold Spring Harbor, N.Y. – Cold Spring Harbor Laboratory.
- Memon, S., Mari, S.N., Mari, A.K. and Gaddi, N.H.** 2010. Induction of callus through anther and ovule culture in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). – World Appl. Sci. 8: 76-79.
- Menassa, R., Zhu, H., Karatzas, C.N., Lazaris, A., Richman, A. and Brandle, J.** 2004. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. – Plant Biotech. J. 2: 431-438.
- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C.Y. and Lewis R.V.** 2005. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. – Biomacromol. 6: 3152-3159.
- Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures. – Physiol. Plantarum 15: 473-497.
- Piruzian, E.S., Bogush, V.G., Sidoruk, K.V., Goldenkova, I.V., Musiichuk, K.A. and Debabov, V.G.** 2003. Construction of the synthetic genes for protein analogs of spider silk carcass spidroin 1 and their expression in tobacco plants. – Mol. Biol. 37: 654-662.
- Rising, A., Hjälm, G., Engström, W. and Johansson, J.** 2006. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriciform spider silk proteins. – Biomacromol. 7: 3120-3124.
- Scheller, J., Gührs, K.H., Grosse, F. and Conrad, U.** 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. – Nat. Biotechnol. 19: 573-577.
- Taliercio, E.W. and Boykin D.** 2007. Analysis of gene expression in cotton fiber initials. – BMC Plant Biol. 7: 22-26.
- Tarakanova, A. and Buehler, M.J.** 2012. A materiomics approach to spider silk: protein molecules to webs. – Jom. 64: 214-225.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. and Swain, W.** 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. – Nat. Biotechnol. 5: 263-266.
- Vollrath, F. and Knight, D.P.** 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. – Nature 410: 541-548.
- Wang, S., Wang, J.W., Yu, N., Li, C.H., Luo, B., Gou, J.Y., Wang, L.J. and Chen, X.Y.** 2004. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. – Plant Cell 16: 2323-2334.

How to cite this article:

Behnam, M., Seyed Javad Davarpanah, S.J. and Karimian, R. 2016. Designing and cloning a *MaSp1*-based synthetic gene in binary vector for transient expression in cotton fiber. – Nova Biol. Rep. 3: 238-248.

بهنام، م.، داورپناه، س.ج. و کریمیان، ر. ۱۳۹۵. طراحی، ساخت و تأیید مولکولی سازه جفتی بیان‌کننده ژن *MaSp1* و بیان گذرای آن در الیاف پنبه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۴۸-۲۳۸.