



## ارزیابی بیان ژن GUS در گیاه سویا با روش آگرواینفیلتراسیون

محمد افشارشاندیز<sup>۱\*</sup>، هوشنگ عزیزاده<sup>۲</sup>، شهناز سالک هاشمی<sup>۳</sup> و مصطفی عالیفر<sup>۴</sup>

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه تهران، ۲- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهران

۳-دانشجوی کارشناسی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران

\* نویسنده مسئول: محمد افشارشاندیز [afsharshandiz@ut.ac.ir](mailto:afsharshandiz@ut.ac.ir)

### چکیده

کشاورزی مولکولی (Molecular farming) تکنولوژی جدید برای تولید پروتئین‌های دارویی و با ارزش در گیاهان تراریخت در مقیاس بزرگ است. این تکنیک جدید چشم انداز وسیعی را فراسوی محققان بخش کشاورزی و علوم گیاهی گسترانده است و به زودی انقلابی در صنایع دارویی و غذایی ایجاد خواهد کرد. به همین منظور اولین گام در استفاده از یک گیاه به عنوان میزبان، بررسی توان گیاه برای تولید پروتئین نوترکیب است. در همین راستا اثر پنج رقم سویای ویلیامز، خوراکی روسی، R.V.B Union و خوراکی ۷ در دو غلظت باکتری با روش آگرواینفیلتراسیون به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا و بررسی شد. در این آزمایش از سویه LBA4404 آگروباکتریوم تومفاسینس حامل پلاسمید pBI121 و ژن گزارشگر gus استفاده و بیان ژن وارد شده به همراه میزان پروتئین تولید شده از طریق سنجش هیستوشیمیایی gus اثبات گردید. نتایج آزمون آماری اختلاف معنی داری بین ارقام سویا نشان داد به طوریکه رقم ویلیامز با میانگین ۰/۸۷۳۱ میکروگرم به ازای گرم برگ تازه بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب را داشت. از طرف دیگر بین دو غلظت 1.5 و 1 باکتری تفاوت معنی داری مشاهده نشد اما تفاوت آنها با تیمار شاهد بسیار معنی دار شد.

واژگان کلیدی: کشاورزی مولکولی، آگرواینفیلتراسیون، سویا، GUS

### مقدمه

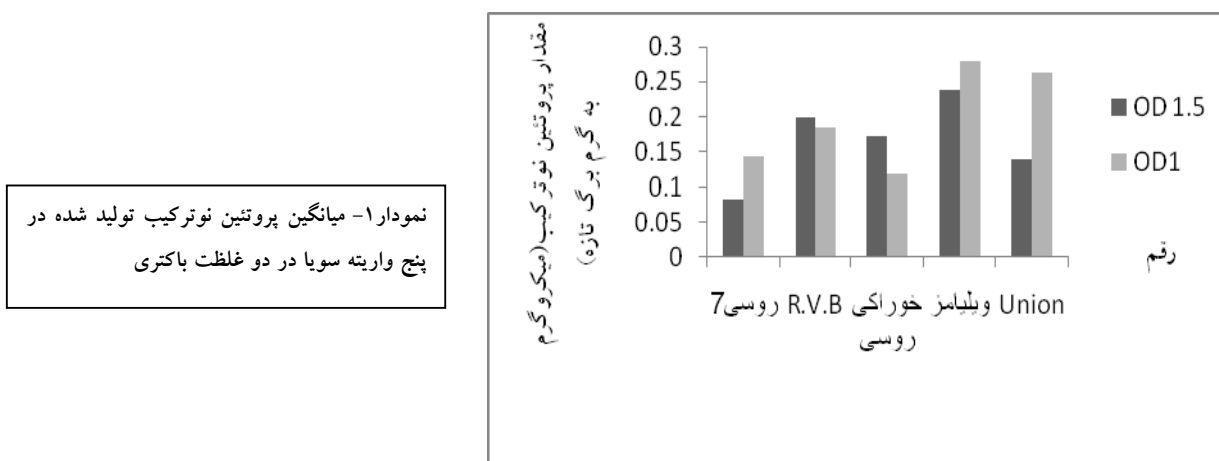
کشاورزی مولکولی (Molecular farming) تکنولوژی جدید برای تولید پروتئین‌های دارویی با ارزش در ارگانسیم‌های تراریخت در مقیاس بزرگ است. این تکنیک با دو استراتژی انتقال پایدار ژن و انتقال موقت ژن اقدام به تولید پروتئین‌های مورد نظر در گیاهان می‌کند. در حقیقت این روش به دلیل قیمت بسیار پائین تولید، بهره‌وری از منابع ارزان قیمت انرژی، خاک و آب و... و امکان تولید در هر کجای دنیا که امکان کشاورزی وجود دارد، با سایر روش‌های موجود قابل رقابت و حتی قابل توصیه می‌باشد (فیشر، ۲۰۰۰). سویا از بزرگترین گیاهان دانه روغنی دنیا بوده و نظر به اینکه دارای درصد پروتئین بالایی نیز می‌باشد به عنوان یکی از اهداف کشاورزی مولکولی و تولید پروتئین‌های نوترکیب مناسب قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش از آگروباکتریوم تومفاسینس سویه LBA4404 حاوی پلاسمید PBI 121 با ژن نشانگر GUS و ژن انتخابگر nptII عامل مقاومت به کانامایسین استفاده شد. کشت ارقام سویا در اتاقک های کشت گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام و نمونه های برگگی جوان و تازه در روز ۳۵ پس از کشت جمع آوری و در شرایط رطوبتی مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. کشت باکتری نیز در محیط LB مایع ۴۸ ساعت قبل از اینفیلتراسیون انجام شد. برای تعیین غلظت باکتری و تهیه محیط اینفیلتراسیون ابتدا فالکن های کشت شده با ۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و پس از حذف مایع رویی، رسوبات باکتری جمع آوری گردیده و با محیط 1/2 MS حاوی ۶۰mg/lit شکر به همراه ۱۰۰ppm مویان توئین ۲۰ مجدداً حل شد و در نهایت OD مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و با طول موج ۶۰۰ nm بدست آمد. برای اینفیلتراسیون محیط مذکور و نمونه های برگگی تازه در محفظه خلا ریخته و خلأ ۲۵۰ میلی بار سه مرتبه پس از هر شکست ناگهانی جهت ورود باکتری به درون بافت گیاهی اعمال شد. سپس برگها به مدت سه روز جهت بیان ژن GUS در ظروف در بسته ای که در ته آنها کاغذ صافی و کمی محیط 1/2MS ریخته شده بود، نگهداری و برای سنجش کمی فعالیت GUS از روش جفرسون و همکاران (۱۹۸۷) و توسط الیزا ریدر با طول موج ۴۰۵ nm استفاده شد. میزان آنزیم تولیدی از فرمول  $Y=0.454X-0.042$  بدست آمد. در نهایت آنالیز داده ها توسط نرم افزار MSTATC انجام و میزان پروتئین در یک گرم برگ تازه اندازه گیری شد.

### نتایج و بحث

با توجه به جدول مقایسه میانگین OD و نمودار ۱، بهترین غلظت باکتری در  $OD=1$  و میزان پروتئین تولیدی در این غلظت  $0.278614$  میکروگرم در گرم برگ تازه بود. و با توجه به مقایسه میانگین VAR و نمودار ۱ نیز بیشترین آنزیم تولیدی GUS در واریته ویلیامز و مقدار آن  $0.185$  میکروگرم در گرم برگ تازه بود. با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل  $VAR \times OD$  بالاترین میزان تولید پروتئین در کل تیمارهای اعمال شده در آزمایش فاکتوریل زمانی بود که واریته ویلیامز در تیمار  $OD=1$  قرار گرفت و میزان آن  $0.18731$  میکروگرم در گرم برگ تازه بود. اسمیت (۲۰۰۲) با این روش آنتی ژن سطحی هپاتیت B را در سویا تولید کرد. روبلوسکی (۲۰۰۵) نیز با این روش بیان ژن گاس را در گیاه کاهو ارزیابی کرده است.





جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای وارپته و غلظت باکتری

منابع تغییرات	درجه آزادی	F Value میانگین جذب در طول موج nm405
OD	۲	**۲/۵۳۰۵
VAR	۴	۲۶/۸۲۵۸ <sup>B.S.</sup>
OD×VAR	۸	۰/۶۹۴۹
خطا	۳۰	

### نتیجه گیری کلی

با توجه به اهمیت نوع میزبان و تفاوت در بیان پروتئین خارجی در ارقام مختلف با انجام این آزمایشات می توان بهترین ارقامی را که قدرت و توان تولید پروتئین نوترکیب زیادی دارند را مشخص و در اهداف مورد نظر برای زراعت مولکولی بهره برد.

### منابع

۱. براهیمی پور ر. ۱۳۸۸. بیان پروتئین های نوترکیب در یونجه و شبدر با روش آگرواینفیلتراسیون. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ۹۸ صفحه.
2. Fisher R. N. Emans, Molecular farming of pharmaceutical proteins, Transgenic Res. 9 (2000) 279-299
3. Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R. (2005). Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato, and Arabidopsis. Plant Biotechnol J 3:259-273

## Evaluation of GUS expression in soybean by agroinfiltration method

Mohamad Afsharshandiz<sup>\*</sup>, Hushang Alizade<sup>2</sup>  
shahnaz Salekhashemi<sup>3</sup>, Mostafa alifar<sup>4</sup>

\* Corresponding E-mail address: afsharshandiz@ut.ac.ir

### Abstract

Molecular farming is a new technology for producing pharmaceutical proteins in transgenic organism at large scale. This method have extended an extensive prospect in front of plant's researcher and very soon will make a revolution in pharmaceutical and food industry. For this, evaluation of plant potent as a host in first step is necessary. In this research, effect of 5 soybean varieties ( Williams, Khoraki rusi, Khoraki-7, Union, R.V.B ) in 3 level of bacteria concentration (OD= 0, 1, 1.5) with agroinfiltration method by completely random design and 3 replication was done. In this experiment we used LBA4404 with pBI121 plasmid that carry GUS gene. Expression of gene was approved by histochemical GUS assay. Statistical analysis showed significant differences between soybean's varieties and Williams with average=0.8731 mg per grams of fresh leaf weight had highest recombinant protein. OD=1 and OD=1.5 had no significant difference together but had ones with test(OD=0).

**Keywords:** Molecular farming, agroinfiltration, soybean, GUS