



همسانه‌سازی فرم اصلاح شده ژن *tPA* انسانی در ناقل کلروپلاستی و باززایی گیاهان ترانس پلاستومیک

توتون

مریم عبدلی نسب^۱، مختار جلالی جواران^{۲*}، امین باقی زاده^۳، هوشنگ علیزاده^۴

^۱ دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان.

^۴ استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۵/۰۱

چکیده

گیاهان جایگزین مناسبی برای سیستم‌های معمول بیان پروتئین‌های نوترکیب و داروهای زیستی، نظیر حیوانات یا سیستم‌های میکروبی تراریخته می‌باشند. به دلیل پلی‌پلوئیدی بالای ژنوم پلاستید گیاهی، در صورت تراریختی کلروپلاست، هزاران نسخه از ژن خارجی در هر سلول وارد و حجم بسیار بالایی از پروتئین نوترکیب تولید می‌شود. پس از سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی-عروقی دومین عامل مرگ و میر انسانی هستند. فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی (*tPA*) یکی از مهمترین پروتئین‌های نوترکیب دارویی است که جهت از بین بردن لخته خون در قسمت‌های مختلف بدن از جمله رگ‌های خونی قلب و مغز استفاده می‌شود. فرم اصلاح شده پلاسمینوژن بافتی (*K2S*) دارای نیمه عمر پلاسمایی طولانی‌تر، قدرت نفوذ در لخته و فعالیت فیبرینولیتیک بالاتر می‌باشد. در این مطالعه، به منظور انتقال ژن *K2S* به کلروپلاست گیاه توتون، پس از طراحی سازه، ژن هدف در ناقل کلروپلاستی *pKCZ* درج و سپس در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی گردید. پس از شلیک موفق ناقل حاوی ژن *K2S* (*pKCZK2S*) به ریزنمونه‌های برگ با استفاده از تکنیک بیولستیک، ریزنمونه‌ها بر روی محیط انتخابی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین قرار گرفتند. پس از باززایی نوساقه‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی، به منظور رسیدن به هموپلاسمی چهار دوره انتخاب و باززایی در حضور آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین انجام شد. حضور، درج در جایگاه مشخص، بیان ژن *K2S* و هموپلاستی در گیاهان ترانس پلاستومیک با روش‌های *PCR*، *RT-PCR* و سادرن بلات به تایید رسید.

واژه های کلیدی: زراعت مولکولی، تراریختی کلروپلاست، ترانس پلاستومیک، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی.

ترومبولیتیکی بیشتر نسبت به tPA طبیعی اشاره کرد (Kohnert et al., 1992). گزارشات متعددی از تولید tPA نوترکیب در باکتری ایشرشیاکولی (Ji et al., ; Qiu et al., 1998; Saito et al., 1994) (1998)، سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) (Corwright, 1992)، مخمر ساکارومیس سرویزیا⁵ (Lemontt et al., 1985)، لاین‌های سلولی مشتق شده از مگس سرکه (Oka et al., 1990)، آسپرژیلوس نیدولانس⁶ (Mariyln et al., 2001)، لیشمانیا (Soleimani et al., 2006)، سلول‌های C127 موش (Reddy et al., 1987)، غدد شیری گاو و موش (Huang et al., 1999) و شیر بز (Ebert et al., 1991) موجود است. از مهمترین معایب سیستم‌های ذکر شده می‌توان به هزینه بالای تولید، بازده کم، واکنش‌های ایمنولوژیک در اثر آلودگی باکتریایی (Dater et al., 1993)، خطر آلودگی به بیماری‌های مشترک و ویروس‌های حیوانی اشاره کرد (Verma and Daniell, 2007). با افزایش تقاضا برای تولید این پروتئین به دلیل استفاده‌های مختلف آن برای درمان بیماری‌های فیبرینولیتیک، وجود سیستم تولید در مقیاس وسیع، مقرون به صرفه و ایمن ضروری می‌باشد. تولید داروهای زیستی در گیاهان و به عبارتی دیگر استفاده از گیاه به عنوان کارخانه زیستی تولید پروتئین‌های نوترکیب یا همان کشاورزی مولکولی⁷

بر اساس اعلام رسمی سازمان بهداشت جهانی، علل مرگ و میر ۱۷ میلیون نفر از ۶ میلیارد مردم جهان، بیماری‌های قلبی-عروقی است (Ghareyazei, 2006). فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی^۱ (tPA)، از مهمترین پروتئین‌های دارویی است که نقش مهم در سیستم فیبرینولیتیک و باز شدن لخته‌های خونی دارد (Colen and Lijnen, 2004).

پروتئین tPA یک سرین پروتئاز با زنجیره پلی‌پپتید ۵۲۷ اسیدآمینوای، ۱۷ باند دی‌سولفیدی، هفت درصد کربوهیدرات، وزن مولکولی ۶۸-۶۳ کیلودالتون و دارای پنج دُمین ساختاری (دُمین انگشتی^۲ (F)، فاکتور رشد پوستی^۳ (EGF)، کرینگل^۴ ۱۴ (K1)، کرینگل^۲ (K2)، و سرین پروتئاز) می‌باشد (Ranby et al., 1982). فرم اصلاح شده فعال‌کننده پلاسمینوژن انسانی، (K2S) Reteplase است که فاقد دُمین‌های F، EGF و K1 فرم اصلی می‌باشد. این فرم فاقد جایگاه گلیکولیزه بوده، تعداد آمینواسید آن به ۳۵۵ و تعداد باندهای دی‌سولفیدی آن به ۹ کاهش یافته است. از ویژگی‌های بارز آن می‌توان به نیمه عمر پلاسمایی بیشتر، مقاومت بیشتر به مهارکنندگان پروتئاز پلاسمما، توانایی بیشتر در اتصال انتخابی به فیبرین و توانایی

¹ Human Tissue Plasminogen Activator

² Finger

³ Epidermal Growth Factor

⁴ Kringle

⁵ *Saccharomyce cerevisiae*

⁶ *Aspergillus nidulans*

⁷ Molecular Farming

به پروتئین tPA جهت مصارف درمانی در سگته- های قلبی و مغزی، کشور ما یکی از واردکنندگان اصلی این دارو می‌باشد. تولید پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست گیاهان علاوه بر قیمت ارزان محصول تولیدی، امکان تولید انبوه آنها را فراهم می‌آورد. در این تحقیق، همسانه سازی ژن tPA فرم K2S در ناقل کلروپلاستی مخصوص گیاه توتون و انتقال آن به کلروپلاست گیاه توتون صورت پذیرفت. در گیاهان ترانس‌پلاستومیک تولیدی وضعیت بیانی ژن هدف بررسی گردید تا گامی جهت تولید این پروتئین فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ناقل pKCZ (دریافت شده از پروفیسور هنز کوپ از دانشگاه مکسیمیلیان مونیخ^۱) جهت تراریختی کلروپلاست گیاه توتون استفاده شد. این ناقل شامل ژن *aada* است که مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین را فراهم می‌کند و تحت کنترل پیشبر *Prrn* مربوط به اپرون rRNA پلاستییدی به عنوان یک پیشبر دائمی بیان می‌شود. همچنین دو ناحیه *INSR* و *INSL* که دقیقاً مشابه دو ناحیه از ژنوم پلاستییدی گیاه توتون است، سبب انجام نوترکیبی همولوگ بین ناقل و ژنوم پلاستییدی و در نهایت درج ژن در کلروپلاست گیاه توتون می‌شود. سازه ژنی جهت

یکی از جدیدترین راهبردها می‌باشد. با وجود گزارشات متعدد انتقال ژن‌های مختلف در هسته گیاهان و بیان پروتئین‌های نوترکیب، این نوع بیان ژن دارای نقایص متعددی از جمله حجم کم پروتئین نوترکیب تولید شده در هر گیاه و زمان طولانی رشد گیاه می‌باشد. ژن tPA به هسته گیاه توتون (Masumi asl et al., Hahn et al., 2009); جلبک دریایی *Laminaria japonica* (2010); و ریشه‌های موئینه خربزه شرقی (Zhang et al., 2009) (Kang et al., 2011) انتقال داده شده است. بیشترین میزان بیان tPA، ۰/۰۱۴٪ پروتئین محلول کل در توتون و ۰/۱۷-۰/۱۵ میکروگرم در میلی گرم ریشه گزارش شده است. یکی از راهکارهای مناسب برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته، الحاق ژن یا ژن‌های کد کننده پروتئین نوترکیب مورد نظر در ژنوم کلروپلاست است. به دلیل ماهیت پلی‌پلوئیدی موجود در سیستم ژنتیکی پلاستید که شامل هزاران نسخه از این ژنوم در هر سلول می‌شود، در صورت تراریختی، حجم بسیار بالایی از پروتئین خارجی در این اندامک‌ها تولید می‌شود. یعنی پلاستیدهای تراریخت به منزله کارخانه‌های قوی تولید پروتئین نوترکیب عمل خواهند کرد. عدم فرار ژن به دلیل توارث مادری پلاستید در بیشتر گیاهان، بیان ژن هدف در یک جایگاه خاص، عدم پدیده اثر مکانی و خاموشی ژن و بیان همزمان چند ژن انتقال یافته از دیگر مزایای انتقال ژن به کلروپلاست است. با توجه به نیاز مبرم

¹ Prof. Hans U. Koop: Ludwig Maximilians University, Munich

در حضور آنزیم لیگاز و بر اساس دستورالعمل کیت K1214 شرکت فرمتاز صورت گرفت. استفاده از محل همسانه‌سازی چندگانه ناقل تجاری pTZ57R/T امکان فعالیت بهتر جهت مراحل بعدی همسانه‌سازی در ناقل کلروپلاستی خاص گیاه توتون را فراهم می‌آورد. همچنین می‌توان از آغازگرهای M13 دو طرف محل درج چندگانه برای تعیین توالی استفاده کرد (Esmaili et al., 2006).

معرفی سازه تهیه شده به سلول‌های مستعد باکتری ایشریشیاکولی: جهت آماده کردن سلول-های *E. coli* سویه DH5 α از روش کلرید کلسیم و جهت تراریختی به درون باکتری از روش شوک حرارتی (Sambrook, 2001) استفاده شد. از کلون-های رشد یافته در محیط LB مایع حاوی آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی (Sambrook, 2001) انجام شد. صحت همسانه‌سازی با استفاده از هضم برشی با آنزیم *NcoI*، کلونی PCR^۳ و توالی‌یابی تایید شد. پس از اطمینان از صحت توالی و چهارچوب خواندن ژن K2S، ناقل تجاری pTZ57R/T حاوی ژن K2S استخراج و توسط آنزیم برشی *NcoI* هضم شد. قطعه ژنی K2S از روی ژل آگاروز با کیت خالص سازی ساخت شرکت BioNeer جدا شد.

درج ژن tPA فرم K2S در ناقل pKCZ قبل از ژن *aadA* طراحی شد. ژن K2S و *aadA* به صورت دی سیسترون تحت کنترل پیشبر *Prrn* بیان خواهند شد (شکل ۱). بدین منظور آغازگرهای مناسب طراحی شد. در طراحی آغازگر رفت (PF1)، توالی جایگاه برشی *NcoI* (به منظور درج ژن در ناقل کلروپلاستی pKCZ)، توالی شش هیستیدین (به منظور نشانمند کردن و تسهیل تخلیص پروتئین رتپلاز تولیدی)، توالی پروتئازی فاکتور Xa^۱ (به منظور جدا کردن پپتیدهای هیستیدین از پروتئین tPA پس از تخلیص) اضافه گردید. در طراحی آغازگر برگشت (PR1)، جایگاه اتصال ریبوزومی RBS^۲ (به منظور بیان ژن *aadA*) و جایگاه برشی *NcoI* در نظر گرفته شد.

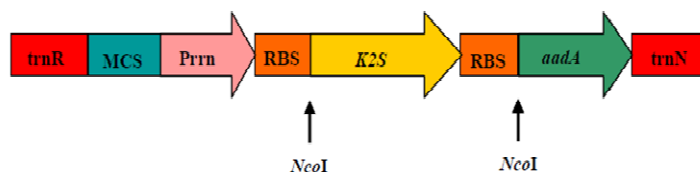
شرایط تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و از طریق PCR با برنامه ۳۰ سیکل شامل دمای واسرشته‌سازی ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه، ۵ دقیقه در ۹۴ °C به عنوان پیش دما و ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C به عنوان بسط نهایی بهینه شد.

همسانه‌سازی ژن هدف (K2S) در ناقل تجاری pTZ57R/T از طریق PCR با کمک آنزیم *Taq DNA Polymerase* به انتهای ۵' ژن K2S، چندین نوکلئوتید A افزوده شد. عمل درج ژن هدف K2S در ناقل تجاری pTZ57R/T

¹ Factor Xa

² Ribosome Binding Site

³ Colony PCR



شکل ۱- تصویر شماتیک سازه طراحی شده برای بیان دی سیسترونیک ژن K2S در ژنوم کلروپلاست توتون.

Figure 1- Schematic view of the designed construct for dicistronic expression of the K2S gene in tobacco chloroplast genome.

توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

PF1: 5'- CAT GCC ATG GAA CAT CAT CAT CAT CAT CAT ATC GAA GGT CGC

Overhang NcoI Gly Histag Factor Xa
GGA AAC AGT GAC TGC TAC TTT G

PR1: 5'- CAT GCC ATG GAT CCC TCC CTT CAT CAC GGT CGC ATG TTG TC -3'

Overhang NcoI RBS Stop codon

Overhang: لنگرگاه، **Gly:** اسید آمینه گلیسین، **Histag:** شش هیستیدین، **Stop codon:** کدون خاتمه، **RBS:** جایگاه اتصال ریبوزومی

با آغازگر طراحی شده از ناحیه Prn وکتور، ۸۰ جفت باز قبل از ژن به عنوان آغازگر رفت (PF2) و همراه با آغازگر برگشت ژن K2S (PR2) و از طریق PCR تایید شد. صحت کلونینگ با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم NcoI، کلونی PCR و توالی یابی تایید شد. کلون‌های حاصل در مرحله بعد جهت انتقال به کلروپلاست توتون مورد استفاده قرار گرفتند.

PF2: 5'- GGC TAG CGG CAA TTC GCC GTC GTT CAA TGA GAA T-3'
PR2: 5'- TCA CGG TCG CAT GTT GTC ACG AAT CCA G -3

مواد گیاهی: بذور توتون Nicotiana

tabacum رقم Xhanti پس از ضد عفونی در محیط

همساز سازی ژن K2S در ناقل کلروپلاستی pKCZ: ناقل کلروپلاستی pKCZ با آنزیم برشی NcoI خطی شد. فسفر انتهای ۵' ناقل خطی شده با کیت آلکالین فسفاتاز EF0651 ساخت شرکت فرمنتاز، حذف شد و ژن K2S با استفاده از واکنش اتصال در آن درج شد. ساختار تهیه شده به روش قبلی به سلول‌های مستعد باکتری E. coli سویه DH5α وارد شد. از کلون‌های رشد یافته در محیط LB مایع، استخراج پلاسمید pKCZK2S به روش لیز قلیایی انجام گرفت. با توجه به اینکه دو طرف ژن و وکتور با یک آنزیم برش داده شده بود، این احتمال وجود داشت که قطعه ژنی به صورت معکوس در ناقل قرار گیرد، جهت صحیح درج ژن،

۹۰۰، فشار خلاء ۲۴ inch Hg، فاصله بافت هدف تا صفحات متوقف شونده ۶ سانتی متر بود.

کشت برگ‌های تراریخت: برگ‌های بمباران

شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط کنترل شده و بر روی محیط RMOP قرار گرفتند. سپس به اندازه-های ۰/۵×۰/۵ خرد و در روی محیط گزینش‌گر (RMOP حاوی ۱ mgL⁻¹ آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین) در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تعویض مرتب محیط‌ها هر دو هفته یکبار انجام گرفت. پس از گذشت چهار هفته از زمان بمباران، اولین گیاهچه‌های مقاوم بر روی محیط انتخابی ظاهر شدند. به منظور دستیابی به هموپلاسمی، ساقه‌ها و برگ‌های گیاهان تازه رسته به قطعات کوچک‌تر تقسیم و به محیط‌های غربال حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. این عمل برای دوره‌های متعدد باززایی (۴ بار) صورت گرفت.

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA:

DNA ژنومی برگ‌های گیاهان تراریخت و شاهد به روش CTAB (Murray and Thompson, 1980) استخراج شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز انجام شد. جهت آنالیز PCR، در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش، ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۱/۴ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱۰ میکرومولار آغازگر رفت و برگشت مربوط به ژن

کشت MS در شرایط استریل، کشت شد و در فیتوترون در ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برگ‌های بالغ سبز تیره جهت تراریختی از گیاهان برداشت شدند.

تراریختی کلروپلاست: جهت تراریختی،

برگ‌ها ۲۴ ساعت قبل بر روی محیط RMOP (محیط کشت MS پایه حاوی ۱ mgL⁻¹ NAA=۳ mgL⁻¹ BAP و تیامین ۱ mgL⁻¹) در فیتوترون ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

آماده سازی ذرات ناقل: جهت انجام

تراریختی با تکنیک بمباران ذره‌ای، از ذرات طلا با قطر ۰/۶ میکرومتر استفاده شد. پس از استریل ذرات با اتانول ۷۰٪، ناقل حامل ژن (pKCZK2S)، توسط کلرید کلسیم ۲/۵ مولار و اسپرمیدین ۰/۱ مولار بر روی آنها رسوب و بر روی صفحات ناقل توزیع شد.

تراریختی برگ‌ها با ذرات ناقل حاوی

DNA: جهت تراریختی از دستگاه PDS-1000/He شرکت بایورد^۲ استفاده شد. قبل از تراریختی تمام اجزای غیر ثابت دستگاه کاملاً استریل شد. شرایط مطلوب شلیک شامل فشار گاز هلیوم ۱۱۰۰ Psi، فشار صفحات پاره شونده Psi

^۱ Murashige and Skoog

^۲ Bio Rad

شد. غلظت محصولات هضم شده توسط نانودراپ تعیین و ۲۰ میکروگرم از محصولات هضم شده، بر روی ژل آگاروز ۱٪ به مدت ۱۵ ساعت با ولتاژ ۲۵ تفکیک شدند. قطعات DNA در حضور محلول‌های نمکی واسرشت و با استفاده از خاصیت کاپیلاری (Brown, 1999) به غشای نیتروسولوزی منتقل شد. هیبریداسیون کاوشگر به غشا، تهیه بافرهای مورد نیاز و ظهور باندها طبق دستورالعمل کیت DIG-DNA Labeling and Detection kit (Roche, Germany) صورت گرفت.

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح RNA:

استخراج RNA از برگ‌های جوان با استفاده از محلول RNX-Plus شرکت سیناژن صورت گرفت. RNA استخراج شده تحت تاثیر آنزیم DNase شرکت Fermentase قرار گرفت. کیفیت و کمیت آن با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و از طریق اسپکتروفتومتر تعیین شد. ساخت cDNA با کیت K1214 شرکت Fermentase صورت گرفت. سپس واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از وسط ژن K2S (PF4 و PR4) صورت گرفت. جهت آنالیز PCR، در حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش، ۵۰ نانوگرم cDNA الگو، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱۰ میکرومولار آغازگر رفت و برگشت و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase استفاده شد. شرایط تکثیر، ۳۰ سیکل شامل دمای واسرشته سازی ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ دقیقه

K2S و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق شرایط بهینه شده انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. گیاهان دارای ژن K2S شناسایی و انتخاب شدند. به منظور تایید درج صحیح ژن در ژنوم کلروپلاست توتون، آنالیز PCR دیگری با آغازگر رفت طراحی شده از درون ژن K2S (PF3) و آغازگر برگشت طراحی شده از روی ژنوم کلروپلاست خارج از ناحیه درج (PR3) صورت گرفت. شرایط تکثیر از طریق PCR، شامل ۳۰ چرخه در دمای واسرشته‌سازی ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ °C به مدت ۱۲۰ ثانیه، ۵ دقیقه در ۹۴°C به عنوان پیش دما و ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C به عنوان بسط نهایی بهینه شد. 5' - GCA TCT - PF3: 3' - AAG TAG TAA GCC CAC CCC A PR3: 5' - TTG ATG CGA AAC TGA GGC TG - 3'

طراحی کاوشگر و انجام آزمون سادرن

بالات جهت تایید هموپلاسمی: به منظور تایید هموپلاسمی آزمون سادرن بالات صورت گرفت. بدین منظور توالی دو کاوشگر از ناحیه K2S و trnR طراحی و از طریق PCR با dNTP های نشان‌دار و از روی سازه pKCZK2S به عنوان الگو تکثیر شد. DNA کل گیاهان تراریخت و شاهد استخراج و به طور جداگانه توسط دو آنزیم برشی *EcoRI* و *HindIII* با قرار گرفتن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت هضم کامل

باززایی، بیانگر تقسیم سلول‌های تراریخت و رفتن گیاهان به سمت هموپلاسمی است (شکل ۷ c). آنالیز PCR تعداد ۸ گیاهان تراریخت قطعه ژنی ۱۲۰۰ جفت باز را نشان داد و هیچ بانندی در گیاه شاهد غیرتراریخت مشاهده نشد (شکل ۸). همچنین ظهور قطعه ژنی ۱۸۰۰ جفت باز در گیاهان تراریخت و عدم حضور آن در گیاه شاهد غیر تراریخت با استفاده از آغازگر طراحی شده از روی ژنوم کلروپلاست، بیانگر درج صحیح ژن K2S در ژنوم کلروپلاست توتون است (شکل ۹). درج ژن و هموپلاسمی در گیاهان T0 با آنالیز سادرن بلات تایید شد. قطعه ژنومی گیاه شاهد (غیر تراریخت)، ترانس‌پلاستومیک با pKCZK2S و ناقل pKCZ پس از هضم برشی با *HindIII* و *EcoRI* در ناحیه درج در شکل ۱۰ a، b و c نشان داده شده است. با هضم برشی توسط آنزیم *HindIII* ، قطعه ژنی ۲/۸ kb در گیاهان ترانس‌پلاستومیک و کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S)، ۱/۷ kb در ناقل pKCZ و قطعه ۱ kb در گیاه شاهد غیر-تراریخت تولید شد (شکل ۱۰ e و g). با هضم برشی توسط آنزیم *EcoRI*، قطعه ژنی ۱/۶ kb در گیاهان ترانس‌پلاستومیک و کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S)، ۲/۹۹ kb در ناقل pKCZ و ۱/۴ kb در گیاه شاهد غیرتراریخت ایجاد شد (شکل ۱۰ f و d). در گیاه ترانس‌پلاستومیک، با استفاده از کاوشگر *trnR*، حضور باند ۲/۸ kb در هضم برشی با آنزیم *HindIII* و باند ۱/۶ kb در هضم برشی با

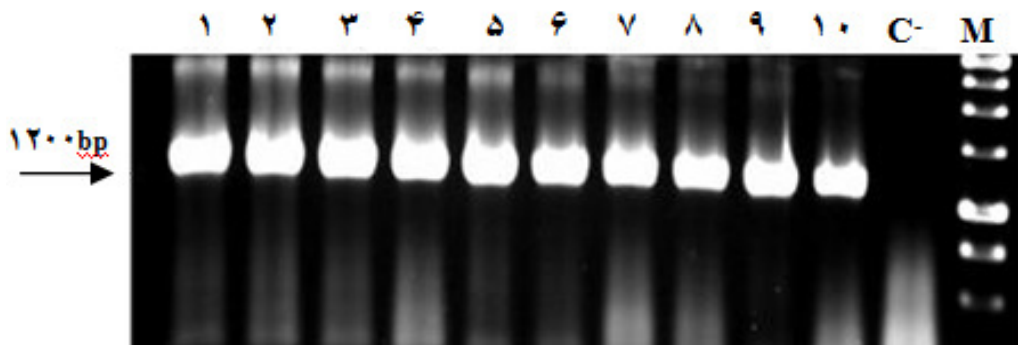
در ۹۴ °C به عنوان پیش دما و ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C به عنوان بسط نهایی صورت گرفت. محصول RT-PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید.
 PF4: 5'- GGA AAC AGT GAC TGC TAC TTT GGG AA -3'
 PR4: 5'- TTG ATG CGA AAC TGA GGC TG -3'

نتایج

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ژن K2S طی واکنش PCR محصولی با اندازه ۱۲۰۰ جفت باز تولید گردید (شکل ۲). با برش آنزیمی ناقل pTZ57RK2S با آنزیم *NcoI*، قطعه ژنی مربوط به K2S (۱۲۰۰ جفت باز) آزاد گردید (شکل ۳). ناقل pKCZK2S تخلیص شده تحت برش با آنزیم *NcoI* قطعه ژنی مربوط به ژن K2S (۱۲۰۰ جفت باز) را مشخص کرد (شکل ۴). همچنین نتایج کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن K2S و پرایمر طراحی شده از ناحیه *Prrn* ناقل قطعه ژنی ۱۲۸۰ جفت باز مورد انتظار را در بسیاری از کلون‌ها تکثیر کرد (شکل ۵). مقایسه نتایج توالی‌یابی ۳ کلون انتخابی با اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی شباهت ۱۰۰ درصد با توالی ژن tPA را نشان داد (شکل ۶). چهار هفته پس از اولین بمباران ژنی تعداد بسیار محدودی گیاهچه تراریخت ظاهر شدند (شکل ۷ a) که در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک قادر به تولید ریشه و برگ بودند (شکل ۷ b). همچنین ظهور چندین گیاهچه در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک پس از سه دور

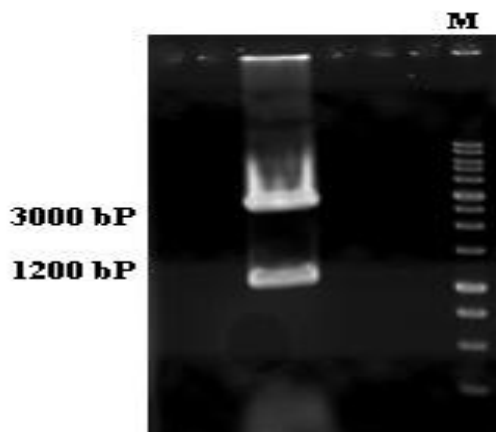
گیاه ترانس‌پلاستومیک تایید شد (شکل ۱۰ e و d).
 نتایج RT-PCR تکثیر قطعه ژنی ۳۰۰ bp را در
 گیاهان ترانس‌پلاستومیک نشان داد و این قطعه در
 گیاه شاهد غیرتراریخت و کنترل منفی مشاهده نشد
 (شکل ۱۱).

آنزیم *EcoRI* همانند کنترل مثبت تایید شد (شکل
 ۱۰ f و g). با استفاده از کاوشگر K2S، با ظهور
 قطعه ژنی ۱/۶ kb در هضم برشی با آنزیم *EcoRI*
 و ۲/۸ kb در هضم برشی با آنزیم *HindIII* همانند
 کنترل مثبت درج ژن K2S در ناحیه *trnN* و *trnR*



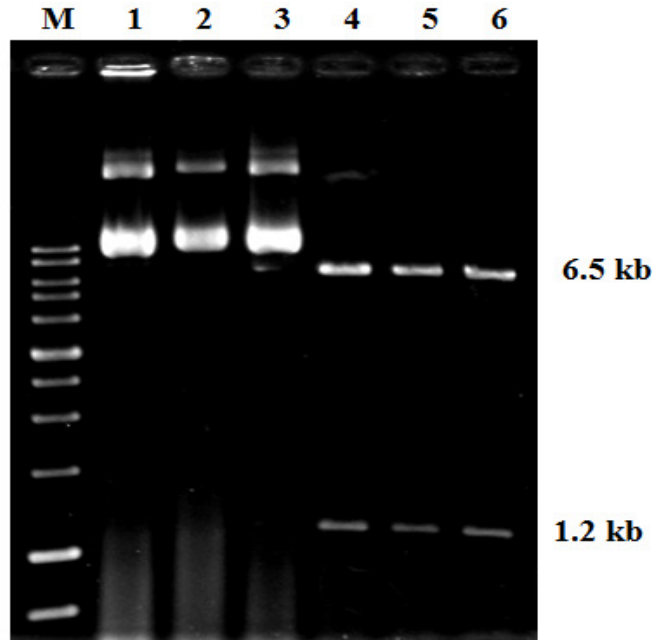
شکل ۲- محصول PCR ژن K2S بر روی ژل آگاروز ۱٪، M: نشانگر اندازه 1Kb (فرمتاز)، C⁻: کنترل منفی (آب به عنوان الگو).

Figure 2- PCR products of the K2S gene on the 1% Agarose gel. M: (Fermentase 1kb standard GeneRuler), C⁻: Negative control (Water as a template).



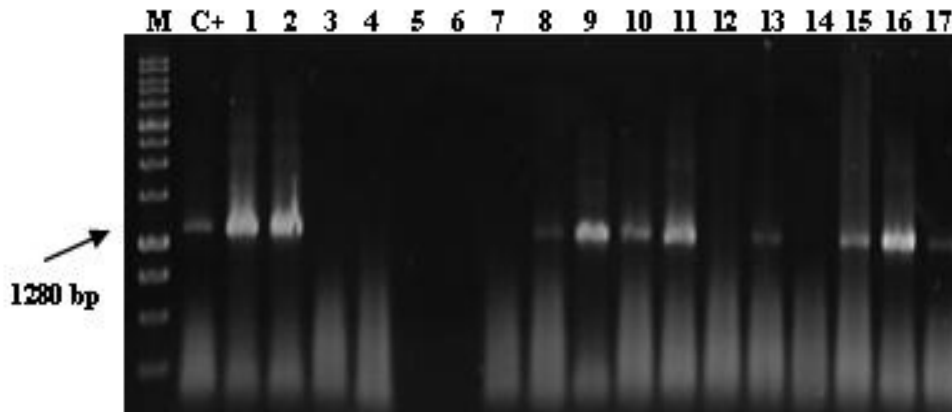
شکل ۳- هضم آنزیمی ناقل TAK2S با آنزیم *NcoI*، M: نشانگر اندازه 1Kb (فرمتاز).

Figure 3- Digestion of TAK2S vector with *NcoI* enzyme, M: 1kb standard GeneRuler (Fermentase).



شکل ۴- برش ناقل pKCZK2S با آنزیم *NcoI* =M نشانگر اندازه 1Kb (فرمتناز)، ۱-۳- ناقل pKCZK2S، ۴-۶- ناقل pKCZK2S برش یافته.

Figure 4- Digestion of pKCZK2S vector with *NcoI* enzyme, M: Fermentase 1 kb standard GeneRuler, Lane1-3: pKCZK2S Vector, Lane 4-6: digested pKCZK2S Vector.



شکل ۵- محصول کلونی PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با پرایمر طراحی شده از ناحیه *prn*، =M نشانگر اندازه، C⁺ کنترل مثبت (وکتور pKCZK2S)، ۱-۱۰: کلون های رشدیافته بر روی محیط.

Figure 5- products of colony PCR with designed primer from *prn* region on the 1% Agarose gel. M: 1 kb standard GeneRuler, C⁺: positive control (pKCZK2S Vector), Lanes 1-10: The clones those were grown on the medium.

sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Synthetic construct DNA clone pF1KB5684_Homo sapiens PLAT gene for plasminogen activator tissue without stop codon in Flexi system	1509	1509	87%	0.0	100%	AB527265.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens mRNA for tissue plasminogen activator precursor (PLAT gene)	1509	1509	87%	0.0	100%	FM956488.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens cDNA FLJ58123 complete cds highly similar to Tissue-type plasminogen activator precursor (EC:3.4.21.68)	1509	1509	87%	0.0	100%	AK299205.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Homo sapiens clone HAIB.100066452.DKFZ0008B1017.plasminogen activator tissue protein (PLAT) gene encodes com	1509	1509	87%	0.0	100%	EU831423.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Homo sapiens clone HAIB.100066454.DKFZ0004B1018.plasminogen activator tissue protein (PLAT) gene encodes com	1509	1509	87%	0.0	100%	EU831516.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens cDNA FLJ93864_Homo sapiens plasminogen activator tissue (PLAT) transcript variant 3 mRNA	1509	1509	87%	0.0	100%	AK313342.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens cDNA FLJ78225 complete cds highly similar to Homo sapiens plasminogen activator tissue (PLAT) transcript variant 1 mRNA	1509	1509	87%	0.0	100%	AK289387.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue (PLAT) transcript variant 1 mRNA	1509	1509	87%	0.0	100%	NM_000930.3
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue (PLAT) transcript variant 3 mRNA	1509	1509	87%	0.0	100%	NM_033011.2
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100010947.FLH194783.01L.RZPD0839F0170D.plasminogen activator tissue (PLAT) gene	1509	1509	87%	0.0	100%	DQ896487.2
<input type="checkbox"/> Synthetic construct clone IMAGE:100006129.FLH194787.01X.RZPD0839F0180D.plasminogen activator tissue (PLAT) gene encodes comp	1509	1509	87%	0.0	100%	DQ893499.2
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue mRNA (cDNA clone MGC:15287 IMAGE:3161005) complete cds	1509	1509	87%	0.0	100%	BC007231.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue mRNA (cDNA clone MGC:3677 IMAGE:3618149) complete cds	1509	1509	87%	0.0	100%	BC002795.2
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue mRNA (cDNA clone MGC:1681 IMAGE:3163742) complete cds	1509	1509	87%	0.0	100%	BC013968.2
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Homo sapiens plasminogen activator tissue mRNA partial cds	1509	1509	87%	0.0	100%	BT007513.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens plasminogen activator tissue mRNA complete cds	1509	1509	87%	0.0	100%	BT007060.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Homo sapiens clone E14045730.01Y.plasminogen activator tissue (PLAT) mRNA complete cds	1509	1509	87%	0.0	100%	U7800747.1

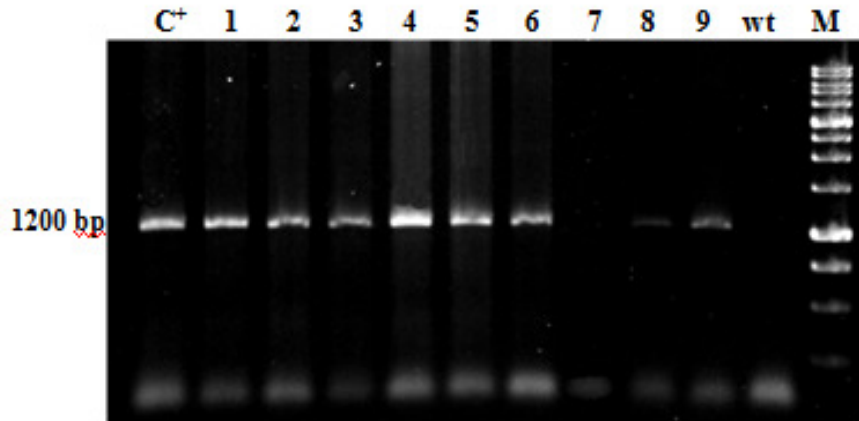
شکل ۶- مقایسه توالی یابی ژن *K2S* کلون شده در ناقل *pKCZ* با اطلاعات موجود در بانک های ژنی.

Figure 6- The results of sequencing of the cloned *K2S* gene as compared with data of GeneBank.



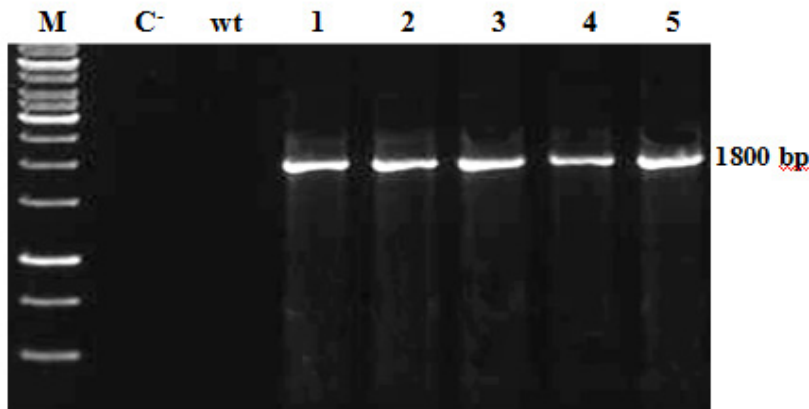
شکل ۷- a: ظهور اولین گیاهچه های باززایی شده تراریخت ۴ هفته پس از بمباران بر روی محیط RMOP حاوی 500 mgL^{-1} آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین، b: گیاهان تراریخت در محیط کشت MS حاوی 500 mgL^{-1} آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین چهار ماه پس از تراریختی c: ظهور گیاهچه های مقاوم حاصل دور سوم باززایی بر روی محیط RMOP حاوی 500 mgL^{-1} آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین.

Figure 7- a: The first regenerated tobacco plants, 4 weeks after bombardment in the RMOP medium containing 500 mg/l spectinomycin antibiotic. B: Transgenic plants in MS medium containing 500 mg/l spectinomycin 4 months after bombardment. c: The third regenerated tobacco shoots in RMOP medium containing 500 mg/l spectinomycin.



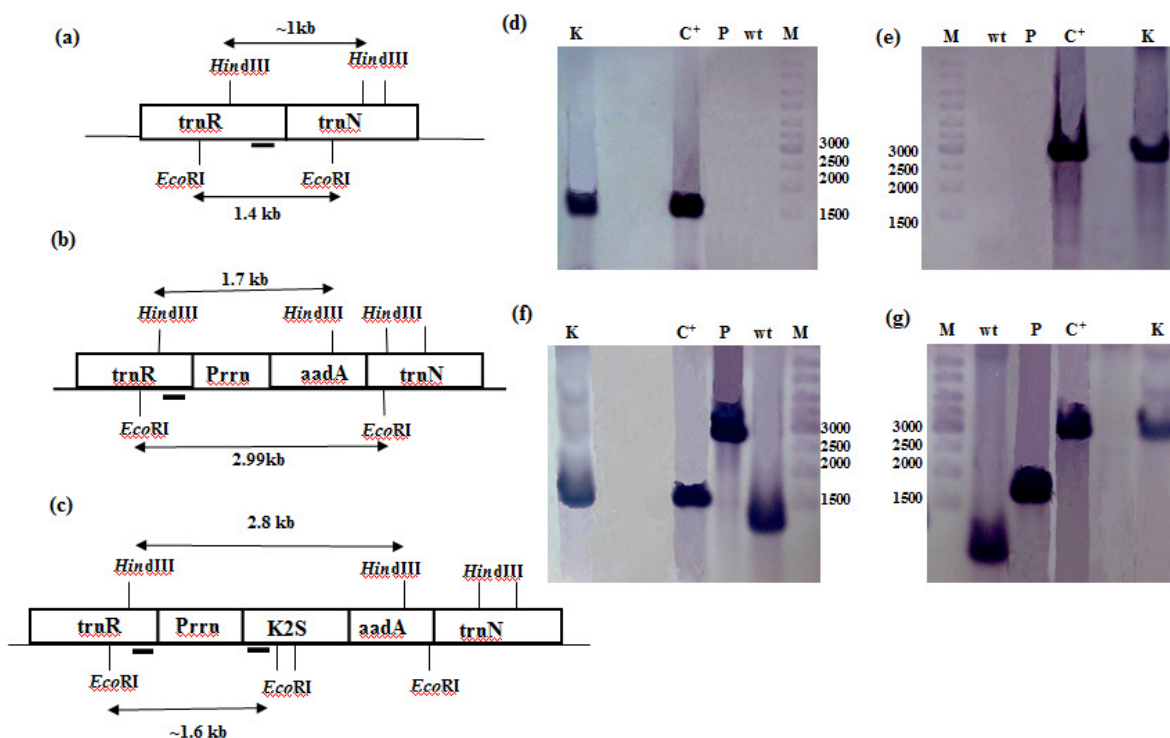
شکل ۸- محصول PCR گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک بر روی ژل آگاروز ۱٪، M: نشانگر اندازه 1kb، C⁺: کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S)، ۱-۶ و ۸-۹ گیاهان تراریخت، wt: گیاه غیرتراریخت.

Figure 8- PCR products of antibiotic resistant plants on the 1% Agarose gel. M: 1kb standard GeneRuler, C⁺: Positive control (pKCZK2S vector), Lane 1-6 and 8-9: Transgenic plants, wt: non-transgenic plant.



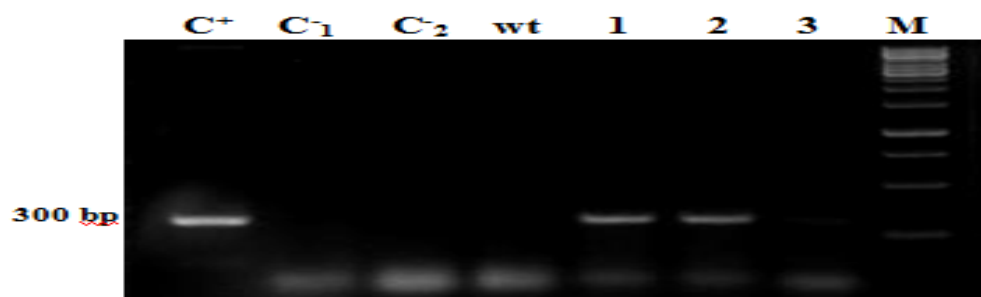
شکل ۹- محصول PCR حاصل از تکثیر با آغازگر طراحی شده از ژنوم کلروپلاست بر روی ژل آگاروز ۱٪، M: نشانگر اندازه 1kb (فرمنتاز)، C⁻: کنترل منفی (آب به عنوان الگو)، wt: گیاه غیرتراریخت، ۱-۵: گیاهان تراریخت.

Figure 9- PCR amplifications with native chloroplast genome primer on the 1% Agarose gel, M: 1 kb standard GeneRuler (Fermentas), C⁻ negative control (water as template), wt: non-transformed plant, Lanes 1-5: transplastomic plants.



شکل ۱۰- نتایج آزمون سادرن بلات در گیاهان ترانس پلاستومیک، a: جایگاه‌های برش آنزیمی کلروپلاست گیاه شاهد (غیرتراریخته)، b: جایگاه‌های برش آنزیمی ناقل pKCZ، c: جایگاه‌های برش آنزیمی کلروپلاست گیاه تراریخته و ناقل pKCZK2S در محل درج. f و g: برش با آنزیم *EcoRI* و *HindIII* در گیاه تراریخت در هیبرید با کاوشگر *trnR*، قطعه ژنی ۱/۶ kb در هضم برشی با آنزیم *EcoRI* (f) و ۲/۸ kb در هضم برشی با آنزیم *HindIII* (g) همانند کنترل مثبت بیانگر هموپلاسمی و در هیبرید با کاوشگر K2S، قطعه ژنی ۱/۶ kb در هضم برشی با آنزیم *EcoRI* (d) و ۲/۸ kb در هضم برشی با آنزیم *HindIII* (e) همانند کنترل مثبت بیانگر درج زن در جایگاه صحیح است. M: نشانگر اندازه (SM0333، فرمنتاز)، K: گیاه ترانس پلاستومیک، wt: گیاه شاهد غیر تراریخت، P: ناقل pKCZ، C⁺: کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S).

Figure 10- Southern-blot analysis of transplastomic T0 lines. Maps of non-transformed plant (a), pKCZ Vector (b) and transplastomic plant (c) genomes showing the positions of *HindIII* and *EcoRI* sites; broken lines indicate the expected size fragments. Southern-blot analysis confirmed transgene integration in the plastid genome. DNA was digested by either *EcoRI* (d, f) or *HindIII* (e, g) and blots were hybridized to a probe targeting a fragment of the K2S (d, e) or *trnR* gene (f, g). When DNA was digested with *EcoRI* (d), the K2S probe hybridized to a 1.6 kb fragment in the transplastomic plant and positive control. When DNA was digested with *HindIII* (e), the K2S probe hybridized to a 2.8 kb fragment in the transplastomic plant and positive control. When DNA was digested with *EcoRI* (f), the *trnR* probe hybridized to a 1.6 kb fragment in the transplastomic plant and positive control. When DNA was digested with *HindIII* (g), the *trnR* probe hybridized to a 2.8 kb fragment in the transplastomic plant and positive control. M: Mixed molecular weight marker (SM0333, fermentas), K: Transplastomic plant, Wt: non-transformed plant P: pKCZ vector, C⁺: Positive control (pKCZK2S vector).



شکل ۱۱- محصول RT-PCR گیاهان ترانس پلاستومیک بر روی ژل آگاروز ۱٪، M: نشانگر اندازه 1Kb (فرمنتاز)، C⁺: کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S)، C₁: کنترل منفی (RNA به عنوان الگو)، C₂: کنترل منفی (آب به عنوان الگو)، wt: کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت)، ۱-۳: گیاهان تراریخت.

Figure 11- RT-PCR amplification of transplastomic plants on the 1% Agarose gel. M: 1 kb molecular weight marker (Fermentas), C⁺: positive control (pKCZK2S vector), C₁: negative control (RNA as template), C₂: negative control (water as template), wt: negative control (non-transformed plant), Lane 1-3: transplastomic plants.

tPA جهت تولید (2011; Hahn et al., 2009;

استفاده شده‌اند. هیچ یک از سیستم‌های بیانی ذکر شده قادر به بیان پروتئین نوترکیب در مقیاس وسیع نیستند. به دلیل پلی‌پلوئید بودن ژنوم کلروپلاست، با انتقال ژن خارجی به کلروپلاست، تجمع بسیار بالایی از پروتئین‌های نوترکیب را در این اندامک‌ها خواهیم داشت. به گونه‌ای میزان بیان پروانسولین انسانی در کلروپلاست توتون تا ۴۷٪ کل پروتئین محلول و در کاهو ۵۳٪ کل پروتئین محلول گزارش شده است (Boyhan and Danielle, 2011). اما تاکنون هیچ گونه گزارشی در خصوص تولید پروتئین tPA در کلروپلاست گیاه ارائه نشده است. در این تحقیق از فرم کوتاه شده tPA (Retplase)

بحث

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) به خاطر تمایل بالای آن به فیبرین، به عنوان یک عامل ترومبولیتیک ارزشمند شناخته شده است. با تزریق پروتئین tPA به عنوان داروی ضد لخته خون یک ساعت پس از حمله قلبی، می‌توان خطر مرگ را به طور معنی‌داری کاهش داد (Frank, 1995). میزبان‌های مختلفی از جمله لاین‌های سلولی پستانداران (Corwright 1992)، باکتری (Saito et al., 1994)، مخمر (Ji et al., 1998; Qiu et al., 1998; Mariyln et al., 1985)، قارچ (Lemontt et al., 1985)، لیشمانیا (Soleimani et al., 2006) و گیاهان (Masumi asl et al., 2010; Kang et al.,)

راحتی تخلیص شود. همچنین به منظور جداسازی پپتیدهای هیستیدینی از پروتئین پس از تخلیص، توالی پروتئازی فاکتور Xa بین توالی شش‌تایی هیستیدین و توالی ژن K2S قرار گرفت. یکی از نواحی مناسب ورود ژن خارجی در ژنوم پلاستییدی توتون حدفاصل بین دو ژن tRNA آرژنین (R-) (ACG) و آسپاراژین (N-GUU) در جایگاه برشی Mun1 واقع در نواحی تکراری (IR) است که مورد هدف ناقل pKCZ است. نواحی INSL و INSR ناقل به طور اختصاصی از روی این نواحی تکثیر شده و سبب انجام نوترکیبی همولوگ و واردسازی ژن هدف به محل مورد نظر می‌شود، بنابراین تعداد نسخه‌های ژن وارد شده که قادر به قرارگیری در هر نسخه ژنوم کلروپلاست هستند به دو برابر افزایش می‌یابند. در صورتی که درج ژن در جایگاه خاص صورت گیرد، قطعه ژنی ۱/۸ Kb مربوط به درج ژن K2S تکثیر خواهد شد، آنالیز PCR وجود ژن مزبور را در گیاهان تراریخت تأیید می‌کند (شکل ۹). پس از انجام تراریختی، به دلیل ماهیت پلی‌پلویدی ژنوم پلاستییدی و حذف حالت هتروپلاسمی، نیاز به انتخاب قوی، تدریجی و طولانی مدت سلول‌های در حال تکثیر است، بدین منظور دوره‌های متعدد انتخاب و باززایی در حضور غلظت‌های بسیار بالای آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین صورت گرفت. در آنالیز سادرن بلات الگوی باندهای مشاهده شده در گیاه ترانس‌پلاستومیک شبیه کنترل مثبت (ناقل pKCZK2S) بوده و قطعه ژنی مربوط به گیاه

به دلیل نیمه عمر پلاسمایی بیشتر نسبت به tPA طبیعی و فقدان جایگاه گلیکولیزه، برای بیان در کلروپلاست گیاه توتون استفاده شد. ژن مورد نظر همراه با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک (aadA) تحت کنترل پیشبر بسیار قوی 16srRNA، به منظور بیان دی‌سیسترونیک در ناقل کلروپلاستی pKCZ خاص گیاه توتون قرار گرفته و همسانه‌سازی شد. این پیشبر منجر به تجمع بسیار بالایی از رونوشت‌ها در کلروپلاست خواهد شد (Zou, 2001). به دلیل رایج بودن جهش‌های خودبخودی در 16SrRNA پلاستییدی که منجر به ایجاد مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک اسپکتینومایسین می‌شود، ممکن است گیاهان به ظاهر تراریخت مقاوم وجود داشته باشند (Zou, 2001)، این گیاهان همانند گیاه شاهد تراریخت نشده هیچ تکثیری را با آغازگرهای اختصاصی K2S نشان ندادند (شکل ۸ چاهک ۷). ناقل pKCZ تحت کنترل توالی‌های تنظیم‌کننده 5'-UTR است، گزارش شده است که در حضور این ناحیه، بیان ژن ۳۰۰-۵۰۰ برابر افزایش خواهد یافت (Fernandez-San et al., 2003). در روش‌های مرسوم تولید پروتئین‌های نوترکیب جهت سهولت در مرحله تخلیص، قبل از انتقال ژن یک توالی کوتاه به آن افزوده می‌شود تا پس از ترجمه به پروتئین، تمایل به لیگاند اختصاصی داشته باشد. قبل از ژن K2S، توالی کوتاه شش هیستیدین قرار گرفت تا پس از ترجمه به پروتئین به دلیل تمایل به لیگاند اختصاصی نیکل از ستون کروماتوگرافی به

غیرتراریخت و کنترل منفی صورت نگرفت. از این آنالیز می توان نتیجه گرفت که گیاهان تراریخت هم ژن K2S را دریافت کرده اند و هم این ژن با موفقیت در این گیاهان در حال بیان و رونویسی است.

شاهد غیرتراریخت در آنها مشاهده نشد (شکل ۱۰). این آنالیز موید هموپلاست بودن گیاهان تراریخت پس از چهار دور باززایی است. گیاهانی که در مراحل انتخاب به کمک آنتی بیوتیک و PCR به عنوان تراریخت شناسایی شدند، در RT-PCR نیز تکثیر شدند و تکثیر این قطعه در گیاه شاهد

منابع

- Gareyazi B (2006). Molecular farming. The 9th Crop Production and Breeding congress of Iran. Aboureyhan Paradise of Tehran University (In Persian).
- Boyhan D, Daniell H (2011). Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnology Journal* 9: 585–598.
- Brown TA (1999). Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. *Encyclopedia of life science*; Pp: 1-6.
- Collen D, Lijnen HR (2004). Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of Thromb Haemost* 2: 541-546.
- Cortwright T (1992). Production of tPA from animal cell culture. In: Spier RE, Griffiths JB, editors. *Animal cell biotechnology*. London, UK: Academic Press; Pp: 218–245.
- Datar RV, Cartwright T, Rosen CG (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology* 11: 349-357.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology* 9: 835–8.
- Esmaeili A, Jalali Javaran M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Forozandeh Moghadam M (2006). Transformation of Single Domain Recombinant Antibody Gene Against MUC1 from *Camelus bactrianus* to Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. 'Xanthi') and Analysis of Transgenic Plants. A Thesis Presented for the Degree of Ph.D in Plant breeding. Faculty of Agriculture. Tarbiat Modarres University (In Persian).
- Fernandez-San A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003). A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol Journal* 1: 71-79.
- Frank A (1995). tPA, Product Monograph Copyright© 1995 Chromogenix AB. Version 1.1. Sweden.
- Hahn BS, Sim JS, Kim HM, Ahn MY, Pak HK, Kim NA, Kim YH (2009). Expression and Characterization of Human Tissue-Plasminogen Activator in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Molcular Biology Reports* 27: 209–216.
- Huang WM, Lai LX, Qiao GL, Yue JM, An J, Wang K, Fu DG, Yin Z, Li J (1999). The development of mouse bioreactor expressing human tissue plasminogen activator (tPA) in

- mammary gland by transfecting spermatozoa in testicular duct. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 32: 227-232.
- Ji Q, James R, Artz S, Georgiou G (1998). Expression of Active Human Tissue Type Plasminogen Activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 12: 4891-4896.
- Kang S, Ajjappala H, Seo HH, Sim JS, Yoon SH, Koo BS, Kim YH., Lee S, Hahn BS (2011). Expression of the human tissue-plasminogen activator in hairy roots of oriental melon (*Cucumis melo*). *Plant Molecular Biology Reports* 10: 1105-1011.
- Kohnert U (1992). Biochemical Properties of the Kringle2 and Protease domains are maintained in the refolded tPA deletion variant BM06.022. *Protein engineering* 5: 93-100.
- Lemontt JF, Wei CM, Dackowski WR (1985). Expression of active human uterine tissue plasminogen activator in yeast. *DNA* 4: 419-428.
- Manosroi J, Taya Piwatana C, Gotz F, Werner RG, Manosroi A (2001). Secretion of Active Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Derivatives in *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 67: 2657-2664.
- Marilyn GW (2001). Production of Tissue Plasminogen Activator (tPA) in *Aspergillus niger*. John Wiley & Sons. Inc. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 164-174.
- Masoumi Asl A, Jalali javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H (2010). Cloning and expression of tissue plasminogen activator (t-pa) gene in tobacco plants. *Scientific Research and Essays* 5: 917-922.
- Murray MG, Thampson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acid Research* 8: 4321-25.
- Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The Plant Journal* 57: 436-445.
- Oka MS, Fong K LL, Cart SA, Shebuski R (1990). Characterization and biological properties of recombinant tPA produced in *Drosophila* cells culture. In *Trends in Animal Cell Culture Technology for Bioprocesses*. Pp: 465-471.
- Pennica D, Holmes W, Kohr WJ, Harkins R, Vehar G, Ward C (1983). Cloning and Expression of a human tissue-type plasminogen activator variant cDNA in *E. coli*. *Nature* 301(29): 14-21.
- Qiu J, Swartz JR (1998). Expression of active human tPA in *E.coli*. *Applied & Environmental microbiology* 64: 4891-4896.
- Ranby M, Bergsdorf N, Nilsson T (1982). Enzymatic properties of one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thrombosis Research*; 27: 175-183.
- Ruhlman, T, Verma D, Samson N, Daniell H (2010). The Role of Heterologous Chloroplast Sequence Elements in Transgene Integration and Expression. *Plant Physiology* 152: 2088-2104.
- Saito Y, Ishii Y, Sasaki H, Hayashi M, Fujimura T, Imai T, Nakamura S, Suzuki S, Notani J, Asada T (1994). Production and characterization of novel tissue-type plasminogen activator derivatives in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progress* 10(5): 472-479.
- Sambrook J, Russel DW (2000 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NewYork, US.
- Soleimani M, Davodi N, Fallahati F, Mahboudi F (2006). Cloning of Tissue Plasminogen Activator cDNA in Nonpathogenic *Leishmania*. *Medical Yakhte* 8: 196-20318.
- Verma D, Daniell H (2007). Chloroplast vector systems for biotechnolog applications. *Plant Physiology* 145: 1129-1143.

Zhang Y, Jiang P, Tao GJ, Liao JM, Sun Sh, Shen ZL, Qin S (2009). Recombinant expression of *rt-PA* gene (encoding Reteplase) in gametophytes of the seaweed *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *Science in China Series C: Life Sciences* 51: 1116-112.

Zou Z (2001). Analysis of cis-acting expression determinants of the tobacco psbA 5' UTR in vivo. Ph.D. thesis submitted to Munchen Univers.

Cloning of the truncated Human *tPA* Gene in Chloroplast vector and regeneration of transplastomic tobacco plants

Abdoli Nasab M.¹, Jalili Javaran M.*², Baghizadeh A.³, Alizadeh H.⁴

¹ PhD Student. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University.

² Associate professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat modares university.

³ Associate professor, Department of Biotechnology, International Center for Sciences, high Technology & environmental science, Kerman.

⁴ Associate professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tehran University.

Abstract

Plants are suitable replacements for current biodrugs and recombinant protein expression systems such as transgenic animals or microbial systems. As the plant plastid genome is highly polyploid, the transformation of chloroplast permits the introduction of thousands of copies of foreign gene per plant cell and generates extraordinarily high levels of recombinant protein. Cardiovascular diseases are the second one leading cause of human mortality after cancer. Human tissue-type plasminogen activator (tPA) is one of the most important pharmaceutical recombinant proteins involved in the breakdown of blood clots in different parts of body such as brain and heart blood vessels. The truncated form of tissue plasminogen activator (K2S) has longer plasma half life, better diffusion into the clot and higher fibrinolytic activity. In this study, in order to introduction of *K2S* gene in tobacco chloroplast, after construct design, the interest gene was ligated to pKCZ vector and cloned in *E. coli*. Following the successfully shooting of the *K2S*-containing vector (pKCZK2S) to leaf explants using the biolistic delivery procedure, the explants were selected on selection medium containing 500 mgL⁻¹ spectinomycine antibiotic. After regeneration of grown shoots on selective medium, in order to achieve homoplasmy, fourth rounds of selection and regeneration in presence of spectinomycine antibiotic were performed. The presence, site-specific integration, expression of the *K2S* gene and homoplasmy in transplastomic plants were confirmed by PCR, RT-PCR and Southern blotting methods.

Keywords: *Chloroplast Transformation, Molecular Farming, Tissue Plasminogen Activator, Transplastomic.*