

## ارزیابی عملکرد دو پپتید نشانه از گیاهان اطلسی (*Petunia × hybrida*) و اسفناج (*Spinacia oleracea*) بمنظور انتقال پروتئین‌های نو ترکیب به اندامک کلروپلاست

مرجان آدی‌گوزلی بهروز، امیر موسوی\* و علی هاتف سلیمانان

ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸

### چکیده

بمنظور انتقال پروتئین‌های نو ترکیب به کلروپلاست در جهت عملکرد مناسب و یا ذخیره سازی آنها در این اندامک، می‌توان از توالی‌های پپتید نشانه مناسب بهره جست. در این مطالعه، در دو مرحله آنالیزهای بیوانفورماتیکی و سپس آزمایشگاهی با هدف انتخاب پپتیدهای نشانه مناسب کلروپلاستی، ارزیابی روی توالی‌های مختلف انجام گرفت. بدین منظور ابتدا ۱۶۰ پپتید نشانه از ژن‌ها و میزبان‌های مختلف جهت بررسی جایگاه برش، احتمال انتقال به کلروپلاست و بررسی آب‌گریزی آنها مورد آنالیز بیوانفورماتیکی قرار گرفتند. ساختارهای ثانویه مربوط به رونوشت‌های آنها در حالت اتصال به ژن گزارشگر نیز پیش‌بینی شدند. در مرحله بعد، پپتید نشانه ژن *epsps* از گیاه اطلسی (*Petunia × hybrida*) و نیز پپتید نشانه ژن *pcaD* از گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*) با طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام PCR از ژنوم گیاهان جداسازی و به توالی ژن گزارشگر *gus* متصل شدند. انتقال سازه‌ها به آگروباکتریوم *تومفائینیس* برای تراریختی گیاه مدل توتون (*Nicotiana tabacum*) صورت گرفت. پس از تراریختی و باززایی گیاهان تراریخت، سنجش کیفی و کمی آنزیم  $\beta$ -glucuronidase بر روی کلروپلاست‌های جدا شده از برگ‌های سبز و جوان نشان داد که محصول ژن *gus* با موفقیت به کلروپلاست‌های گیاه هدفمند شده است و پپتید نشانه ژن *epsps* جدا شده از گیاه اطلسی کارایی بالاتری را در انتقال پروتئین نو ترکیب به کلروپلاست‌ها داشته است. توالی مذکور می‌تواند کاندیدی برای استفاده در گیاهان تراریخته تجاری در راستای هدفمندی محصول پروتئینی در ساختارهای پلاستی و نهایتاً افزایش بروز صفت مورد نظر و یا ذخیره‌سازی و خالص‌سازی بهتر محصولات پروتئینی باشد.

واژه‌های کلیدی: کلروپلاست، پپتید نشانه، انتقال ژن، ارزیابی کمی و کیفی *gus*، SOEing PCR

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۰۵، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

### مقدمه

مسئولیت هدایت پروتئین از سطح سیتوپلاسم به کلروپلاست وابسته به ترادف اسیدآمینه‌ای در توالی پپتید نشانه (Signal Peptides) است. پپتیدهای نشانه پپتیدهای کوتاه و معمولاً دارای ۲۵-۳۰ اسیدآمینه هستند که اغلب در پایانه آمینی پروتئین‌ها قرار داشته و در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها نیز وجود دارند. پپتید نشانه چند قسمتی در کلروپلاست‌ها حاوی نشانه‌هایی است که بطور متوالی عمل می‌کنند. بطور معمول قسمت اول از پپتید نشانه، پروتئین را

بیان کارآمد یک پروتئین نو ترکیب در گیاه، نیازمند فرایندهای مختلف به‌ویژه بهینه‌سازی این مراحل است. این موارد شامل انتخاب ژن و ساختارهای کنترل‌کننده آن، پیش‌برنده مناسب و کارآمد، پایداری قابل قبول برای mRNA ژن هدف، کارایی مناسب در هنگام ترجمه و در صورت نیاز، تغییرات پس از ترجمه و همچنین تجمع پروتئین در اندامک‌های ویژه گیاه از جمله کلروپلاست است (۷،۹).

## مواد و روشها

**انتخاب توالی‌های نشانه:** در این مطالعه، در مرحله اول باهدف انتخاب پپتید نشانه مناسب کلروپلاستی، آنالیزهای بیوانفورماتیکی انجام گرفت. ابتدا براساس مطالعات پیشین که بر روی شناسایی توالی‌های پپتیدهای نشانه کلروپلاستی صورت گرفته است، ۱۶۰ پپتید نشانه از ژن‌ها و میزبان‌های مختلف برای بررسی جایگاه برش بین پپتید نشانه و پروتئین GUS، احتمال انتقال به کلروپلاست و آب‌گریزی توسط برنامه‌های بیوانفورماتیکی Targetp، Tppred، PredSL، Predator و Protoscale مورد آنالیز قرار گرفتند و توالی‌های انتخاب‌شده از نظر ساختار دوم و پس از شبیه‌سازی اتصال پپتیدهای نشانه به ژن گزارش‌گر *gus*، با برنامه RNAfold نیز بررسی شدند. از بین توالی‌های مورد مطالعه، با توجه به داشتن بهترین ساختارهای قابل پیش‌بینی، دو پپتید نشانه از گیاه اطلسی و اسفناج انتخاب شدند.

**کشت گیاهان هدف:** ابتدا بذرهای گیاهان اطلسی (*Petunia × hybrida*) و اسفناج (*Spinacia oleracea*) با آب استریل شسته و با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده و سپس دو بار با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از ضدعفونی، بذور در محیط ۱/۲ موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog medium; MS) قرار گرفته و در شرایط کنترل‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. بعد از حدود ۱۰-۱۵ روز جوانه‌زنی شروع شد و بعد از ۳۰ روز گیاهان به محیط کامل MS منتقل شدند (۴).

**استحصال پپتیدهای نشانه:** استخراج DNA ژنومی از گیاهان کامل (حدود ۴۵-۶۰) روزه اطلسی و اسفناج بمنظور بدست آوردن توالی‌های پپتیدهای نشانه به روش Doyle and Doyle (۸) انجام گردید. برای تکثیر و جداسازی قطعه پپتید نشانه از DNA استخراج‌شده از گیاهان، PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی پیشرو برای

به اندامک هدف می‌برد و قسمت دوم برای جهت‌دهی آن به نواحی غیر از استروما لازم است (۲۱-۱۹).

تصور می‌شود که دو تا سه هزار پروتئین مختلف برای انتقال به کلروپلاست هدف‌گذاری شده و پپتیدهای نشانه‌ای که بعنوان توالی‌های هدفمند کلروپلاست عمل می‌کنند، احتمالاً بزرگ‌ترین دسته از توالی‌های هدفمندسازی در گیاهان هستند. تنوع بالا در ترکیب این پپتیدها، نشان‌دهنده توانایی و ظرفیت بالای آن‌ها برای انتقال پروتئین‌ها به اندامک هدف است (۶).

پپتیدهای نشانه از اهمیت ویژه‌ای در زمینه‌های مختلف برخوردارند و در زمینه تولید پروتئین‌های نوترکیب توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۹). موارد متعددی از استفاده بهینه از پپتیدهای نشانه کلروپلاستی در تولید پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد (۱۳، ۱۴، ۱۹، ۲۲). در مطالعه‌ای، تلاش شد که محصول ژن‌های گلی اکسیلات کربولیکاز (EcGCL) و تارترونیک سمی آلداید ردوکتاز (EcTSR) از باکتری *شریشیای کلای* را با یک پپتید نشانه بهبودیافته از پروتئین روبیسکو به کلروپلاست گیاه برنج انتقال دهند و توانستند اثربخشی این پپتید نشانه را بطور چشم‌گیری افزایش دهند (۲۱). در مطالعات دیگری، از پپتیدهای نشانه ژن‌های تیوردوکسین Z، فیلامین ۱ و آلبومین سرم انسانی ۱ استفاده کردند (۱۳) و در بررسی کارایی این پپتیدهای نشانه در گیاه برنج، نشان دادند که این پپتیدهای نشانه می‌توانند یک پروتئین غیر کلروپلاستی را نیز به کلروپلاست گیاه انتقال دهند (۱۴).

در مطالعه حاضر، در دو مرحله، آنالیزهای بیوانفورماتیکی و سپس آزمایشگاهی باهدف انتخاب پپتیدهای نشانه مناسب برای انتقال پروتئین‌ها و آنزیم‌های نوترکیب به کلروپلاست، روی توالی‌های مختلف از گونه‌های مختلف گیاهی انجام گرفت.

ابتدای پپتید نشانه و آغازگر معکوس بر اساس ترادف انتهای پپتید نشانه و اضافه کردن ترادف همپوشان با توالی ژن گزارشگر *gus* (جدول ۱) انجام شد. محصول PCR برای همسانه‌سازی در یک ناقل پلاسمیدی اولیه (pJET1.2, Thermo scientific) و سپس برای انتقال به گیاه در ناقل

ابتدای پپتید نشانه و آغازگر معکوس بر اساس ترادف انتهای پپتید نشانه و اضافه کردن ترادف همپوشان با توالی ژن گزارشگر *gus* (جدول ۱) انجام شد. محصول PCR برای همسانه‌سازی در یک ناقل پلاسمیدی اولیه (pJET1.2, Thermo scientific) و سپس برای انتقال به گیاه در ناقل

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه\*

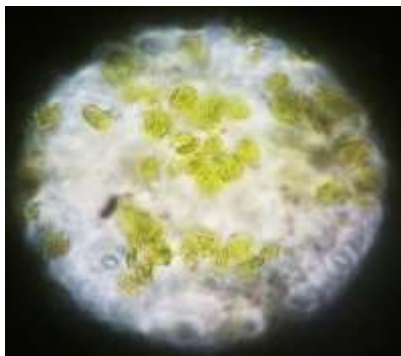
نام آغازگر	توالی	Tm (C)	طول (nt)
SP.P.FW	5'-CCCGGAATGGCACAATAAC-3'	۵۵	۲۲
SP.P.RV	5'-CTACAGGACGTAACATAGGCTGTAGCCACTG-3'	۶۳	۳۱
GUS.P.FW	5'-CAGTGGCTACAGCCTATGTTACGTCCTGTAG-3'	۶۳	۳۱
SP.S.FW	5'-TCTAGAATGGCCATGGCAACTCAAGC-3'	۶۴	۲۶
SP.S.RV	5'-CTACAGGACGTAACATTGCCGGGATAGAGTGG-3'	۶۵	۳۲
GUS.S.FW	5'-CCACTCTATCCCGGCAATGTTACGTCCTGTAG-3'	۶۵	۳۲
GUS.RV	5'-GAGCTCTCATTGTTTGCCCTCCCTG-3'	۵۹	۲۴
CaMV35S F	5'-CCCAAGCTTACAACGATAACACAAAACCT-3'	۵۵	۲۹
Actin F	5'-GCTATTCAGGCCGTTCTTTCTC-3'	۶۰/۳	۲۲
Actin R	5'-AGTACTTCAGGGCAACGGAATC-3'	۶۰/۳	۲۲
VirG F	5'-GGTCGCTATGCGGCATC-3'	۵۷/۶	۱۷
VirG R	5'-CCTGAGATTAAGTGTCCAGTCAG-3'	۶۰/۶	۲۳

\*جزئیات به کارگیری هر ترادف در متن ارائه شده است

انتقال سازه‌های ژنی به گیاه: برای انتقال سازه به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 مطابق روش استاندارد انجماد و ذوب و با استفاده از محلول استریل کلسیم کلراید (۲۰ میلی مولار) و ازت مایع عمل گردید (۱۵). در این مرحله، برای کنترل تراریختی، صحت و مقایسه پپتیدهای نشانه از سازه pBI121+GUS و سازه

انتقال سازه‌های ژنی به گیاه: برای انتقال سازه به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 مطابق روش استاندارد انجماد و ذوب و با استفاده از محلول استریل کلسیم کلراید (۲۰ میلی مولار) و ازت مایع عمل گردید (۱۵). در این مرحله، برای کنترل تراریختی، صحت و مقایسه پپتیدهای نشانه از سازه pBI121+GUS و سازه

کلروپلاست (۸) انجام گرفت. بمنظور کمی سازی داده‌های آزمایش، اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها با روش بردفورد (۵) انجام گرفت.



شکل ۱- کلروپلاست‌های استخراج‌شده (x100)

**سنجش کمی فعالیت آنزیم GUS در کلروپلاست‌ها:**  
 بمنظور تعیین میزان فعالیت GUS، باید ابتدا پروتئین تام از کلروپلاست‌های خالص‌شده استخراج گردد. جهت انجام این سنجش، مقادیر مساوی از محلول پروتئینی استخراج‌شده از کلروپلاست و سوبسترا (۵۰ میکرولیتر محلول پروتئینی حاوی GUS و ۵۰ میکرولیتر سوبسترای -۴MUG) ترکیب شد. سپس با افزودن میزان ۹۰۰ میکرولیتر بافر متوقف‌کننده سدیم کربنات ۰/۲ مولار، این واکنش خاتمه یافته و متوقف گردید. سنجش‌های فلوریمتری، با استفاده از دستگاه فلورسنت اسپکتروفوتومتر (Varian Carry Eclipse Fluorescence Spectrophotometer) به انجام رسید. اعداد بدست آمده از دستگاه، برای محاسبه مقدار MU استفاده شد (۱۰). نتایج حاصل از آزمون‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار IBMSPSS براساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل گردید.

## نتایج

در این مطالعه، باهدف انتخاب پپتید نشانه مناسب کلروپلاستی، ابتدا از میان ۱۶۰ پپتید نشانه از ژن‌ها و میزبان‌های مختلف براساس جایگاه برش، احتمال انتقال به

قرار داده تا خشک شوند. نمونه‌ها بلافاصله بر روی محیط MS هورمون دار بدون آنتی‌بیوتیک منتقل شدند؛ سپس به محیط انتخابی که حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۸ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین است انتقال یافتند. از این پس ظرف‌های پتری در نور مناسب (حداقل ۱۰۰۰ لوکس) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند تا نوساقه‌های متعددی روی بعضی از قطعات برگی بوجود آمد. نوساقه‌های سبز باززایی شده روی محیط گزینشگر، جداسده و به محیط طویل شدن نوساقه که حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم است، منتقل گردیدند.

**استخراج DNA از گیاه:** برای استخراج DNA ژنومی از گیاه، ۳۰ میلی‌گرم بافت برگ به کمک نیتروژن مایع منجمد و با استفاده از هاون چینی پودر و سپس طبق روش دوئل و دوئل (۸) استخراج انجام شد. برای کنترل کیفیت و کمیت DNA خالص‌شده، از روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتری (در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) استفاده شد. بعد از استخراج DNA از گیاه، برای تأیید کیفیت و صحت DNA استخراجی، ابتدا واکنش PCR با آغازگرهای ژن اکتین و نهایتاً واکنش با آغازگرهای پیشرو CaMV 35S و معکوس انتهای GUS انجام شد (جدول ۱). برای اطمینان از عدم آلودگی DNA ژنومی استخراج‌شده به ژنوم باکتری، از نمونه‌های مثبت، مجدداً با آغازگرهای اختصاصی ژن آگروباکتریوم (*VirG*)، واکنش PCR انجام گرفت.

**استخراج کلروپلاست از برگ:** بمنظور بررسی وضعیت عملکرد پپتیدهای نشانه در توانایی هدفمندسازی پروتئین GUS و بررسی تجمع این پروتئین در درون کلروپلاست‌ها، از نمونه گیاهانی که وجود قطعه ژنی SPP-GUS و SPS-GUS (بترتیب حاوی پپتید نشانه‌های گیاه اطلسی و اسفناج) و پپتید نشانه رویسکو در آن‌ها با PCR تأیید شده است و نمونه گیاه شاهد (غیر تراریخت)، استخراج

تأیید صحت طراحی و اطمینان از ساخت سازه‌های ژنی حاوی این پپتیدهای نشانه، قطعات موردنظر (توالی پپتید نشانه + ژن *gus*) مورد توالی‌یابی قرار گرفتند (شکل ۱).

کلروپلاست و آب‌گریزی، دو توالی نشانه از گیاهان اطلسی و اسفناج انتخاب گردیدند (جدول ۲) و ساختار دوم این پپتیدهای نشانه پس از اتصال به پروتئین GUS موردبررسی قرار گرفت (داده‌ها ارائه نشده است). همچنین، بمنظور

جدول ۲- اطلاعات مربوط به پپتیدهای نشانه انتخابی

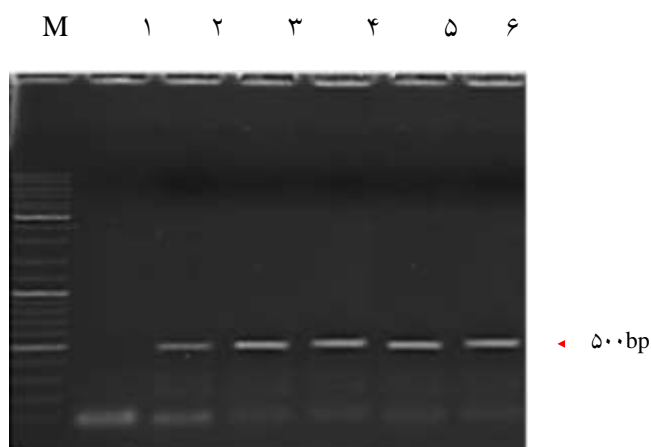
ژن	پروتئین	منبع	توالی، شماره شناسایی و طول
<i>psaD</i>	زیر واحد ۲ مرکز واکنش فتوسیستم ۱	اسفناج ( <i>Spinacia oleracea</i> )	>sp P12353 I-50 MAMATQATLFSPLLSSAKPIDTRLTTSFKQ PSAVTFASKPASRHHSIRA
<i>epeps</i>	آنزیم EPEPS	اطلسی ( <i>Petunia hybrida</i> )	>US20100022762A I_73 MAQINNMAQGIQTLNPNNSFHK PQVPKSSSFLVFGSKKLKNSANS MLVLKKDSIFMQKFCFRISASVATAACM



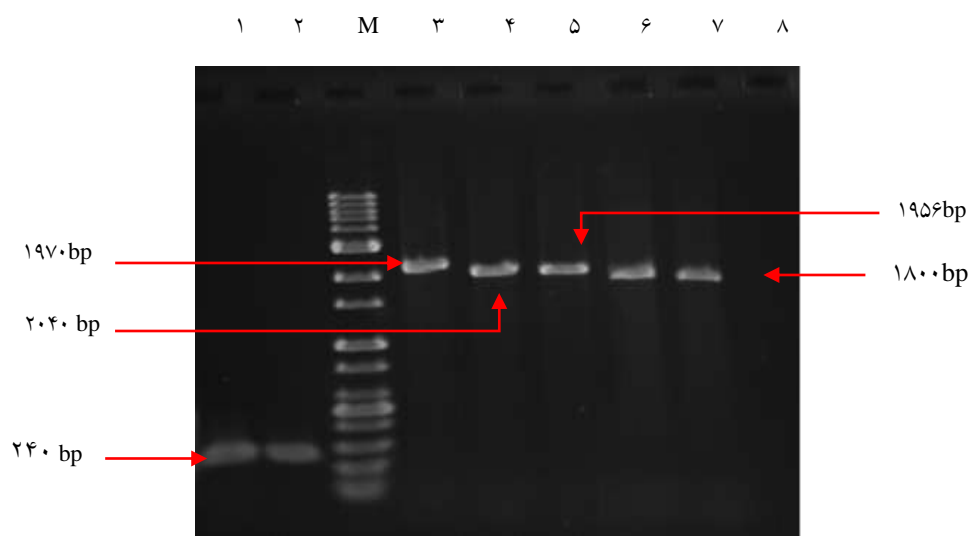
شکل ۲- نتایج حاصل از توالی‌یابی در محل اتصال پپتید نشانه و ژن *gus* بمنظور تأیید صحت طراحی و ساخت سازه‌ها در ناقل pJET1.2 (توالی محل اتصال پپتید نشانه و ژن *gus* روی شکل با خطوط قرمز مشخص شده است): الف) SPP+GUS، ب) SPS+GUS

تأیید کیفیت DNA استخراجی از گیاه واکنش PCR با آغازگرهای ژن اکتین بعنوان یکی از ژن‌های خانه‌دار انجام شد (شکل ۲). بمنظور اثبات حضور سازه‌های ژنی در گیاهان تراریخت شده، از آزمون PCR با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها استفاده بعمل آمد (شکل ۳).

پپتیدهای نشانه موردبررسی سپس به ابتدای توالی ژن گزارش‌گر *gus* متصل شده و سازه‌های نوترکیب حاصل از طریق تراریختی بواسطه آگروباکتریوم به گیاه مدل توتون جهت مطالعه عملکرد توالی‌ها در هدفمند کردن پروتئین موردبررسی به درون کلروپلاست، انتقال یافتند. بمنظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت، DNA ژنومی با استفاده از برگ‌های جوان و سبز گیاهان، استخراج گردید. برای



شکل ۳- آزمون تأیید صحت DNA استخراج‌شده از گیاهان تراریخت شده توتون به روش PCR با آغازگرهای ژن اکتین روی ژل آگارز ۱ درصد؛ M، نشانگر وزن مولکولی DNA (Mix 100bp, Fermentas)؛ چاهک ۱ کنترل منفی واکنش (فاقد نمونه الگو)؛ چاهک ۲ محصول PCR لاین غیر تراریخت؛ چاهک‌های ۳-۶ محصول PCR لاین‌های تراریخت شده بترتیب با سازه‌های pBI121-SPP+GUS، pBI121-SPS+GUS، pBI121+170، pBI121+GUS؛ تمامی چاهک‌ها حاوی قطعه‌ای اختصاصی به طول ۵۰۰ نوکلئوتید می‌باشند.



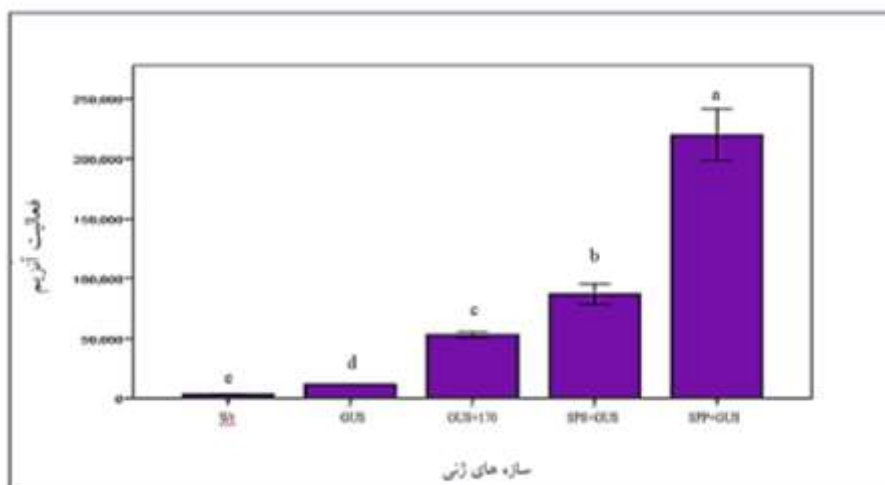
شکل ۴- تأیید حضور سازه‌های نوترکیب pBI121 بترتیب حاوی SPP+GUS، SPS+GUS، +GUS، +170 در DNA استخراجی از گیاهان توتون به روش PCR با آغازگرهای اختصاصی سازه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد با قطعات تکثیری بین ۱۸۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز؛ ستون M، نشانگر وزن مولکولی (Fermentas) 1kb plus؛ چاهک‌های ۱ و ۲، محصول PCR لاین تراریخته با SPP+GUS- با آغازگرهای SP-P-FW و SP-P-RV؛ چاهک‌های ۳-۸ محصول تکثیرشده با آغازگرهای BRT1 و GUS-RV؛ چاهک ۳ محصول PCR لاین تراریخته با +GUS170؛ چاهک ۴ محصول PCR لاین تراریخته با SPP+GUS؛ چاهک ۵ محصول PCR لاین توتون تراریخته با SPS+GUS؛ چاهک ۶ محصول PCR لاین تراریخته با pBI121+GUS؛ چاهک ۷ کنترل مثبت واکنش (DNA پلاسمیدی)؛ چاهک ۸ کنترل منفی واکنش (DNA لاین غیر تراریخت با آغازگرهای SP.P.FW و SP.P.RV).

داشته و هر سازه از نظر عملکرد در یک کلاس مجزا قرار گرفته است (جدول ۳، شکل ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس مقایسه فعالیت GUS بین گیاهان تراریخته حاوی سازه‌های مختلف ژنی.

عدد F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات
۲۵۳/۴۳۵*	۱/۵۶۱	۴	۶/۲۴۴
	۰/۰۰۶	۱۰	۰/۰۶۲
		۱۴	۶/۳۰۵

$P < 0.05^*$



شکل ۵- مقایسه کارایی پپتیدهای نشانه با استفاده از مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم GUS در کلروپلاست‌های جدا شده از گیاهان تراریخت توتون (هر یک از حروف انگلیسی بیانگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد است).

پلیمرهای قابل تجزیه را فراهم آورده‌اند. از مزایای بیان در گیاهان در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی، می‌توان به کاهش هزینه‌ها، امکان تغییر سریع مقیاس تولید، عدم حضور اندوتوکسین‌ها و پاتوژن‌های انسانی اشاره کرد (۱۷).

یکی از عوامل مهم در طراحی یک سازه ژنی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب که باعث افزایش میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان نیز می‌گردد، استفاده از پپتیدهای نشانه است (۱۶). برخی از این پپتیدها موجب

## بحث

فناوری مهندسی ژنتیک امکان بیان ژن‌های خارجی را در انواع گیاهان میزبان ایجاد کرده است. با توجه به روش‌های تراریختی سریع و کارا، می‌توان نیز گیاهان بعنوان سیستمی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده نمود (۱۸). گیاهان یک سیستم ارزان و راحت، جهت تولید ماکرومولکول‌های ارزشمندی چون پروتئین‌های دارویی و تشخیصی، آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌ها و زیست

انتقال پروتئین نوترکیب تولیدشده در سیتوپلاسم به کلروپلاست می‌شوند. اطلاعات لازم برای هدفمند شدن پروتئین به سمت اندامک موردنظر، توسط بخشی از توالی پپتیدی که معمولاً در انتهای آمینی پروتئین قرار گرفته است و پپتید نشانه نام دارد، مهیا می‌گردد (۲۰). در میان اندامک‌های درون سلول‌های گیاهی، کلروپلاست‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. این اندامک محل بسیاری از اعمال حیاتی سلول محسوب می‌گردد. بعنوان مثال، آنزیم *epsps* توسط ژن‌های موجود در ژنوم هسته‌ای رمزگذاری شده و پس از ساخته شدن در ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی، به درون کلروپلاست‌ها هدایت شده تا در مسیر بیوستز اسیدهای آمینه آروماتیک ایفای نقش بنماید (۳). با توجه به جایگاه وقوع مسیر شیکیمات در کلروپلاست گیاهان، از توالی‌های نشانه کارآمد ژن‌های گیاهی برای هدایت این آنزیم کلیدی (که جایگاه هدف علف‌کش گلایفوسیت نیز است) به درون کلروپلاست طی دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان زراعی برای ایجاد صفت مقاومت به علف‌کش می‌توان استفاده کرد. (۲).

از طرف دیگر، انتقال ژن به کلروپلاست مزایای زیادی را به همراه دارد از جمله اینکه تعداد نسخه‌های ژن انتقالی زیاد است و اثرات خاموشی ژن در کلروپلاست دیده نمی‌شود. به همین دلیل سطح بیان ژن‌های انتقال یافته بسیار بالا است. همچنین تعداد بسیار زیاد کروپلاست در اندام‌های مختلف گیاهی می‌تواند به بیان فزاینده ژن موردنظر منجر شود. همچنین تجمع پروتئین‌ها در کلروپلاست، سمیت آن‌ها را محدودتر می‌سازد (۳). این در حالی است که تا خوردن عملکردی در دانه گرده، فرار ژنی DNA، عدم وجود پروتئین، اضافه شدن مولکول‌های قندی و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در کلروپلاست صورت نمی‌گیرد. بر این اساس تولید گلیکوپروتئین‌ها در کلروپلاست محدود می‌شود. علاوه بر کلروپلاست گزارش‌هایی در مورد تراریخت نمودن سایر پلاست‌های گیاهی در هویج، گوجه‌فرنگی و برخی میوه‌جات وجود دارد (۶).

آنالیزهای آماری نشان داد که پپتید نشانه ژن *epsps* گیاه اطلسی نسبت به پپتید نشانه ژن *pcaD* از اسفناج و پپتید نشانه روبیسکو آرابیدوپسیس بطور بسیار معناداری کارآمدتر است. این کارآمدی را شاید بتوان بعلت هم تیره بودن گیاه اطلسی و توتون (بعنوان گیاه میزبان در این مطالعه) دانست که هر دو از تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) می‌باشند. طبق مطالعات صورت گرفته توسط چن و همکاران، میزبان نقش مهمی در کارایی پپتید نشانه دارد (۶). احتمال دیگر در خصوص کارایی چشمگیرتر پپتید نشانه اطلسی نسبت به پپتید نشانه بکاررفته از گیاه اسفناج و پپتید نشانه روبیسکو (شاهد)، می‌تواند ناشی از تجمع بیشتر پروتئین هدف در غشای بیرونی و داخلی کلروپلاست‌ها باشد تا اینکه بتواند بطور مستقیم وارد کلروپلاست شود و بدین ترتیب، احتمالاً پروتئین هدفمند شده با پپتید نشانه اطلسی بیشتر در کلروپلاست تجمع می‌یابد (۱). مطالعات دیگر نشان داده که برخی آمینواسیدها در پپتید نشانه حفاظت شده هستند و برخی بستگی به گیاه میزبان می‌تواند متغیر باشد و کارایی پپتید نشانه را تغییر دهد. علاوه بر این، طول پپتید نشانه نیز در کارایی هدفمندسازی تجمع پروتئین نقش مهمی دارد (۲). طبق مطالعات صورت گرفته، توالی‌های بسیار بلند و کوتاه پپتید نشانه کارایی خوبی ندارند، پپتیدهای نشانه با طول توالی ۵۰ تا ۷۰ مناسب هدفمندی پروتئین به کلروپلاست هستند، بنابراین در این مطالعه سعی بر این شد که طول توالی پپتید نشانه در دامنه مناسبی قرار گیرد (۷) تا به نحوی تاثیر طول توالی در نتایج آزمون‌های صورت گرفته به حداقل برسد. بنابراین، می‌توان این چنین پیشنهاد کرد که جهت بهره‌مندی از کارایی بهتر تولید پروتئین نوترکیب در سیستم گیاهی، بهتر است از پپتیدهای نشانه حاصل از گیاه هم-خانواده استفاده شود تا با به حداقل رسیدن اثر میزبان، بیشترین میزان هدفمندی صورت گیرد.

از طرف دیگر، انتقال ژن به کلروپلاست مزایای زیادی را به همراه دارد از جمله اینکه تعداد نسخه‌های ژن انتقالی زیاد است و اثرات خاموشی ژن در کلروپلاست دیده نمی‌شود. به همین دلیل سطح بیان ژن‌های انتقال یافته بسیار بالا است. همچنین تعداد بسیار زیاد کروپلاست در اندام‌های مختلف گیاهی می‌تواند به بیان فزاینده ژن موردنظر منجر شود. همچنین تجمع پروتئین‌ها در کلروپلاست، سمیت آن‌ها را محدودتر می‌سازد (۳). این در حالی است که تا خوردن عملکردی در دانه گرده، فرار ژنی DNA، عدم وجود پروتئین، اضافه شدن مولکول‌های قندی و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در کلروپلاست صورت نمی‌گیرد. بر این اساس تولید گلیکوپروتئین‌ها در کلروپلاست محدود می‌شود. علاوه بر کلروپلاست گزارش‌هایی در مورد تراریخت نمودن سایر پلاست‌های گیاهی در هویج، گوجه‌فرنگی و برخی میوه‌جات وجود دارد (۶).

از طرف دیگر، انتقال ژن به کلروپلاست مزایای زیادی را به همراه دارد از جمله اینکه تعداد نسخه‌های ژن انتقالی زیاد است و اثرات خاموشی ژن در کلروپلاست دیده نمی‌شود. به همین دلیل سطح بیان ژن‌های انتقال یافته بسیار بالا است. همچنین تعداد بسیار زیاد کروپلاست در اندام‌های مختلف گیاهی می‌تواند به بیان فزاینده ژن موردنظر منجر شود. همچنین تجمع پروتئین‌ها در کلروپلاست، سمیت آن‌ها را محدودتر می‌سازد (۳). این در حالی است که تا خوردن عملکردی در دانه گرده، فرار ژنی DNA، عدم وجود پروتئین، اضافه شدن مولکول‌های قندی و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در کلروپلاست صورت نمی‌گیرد. بر این اساس تولید گلیکوپروتئین‌ها در کلروپلاست محدود می‌شود. علاوه بر کلروپلاست گزارش‌هایی در مورد تراریخت نمودن سایر پلاست‌های گیاهی در هویج، گوجه‌فرنگی و برخی میوه‌جات وجود دارد (۶).

## نتیجه‌گیری

نشانه روبیسکو (۲، ۱۹ و ۲۲) نیز مشاهده گردید که مؤید تأثیر مهم آنالیزهای بیوانفورماتیکی صورت گرفته قبل از انتخاب توالی مورد استفاده بود. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، می‌توان از این پپتیدهای نشانه برای هدف‌سازی پروتئین‌های خارجی به کلروپلاست گیاهان دست‌ورزی شده ژنتیکی با اهداف صفات مطلوب زراعی و یا تولید داروهای نوترکیب بهره‌گرفت (۱۹ و ۲۲).

طبق نتایج حاصله از بررسی‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی این دو پپتید نشانه، مشاهده گردید که هر دوی این پپتیدها قادرند پروتئین با منشأ خارجی و غیر کلروپلاستی را بصورت کارایی به کلروپلاست منتقل کنند. علاوه بر تأیید نتایج بیوانفورماتیکی توسط نتایج آزمایشگاهی، کارایی بالاتر پپتیدهای نشانه ژن *epsps* گیاه اطلسی و پپتید نشانه ژن *pcad* از اسفناج نسبت به پپتید

## منابع

۱. سلیمانی زاده، م.، جلالی جواران، م. و باقری، ع. (۱۳۹۸). زراعت مولکولی و راهکارهای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۱۱، شماره ۲، صفحه ۱۰۱-۱۲۶.
۲. قوامی، م. ل.، موسوی، الف.، سلیمانان، ع. ه. و هادی، ف. (۱۳۹۴). تراریختی گیاه کلزا با ساختار ترکیبی حاوی ژن جهش‌یافته *epsps* و ترادف نشانه کلروپلاستی بمنظور افزایش تحمل به علف‌کش گلایفوسیت. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۱۰۷-۱۲۰.
3. Adem, M., Beyene, D. and Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 13(1), p.30.
4. Andersen, C.P., King, G., Plocher, M., Storm, M., Pokhrel, L.R., Johnson, M.G. and Rygielwicz, P.T. (2016). Germination and early plant development of ten plant species exposed to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9), pp.2223-2229.
5. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp.248-254.
6. Chen, L., Wang, X., Wang, L., Fang, Y., Pan, X., Gao, X. and Zhang, W. (2019). Functional characterization of chloroplast transit peptide in the small subunit of Rubisco in maize. *Journal of plant physiology*, 237, pp.12-20.
7. Chotewutmontri, P., Holbrook, K. and Bruce, B.D. Plastid protein targeting: preprotein recognition and translocation. In *International review of cell and molecular biology* 2017, (Vol. 330, pp. 227-294). Academic Press.
8. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, pp.13-15.
9. Fallahi, S. and Mohammadhassan, R. (2020). A Review of Pharmaceutical Recombinant Proteins and Gene Transformation Approaches in Transgenic Poultry. *Journal of Tropical Life Science*, 10(2), pp.163-173.
10. Gallagher, S.R. (2012) ed. GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press.
11. Gallois, P., & Marinho, P. (1995). Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. *Plant gene transfer and expression protocols*, 39-48.
12. Ge, C., Spänning, E., Glaser, E. and Wieslander, Å. (2014). Import determinants of organelle-specific and dual targeting peptides of mitochondria and chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 7(1), pp.121-136.
13. He, L., Zhang, S., Qiu, Z., Zhao, J., Nie, W., Lin, H., Zhu, Z., Zeng, D., Qian, Q. and Zhu, L., (2018). FRUCTOKINASE-LIKE PROTEIN 1 interacts with TRXz to regulate chloroplast development in rice. *Journal of integrative plant biology*, 60(2), pp.94-111.
14. He, L., Chen, G., Zhang, S., Qiu, Z., Hu, J., Zeng, D., Zhang, G., Dong, G., Gao, Z., Ren, D. and Shen, L. (2019). Functional Analysis of Three Rice Chloroplast Transit Peptides. *Rice Science*, 26(1), pp.11-20.

15. Holsters, M., De Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., & Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 163(2), 181-187.
16. Lee, D.W. and Hwang, I. (2018) Evolution and design principles of the diverse chloroplast transit peptides. *Molecules and cells*, 41(3), p.161.
17. Mohammadhassan, R., Esfahani, K. and Kashefi, B. (2018). Constructional and Functional Evaluation of Two New Plant Expression Vectors—pBI121 gus- and pBI121 5+ 1. *Banat's Journal of Biotechnology*, 9(17), pp.60-68.
18. Mohammadhassan, R., Kashefi, B. and Delcheh, K.S. (2014). *Agrobacterium*-based vectors: a review. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(9), pp.1002-1008.
19. Morgenfeld, M. M., Vater, C. F., Alfano, E. F., Boccardo, N. A., & Bravo-Almonacid, F. F. (2020). Translocation from the chloroplast stroma into the thylakoid lumen allows expression of recombinant epidermal growth factor in transplastomic tobacco plants. *Transgenic research*, 29(3), 295-305.
20. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A. and Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European journal of cell biology*, 97(6), pp.422-441.
21. Richardson, L.G., Small, E.L., Inoue, H. and Schnell, D.J. (2018). Molecular topology of the transit peptide during chloroplast protein import. *The Plant Cell*, 30(8), pp.1789-1806.
22. Shen, B.R., Zhu, C.H., Yao, Z., Cui, L.L., Zhang, J.J., Yang, C.W., He, Z.H. and Peng, X.X. (2017). An optimized transit peptide for effective targeting of diverse foreign proteins into chloroplasts in rice. *Scientific reports*, 7, p.46231.

## Functional study of two signal peptides derived from *Petunia* (*Petunia × hybrida*) and Spinach (*Spinacia oleracea*) in order to transfer recombinant proteins to chloroplast

Adigozali Behrouz M., Mousavi\* A. and Salmanian A.H.

Dept. of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Signal peptides can be used to effectively transfer recombinant proteins into chloroplast for their appropriate functionality or storage. In this study, the efficiency of candidate signal peptides was studied using *in silico* and *in vitro* approaches. At first, the cleavage sites, ability to transport into chloroplast, and hydrophobicity of 16 signal peptides were analyzed by bioinformatic tools. The secondary structures of the transcripts of reporter gene fused to these signal peptides were also predicted. In the next step, signal peptides of *epsps* and *pcaD* genes, respectively from petunia (*Petunia × hybrida*) (and spinach) *Spinacia oleracea* (were cloned using specific primers.  $\beta$ -glucuronidase gene and each signal peptides coding sequences were fused together. The resulting fragments were then transferred by *Agrobacterium tumefaciens* and over-expressed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) (as a model plant. Chloroplasts were extracted from transgenic young and green leaves and  $\beta$ -glucuronidase activity was assayed qualitatively and quantitatively. The results showed that GUS was present and active in chloroplasts and the *epsps* signal peptide was more effective than *pcaD* in transferring the target protein. In conclusion, we can speculate that the identified signal sequences have the potential to transfer recombinant proteins into plastids for more effectiveness or for storage and extraction purposes.

**Keywords:** Chloroplast, Signal Peptide, Gene Transformation, *Spinacia oleracea*, SOEing PCR