مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 3، شماره 1، بهار و تابستان 1390)

رونویسی غیر متعارف cDNA ژن فعال کننده پلاسمینوژن انسانی (t-PA) در گیاهان تراریخت توتون

مختار جلالی جواران*[1]، حیدر سیفی نبی آباد[2]، محمد مهدی یعقوبی[3]، سامان حسینخانی[4]

[1]عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

[2]دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

[3] عضو هیئت علمی مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی

[4]عضو هیئت علمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 1389/12/11، تاریخ پذیرش: 1390/11/20

چکیده

پروتئین rt-PA یک عامل اختصاصی فیبرین است که موجب حل کردن لخته های خونی و جلوگیری از سکته های قلبی و مغزی می‌گردد. این پروتئین به فرم دارویی در میزبانهای مختلف بصورت نوترکیب تولید شده است. هدف از این طرح بررسی بیان آن در گیاهان توتون تراریخت بودکه در آن مورد جالبی از نحوه رونویسی ژن در گیاهان تراریخت مشاهده گردید. رونویسی ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش RT-PCR انجام گرفت. نتایج روی الکتروفرز ژل آگارز 0/8 درصد نشان داد که علاوه بر نوار اختصاصی *t-PA* (1.7 kb) یک محصول غیر منتظره دیگر به طول 650 bp هم در گیاهان تراریخت تکثیر می شد. پس از بازیابی آن قطعه از ژل و توالی یابی، مشخص شد که این محصول اضافی با cDNA مربوط به ژن t-PA 99% همولوژی دارد. به عبارت دیگر این باند اضافی دارای بخشی از توالی cDNAی ژن *t-PA* می باشد. در ادامه توالی قطعه اضافی با نرم افزار MegAlign با توالی cDNA ژن t-PA همردیف شد تا نواحی همپوشان و نیز نواحی حذف شده از این قطعه مشخص شود. در نهایت از پایگاه اطلاعاتی CDD موجود در NCBI جهت مشخص کردن دامنه های حذف شده و باقی مانده استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که توالی مربوط به دامنه کرینگل ها حذف و توالی مربوط به دامنه سرین پروتئازی آن باقی مانده است. از طرفی این دمین سرین پروتئازی می باشد که کار اصلی t-PA را انجام می‌دهد به گونه‌ای که مهندسین ژنتیک در تلاش برای تولید پروتئینی از t-PA می باشند که فقط دارای همین دمین پروتئازی باشد. در حالی که در اینجا گیاه این کار مهندسی را به صورت طبیعی انجام می‌دهد. این نتایج احتمالاً به علت پردازش متغیر RNA می باشد.

کلمات کلیدی: *توتون تراریخت، دمین، کرینگل و t-PA نوترکیب.*

* نویسنده مسئول: مختار جلالی جواران تلفن: 021-44196522 Email: m_jalali@modares.ac.ir

مقدمه

در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش می باشد و چون معمولاً قیمت این داروها، فراوانی آنها را محدود می‌کند، لازم است سیستم هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند (Brondyk, 2009). گیاهان تراریخت[1] جایگزین مناسبی برای سیستم های رایج بیان کننده پروتئین های نوترکیب، مانند کشت سلول های جانوری و پروکاریوتی می باشند (Daniell *et al.*, 2001; Sonya, 2005). گیاهان تراریخت می توانند به عنوان بیوراکتورهای زنده برای تولید ارزان مواد دارویی عمل نمایند که این پدیده به کشاورزی مولکولی[2] معروف می باشد (Fernandes *et al.*, 2009; Schillberg *et al.*, 1999). از گیاهان تراریخت می توان به عنوان بیوراکتورهای مفید و جالب برای تولید ارزان و فراوان یک درشت مولکول[3] نو ترکیب و فعال، مثل ترکیبات خونی، واکسن ها، فاکتور های رشد، آنتی بادی ها و آنزیم ها استفاده نمود (Fischer *et al.*, 2004).

لخته شدن خون یک فعالیت آنزیماتیک است که توسط موادی از بافت های آسیب دیده شروع شده و در تشکیل تک واحدهای فیبرین تشکیل دهنده- لخته به اوج می‌رسد و بعد از مدت کمی، لخته فیبرینی توسط سیستم آنزیمی فیبرینولیتیک تجزیه می شود (Bruen *et al.*, 2007; Gaffney and Longstaff, 1994; Henkin *et al.*, 1991; Mayer, 1990; Mosher,1990; Wiman and Hamsten, 1990).

آنزیم پلاسمینوژن به فرم غیر فعال می باشد و برای اینکه فعال شود باید توسط یک هضم پروتئازی به پلاسمین تبدیل شود. از جمله فاکتورهایی که این تبدیل را انجام می دهند آنزیم فعال کننده پلاسمینوژن بافتی[4] می باشد. افرادی که دچار سکته های قلبی و مغزی می‌شوند معمولاً در تولید t-PA دارای نقص می باشند. یکی از روش های درمان لخته های خونی تزریق داخل وریدی فعال کننده های پلاسمینوژن به عنوان داروهای حل کننده لخته خونی است (Collen and Lijnen, 1991). پروتئین t-PA انسانی یک سرین پروتئاز 68 – 62 کیلودالتونی است که از 530-527 اسیدآمینه تشکیل شده و دارای 13% کربوهیدرات می‌باشد. مولکول t-PA از پنج ساختار متمایز با عملکرد مستقل ساخته شده است (Bachmann *et al.*,1994) (شکل 1). دامنه[5] زبانه (F) یا انگشت مانند و دو تا دامنه کرینگل (K1-2) در اتصال *t-PA* به فیبرین دخالت دارند، در حالی که دامنه فاکتور رشد پوستی[6] در زدودگی سریع کبدی مولکول نقش دارد. دامنه سرین پروتئاز (P) دارای جایگاه

[1] Transgenic
[2] Molecular Farming
[3] Macro molecule

[4] Tissue plasminogen activator (t-PA)
[5] Domain
[6] Epidermal growth factor (EGF)

فعال می باشد که از سرین، هیستیدین و آسپاراتیک اسید تشکیل شده که در ساختار اولیه پروتئین دور از هم قرار گرفته‌اند، اما در ساختار تاخورده پروتئین به هم نزدیک می‌باشند. دامنه سرین پروتئازی با هضم پیوند Arg^{561} _ Val^{562} در پلاسمینوژن آن را به پلاسمین فعال می‌کند (Frank, 1995; Von *et al*., 2008).

امروزه ***t-PA*** نوترکیب با اسم تجاری Activase یا Alteplase، به عنوان یک داروی مهم در درمان بیماری های قلبی، مثل ترومبولیتیک (سکته قلبی) استفاده می شود. این دارو در حال حاضر توسط شرکت آمریکایی Genentech تولید و با قیمت خیلی بالا وارد برخی کشورها می‌شود. به علت اهمیت خیلی بالای این پروتئین، به منظور تولید آن فعالیت هایی در داخل کشور شروع شده است.

مواد و روش ها

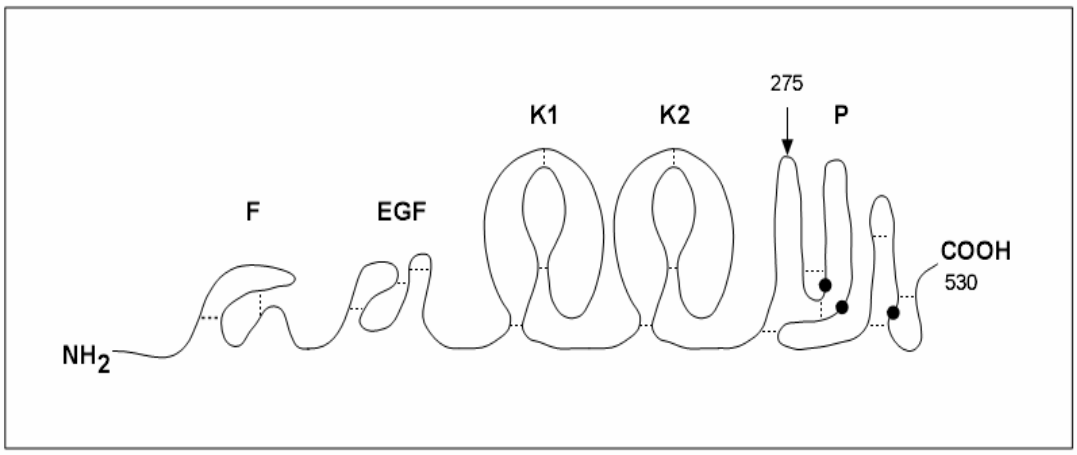
در این مطالعه کار کلون نمودن و انتقال ژن به گیاه توسط آقای اسد معصومی اصل در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده و بذرهای تراریخت از ایشان اخذ شد (Masoumi Asl, 2009). جهت تولید و تخلیص ***t-PA*** نوترکیب انسانی از گیاهان تراریخت توتون ابتدا لازم بود که بذر گیاهان نسل T_0 که به عنوان تراریخت شناسایی شده بودند کشت می شد و مجدداً تراریخت بودن این گیاهان(T_1) را نشان می دادیم.

بعد از کشت بذر گیاهان تراریخت، استخراج DNA از برگ گیاهان به کمک روش CTAB انجام گرفت (Pan *et al*., 2006). PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی برای cDNA ژن t-PA به میزان 0/4 µM از هر آغازگر، 200ng از DNA ژنومی، 1/25U پلیمراز Tag (سیناژن)، 1/5 میلی مولار $MgCl_2$ و 200 میکرومول dNTPs در حجم 25 میکرولیتر با استفاده از دستگاه چرخه دمایی انجام شد.

چرخه دمایی تکثیر شامل واسرشت کردن اولیه دردمای 94°C برای 4 دقیقه، 35 چرخه واسرشت کردن در 94°C برای یک دقیقه، آنلینگ در 60°C به مدت یک دقیقه و بسط در 72°C به مدت 2 دقیقه و بسط نهایی 72 °C به مدت 5 دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگارز 0/8 درصد بارگذاری شده و پس از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، عکسبرداری با ژل اسکن مدل G BOX HR (Syngene, UK) انجام گرفت. در این مرحله پلاسمید pBI121 دارای cDNA ژن t-PA از باکتری تراریخت تخلیص شد و به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

برای بررسی رونویسی cDNAی ژن t-PA منتقل شده به گیاهان تراریخت، ابتدا با استفاده از کیت^{plus} RNX (سیناژن) RNA از برگ های تازه تحت شرایط استریل و عاری از RNase استخراج شد. به این منظور 10 mg برگ توتون توسط هاون پر از ازت مایع بخوبی پودر گردیده و 1 ml از بافر

RNX^{Plus} به نمونه ها اضافه شد. سپس حدود µl 300 کلروفرم اضافه گردید و در دور 15000 rpm به مدت 15 دقیقه در 4 ˚C سانتریفیوژ گردید.



شکل 1- ساختار دامنه‌ای مولکول t-PA انسانی که P نقش سرین پروتئازی و اصلی ضد لختگی خون، Ks در اتصال به فیبرین و EGF در پاک کنندگی سریع کبدی مولکول نقش دارد (Frank 1995).

Figure 1-Domain structure of human t-PA, P has serine protease and main anti clot role, Ks binding to fibrin and EGF cause the rapid efface from liver (Frank 1995).

برای از بین بردن آلودگی های فنولی که میزان آن در توتون بالا می باشد از 100 میکرولیتر PEG%20 استفاده شد. پس از سانتریفوژ فاز آبی را جمع کرده و هم حجم آن ایزوپروپانول ریخته و در دمای 20- ˚C به مدت 30 دقیقه نگه داشته شد. نمونه ها دوباره در دور 12000 rpm به مدت 15 دقیقه در 4 ˚C سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته و رسوب توسط اتانول 75 درصد شستشو داده سپس در دور 7500 rpm به مدت 8 دقیقه در 4 ˚C سانتریفیوژ گردید. نهایتاً رسوب را خشک کرده و در 30µl آب استریل تیمار شده با DEPC حل شد. بعد از استخراج RNA برای کیفیت سنجی 5 µl از آن روی الکتروفرز ژل آگارز 0/8 درصد مشاهده شد. کمیت آن به کمک دستگاه طیف سنج نوری در طول موجهای 280 و 260 نانومتر اندازه گیری شد. برای ساخت cDNA 100نانوگرم RNA به همراه 0/2 میکروگرم آغازگرهای شش تایی تصادفی[1]، 20 واحد RNasin و 200 واحد آنزیم RevertAid^{TM} M-MuLV Reverse Transcriptase(Fermentas) در دمای 42°C به مدت 60 دقیقه استفاده شد. دو نوع کنترل منفی بدون RNA و بدون آنزیم روتوشت بردار معکوس

[1] Random hexamer primer

(RT) نیز در این آزمون به کار برده شد. شرایط PCR برای تکثیر cDNA نیز همان شرایط ذکر شده برای تکثیر DNA ژنومی بود. در نهایت محصول PCR روی ژل آگارز 0/8درصد بارگذاری شد. پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید توسط ژل اسکن مدل G BOX HR عکسبرداری شد. در این آزمون از ژن گلیسرآلدهید 3-فسفات دهیدروژناز(GAPDH) توتون به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

توالی آغازگرهای استفاده شده برای ژنهای *t-PA* و *gapdh* در جدول 1و 2 آورده شده است.

بازیافت یا استخراج محصول PCR و توالی یابی

پس از انجام آزمون RT-PCR مشاهده گردید که علاوه بر باند اختصاصی t-PA یک باند اضافی غیر قابل انتظار دیگرهم تکثیر می شود. برای تعیین ماهیت دقیق این قعطه تکثیر شده، باند اضافی به کمک کیت بازیافت و استخراج DNA (Fermentas) از روی ژل آگارز خالص شد. بعد از کیفیت سنجی به کمک ژل آگارز 0/8درصد و کمیت سنجی به کمک دستگاه طیف سنج نوری ، محصول PCR خالص شده برای توالی یابی به شرکت آلمانی MWG Operon فرستاده شد.

جستجوی توالی های همپوشان با توالی باند اضافی

بعد از توالی یابی باند اضافی تکثیر شده در مرحله RT-PCR ، به منظور یافتن توالی های همپوشان، از برنامه BLAST در پایگاه اطلاعات NCBI استفاده شد.

یافتن دامنه های حذف شده و باقی مانده در قطعه مورد نظر

در این بخش با استفاده از نرم افزار(MegAlign (DNAstar، توالی قطعه مورد نظر با توالی cDNAی ژن t-PA همردیف[1] شد. بعد از همردیفی، جهت یافتن اینکه چه نواحی وابسته ی به این توالی ها از پروتئین t-PA حذف شده و توالی cDNA مربوط به چه دمینی رونویسی شده است، از پایگاه اطلاعاتی CDD موجود در بانک اطلاعاتی NCBI استفاده گردید.

[1] Align

جدول 1- توالی آغازگرهای ژن t-PA.

Table 1-primer sequences of t-PA

آغازگر	توالی
جلوبرنده	5’- GAGTCTAGATAAACAATGGATGCAATGAAGAGAGGG- 3’
معکوس	5’ –ATAGTCAACTCATAGCTCATCTTTCGGTCGCATGTTG- 3’

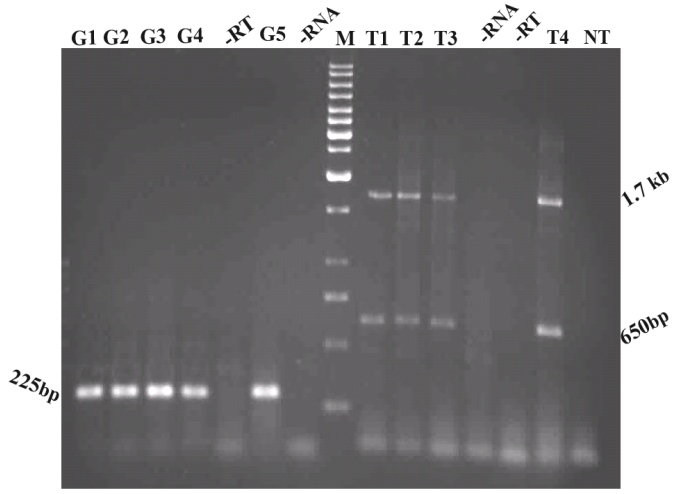
جدول 2- توالی آغازگرهای ژن گلیسرآلدهید 3-فسفات دهیدروژناز.

Table 2- primer sequences of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

آغازگر	توالی
جلوبرنده	5’-GTGGTGCCAAGAAGGTTGTG-3’
معکوس	5’-CCAGTGCTGCTAGGAATGATG-3’

نتایج و بحث

امروزه تولید پروتئین ها و داروهای نوترکیب اهمیت ویژه ی برای محققان و کشورها دارد. در این راستا نیز میزبان های مختلفی شامل باکتری ها، قارچ ها، حیوانات و گیاهان به عنوان راکتور تولید کننده استفاده شده است. از این میان گیاهان برای تولید داروهای نوترکیب ترجیح داده می شوند. زیرا قیمت تمام شده محصول در گیاهان کمتر از سایر منابع می باشد. بعلاوه داروهای نوترکیب تولید شده از طریق گیاهان به علت عدم وجود آلودگی های میکروبی و بویژه عوامل بیماریزای مشترک با انسان، ایمنی بالاتری را دارند. در این مطالعه پس از انجام PCR روی DNA ژنومی گیاه، باند 1.7 kb در گیاهان تراریخت توتون (هم اندازه cDNAی *t-PA* انسانی و مشابه با کنترل مثبت پلاسمید pBI121 حاوی cDNA ژن *t-PA* انسانی) تکثیر شدکه در گیاهان غیر تراریخت و کنترل منفی این محصول دیده نمی‌شد (داده ها نشان داده نشده است). از این رو می توان نتیجه گرفت که cDNA ژن *t-PA* انسانی با موفقیت به ناحیه یوکروماتین ژنوم گیاهان تراریخت الحاق یافته است. بعد از انجام آزمون RT-PCR نیز همان قطعه مطابق با cDNA ژن *t-PA* (در حدود 1.7kb) در گیاهان تراریخت تکثیر شد. در حالی که این قطعه در گیاهان غیر تراریخت و چاهک های کنترل کنفی مشاهده نمی شد (شکل2).



شکل 2- نتایج RT- PCR روی الکتروفرز ژل آگارز. چاهک های G محصول تکثیر رونوشت ژن کنترل داخلی GAPDH و چاهک های T مربوط به محصول تکثیر رونوشت cDNA ژن t-PA انسانی در گیاهان تراریخت هستند. چاهک RT– نمونه کنترل منفی فاقد آنزیم رونوشت بردار معکوس؛ چاهک RNA– نمونه های کنترل منفی فاقد RNA و M استاندارد وزن مولکولی است (100bp). همانطور که مشخص است در نمونه های گیاه تراریخت دو محصول RT-PCR به طولهای 1700 و 650 جفت باز دیده می-شود.

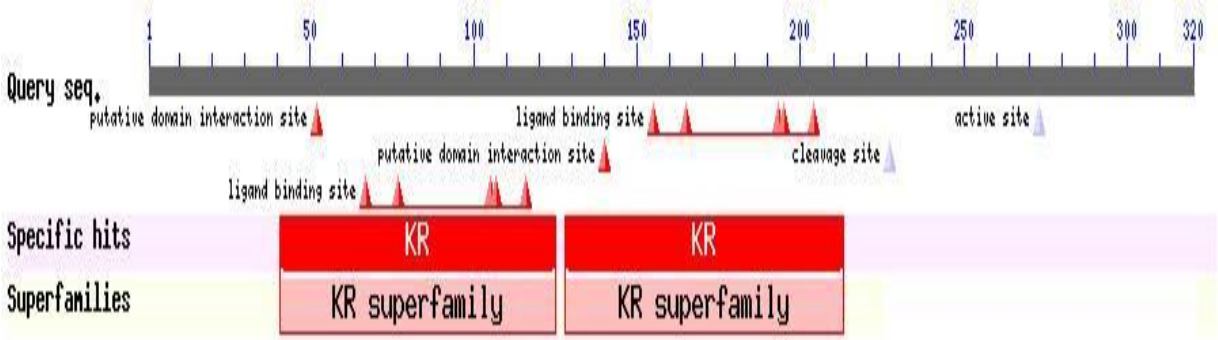
Figure 2- The results of RT-PCR on agarose gele electrophoresis. G wells are amplified product of internal control (GAPDH) and T wells are amplified product of cDNA of human t-PA in transgenic plants. –RT well is negative control without reverse transcriptase; -RNA well is negative control without RNA and M (100 bp GeneRuller DNA ladder). The anticipated 1.7-kb product of t-PA transcription and a 650-bp extra band that is present only in transgenic plants are seen on agarose gel.

این نتایج نشان می‌دهد که ژن انتقال یافته به کروموزوم هسته گیاه وارد شده و نتیجه آن رونویسی فعال *t-PA* نوترکیب در گیاهان تراریخت می باشد. اما علاوه بر این باند، یک محصول اضافی غیر قابل انتظار به طول حدود 650 bp نیز در گیاهان تراریخت مشاهده می شد در حالی که در نمونه های کنترل منفی و گیاهان غیر تراریخت دیده نشد. همچنین با اینکه همه شرایط و مواد PCR و RT-PCR یکسان بود ولی این قطعه در مرحله PCR تکثیر نمی شد. به همین جهت می توان گفت که این قطعه از روی ژنوم تکثیر نمی‌شود بلکه از مرحله رونویسی حاصل شده است. در ابتدا این تصور مطرح شد که این باند به علت غیر اختصاصی بودن مواد و شرایط RT-PCR

تکثیر می شود. اما با عوض کردن مواد PCR و اختصاصی تر کردن دمای اتصال آغازگرها به کمک touchdown PCR نه تنها باند اضافی حذف نشد بلکه تکثیر آن بهتر از باند اصلی هم صورت می گرفت (نتایج نشان داده نشده اند). بعد از استخراج از ژل و توالی یابی این قطعه اضافی رونویسی شده و استفاده از برنامه BLAST موجود در پایگاه NCBI، مشاهده شد که این باند با cDNA ژن *t-PA* انسانی (NM 000930) 99% همولوژی دارد. به عبارت دیگر این رونوشت اضافه بخشی از توالی cDNAی *t-PA* انسانی را دارا می باشد و برخی نواحی cDNA ژن *t-PA* از آن حذف شده است. توالی این باند اضافی با توالی cDNA (FM956488.1) مربوط به *t-PA* با استفاده از نرم افزار MegAlign (محصول DNA Star) همردیف شدند. با استفاده از پایگاه اطلاعات زیستی CDD (اختصاصی جستجوی دامنه های حفاظت شده) نتایج نشان داد که از دامنه های مربوط به پروتئین t-PA (شکل1) توالی مربوط به دامنه سرین پروتئازی t-PA با 20 نوکلئوتید ابتدایی دامنه F در این قطعه اضافی باقی مانده و توالی کرینگل ها، و سایر دمین ها حذف شده است (شکل 3). به عبارتی ترانسژن *t-PA* به دو طریق در گیاهان رونویسی می شود. یک نوع آن فرم کامل رونویسی می باشد و نوع دیگر حاصل پردازش در رونویسی می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده فرضیه های مختلفی را برای این نوع رونویسی در گیاهان تراریخت می توان مطرح کرد. از جمله پردازش متغیر[1] و یا ویرایش RNA[2] را می توان نام برد. مثلاً جهش در یک جایگاه پردازش منجر به از دست عملکرد آن جایگاه شود که در نتیجه آن یک کدون خاتمه زودرس بوجود آمده و موجب از دست رفتن بعضی از اگزون ها در رونوشت کوتاهتر شود. همچنین احتمال دارد که کمپلکس پردازشگر از جمله U_1 که کار شناسایی توالی جایگاه پردازش در نسخه RNA اولیه را به عهده دارد یک جایگاه اضافی شناسایی کرده و منجر به حذف اگزون ها گردد. البته امکان دارد که آنزیم RNA پلیمراز در حین رونویسی دچار سر خوردن شده و اگزون های مرکزی t-PA رونویسی نشود. تشکیل ساختارهای ثانویه که مانع از رونویسی کامل ژن می شود نیز می تواند عامل دیگری در این نوع رونویسی باشد. فرضیه دیگری که در این باره می توان مطرح کرد این است که چون ژن *t-PA* طی تکامل به علت پدیده DNA Shuffling از ژنهای فاکتور رشد پوستی، فیبرونکتین و تریپسین بوجود آمده است (Brown, 1998). چون ژن t-PA انسانی همولوژی و قرابت با ژن های گیاهی ندارد، بنابر این در خارج از سیستم تکاملی خود تمایل دارد به اجزاء تشکیل دهنده خود رونویسی شود. که در اینجا هم توالی مربوط به دامنه تریپسین جداگانه رونویسی می‌شود. با توجه به اینکه توالی این

[1] Alternative splicing
[2] RNA editing

تریپسین دارای توالی های کدون آغازین و توالی کزاک و نیز توالی کدون خاتمه و توالی سیگنالی KDEL می باشد. بنابر این می توان گفت که این قطعه سرزده هم می‌تواند به پروتئین ترجمه شود.



شکل 3- دمین های حذف شده (کرینگل 1 و 2) از قطعه حاصل از پردازش متغییر RNA.

Figure 3-omitted domains (kringle 1 and 2) from alternative spliced RNA.

بنا براین در مراحل بعدی تحقیقات تلاش می کنیم این آنزیم *t-PA* سرزده از گیاهان تراریخت تخلیص شده و فعالیت آنزیمی آن با *t-PA* کامل مقایسه گردد. در مورد پروتئین t-PA مشخص شده است که فعالیت اصلی باز کردن لخته های خونی به عهده دامنه سرین پروتئازی(P) می باشد و سایر دامنه ها نقش های کمکی را دارند. به گونه ی که امروزه مهندسین ژنتیک سعی می کنند فقط توالی مربوط به دمین سرین پروتئازی را به میزبان منتقل و بیان کنند. با این اوصاف گیاه به نحوی بیان *t-PA* را پردازش می‌کند که فقط قطعه اصلی آنزیم (دمین سرین پروتئازی) باقی بماند. کاری که مهندسین ژنتیک قصد انجام آنرا دارند تا با دستکاری ژن *t-PA* فقط قطعه سرین پروتئازی آن را به موجودات تراریخت منتقل کنند که به آن ژن سربریده[1] اطلاق می شود. در اینجا این کار مهندسی به صورت طبیعی در گیاه در حال انجام است.

تشکر و قدردانی

اعتبار انجام این طرح توسط مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی تامین شده است که بدینوسیله از مسئولین آن مرکز تشکر می‌شود. همچنین جا دارد از آقای دکتر معصومی اصل به خاطر در اختیار گذاشتن بذر گیاهان تراریخت تشکر کرد.

[1] truncated gene

منابع

Bachmann F (1994). Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. In Hemostasis and Thrombosis. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds), third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh. 575-613.

Brondyk W H (2009). Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. Methods in enzymology 463: 131–147.

Brown TA (1998). Gene Cloning. Blackwell Science LTD. PP. 50-56. 3rd edition

Bruen KJ, Ballard JR, Morris SE, Cochran A, Edelman LS, Saffle JR (2007). Reduction of the incidence of amputation in frostbite injury with thrombolytic therapy. Surgery 6: 546–51.

Collen D, Lijnen HR (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Blood 12: 3114-3124.

Daniell H, Stephen JS and Wycoff K (2001). Medical molecular farming. Prodaction of antibodies biophamaceuticals and edible vaccines in plants. plant Science 615: 219-26.

Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. Plant Biology 7: 152–158.

Frank A (1995). t-PA, Product Monograph Copyright © 1995 Chromogenix AB. Version 1.1. Sweden.

Gaffney PJ, Longstaff C (1994). An overview of fibrinolysis. In: Hemostasis and Thrombosis. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds), third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh. 549-571.

Henkin J, Marcotte P, Yang H (1991). The plasminogen-plasmin system. Cardial Disease 2: 135-164.

Masoumi asl A (2009). Cloning and transformation of human t-PA gene to tobacco plants and analysis of transgenic plants. Ph.D. Thesis. Department of plant breeding, faculty of agriculture, tarbiat mofares university. Tehran-Iran.

Mayer M (1990). Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. Clincal Biochemistry 23: 197-211.

Mosher DF (1990). Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. Clinical Cardiology 13: 5-11.

Pan H, Yang CP, Wei ZG and Jiang J (2006). DNA extraction of birch leaves by improved CTAB method and optimization of its ISSR system. Forestry Research 17: 298-300.

Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, and Fisher R (1999). Apoplastic and cytosolic expression of full size antibodies and antibodies fragments in Nicotiana tabacum. Transgenic Research 8: 217-221.

Sonya N (2005). Molecular farming. Science and Technology Division Canadian Library of Parliament. http://www2.parl.gc.ca/Content/LOP/ResearchPublications/prb0509-e.htm. Retrieved 2008-09-11.

Von FT, McDiarmid T, MacKler L, Zolotor A (2008). Clinical inquiries: Can recombinant growth hormone effectively treat idiopathic short stature? family practice. 57: 611–612.

Wiman B, Hamsten A (1990) The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. Seminar Thromb Haemostas 3: 207-216.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 3، شماره 1، بهار و تابستان 1390)

Unexpected Transcription of Human t-PA cDNA in transgenic tobacco plants

Jalali Javaran M. [1 *]**, Saify Nabiabad H.** [2]**, Yaghoobi M.M.** [3]**, Hosseinkhani S**[4]**.**
[1] Department of Biotechnology, School of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Department of Biotechnology, School of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Department of Biotechnology, Research Institute for Environmental Sciences, International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, Iran
[4]Department of Biochemistry, College of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) is used as a fibrin-specific thrombolytic agent for the treatment of various thromboembolic diseases. In this study, we tried to show the expression of transferred cDNA of human t-PA gene in transgenic tobacco plants produced previously by this group. RT-PCR with specific primers for t-PA, were used to assay the transgenic plants. RT-PCR products were observed on agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining. The results showed that the t-PA gene is stably expressed in second generation transgenic plant at the level of mRNA, while no expression was seen in non transgenic plants. These results also indicate an unfamiliar 650 bp transcript from t-PA transgene in plants. The results of homology search by CDD at NCBI database demonstrate that in addition to complete cDNA, an incomplete transcript so observed. This truncated transcript is a part of cDNA of t-PA that has lost the kringles domain while tyrosine-like serine protease is remained. This may results from alternative RNA splicing. The serine protease domain can carry out the role of t-PA alone. So many scientists are trying to clone this fragment only as a drug. Interestingly the plant produces this fragment naturally. This result may be because of alternative splicing of RNA.

Key words: *Domain, Kringle, recombinant t-PA and transgenic tobacco.*

[*] Corresponding Author: Jalali Javaran M. Tel: 021-44196522 Email: m_jalali@modares.ac.ir