

ارزیابی اثر توالی‌های پتید نشانه پلاستییدی LIM14 و AtCPrecA در هدایت پروتئین‌های گزارشگر فلورسنت سبز (GFP) و بتاگلوکورونیداز (GUS) در گیاهان سیب‌زمینی تراریخت

امید تقویان، امیر موسوی*، هاله هاشمی سهی، عصمت جورابیجی و کسری اصفهانی
گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

در این پژوهش، توالی‌های پتید نشانه یک پروتئین اختصاصی بساک در گیاه *Lilium longiflorum* cv. Hinomoto به نام LIM14 و یک پروتئین در گیاه آراییداپسیس با نام AtCPrecA که ویژگی‌های توالی‌های نشانه کلروپلاستی را دارا هستند، به طور جداگانه به پایانه آمینی ژن‌های گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز (Green Fluorescent Protein=GFP) و بتاگلوکورونیداز (β -glucuronidase=GUS) متصل شده، سازه‌های حاصل به واسطه آگروباکتریوم به رقم کاردال گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L. cv. Kardal) منتقل شدند. بررسی با میکروسکوپ فلورسنت و همچنین رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS، نشان داد که پروتئین‌های نو ترکیب LIM14-GFP و LIM14-GUS به آمیلوپلاست غده و کلروپلاست سیب‌زمینی‌های تراریخت هدایت شده‌اند. سنجش کمی فعالیت آنزیم GUS نشان داد که میزان بیان این پروتئین در بخش‌های غنی از آمیلوپلاست گیاهان تراریخت سیب‌زمینی، در حالت حضور توالی نشانه به مراتب بیشتر از گیاهان تراریخت واجد ژن *gus* به تنهایی است. در این مطالعه همچنین عملکرد پتید نشانه AtCPrecA، در بالادست پایانه آمینی پروتئین فلورسنت سبز بررسی شد و بیان این پروتئین در سلول‌های اپیدرم پیاز (*Allium cepa* L.) نشان‌دهنده این بود که AtCPrecA-GFP و به طور ویژه در پلاستیدها متمرکز شده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، توالی‌های نشانه AtCPrecA و LIM14 وظیفه پیش‌بینی شده را انجام داده، قابلیت هدایت پروتئین نو ترکیب را به درون پلاستید دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: پلاستید، سیب‌زمینی تراریخت، توالی نشانه پتیدی، پروتئین نو ترکیب، آزمون کمی

مقدمه

پروتئین‌ها در سامانه سلولی، لازم است که هر یک از پروتئین‌ها در جایگاه و محل مناسب خود نظیر غشا سلولی، ماتریکس میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی،

در یک سلول یوکاریوتی، چندین هزار نوع پروتئین مختلف وجود دارد. برای کارکرد صحیح این

راهبرد ذخیره این پروتئین‌ها در اندام‌هایی ذخیره‌ای نظیر: بذر (Wright *et al.*, 2001) و غده (Farran *et al.*, 2002) (راهبرد انتقال به اندام) و انتقال پروتئین نو ترکیب به اندامک‌های درون سلولی مثل شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری و پلاستید می‌تواند راهگشا باشد.

در راهبرد اول، از پیش‌برهای (promoters) اختصاصی بافت نظیر: پاتاتین (patatin) (پیش‌بر اختصاصی غده سیب‌زمینی)، اولئوسین (Oleosin) (پیش‌بر اختصاص بذر روغنی) و پیش‌بر اختصاصی بافت‌های سبز ذرت (maize C4 PEP carboxylase) استفاده می‌شود که باعث بیان نسبتاً بالای پروتئین نو ترکیب در یک بافت اختصاصی می‌شوند.

در راهبرد دوم، از توالی‌های پتید نشانه برای انتقال پروتئین‌های نو ترکیب به اندامک‌های سلولی استفاده می‌شود. انتقال درون سلولی پروتئین‌ها به محلی خاص تأثیر زیادی بر بیان بالای پروتئین مورد نظر خواهد داشت؛ چرا که تجمع پروتئین در محل‌های خاص و مورد نظر در سلول و بافت، می‌تواند باعث پایداری بیشتر آن و همچنین، سهولت استخراج آن گردد (Thomas *et al.*, 2005). به هر حال، مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده سطح کلی تجمع پروتئین‌ها، پایداری آنها به ویژه در مورد آنتی‌بادی‌ها است که با انتقال هدفمند این پروتئین‌ها قابل حصول است (Schiermeyer *et al.*, 2004).

هر دو راهبرد اشاره شده در بیان دایم و موقت پروتئین هدف قابل اجرا هستند (Fischer and Emans, 2000). میزان تجمع پروتئین بستگی به مقصد آن در داخل سلول دارد (D'Aoust *et al.*, 2004) و یکی از

لیوزوم، پلاستید یا سیتوسل قرار گیرند. انتقال هر یک از این پروتئین‌ها پس از تولید در ریوزوم به اندامک‌های مورد نظر، با شناسایی علائم مربوط به محل فعالیت آنها که عمدتاً در توالی ابتدای ساختار پروتئین قرار دارد صورت می‌گیرد (Hoppman *et al.*, 2002؛ Peng and Gong 2011). از این سامانه برای انتقال پروتئین‌های نو ترکیب به اندامک‌های ویژه در گیاهان تراریخت، با مقاصد مختلفی مانند: تولید گیاهان مقاوم به عوامل بیماری‌زا، حشرات و علف‌کش‌ها، مهندسی مسیرهای بیوشیمیایی اندامک‌ها، تولید دارو و پروتئین‌های ارزشمند اقتصادی استفاده شده است (Fischer and Emans, 2000).

هزینه تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی و صنعتی، آنتی‌بادی‌ها و واکسن‌ها در گیاهان ۱۰ تا ۵۰ برابر ارزان‌تر از هزینه تولید آنها در باکتری *Escherichia coli* برآورد می‌شود (Kusnadi *et al.*, 1997) اما هزینه استخراج و خالص‌سازی این پروتئین‌ها از گیاهان تراریخته نسبتاً بالا بوده (Giddings, 2001)، به ترتیب ۴۰ و ۴۸ درصد از کل هزینه عملیاتی سالانه تولید این مواد با درجه خلوص ۸۳ درصد را شامل می‌شوند (Schiermeyer *et al.*, 2004). همچنین، میزان تولید پروتئین‌های نو ترکیب نسبت به کل پروتئین محلول در گیاهان بسیار پایین است (۰/۰۲ درصد در اندام‌های هوایی و یک پنجم این مقدار در ریشه و غده) (Farran *et al.*, 2002) و علت این موضوع هنوز کاملاً مشخص نشده است (Shadwick and Doran, 2004). علیرغم اینکه این میزان پایین تولید پروتئین نو ترکیب در گیاهان، با عملکرد بسیار بالای تولید توده زیستی (biomass) جبران می‌شود، در عین حال استفاده از دو

دارد که همه آنها به یک میزان موفقیت آمیز نبوده‌اند (Ehsani *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1996; Castanon *et al.*, 1999; Artsaenko *et al.*, 1998; Farran *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). با استفاده از پیش‌بر پاتاتین که مختص غده است و همچنین، توالی راهنمای آمیلوپلاستی (granule bound starch synthase)، موفقیت در خور توجهی در این زمینه حاصل شده است (Ji *et al.*, 2003).

در پژوهش حاضر، فعالیت دو توالی راهنمای پپتیدی پروتئین‌های LIM14 و ATCPrecA در انتقال پروتئین‌های نوترکیب به اندام ذخیره‌ای نشاسته بررسی شده است. توالی اول، توالی راهنمای یک پروتئین اختصاصی بساک (Lily messages Induced at Meiosis) به نام LIM14 است که در تجمع نشاسته و تمایز آمیلوپلاست هنگام شکل‌گیری بساک و تشکیل گرده‌ها در گیاه سوسن (*Lilium longiflorum*) نقش دارد (Mousavi *et al.*, 1999). توانایی LIM14 در انتقال موفق پروتئین‌های گزارشگر به پلاستیدهای لاین سلولی BY-2 گیاه توتون با استفاده از روش انتقال ژن پایدار پیش از این تأیید شده بود، گرچه در روش انتقال ژن موقت، موفقیتی در این زمینه حاصل نشده بود (Mousavi *et al.*, 1999). این توالی به منظور هدایت و تجمع پروتئین‌های نوترکیب به آمیلوپلاست گیاه سیب‌زمینی استفاده شد. همچنین، پروتئین ATCPrecA که در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی شده است، دارای یک توالی راهنمای کلروپلاستی در پایانه آمینی خود است (Hiratsuka *et al.*, unpublished). با قرار دادن توالی پپتید نشانه این پروتئین در بالادست ژن رمز کننده پروتئین GFP (پایانه آمینی)، فعالیت این

گزینه‌های مطرح برای بیان و تولید پروتئین، هدایت آن به شبکه اندوپلاسمی (Fischer and Emans, 2000) است، چرا که تغییرات پس ترجمه‌ای ایجاد شده در این مسیر کامل بوده، برای ساختار، عمل و کارآیی پروتئین مهم هستند. در عین حال، در برخی موارد هدایت پروتئین‌ها به کلروپلاست به ویژه پروتئین‌هایی که نیاز به تغییرات پس از ترجمه خاصی ندارند، نسبت به سایر اندامک‌ها مناسب‌تر بوده است (D'Aoust *et al.*, 2004). به طور طبیعی نیز بخشی از پروتئین‌های کلروپلاست توسط ژن‌های مستقر در هسته سلول رمز می‌شوند و این پروتئین‌ها پس از تولید در سیتوسل به کلروپلاست منتقل می‌شوند (Gould *et al.*, 2008; Jarvis, 2008; Li and Chiu, 2010). تعداد زیاد پلاستیدها در تمامی اندام‌های گیاهی و نقش ذخیره‌ای آنها برای لیپیدها، نشاسته و رنگدانه‌ها آنها را در این زمینه مورد توجه ویژه قرار داده است.

ویژگی‌های گیاه سیب‌زمینی مانند سادگی تکثیر رویشی، آن را تبدیل به یکی از مناسب‌ترین گزینه‌ها برای استفاده در زراعت مولکولی به عنوان یک راکتور زیستی قدرتمند کرده است. در عین حال، بررسی‌های جدید نشان می‌دهد که سیب‌زمینی مزایای بی‌شمار دیگری نیز برای تولید مواد دارویی دارد. غده گیاه سیب‌زمینی اندامی اختصاصی است که برای تجمع مقادیر بالای پروتئین‌سازش یافته است؛ بنابراین، تولید پروتئین‌های نوترکیب در غده با استفاده از پیش‌برهای اختصاصی غده یا هدایت این پروتئین‌ها به آمیلوپلاست با استفاده از پپتیدهای نشانه می‌تواند بسیار سودمند باشد. گزارش‌های متعددی از بیان تراژن‌های گوناگون در غده سیب‌زمینی با استفاده از روش‌های مختلف وجود

برای بررسی بیان موقت ژن از روش بمباران ذره‌ای، از سلول‌های لایه اپیدرمی پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) استفاده شد.

ساخت سازه‌های ژنی

برای ساخت ناقل بیانی ترکیبی LIM14-GUS، قطعه ۷۹ جفت بازی ابتدای توالی LIM14 از پلاسمید pBluscript-LIM14 (Kobayashi et al., 1994) با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *BsaI* خارج شده، پس از هضم آنزیمی پلاسمید (Clontech) pBI121 با آنزیم‌های *XbaI* و *SmaI*، در این جایگاه‌ها همسانه‌سازی گردید.

برای ساخت ناقل بیانی ترکیبی pBI121-CPGFP2، ابتدا ناحیه رمزکننده پروتئین فلورسنت سبز (GFP) از ناقل pGFP2 (Spielhofer and Chua, unpublished) جایگزین ژن *gus* در پلاسمید pBI121 شد. سپس، این پلاسمید با آنزیم‌های *XbaI* و *XhoI* هضم شده و قطعه ابتدای توالی LIM14 که با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *BsaI* از پلاسمید pBluscript-LIM14 خارج شده بود، در این جایگاه‌ها همسانه‌سازی شد.

سازه‌های ساخته شده به همراه ناقل pBI121 با روش انجماد و ذوب (Sambrook and Russell, 2001) به سویه GV3850 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شده، سپس، برای انتقال به گیاه سیب‌زمینی استفاده شدند.

در مرحله بعد، قطعه AtCPRecA-GFP2 از پلاسمید pBI121-CPGFP2 با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* جداسازی شده، در ناقل pBI221 که

توالی نیز مطالعه شد. پس از انتقال سازه‌های مذکور به گیاهان هدف، کارآیی توالی‌های ذکر شده در هدایت پروتئین‌های نو ترکیب به پلاستید ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای تهیه جداکشت ریز غده، ساقه‌های استریل رقم کاردال گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L. cv. Kardal) در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) با اسیدیته ۵/۸، حاوی ۳ درصد سوکروز و ۰/۸ درصد آگار قرار داده شد. سپس، در شرایط دمایی ۱۸ درجه سانتیگراد، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۶۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها هر دو هفته یک بار به محیط کشت تازه منتقل شدند و در نهایت، گیاهچه‌های حاصل به محیط کشت MS دارای ۹ درصد سوکروز منتقل شدند. از راکتور زیستی تعلیق موقت (Piao et al., 2003) محتوی محیط کشت MS مایع حاوی ۹ درصد سوکروز و هورمون BAP با غلظت نهایی ۲ میلی‌گرم در لیتر نیز برای تولید ریز غده استفاده شد.



شکل ۱- غوطه‌وری موقت شاخه‌های حاصل از کشت در شیشه سیب‌زمینی در راکتور زیستی برای غده‌زایی

لیتر برای از بین بردن آگروباکتریوم شستشو شدند. جداکشت‌ها برای باززایی و انتخاب گیاهان تراریخت بر روی محیط باززایی MLS جامد دارای کانامایسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و سفاتا کسیم با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر کشت شده، در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۳ هفته، گیاهچه‌های باززایی شده به منظور ریز غده زایی به محیط کشت MS حاوی ۹ درصد سوکروز منتقل شدند و پس از یک ماه، ریز غده‌های لازم برای مطالعات بعدی تولید شد.

انتقال ژن با روش بمباران ذره‌ای

انتقال ژن به سلول‌های لایه اپیدرمی پیاز با استفاده از دستگاه (Bio-Rad, Biolistic PDS-1000/He, Richmond, CA) انجام شد. شرایط انجام آزمایش عبارت بودند از فاصله صفحه پاره‌شونده تا صفحه حمل‌کننده ذرات ۱۰ میلی متر، فاصله صفحه حمل‌کننده ذرات تا صفحه متوقف‌کننده ۱۴ میلی متر و غیر متغیر، فاصله صفحه متوقف‌کننده تا بافت هدف ۹۰ میلی متر، صفحه پاره‌شونده ۱۱۰۰ psi و فشار خلأ ۲۵ اینچ جیوه. ذرات طلا (با قطر یک میکرومتر) با توجه به دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده تهیه شدند بدین صورت که ۶۰ میلی گرم از ذرات ریز طلا درون ویال ۱/۵ میلی لیتری به مدت ۱۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درجه قرار داده شد. سپس، ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شده، پس از آن ۱ میلی لیتر گلیسرول استریل ۵۰ درصد به آن اضافه شد. DNA پلاسمیدی به صورت مستقیم برای پوشش دادن ذرات طلا بدون خالص‌سازی

با استفاده از هضم آنزیمی با *BamHI* و *SacI* ژن *gus* آن خارج شده بود، همسانه‌سازی شد. همچنین، ناقل p35S-GFP (Clontech) نیز در این روش به عنوان سازه ژنی شاهد استفاده شد.

تراریختی گیاهان

انتقال ژن هدف توسط آگروباکتریوم

باکتری آگروباکتریوم حامل سازه‌های مورد نظر در محیط LB مایع (تریپتون ۱۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر، کلرید کلسیم ۱۰ گرم در لیتر) با اسیدیته ۷ دارای غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک (۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد کشت شدند. وقتی OD_{600} محیط کشت به ۰/۵ رسید، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، رسوب باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط تلقیح (محیط کشت MS، ۵ درصد سوکروز، اسیدیته ۵) مجدداً به صورت سوسپانسیون در آمد.

برش‌های ریز غده استریل با ضخامت ۱ تا ۳ میلی متر که حداقل یک جوانه چشمی داشته باشند در این سوسپانسیون حاوی باکتری به مدت ۳۰ ثانیه معلق شده، پس از آن بر روی کاغذ صافی استریل به منظور خشک شدن قرار داده شدند. پس از آلوده‌سازی جداکشت‌ها، ریز غده‌های آلوده شده روی محیط کشت MLS (Domansky *et al.*, 1995) جامد با اسیدیته ۵/۸ فاقد آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت دو تا سه روز قرار داده شدند.

ریز غده‌ها با محیط کشت مایع MS حاوی آنتی‌بیوتیک سفاتا کسیم با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در

ژن با توالی:

5'-CAA ATT TTC TGT CAG TGG AGA GG-3'

5'-GAT TGT GTG GAC AGG TAA TGG TT-3'

و شرایط: ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتیگراد یک دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه در ۳۰ چرخه برای انجام PCR استفاده شد. DNA تکثیر شده بر روی ژل ۰/۸ درصد آگاروز الکتروفورز شده و قطعات تکثیر شده بررسی شد.

سنجش پروتئین‌های گزارشگر در گیاهان تراریخت جداسازی کلروپلاست و آمیلوپلاست

از یک محیط یونی ضعیف برای جداسازی و تعلیق مجدد کلروپلاست‌ها استفاده شد (Cerovic and Plesnicar, 1984). این محیط پایه حاوی سوربیتول (۳۳۰ میلی‌مولار)، کلرید پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار)، EDTA (۱ میلی‌مولار) و HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid] با غلظت نهایی ۵۰ میلی‌مولار بود و اسیدیته این محیط با هیدروکسید پتاسیم بر روی ۷/۸ تنظیم شد. برای ساخت محلول جداسازی، محیط پایه با سوربیتول ۳۳۰ میلی‌مولار ۲۵ بار رقیق شد (۴ میلی‌لیتر محیط پایه در ۹۶ میلی‌لیتر سوربیتول ۳۳۰ میلی‌مولار). برای ساخت محیط تعلیق مجدد، کلرید منگنز و کلرید منیزیم با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط پایه اضافه شد (Cerovic et al., 1987). هر دو محلول بایستی به صورت تازه تهیه و مصرف شوند. برای استخراج کلروپلاست، دو برگ سبز و جوان گیاهان تراریخته به خوبی خرد شده، سپس، در درون ویال حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول جداسازی قرار

استفاده شد. برای هر بمباران ۵۰ میکرولیتر از محلول ذرات طلا (۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. محلول سانتریفیوژ و روشناور دور ریخته شد و پس از آن ۵ میکرولیتر معادل ۵ میکروگرم DNA، ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۲/۵ مولار و ۲۰ میکرولیتر spermidine ۰/۱ مولار به رسوب حاصل اضافه شده، به خوبی مخلوط شدند. ویال به مدت نیم ساعت بر روی یخ قرار گرفته، طی این مدت چندین بار مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب به ترتیب با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه و ۱۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق شستشو داده شد و در نهایت، در ۱۷۰ میکرولیتر اتانول مطلق مجدداً مخلوط شد. ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط بر روی هر صفحه حمل‌کننده ذرات پخش شد. عمل انتقال ژن ۵ تا ۱۰ دقیقه پس از خشک شدن صفحه مذکور انجام شد.

آزمون PCR

DNA ژنومی از گیاهان تراریخته سیب‌زمینی در مراحل نخست باززایی با روش ارابه شده توسط Kawata و همکاران (۲۰۰۳) با اندکی تغییر استخراج شد. گیاهچه‌های تراریخت با استفاده از PCR برای حضور DNA خارجی تحلیل شدند. PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* با توالی:

5'-GGT GGT CAG TCC CTT ATG TTA CG-3'

5'-CCG GCA TAG TTA AAG AAA TCA TG-3'

و شرایط: ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه در ۳۰ چرخه انجام شد. برای تشخیص ژن *GFP* از آغازگرهای اختصاصی این

شدند. تصاویر توسط دوربین دیجیتال نصب شده بر روی میکروسکوپ فلورسنت مجهز به لامپ زنون ۷۵ وات و با نرم‌افزار Cytovision v.2 ضبط شد و نور از فیلتر FITC (محدود ۴۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر) و فیلتر سبز (۵۴۰ نانومتر) عبور نمود.

سنجش GUS

فعالیت GUS با روش هیستوشیمیایی ارایه شده توسط Jefferson (۱۹۸۷) با برخی تغییرات ارزیابی شد. برای این آنالیز، بافت برگ و بخش‌های غنی از آمیلوپلاست یک شب در محلول واکنش شامل بافر فسفات با اسیدیته ۷ (۵۰ میلی‌مولار)، یک در هزار حجمی/حجمی Na₂EDTA, Triton X-100 (۱ میلی‌مولار)، بتامر کاپتواتانول (۰/۷۸ میکرولیتر در یک لیتر) و سه در هزار وزنی/حجمی 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid به عنوان سوبسترای اختصاصی آنزیم نگهداری شد. نمونه‌های برگ با شستشو با اتانول ۷۰ درجه کلروفیل‌زدایی شدند. نمونه‌ها برای بررسی فعالیت GUS و رنگ آبی حاصل زیر میکروسکوپ با نور مرئی مطالعه شدند.

سنجش کمی فعالیت GUS در بافت غده و بخش‌های غنی از آمیلوپلاست در نمونه‌های باززایی شده تراریختی که در آزمون PCR و رنگ آمیزی اولیه تأیید شده بودند با روش اسپکتوفتومتری (Aich *et al.*, 2001) انجام شد. بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم از بافت با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شده، پس از خرد شدن به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. سپس، یک میلی‌لیتر بافر استخراج شامل بافر فسفات با اسیدیته ۷ (۵۰ میلی‌مولار) و بتامر کاپتواتانول (۱۰ میلی‌مولار) به

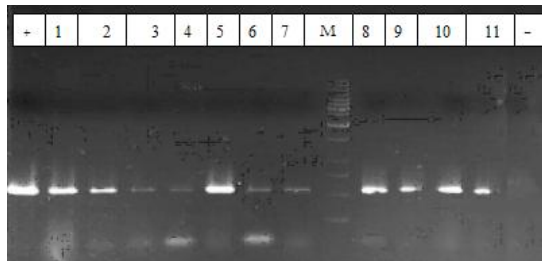
داده شد. سوپانسیون حاصل با استفاده از یک لایه پارچه چیت فیلتر شده و مایع سبز رنگ حاصل به مدت ۴ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل مجدداً در ۳۰ میکرولیتر محلول استخراج معلق شده، برای بررسی‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

برای استخراج آمیلوپلاست‌ها، قطعات کوچک ریز غده در داخل یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری خرد شده و به آن ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل: HEPES/KOH (pH 7.2) (۲۰ میلی‌مولار)، سوربیتول (۵۰۰ میلی‌مولار)، کلرید منیزیم (۱ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۵ میلی‌مولار)، کلرید منگنز (۱ میلی‌مولار)، DTT (۲۰ میلی‌مولار)، EDTA (۱ میلی‌مولار) و ۱۰ درصد حجمی/حجمی اتیلن گلايگول، یک درصد وزنی/حجمی PVP و یک در هزار وزنی/حجمی BSA افزوده شد (Wischmann *et al.*, 1999) و به خوبی له و مخلوط شد. مخلوط حاصل با استفاده از یک لایه پارچه چیت صاف شد و به مدت ۱۰ دقیقه و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن روشناور، رسوب حاوی آمیلوپلاست‌ها برای بررسی‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

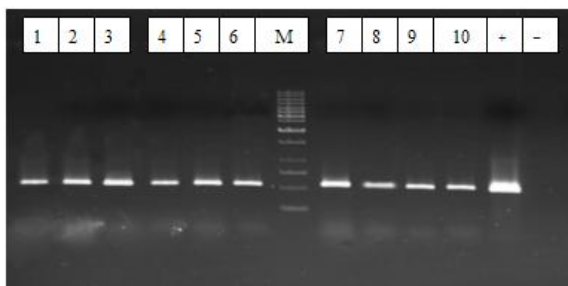
سنجش GFP

نمونه‌های بمباران شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط مرطوب و تاریک نگهداری شدند سپس، برای سنجش GFP، قطعات کوچک از اپیدرم رویی پیاز بین لام و لامل همراه با یک قطره آب مقطر استریل قرار گرفته، با میکروسکوپ فلورسنت Zeiss مطالعه

انتظار برای گیاهان تراریخت بود.



شکل ۳- الکتروفورز نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به تکثیر قطعات ژنومی با آغازگرهای اختصاصی GFP. از چپ به راست، چاهک اول، کنترل مثبت (PBI121-GFP)، چاهک‌های ۱، ۲ و ۳ لاین‌های تراریخت شده با ناقل p35SGFP، چاهک‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ لاین‌های تراریخت شده با ساختار LIM14-GFP، چاهک‌های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ لاین‌های تراریخت شده با ساختار AtpcRecA-GFP و چاهک آخر کنترل منفی (pBI121). تکثیر قطعه ۵۳۹ جفت بازی در تمام چاهک‌ها به غیر از نمونه کنترل منفی قابل مشاهده است. الگوی بانندی نشانگر اندازه مولکولی 1kb شرکت Fermentas در سمت راست شکل قرار دارد.

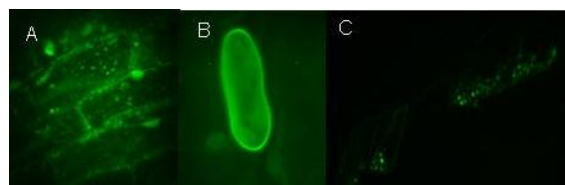


شکل ۴- الکتروفورز نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز مربوط به تکثیر قطعات ژنومی با آغازگرهای اختصاصی GUS. از چپ به راست، چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ لاین‌های تراریخت شده با ناقل p35SGUS، چاهک‌های ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ لاین‌های تراریخت شده با ساختار LIM14-GUS، چاهک ۱۱ (+)، کنترل مثبت (PBI121) و چاهک آخر (-) کنترل منفی (بدون pBI121). تکثیر قطعه ۵۲۰ جفت بازی در تمام چاهک‌ها به غیر از نمونه کنترل منفی قابل مشاهده است. الگوی بانندی نشانگر اندازه مولکولی 1kb شرکت Fermentas در سمت راست شکل قرار دارد.

نمونه‌ها افزوده شد و با ورتکس به خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، روشناور شفاف به ویالی جدید منتقل شد. سپس، *para* nitro-phenyl- β -D-glucoronide (pNPG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار به نمونه‌ها افزوده شد و طیف جذبی نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (دمای فعالیت بهینه آنزیم) نگهداری شده، اندازه‌گیری مجدداً انجام شد. افزایش جذب نشان‌دهنده تولید *p*-nitro-phenol در نتیجه فعالیت GUS است.

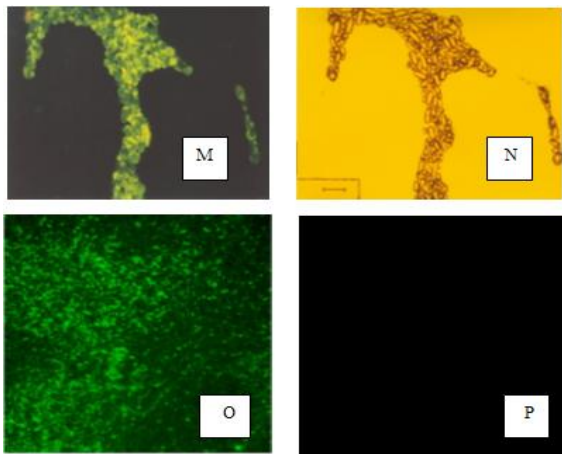
نتایج

بررسی بیان موقت ژن GFP با روش زیست پرتابی در لایه‌های اپیدرمی پیاز نشان‌دهنده این بود که پروتئین ترکیبی AtpcRecA-GFP به طور خاص در پلاستیدها متمرکز شده است (شکل ۲- A و C).



شکل ۲- تجمع درون سلولی GFP در الحاق با پیتید نشانه اپیدرمی پیاز که با روش بمباران ذره‌ای تراریخت شده است. این تصاویر در ۲۴ ساعت پس از بمباران به دست آمده است.

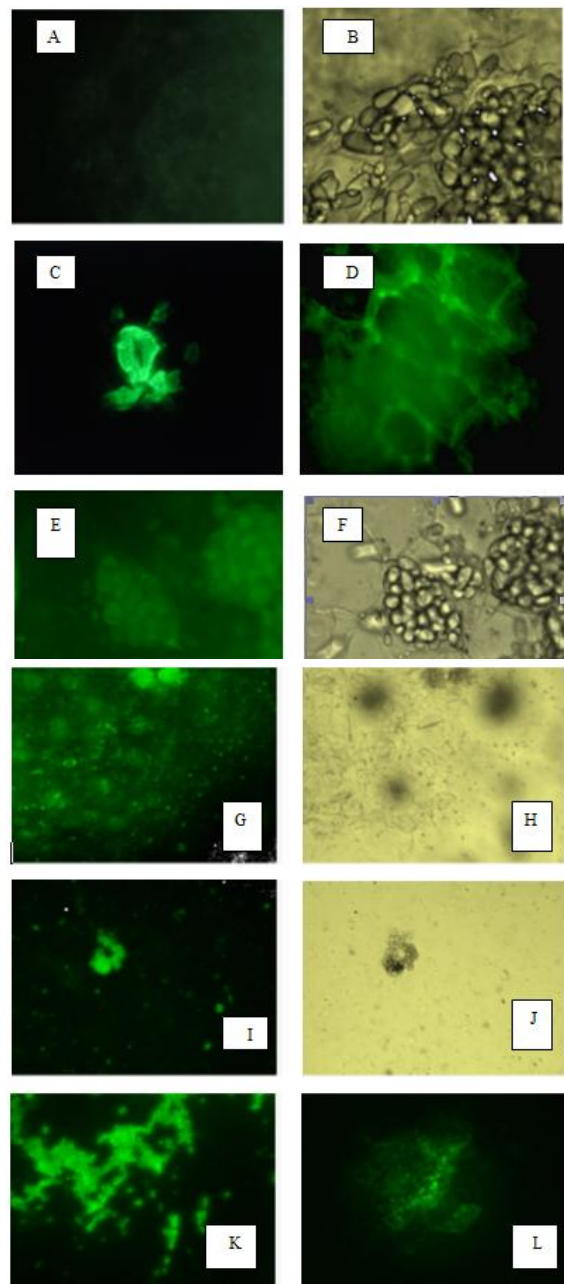
حضور سازه‌های ژنی واجد GFP و GUS در گیاهچه‌های تراریخته با روش PCR تأیید شد که نتایج آن در شکل‌های ۳ و ۴ ملاحظه می‌شود. مشاهده قطعات ۵۳۹ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر ژن GFP و ۵۲۰ نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر ژن *gus* نتیجه مورد



شکل ۵- بررسی میکروسکوپی مقاطع مختلف برگ و غده‌های گیاهان تراریخت سیب‌زمینی دارای ساختارهای ژنی GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلتر FTC؛ فلورسنت تابشی برش عرضی سیب‌زمینی غیر تراریخت (A) و همان تصویر در زیر میکروسکوپ با نور مرئی (B). بیان سیتوزولیک پروتئین GFP بدون پپتید نشانه در برگ (C) و غده (D) گیاهان تراریخت pBI121-GFP. تصویر فلورسنت تابشی برش عرضی غده سیب‌زمینی تراریخت pBI-LIMGFP2 (E) و همان تصویر در زیر میکروسکوپ با نور مرئی (F). تصویر فلورسنت تابشی برگ سیب‌زمینی تراریخت pBI-LIMGFP2 (G) و همان تصویر در زیر میکروسکوپ با نور مرئی (H). تصویر فلورسنت تابشی برگ سیب‌زمینی تراریخت pBI-CPGFP2 (I) و همان تصویر در زیر میکروسکوپ با نور مرئی (J). تظاهر پروتئین GFP در آمیلوپلاست غنی شده گیاه تراریخت pBI-CPGFP2 (K). تظاهر پروتئین GFP در غده گیاهان تراریخت pBI-CPGFP2 (L). تصویر فلورسنت تابشی آمیلوپلاست‌های غنی شده گیاه تراریخت pBI-LIMGFP2 (M) و همان تصویر در زیر میکروسکوپ با نور مرئی (N). تصویر فلورسنت تابشی کلروپلاست‌های غنی شده گیاهان تراریخت pBI-CPGFP2 (O). تصویر فلورسنت تابشی آمیلوپلاست‌های غنی شده گیاهان تراریخت pBI-GFP (P).

در گیاهان تراریخت واجد سازه pBI-LIM-GUS، پروتئین GUS هم در داخل آمیلوپلاست و هم در داخل کلروپلاست هدف‌گیری و ذخیره‌سازی شد (شکل ۶).

تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از غده سیب‌زمینی و بخش‌های سلول‌های بافت سبز گیاهان تراریخت، نشان داد که فلورسانس GFP منحصرأ در پلاستیدها تجمع یافته است، به ویژه زمانی که به پپتیدهای نشانه LIM14 یا AtcpRecA متصل باشد (شکل ۵). این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین ترکیبی GFP با پپتید نشانه به سوی کلروپلاست و آمیلوپلاست هدف‌گیری شده است.



LIM14 با ژن‌های GUS و GFP به خودی خود الگوهای تجمع‌سازی در اندامک‌های زیرسلولی مانند پلاستیدها (آمیلوپلاست، کلروپلاست) را نشان می‌دهند، که در نهایت، نشان‌دهنده این نکته است که این نوع پروتئین‌ها قابلیت هدفمندی به سوی این اندامک‌ها را دارا هستند.

جدول ۱- نتایج حاصل از سنجش کمی GUS در گیاهان تراریخت. pNPG به عنوان یک سوبسترای اسپکتروفوتومتریک برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. جذب در ۴۱۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر پس از اضافه کردن سوبسترا پس از ۲۴ ساعت (A24) اندازه‌گیری شد. تفاوت معنی‌داری بین دو بار اندازه‌گیری، تولید محصول تراژن و در نتیجه حضور و فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد.

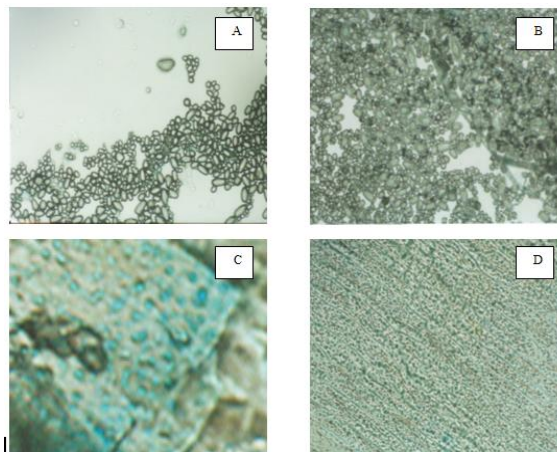
برگ توتون به عنوان کنترل + (GUS)	آمیلوپلاست (Wt)	آمیلوپلاست (GUS)	آمیلوپلاست (LIM14-GUS)	
۰/۹۵۱۳۸۸	۰/۲۹۹۶۷۵	۲/۰۱۳۷۸۸	۰/۲۶۸۸۳۹	A ₀
۱/۵۶۲۱۵	۰/۲۷۵۸۵۷	۱/۹۷۱۶۷۳۲	۰/۳۱۳۵۵۹	A ₂₄
۰/۶۱۰۷۶۲	-۰/۰۲۳۸۱۸	-۰/۰۴۲۱۱۴۸	۰/۰۴۴۷۲	A ₂₄ -A ₀

بحث

توالی پپتید نشانه ATCPrecA که در گیاه آراییداپسیس توالی راهنمای انتقال به کلروپلاست است، توانایی انتقال پروتئین متصل به خود را به کلروپلاست و آمیلوپلاست (پلاستیدها) در هر دو حالت بیان موقت و انتقال دائم ژن داراست. این امر نشان‌دهنده این موضوع است که این توالی برای انجام عمل خود نیازی به تغییرات پس از ترجمه- که در انتقال دائم ژن رخ می‌دهد- ندارد.

با توجه به گزارش Mousavi و همکاران (۱۹۹۹) که اعلام کردند پروتئین LIM14 به دانه‌های نشاسته

گیاهان تراریخت شده با pBI121، بیان سیتوزولی پروتئین GUS را نشان دادند و بیان بسیار ضعیفی در پلاستیدهای استخراج شده داشتند (شکل ۶- A).



شکل ۶- آزمون هیستوشیمیایی GUS روی اجزای آمیلوپلاستی جداشده از ریز غده گیاهان تراریخته دارای ناقل pBI121 (A) و ریز غده‌های گیاهان تراریخته دارای ساختار LIM14-GUS (B). مقاطع تهیه شده از بافت ساقه گیاهچه‌های واجد ساختار LIM14-GUS (D) و همان شکل با بزرگ‌نمایی بیشتر (C). کلروفیل‌ها با تیمار نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد حذف شدند.

GUS بدون کمک پپتید نشانه نمی‌تواند وارد پلاستیدها شود (A) ولی با پپتید نشانه این امر صورت گرفته است (B). شکل‌های C و D نقطه‌های آبی، فعالیت GUS را در پلاستیدها در بافت ساقه گیاهچه و در نتیجه هدف‌گیری و تجمع GUS را در این اندامک‌ها نشان می‌دهد.

در عین حال، آزمون سنجش کمی فعالیت GUS در آمیلوپلاست گیاهان تراریخت سیب زمینی و شاهد نشان‌دهنده فعالیت بیشتر آنزیم GUS در گیاهان تراریخت با سازه واجد پپتید نشانه LIM14 در مقایسه با گیاهان تراریخت با سازه بدون پپتید نشانه و شاهد بود (جدول ۱). هر دو پروتئین ترکیبی AtCPRecA و

پلاستید داشتند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که هر دو پپتیدهای نشانه پلاستی‌دی هستند و می‌توانند در هدایت پروتئین‌های نوترکیب متصل به خود به این اندامک‌ها نقش داشته باشند و در حوزه‌های زراعت مولکولی، مهندسی متابولیت‌ها و تولید گیاهان تراریخت مقاوم استفاده شوند. البته باید توجه داشت که بسیاری از پروتئین‌ها برای فعالیت خود نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند و هدایت آنها به پلاستیدها به دلیل عدم وجود راه کاری برای ایجاد این تغییرات، نمی‌تواند مفید باشد. همچنین، محدودیت‌هایی برای انتقال پروتئین‌هایی که باعث اختلال در انجام وظایف حیاتی این اندامک‌ها و در نتیجه مرگ سلول می‌شوند، وجود دارد.

با توجه به این که اثر پروتئین‌های سلول میزبان بر روی پروتئین‌های مختلف یکسان نیست بنابراین، میزان بیان ژن گزارشگر نمی‌تواند شاخص میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب دیگر باشد.

پپتیدهای نشانه پلاستی‌دی از نظر طول توالی تنوع بالایی نشان می‌دهند و دارای تعداد بسیار اندک یا فاقد اسیدهای آمینه اسیدی هستند در مقابل، تعداد زیادی اسیدهای آمینه بازی با پیوندهای هیدروکسیلی متعدد دارند (Emanuelsson and Heijne, 2001). اما توالی پایانه آمینی پروتئین LIM14 یا همان توالی نشانه این پروتئین، دارای ویژگی ذکر شده توالی‌های نشانه پلاستی‌دی نیست و در عین حال دارای توالی معمول جایگاه برش مشابه اغلب پپتیدهای نشانه پلاستی‌دی نمی‌باشد (Li et al., 1992).

در برخی سامانه‌های بیان هترولوگوس، ممکن است در زمان بیان پروتئین‌های ترشحی، توالی نشانه پروتئین به درستی برداشته نشود و این موضوع به افزایش یا

مربوط است، توالی نشانه LIM14 که یک توالی هدایت‌کننده به آمیلوپلاست و کلروپلاست در گیاه *Lilium lingiflorum* است و همچنین، توانایی هدایت پروتئین‌های گزارشگر به آمیلوپلاست و کلروپلاست را در حالت انتقال دایم ژن به گیاه تراریخت دارد و این در حالی است که این توالی در شرایط بیان موقت ژن این توانایی را ندارد. این دو مشاهده تأیید‌کننده این موضوع است که توالی‌های هدایت‌کننده به پلاستیدها دارای شباهت‌هایی در عملکرد خود هستند و علت این امر آن است که همگی دارای منشأیی مشترک (پیش پلاست) هستند (Li and Chiu, Gould et al., 2008). بنابراین، سامانه‌های مشابهی در انتقال و هدایت پروتئین‌ها به پلاستیدها نقش دارند.

توالی نشانه AtCPRecA در سلول‌های اپیدرم پیاز و توالی نشانه LIM14 در کشت سلولی BY-2 و هر دو توالی در سیب‌زمینی، توانایی هدایت پروتئین‌های گزارشگر را به پلاستید دارا هستند.

داده‌های به دست آمده از سنجش کمی GUS نشان می‌دهد که در گیاهان تراریخت شده با سازه pBI-LIMGUS، افزایش فعالیت پروتئین گزارشگر GUS که توسط پپتید نشانه LIM14 به آمیلوپلاست‌ها منتقل شده بود در طول ۲۴ ساعت مشاهده شد، در حالی که در گیاهان تراریخت شده با سازه pBI121 که فاقد توالی نشانه است، این افزایش دیده نشد. همچنین، بیان GUS در سیتوسل هر دو گیاه تراریخت مذکور نیز مشاهده شد.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، توالی‌های نشانه LIM14 و AtCPRecA وظیفه پیش‌بینی شده را انجام داده، قابلیت هدایت پروتئین نوترکیب را به درون

سایر گونه‌ها، به ویژه گیاهان زراعی مهم مانند سیب زمینی هنوز به راحتی قابل انجام نبوده، بسیار پُر چالش است. لذا، هدفمندسازی پروتئین‌های تولید شده توسط ژن‌های انتقال یافته به هسته همچنان راه کاری مؤثر و ساده‌تر در مقایسه با بیان ژن در پروکاریوت‌هاست و برای تولید تجاری پروتئین‌های نو ترکیب مطرح است.

کاهش اسیدهای آمینه پایانه آمین پروتئین نو ترکیب منجر می‌شود. در بسیاری از موارد، این تغییرات ناخواسته، در تولید مواد دارویی نو ترکیب نامطلوب است (Aoust *et al.*, 2004).

نخستین انتقال ژن به پلاستید در گیاهان عالی در سال ۱۹۹۰ به کلروپلاست گیاه توتون انجام شد (Svab *et al.*, 1990). با وجود این، این فناوری در

منابع

- Aich, S., Delbaere, L. T. and Chen, R. (2001) Continuous spectrophotometric assay for beta-glucuronidase. *BioTechniques* 30(4): 846-851.
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U. and During, K. (1998) Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* 4: 313-319
- Castanon, S., Marin, M. S., Martin-Alonso, J. M., Boga, J. A., Casais, R., Humara, J. M., Ordas, R. J. and Parra, F. (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal of Virology* 73: 4452-4455.
- Cerovic, Z. G. and Plesnicar, M. (1984) An improved procedure for the isolation of intact chloroplasts of high photosynthetic capacity. *Biochemical Journal* 223: 543-545.
- Cerovic, Z. G., Cheesbrough, J. K. and Walker, D. A. (1987) Photosynthesis by intact isolated chloroplasts on solid support. *Plant Physiology* 84: 1249-1251.
- D'Aoust, M. A., Busse, U., Martel, M., Lerouge, P., Levesque, D. and Vézina, L. P. (2004) Perennial plants as a production system for pharmaceuticals. In: *Handbook of plant biotechnology* (Eds. Paul, C. and Klee, H.) 321-330. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Domansky, N., Ehsani, P., Salmanian, A. H. and Medvedeva, T. (1995) Organ specific expression of hepatitis B surface antigen in potato. *Biotechnology Letters* 17(8):863-866.
- Ehsani, P., Khabiri, A. and Domansky, N. N. (1997) Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. *Gene* 190:1 07-111.
- Emanuelsson, O. and Heijne, G. (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochemica et Biophysica Acta* 1541: 114-119.
- Farran, I., Sanchez-Serrano, J. J., Medina, J. F., Prieto, J. and Mingo-Castel, A. M. (2002) Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Research* 11: 337-346.
- Fischer, R. and Emans, N. (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9: 279-299.
- Giddings, G. (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current opinion in Biotechnology* 12: 450-454.
- Gould, S. B., Waller, R. F. and McFadden, G. I. (2008) Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology* 59: 491-517.
- Hoppman, V., Di Fiore, S., Zimmermann, S., Emans, N., Rademacher, T., Fischer, R. and Schillberg, S. (2002) The potato granule bound starch synthase chloroplast transit peptide directs recombinant proteins to plastids. *Journal of Plant Physiology* 159: 1061-1067.

- Jarvis, P. (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytologist* 179: 257-285.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Ji, Q., Vincken, J. P., Suurs, L. C. J. M. and Visser, R. G. F. (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 51: 789-801.
- Kawata, M., Matsumura, Y., Oikawa, T., Kimizu, M., Fukumoto, F. and Kuroda, S. (2003) Analysis of DNA extraction buffer components from plant tissue by polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 318(2): 314-317.
- Kim, H.-S., Euy, J.-W., Kim, M.-S., Lee, B.-C., Mook-Jung, I., Jeon, J.-H. and Joung, H. (2003) Expression of β -human amyloid in transgenic potato. *Plant Science* 165: 1445-1451.
- Kobayashi, T., Kobayashi, E., Sato, S., Hotta, Y., Miyajima, N., Tanka, A. and Tabata, S. (1994) Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA Research* 1: 15-26
- Kusnadi, A., Nikolov, Z. L. and Howard, J. A. (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 56: 473-484.
- Li, H. M. and Chiu, C. C. (2010) Protein transport into chloroplasts. *Annual Review of Plant Biology* 61: 157-180.
- Li, H., Sullivan, T. D. and Keegstra, K. (1992) Information for targeting to the chloroplastic inner envelope membrane is contained in the mature region of the maize Bt1-encoded protein. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 18999-19004.
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K. and Arntzen, C. J. (1996) Expression of norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5335-5340.
- Mousavi, A., Hiratuka, R., Takase, H., Hiratsuka, K. and Hotta, Y. (1999) A novel glycine-rich protein is associated with starch grain accumulation during anther development. *Plant and Cell Physiology* 40: 406-416.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Peng, J. S. and Gong, J.-M. (2011) The mechanisms of protein sorting and translocation regulated by signal peptides. *Zhiwu Shengli Xuebao/Plant Physiology Journal* 47: 9-17.
- Piao, X. C., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. and Peak, K. Y. (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science* 84: 1129-1132.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, New York.
- Schiermeyer, A., Dorfmueller, S. and Schinkel, H. (2004) Production of pharmaceutical proteins in plants and plant cell suspension cultures. In: *Molecular farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins* (Eds. Fischer, R. and Schillberg, S.) 91-112. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Shadwick, F. S. and Doran, P. M. (2004) Foreign protein expression using plant cell suspension and hairy root cultures. In: *Molecular farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins* (Eds. Fischer, R. and Schillberg, S.) 13-36. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 87(21): 8526-8530.

- Thomas, B. R., Deynze, A. V. and Bradford, K. J. (2005) Production of therapeutic proteins in plants. Agricultural and Natural Resources Publication, University of California, Berkeley.
- Wischmann, B., Nielsen, T. H. and Muller, B. L. (1999) *In vitro* biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiology* 119: 455-462.
- Wright, K. E., Prior, F., Sardana, R., Altosaar, I., Dudani, A. K., Ganz, P. R. and Tackaberry, E. S. (2001) Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tobacco. *Transgenic Research* 10: 177-181.

Functional assessment of plastid signal peptide sequences LIM14 and AtCPrecA in localization of Green Fluorescent Protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter proteins in transgenic potato plants

Omid Taghavian, Amir Mousavi *, Haleh Hashemi Sohi, Esmat Jourabchi and Kasra Esfahani

Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

In this study, signal peptide sequences of *Lilium longiflorum* anther-specific protein LIM14 and ATCPrecA, a protein with the origin of *A. thaliana* that had the characteristics of chloroplast signal sequence were independently fused to the N terminus of the green fluorescent protein (GFP) and β -glucuronidase (GUS) genes and subsequently transferred to potato (*Solanum tuberosum* cv. Kardal) as an important starch storage plant by Agrobacterium-mediated transformation. Fluorescence microscopy and GUS staining showed that the recombinant LIM14-GFP fusion protein was targeted to the amyloplast and chloroplast of transgenic potato plants. Quantitative assay of GUS showed that the level of expression in the enriched amyloplast fragment of signal peptide included plants is higher than the GUS control transformed plants. ATCPrecA is a protein with the origin of *Arabidopsis thaliana* that had the characteristics of chloroplast signal sequence in N-terminus. To study the function of the transit peptide of ATCPrecA, full length cDNA was fused to the N-terminus of the GFP to make recombinant protein. ATCPrecA-GFP was transferred to potato by Agrobacterium-mediated transformation and transiently expressed in onion (*Allium cepa* L.) epidermal cells via microprojectile bombardment. According to the results of this research, we concluded that the transit sequence of both LIM14 and ATCPrecA were functional and were capable of directing recombinant proteins into plastids.

Key words: Plastid, Transgenic potato, Recombinant protein, Signal peptide, Quantitative assay

* Corresponding Author: m-amir@nigreb.ac.ir