

Effect of P19 gene expression on transcription rate and production of recombinant human tissue plasminogen (rtPA) in tobacco (*Nicotiana benthamiana*)

Yousef Sharafi

* PhD student of Plant Breeding, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: y.sharafi@modares.ac.ir

Mokhtar Jalali Javaran 

Professor of Molecular Genetics and Genetics Engineering, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: m_jalali@modares.ac.ir

Mohammad Sadegh Sabet 

Assistant Professor of Molecular Genetics and Genetics Engineering, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: ms.sabet@modares.ac.ir

Abstract

Objective

Tissue plasminogen activator is one of the most important drugs in the treatment of heart disease. This drug is produced in the expression system as a recombinant protein that has high production costs. Transient expression system is very suitable for protein expression because of its high expression, high speed, low cost and no spatial effect. Post-transcriptional silencing has been shown to affect expression levels. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of simultaneous expression of P19 silencing suppressor gene on transient expression of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) at transcriptional and protein levels in *Nicotiana benthamiana*.

Material and methods

To serve this purpose, the expression proportion of injected *Agrobacterium tumefaciens* containing a binary vector pCAMBIA1304-rtPA with *agrobacterium* containing pCAMBIA1304-P19 have been studied comparison with the expression level from *Agrobacterium* containing only the binary vector pCAMBIA1304-rtPA. Leaf samples were prepared on 4, 7, and 10 day post-inoculation with *Agrobacterium*. Transcription and then protein levels were calculated using the Real Time PCR and ELISA tests.

Results

The results of Real Time PCR test showed that rtPA transcript increased in the presence of P19. Also, 4 days after plant inoculation, the highest transcript levels were obtained from p19 and rtPA genes. ELISA results showed that the expression of rtPA protein in the presence of P19 was 89 and 84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ leaf weight at the 7 and 10 day after inoculation, respectively. This expression was 12 and 15% higher than of when *agrobacterium*-containing pCAMBIA1304-rtPA vector alone was used, respectively.

Conclusion

The results showed that the use of transient expression method could be a suitable method for rtPA protein production.

Keywords: *Agrobacterium*, Transient Expression, Molecular Farming, Silencing Suppressor.

Citation: Sharafi Y, Jalali Javaran M, Sabet MS (2020) Effect of P19 Gene Expression on Transcription Rate and Production of Recombinant Human Tissue Plasminogen (rtPA) in Tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 103-128.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (2), 103-128.

DOI: 10.22103/jab.2020.15628.1217

Received: April 3, 2020; Accepted: May 17, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تأثیر بیان ژن P19 بر افزایش میزان رونویسی و تولید پروتئین نوترکیب پلاسمینوزن بافتی

انسانی (rtPA) در گیاه توتون (*Nicotiana benthamiana*)

یوسف شرفی

* دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ایمیل:

y.sharafi@modares.ac.ir

مختار جلالی جواران

استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ایمیل:

m_jalali@modares.ac.ir

محمدصادق ثابت

استادیار گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ایمیل:

ms.sabet@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۸

چکیده

هدف: فعال‌کننده پلاسمینوزن بافتی (rtPA) یکی از مهم‌ترین داروها در درمان بیماری‌های قلبی است. این دارو به‌صورت پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی تولید می‌شود که هزینه‌های تولید بسیار بالایی دارد. سیستم بیان موقت به‌دلیل بیان زیاد، سرعت بالا، هزینه پایین و عدم تأثیرپذیری مکانی جهت بیان پروتئین بسیار مناسب می‌باشد. با این وجود مشخص شده است که خاموشی پس از رونویسی حاصل از کمپلکس RISC بر میزان بیان پروتئین نوترکیب تأثیر می‌گذارد. یکی از مهم‌ترین سرکوب‌کننده‌های خاموشی RNA شناخته شده در گیاهان، پروتئین P19 می‌باشد که از طریق میل ترکیبی زیادی که با siRNA دو رشته‌ای دارد به آن متصل می‌گردد و آن را تجزیه می‌کند و مانع خاموشی ژن می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر بیان هم‌زمان ژن P19 بر بیان ژن فعال‌کننده پلاسمینوزن بافتی (rtPA) در سطح رونویسی و پروتئین در گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* بود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر میزان بیان ژن rtPA در سطح رونویسی و پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از تزریق هم‌زمان اگروباکتريوم حاوی ناقل دوتایی pCAMBIA1304-rtPA و اگروباکتريوم حاوی ناقل pCAMBIA1304-P19 در مقایسه با اگروباکتريوم حاوی تنها ناقل بیانی pCAMBIA1304-rtPA استفاده شد. نمونه‌های برگ‌گی در روزهای ۴، ۷

و ۱۰ روز پس از تلقیح با آگروباکتریوم تهیه شدند. سپس میزان رونویسی و پروتئین با استفاده از آزمون ReaTime PCR و الایزا محاسبه شد.

نتایج: نتایج آزمون Real Time PCR حاکی از افزایش ۳۴ درصد میزان رونویسی ژن rtPA در حضور P19 نسبت به شاهد بود. بیشترین میزان رونویسی از ژن‌های P19 و rtPA با گذشت چهار روز از تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم حاصل شد. نتایج الایزا نشان داد که میزان بیان پروتئین rtPA در حضور ژن P19 در روز هفتم و دهم پس از تلقیح به ترتیب ۸۹ و ۸۴ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ بود که در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۱۲ و ۱۵ درصد بیشتر بود.

نتیجه‌گیری کلی: نتایج نشان داد که کاربرد P19 علاوه بر سرکوب خاموشی ژن، می‌تواند برای دستیابی به بیان در سطح بالا مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، بیان موقت، زراعت مولکولی، سرکوب‌کننده خاموشی ژن.

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی، از شایع‌ترین عوامل مرگ‌ومیر افراد بالغ در کشورهای توسعه‌یافته است. بنابر گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)^۱، در سال ۲۰۱۶، ۱۵/۲ میلیون از ۵۶/۹ میلیون مرگ در سراسر جهان مربوط به بیماری ایسکمیک قلب است (WHO 2018). امروزه با استفاده از داروهای تجزیه‌کننده لخته خونی (ترومبولیتیک)^۲ و حذف لخته از سیستم گردش خون، مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری به میزان زیادی کاهش یافته است. هدف‌گیری داروهای ترومبولیتیک، سیستم تجزیه‌ی فیبرین^۳ می‌باشد. لخته خون به صورت ساختاری موقت از فیبرین در اثر سگته قلبی در خون تشکیل می‌شود و پس از ایجاد آن، لازم است تا تجزیه (حل) گردد. تجزیه‌رشته‌های فیبرین به ترکیبات محلول در خون، توسط پلاسمین صورت می‌گیرد (Kunamneni et al. 2008). پلاسمین آنزیم اختصاصی و از خانواده‌ی پروتئازها محسوب می‌شود. در جریان خون، پلاسمین به صورت پیش آنزیمی غیرفعال به نام پلاسمینوژن وجود دارد که توسط عامل فعال‌کننده در محل تشکیل لخته، به پلاسمین تبدیل می‌گردد (Kunamneni et al. 2008). از فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن جهت مصارف درمانی می‌توان به یوروکیناز، استرپتوکیناز، و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی اشاره نمود. پروتئین فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی (tPA) در مقایسه با Urokinase و Streptokinase، به‌طور اختصاصی و با تمایل بالا به فیبرین متصل می‌شود و بنابراین با کارایی بهتری لخته را حل می‌کند (Baruah et al. 2006). پروتئین tPA یک سرین پروتئاز با زنجیره‌ی پلی پپتیدی ۵۲۷ اسیدآمینوای و حاوی پنج دمین

¹World health organization; WHO

² Thrombolytic

³ Fibrinolysis

ساختاری و عملکردی می‌باشد (Ranby 1982). شکل کوتاه شده‌ی پروتئین tPA (Truncated tPA)، امروزه در فرمولاسیون‌های جدید دارویی بیشتر کاربرد دارد و از پنج دامین پروتئین اصلی، تنها حاوی دامین‌های سرین پروتئاز و کرینگل ۲ (K2S) می‌باشد. شکل کوتاه شده‌ی پروتئین tPA (rtPA)، فاقد واحدهای قندی بوده و تعداد آمینواسیدهای آن به ۳۵۵ کاهش یافته است (Kohnert et al. 1992). چنین تغییری سبب افزایش نیمه‌عمر پلاسمایی آن و نهایتاً توانایی بهتر در حذف لخته نسبت به پروتئین اصلی شده است (Flemmig & Melzig 2012). با افزایش تقاضا برای پروتئین tPA به دلیل مصارف مختلف آن در درمان بیماری‌های فیبرینولیتیک، ایجاد سیستم تولید در مقیاس وسیع، مقرون به صرفه و ایمن، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. تولید پروتئین tPA در سلول‌های L موش (Browne et al. 1985)، لاین‌های سلولی ملانوما بوتر (Dodd et al. 1986)، لاین‌های سلولی پستانداران (Jalanko et al. 1990)، باکتری اشریشیاکلی (Escherichia coli) (Obukowicz et al. 1990)، سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) (Fann et al. 2000) و لیشمانیا (Soleimani et al. 2006) مورد مطالعه قرار گرفته است. با این وجود استفاده از گیاهان به دلیل مقیاس‌پذیری، عدم وجود بیماری مشترک بین گیاه و انسان، انجام تغییرات پس از ترجمه همانند سیستم انسانی و افزایش پایداری و ثبات پروتئین در جهت دستیابی به این هدف بسیار مناسب می‌باشند. تحقیقات متعددی در جهت تولید این پروتئین انسانی در گیاهان مختلف صورت گرفته است. در سال ۲۰۱۰ ژن کدکننده پروتئین tPA با موفقیت به هسته گیاه توتون منتقل شد و تولید پروتئین نوترکیب tPA فعال مشابه نوع تجاری در گیاهان تراریخت تأیید شد (Masoumi Asl et al. 2010). سپس فعالیت گسترده‌ای جهت خالص سازی پروتئین نوترکیب tPA از توتون‌های تراریخت صورت گرفت (Nabiabad et al. 2011). همچنین وضعیت بیانی tPA با افزودن پپتیدهای راهنما و الحاقی به انتهای ژن tPA و انتقال به هسته گیاه توتون، در گیاهان تراریخت مورد بررسی قرار گرفت (Goojani et al. 2013). همچنین ژن tPA به ژنوم هسته‌ای گیاه خیار (*Cucumis sativa L.*) منتقل و تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت تأیید شد (Asgari et al. 2014). به منظور افزایش سطح بیان ژن tPA در گیاه توتون، ترادف ژنی فرم کوتاه شده‌ی پروتئین tPA به کلروپلاست گیاه توتون نیز انتقال یافته است (Abdoli-Nasab et al. 2013).

امروزه با توجه به طولانی بودن ارزیابی عملکرد گیاهان تراریخت پایدار، بیان موقت ژن بیگانه جایگزینی مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به حساب می‌آید (Goodin et al. 2002; Li et al. 2009; Zhou et al. 2009; Xu et al. 2012). بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند و کارا برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه در بیوتکنولوژی گیاهی است. از بیان موقت بیشتر برای تأیید تراریختی و امکان تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود (Pogue et al. 2010). در این روش پروتئین در سطح بالا و در کوتاه‌ترین زمان تولید می‌شود (Pogue et al. 2010). این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت بافت و در بافت‌های تمایز یافته قابل اجرا بوده و همچنین تحت تأثیر محیط نمی‌باشد (Xu et al. 2012). عوامل محدودکننده متعددی تولید پروتئین نوترکیب را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. خاموشی ژن پس از

رونویسی (PTGS) از جمله عواملی است که در برگ‌های گیاهان تلقیح شده با اگروباکتریوم گزارش شده است (Omar 2013). فرآیند PTGS در گیاهان به‌عنوان سیستم ایمنی غیراختصاصی سرکوب‌کننده ویروس‌ها و به‌عنوان یک استراتژی ضد دفاعی عمل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد حداقل سه مسیر خاموشی ژن در گیاهان وجود دارد. اولین مسیر توسط RNAهای مداخله‌کننده کوتاه سی‌تی‌پولاسمی (siRNA) انجام می‌پذیرد. در سی‌تی‌پولاسم dsRNAs، توسط آنزیمی به نام Dicer (نوعی ریبونوکلاز III) به siRNA های دو رشته‌ای ۲۱-۱۸ جفت نوکلئوتیدی تبدیل می‌شود. سپس siRNA در کمپلکس پروتئینی RISC قرار می‌گیرد. این مجموعه یکی از رشته‌های siRNA به نام آنتی‌سنس و مکمل رشته mRNA را در کمپلکس حفظ کرده و رشته مشابه mRNA را از کمپلکس خارج می‌کند و پس از آن مجموعه RISC به mRNA مکمل خود در سلول متصل شده و آن را برش می‌دهد. مسیر دوم خاموشی mRNA توسط miRNA می‌باشد. در این روش miRNA ها به mRNA موردنظر متصل می‌شوند و در نتیجه mRNA برش داده می‌شود و یا از ترجمه پروتئین آن جلوگیری می‌شود. سومین مسیر خاموشی RNA در گیاهان از طریق متیله شدن DNA و سرکوب رونویسی صورت می‌گیرد (Jinek & Doudna 2009). هر سه مسیر خاموشی RNA دارای منشأ یکسانی در جانوران، قارچ‌ها و گیاهان هستند. در این بین گیاهان دارای هر سه مسیر خاموشی RNA هستند، در حالیکه سایر موجودات تنها یک یا دو مسیر خاموشی RNA را دارند (Eamens et al. 2008).

به‌منظور غلبه بر مشکل خاموشی ژن پس از رونویسی، بیان پروتئین بیگانه در سیستم بیان موقت می‌تواند در حضور سرکوب‌کننده خاموشی ژن افزایش یابد. از این رو شناسایی سرکوب‌کننده‌هایی که خاموشی ژن پس از رونویسی را متوقف می‌کنند، بسیار حائز اهمیت است. بسیاری از ویروس‌های گیاهی به‌گونه‌ای پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند که بتوانند سیستم خاموشی گیاه را سرکوب کنند. تعدادی از سرکوب‌کننده‌های خاموشی ژن از قبیل P21، P22، P14، P15، P25، HC-Pro، P1 و P19 در ویروس‌ها شناسایی شده‌اند (Burguán & Havelda 2011). ژن ویروسی که پروتئین P19 را رمز می‌کند از ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی (TBSV) (Csorba et al. 2015) جداسازی و به‌عنوان ژن مؤثر در سرکوبی سیستم خاموشی شناخته شده است (Omar 2013). پروتئین P19 یک پروتئین چندمنظوره است که به‌عنوان یک دایمر فعال هم در سیتوزول و هم در هسته قرار دارد (Park et al. 2004) و قادر به اتصال به مولکول‌های siRNA و miRNA به‌صورت غیراختصاصی می‌باشد (Dunoyer et al. 2004). از آنجایی که سطح siRNA مشتق شده از ویروس در گیاهان در پاسخ به آلودگی افزایش می‌یابد، P19 میزان siRNA دورشته‌ای آزاد را از طریق اتصال غیراختصاصی کاهش می‌دهد و پاسخ خاموشی را از طریق تداخل در اتصال siRNA به مجموعه RISC سرکوب می‌کند (Hsieh et al. 2009). نتایج مطالعه Lindbo (2007) نشان داد که به‌کمک بیان موقت و با استفاده از راه انداز 35S ویروس موزائیک کلم گل (35S CaMV)، تولید پروتئین GFP در حضور ژن سرکوب‌کننده خاموشی P19، ۱۰ تا ۲۵ برابر افزایش یافت. در مطالعه Liu & Kearney (2010) در عدم حضور P19 میزان بیان GFP ناچیز گزارش شد. P19 بیان پروتئین‌های نوترکیب مختلف از قبیل پروتئین‌های گزارشگر، آنتی بادی، پروتئین‌هایی با

هدف تولید واکسن و پروتئین‌های دارویی دیگر را با میزان‌های متفاوت ۵ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد (Wroblewsky et al. 2012; Lindbo 2007; Garabagi et al. 2005). با این حال اثر ژن P19 بر بیان فرم کوتاه شده پروتئین tPA در سطوح رونویسی و پروتئین انجام نشده است. هدف اصلی از مطالعه حاضر سرکوبی خاموشی ژن با استفاده از پروتئین P19 و افزایش پروتئین rtPA در گیاه توتون (*Nicotiana benthamiana*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از بذور توتون (*N. benthamiana*) موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. بذرهای گیاه پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد و آب، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت و خاک به نسبت ۱:۱ کشت گردیدند و در اتاق رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 24 ± 2 پرورش داده شدند.

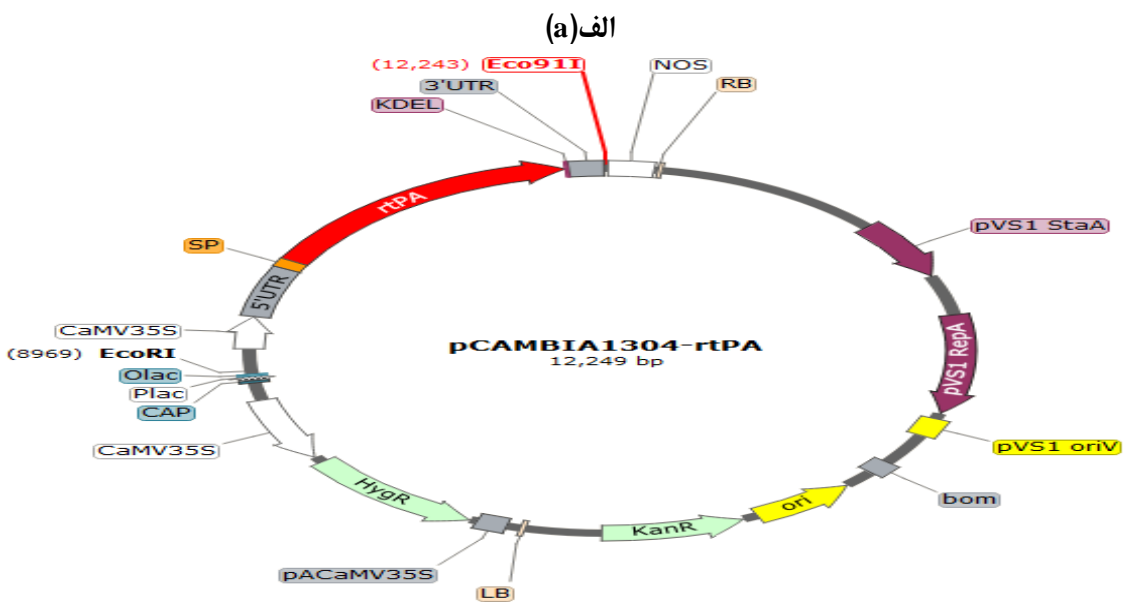
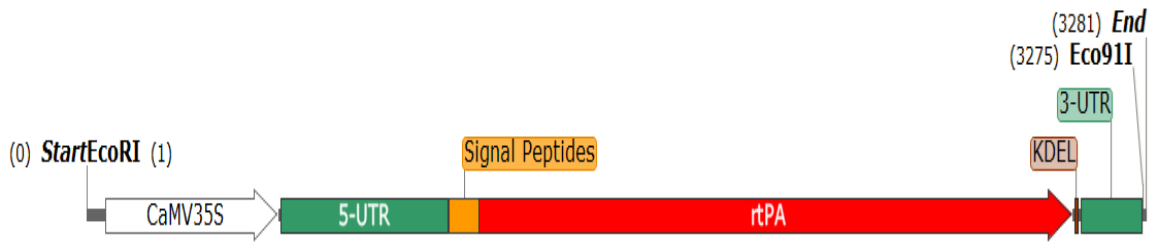
سویه‌های باکتری و ناقل‌های مورد استفاده: از باکتری *E. coli* سویه DH5 α (موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس)، *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی ناقل pCAMBIA1304 دارنده ژن P19 (اهدایی دکتر احسانی، گروه بیولوژی مولکولی، انیستیتو پاستور) استفاده گردید. در این مطالعه از ناقل‌های pMV و pCAMBIA1304 برای همسانه سازی ژن rtPA استفاده شد.

سازه ژنی rtPA: اجزای سازه ژنی شامل ناحیه راه انداز CaMV35S (به طول ۵۳۸ جفت باز)، ناحیه 5'-UTR^۱ و ۳' از Cowpea virus (به ترتیب با طول‌های ۵۱۷ و ۱۸۸ جفت باز)، توالی پپتید نشانه شبکه آندوپلاسمی (به طول ۹۰ جفت باز از ژن Pr1b گیاه توتون)، ۲' CDS ژن rtPA (به طول ۱۸۴۲ جفت باز)، توالی KDEL^۳ (به طول ۱۲ جفت باز) و جایگاه‌های برش آنزیمی بود (شکل ۱ الف). پس از تأیید قرار گرفتن اجزای سازه در کنار همدیگر، با استفاده از نرم افزار Snapgen version 4.1.9 ترجیح کدونی بر اساس گیاه توتون رقم *benthamiana* انجام شد (شکل ۱ ب)، سپس سازه ژنی rtPA به شرکت Shingene چین جهت سنتز ارسال گردید. سازه سنتز شده در ناقل pMV دریافت شد.

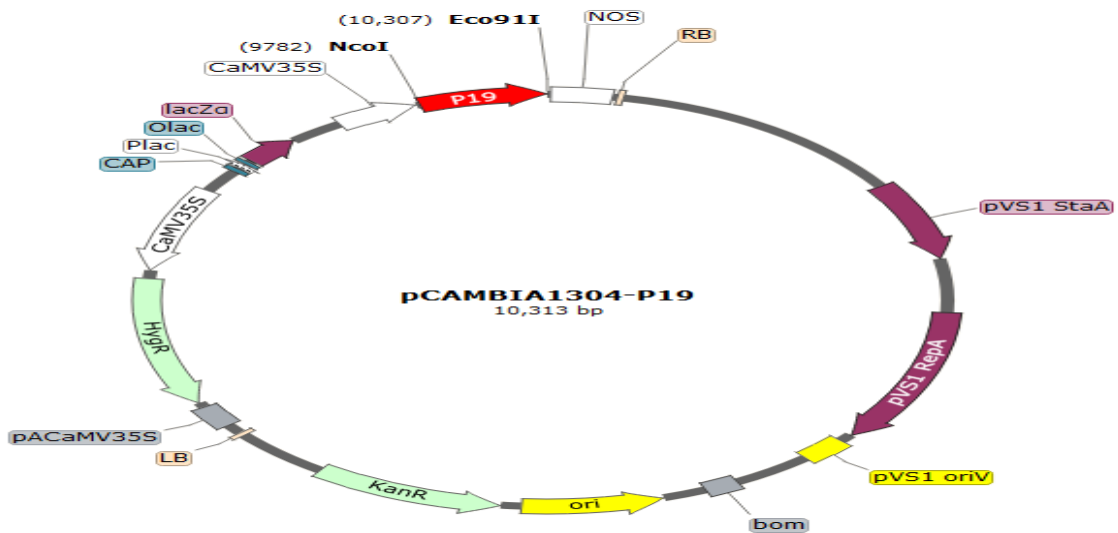
¹ Untranslated region; UTR

² Coding sequences; CDS

³ Lys-Asp-Glu-Leu aminoacids; KDEL



ب (b)



ج (c)

شکل ۱- نمایش شماتیک ناقل pCAMBIA1304 حاوی سازه ژنی rtPA و P19. الف: نقشه سازه ژنی rtPA و جایگاه‌های برش آنزیمی: CaMV35S: راه انداز CaMV35S ویروس موزائیک کلم همراه افزایش دهنده مضاعف شده نسخه برداری، 5' and 3' UTR: ناحیه 5' و 3' UTR از Cowpea virus، SP: توالی پپتید نشانه شبکه آندوپلاسمی گیاه توتون، rtPA: CDS ژن rtPA: KDEL: توالی نشانه نگهداری در شبکه آندوپلاسمی (ب) نقشه ناقل pCAMBIA1304 حاوی CDS ژن rtPA و جایگاه‌های برش آنزیمی: NOS: خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز، KanR: ژن مقاومت به کانامایسین، HygR: ژن مقاومت به هیگرومایسین، Ori: ناحیه آغاز همانندسازی ناقل pBR322، pCaMV35S: سیگنال چند آدنیل شدن CaMV35S، CAP: ناحیه اتصال پروموتور، Plac: پروموتور اپرون لاکتوز، Olac: اپرون لاکتوز (ج) نقشه ناقل pCAMBIA1304 حاوی CDS ژن P19 و جایگاه‌های برش آنزیمی.

Figure 1- Schematic overview of the vector pCAMBIA1304 containing the rtPA and p19 gene constructs. (a): map of rtPA construct with the restriction enzyme sites: CaMV35S: CaMV 35S promoter of the cabbage mosaic virus with duplicated transcriptional enhancer, 5' and 3' UTR: 5' and 3' UTR region of Cowpea virus, SP: plant codon optimized leader sequence of the endoplasmic reticulum of tobacco, rtPA: CDS of rtPA gene, KDEL: Endoplasmic reticulum retention signal, (b): map of pCAMBIA1304 vector containing the CDS of rtPA gene with the restriction enzyme sites: NOS: nopaline synthase gene terminator, KanR: kanamycin resistance gene, HygR: hygromycin resistance gene, Ori: pBR322 origin of replication, pCaMV35S: CaMV 3'UTR (polyA signal), Plac: lacZ promoter, Olac: operon of lactose; (c): map of pCAMBIA1304 vector containing the CDS of P19 gene with the restriction enzyme sites.

آغازگرهای مورد استفاده: آغازگرهای مناسب ژن rtPA با توجه به توالی‌های کناری و داخلی ژن rtPA با استفاده از

نرم‌افزار Oligo7 طراحی گردیدند. مشخصات آغازگرها به همراه آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان نسبی ژن‌های rtPA و P19 و GAPDH در جدول ۱ ارائه شده است.

همسانه‌سازی سازه ژنی rtPA در ناقل بیانی: ناقل pMV حاوی سازه ژنی rtPA، با روش استاندارد ذوب و

انجماد (Sambrook & Russell 2001) به باکتری E. coli سویه DH5 α انتقال یافت. ناقل‌های حاصله پس از استخراج، با دو آنزیم برشی EcoRI و Eco91I تعبیه‌شده در دو انتهای سازه ژنی rtPA، برش داده شدند و پس از برش ناقل بیانی pCAMBIA1304 با همین آنزیم‌ها، طی یک واکنش اتصال، سازه ژنی rtPA توسط آنزیم لیگاز T4 در ناقل pCAMBIA1304 درج شد و ناقل pCAMBIA1304-rtPA حاصل شد. محصول اتصال به باکتری E. coli سویه DH5 α که با استفاده از کلرید کلسیم به صورت مستعد درآمده بود، انتقال داده شد (Sambrook & Russel 2001). کلون‌های تراریخت باکتریایی در محیط LB^۱ انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ mg/ml) شناسایی و انتخاب گردیدند. صحت همسانه‌سازی با استفاده از واکنش برش آنزیمی، PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن rtPA و همچنین هم‌ردیفی نتایج

¹ Luria-Bertani; LB

توالی‌یابی با توالی سازه ژنی rtPA با استفاده از نرم افزار آنالین ClustalW قابل دسترس از <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> تأیید گردید.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Colony PCR و بیان نسبی ژن‌های rtPA P19 و GAPDH

Table 1- Primers used in Colony PCR assay and relative expression of rtPA, P19 and GAPDH genes

نوع آزمون Test Name	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز) Amplicon Size (bp)	دمای ذوب (°C) Tm (°C)	طول آغازگر (باز) Primer Length (base)	توالی (5' → 3') Sequence (5' → 3')	نام آغازگر Primer Name		
تأیید درج ژن در ناقل بیانی	1724	53.5	47.6	21	CAGGAAACAGCTATGACCATG	آغازگر رفت Forward Primer	PCAMF
		57.3	50	20	TCTTGAGCGCACCTAGAAGA	آغازگر برگشت Reverse Primer	
آزمون Real Time PCR	215	57.3	50	20	TGCTGGATTCTTTCTGCTGC	آغازگر رفت Forward Primer	K2SF
		57.3	50	20	TCTTGAGCGCACCTAGAAGA	آغازگر برگشت Reverse Primer	
آزمون Real Time PCR	181	59.5	43.5	23	TCGTTCAAGTCTCCAAGAAGACA	آغازگر رفت Forward Primer	GAPDHF
		59.1	41.7	24	TCATCTCCCATGACCATAGTAAGT	آغازگر برگشت Reverse Primer	
آزمون Real Time PCR	166	58.6	41.7	24	ACCAGATCGGATGTACCTATAGTA	آغازگر رفت Forward Primer	P19F
		58.5	41.7	24	GGGCATCCTCTTGATACACTT	آغازگر برگشت Reverse Primer	

ترازیختی **اگروباکتریوم**: انتقال ناقل pCAMBIA1304-rtPA به باکتری *A. tumefaciens* با روش استاندارد

ذوب و انجماد (Sambrook & Russell, 2001) صورت گرفت. سلول‌های ترازیخت حاوی سازه ژنی در محیط کشت LB

حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ mg/ml)، ریفامپیسین (۱۰۰ mg/ml) و هیگرومایسین (۵۰ mg/ml) در دمای 28°C کشت و با استفاده از آزمون‌های Colony PCR و آغازگرهای اختصاصی تأیید شد. از اگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA1304 به‌عنوان شاهد منفی در واکنش PCR استفاده شد.

انتقال اگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA1304-rtPA به گیاه توتون: اگروباکتریوم حاوی ناقل

pCAMBIA1304-rtPA در محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ریفامپیسین و هیگرومایسین در دمای 28°C به مدت ۱۸ ساعت کشت شد. سپس کشت‌ها با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب 5000 g رسوب داده شدند و در محیط تلقیح (استوسرینگون $200\ \mu\text{M}$)، بافر MES ($10\ \text{mM}$)، گلوکز (۵٪ درصد) و MgCl_2 ($10\ \text{mM}$) تا رسیدن به $0.6\ \text{OD}_{600}$ رقیق شدند. به‌منظور بررسی اثر سرکوبی خاموشی ژن، قبل از تزریق به گیاه، میزان و رقت یکسان ($0.6\ \text{OD}_{600}$) از اگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA1304-rtPA و ناقل pCAMBIA1304-P19 (Zangi et al. 2016) با یکدیگر مخلوط شدند و تیمار rtPA-P19 آماده آزمون گردید. در این آزمون از اگروباکتریوم حاوی ناقل فاقد ژن rtPA به‌عنوان شاهد (C) و از اگروباکتریوم حاوی تنها سازه ژنی rtPA به‌عنوان تیمار rtPA در نظر گرفته شد. تمام برگ‌های گیاهان (N. benthamiana) در مرحله ۶ برگی توسط سرنگ بدون سوزن تزریق شدند. بعد از تلقیح، گیاهان در اتاق رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ نگهداری شد.

بیان ژن rtPA در سطح RNA: به‌منظور بررسی و ارزیابی اثر بیان ژن P19 بر بیان ژن rtPA در سطح RNA،

آزمون Real Time PCR انجام شد. بدین منظور استخراج RNA از برگ‌های تلقیح شده، با استفاده از روش RNXplus (شرکت سیناژن) انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ (EPOCH, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت پارس طوس انجام شد. برای حذف آلودگی‌های DNA، RNA استخراج شده به مدت ۳۰ min در دمای 37°C تحت تأثیر آنزیم DNaseI (شرکت Fermentas) قرار گرفت. جهت غیرفعال نمودن آنزیم DNaseI در واکنش ساخت cDNA، $50\ \text{mM}$ EDTA به هر نمونه اضافه و به مدت ۱۰ min در دمای 65°C نگهداری شد. سپس $0.5\ \text{mM}$ Random Hexamer به هر کدام از نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ min در دمای اتصال 65°C قرار داده شد. اجزای واکنش ساخت cDNA، شامل بافر RT (X5)، آنزیم RT ($10\ \mu\text{u}, \mu\text{l}^{-1}$) و dNTP ($10\ \text{mM}$) به ویال‌ها اضافه شده و به ترتیب در زمان و دمای: ۱۰ min در 47°C و ۱۰ min در 70°C قرار گرفت. سطوح بیان ژن‌های rtPA و P19 با qRT-PCR و به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD USA) اندازه‌گیری شد. واکنش‌ها در حجم $10\ \mu\text{l}$ شامل $5\ \mu\text{l}$ Sybrgreen، $5\ \mu\text{l}$ nuclease free cDNA، $3/25\ \mu\text{l}$ GAPDH به‌عنوان ژن شاهد داخلی استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار $0.75\ \mu\text{l}$ ($50\ \text{ng}, \mu\text{l}^{-1}$)، آغازگر $0.5\ \mu\text{l}$ بود. از ژن GAPDH به‌عنوان ژن شاهد داخلی استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار

¹ 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; MES

زیستی و تکنیکی بررسی شد. میزان بیان نسبت به ژن GAPDH که به عنوان ژن حفاظت شده خانه دار^۱ انتخاب شده بود، نرمال شد. داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن برحسب سیکل آستانه (Ct)^۲، سیکلی که شدت فلورسنت به خط آستانه می‌رسد، به دست آمد (Pfaffl 2001). مقدار استاندارد شده این نسبت با استفاده از روش $2^{-\Delta Ct}$ برای نمونه‌ها محاسبه شد (Livak & Schmittgen 2001). تعیین efficiency واکنش Real Time PCR با غلظت‌های مختلف cDNA انجام شد و شیب منحنی استاندارد که بیانگر کارایی آغازگرها بود به دست آمد. در این آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی در ترکیبات استفاده شده در واکنش از شاهد منفی (گیاهان تلقیح شده با pCAMBIA1304) استفاده شد.

بیان ژن rtPA در سطح پروتئین: به منظور بررسی و ارزیابی اثر بیان ژن P19 بر بیان ژن rtPA در سطح پروتئین،

از آزمون الایزا (ELISA)^۳ استفاده گردید. بدین منظور $22 \mu\text{g}$ از پروتئین استخراج شده از برگ‌های گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده (شاهد منفی) بر اساس روش Guy و همکاران در این آزمون مورد استفاده قرار گرفت (Guy et al., 1992). آزمون الایزا به روش غیرمستقیم (Engvall & Perlmann 1971) با استفاده از آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال tPA تولید شده در موش (تولید شده توسط نویسنده و همکاران) و آنتی‌بادی ثانویه Goat anti Rabbit IgGHRP conjugate (USA, SC2030) صورت گرفت. میزان جذب نوری در 450 نانومتر توسط دستگاه ELISA-Reader (BioTek, USA) و در سه تکرار اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های tPA تجاری (Alteplase) برای کمی‌سازی پروتئین tPA مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از معادله رگرسیون میزان جذب به میزان پروتئین rtPA بر حسب $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ تبدیل گردید. سپس میزان محلول پروتئین کل (بر حسب μl) به ازای $22 \mu\text{g}$ مشخص شد. سپس میزان پروتئین rtPA (بر حسب $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) بدست آمده در مرحله قبل در میزان محلول پروتئین کل (بر حسب μl) ضرب شد و میزان پروتئین rtPA بر حسب $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ محاسبه شد. میزان بیان ژن rtPA در سطح پروتئین بر حسب درصد نیز از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{میزان پروتئین rtPA}}{\text{میزان پروتئین کل}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای مورد

مطالعه شامل دو فاکتور نوع سازه تلقیح شده (در دو سطح rtPA همراه با P19 و rtPA بدون P19) و زمان برداشت برگ (۴، ۷ و ۱۰ روز بعد از تلقیح با آگروباکتریوم)، بود. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SAS version 9.1 انجام و قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD^۴ و در سطح $P < 0.01$ انجام شد.

¹ Housekeeping gene

² Cycle threshold (C_t)

³ Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA

⁴ Least significant difference; LSD

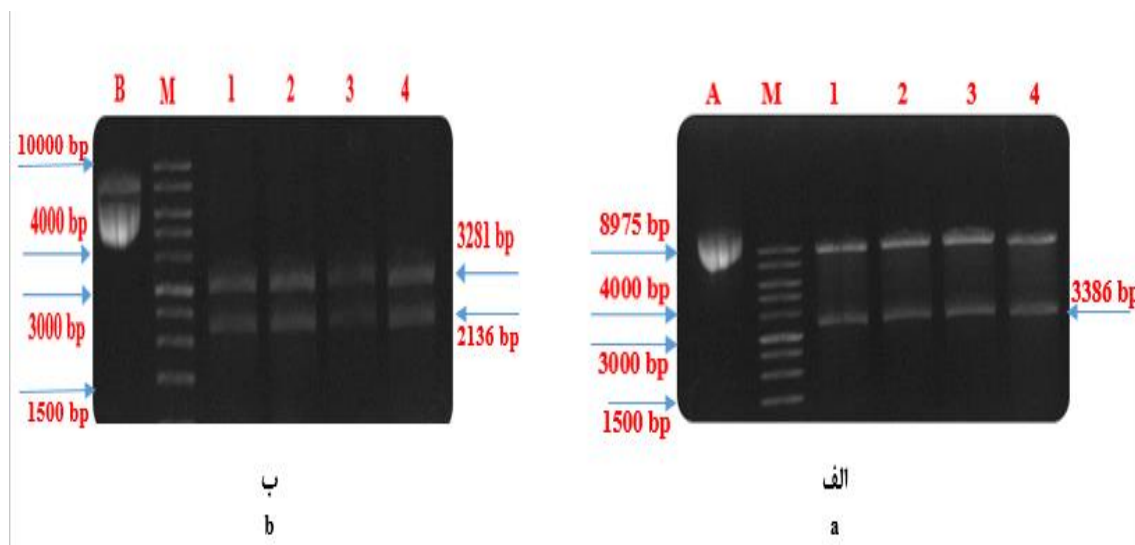
نتایج و بحث

به منظور ساخت ناقل pCAMBIA1304-rtPA، واکنش اتصال بین محصول حاصل از برش آنزیمی (آنزیم‌های EcoRI و Eco9II) ناقل‌های pMV-rtPA (شکل ۲ الف) و pCAMBIA1304 (شکل ۲ ب) انجام شد. درج سازه ژنی rtPA در ناقل بیانی pCAMBIA1304 به کمک آزمون Colony PCR مورد تأیید قرار گرفت. تکثیر قطعه مورد انتظار به طول ۱۷۲۴ جفت باز در کلونی‌های رشد یافته، مبین درج صحیح ژن در ناقل بیانی بود (شکل ۳ الف). همچنین جهت تأیید وجود pCAMBIA1304-rtPA در کلون‌های رشد یافته در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، استخراج ناقل صورت گرفت و با آنزیم‌های EcoRI و Eco9II مورد برش آنزیمی قرار گرفت. محصول حاصل از برش آنزیمی، با ایجاد قطعه‌ای به طول ۳۲۸۱ جفت باز، وجود سازه ژنی rtPA در ناقل pCAMBIA1304 را تأیید نمود (شکل ۳ ب). ناقل‌های مورد تأیید جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogen ارسال گردید. نتایج درج صحیح سازه ژنی rtPA را در ناقل pCAMBIA1304 تأیید نمود (شکل ۴). در نهایت، ناقل pCAMBIA1304-rtPA به آگروباکتریوم انتقال یافت و حضور ناقل pCAMBIA1304-rtPA در کلونی‌های مثبت از طریق آزمون Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تأیید شد (شکل ۵). تکثیر قطعه ژنی ۱۷۲۴ جفت بازی حاکی از انتقال موفق ناقل pCAMBIA1304-rtPA به آگروباکتریوم بود (شکل ۵).

بیان ژن rtPA و P19 در سطح رونویسی: نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها

به صورت اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی از جمله دایمر آغازگرها انجام شده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع سازه تلقیح شده \times زمان برداشت برگ‌های تلقیح شده بر میزان بیان ژن rtPA دارای اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد بود (جدول ۲).

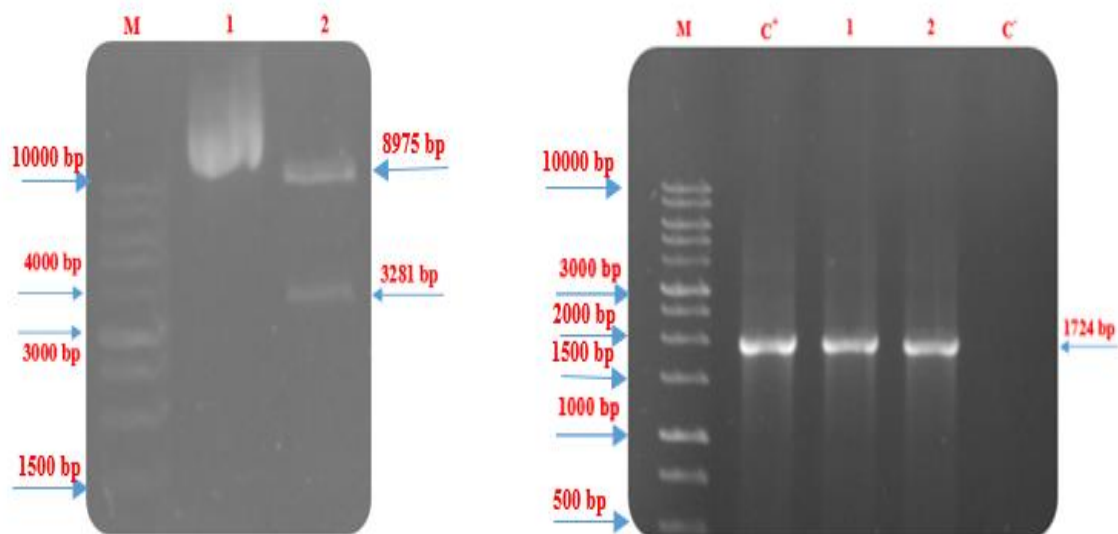
مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نشان داد که بیشترین بیان نسبی ژن rtPA (۰/۸۱) در حضور ژن P19، ۴ روز پس از تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم و کمترین بیان نسبی ژن rtPA (۰/۲۲) در عدم حضور ژن P19، ۱۰ روز پس از تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم حاصل شد (شکل ۶). با افزایش روزهای پس از تلقیح میزان بیان ژن هدف احتمالاً بدلیل فعال شدن سیستم ایمنی گیاه و همچنین افزایش سن گیاه کم شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در حضور ژن P19 میزان بیان نسبی ژن rtPA در ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از تلقیح گیاهان با آگروباکتریوم به ترتیب ۳۴، ۶۴، ۹۴ درصد نسبت به زمانی که تنها از آگروباکتریوم حاوی pCAMBIA1304-rtPA جهت تلقیح استفاده شد، افزایش یافت (شکل ۶). اثر بیان ژن P19 بر بیان نسبی ژن rtPA افزایشی بود بطوریکه در همه روزهای مورد مطالعه افزایش معنی‌داری در بیان نسبی ژن rtPA مشاهده شد.



شکل ۲- برش آنزیمی الف) ناقل pCAMBIA1304 با آنزیم‌های EcoRI و Eco91I: A: ناقل pCAMBIA1304 برش داده نشده، ۱-۴: ناقل pCAMBIA1304 برش داده شده، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Ampliqon و ب) ناقل pMV-rtPA با آنزیم‌های EcoRI و Eco91I: B: ناقل pMV-rtPA برش داده نشده، ۱-۴: ناقل pMV-rtPA برش داده شده، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Ampliqon.

Figure 2- Digestion of a) the pCAMBIA1304 vector with EcoRI and Eco91I enzymes: A: The undigested pCAMBIA1304vector, 1-4: Product of enzymatic digestion reaction, M: 1kb standard GeneRuler (Ampliqon) Ladder and 2) B: the pMV vector with EcoRI and Eco91I enzymes: A: The undigested pMV vector, 1-4: Product of enzymatic digestion reaction, M: 1kb standard GeneRuler (Ampliqon) Ladder.

جهت بررسی بیشتر، بیان نسبی ژن P19 نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین بیان نسبی ژن P19 در ۴ روز پس از تلقیح گیاه با آگروباکتریوم با میانگین ۰/۵۸ حاصل شد. همچنین بیان نسبی ژن P19 با گذشت ۷ و ۱۰ از تلقیح گیاه با آگروباکتریوم به ترتیب به میزان ۴۴ و ۴۹ درصد نسبت به ۴ روز پس از تلقیح به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.01$) (شکل ۷). نتایج نمودارهای ۶ و ۷ حاکی از روند یکسان و مشابه در میزان بیان ژن های rtPA و P19 بود. همچنین همبستگی مثبت و برابر با ۰/۶۱ بین بیان نسبی ژن P19 و بیان نسبی ژن rtPA مشاهده شد.



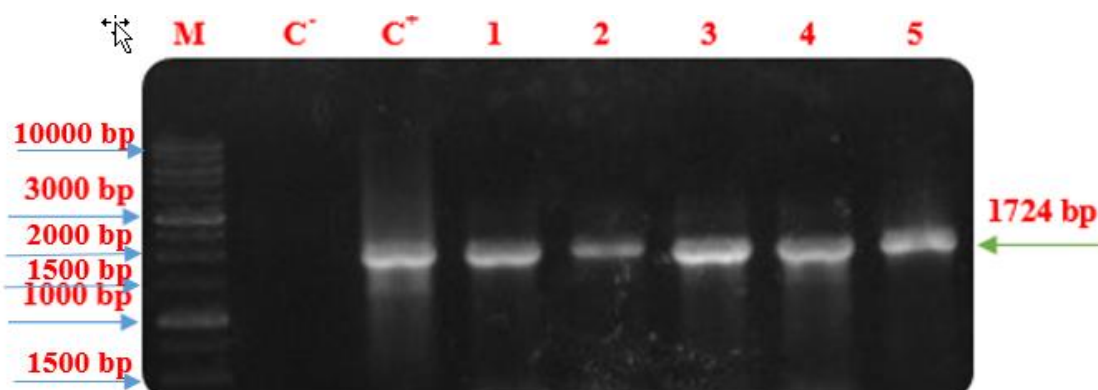
شکل ۳- تأیید درج صحیح سازه ژنی rtPA در ناقل pCambia1304 (الف) Colony PCR با استفاده از آغازگرهای PCAMF و K2SR. C⁻: شاهد منفی، C⁺: شاهد مثبت (ناقل pMV)، ۲-۱: کلونی‌های رشد کرده روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Ampliqon و (ب) برش آنزیمی ناقل pCambia1304-rtPA. ۱: ناقل برش داده نشده و ۲: برش با آنزیم‌های EcoRI و Eco91I. M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Ampliqon.

Figure 3- Verification of the correct insertion of the rtPA construct into the pCambia1304 (a) Colony PCR vector using PCAMF and K2SR primers. C⁻: negative control, C⁺: positive control (pMV vector), 2-1: colonies grown on LB medium containing kanamycin antibiotic, M: 1kb standard GeneRuler (Ampliqon) Ladder, and (b) Digestion of pCambia1304-rtPA vector, 1: The undigested pCambia1304 vector and 2: Product of enzymatic digestion reaction, M: 1kb standard GeneRuler (Ampliqon) Ladder.

pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	CTTCTGTTGTTAGAACCCTTTGCCTTCCTCCTGCTGATCTTCAACTTCTCGATTGGACCG CTTCTGTTGTTAGAACCCTTTGCCTTCCTCCTGCTGATCTTCAACTTCTCGATTGGACCG	255 1920
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	AATGCGAACCTTCTGGTTATGGTAAGCATGAAGCTCTTTCCTTTTATTCTGAAAGAC AATGCGAACCTTCTGGTTATGGTAAGCATGAAGCTCTTTCCTTTTATTCTGAAAGAC	315 1980
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	TTAAGGAAGCTCATGTTAGACTTTATCCTTCTTCTAGGTGCACCTCTCAACATCTTCTTA TTAAGGAAGCTCATGTTAGACTTTATCCTTCTTCTAGGTGCACCTCTCAACATCTTCTTA	375 2040
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	ATAGAACCCTTACCATAAATATGCTTTGCGCTGGTGATACTAGATCAGGTGGTCCCTCAAG ATAGAACCCTTACCATAAATATGCTTTGCGCTGGTGATACTAGATCAGGTGGTCCCTCAAG	435 2100
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	CTAATCTTCATGATGCTTGGCAAGGTGATTCGGTGGTCCCTTGTGTTGCCCTAATGATG CTAATCTTCATGATGCTTGGCAAGGTGATTCGGTGGTCCCTTGTGTTGCCCTAATGATG	495 2160
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	GTAGAATGACCCCTTGTGGTATTATTCTTGGGGTCTTGGTTGCGGTCAAAGGATGTTTC GTAGAATGACCCCTTGTGGTATTATTCTTGGGGTCTTGGTTGCGGTCAAAGGATGTTTC	555 2220
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	CTGGTGTATACCAAAGTTACTAATATCTTGATTGGATTAGAGATAAATAGAGACCTC CTGGTGTATACCAAAGTTACTAATATCTTGATTGGATTAGAGATAAATAGAGACCTC	615 2280
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	TGCAGGAAAATCTTTATTTTCAACATCATCATCATCATAGATCTGGTGGTGGTCTCG TGCAGGAAAATCTTTATTTTCAACATCATCATCATCATAGATCTGGTGGTGGTCTCG	675 2340
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	GTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTCCTAGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTCCTAGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT	735 2400
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	TTGGTGTTCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TTGGTGTTCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT	795 2460
pCAMBIA1304-rPA. K2SF Construct	TTGGTGTTCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TTGGTGTTCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT	855 2520

شکل ۴- همردیفی نتایج توالی یابی با توالی سازه ژنی rtPA با استفاده از نرم افزار آنالین ClustalW.

Figure 4- Alignment of sequencing results with the sequences of the rtPA construct using ClustalW online software.



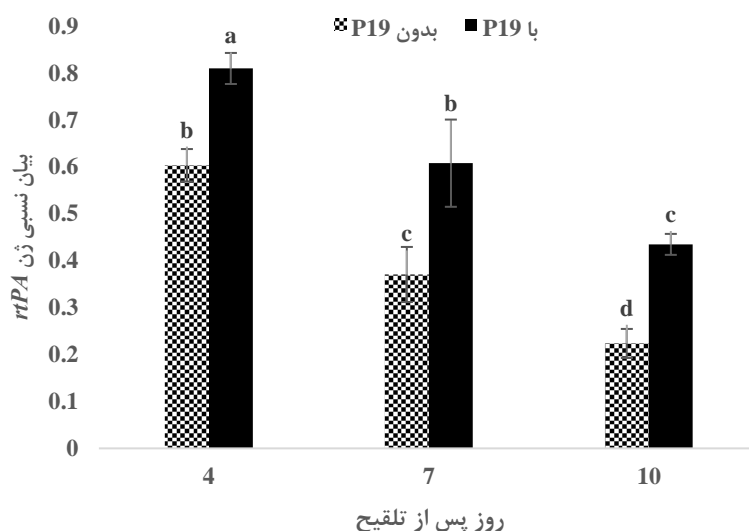
شکل ۵- آزمون Colony PCR کلونی‌های آگروباکتریوم رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک‌های کانامایسین، ریفامپیسین و هیگرومایسین با آغازگرهای اختصاصی PCAMF و K2SR روی ژل آگارز ۱ درصد. C⁻: شاهد منفی، C⁺: شاهد مثبت (ناقل pCAMBIA1304-rtPA)، ۱-۵: کلونی‌های رشد کرده، M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb شرکت Ampliqon.

Figure 5- Colony PCR assay of agrobacterium colonies grown on medium containing kanamycin, rifampicin and hygromycin antibiotics with specific primers of PCAMF and K2SR on 1% agarose gel. C⁻: negative control, C⁺: positive control (pCAMBIA1304-rtPA vector), 1-5: Grown colonies, M: 1kb standard GeneRuler (Ampliqon) Ladder.

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن rtPA در سطح رونویسی و ترجمه

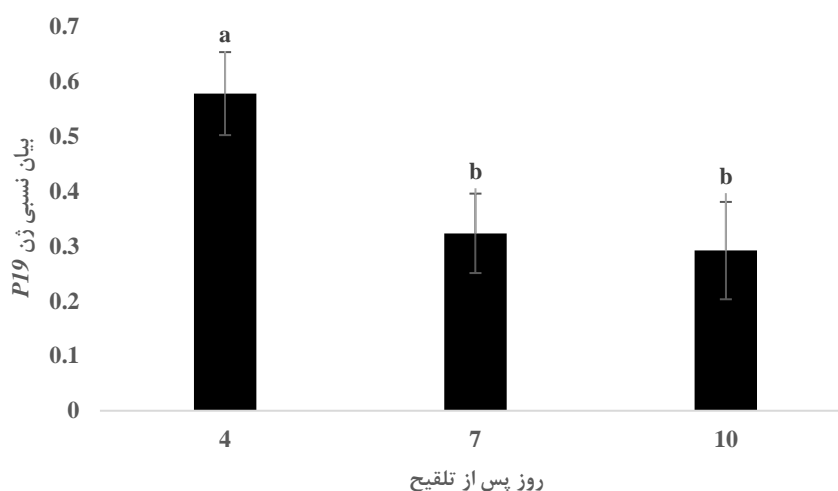
Table 2 - Analysis of expression variance of rtPA gene at the level of transcription and translation

M.S. میانگین مربعات		درجه آزادی df	S.O.V. منابع تغییرات
بیان پروتئین rtPA rtPA protein expression	بیان ژن rtPA rtPA gene expression		
233.69**	0.285*	2	روز پس از تلقیح day post-inoculation
367.07**	0.354*	1	نوع سازه انتقالی gene construct
258/38**	0.305*	2	روز پس از تلقیح × نوع سازه انتقالی gene construct × day post-inoculation
47.85	0.07	12	خطای آزمایشی error



شکل ۶- بیان نسبی ژن rtPA در روزهای مختلف پس از تلقیح با آگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA1304-rtPA در گیاه توتون (*N. benthamiana*) در حضور و عدم حضور ژن P19.

Figure 6- Relative expression of rtPA gene at day post-inoculation with agrobacterium containing pCAMBIA1304-rtPA vector in tobacco (*N. benthamiana*) in the presence and absence of p19 gene.



شکل ۷- بیان نسبی ژن P19 در روزهای مختلف پس از تلقیح با اگروباکتریوم حاوی pCAMBIA1304-rtPA و pCAMBIA1304-P19 در گیاه توتون (*N. benthamiana*).

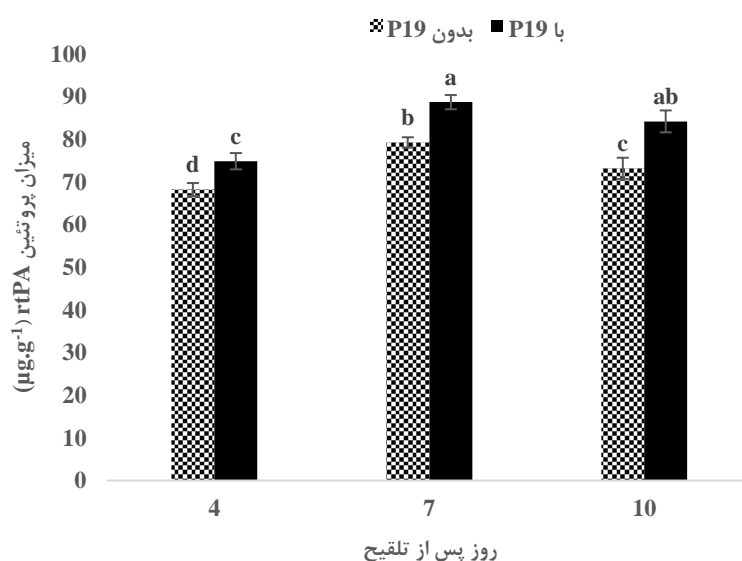
Figure 7- Relative expression of p19 gene at day post-inoculation with agrobacterium containing pCAMBIA1304-rtPA and pCAMBIA1304-P19 in tobacco (*N. benthamiana*).

نتایج نشان داد که بیان موقت ژن P19، سبب افزایش رونویسی ژن rtPA شد. بر اساس مطالعات انجام شده، مشخص شده است که PTGS، بیان موقت ژن به کمک اگروباکتریوم را محدود می‌کند. در عدم حضور ژن P19، mRNA های ژن تراریخت که به میزان زیادی بیان می‌شوند، احتمالاً برای تخریب توسط سیستم خاموشی ژن در گیاه هدف قرار داده خواهند شد (Thomas & Walmsley 2014). پروتئین P19، به عنوان یک پروتئین سرکوب کننده قوی، مکانیسم منحصر به فردی دارد بطوریکه به صورت انتخابی به siRNA های ۲۱ و ۲۲ نوکلئوتیدی متصل می‌شود که این اتصال می‌تواند به صورت اختصاصی و یا غیر اختصاصی باشد (Arzola et al. 2011). با توجه به میل ترکیبی زیادی که پروتئین P19 با siRNA دو رشته‌ای دارد به آن متصل می‌گردد و آن را تجزیه می‌کند و مانع خاموشی ژن می‌گردد (Burgyan & Havelda 2011). همچنین مطالعات نشان داده است که در زمان اتصال پروتئین P19 با siRNA یا miRNA دو رشته‌ای، P19 باعث ایجاد دایمر پروتئینی می‌شود که در قسمت انتهایی خود به انتهای siRNA یا miRNA دو رشته‌ای متصل می‌گردد (Alvarez et al. 2008) و بدین ترتیب مانع از تشکیل ساختار دو رشته‌ای siRNA یا miRNA با mRNA ژن rtPA می‌گردد و باعث سرکوب مسیر خاموشی محسوب می‌شود (Burgyan & Havelda 2011). همچنین، پروتئین P19 قادر به اتصال به siRNA دو رشته‌ای بوده و از تشکیل کمپلکس RISC جلوگیری می‌کند. مشخص شده است که پروتئین P19 مانع گسترش و پخش دوپلکس siRNA به عنوان

سیگنال خاموشی می‌گردد (Dunoyer et al. 2004). با توجه به انواع مکانیسم عمل سرکوب‌کنندگی خاموشی توسط P19، دلیل افزایش میزان رونویسی ژن rtPA در این مطالعه نیز می‌تواند همین امر باشد.

بیان پروتئین rtPA در گیاه توتون: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از وجود اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.01$) در اثر متقابل نوع سازه ژنی تلقیح شده \times زمان برداشت برگ گیاهان تلقیح شده بر میزان پروتئین rtPA بود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان پروتئین rtPA در حضور ژن P19 به‌عنوان یک سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در ۷ ($89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) و ۱۰ ($84 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) روز پس از تلقیح بود (شکل ۸). کمترین میزان پروتئین rtPA ($68 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) در عدم حضور ژن P19، ۴ روز پس از تلقیح گیاهان با اگروباکتریوم حاصل شد (شکل ۸). نتایج حاکی از مؤثر بودن سرکوب‌کننده خاموشی ژن P19 در افزایش میزان پروتئین rtPA در گیاه توتون (*N. benthamiana*) بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در حضور ژن P19 میزان پروتئین rtPA در ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از تلقیح گیاهان با اگروباکتریوم به ترتیب ۹، ۱۲، ۱۵ درصد نسبت به زمانی که تنها از اگروباکتریوم حاوی pCAMBIA1304-rtPA جهت تلقیح استفاده شد، افزایش یافت (شکل ۸). میزان بیان rtPA در توتون در مطالعات Hahn و همکاران (2009) حدود $0.014 \pm$ درصد میزان کل پروتئین محلول و Masoumi Asl و همکاران (2010) $0.026/0.1 - 0.001$ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن تر برگ در انتقال ژن به هسته بود.



شکل ۸- میزان بیان پروتئین rtPA در روزهای مختلف پس از تلقیح با اگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA1304-rtPA در گیاه توتون (*N. benthamiana*) در حضور و عدم حضور ژن P19.

Figure 8- Expression of rtPA protein at day post-inoculation with agrobacterium containing pCAMBIA1304-rtPA vector in tobacco (*N. benthamiana*) in the presence and absence of P19 gene.

نتایج نشان داد که بیشترین میزان رونویسی در روز چهارم بدست آمد، در حالی که در روز چهارم کمترین میزان پروتئین بدست آمد. علت این امر احتمالا می تواند به دلیل این باشد که در روز چهارم هنوز سیستم خاموشی گیاه در جهت سرکوب بیان ژن rtPA فعال نشده است، بنابراین میزان رونویسی از ژن rtPA افزایش یافت، اما با فعال شدن سیستم خاموشی میزان رونویسی از ژن rtPA در روزهای ۷ و ۱۰ کاهش یافت. دلیل دیگر کاهش میزان رونویسی در روزهای ۷ و ۱۰ احتمالا افزایش سن گیاه باشد. با توجه به اینکه طراحی سازه ژنی بر پایه پایداری RNA انجام شد، انتظار می رفت میزان پایداری RNA افزایش یابد تا میزان پروتئین بیشتری حاصل گردد. این امر به وضوح در نتایج مطالعه مشاهده شد. به طوری که با افزایش میزان پایداری RNA ژن rtPA، میزان بیان ژن در سطح رونویسی در روزهای اول افزایش یافت. از سوی دیگر بدلیل سرعت کمتر ترجمه نسبت به رونویسی انتظار می رفت میزان پروتئین در روز ۴ نسبت به روزهای ۷ و ۱۰ کمتر باشد، که این مورد نیز در نتایج مشاهده شد.

با مقایسه میزان بیان پروتئین rtPA می توان به نقش مؤثر پروتئین P19 در خاموشی ژن و افزایش میزان بیان پی برد. از طرفی با توجه به میزان بیان بیشتر پروتئین تولیدی در بیان موقت در حضور و عدم حضور P19 نسبت به مطالعات قبلی می توان دریافت که احتمالا این سیستم بیانی برای تولید پروتئین rtPA مفید می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روز هفتم و دهم پس از تلقیح می تواند معیار مناسبی برای رسیدن به حداکثر پروتئین rtPA باشد. بنابراین اگر در هر گرم وزن تر گیاه، میزان ۸۸ میکروگرم پروتئین rtPA (۱۵/۷۵ درصد) بیان گردد با در نظر گرفتن رشد مناسب و تعداد برگ های قابل تزریق مناسب، می توان در مدت زمان یک هفته با افزایش تعداد گیاهان دارای برگ های قابل تزریق، با توجه به ویژگی تکرارپذیری بیان موقت، به میزان مورد نیاز از پروتئین rtPA دست پیدا کرد. با توجه به معایب روش انتقال پایدار از قبیل پایین بودن میزان تولید پروتئین نوترکیب، بالا بودن مدت زمان تولید (حدود شش ماه تا یک سال) و عدم تکرارپذیری انتقال پایدار، پیش بینی می شود که بیان موقت بتواند به راحتی به عنوان یک سیستم بیان سریع و مقرون به صرفه برای تولید پروتئین های نوترکیب در تعداد زیادی از گیاهان به کار برده شود. یکی دیگر از راهکارها برای افزایش بازده تولید، در کنار استفاده از بیان موقت برای سطح بالاتر بیان و استفاده از سازه سرکوب کننده P19 (حاوی ژن سرکوب کننده خاموشی)، هدف قرار دادن پروتئین هدف به سمت شبکه آندوپلاسمی و دیگر اجزای سلول به منظور نگهداری و محافظت است (Voinnet et al. 2003). در مطالعه حاضر از یک نوع ناقل برای بررسی بیان پروتئین هدف استفاده شد تا هیچ گونه تفاوتی از نظر محل نگهداری محصول نهایی وجود نداشته باشد تا بتوان تفاوت بیان را به استفاده از سازه سرکوب کننده P19 (حاوی ژن سرکوب کننده خاموشی) مرتبط دانست. سرکوب کننده P19 به صورت موفقیت آمیزی در سنجش بیان موقت برای افزایش عملکرد چندین پروتئین نوترکیب در جنس *Nicotiana glauca* به کار برده شده است. در N. benthamiana چندین گزارش از افزایش میزان بیان وجود دارد. در مطالعه Voinnet و همکاران (2003) کاربرد P19 سبب افزایش ۵۰ برابر و حتی بیشتر میزان بیان پروتئین GFP گردید (Voinnet et al. 2003). در مطالعه Liu & Kearney (2010) افزایش سطح بیان پروتئین GFP را در حضور ژن سرکوب کننده خاموشی P19 تحت کنترل راه انداز 35S، ۲۵ درصد

میزان کل پروتئین محلول را گزارش نمودند، درحالی که در عدم حضور این سرکوب کننده میزان بیان تقریباً ناچیز بود (Liu & Kearney 2010). در مطالعه Garabagi و همکاران (2012) افزایش ۱۵ برابری میزان بیان پروتئین نوترکیب در حضور ژن سرکوب کننده خاموشی P19 را گزارش شد (Garabagi et al. 2012). تزریق همزمان P19 و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (hEGF) در مطالعه Thomas & Walmsley (2014) سبب گردید که میزان بیان پروتئین سه برابر افزایش یابد (Thomas & Walmsley 2014).

مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از TBSV-P19 باعث افزایش سطح بیان پروتئین‌های مختلف در *N. benthamiana* تا ۵۰ برابر شده است (Saxena et al. 2011). نتایج نشان داده که برگ‌های تلقیح شده با PVX-rhNGF و TBSV-P19 به صورت همزمان عملکرد بالاتر (میانگین ارزش ۸٪ TSP) داشتند. مطابق با تحقیق حاضر، مطالعات قبلی همچنین تأثیر این سرکوبگر خاموشی در بیان ژن‌های خارجی را نشان داد. در مطالعه Lombardi و همکاران (2009) افزایش سه برابری سطح بیان فاکتور تنظیمی منفی (Nef) در مقایسه با گیاهان بدون P19 را گزارش نمودند. همچنین، Voinnet و همکاران (2003) نشان دادند که بیان موقت سرکوبگرهای ویروسی PTGS، پاسخ خاموش کننده میزان را در *N. benthamiana* کاهش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که مؤثرترین سرکوبگر پروتئین P19 بود که از TBSV به دست آمده است. این پروتئین به طور قابل توجهی بیان موقت طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها را افزایش داد، در چندین مورد، بازده بیش از ۵۰ برابر بود (Voinnet et al., 2003). علاوه بر این، در مطالعه انجام شده توسط Boivin و همکاران (2010)، نشان داده شده است که در فرآیند بیان موقت با واسطه آگروباکتریوم در کشت سوسپانسیون، با استفاده از سرکوبگر ویروسی مانند P19 در ترکیب با یک ناقل بیانی، تولید پروتئین نوترکیب را ۲ برابر در مقایسه با زمانی که P19 استفاده نشد، افزایش داد (Boivin et al. 2010). با توجه به نتایج حاصل، انتظار می‌رود که استفاده از P19 به عنوان افزایش دهنده میزان بیان برای تولید صنعتی پروتئین‌های نوترکیب، در کنار تحقیق به منظور جداسازی و بررسی بیوشیمیایی پروتئین‌ها، بدون نیاز به استفاده از روش‌های باززایی زمان‌بر مربوط به تولید گیاهان تراریخت پایدار به کار رود.

نتیجه گیری کلی: مطالعه حاضر نشان داد که ژن P19 به طور معنی‌داری می‌تواند باعث افزایش میزان رونویسی و تولید پروتئین rtPA در گیاه توتون (*N. benthamiana*) شود. برداشت برگ گیاهان هفت روز بعد از تلقیح با آگروباکتریوم در حضور P19 می‌تواند روشی مناسب در افزایش تولید پروتئین نوترکیب rtPA باشد. همچنین کاربرد P19 همراه با طراحی سازه‌های حاوی عناصر مؤثر در افزایش بیان می‌تواند برای دست‌یابی به بیان در سطح بالا مفید باشد.

References

- Abdoli-Nasab M, Jalali-Javaran M, Cusidó RM et al. (2013) Expression of the truncated tissue plasminogen activator (K2S) gene in tobacco chloroplast. *Mol Biol Rep* 40, 5749–58.
- Alvarez ML, Pinyerd HL, Topal E, Cardineau GA (2008) P19-dependent and P19-independent reversion of F1-V gene silencing in tomato. *Plant Mol Biol* 68, 61–79.
- Arzola L, Chen J, Rattanaporn K et al. (2011) Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *Int J Mol Sci* 12, 4975–4990.
- Asgari M, Javaran MJ., Moieni A et al. (2014) Production of Human Tissue Plasminogen Activator (tPA) In *Cucumis sativus*. *Prep Biochem Biotech* 44, 182-192.
- Baruah DB, Dash RN, Chaudhari M, Kadam S (2006) Plasminogen activators: a comparison. *Vasc Pharmacol* 44, 1-9.
- Boivin EB, Lepage É, Matton DP et al. (2010) Transient expression of antibodies in suspension plant cell suspension cultures is enhanced when co-transformed with the tomato bushy stunt virus p19 viral suppressor of gene silencing. *Biotechnol Prog* 26, 1534-43.
- Browne MJ, Tyrrell AWR, Chapman CG et al (1985) Isolation of a human tissue-type plasminogen-activator genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* 33, 279–284.
- Burgyán J, Havelda Z (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in J Plant Sci* 16, 265–272.
- Csorba T, Kontra L, Burgyán J (2015) Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *J VIROL* 479, 85-103.
- Dodd I, Jalalpour S, Southwick W et al. (1986) Large scale, rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator. *Febs Lett* 209, 13–17.
- Dunoyer P, Lecellier C-H, Parizotto EA et al (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell Online* 16, 1235–1250.
- Eamens A, Wang MB, Smith NA, Waterhouse PM (2008) RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol* 147, 456-68.

- Fann CH, Guirgis F, Chen G et al. (2000) Limitations to the Amplification and Stability of Human Tissue-Type Plasminogen Activator Expression by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Bioeng* 2, 204–212.
- Flemmig M, and Melzig MF (2012) Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *J Pharm Pharmacol* 64, 1025-1039.
- Garabagi F, Gilbert E, Loos A et al. (2012) Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. *Plant Biotechnol J* 10, 1118–1128.
- Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D et al. (2002) pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J* 31, 375-383.
- Goojani HG, Javaran MJ, Nasiri J et al. (2013) Expression and large-scale production of human tissue plasminogen activator (t-PA) in transgenic tobacco plants using different signal peptides. *Appl Biochem biotechnol* 169, 1940-1951.
- Hahn BS, Sim JS, Kim HM et al. (2009) Expression and characterization of human tissue-plasminogen activator in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol Rep* 27, 209-216.
- Hsieh YC, Omarov RT, Scholthof HB (2009) Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the Tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor. *J Virol* 83, 2188–2200.
- Jalanko A, Pirhonen J, Pohl G, Hansson L (1990) Production of human tissue-type plasminogen activator in different mammalian cell lines using an Epstein-Barr virus vector. *J Biotechnol* 15, 155–168.
- Jinek M, Doudna JA (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405-12.
- Kohnert U, Rudolph R, Verheijen JH et al. (1992) Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. *Protein Eng* 5, 93-100.
- Li J, Park E, Arnim AG, Nebenführ A (2009) The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods* 15, 1–15.

- Lindbo JA (2007) High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC biotechnol* 7, 52-63.
- Liu Z, Kearney CM (2010) A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and Nicotiana. *J Biotechnol* 147, 151–159.
- Livak KJ, Thomas DS (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Lombardi R, Circelli P, Villani ME et al. (2009) High-level HIV-1 Nef transient expression in Nicotiana benthamiana using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. *BMC Biotechnol* pp, 96.
- Masoumi Asl A, Jalali-Javaran M, Mahboudi F, Alizadeh H (2010) Cloning and expression of tissue plasminogen activator (t-pa) gene in tobacco plants. *Sci Res Essays* pp, 917-922.
- Obukowicz MG, Gustafson ME, Junger KD et al. (1990) Secretion of active kringle-2-serine protease in Escherichia coli. *Biochem* 29, 9737–9745.
- Omar A (2013) Effect of a silencing suppressor gene towards the expression of VP2 protein of highly virulent infectious bursal disease virus in tobacco. *J Biosci Bioeng* 2, 159–166.
- Park JW, Faure-Rabasse S, Robinson MA et al. (2004) The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *J Virol* 323, 49–58.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45-e45.
- Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE et al. (2010) Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant biotechnol J* 8, 638-654.
- Ranby M (1982) Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *BBA-Protein Struct Mol Enzymol* 704, 461-469.
- Saxena P, Hsieh YC, Alvarado VY et al. (2011) Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmless. *Plant Biotechnol J* 9, 703-712.
- Soleimani M, Davudi N, Fallahian F, Mahboudi F (2006) Cloning of Tissue Plasminogen Activator cDNA in Nonpathogenic Leishmania. *Yakhteh Med J* 8, 196–203.

- Thomas DR, Walmsley AM (2014) Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Rep* 33, 1801–1814.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33, 949-56.
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* 3, 259–73.
- Xu J, Dolan MC, Medrano G et al. (2012) Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv* 30, 1171–1184.
- Zangi M, Ofoghi H, Amini-Bayat Z, Ehsani P (2016) Utility of P19 Gene-Silencing Suppressor for High Level Expression of Recombinant Human Therapeutic Proteins in Plant Cells. *Res Mol Med* 4, 35-40.
- Zhou B, Zhao X, Kawabata S, Yuhua L (2009) Transient expression of a foreign gene by direct incorporation of DNA into intact plant tissue through vacuum infiltration. *Biotechnol Lett* 31, 1811–1815.
- WHO (2018). The top 10 causes of death: World Health Organization; [Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>].

