



بهینه سازی توالی کدکننده فاکتور رشد فیروبلاستی بازی انسانی بمنظور بیان در گیاه برنج و همسانه سازی آن تحت کنترل توالی های تنظیم کننده ژن *ramy3D* در ناقل دوتایی pCAMBIA1304

میشم بسطامی^۱، رامین حسینی^{۲*}

^۱دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.
^۲دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۹

چکیده

فاکتور رشد فیروبلاستی بازی انسانی (bFGF) یک پروتئین بسیار با ارزش با کاربردهای گسترده درمانی و تحقیقاتی است. در حال حاضر تولید این فاکتور رشد بشکل نوترکیب در بسترهای مرسوم میکروبی و سلول های حشرات با مشکلاتی همراه است که منجر به هزینه تولید بالا و در نتیجه محدود ساختن کاربرد آن شده است. کشت سلولی گیاه برنج بستری کارآمد، ایمن و کم هزینه برای تولید پروتئین نوترکیب است. هدف از این تحقیق تهیه یک سازه بیانی مناسب برای بیان بالای نسخه بهینه سازی شده ای از فاکتور رشد انسانی bFGF در کشت سلولی گیاه برنج تحت کنترل عوامل تنظیمی ژن *ramy3D* بوده است. برای این منظور ابتدا توالی کدکننده فاکتور bFGF بر اساس شاخص های کاربرد کدونی و محتوای GC برای بیان در گیاه برنج بهینه سازی و در ادامه سنتز شد. بدنبال فرایند بهینه سازی، شاخص سازگاری کدونی از ۰/۷۶ به ۰/۸۲ و محتوای GC از ۵۲/۶۵ درصد به ۵۵/۴۵ درصد ارتقا یافت. توالی های تنظیم کننده ژن *ramy3D* برنج در قالب دو قطعه مجزا از روی DNA ژنومی تکثیر و همسانه سازی شدند. در ادامه اقدام به سرهم سازی توالی های تنظیم کننده ژن *ramy3D* در ناقل دوتایی گیاهی pCAMBIA1304 و سپس درج توالی کدکننده بهینه سازی شده ی bFGF در حدفاصل توالی پپتید راهنما و 3'UTR شد. از جمله مزیت های سیستم بیانی *Ramy3D* می توان به میزان بیان بالای ژن انتقالی، القاپذیر بودن و همچنین سهولت تخلیص پروتئین بواسطه ترشح به محیط اشاره کرد.

کلمات کلیدی: فاکتور رشد *bFGF*، *Ramy3D*، برنج، پروتئین نوترکیب.

فاکتور های رشد فیروبلاستی (FGFs) خانواده ای متشکل از پروتئین های متصل شونده به هپارین بوده که به لحاظ ساختاری و عملکرد بیولوژیک دارای تشابه هستند (An et al., 2013). فاکتور رشد فیروبلاستی بازی انسانی (bFGF) عضوی مهم از این خانواده ژنی بشمار می رود. این فاکتور رشد دارای اثرات میتوژنیک بسیار قوی بر روی انواعی از سلول های با منشأ میان پوستی (مزودرمی) و اکتودرم عصبی (نورواکتودرمی) شامل سلول های اندوتلیال عروقی است (Gospodarowicz et al., 1986). بر همین اساس این فاکتور رشد نقش مهمی را در تنظیم فرایندهای رگ زایی (آنژیوژنز) و نو رگ زایی (نئو واسکولاریزاسیون) در طول نمو، التیام زخم و تشکیل تومور ایفا می کند (Fernig & Gallagher, 1994). این فاکتور رشد در تکثیر، مهاجرت، تمایز و حیات سلول های مختلفی از جمله فیروبلاست ها، سلول های اندوتلیال، سلول های ماهیچه صاف و سلول های عصبی نقشی کلیدی ایفا می کند (Bikfalvi et al., 1997). فاکتور رشد bFGF دارای کاربردهای درمانی متعددی در پیوند بافت، التیام زخم، درمان بیماری های قلبی و عروقی، بازسازی سلول های عصبی و جلوگیری از آسیب به مغز در اثر بیماری آسم است (Bikfalvi et al., 1997;).

با توجه به کاربردهای درمانی و تحقیقاتی متعدد فاکتور رشد bFGF، نیاز به آن بسیار بالاست. این فاکتور برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ میلادی در مغز گاو گزارش شد (Gospodarowicz et al., 1978) و خالص سازی آن در سال ۱۹۸۴ میلادی انجام پذیرفت (Böhlen et al., 1984). میزان bFGF طبیعی در بافت های جانوری بسیار اندک است، بطوری که تخلیص این پروتئین از این طریق نمی تواند تامین کننده نیازهای روزافزون به آن باشد (Gasparian et al., 2009). از این رو در طول سه دهه گذشته تلاش های فراوانی برای بیان این فاکتور رشد بصورت نوترکیب در موجودات مختلفی همچون باکتری *Escherichia coli*، باکتری *Bacillus subtilis* مخمر *Pichia pastoris*، کرم ابریشم (*Bombyx mori* L.)، بذور گیاهان سویا

باکتریایی و کشت سلولی پستانداران بدل ساخته است (Hellwig *et al.*, 2004). با این حال، مزیت اصلی این سیستم بیانی را می توان القاپذیر بودن آن بدنبال حذف قند از محیط دانست. این ویژگی، امکان جدا سازی فاز رشدی از فاز تولید پروتئین نوترکیب را، مشابه با آنچه در سیستم های باکتریایی مر سوم است، فراهم می سازد (Xu *et al.*, 2011). مزیت دیگر استفاده از این سیستم بیانی، امکان ترشح پروتئین نوترکیب به فضای خارج سلولی (محیط کشت در کشت سلولی) با بکارگیری پپتید راهنمای پروتئین Ramy3D است. این ویژگی فرایند خالص سازی پروتئین نوترکیب را بسیار تسهیل می کند (Huang *et al.*, 2015).

هدف از این تحقیق بهینه سازی توالی کدکننده (CDS) فاکتور رشد انسانی bFGF برای بیان در گیاه برنج و در ادامه همسانه سازی توالی بهینه شده، تحت کنترل توالی های تنظیمی ژن *ramy3D* گیاه برنج، در یک ناقل دوتایی بوده است. از این طریق زمینه لازم برای بیان بالای این فاکتور رشد در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه برنج فراهم می گردد. برای این منظور با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی اقدام به بهینه سازی توالی CDS فاکتور bFGF بر اساس شاخص های کاربرد کدونی و محتوای GC گیاه برنج شد. توالی های تنظیمی *ramy3D* در دو قطعه مجزا از ژنوم گیاه برنج تکثیر و همسانه سازی گردید. در نهایت اقدام به سرهم

(*Glycine max*) و برنج (*Oryza sativa*) و همچنین کلروپلاست گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) صورت پذیرفته است (An *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2006; Ke *et al.*, 1992; Kwong *et al.*, 2013; Mu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2001). در حال حاضر فاکتور bFGF به صورت تجاری و در فرم نوترکیب در بستر های بیانی مختلفی اعم از باکتری های *E. coli* و *B. subtilis* مخمر *P. pastoris* و همچنین کشت سلولی حشرات تولید می شود (Wang *et al.*, 2015). تولید فاکتور bFGF انسانی در بستر های ذکر شده با مشکلات متعددی همچون میزان تولید پائین، تشکیل اینکلوژن بادی ها و فرآوری پیچیده و همچنین پروتئولیز و استیلایسیون همراه است (An *et al.*, 2013; Kwong *et al.*, 2013). در نتیجه قیمت این فاکتور رشد در حال حاضر بسیار بالا بوده بگونه ای که استفاده از این فاکتور را برای اهداف درمانی و همچنین تحقیقاتی با محدودیت مواجه ساخته است.

توالی های تنظیم کننده ژن آلفا آمیلاز 3D (*ramy3D*) گیاه برنج موفقترین سیستم بیانی بکار گرفته شده در زمینه تولید پروتئین های نوترکیب در کشت سلولی گیاهان است (Xu *et al.*, 2011). میزان تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از این سیستم بیانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه برنج بسیار قابل توجه است بگونه ای که این سیستم را به سیستمی قابل رقابت با سیستم های مر سوم

شرکت Generay Biotech (چین) سنتز و در ناقل pGH همسانه سازی شد. ناقل تهیه شده تحت عنوان pGH-bFGF نامگذاری شد.

استخراج DNA ژنومی از گیاه برنج

DNA ژنومی گیاه برنج با استفاده از روش CTAB از برگ استخراج شد (Doyle, 1987). محلول محتوی DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با استفاده از محلول اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و در دستگاه ژل داگ برای تایین کیفیت و کمیت مورد بررسی قرار گرفت.

همسانه سازی توالی های تنظیم کننده ژن *ramy3D*

در این مرحله توالی های تنظیم کننده ژن *ramy3D* گیاه برنج در قالب دو قطعه مجزا از ژنوم این گیاه تکثیر شدند. قطعه اول (تحت عنوان قطعه PRO) شامل پروموتور، 5'UTR و توالی کدکننده پپتید راهنما و قطعه دوم (تحت عنوان قطعه TER) شامل 3'UTR و ترمیناتور ژن *ramy3D* (با شماره دسترسی M24287.1) بود. با استفاده از نرم افزار Primer-Blast وب سایت NCBI، طراحی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر دو قطعه PRO و TER صورت پذیرفت (جدول ۱). مکان های برشی آنزیم های *HinDIII* و *BamHI* به ترتیب به ابتدا و انتهای قطعه PRO و مکان های برشی آنزیم های *SacI* و *EcoRI* به ترتیب به ابتدا و انتهای قطعه TER،

سازی قطعات بدست آمده در غالب یک سازه بیانی در ناقل دوتایی گیاهی pCAMBIA1304 شد.

مواد و روش ها

بهینه سازی و سنتز توالی CDS فاکتور bFGF

با مراجعه به پایگاه داده کاربرد کدونی (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)، جدول کاربرد کدونی ژنوم گیاه برنج دریافت شد. توالی CDS فاکتور رشد انسانی bFGF (با شماره دسترسی AAA52448.1) از پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت شد. نرم افزار Gene Designer 2.0 از وب سایت DNA2.0 (به نشانی <https://www.atum.bio/resources/genedesigner>) دانلود شد. با استفاده از نرم افزار Gene Designer، توالی CDS فاکتور bFGF بر اساس شاخص های سازگاری کدونی (Codon Adaptation Index) و محتوای GC، برای بیان در گیاه برنج بهینه سازی شد. توالی بهینه سازی شده بوسیله الگوریتم OptimumGene شرکت GenScript از نظر حضور موتیف های ناپایدار کننده RNA (ARE) در ساختار ثانویه mRNA و توالی های تکراری مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه مکان های برشی دو آنزیم *BamHI* و *SacI* بترتیب به ابتدا و انتهای توالی بهینه سازی شده، بمنظور استفاده در مراحل سرهم سازی کاست بیانی، درج شدند. توالی بهینه سازی شده توسط

جایگاه همسانه سازی (MCS) حامل pTG19-T موجود است، هضم شدند. محصول واکنش هضم آنزیمی در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و نتیجه آن برر سی شد. در مورد قطعه PRO حامل تهیه شده pTG-PRO و در مورد قطعه TER حامل تهیه شده pTG-TER نامگذاری شد.

تهیه ناقل دوتایی گیاهی حاوی توالی های تنظیم کننده *ramy3D*

در این مرحله اقدام به سرهم سازی توالی های تنظیم کننده *ramy3D* در غالب یک قطعه واحد و درج آن در ناقل دوتایی گیاهی pCAMBIA1304 شد. برای این منظور با استفاده از آنزیم های *EcoRI* و *SacI*، قطعه TER از حامل pTG-TER جداسازی و در حامل pTG-PRO بریده شده با همان دو آنزیم، در پایین دست قطعه PRO درج گردید. قطعه تهیه شده، حاوی تمامی توالی های تنظیم کننده *ramy3D* شامل پروموتور، 5'UTR، توالی کدکننده پپتید راهنما، 3'UTR و ترمیناتور، تحت عنوان قطعه EXPCAS و ناقل محتوی این قطعه تحت عنوان pTG-EXPCAS نامگذاری شد.

از طریق درج آنها در پرایمرهای طراحی شده، اضافه شدند. با استفاده از واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی، قطعه PRO (با طول ۱۰۰۸ bp) و قطعه TER (با طول ۸۵۱ bp) تکثیر شدند. واکنش PCR طی مراحل زیر انجام گرفت: یک چرخه دمایی بمدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، ۳۲ چرخه دمایی هر یک شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۳۵ ثانیه در دمای ۶۲°C برای تکثیر قطعه PRO و ۵۸°C برای قطعه TER، ۱ دقیقه در دمای ۷۲°C برای قطعه PRO و ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲°C برای قطعه TER و یک چرخه دمایی بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C. قطعات تکثیر شده در واکنش PCR، با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase، در حامل همسانه سازی خطی pTG19-T (شرکت Vivantis، مالزی) درج شدند. تهیه سلول های مستعد و تراریخت سازی آنها با استفاده از روش TSS انجام پذیرفت (Chung et al., 1989). غربالگری کلونی های حاوی پلاسمید نو ترکیب با استفاده از تست آبی-سفید انجام شد. تعدادی از کلنی های سفید انتخاب و از روش Alkaline Lysis برای استخراج پلاسمید استفاده شد (Bimboim & Doly, 1979). بمنظور برر سی درج قطعه، پلاسمیدهای استخراج شده، با آنزیم *BamHI*، که سایت برشی آن در دو سمت

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر دو قطعه PRO و pPRO.c.TER: پرایمر رفت برای تکثیر قطعه PRO، pPRO.r: پرایمر برگشت برای تکثیر قطعه PRO، pTER.c: پرایمر رفت برای تکثیر قطعه TER، pTER.r: پرایمر برگشت برای تکثیر قطعه TER. زیر توالی آنزیم‌های برشی خط کشیده شده است.

Table 1- The sequences of specific primers for amplification of PRO and TER fragments. pPRO.c: forward primer for PRO fragment amplification, pPRO.r: reverse primer for PRO fragment amplification, pTER.c: forward primer for TER fragment amplification, pTER.r: reverse primer for TER fragment amplification. The sequences of restriction enzymes are underlined.

Name	نام	Sequence	توالی
<i>Hin</i> DIII + pPRO.c		<u>AAGCTT</u> AGGTGTGCGCAATCAGGAA	
<i>Bam</i> HI + pPRO.r		GGATCCTGCTTGACCCGAGTTACAGG	
<i>Sac</i> I + pTER.c		<u>GAGCTC</u> TAGCGGGCTCAAGCCCTA	
<i>Eco</i> RI + pTER.r		GAATTCGTCCATTACATGTGCCGAGGCT	

pCAM-EXPCAS در حد فاصل توالی کدکننده پپتید راهنما و 3'UTR ژن *ramy3D* درج شد. برای این منظور حامل pGH-bFGF با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I هضم و قطعه خارج شده (قطعه bFGF با طول ۵۵۲ bp) در حامل pCAM-EXPCAS بریده شده با همان دو آنزیم، درج گردید. حامل نو ترکیب حاصل pCAM-EXPCAS-bFGF و قطعه تهیه شده (حاصل از ادغام سه قطعه PRO، bFGF و TER) EXPCAS-bFGF نامگذاری شد. بمنظور بررسی درج قطعه EXPCAS-bFGF در حامل pCAM-EXPCAS-bFGF، حامل تهیه شده با آنزیم‌های *Hin*DIII، *Bam*HI، *Sac*I و *Eco*RI هضم گردید. محصول واکنش هضم آنزیمی در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

در ادامه قطعه EXPCAS با استفاده از دو آنزیم *Hin*DIII و *Eco*RI از ناقل pTG-EXPCAS بریده و در ناقل دوتایی گیاهی pCAMBIA1304 بریده شده با همان دو آنزیم، درج گردید. ناقل دوتایی نو ترکیب حاصل، تحت عنوان pCAM-EXPCAS نامگذاری شد. بمنظور بررسی درج قطعه، حامل pCAM-EXPCAS با آنزیم‌های *Hin*DIII و *Eco*RI و همچنین آنزیم‌های *Hin*DIII و *Eco*RI هضم گردید. محصول واکنش هضم آنزیمی در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

تهیه ناقل بیانی فاکتور bFGF

بمنظور تهیه سازه بیانی فاکتور bFGF تحت کنترل توالی‌های تنظیم کننده *ramy3D*، توالی کدکننده بهینه سازی شده فاکتور bFGF، در ناقل

نتایج و بحث

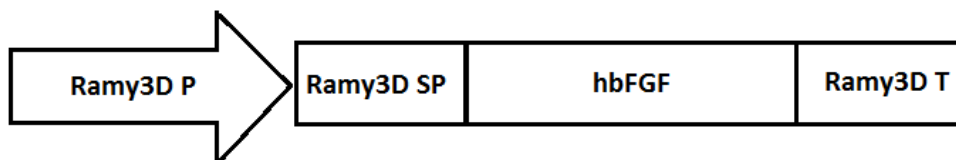
در طول سه دهه گذشته استفاده از کشت سلولی گیاهان تراریخت در جهت تولید پروتئین‌های با ارزش دارویی و صنعتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این زمینه کشت سلولی گیاهی مزیت‌های متعددی را نسبت به سیستم‌های مرسوم میکروبی و کشت سلولی پستانداران دارا می‌باشد. از یک سو گیاهان بدلیل عاری بودن از ویروس‌ها و پاتوژن‌های انسانی و همچنین اندوتوکسین باکتریایی بستری ایمن را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب فراهم می‌سازند. از سوی دیگر، در حالی که محیط کشت سلول گیاهان همانند باکتری‌ها ساده و کم هزینه است، اما بعنوان یوکاریوت‌های عالی گیاهان قادر به سنتز پروتئین‌های چند جزئی و پیچیده و همچنین اعمال تغییرات پس از ترجمه همانند گلیکوزیلاسیون هستند. این در حالی است که باکتری‌ها این توانایی‌ها را ندارند. همچنین بایستی به هزینه پایین تخلیص پروتئین نوترکیب در این سیستم اشاره کرد (Hellwig et al., 2004; Saber et al., 2015). کشت سلولی برنج و توالی‌های تنظیم کننده ژن *ramy3D* بستری بسیار مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب است. پروموتر ژن *ramy3D* جزء پروموت‌های القا شونده طبقه بندی شده که در شرایط فقدان ساکارز به شدت بیان می‌شود. زمانی که بافت کالوس گرفته شده از اسکوتلوم بذر برنج، در کشت سوپانسیون سلولی

قرار می‌گیرد، ایزوزایم آلفا آمیلاز *Ramy3D* یکی از فراوانترین پروتئین‌های ترشح شده به محیط کشت بدنبال حذف ساکارز از محیط است (Huang et al., 1993). تا به امروز این پروموتر موفق‌ترین پروموتر القا شونده استفاده شده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم کشت سوپانسیون سلولی گیاهی بوده است. استفاده از این پروموتر منجر به سطح بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب مانند *rAAT*، *hGM-CSF*، *hG-CMS*، هورمون رشد انسانی، *bryodin-1*، لیزوزیم، و آلبومین سرم انسانی در کشت سوپانسیون سلولی برنج شده است (Xu et al., 2011). در یک مطالعه سطح بیان پروتئین *hGM-CSF* در کشت سوپانسیون سلولی برنج تراریخت، تحت کنترل پروموتر *ramy3D* ۱۰۰۰ برابر بالاتر از سطح بیان این پروتئین در کشت سوپانسیون سلولی توتون تراریخت تحت کنترل راه‌انداز *35S* ویروس موزائیک تنباکو (*CaMV*) بود (Shin et al., 2003). سطح بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب تحت کنترل پروموتر *ramy3D* در کشت سوپانسیون سلولی برنج، در نتیجه قدرت بیان بالای این راه‌انداز تحت شرایط فقدان ساکارز و همچنین کاهش فعالیت پروتئازهای خارج سلولی است.

هدف از این تحقیق تهیه سازه بیانی مناسب برای بیان فاکتور *bFGF* نوترکیب در کشت سوپانسیون سلولی گیاه برنج بوده است. در این

سازگی شد. در شکل ۱ تصویر نمادین سازه بیانی فاکتور bFGF ارائه شده است.

تحقیق توالی CDS فاکتور bFGF بر اساس کاربرد کدونی گیاه برنج بهینه سازی و توالی بهینه شده تحت کنترل توالی های تنظیمی *ramy3D* همسانه



شکل ۱- تصویر نمادین سازه بیانی تهیه شده در ناقل دوتایی pCambia1304. Ramy3D P: پروموتور و 5'UTR ژن *ramy3D* Ramy3D SP: توالی کدکننده پپتید راهنمای *Ramy3D*, hbFGF: توالی کدکننده بهینه سازی شده فاکتور رشد انسانی bFGF, Ramy3D T: 3'UTR و ترمیناتور *ramy3D*

Figure 1- Schematic picture of the prepared expression cassette in the binary vector, pCambia1304. Ramy3D P: *ramy3D*'s promoter and 5' UTR, Ramy3D SP: *Ramy3D*'s signal peptide coding sequence, hbFGF: human basic Fibroblastic Growth Factor coding sequence, Ramy3D T: *ramy3D*'s 3' UTR and terminator.

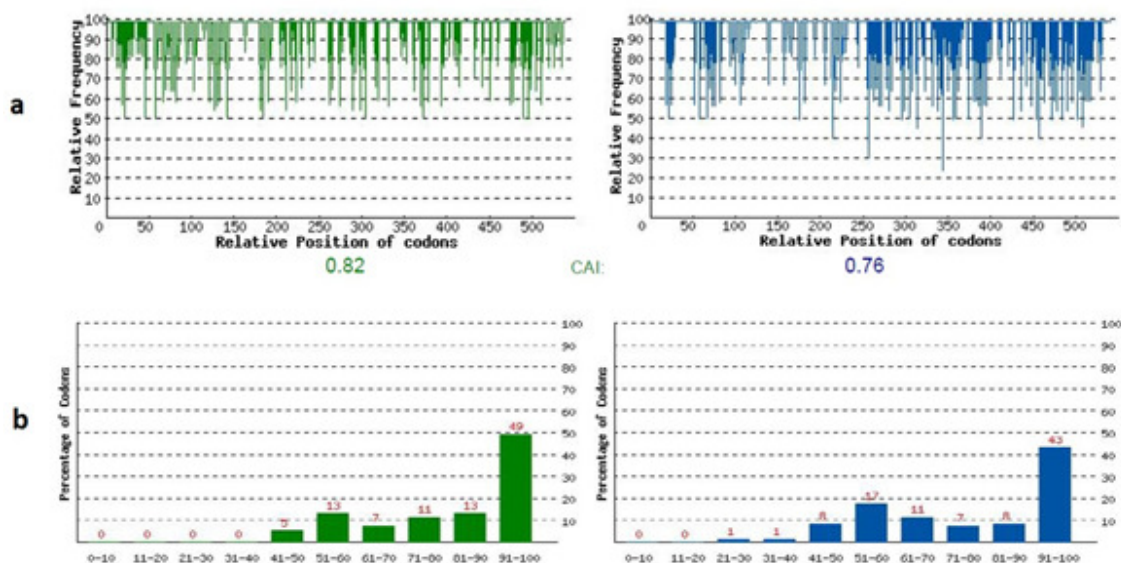
(Codon Adaptation Index) از ۰/۷۶ به ۰/۸۲ افزایش یافت (شکل ۲-a). شاخص سازگاری کدونی (CAI) شاخصی بسیار مفید برای پیش بینی میزان بیان ژن در یک موجود خاص بوده و مرسوم ترین پارامتر برای نشان دادن میزان انطباق کاربرد کدونی یک ژن در یک موجود زنده است (Sharp & Li, 1987; Ullrich et al., 2015). این شاخص عبارت است از میانگین هندسی سازگاری نسبی تمامی کدون های یک ژن، که عددی بین صفر و یک است. سازگاری نسبی هر کدون با تقسیم کاربرد آن کدون بر کاربرد فراوانترین کدون برای همان آمینه محاسبه می شود (Sharp & Li, 1987). یک روش دیگر برای افزایش بیان ترانسژن،

یکی از مهمترین مراحل در انتقال یک ترانسژن بمنظور تولید پروتئین نو ترکیب تغییر کاربرد کدونی در جهت انطباق با ژنوم میزبان است (Ullrich et al., 2015). به فرایند جایگزینی کدون های کمیاب با کدون های مناسب، بهینه سازی کدونی اطلاق می شود (Gould et al., 2014). در مطالعات پیشین نشان داده شده است که بهینه سازی کاربرد کدونی ترانسژن ها مطابق با سلول میزبان، بیان ژن نو ترکیب را افزایش می دهد (Mozhgan et al., 2018; Ullrich et al., 2015). در این تحقیق بدنبال جایگزینی کدون های دارای کاربرد پایین با کدون های دارای کاربرد بالا بر اساس جدول کاربرد کدونی گیاه برنج، شاخص سازگاری کدونی

با طول ۸۵۱ bp تکثیر شد که با طول باند مورد نظر برای قطعه TER مطابقت داشت (شکل ۳-ع). شکل ۳-d و ۳-ع، بترتیب نتیجه الکتورفورز محصول هضم آنزیمی حامل‌های pTG-PRO و pTG-TER با آنزیم BamHI در ژل آگارز را نشان می‌دهد. همانگونه که در تصاویر مشخص است، بدنبال هضم آنزیمی حامل pTG-PRO، قطعه‌ی PRO با طول ۱۰۰۸ برش و از حامل خارج شد که نشان دهنده درج صحیح قطعه مورد نظر در حامل می‌باشد. همچنین بدنبال هضم آنزیمی حامل pTG-TER (شکل ۳-ع)، قطعه‌ای با طول ۸۵۱ برش و از حامل خارج شده است که نشانگر قطعه TER است. نقشه حامل همسانه سازی pTG19-T (با طول ۲۸۸۰ bp) در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به جهت درج قطعه PRO در ناقل pTG-PRO، که بدنبال توالی یابی این ناقل مشخص گردید (شکل ۵-ا)، مکان‌های برشی EcoRI و SacI که بخشی از جایگاه همسانه سازی چندگانه (MCS) ناقل pTG19-T هستند، در ناحیه پایین دست قطعه PRO قرار داشت. بر همین اساس قطعه TER مابین دو جایگاه یاد شده در ناقل pTG-PRO درج گردید.

تغییر محتوای GC در جهت انطباق با ژن‌های میزبان است. بر اساس مطالعات پیشین انطباق محتوای GC ترانسژن با ژن‌های میزبان یکی از فاکتورهای مهم برای بیان بالای آن است (Jackson *et al.*, 2014). با استناد به پایگاه کاربرد کدونی، میانگین محتوای GC در نواحی کدکننده گیاه برنج ۵۵/۲۶ درصد است. در این تحقیق در فرایند جایگزینی کدون‌ها این شاخص نیز در نظر گرفته شد که در نتیجه آن میانگین محتوای GC توالی کدکننده فاکتور bFGF از ۵۲/۶۵ درصد به ۵۵/۴۵ درصد ارتقا یافت (شکل ۲-ب). توالی بهینه سازی شده از نظر ساختار ثانویه mRNA، توالی‌های ناپایدار کننده RNA و توالی‌های تکراری توسط الگوریتم OptimumGene شرکت GenScript مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده‌ی نبود ساختارهای ناپایدار کننده در توالی بهینه سازی شده بود.

نتیجه الکتورفورز DNA ژنومی استخراج شده از برگ گیاه برنج در شکل ۳-ا نشان داده شده است. در چاهک شماره ۱ باند مربوط به DNA با وزن مولکولی بالا مشاهده می‌شود. مطابق انتظار بدنبال واکنش PCR برای تکثیر قطعه PRO، قطعه‌ای با طول ۱۰۰۸ bp تکثیر شد (شکل ۳-ب). در نتیجه واکنش PCR برای تکثیر قطعه TER نیز، قطعه‌ای



شکل ۲- a: نمودار توزیع کاربرد کدونی در طول توالی کدکننده فاکتور bFGF قبل (راست) و بعد (چپ) از فرایند بهینه سازی کدونی تهیه شده توسط نرم افزار OptimumGene شرکت GenScript. محور افقی موقعیت کدون و محور عمودی کاربرد کدونی کدون‌ها را در گیاه برنج نشان می‌دهد. شاخص سازگاری کدونی (CAI) در زیر نمودار نشان داده شده است. CAI بزرگتر از ۰/۸ مقداری مطلوب را از نظر میزان بیان ترانسژن نشان می‌دهد. b: هیستوگرام فراوانی کدون‌ها در ۱۰ گروه کاربرد کدونی. هیستوگرام راست مربوط به توالی bFGF پیش از بهینه سازی و هیستوگرام چپ مربوط به توالی بهینه سازی شده است. عدد ۱۰۰ در محور افقی نشان دهنده بالاترین کاربرد کدونی برای یک کدون خاص در سیستم بیانی برنج است.

Figure 2- a: Codon usage distribution along bFGF coding sequence before (right) and after (left) codon optimizing process prepared by OptimumGene software from GenScript. Horizontal axis is showing codon position and vertical axis shows relative frequency of each codon in rice. Codon Adaptation Index has been shown below the chart. Transgene with CAI higher than 0.8 has a high expression level. b: codon frequency histogram in 10 codon usage bins. Right histogram is showing bFGF sequence before optimization and left histogram shows optimized sequence. In the horizontal axis 100 shows the highest codon usage for a specific codon in a defined (rice) organism.

هم‌سازگی فراهم کرد. شکل ۵-b نتیجه هضم آنزیمی حامل pTG-EXPCAS با آنزیم‌های EcoRI

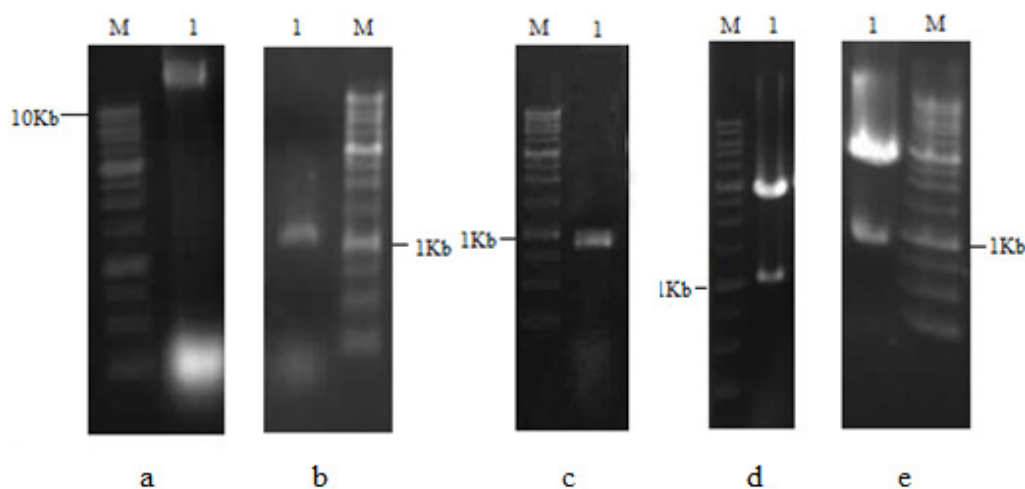
این امر امکان سرهم سازی دو قطعه یاد شده را در جهت مناسب نسبت به یکدیگر در ناقل

۷۰٪ کالوس‌های غیر تراریخت قادر به رشد بر روی محیط حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین هستند (Wilnink & Dons, 1993). از سوی دیگر ژن مقاومت به هیگرومایسین *hpt* موثرترین مارکر استفاده شده برای ترانسفورماسیون گیاه برنج است (Hiei & Komari, 2008). ثابت شده است که غلظت‌های ۲۵-۵۰ میلی گرم از این آنتی بیوتیک (بسته به نوع واریته) بگونه‌ای موثر در فرایند غربالگری کالوس‌های تراریخت در گیاه برنج عمل می‌کند (Nishimura et al., 2006; Wang, 2006). مزیت دیگر استفاده از ناقل دوتایی pCAMBIA1304 در تهیه کشت سوسپانسیون سلولی برنج تولید کننده پروتئین نوترکیب، حضور ژن کدکننده پروتئین فلورسنت *gfp* به عنوان ژن گزارش‌گر است. یکی از عوامل محدود کننده ظرفیت کشت‌های سلولی گیاهی برای تولید پروتئین نوترکیب، ناپایداری بودن سطح تولید پروتئین نوترکیب در کشت‌های طولانی مدت است. یکی از دلایل این امر ناهمگونی کشت سلولی اولیه از لحاظ حضور سلول‌های با فرم تراریختگی متفاوت به لحاظ تعداد و جایگاه درج ترانسژن و همچنین تغییرات ژنتیکی و اپیژنتیکی است که بدنبال کشت‌های متمادی ایجاد می‌شوند (Kirchhoff et al., 2012).

و *HindIII* را نشان می‌دهد. با توجه به نقشه MCS حامل pTG19-T و همچنین مکان‌های برشی در نظر گرفته شده برای قطعات PRO و TER، می‌بایستی که بدنبال هضم حامل pTG-EXPCAS با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* کل قطعه EXPCAS، متشکل از دو قطعه PRO و TER، با طول ۱۸۵۹ bp، برش و از حامل خارج شود که این امر در تصویر مشخص است.

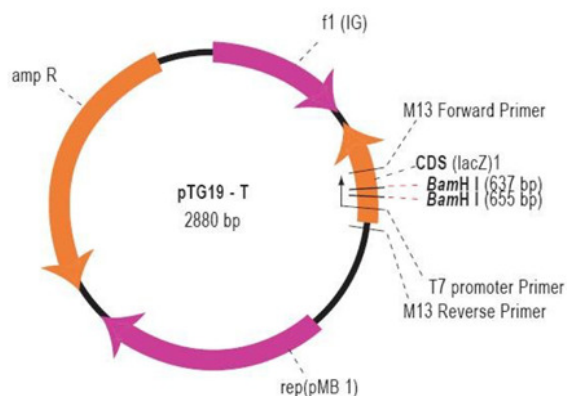
نقشه ناقل دوتایی گیاهی pCAMBIA1304 در شکل ۶ نشان داده شده است. این ناقل دوتایی حاوی ژن‌های *gfp* (Green Fluorescent Protein) و *gus* (β -Glucuronidase) به عنوان ژن‌های گزارش‌گر و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین (*hpt* Hygromycin Phosphotransferase) به عنوان ژن گزینش‌گر است. نوع عامل گزینش‌گر فاکتور بسیار مهمی در یک فرایند ترانسفورماسیون موفق است (Hiei & Komari, 2008).

یکی از دلایل استفاده از این ناقل دوتایی در تحقیق حاضر حضور ژن *hpt* به عنوان ژن گزینش‌گر است. آنتی بیوتیک کانامایسین، که رایجترین عامل گزینش‌گر در ترانسفورماسیون گیاهان دو لپه‌ای است، در مورد گیاهان تک لپه‌ای همچون برنج براحتی قابل استفاده نیست چراکه گیاهان تک لپه‌ای نسبت به غلظت‌های بالایی از این آنتی بیوتیک مقاوم هستند. در مورد برنج نشان داده شده است که



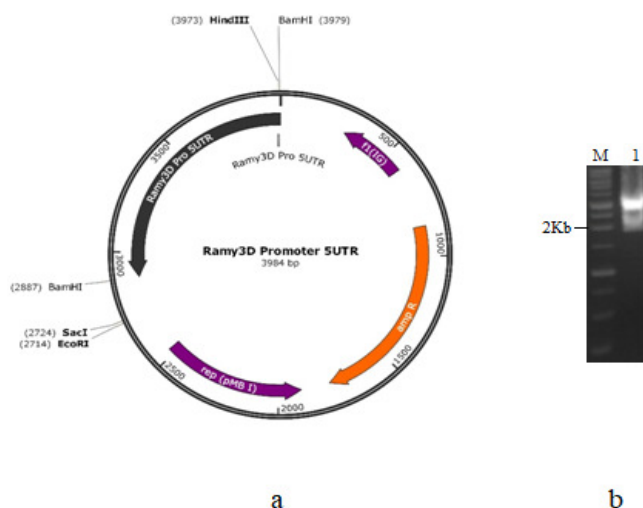
شکل ۳- a: تصویر الکتروفورز ژل آگارز DNA ژنومی گیاه برنج. چاهک ۱: DNA ژنومی. b: تصویر الکتروفورز محصول PCR قطعه PRO. چاهک ۱: محصول PCR قطعه PRO. c: تصویر الکتروفورز محصول PCR قطعه TER. چاهک ۱: محصول PCR قطعه TER. d: تصویر الکتروفورز هضم آنزیمی حامل pTG-PRO با آنزیم *Bam*HI. چاهک ۱: محصول هضم آنزیمی حامل pTG-PRO با آنزیم *Bam*HI. e: تصویر الکتروفورز هضم آنزیمی حامل pTG-TER با آنزیم *Bam*HI. چاهک ۱: محصول هضم آنزیمی حامل pTG-TER با آنزیم *Bam*HI. در تمامی تصاویر چاهک M به نشانگر اندازه مولکولی اشاره دارد.

Figure 3- a: Gel electrophoresis picture of rice genomic DNA. Lane 1: Genomic DNA. b: Gel electrophoresis picture of PRO fragment PCR product. Lane 1: PRO fragment PCR product. c: Gel electrophoresis picture of TER fragment PCR product. Lane 1: TER fragment PCR product. d: Gel electrophoresis picture of pTG-PRO digested with *Bam*HI. Lane 1: pTG-PRO digestion product with *Bam*HI. e: Gel electrophoresis picture of pTG-TER digested with *Bam*HI. Lane 1: pTG-TER digestion product with *Bam*HI. In all figures M refers to size marker.



شکل ۴- نقشه حامل همسانه سازی pTG19-T. در این حامل غربالگری باکتری‌های تراریخت از طریق مقاومت به آنتی بیوتیک آمپیسیلین و تست آبی-سفید انجام می‌پذیرد.

Figure 4- PTG19-T cloning vector map. Transgenic bacteria are screened by ampicillin resistance and white-blue test.



شکل ۵- a: تصویر نمادین ناقل نو ترکیب pTG-PRO. جهت درج قطعه PRO نشان داده شده است. b: تصویر الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل pTG-EXPCAS با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* در ژل آگاروز. M: نشانگر اندازه مولکولی. چاهک ۱: محصول هضم آنزیمی حامل pTG-EXPCAS با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI*

Figure 5- a: Schematic picture of recombinant pTG-PRO vector. The direction of PRO fragment insertion has been shown. b: electrophoresis picture of pTG-EXPCAS digestion with *EcoRI* and *HindIII* on agarose gel. M: size marker. Lane 1: product of pTG-EXPCAS digestion with *EcoRI* and *HindIII*.

قطعه PRO و TER همزمان از حامل برش خورده و خارج گردند. در تصویر مشاهده می‌شود که بدنبال واکنش آنزیمی یاد شده هر دو قطعه PRO و TER با طول‌های مورد نظر برش خورده و از حامل خارج شده‌اند. ناقل دوتایی نو ترکیب pCAM-EXPCAS تهیه شده در این تحقیق، تمامی اجزای لازم را برای بیان یک پروتئین نو ترکیب تحت کنترل توالی‌های تنظیمی ژن *ramy3D* در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه برنج دارا می‌باشد (شکل ۷-b). از این ناقل می‌توان برای بیان پروتئین‌های با ارزش دارویی و صنعتی، از طریق درج توالی کدکننده پروتئین مورد نظر در حد فاصل توالی کدکننده پپتید راهنما و ترمیناتور *ramy3D* با استفاده از مکان‌های برشی *BamHI* و *SacI* استفاده نمود. شکل ۸ نتیجه هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS-bFGF را با آنزیم‌های *SacI*، *BamHI*، *EcoRI* و *HindIII* نشان می‌دهد. در نتیجه این هضم آنزیمی، می‌بایستی که هر سه قطعه PRO، TER و bFGF برش خورده و از حامل خارج می‌شدند. همانگونه که در تصویر مشخص است بدنبال هضم آنزیمی ذکر شده، هر سه قطعه PRO با طول ۱۰۰۸ bp، TER با طول ۸۵۱ bp و bFGF با طول ۵۵۲ bp از حامل خارج شده‌اند که این امر نشان دهنده قرارگیری هر سه قطعه در جهت مورد نظر در حامل pCAM-EXPCAS-bFGF می‌باشد.

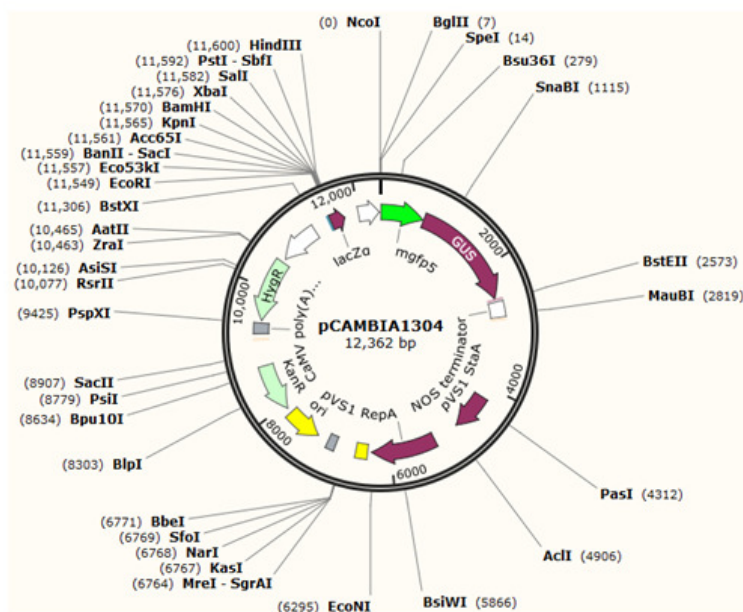
یکی از روش‌های غلبه بر این مشکل استفاده از پروتئین‌های گزارشگر فلورسنت همانند GFP در جهت ایجاد لاین سلولی مونوکلونال از جمعیت ناهمگون اولیه از طریق تکنیک flow sorting است (Kirchhoff *et al.*, 2012). در نتیجه ناقل دوتایی تهیه شده در این تحقیق علاوه بر مزیت‌های بهینه سازی توالی کدکننده فاکتور bFGF، استفاده از سیستم بیانی بسیار قدرتمند و قابل القای *ramy3D* و امکان ترشح پروتئین نو ترکیب به فضای بیرون سلولی و تسهیل خالص سازی آن، از نظر فرایند غربالگری لاین‌های تراریخت و همچنین امکان تهیه سوسپانسیون سلولی یکنواخت و مونوکلونال نیز بسیار مناسب است. شکل ۷-a نتیجه هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* و همچنین آنزیم‌های *EcoRI*، *BamHI* و *HindIII* را نشان می‌دهد. همانگونه که در تصویر مشخص است در نتیجه هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* قطعه EXPCAS با طول ۱۸۵۹ bp از حامل خارج شده است و این نشان دهنده درج قطعه مذکور در جایگاه MCS حامل pCAMBIA1304 می‌باشد. همچنین با توجه به حضور سایت برشی *BamHI* در حد فاصل دو قطعه PRO و TER در قطعه EXPCAS، می‌بایستی که با هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS با آنزیم‌های *EcoRI*، *HindIII* و *BamHI*، هر دو

جمله مزیت های استفاده از این ناقل برای بیان فاکتور رشد انسانی bFGF می توان به: بهینه سازی توالی کدکننده فاکتور bFGF برای بیان در گیاه برنج، استفاده از سیستم بیانی بسیار قدرتمند و قابل القای *ramy3D* برای بیان پروتئین نو ترکیب، ترشح پروتئین نو ترکیب به فضای خارج سلولی و در نتیجه تسهیل فرایند خالص سازی، امکان غربالگری موثر لاین های تراریخت بواسطه استفاده از ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین بعنوان ژن گزینشگر و همچنین امکان تهیه سوسپانسیون سلولی یکنواخت و مونوکلونال بواسطه حضور ژن گزارشگر *gfp* اشاره کرد.

در تمامی مراحل پس از تایید تهیه حامل مورد نظر بوسیله واکنش هضم آنزیمی، حامل تهیه شده بمنظور توالی یابی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده و پس از انجام خوانش، نتیجه با توالی مورد انتظار مقایسه و صحت انجام همسانه سازی مجدداً تایید شد.

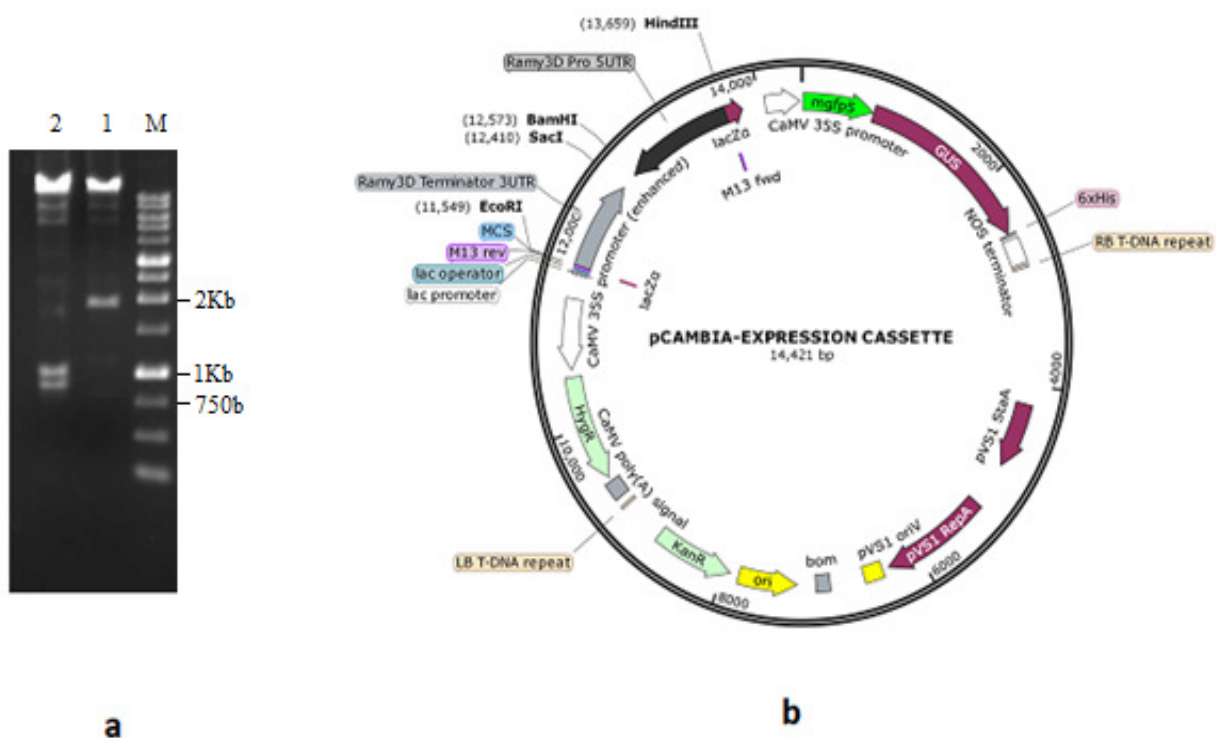
نتیجه گیری

در این تحقیق اقدام به تهیه یک ناقل باینری مناسب برای بیان بالای فاکتور رشد انسانی bFGF در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه برنج شد. از



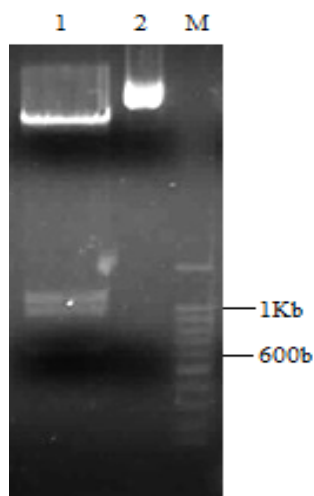
شکل ۶- نقشه حامل دوتایی pCAMBIA1304

Figure 6- PCAMBIA1304 binary vector map.



شکل ۷- a: تصویر الکتروفورز محصول هضم آنزیم ناقل pCAM-EXPCAS با آنزیم های *HindIII*, *EcoRI* و *BamHI*. M: نشانگر اندازه مولکولی. چاهک ۱: نتیجه هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS با آنزیم های *EcoRI* و *HindIII*. چاهک ۲: نتیجه هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS با آنزیم های *EcoRI*, *HindIII* و *BamHI*. b: تصویر نمادین ناقل pCAM-EXPCAS.

Figure 7- a: Electrophoresis picture of pCAM-EXPCAS digestion with *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*. M: size marker. Lane 1: pCAM-EXPCAS digestion product with *EcoRI* and *HindIII*. Lane 2: pCAM-EXPCAS digestion product with *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*. b: Schematic picture of pCAM-EXPCAS vector.



شکل ۸- تصویر الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل pCAM-EXPCAS-bFGF با آنزیم‌های *Bam*HI، *Sac*I، *Hin*DIII و *Eco*RI. M: نشانگر اندازه مولکولی، چاهک ۱: هضم حامل pCAM-EXPCAS-bFGF با آنزیم‌های *Bam*HI، *Sac*I، *Hin*DIII و *Eco*RI. چاهک ۲: حامل pCAM-EXPCAS_bFGF هضم نشده.

Figure 8- Electrophoresis picture of pCAM-EXPCAS-bFGF digestion with *Eco*RI, *Hin*DIII, *Bam*HI and *Sac*I. M: size marker. Lane 1: pCAM-EXPCAS-bFGF digestion product with *Eco*RI, *Hin*DIII, *Bam*HI and *Sac*I. Lane 2: undigested pCAM-EXPCAS-bFGF.

منابع

- An N, Ou J, Jiang D, Zhang L, Liu J, Fu K, Dai Y, Yang D (2013). Expression of a functional recombinant human basic fibroblast growth factor from transgenic rice seeds. *International journal of molecular sciences* 14:3556-3567
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997). Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2 1. *Endocrine reviews* 18:26-45
- Bimboim H, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513-1523
- Böhlen P, Baird A, Esch F, Ling N, Gospodarowicz D (1984). Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:5364-5368
- Chen R, John J, Lavrentieva A, Müller S, Tomala M, Zhao Y, Zweigerdt R, Beutel S, Hitzmann B, Kasper C (2012). Cytokine production using membrane adsorbers: Human basic fibroblast growth factor produced by *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences* 12:29-38
- Chung C, Niemela SL, Miller RH (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:2172-2175

- Delrieu I (2000). The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS letters* 468:6-10
- Ding S-H, Huang L-Y, Wang Y-D, Sun H-C, Xiang Z-H (2006). High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnology letters* 28:869-875
- Doyle JJ (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull* 19:11-15
- Fernig DG, Gallagher JT (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Progress in growth factor research* 5:353-377
- Gasparian M, Elistratov P, Drize N, Nifontova I, Dolgikh D, Kirpichnikov M (2009). Overexpression in *Escherichia coli* and purification of human fibroblast growth factor (FGF-2). *Biochemistry (Moscow)* 74:221-225
- Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G (1978). Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *Journal of Biological Chemistry* 253:3736-3743
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986). Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell differentiation* 19:1-17
- Gould N, Hendy O, Papamichail D (2014). Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 22:1415
- Hiei Y, Komari T (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols* 3:824
- Huang L-F, Tan C-C, Yeh J-F, Liu H-Y, Liu Y-K, Ho S-L, Lu C-A (2015). Efficient secretion of recombinant proteins from rice suspension-cultured cells modulated by the choice of signal peptide. *PloS one* 10:e0140812
- Huang N, Chandler J, Thomas BR, Koizumi N, Rodriguez RL (1993). Metabolic regulation of α -amylase gene expression in transgenic cell cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant molecular biology* 23:737-747
- Jackson MA, Sternes PR, Mudge SR, Graham MW, Birch RG (2014). Design rules for efficient transgene expression in plants. *Plant biotechnology journal* 12:925-933
- Ke Y, Wilkinson MC, Fernig DG, Smith JA, Rudland PS, Barraclough R (1992). A rapid procedure for production of human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1131:307-310
- Kirchhoff J, Raven N, Boes A, Roberts JL, Russell S, Treffenfeldt W, Fischer R, Schinkel H, Schiermeyer A, Schillberg S (2012). Monoclonal tobacco cell lines with enhanced recombinant protein yields can be generated from heterogeneous cell suspension cultures by flow sorting. *Plant biotechnology journal* 10:936-944
- Kwong KW, Ng KL, Lam C-C, Wang YY, Wong W (2013). Authentic human basic fibroblast growth factor produced by secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology* 97:6803-6811
- Liu X, Zhu X (1998). Basic fibroblast growth factor protected forebrain against ischemia-reperfusion damage in rats. *Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica* 19:527-530

- Mozhgan S, Abdolreza B, Mokhtar J, Alireza S, Mahdi B, Fatemeh K (2018). Study of the effect of codon optimization on Anti-VEGF nanobody expression. *Journal of Agricultural Biotechnology* 9:81-100
- Mu X, Kong N, Chen W, Zhang T, Shen M, Yan W (2008). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 59:282-288
- Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M (2006). A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nature Protocols* 1:2796
- Saber AZ, Khadijeh B, Mokhtar JJ, Fereydoun M (2015). Expression of recombinant gamma interferon in tobacco plant seeds. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7
- Sharp PM, Li W-H (1987). The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research* 15:1281-1295
- Shin YJ, Hong SY, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2003). High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnology and bioengineering* 82:778-783
- Ullrich KK, Hiss M, Rensing SA (2015). Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current opinion in biotechnology* 32:61-67
- Wang K (2006) *Agrobacterium protocols*, vol 1. Springer
- Wang Y-P, Wei Z-Y, Zhong X-F, Lin C-J, Cai Y-H, Ma J, Zhang Y-Y, Liu Y-Z, Xing S-C (2015). Stable expression of basic fibroblast growth factor in chloroplasts of tobacco. *International journal of molecular sciences* 17:19
- Wilkinson A, Dons J (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 11:165-165
- Wu X, Kamei K, Sato H, Sato S-i, Takano R, Ichida M, Mori H, Hara S (2001). High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expression and Purification* 21:192-200
- Xu J, Ge X, Dolan MC (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances* 29:278-299

Optimization of human basic Fibroblastic Growth Factor coding sequence for expression in rice (*Oryza sativa* L.) and cloning under *ramy3D* gene regulating sequences in the binary vector pCAMBIA1304

Bastimi M.¹, Hoseini R.^{1*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Abstract

Human basic Fibroblastic Growth Factor (hbFGF) is a valuable protein with a wide variety of clinical and research applications. Currently, recombinant production of this growth factor in conventional platforms of microbial and insect cells is accompanied by several problems causing high cost production that limited its applications. Rice cell suspension culture is an efficient, safe and low cost platform for recombinant protein production. In this study we prepared a suitable construct for high level expression of an optimized version of bFGF coding sequence under control of *ramy3D* gene expression sequences in rice cell suspension culture. The codon usage and GC content of bFGF coding sequence was optimized for expression in rice and then synthesized. Following optimization, the Codon Adaptation Index and GC content were upgraded from 0.76 to 0.82 and from 52.65% to 55.45%, respectively. The *ramy3D* regulating sequences were amplified from genomic DNA in two separate fragments and then cloned. The *ramy3D* regulating fragments were assembled in the binary vector pCAMBIA1304. Then the bFGF optimized CDS was inserted in the construct between signal peptide CDS and 3'UTR. *Ramy3D* expression system has several advantages including high level expression of transgene, inducibility and simple protein purification through protein secretion into the medium.

Keywords: *bFGF growth factor, Ramy3D, rice, recombinant protein.*

* Corresponding Author: Hoseini R.

Tel: 09127694060

Email: raminh_2001@yahoo.com