جداسازی و همسانه سازی ژن فسفومانوز ایزومراز و تغییر codon usage آن جهت کاربرد در انتقال ژن به گیاه به عنوان ژن انتخابگر

سعید سهیلی وند[××]، غلامرضا صالحی جوزانی، عباس کیانی، علی محمد شکیب، ثریا دانشور تکمه داش، ابراهیم کریمی، محمد رضا صفرنژاد

محقق آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی
Soheili@abrii@ac.ir, vand_soheily@yahoo.com
کرج- اول جاده ماهدشت- روبروی ترمینال شهید کلانتری- محوطه اصلاح نهال و بذر- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی-
صندوق پستی: ۱۸۹۷- ۳۱۵۳۵

چکیده

در تمامی فعالیتهای انتقال ژن، انتخاب سلولهای دستورزی شده جزء جدایی ناپذیر است که توسط ژن های انتخابگر انجام می گیرد. ژنهای ایجاد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک ها و علف کشها جزء ژنهایی هستند که بصورت متداول برای این منظور استفاده می شوند. مطرح شدن برخی سوالات در مورد مسایل ایمنی زیستی چنین ژن هایی باعث شده است که گرایش به سمت استفاده از ژن های انتخابگر متابولیکی بیشتر شود. ژن فسفومانوز ایزومراز یکی از ژنهای نامزد است که در دنیا از آن در کارهای انتقال ژن به گیاهان بعنوان ژن انتخابگر متابولیکی استفاده می شود. هدف از این تحقیق جداسازی ژن فسفومانوز ایزومراز و همسانه سازی آن و تغییر codon usage آن از شکل پروکاریوتی به یوکاریوتی می باشد. هدف نهایی، مقایسه کارایی انتخاب سلول های گیاهی تراریخته، توسط ژن دستکاری شده در مقایسه با ژن اصلی جدا شده از باکتری است. روند کار بصورت خلاصه، شامل مطالعه و مقایسه توالی های ژن فسفومانوزایزومراز، طراحی و انتخاب آغازگرهای مناسب با توجه به پلاسمید هدف، جهت جداسازی و همسانه سازی آن در ناقل مناسب برای انتقال ژن به گیاه است. همچنین طراحی codon usage ژن فسفومانوزایزومراز، از شکل پروکاریوتی به یوکاریوتی است که توسط روشهای بیوانفورماتیکی و طراحی و سنتز قطعات ژنی، سرهم بندی قطعات و همسانه سازی آن در ناقل مناسب است. در نهایت آزمون عملکرد و کارایی ژن سنتز شده در مقایسه با ژن اصلی جدا شده از باکتری انجام خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی و سنتز فسفومانوز ایزومراز، ژن انتخابگر، ایمنی زیستی، codon usage

مقدمه

با نگاهی گذرا به تاریخچه ژن های انتخابگر مشخص می شود که ژنهای ایجاد کننده مقاومت، بخصوص مقاومت به آنتی بیوتیک ها، اولین ژنهایی بودند که برای انتخاب سلول های تراریخته بکار برده شدند. این ژنها هنوز هم در تحقیقات پایه ای و در برخی موارد کاربردی استفاده می شوند. ولی دارای مشکلات ایمنی زیستی می باشند. بنابراین رویکرد به ژن های انتخابگری که بر پایه روشهای متابولیکی سلول است روبه افزایش است. یکی از بهترین نامزدها برای این منظور ژن فسفومانوزایزومراز است بدین صورت که آنزیم تولید شده در گیاه قند مانوز را تبدیل به گلوکز کرده و وارد چرخه های طبیعی سلول می کند. لازم به ذکر است که انباشته شدن قند مانوز در سلول گیاهی باعث مصرف انرژی بسیار بالایی می شود که به سلول تحمیل می گردد و چنین روندی باعث تحلیل انرژی و ضعیف شدن سلول می گردد بطوری که گیاه از رشد طبیعی بازمانده و به اصطلاح دچار گرسنگی می شود. این نوع پیامد فرصت خوبی را برای انتخاب سلولهای تراریخته از بین سلولهای غیرتراریخته موجود در محیط کشت بافت حاوی قند مانوز، در اختیار قرار می دهد. بنابراین سلول تراریخته حاوی این ژن انتخابگر، بصورت نرمال از قند مانوز موجود در محیط کشت بافت استفاده کرده و با کمک تیمارهای مناسب تمایز حاصل کرده و تبدیل به یک گیاه تراریخته کامل می گردد. در عوض سلولهای غیرتراریخته دچار اختلال در سیستم انرژی و متابولیکی شده و از رشد باز می ایستند.

امروزه، با توجه به مزایای ژن های متابولیکی به عنوان ژنهای انتخابگر، استفاده از آنها روبه افزایش است (پنا و همکاران ۲۰۰۲). منبعی که ژن فسفومانوز ایزومراز از آن جدا شده و برای کارهای انتقال ژن استفاده می گردد از باکتری *E. coli* است. این ژن در انتقال ژن به گیاهان، به عنوان ژن انتخابگر در ذرت (نگروتو و همکاران ۲۰۰۰)، آرابیدوپسیس (تود و همکاران ۲۰۰۲)، گندم و جو (پنا و همکاران ۲۰۰۲)، ارزن مرواریدی (اکندی ۲۰۰۴)، انگور (ریوسل و همکاران ۲۰۰۳) و ... استفاده شده است.

در این تحقیق نیز با جداسازی ژن فسفومانوزایزمراز و همسانه سازی آن در ناقل های مناسب انتقال ژن به گیاه و همچنین تغییر codon usage آن برای بیان بهتر در سلول گیاهی و بطبع آن بالا بردن کارایی انتخاب سلول های تراریخته، می توان نگرانی های مربوط به ایمنی زیستی ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها و علف کش ها را مرتفع ساخت.

مواد و روش ها

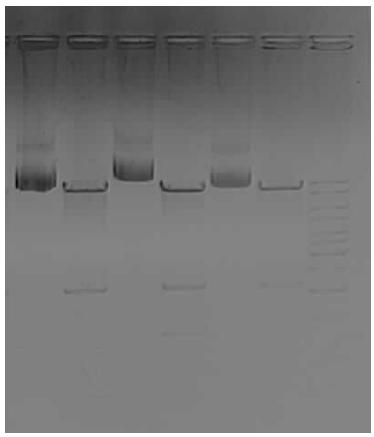
در قدم اول با مرور بانک های اطلاعاتی که دارای توالی های مختلف ژن فسفومانوزایزومراز می باشند و مقایسه توالی آنها، باکتری *E. coli* استرین K12 به عنوان منبع جداسازی این ژن انتخاب شد. نقشه پلاسمید هدف (pCAMBIA3301) که بایستی ژن انتخابگر آن حذف شود و بجای آن ژن فسفومانوز ایزومراز قرار گیرد توسط نرم افزار Vector NTI Viewer بررسی شده و جایگاههای آنزیمی ممکن برای همسانه سازی معین گردید. همچنین توالی ژن فسفومانوز ایزومراز، که از سایت NCBI بدست آمده بود توسط نرم افزارهای خانواده DNASTAR بررسی گردید. بطوری که بتوان ژن را بطور کامل از کدون شروع تا کدون انتها تکثیر کرد به همین خاطر جایگاههای برش آنزیمی که برای همسانه سازی در پلاسمید هدف استفاده می شوند و همچنین جایگاههای آنزیمی که درون قطعه ژنی قرار دارند و در مراحل بعدی می توانند برای شناسایی قطعه مانوز تکثیر شده استفاده شوند مشخص گردیدند. جفت آغازگرها نیز بر همین اساس و با توجه به جایگاههای آنزیمی و رشته الگو در نرم افزار Primer 3 طراحی شدند و بهترین جفت آغازگرها انتخاب و برای تکثیر کامل ژن استفاده شدند. پس از تکثیر و همسانه سازی ژن و انتقال سازه به باکتری ها، با ظهور کلونی ها، تعدادی از آنها انتخاب و پلاسمید از آنها استخراج شد و برای توالی یابی ارسال گردید.

نتایج و بحث

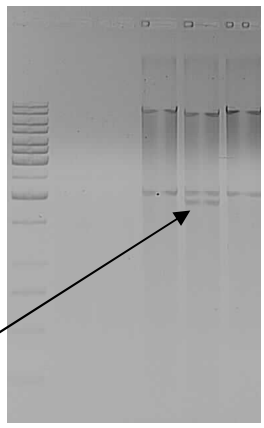
با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، ژن توسط PCR تکثیر شد. برای آزمون مقدماتی، از آنزیم *Bsp*119I که دارای جایگاه برشی در داخل قطعه ژنی است استفاده شد به همین منظور محصول PCR توسط این آنزیم برش داده شد. با مشاهده الگوی باندی مورد نظر در ژل آگاروز، قطعه تکثیر شده در T-vector همسانه سازی شد.

پس از مشخص شدن نتایج توالی یابی، کل توالی در سایت NCBI با بقیه توالی ها BLAST شد نتایج نشان داد که ژن مربوطه از لحاظ اسید آمینه کاملا با توالی ژن اصلی که برای انتقال ژن استفاده می شود برابر است.

برای همسانه سازی ژن فوق در پلاسمید pCAMBIA3301 هر دو پلاسمید (T-پلاسمید و پلاسمید pCAMBIA3301) با توجه به جایگاههای برش، توسط آنزیم XhoI برش داده شد این عمل همچنین باعث حذف کامل ژن انتخابگر قبلی که بر روی pCAMBIA3301 قرار دارد، شد. قطعات ژنی و پلاسمید هدف، از ژل بازیافت شدند. سپس با استفاده از آنزیم لیگاز دو قطعه به هم متصل شده و پلاسمید نوترکیب ساخته شد. پلاسمید نوترکیب، توسط روش شوک حرارتی به داخل باکتری *E. coli* منتقل شد. باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب گزینش شدند. در مرحله آخر کلونی های بدست آمده در محیط LB مایع رشد داده شده و پلاسمید آنها استخراج شد. به منظور اطمینان از درج ژن در پلاسمید نوترکیب، با استفاده از آنزیم *Xho*I پلاسمید نوترکیب برش داده شد، تا قطعه ژنی مورد انتظار مشاهده شود (شکل ۱). چون به ناچار بایستی از یک آنزیم برشی (*Xho*I) برای همسانه سازی ژن استفاده می شد. جهت قرار گیری ژن از اهمیت ویژه ای برخوردار بود. برای مشخص کردن اینکه آیا ژن در جهت سنس یا آنتی سنس قرار گرفته است از آنزیم *Bsp*119I که داخل ژن قرار داشت به همراه یک جایگاه آنزیم برشی دیگر مانند *Eco*RI استفاده شد (شکل ۲). این تحقیق با طراحی و تغییر codon usage و در نهایت انتقال آن به گیاه و مقایسه عملکرد و کارآیی دو نوع ژن فسفومانوز ایزومراز با منشاء باکتریایی و سنتز شده در حال انجام می باشد.



شکل ۱: هضم پلاسمید pCAMBIA3301 با آنزیم XhoI برای تایید کلون ژن فسفومانوز ایزومراز



شکل ۲: هضم پلاسمید pCambia3301 با آنزیم های EcoRI و Bsp119I برای

References

Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck AR. and G. Hansen, The use of Phosphomannose-Isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (Zea mays L.) via Agrobacterium transformation. Plant Cell Reports, 19(8), 2000, 798-803

Todd R. and B. W. Tague, Phosphomannose Isomerase: A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. Plant Molecular Biology Reporter, 20 (1), 2002, 307-319

Penna S., Sagi L. and R. Swennen, Positive selectable marker genes for routine plant transformation. In Vitro Cellular and Development Biology - Plant, 38 (2), 2002, 125-128(4)

Okennedy MM., Burger JT. and FC. Botha, Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene Phosphomannose Isomerase. Plant Cell Rep, 22(9), 2004, 684-90.

Reustle GM., M. Wallbraun, M. Zwiebel, R. Wolf, T. Manthey, C. Burkhardt, T. Lerm, M. Vivier and G. Krczal, Selectable marker systems for genetic engineering of grapevine. ISHS Acta Horticulturae 603: VIII international conference on grape genetics and breeding, 2003.

Isolation and cloning of phosphomannose isomerase gene and modification of its codon usage to use in transformation into plants as selectable marker gene

Saeed Soheilivand, Gholamreza Salehi Jozani, Abbas Kiyani, Ali Mohammad Shakib, Soraya Daneshvar Tekmedash, Ebrahim Karimi, Mohammad Reza Safarnejad**
Researcher in microbial biotechnology and biosafety department
Soheili@abrii@ac.ir, vand_soheily@yahoo.com
Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII),
Seed and Plant Improvement Institutes Campus,
Mahdasht Road, Karaj, Iran P. O. Box: 31535-1897

Abstract
Selection of transform cells is a very important stage in all gene transformation researches through selectable marker genes. The genes responsible for resistance to antibiotics and herbicides are routinely used for this approach. From the view of biosafety these genes come into question, therefore tendency for metabolic selectable gene application rises. The phosphomannose isomerase gene is one of the candidate metabolic genes as selectable marker for gene transformation into plants in the world. The aim of this research is to isolate and clone this gene and to modify its codon usage from prokaryote form to eukaryote form in order to compare its efficiency for selection of transformed plant cells instead of bacterial isolated gene. As a summary, the process of this research includes the study and aligning of phosphomannose isomerase gene sequences, designing and selection of proper primers according to the target plasmid used to plant transformation. Also, codon usage modifying of phosphomannose isomerase gene from prokaryote form to eukaryote form by bioinformatics methods involving designing and synthesis of gene fragments, assembling synthesis fragments and cloning them in the proper vector. Finally, assay for action and efficiency of synthetic gene will be carried out to compare it with original gene that isolated from bacteria.

Key words: Isolation and synthesis of phosphomannose isomerase gene, codon usage, selectable marker, biosafety