بهینه سازی انتقال همزمان چندین ناقل به اگروباکتریوم

فاطمه علیزاده آریمی [1*]، ویدا چالوی [2]، علی دهستانی [3]
1- دانشجوی کارشناسی.2- استادیار گروه باغبانی. 3- استادیار گروه اصلاح نبات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، صندوق پستی 578، ساری، مازندران.
v.chalavi@sanru.ac.ir

چکیده

در سال های اخیر، بهره‌گیری از تکنولوژی انتقال ژن به گیاهان به سرعت گسترش یافته است. هنوز هم، برترین روش انتقال ژن به گیاهان ، بویژه گیاهان دولپه، با واسطه اگروباکتریوم می‌باشد. یکی از ناقل‌های مناسب برای اگروباکتریوم ناقل pGreen می باشد. این ناقل جهت همانند سازی در اگروباکتریوم نیاز به پلاسمید کمکی pSoup دارد. روش های مختلفی جهت انتقال هر دو ناقل به اگروباکتریوم وجود دارد، مانند انتقال همزمان و انتقال پی در پی این ناقل ها با روش‌های الکتروپوریشن و انجماد و ذوب. در پژوهش حاضر، کارایی روش های انتقال پی در پی و همزمان پلاسمیدهای pSoup و pGreen0029 مهندسی شده حامل ژن های bphAEG، موثر در تجزیه بی فنیل های پلی کلرینه ، به اگروباکتریوم سویه ی LBA4404، به روش انجماد و ذوب مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، فقط انتقال پی در پی این دو ناقل با روش انجماد و ذوب موفیت‌آمیز بود. در این آزمایش ابتدا پلاسمیدpSoup به سلول های مستعد اگروباکتریوم انتقال یافت و سپس ناقلpGreen0029 حاوی bphAEG به سلول های مستعد اگروباکتریوم حامل pSoup منتقل شد. در پایان، وجود هر دو پلاسمید در اگروباکتریوم سویه ی LBA4404 با آزمون PCR تایید شد. از طرف دیگر، در انتقال همزمان این دو ناقل به روش انجماد و ذوب هیچ کلونی نوترکیبی بر روی محیط انتخابی مشاهده نشد. در نتیجه برای انتقال چندین پلاسمید به اگروباکتریوم با استفاده از روش انجماد و ذوب، بهتر است که پلاسمید ها در دو مرحله و به صورت پی در پی انتقال یابند.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، پلاسمید، انتقال همزمان نافل‌ها

مقدمه:

سیستم انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم ، اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان است. بدلیل عدم محدودیت در اندازه ی قطعات DNA نوترکیب، تلفیق دقیق DNA، سادگی و کم هزینه بودن، استفاده از اگروباکتریوم، هنوز هم بعنوان یکی از کارامدترین روش های انتقال ژن در گیاهان شناخته می‌شود.یکی از این ناقل های دوگانه که برای انتقال ژن به گیاه به واسطه آگروباکتریوم به کار می رود، ناقل pGreen میباشد که با ویژگی هایی نظیر کاهش سایز پلاسمید و داشتن چندین مکان کلون کردن ژن به عنوان یک حامل مناسب انتخاب شده است. طراحی این وکتور بر اساس ناقل عمومی pBluescript بوده که ناحیه ی pColiEl (جهت همانندسازی در Ecoli) ، لوکوس همانندسازی pSa (جهت همانندسازی در اگروباکتریوم) و ژن Npt1 (رمز کننده ی مقاومت به کانامایسین) در آن تعبیه شده است. تاکنون از این ناقل استفاده های گوناگونی شده است. در پژوهشAfolabi و همکاران (2005) احتمال تولید برنج تراریخته بدون مارکر با استفاده از سیستم ناقلین دوگانه pG/pS مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در پژوهش محمدی و همکاران(2007)نیز جهت انتقال ژنهای بیفنیل کلرو بیفنیل دی اکسیژنز به گیاه توتون از ناقل دوگانه pGreen0029به همراه pSoup استفاده شده. در تحقیقی دیگر نیز جهت افزایش کارایی ترانسفورماسیون مرکبات و گیاهان چوبی از ناقل pGreen به همراه کاست ژن گزارشگر GFP استفاده گردیدChen و همکاران(2007). هم چنین جهت بهینه سازی انتقال ژن به کاهو از ناقل دوگانه pBI121 حامل ژن گزارشگر GUS استفاده شد(هنری و همکاران(1391).جهت انتقال ناقل های دوگانه به اگروباکتریوم، میتوان از دو روش انتقال همزمان و انتقال پی در پی ناقل ها با استفاده از روش های ذوب و انجماد و الکتروپوریشن استفاده کرد. هر یک از این روش ها دارای مزایا و معایبی می باشند. الکتروپوریشن علاوه بر قابلیت کاربرد در

گیاهان تک لپه و دولپه دارای مزایایی هم]چون سرعت و راندمان بالا، قابلیت استفاده در گونه های مختلف گیاهی و سمیت کم برای سلول است. از طرفی دیگر نیاز داشتن به دستگاهای مجهز وتهیه ی کووت با توجه به تحریم بودن، از معایب این روش می باشد. روش ذوب و انجماد نیز علی رغم کارایی کمتر، به دلیل کم هزینه بودن و عدم نیاز به دستگاهای مجهزکاربرد فراوانی دارد.هدف پژوهش حاظر انتقال pGreen0029 مهندسی شده حامل ژن های bphAEGکه این ژن ها موثر در تجزیه بی فنیل های پلی کلرینه شده هستند (pGAEG)، به اگروباکتریوم سویه ی LBA4404 با استفاده از روش ذوب و انجماد می باشد.در این پژوهش کارایی روش های انتقال پی در پی و همزمان ناقل ها به این سویه مورد بررسی قرار میگیرد.

مواد وروش ها:

تهیه پلاسمید:این تحقیق در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. سازه حاوی ژن bphAEG که شامل سه ژن bphE وbph A, bphG میباشد، در سال 2006 توسط محمدی و همکاران در ناقل دوگانه pGreen0029 با پیشبرنده 35S ،کلون گردید. از باکتری Esherichia با نژاد DH5α به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیرناقل استفاده گردید. همچنین پلاسمید pGreen0029 حامل ژن های bphAEG بر اساس دستورالعمل سمبرگ و همکاران (1989)، از باکتری Ecoli سویه ی DH5α استخراج و پس از مشاهده باند پلاسمید بر روی ژل آگارز یک درصد، جهت انتقال به اگروباکتریوم استفاده شد.

تهیه سلول های مستعد اگروباکتریوم: از باکتری از *Agrobacterium tumefacience* سویه ی LBA4404 جهت انتقال ژن به گیاه استفاده گردید. تک کلونی اگروباکتریوم سویه LBA4404 در 10میلی لیتر از محیط کشتLB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپیسین با غلظت 50 میلی گرم در لیتر، به مدت 2 شبانه روز در دمای 28 درجه سانتی گراد با دور 180شیکر شد. وقتی تراکم باکتری ها (OD_{600}) بین 0/4- 5/ 0 رسید، محیط محتوی اگروباکتریوم در دور 3500 و دمای 4درجه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله طی دو مرحله با کلرید کلسیم سرد و استریل20 میلی مولار شستشو داده شد. سپس درانتهای کار رسوب مجددا در 2میلی لیتر کلرید کلسیم سرد و استریل به همراه 500 میکرولیتر گلیسرول استریل حل گردید و بالافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد .

انتقال سازه های پلاسمیدی خالص شده به اگروباکتریوم: انتقال با استفاده از روش ذوب و انجماد طی دو مرحله آزمایش شامل انتقال همزمان وانتقال پی در پی صورت گرفت. در آزمایش اول که به صورت انتقال همزمان بوده، pSoup به همراه پلاسمید pGAEGبه سلول های مستعد اگروباکتریوم سویه نامبرده اضافه گرید. سپس به مدت 5 دقیقه ابتدا درون نیتروژن مایع و سپس بالافاصله در دمای 37 درجه قرار گرفتند. یک میلی لیتر محیط LB مایع به آنها اضافه گردید و به مدت 2 ساعت در دمای 28 درجه با دور 180شیکر شدند. در انتهای کارپس از سانتریفیوژ با دور 5000، رسوب باکتری در 100میکرولیتر از فاز رویی حل گردید و بر روی محیط کشت جامد حاوی انتی بیوتیکهای ریفامپیسین (با غلظت 50 میلی گرم در لیتر) و تتراسایکلین (با غلظت 5 میلی گرم در لیتر)و کانامایسین (با غلظت 50 میلی گرم در لیتر) پخش گردید ودر انکوباتور در دمای 28 درجه به مدت 2-3 روز قرار داده شدند.

در آزمایش دوم که بصورت انتقال پی در پی ناقل ها بوده، ابتدا 5 میکرولیترپلاسمیدpSoup، با روشی مشابه با روش مرحله ی اول(ذوب و انجماد) به سلول های مستعد اگروباکتریوم سویه ی LBA4404، اضافه گردید و سپس روی محیط LB حاوی 50 میلی گرم در لیتر ریفامپیسین و 5 میلی گرم در لیتر تتراسایکلین بطور یکنواخت پخش گردید. پس از جذب سلول های باکتری در سطح پتری‌دیش، به مدت 2-3 روز در انکوباتور با دمای 28 درجه نگهداری شدند. بعد از 3 روز، ،جهت تایید درستی تراریخته بودن کلونی های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی رشد کرده بودند، آزمون کلونی PCR انجام شد و سپس از این اگروباکتریوم‌های حاوی pSoup، سلول های مستعد مشابه با روش قبلی، تهیه گردید. در مرحله ی بعد، به سلول های مستعد حامل

pSoup، با روش ذوب و انجماد، پلاسمید pGAEG اضافه گردید و بر روی محیط LB جامد حاوی 50 میلی گرم در لیتر ریفامپیسین، 5 میلی گرم در لیتر تتراسایکلین و 50 میلی گرم در لیتر کانامایسین بطور یکنواخت پخش شدند. سپس به مدت 3-2 روزدر انکوباتور با دمای 28 درجه قرار داده شدند.

تهیه آغازگرها وآزمون PCR: مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR اعم ازآنزیم Taq polymerase, dntp و $mgcl_2$ از شرکت فرمنتاس تهیه گردید. آغازگر مورد استفاده برای تکثیر قطعه ژنی bphA بوسیله نرم افزار oligo و توسط شرکت ژن فن آوران تهیه گردیدکه عبارت بودنداز ; 5' ATG AGT TCA GCA ATG AAA 3'

bph A- Forward

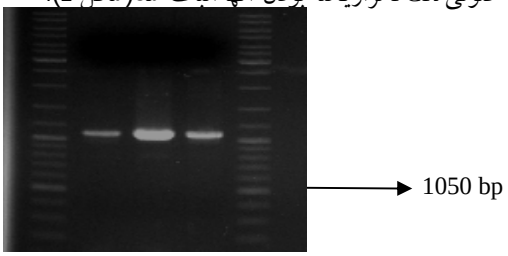
- Backward: 5' GCG CAT CAT GGA CTC GGG 3'

bphA

برای تکثیر قطه ژنی bphA ابتدا واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه انجام شد.سپس واسرشته سازی ، اتصال و طویل شدن به ترتیب در دماهای 51،94 و 72 درجه و هر کدام به مدت 1 و در 35 سیکل انجام شد. در نهایت طویل شدن نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72صورت گرفت.

نتایج و بحث:

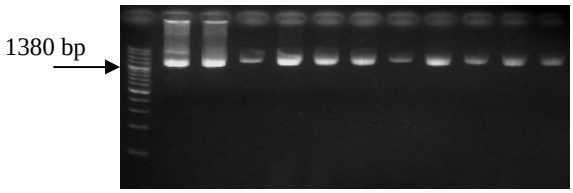
نتایج بدست آمده نشان دادند که انتقال پی‌درپی دو ناقل pSoup و pGreenAEG به سلول های مستعد اگروباکتریوم موفقیت آمیز بود و کلونی‌های نوترکیب بر روی محیط انتخابی مشاهده شدند، که با آزمون PCR تراریخته بودن و وجود پلاسمیدها در اگروباکتریوم اثبات شد. بعد از انتقال پلاسمید pSoup به سلول های مستعد اگروباکتریوم، کلونی های نوترکیب در سطح پلیت مشاهده شد که با آزمون کلونی PCR تراریخته بودن آنها اثبات شد(شکل 1). M C 1 2 M



شکل 1:M : مارکر 10000bp- C^+:کنترل مثبت (پلاسمیدpSoup)- شماره های 1و2: تایید حضور قطعه 1050 bp در اگرباکتریوم با Colony PCR

در ادامه نیز، پس از انتقال ناقل pGAEG به سلول های مستعد حامل pSoup، بر روی محیط انتخابی کلونی های نوترکیب ظاهرشد که با انجام آزمون کلونی PCR، تراریخته بودن همه ی کلونی ها اثبات گردید (شکل 2).

M C C 1 2 3 4 5 6 7 8 9



شکل 2: مارکر bp 10000 - +C:کنترل مثبت(پلاسمید pGAEG)- شماره های 1الی9: تایید حضور قطعهbp 1380در اگروباکتریوم با Colony PCR

در این پژوهش با انتقال همزمان دو ناقل pSoup و pGreenAEG به سلول های مستعد اگروباکتریوم، هیچ کلونی نوترکیبی بر روی محیط انتخابی رشد نکرد. . در حالیکه گزارش شده است که دو ناقل pSoup و pGreenAEG بطور همزمان با استفاده از روش ذوب و انجماد به اگروباکتریوم سویه ی AGL1 جهت تولید برنج تراریخته بدون مارکرتوسط Afolabi و همکاران (2005)،انتقال یافتند. گزارش‌های فراوانی در مورد استفاده از روش الکتروپوریشن برای انتقال همزمان دو ناقل وجود دارد. به عنوان مثال، در پژوهش محمدی و همکاران(2007)، جهت انتقال ژنهای کلرو بیفنیل کلرو دی اکسیژنز به باکتری سویه یLBA4404 از روش الکتروپوریشن برای انتقال همزمان دو وکتور pGreen و pSoup استفاده کردند. همچنین، جهت افزایش کارایی انتفال پلاسمید به اگروباکتریوم برای انتقال ژن به مرکبات و گیاهان چوبی ، از انتقال همزمان ناقلین با استفاده از روش الکتروپوریشن استفاده شده است (Chen و همکاران(2007). بطور کلی، روش الکتروپوریشن کارایی بهتری برای انتقال پلاسمید دارد و با درصد بالاتری از موفقیت همراه است و در صورت داشتن مواد و تجهیزات لازم بهتر است از این روش برای انتقال پلاسمید به اگروباکتریوم استفاده شود. در صورت نبودن وسایل و امکانات برای روش الکتروپوریشن، چاره‌ای به جز استفاده از روش ذوب و انجماد نیست.

همچنین میتوان یافته های بدست آمده را به نقش مهم پلاسمید کمکی pSoup در همانندسازی پلاسمیدpGreen ارتباط داد، چرا که پلاسمید pGreen بدون پلاسمید کمکی خود قادر به همانند سازی در سویه های مختلف اگروباکتریوم نمی باشد. از انجایی که pGreen برای همانند سازی نیاز به عملکرد ژن RepA از لوکوس همانندسازی pSa دارد، ابتدا باید pSoup در سویه ی اگروباکتریوم مورد نظر مستقر شود و با تکثیر pSoup ،کپی های زیادی از لوکوس همانند سازی pSa تولید شود تا در نهایت ژن RepA قادر به انجام عملکرد خود باشد. بنابراین با انتقال پی در پی وکتورها میتوان کارایی بالاتری در ترانسفورماسیون انتظار داشت، بدین صورت که پلاسمید کمکی زمان کافی جهت تکثیر لوکوس همانندسازی خواهد داشت ومتعاقبا توانایی تکثیر پلاسمید اصلی توسط پلاسمید کمکی افزایش خواهد یافت.

منابع:

1- هنری، ح.، ه. علیزاده، ع. شاه نجات بوشهری، ع. پیغمبری، م. جلالی و ر. براهیپور. 1391. عوامل موثر در انتقال ژن گزارشگر A *uid* با استفاده از اگروباکتری به گیاه کاهو(*Latuca sativa L.*). مجله علوم باغبانی ایران. 43(1): 91-101.

2- Afolabi, A.S, B. worland, T.Snape and P. vain. 2005. Novel pGreen/pSoup dual-bionary vector system in multiple T-DNA Co-cultivation as a method of producing marker free (clean gene) transgenic rice (oriza sativa l.) plant. African journal of biotechnology. 4(6): 531-540.

3- Chen, C., Q.Zheng, X. Xiang and F. Gmitter. 2007. Development of pGreen-derive GFP Binary vectors for citrus transformation. Journal of Hortscience. 42(1): 7-10

4- Hellens, R., A. Edwards, N. leyland, S. Bean and P. Mullineaux. 2000. pGreen: a vector and flexible binary Ti vector for Agrobacterium - mediated plant transformation. Jornal of the plant molecular biology. 42:819-832.

5- Mohammadi, M., V.Chalavi, M. Novakova, J. laliberte and M. sylvestre. 2007. Expression of Bacteria Byphenyl-Chlorobiphenyl Dioxygenase Genes in Tobacco Plants. Journal of Biotechnology and Bioengineering. 97(3): 496-550.

Optimizing co-transformation of multiple vectors into Agrobacterium

F. Alizadeh[1], V. Chalavi[2] and A. Dehestani[3]

[,1,2,3]*Department of Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, PO-Box 578; v.chalavi@sanru.ac.ir*

Abstract:
In recent years, taking advantage of plant gene transformation technology has been increased rapidly. Still, the best method for plant gene transformation, especially for dicotyledon plants, is Agrobacterium mediated. One of the compatible Ti vectors for Agrobacterium, is pGreen vector. For multiplication in Agrobacterium, this vector needs a helper plasmid, pSoup. There are different methods for transformation of two vectors into Agrobacterium, like co-transformation or successive transformation by using either electroporation or freeze.thaw methods. In present study, the efficiency of successive transformation and co-transformation of plasmids pSoup and an engineered pGreen0029 carrying bphAEG genes), involved in catabolic pathway of polychlorinated biphenyls (PCBs), into Agrobacterium strain LBA4404 by freeze.thaw method was investigated. According to obtain results, only successive transformation of these two vectors with freeze.thaw method was successful. In this experiment, first pSoup plasmid was transformed. At the end, the existence of both plasmids was confirmed by PCR analysis. On the other hand, in co-transformation of these two vectors with freeze.thaw methods no recombinant colony was observed on selection medium. Therefore, for multiple plasmid transformation into Agrobacterium by freeze.thaw methods, two steps and successive transformation are prefered.

Keywords; Agrobacterium, Plasmid, Successive transformation of vectors.