نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ٦٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٢
٢٣٣

تاریخ دریافت: ١٣٩١/١١/٢٥
تاریخ پذیرش: ١٣٩٢/٢/٧

انتقال ژن hrGFP به تیرهٔ سلولی ZF_4 ماهی زبرا با استفاده از پروتئین‌های نوترکیب virD٢ & virE٢

ندا قوتی؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران
حمید فرحمند *؛ گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران
هوشنگ علیزاده؛ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران

چکیـــده

یکـــی از چالش‌های فرایند انتقال ژن در ماهیان، توســـعهٔ سیســـتم‌هایی بـــرای انتقال کارآمد DNA اســـت. در این پژوهش از پروتئین‌های باکتریایی برای هدفمندســـازی انتقال ژن به تیرهٔ ســـلولی ماهی زبرا استفاده شده اســـت. اگروباکتریوم با نام علمی *Agrobacterium tumefaciens* قادر به انتقال کارآمد DNA خود به صورت یک مجموعه DNA–Protein به سلول‌های گیاهی است. پروتئین‌های اگروباکتریوم VirD٢ و VirE٢ در این فرایند نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در این مطالعه با ساخت یک مجموعه مشـــابه سیستم اگروباکتریوم، متشکل از DNA تک‌رشته‌ای و پروتئین‌های VirE٢ و VirD٢ به صورت in vivo، به بررسی پتانسیل این روش در افزایش کارایی فرایند انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF٤ ماهی زبرا پرداختیم. نتایج نشان داد که VirE٢ و VirD٢ سبب بهبود کارایی انتقال DNA به ژنوم تیرهٔ سلولی ماهی زبرا شدند.

واژگان کلیدی: انتقال ژن، اگروباکتریوم، تیرهٔ سلولی، پروتئین نوترکیب، ژن hrGFP، ماهی زبرا.

* نویسنده مسئول تلفن: ٠٩١٢٧٦٦٩٤٦١
E. mail: hfarahmand@ut.ac.ir

۱. مقدمه

یکی از مسائل حائز اهمیت در فرایند انتقال ژن سرنوشت DNA و درصد نفوذ سازهٔ ژنی به درون ژنوم است. به طور ایده‌آل سیستم انتقال ژنی باید، علاوه بر کارآمدی، از ورود نسخه‌های متعدد ژن مورد نظر به درون هستهٔ سلول نیز جلوگیری کند، زیرا نسخه‌های متعدد سبب خاموش‌سازی ژن‌ها می‌شوند (Pelczar *et al.,* 2004). در حال حاضر، تمرکز اصلی مطالعات انتقال ژن در موجودات با اهداف متفاوت، جست‌وجو برای عناصری است که بتوانند احتمال نزدیک‌شدن و ادغام با ژنوم موجود هدف را افزایش دهند تا سبب افزایش کارآمدی عمل انتقال ژن شوند (Tzfira & Citovsky, 2008)، زیرا امروزه یکی از چالش‌های اساسی در مباحث انتقال ژن به موجودات مختلف افزایش بازدهی عملیات انتقال ژن است (Tzfira & Citovsky, 2005). در سال‌های اخیر، دانش فنّاوری زیستی در حوزهٔ انتقال ژن بر جست‌وجو و ارائهٔ سیستم‌های انتقال هدفمند انواع ژن‌ها به ژنوم موجودات مختلف متمرکز بوده است و بیشترین تأکید بر دسترسی کارآمد این مواد به هستهٔ سلول و درون ژنوم است. در ادامه و با معرفی روش‌های جدید، مانند انواع پروتئین‌هایی که قابلیت نزدیک‌شدن به هستهٔ سلول را فراهم می‌کنند، تلاش‌ها برای معرفی چنین سیستم‌هایی در انواع مختلف موجودات ادامه دارد (Guralnick *et al*., 1994; Collas and Alestrom, 1998; Ziemienowicz *et al*., 1993; Pelczar *et al*., 2004; Ziemienowicz *et al*., 2001).

تلاش برای تولید ماهیان انتقال‌ژن‌یافته چه با هدف افزایش تولید در آبزی‌پروری و چه با هدف کاربرد آنها به‌منزلهٔ موجودات مدل در تولید پروتئین‌های نوترکیب صنعتی یا دارویی و نیز کاربرد ماهیان انتقال‌ژن‌یافته در مطالعات پایه‌ای ژنوم در آبزیان همواره حائز اهمیت بوده است (Houdebine, 2009; Hwang *et al*., 2004; Morita *et al*., 2004; Sin, 1997).

هر یک از روش‌های انتقال ژن در آبزیان معایب و مزایای خاص خود را دارد. در مجموع می‌توان گفت هر چند انواع روش‌های انتقال ژن در تولید ماهیان انتقال‌ژن‌یافته به کار می‌رود، هیچ کدام از این روش‌ها کامل یا در همهٔ موارد مناسب نیستند و در اکثر آنها بازدهی انتقال توالی ژنی به درون هستهٔ سلول و ژنوم ماهی بسیار کم (به طور متوسط ۰/۵–۱ درصد) است (Maclean, 1994). بنابراین، بهینه‌سازی روش‌های موجود در انتقال ژن به منظور افزایش میزان نفوذ DNA خارجی به داخل ژنوم و متعاقباً افزایش کارایی عملیات انتقال ژن ضروری خواهد بود. به این ترتیب، به نظر می‌رسد کاربرد روش‌هایی که سبب نفوذ هدفمند DNA خارجی به داخل ژنوم شوند کمک شایانی به روند بهتر و مؤثرتر فرایند انتقال ژن خواهد کرد.

اخیراً مشخص شده است که از میان گروهی از باکتری‌های خاک، که به‌منزلهٔ اگروباکتریوم شناخته می‌شوند، چندین گونه وجود دارند که می‌توانند سبب انتقال قسمتی از DNA پلاسمیدی خود به کروموزوم گیاه شوند (Tzfira *et al.,* 2005). این پلاسمید شامل DNA انتقال‌یابنده (T–DNA) و همهٔ ژن‌های ضروری برای عمل انتقال به سلول گیاهی است. در این میان ژن‌های vir از اهمیت ویژه‌ای در فرایند انتقال ژن برخوردارند و از بین آنها پروتئین‌های VirD۲ و VirE۲ نقشی حیاتی و کامل‌کننده در انتقال ژن به واسطهٔ اگروباکتریوم بازی می‌کنند. این دو پروتئین به همراه رشتهٔ T، مجموعه‌ای به نام مجموعهٔ T را تشکیل می‌دهند که شکل انتقال‌شوندهٔ T–DNA است. این دو پروتئین توالی پیام مکان‌یابی هسته‌ای (NLS) دارند که در هدایت آنها و T–DNA متصل به آنها به سوی هستهٔ سلول گیاهی کمک می‌کند (Tzfira & Citovsky, 2000). توالی NLS در این پروتئین‌ها می‌تواند مجموعه‌های T ساخته‌شده در آزمایشگاه را، که شامل پروتئین‌های گزارشگرند، به هستهٔ سلول‌های گیاه، جانور و مخمر هدایت کند (Tzfira & Citovsky, 2008).

در این پژوهش، امکان استفاده از این روش در انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF٤ ماهی زبرا (*Danio rerio*) بررسی

می‌شود تا تأثیرات این روش در میزان نفوذ هدفمند و مؤثر توالی DNA خارجی به درون ژنوم این تیرهٔ سلولی و افزایش کارایی عمل انتقال ژن در سطح in Vitro سنجش شود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تولید پروتئین‌های نوترکیب

برای تولید پروتئین‌های نوترکیب VirE۲ و VirD۲، از باکتری *E.Coli* سویهٔ BL۲۱(DE۳)PLysS استفاده شد. به این منظور توالی کدکنندهٔ این دو پروتئین از سایت NCBI جست‌وجو و برای سنتز به شرکت MWG فرستاده شد. پس از دریافت سازه‌های ژنی مربوطه از این شرکت، توالی کدکنندهٔ این دو پروتئین از طریق برش با آنزیم‌های برشی ECoRI و HindIII از این سازه‌ها جداسازی شد و از طریق واکنش اتصال آنزیمی در سازهٔ ژنی pET۳۲a(+) درج شد که با آنزیم‌های مذکور برش داده شده بود. سپس، این سازه‌های ژنی نوترکیب از طریق واکنش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری *E.Coli* سویهٔ BL۲۱(DE۳)PLysS منتقل شدند. کلونی‌های حامل ژن‌های جدید، پس از تأیید وجود قطعهٔ درج‌شده، به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس پرایمرهای پیشرو و پسروی پروموتر Tv، از روی پلت آگار جداسازی شدند و نخست به مدت ۱۶ ساعت در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از تهیهٔ این کشت اولیه، سلول‌های باکتری به نسبت ۱:۵۰ به محیط کشت LB جدید تلقیح و تا رسیدن به درجهٔ کدورت ۰/۷کشت باکتریایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با شرایط ۲۰۰ rpm کشت داده شدند. پس از طی این مدت با افزودن IPTG (با غلظت نهایی ۱mM) در محیط کشت LB تولید این پروتئین‌ها در این سویه القا شد و باکتری‌ها پس از افزودن IPTG، در همان محیط کشت به مدت ۶ ساعت به ترتیب در دمای ۲۸ و ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد برای VirD۲ و VirE۲ کشت داده شدند. پس از اتمام زمان بیان، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ با شرایط ۱۰,۰۰۰ x g در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه از محیط کشت جدا شدند و پس از حل‌کردن رسوب در بافر EDTA,Potease ۱Mm Tric-HCl,۲۰Mm inhibitor,tritonX۱۰۰,pH۸,۳ که روی یخ انجام گرفت، با اعمال نیروی فراصوت شکسته شدند. محلول رویی این عصارهٔ سلولی که حاوی پروتئین محلول و فعال در فرم زیستی است، پس از سانتریفیوژ در شرایط ۱۰,۰۰۰ x g در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه، به روش SDS-PAGE الکتورفورز و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و برای تأیید صحت پروتئین بیان‌شده از روش وسترن بلات[1] استفاده شد. در مرحلهٔ بعد برای خالص‌سازی این پروتئین‌ها از ستون‌های کروماتوگرافی HisTrap HP (GE Healthcare) استفاده شد.

۲.۲. ساخت سازهٔ ژنی

برای ساخت سازهٔ ژنی که متشکل از مجموعهٔ حاصل از اتصال DNA به دو پروتئین نوترکیب VirE۲ و VirD۲ است، از سازهٔ ژنی phrGFP-۱(STRATAGEN) استفاده شد. به منظور ایجاد شرایط لازم برای اتصال پروتئین VirD۲ به DNA، از پرایمرهای F:۵′ccaata tatcctgtcaaatgcattagttattaatagt۳′ و R: ۵′ccaat atatcctgtcaattaagatacattgatgagttt۳′ استفاده شد. توالی مجاور سمت راست T-DNA در پلاسمید pTi (RB) در این توالی‌ها با کشیدن خط مشخص شده است. بقیهٔ توالی پرایمر، توالی اختصاصی سازهٔ phrGFP-۱ است. پس از تکثیر قطعهٔ مورد نظر از این سازه به کمک این پرایمرها، باند حاصله به طول ۱/۹کیلوباز به کمک کیت خالص‌سازی (QIAGEN) از روز ژل آگارز جداسازی شد و در مرحلهٔ بعد در درجهٔ حرارت ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (GeneAmp PCR System 2400) قرار گرفت تا DNA تک‌رشته‌ای تولید شود.

1.Western Blot

این توالی تک‌رشته‌ای DNA که شامل ژن گزارشگر hrGFP، پروموتر CMV، توالی خاتمه‌دهندهٔ SV٤٠ و توالی RB برای اتصال به پروتئین VirD۲ است نخست، در درجهٔ حرارت ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۱ ساعت مورد واکنش با پروتئین VirD۲ قرار گرفت و در مرحلهٔ بعدی این توالی تک‌رشته‌ای متصل به VirD۲، به مدت ۳۰ دقیقه در درجهٔ حرارت ٤ درجهٔ سانتی‌گراد در مجاورت پروتئین VirE۲ قرار گرفت تا سازهٔ ژنی نهایی که ترکیبی از DNA تک‌رشته‌ای و این دو پروتئین است ساخته شود.

۳.۲. ساخت سازهٔ ژنی برای انتقال به تیرهٔ سلولی ZF_4

برای بررسی و مقایسهٔ تفاوت‌های احتمالی کاربرد این دو پروتئین نوترکیب در انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF_4 ماهی زبرا (*Danio rerio*) دو سازهٔ ژنی مختلف به این تیرهٔ سلولی انتقال داده شد: سازهٔ ژنی اول، DNA تک‌رشته‌ای بدون حضور این دو پروتئین و سازهٔ دوم، DNA تک‌رشته‌ای متصل به پروتئین‌های VirE۲ و VirD۲.

٤.۲. کشت تیرهٔ سلولی ZF_4

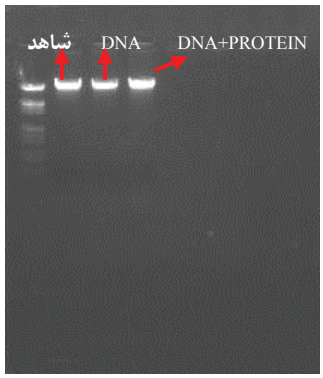
تیرهٔ سلولی ZF_4 که از لارو یک روزهٔ ماهی زبرا تهیه شده است، از لحاظ ریخت‌شناسی دارای شکل فیبروبلاستی و به صورت چسبیده به بستر محیط کشت است. برای کشت این تیرهٔ سلولی از محیط کشت DME(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) به همراه ۱۰ درصد FCS با شرایط درجهٔ حرارت ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO_2 استفاده شد.

۵.۲. انتقال سازهٔ ژنی به تیرهٔ سلولی ZF_4

۲٤ ساعت قبل از انتقال سازهٔ ژنی، سلول‌ها از فلاسک به پلت‌های ٦ خانه‌ای با تراکم ۱×۱۰^{٦} پاساژ داده شدند؛ برای انتقال سازهٔ ژنی hrGFP به تیرهٔ سلولی ZF_4، پس از رسیدن به تراکم مورد نظر، سازه‌های ژنی با Opti–MEM(invitrogen) رقیق و پس از اختلاط با لیپوفکتامین (invitrogen) به محیط کشت سلول‌ها انتقال داده شدند.

٦.۲. بررسی موفقیت انتقال ژن

برای بررسی میزان موفقیت انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF_4 در هر یک از دو سازهٔ ژنی انتقال‌یافته، محیط کشت تیرهٔ سلولی در فاصلهٔ زمانی ٤۸ ساعت پس از انتقال ژن برای بیان یا بیان‌نشدن ژن hrGFP از طریق میکروسکوپ MVX۱۰–macro–zoom(Olumpus,Tokyo,Japan) بررسی شد. همچنین، برای تأیید نتایج داده‌های میکروسکوپی، DNA ژنومی از تیرهٔ سلولی با استفاده از کیت استخراج DNA (DNeasy blood and tissue miniprep kit,QIAGEN) استخراج شد (شکل ۱) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hrGFP شامل F:۵′atgcattagttattaatagt۳′ و R: ۵′ttaagatacattgatgagtt۳′ و به کمک واکنش زنجیره‌ای



شکل ۱. استخراج DNA. لاین‌ها از سمت مارکر: تیمار کنترل (بدون انتقال ژن). تیرهٔ سلولی که ssDNA به آن منتقل شده است. تیرهٔ سلولی که ssDNA+VirD۲+VirE۲ به آن منتقل شده است.

پلیمراز تکثیر شد. برای تأیید صحت نتایج، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر نمونه از DNA استخراج‌شده برای هر تیمار ۳ بار تکرار شد. همچنین، پس از طراحی پروب برای ژن hrGFP به طول ۵۵۰ جفت باز با استفاده از کیت PCR DIG prob synthesis(Roche)، DNA ژنومی استخراج‌شده از تیره‌های سلولی با ساترن بلاتینگ بررسی شد تا از ورود ژن انتقال‌یافته به درون ژنوم اطمینان حاصل شود.

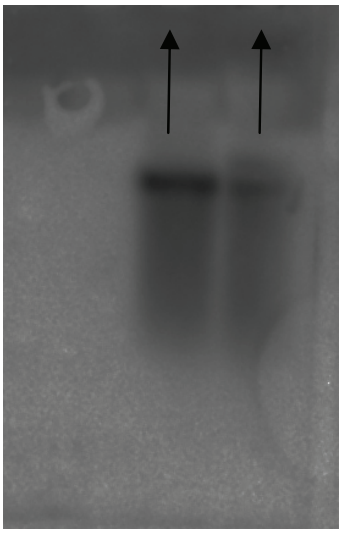
۳. نتایج

۱.۳. بررسی موفقیت انتقال ژن

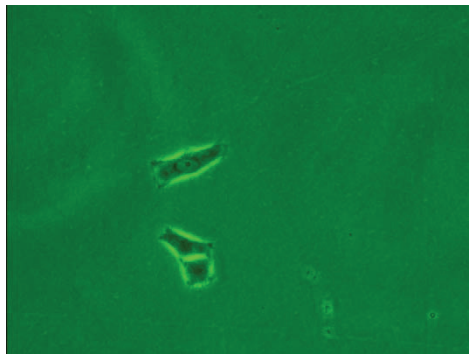
برای سنجش تأثیرات حاصل از کاربرد دو پروتئین نوترکیب VirE۲ و VirD۲ در فرایند انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ماهی زبرا، در فاصلهٔ زمانی ٤٨ ساعت پس از انتقال ژن، بیان یا بیان‌نشدن ژن hrGFP با میکروسکوپ MVX۱۰–macrozoom(Olympus,Tokyo,Japan) بررسی شد (شکل ۲). داده‌های میکروسکوپی نشان داد درصد سلول‌هایی که بیان ژن hrGFP را نشان دادند برای سلول‌هایی که مجموعهٔ تک‌رشته به همراه پروتئین‌های VirE۲ و VirD۲ به آنها منتقل شده بود، بیشتر از سلول‌هایی بود که فقط DNA تک‌رشته‌ای به آنها انتقال داده شده بود. این نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش درخور ملاحظهٔ کارایی انتقال ژن با استفاده از این دو پروتئین در مقایسه با تیمار دیگر است.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و نیز ساترن بلاتینگ با استفاده از پروب طراحی‌شده برای ژن hrGFP، نشان‌دهندهٔ تأیید نتایج قبلی بود (شکل ۳) و مشخص کرد که استفاده از این دو پروتئین با افزایش نرخ انتقال ژن، سبب افزایش کارایی فرایند انتقال ژن در این تیرهٔ سلولی ماهی زبرا شده است.

الف ب



شکل ۲. نتایج ساترن بلات در دو تیمار مورد آزمایش. الف) ssDNA ، ب) ssDNA+VirD۲+VirE۲



شکل ۳. بیان ژن hrGFP در تیرهٔ سلولی ZF_4 در تیمار ssDNA+VirD۲+VirE۲

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر کاربرد دو پروتئین نوترکیب VirE۲ و VirD۲ در سازهٔ ژنی برای انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF_4 ماهی زبرا بررسی شد تا تأثیرات کاربرد این پروتئین‌ها در افزایش بازدهی فرایند انتقال ژن و افزایش درصد نفوذ DNA خارجی به درون ژنوم این تیرهٔ سلولی بررسی شود.

بر اساس نتایج این مطالعه، کاربرد این پروتئین‌ها به صورت درخور ملاحظه‌ای سبب افزایش راندمان فرایند انتقال ژن نسبت به تیمار مورد مقایسه (بدون کاربرد این دو پروتئین) شد. مطالعات انجام‌گرفته در لاین‌های سلولی در پستانداران و نیز دوزیستان نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (Guralnick *et al*., 1994; Ziemienowicz *et al*., 1993 & 2001; Pelczar *et al*., 2004). این تأثیرات به علت حضور توالی مکان‌یابی هسته‌ای (NLS) در این دو پروتئین است که در هدایت این پروتئین‌ها و DNA متصل‌شده به آنها به سوی هستهٔ سلول نقش دارد (Tzfira & Citovsky,2008). توالی NLS در این پروتئین‌ها می‌تواند مجموعه‌های DNA–Proteain ساخته‌شده در آزمایشگاه را، که شامل پروتئین‌های گزارشگرند، به هستهٔ سلول‌های گیاه، جانور و مخمر هدایت کند (همان).

یکی از مزایای اگروباکتریوم در فنّاوری انتقال ژن در مقایسه با سایر روش‌ها این است که می‌توان توالی DNA مورد نظر را به ژنوم میزبان انتقال داد، بدون اینکه در اثر نفوذ چندین کپی از آن توالی، ژن مورد نظر خاموش شود و یا بیان آن به شکل غیرمطلوبی صورت پذیرد (Pelczar *et al*., 2004)؛ مطالعات انجام‌شده روی لاین سلولی انسانی نشان داده‌اند که استفاده از این پروتئین‌ها در انتقال ژن، سبب نفوذ یک نسخه از ژن مورد نظر به درون ژنوم میزبان می‌شود (Pelczar *et al*., 2004). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که با استفاده از این روش، یک نسخه از ژن hrGFP وارد ژنوم ماهی زبرا شده است.

به طور خلاصه می‌توان گفت انتقال دو پروتئین VirE۲ و VirD۲ به سازهٔ ژنی برای انتقال ژن به تیرهٔ سلولی ZF_4 در ماهی زبرا، به طور چشمگیری سبب افزایش کارایی انتقال ژن شد که این مسئله به علت افزایش نرخ ورود ژن انتقال‌یافته به درون ژنوم این تیرهٔ سلولی است.

References

[1]. Collas,C and Alestroè M,M.1998. Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish, Transgenic Research 7, 303-309.

[2]. Houdebine,L.M.2009,production of pharmaceutical proteins by transgenic animals,comparative immunology,microbiology and infectious disease 32,107-121.

[3]. Hwang,G., Muller,F., Rahman,M.A., Williams,D.W., Murdock,P.J., Pasi,K.J., Goldspink,G., Farahmand,H and Maclean,N,2004. Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos, Mar. Biotechnol. 6, 485–492.

[4]. Guralnick,B.,Thomsen, G and Citovsky,V.1996. Transport of DNA into the Nuclei of Xenopus Oocytes by a Modified VirE2 Protein of Agrobacterium, The Plant Cell, Vol. 8, 363-373.

[5]. Maclean,N,1994.Animal with novel genes, Cambridge University Press,NEW YORK,PP:255.

[6]. Pelczar,P., Kalck,V., Gomez,D & Hohn,B.2004. Agrobacterium proteins VirD2 and VirE2 mediate precise integration of synthetic T-DNA complexes in mammalian cells, EMBO reports VOL 5, NO 6.

[7]. Tzfira,T., Kunik,T., Gafni,Yand Citovsky,V.2000. Mammalian Cells, From: Methods in Molecular Biology, vol. 344: Agrobacterium Protocols, 2/e, volume 2.

[8]. Tzfira,T., Lacroix,B and Citovsky,V.2005. Nuclear Import and Export in Plants and Animals, edited by Tzvi Tzfira and Vitaly Citovsky, Eurekah.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers, Chapter 6,83-99.

[9]. Tzfira,T AND Citovsky,V.2008. Agrobacterium: From Biology to Biotechnology, Springer ,USA,PP: 737.

[10]. Ziemienowicz,A., Rlich,D.G., Lanka,E., Hohn,B and Rossi,L. Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium, Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 96, pp. 3729–3733.

[11]. Ziemienowicz,A.,Merkle,T.,Schoumacher,F., Hohn,B and Rossi,L.2001.Import of Agrobacterium T-DNA into Plant Nuclei:Two Distinict Function of VirD2 and VirE2 Proteins,The Plant Cell,Vol.13,369-383.