

Transient expression and purification of prochymosin in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) using viral vectors

Esmail Ziaee 

PhD Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: Ziaee885@shirazu.ac.ir

Mohammad Hadi Eskandari 

*Corresponding author: Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: Eskandar@shirazu.ac.ir

Ali Niazi 

Professor, Institute of Biotechnology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: Niazi@shirazu.ac.ir

Marzieh Moosavi-Nasab 

Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: mosavi@shirazu.ac.ir

Mahmoud Aminlari 

Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: Aminlari@shirazu.ac.ir

Abstract

Objective

The aim of present study was transient expression and purification of recombinant caprine chymosin and prochymosin in *N. benthamiana* leaves using plant binary vectors and tobacco mosaic virus (TMV) vector.

Material and Methods

The caprine prochymosin gene sequence was obtained from NCBI gene bank and optimized at codons for preferential expression in tobacco leaves. The chymosin and prochymosin genes were introduced into the plant binary and viral vectors. Immunoblotting analyses were conducted to demonstrate expression of chymosin and prochymosin, and the expression level was quantified by milk clotting activity test.

Results

Results indicated that *N. benthamiana* leave cells cannot process prochymosin correctly and only a weak band observed in extracted total proteins (TPs) which showed no milk clotting activity while leaves infiltrated by p20 α chymosin showed a band with chymosin molecular weight and slightly showed milk clotting activity. TMV-based recombinant prochymosin and chymosin expression showed necrosis after 3 days post infiltration (dpi) in agro-infiltrated leaves and after 5 days, leaves completely dried and necrotized. Blotting analysis showed only a band with right molecular weight in TSPs extracted *N. benthamiana* leaves infiltrated by TMV α chymosin. Moreover, we subcloned chymosin which expanded with a N-terminal barley alpha amylase signal peptide and a C-terminal hybrid Fc tag which labelled as TMV α chymosinhyFc. The expression level increased gradually from 2 to 5 days after infiltration from 3.3 U/g FW to 16.8 U/g FW but after 5-day leaves necrosis started and expression level reduced gradually.

Conclusion

Viral vectors and transient expression can be a cheap, fast and effective method to produce a huge amount of recombinant proteins but it seems chymosin production still needs more research and find the *N. benthamiana* cells problem with chymosin which leads to necrosis and reduce the expression level for large scale production.

Keywords: Chymosin, Prochymosin, Transient expression, Viral vector

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ziaee E, Eskandari MH, Niazi A, Moosavi-Nasab M, Aminlari M (2022) Transient expression and purification of prochymosin in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) using viral vectors. *Agricultural Biotechnology Journal* 14(2), 45-66.

Agricultural Biotechnology Journal 14(2), 45-66.

DOI: 10.22103/jab.2021.16588.1262

Received: January 8, 2021.

Received in revised form: February 11, 2021.

Accepted: February 11, 2021.


Published online: February 30, 2021

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




© the authors

بیان موقت و خالص سازی پروتئین پروکیموزین در گیاه توتون با استفاده از وکتور ویروسی

اسماعیل ضیایی 


دانشجوی دکتری، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه:

Ziaee885@shirazu.ac.ir

محمدهادی اسکندری 

*نویسنده مسئول: دانشیار، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه:


Eskandar@shirazu.ac.ir

علی نیازی 

استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: Niazi@shirazu.ac.ir

مرضیه موسوی نسب 

استاد، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: mosavi@shirazu.ac.ir

محمود امین لاری 

استاد، بخش علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: aminlari@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق همسانه سازی و بیان پروتئین نوترکیب کیموزین و پروکیموزین در گیاه توتون با استفاده از ناقل ویروس موزائیک تنباکو و خالص سازی پروتئین تولید شده بود.

مواد و روش ها: توالی پروکیموزین بزی از پایگاه داده NCBI دریافت و براساس ترجیح کدونی گیاه توتون بهینه سازی گردید. سپس با طراحی آغازگرهای مختلف ژن پروکیموزین و کیموزین تکثیر و در ناقل های دوتایی (باینری) و ویروسی همسانه سازی و به باکتری *آگروباکتریوم تومیفاسینس* انتقال داده شد. با روش آگرواینفیلتراسیون باکتری حامل ناقل های دوتایی و ویروسی به برگ های گیاه توتون تزریق گردید. روش و سترن بالاتینگ به منظور بررسی بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت نسبی پروتئین ها در تشکیل لخته مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: زمانی که ژن پروکیموزین با استفاده از ناقل‌های دوتایی در گیاه توتون بیان گردید، فقط یک باند ضعیف در پروتئین کل استخراج شده مشاهده گردید، ولی زمانی که ژن کیموزین در ناقل دوتایی بیان گردید، در پروتئین محلول نیز باند مشاهده گردید. استفاده از ناقل‌های ویروسی باعث نکروزه شدن برگ‌های گیاه توتون گردید و نتایج مشابهی نیز با ناقل‌های دوتایی بدست آمد به طوری که زمانی که ژن پروکیموزین بیان گردید فقط یک باند در پروتئین کل، ولی زمانی که کیموزین بیان گردید علاوه بر پروتئین کل در پروتئین محلول استخراج شده نیز باند مشاهده گردید. بیشترین میزان بیان با استفاده از سازه ژنی $TMV\alpha chymosin^{hyFC}$ بدست آمد که پروتئین خالص شده دارای فعالیت تشکیل لخته $U 16/8$ در هر گرم برگ تر بود.

نتیجه گیری: اگرچه استفاده از ناقل‌های ویروسی و بیان موقت می‌تواند روش ارزان، سریع و موثری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب باشد ولی در تحقیق حاضر نکروزه شدن و مشکلات احتمالی گیاه توتون با کل یا بخشی از ژن پروکیموزین باعث کاهش سطح بیان کیموزین گردید، که تعیین دلایل احتمالی و راه‌های رفع آن‌ها نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: بیان موقت، پروکیموزین، کیموزین، ناقل ویروسی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ضیایی اسماعیل، اسکندری محمدهادی، نیازی علی، موسوی‌نسب مرضیه، امین‌لاری محمود (۱۴۰۱) بیان موقت و خالص‌سازی پروتئین پروکیموزین در گیاه توتون با استفاده از وکتور ویروسی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۲)، ۶۶-۴۵.

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



© the authors

مقدمه

کیموزین یک آسپارتیک پروتئاز بوده که با شکستن پیوند پپتیدی بین اسیدآمینه فنیل‌آلانین و متیونین در کاپاکازئین موجب ناپایداری میسل‌های کازئین و تشکیل لخته شده و هنوز هم به عنوان مهمترین عامل تشکیل لخته در صنعت لبنیات برای تولید پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kumar et al. 2010; Jiang et al. 2012). کیموزین به صورت سنتی از معده چهارم نشخوارکنندگان جوان پس از کشتار بدست آمده که با افزایش جمعیت جهان و افزایش تقاضا، نیاز به جایگزین‌های کیموزین ضروری می‌باشد. پروتئازهای گیاهی و میکروبی به دلیل عمل غیراختصاصی بر روی پروتئین‌های شیر موجب ایجاد طعم‌های نامطبوع، پپتیدهای کوچک عامل ایجاد طعم تلخ در لخته و کاهش بازده تولید پنیر می‌گردند (Jiang et al. 2012; Feng et al. 2012).

al. 2010; Espinoza-Molina et al. 2016). در حال حاضر کیموزین نوترکیب تولید شده در مخمر پیش‌یا پاستوریس^۱ (Tyagi et al. 2017)، اشرشیاکلی^۲ (Kawaguchi et al. 1987; Menzella 2011) و بعضی از قارچ‌ها (Ward et al. 1990; Cardoza et al. 2003) به صورت گسترده در بسیاری از کشورها به صورت تجاری در صنعت لبنیات مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین استفاده از تکنولوژی تولید کیموزین نوترکیب در میزبان‌های دیگر به عنوان یک روش جایگزین روش‌های سنتی تولید کیموزین دارای مزایای متعددی می‌باشد. مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی^۳ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری اشرشیاکلی کشف شد (Ahsani et al. 2019a). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). در طی سالیان اخیر استفاده از گیاهان مختلف به عنوان میزبان مناسب برای تولید طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های نوترکیب مثل آنزیم‌های صنعتی، انواع مختلف آنتی‌بادی‌های ازسانی و همچنین انواع واکسن و داروها مورد استفاده قرار گرفته است (Tusé et al. 2014; Conley et al. 2011; Doran 2006) استفاده از گیاهان در مقایسه با سایر میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارای مزایای متعددی بوده که از آن جمله می‌توان به ارزان‌تر بودن، سهولت افزایش مقیاس تولید، تولید پروتئین‌های ازسانی اشاره کرد (Sheen 1983). از بین میزبان‌های گیاهی مختلف، توتون دارای بیشترین سابقه به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب بوده و به دلیل سهولت دست‌کاری ژنتیکی، در دسترس بودن اطلاعات و ابزارهای لازم جهت تولید در این میزبان و امکان تولید بازده زیست توده^۴ بیشتر از ۱۰۰ تن در هر هکتار دارای جذابیت‌های بالایی برای انتخاب به عنوان یک میزبان برای تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس صنعتی می‌باشد (Fischer et al. 2004; Twyman et al. 2003; Gleba et al. 2005). از طرف دیگر سطح بیان کم پروتئین نوترکیب هنوز به عنوان مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب در توتون می‌باشد. در حال حاضر استفاده از ناقل‌های

^۱ *Pichia pastoris*

^۲ *Escherichia coli*

^۳ DNA

^۴ Biomass

ویروس‌های گیاهی و بیان موقت به عنوان یک روش موثر برای افزایش سطح بیان پروتئین و کاهش زمان تولید مورد استفاده قرار می‌گیرد. از مهمترین مزایای سیستم‌های متکی به استفاده از ویروس‌های گیاهی، بیان بالای پروتئین مورد نظر در گیاه در مدت زمان کمتر از ۱۰ روز می‌باشد (Doran 2006; Giritch et al. 2006; Nausch et al. 2012). از بین ویروس‌های گیاهی، ویروس موزائیک تنباکو^۵ به صورت گسترده و موثری برای تولید طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفته است (Schneider et al. 2015). هدف از این تحقیق بررسی امکان تولید پروتئین پروکیموزین در گیاه توتون با استفاده از ناقل ویروسی و بررسی خصوصیات پروتئین تولید شده بود.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاه توتون: بذره‌های توتون در اتاق رشد با دمای ثابت 24 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰٪ و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در خاک مناسب رشد داده شدند. گیاهچه‌های با سن ۶ هفته برای آگرواینفیلتراسیون^۶ مورد استفاده قرار گرفتند.

هم‌سازگی پروکیموزین و بررسی محل قرارگیری پروتئین نو ترکیب در اندامک‌های سلولی توتون:

توالی ژن پروکیموزین بزی مورد استفاده در این تحقیق با شماره دسترسی AY389343.1 از پایگاه داده NCBI دریافت و براساس ترجیح کدونی توتون بهینه‌سازی گردید و سپس درون پلاسمید گیاهی pBI121 (شکل ۱-ا) دریافت گردید. به منظور مطالعه محل قرارگیری کیموزین و پروکیموزین در اندامک‌های سلول گیاه توتون توالی پروکیموزین با استفاده از آغازگرهای طراحی شده تکثیر و سپس با استفاده از آنزیم‌های برشی BamHI/XbaI در بالا دست ژن پروتئین فلور سنت سبز^۷ مونومریک پروتئین قرمز فلورسنت^۸ هم‌سازگی گردید. همچنین ژن کیموزین در پایین دست سیگنال ترشحی آلفا آمیلاز و بالادست پروتئین فلورسنت سبز هم‌سازگی گردید و ناقل‌های p20prochymosin^{GFP}، p31prochymosin^{mRFP} و p20achymosin^{GFP} تهیه گردید (شکل ۱- b-d). سازه‌های ژنی کلون شده با استفاده از روش شوک الکتریکی^۹ به باکتری اشرشیا کلی سویه DH5 α انتقال داده شده و کلنی‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و توالی‌یابی تأیید شدند و

^۵ Tobacco Mosaic Virus (TMV)

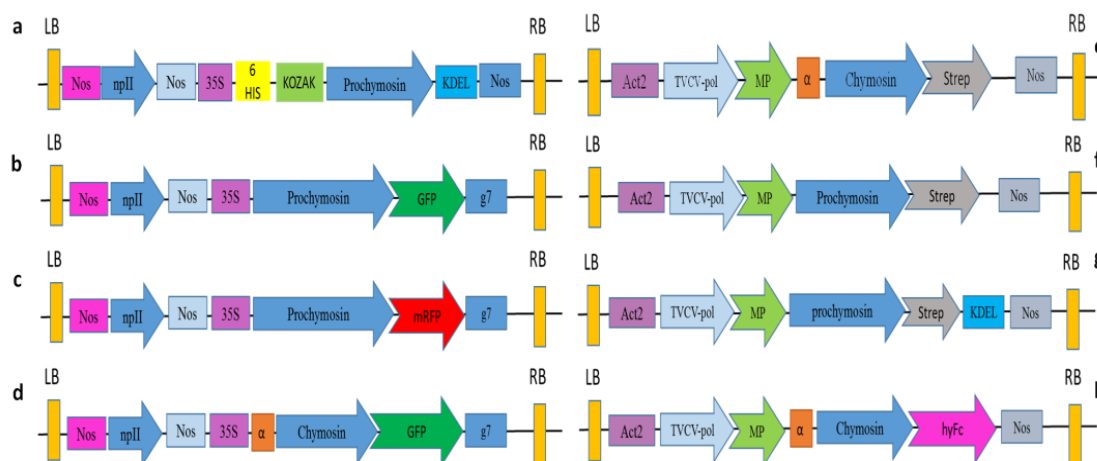
^۶ Agroinfiltration

^۷ Green Fluorescent Protein (GFP)

^۸ Monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP)

^۹ Electroporation

سپس پلاسمید تأیید شده استخراج و به باکتری *آگروباکتریوم تومه فاشینس*^۱ سویه GV3101 انتقال داده شد. ژن کیموزین و پروکیموزین با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون به روش بیان موقت در برگ گیاه توتون با سن ۶ هفته‌ای با استفاده از باکتری *آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای کلون شده p20prochymosin^{GFP} و p20αchymosin^{GFP}* بیان شد. علاوه بر این باکتری *آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی p31GnTI-C_{AAA}TS-mRFP* به صورت همزمان با سازه‌های کیموزین و پروکیموزین در غلظت OD₆₀₀=0.05 در برگ‌های گیاه توتون تزریق شد و به عنوان نشانگر قرار گرفتن در شبکه آندوپلاسمی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱. شماتیک سازه‌های همسانه‌سازی شده در ناقل‌های بیانی گیاهی و ویروسی به منظور بیان موقت در گیاه توتون

Figure 1. Schematic structure of cloned binary and viral vectors to transiently express in tobacco

همسانه‌سازی کیموزین در ناقل ویروسی موزائیک توتون: به منظور تهیه سازه ژنی TMVprochymosin و TMVprochymosin^{KDEL} ژن پروکیموزین به ترتیب با استفاده از آغازگرهای F2/R2 و F2/R1 (جدول ۱) تکثیر و همچنین برای تهیه سازه ژنی TMVαchymosin^{hyFc} و TMVαchymosin ژن کیموزین به ترتیب با استفاده از آغازگرهای F1/R4 و F1/R1 تکثیر شده و سپس محصولات PCR پس از خالص‌سازی با استفاده از آنزیم BsaI بریده شده و درون ناقل‌های خطی شده با استفاده از آنزیم BsaI همسانه‌سازی گردید. سپس پلاسمیدهای نوترکیب درون سلول‌های پذیرا / *شرشیا کلی* سویه DH5α و *آگروباکتریوم تومه فاشینس* سویه GV3101 با استفاده از روش الکتروپوراسیون انتقال داده شد و جهت تأیید

^۱ *Agrobacterium tumefaciens*

از روش آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز و استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک و روش توالی‌یابی استفاده گردید.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده و جایگاه برش طراحی شده در هر یک از آنها

Table 1. Sequence of primers used in this study

توالی آغازگر Primer Sequence	جایگاه برش Restriction Site	آغازگر Primer
CGCGGTCTCAAGGTGGAGAAGTGGCTAGT GTGC	<u>BsaI</u>	آغازگر رفت F1 Sense Primer F1
CGCTCTAGATGGTCTCAAGGTATGGCGGC GGAAATTACAAGAATACC	<u>XbaI</u> , <u>BsaI</u>	آغازگر رفت F2 Sense Primer F2
GGCTTCCGAATATTCTGTCCCAGTG	-	آغازگر رفت F3 Sense Primer F3
GTCGACGGTCTCAAAGCTTACTTTTTCGAAC TGCGGATGGCTCCAGGATCCGATTGCTTT GGCAAGACCTAC	<u>BamHI</u> , <u>BsaI</u>	آغازگر برگشت R1 Antisense Primer R1
GTCGACGGTCTCAAAGCTTACTTTTTCGAAC TGCGGATGGCTCCATAACTCATCCTTGATT GC	<u>BsaI</u>	آغازگر برگشت R2 Antisense Primer R2
CTGAAGGGTTACGGGTACCCAGTGAAGG	-	آغازگر برگشت R3 Antisense Primer R3
GCGGGTCTCATCCTTTAGATTGCTTTGGCA AGACCTAC	<u>BsaI</u>	آغازگر برگشت R4 Antisense Primer R4

بیان موقت و بررسی بیان با استفاده از روش وسترن بلاتینگ: به منظور بیان موقت ژن کیموزین و پروکیموزین

از باکتری‌های *اگر و باکتریوم توم‌فا شینس* حاوی پلاسمید سازه‌های مختلف که در مرحله قبل تأیید شده بودند، کشت شبانه تهیه شده و سپس سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در شرایط $5000 \times g$ و زمان ۵ دقیقه از محیط کشت جدا شده و درون محلول بافر اینفیلتراسیون^{۱۱} (ترکیب ۱۰ میلی مولار MES با pH برابر ۵/۶ و ۱۰ میلی مولار منیزیم سولفات) به صورت یکنواخت معلق شده و سپس غلظت‌های با دانسیته نوری ۰/۱ تهیه شده و برای اگرواینفیلتراسیون مورد استفاده قرار گرفت. برگ‌های تلقیح شده بعد از ۵-۲ روز و با استفاده از نیتروژن مایع به صورت سریع منجمد شده و تا زمان انجام آزمایشات درون فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

استخراج پروتئین و آنالیز وسترن بلاتینگ: پروتئین‌های موجود در فضای آپوپلاستیک، پروتئین محلول کل و

پروتئین کل نمونه‌های برگ تلقیح شده مطابق روش شنایدر و همکاران (۲۰۱۵) استخراج گردید (Schneider et al. 2015). به طور خلاصه به منظور استخراج پروتئین‌های محلول و پروتئین کل، ۲۰۰ میلی گرم از برگ‌های منجمد شده با نیتروژن مایع به همراه ۲ عدد گلوله کوچک استیل درون تیوپ قرار داده شده و با استفاده از دستگاه (Retsch, MM2000, swing mill) همراه

^{۱۱} Infiltration buffer

Haan, Germany) برای مدت ۲ دقیقه و دامنه نوسان ۶۰ کاملاً خرد شده و سپس برای استخراج پروتئین محلول کل ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین محلول (۱/۵ مولار سدیم کلرید، ۱ میلی مولار EDTA، ۴۵ میلی مولار تریس و ۴۰ میلی مولار آسکوربیک اسید با pH برابر ۷/۴) و یا ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین کل (۰/۲ مولار اسید سیتریک، ۵ میلی مولار EDTA، ۴۰ میلی مولار آسکوربیک اسید و ۱٪ تریتون X-100 با pH برابر ۷/۲) به آنها اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری شده و سپس با استفاده از سانتریفیوژ (g × ۱۰۰۰۰، زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) محلول رویی که حاوی پروتئین مورد نظر بود جدا گردید. غلظت پروتئین در هر نمونه با استفاده از روش برادفورد و با استفاده از نمودار استاندارد رسم شده بر اساس غلظت‌های آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری گردید. تائید بیان پروتئین کیموزین و پروکیموزین با استفاده از روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی انجام پذیرفت. بدین منظور ابتدا غلظت مساوی از هر یک پروتئین‌های استخراج شده بر روی ژل آکریلامید درون ژل جداکننده ۱۲٪ ران شده و الکتروفورز در شرایط ۱۳۰ ولت و زمان ۱-۲ ساعت انجام گرفت. سپس پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل آکریلامید به ممبران نیتروسولوز انتقال داده شد. سپس ممبران نیتروسولوز با استفاده از محلول ۵٪ آلبومین سرم گاوی درون محلول تریس بافر-توئین به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شده و سپس درون محلول تریس بافر حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه و سپس ثانویه مطابق شرایط زیر قرار داده شد.

anti-GFP - محلول ۱:۲۰۰۰ آنتی بادی anti-GFP درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی اولیه) و شناسایی توسط پروتئین HRP کانژوگه شده به IgG موش (محلول ۱:۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی anti-mouse-IgG درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی ثانویه).

anti-mRFP - محلول ۱:۲۰۰۰ آنتی بادی anti-mRFP درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی اولیه) و شناسایی توسط پروتئین HRP کانژوگه شده به IgG موش (محلول ۱:۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی anti-mouse-IgG درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی ثانویه).

anti-strep - محلول ۱:۵۰۰۰ آنتی‌بادی anti-strep درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی اولیه) و شناسایی توسط پروتئین HRP کانژوگه شده به IgG موش (محلول ۱:۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی anti-mouse-IgG درون محلول ۵٪ شیرخشک در محلول تریس بافر-توئین به عنوان آنتی‌بادی ثانویه).

بررسی فعالیت تشکیل لخته و خصوصیات بیوشیمیایی: به منظور بررسی فعالیت تشکیل لخته پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاه توتون پروتئین محلول کل از گیاهان تلقیح شده با باکتری آگروباکتریوم تومه فائسینس دارای پلاسמיד TMV α chymosin^{hyFC} استخراج شده و سپس پروتئین کیموزین با استفاده از پروتکل پیشنهادی سازنده رزین پروتئین A که

دارای تمایل اتصال به بخش hyFC می باشد از سایر پروتئین‌های موجود در بخش محلول خالص‌سازی گردید. اندازه‌گیری فعالیت نسبی تشکیل لخته با استفاده از روش پیشنهادی Arima انجام گردید (Arima et al. 1967). بدین منظور ابتدا محلول ۱۰٪ شیرخشک بدون چربی در محلول ۰/۰۱ مولار کلسیم کلرید تهیه گردید و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از آنزیم خالص شده به ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۱۰٪ شیر خشک اضافه شده و در دمای 2 ± 35 درجه سلسیوس به منظور ثبت زمان تشکیل اولین لخته افزوده شد. فعالیت کیموزین با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت کیموزین} = \frac{\text{milk volume}}{\text{chymosin volume}} \times \frac{40}{t}$$

به منظور مطالعه اثر دما و pH بر فعالیت کیموزین تولید شده در گیاه توتون آنزیم تولید شده در دماهای مختلف (۱۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و میزان فعالیت باقی مانده آنزیم اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم، محلول آنزیم در بافرهای مختلف با pH های مختلف از ۲ تا ۹ برای ۱ ساعت افزوده شده و سپس میزان فعالیت باقی مانده آنزیم اندازه‌گیری گردید. بدین منظور از بافرهای ۵۰۰ میلی مولار سدیم سیترات (pH= ۲-۳/۵)، ۵۰۰ میلی مولار سدیم استات (pH= ۴/۵-۵)، ۵۰۰ میلی مولار پتاسیم فسفات (pH= ۶-۷/۵) و محلول ۵۰۰ میلی مولار تریس-اسید هیدروکلریدیک (pH= ۸-۹) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق از طرح آماری کاملاً تصادفی ساده استفاده گردید و تمام آزمایش‌ها در سه تکرار

انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS V. 9.1 و روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با استفاده از آزمون‌های چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ساخت ناقل‌های بیان برای بیان موقت در گیاه توتون: برای رسیدن به سطح بالایی از بیان پروکیموزین بزی توالی

ژنی پروکیموزین بزی بر اساس ترجیح کدونی گیاه توتون بهینه‌سازی گردید. برای تولید پروکیموزین نوترکیب در گیاه توتون ساختارهای ژنی مختلف هم‌سانه سازی گردید. در بخش اول ژن پروکیموزین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی F2/R1 و ژن کیموزین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی F1/R1 از سازه ژنی pBI121prochymosin (شکل ۱-ا) تکثیر شده و نهایتاً قطعه پروکیموزین در بالادست پروتئین فلورسنت سبز (p20prochymosin^{GFP})، مونومریک پروتئین فلورسنت قرمز (p31prochymosin^{mRFP}) و ژن کیموزین در پائین دست سیگنال ترشحی آلفا آمیلاز جو و بالادست پروتئین فلورسنت سبز

(p20achymosin^{GFP}) به صورت موفقیت آمیز درون ناقل‌های دوتایی گیاهی هم‌سانه سازی گردید (شکل ۱، b-d). علاوه بر این سازه‌های ژنی مختلفی از کیموزین و پروکیموزین درون ناقل ویروسی TMV هم‌سانه سازی گردید (شکل ۱، e-h). در قسمت انتهایی C بعضی از ساختارهای ژنی یک توالی KDEL برای انتقال پروتئین تولید شده به شبکه آندوپلاسمی به منظور جلوگیری از اثرات منفی پروتئازهای گیاهی قرار داده شد. نهایتاً به منظور خالص سازی پروتئین تولید شده در گیاه دو توالی شامل توالی strep-II-tag و توالی hyFC در قسمت پائین دست ژن مورد نظر قرار داده شد. نهایتاً چهار سازه ژنی مختلف با استفاده از ناقل‌های ویروسی به صورت موفقیت آمیز هم‌سانه سازی گردید که عبارتند از TMVprochymosin^{KDEL}، TMVprochymosin^{hyFC} و TMVachymosin^{hyFC} و نقشه شماتیکی آنها در شکل ۱، e-h آورده شده است. تمامی سازه‌ها به صورت موفقیت آمیز ابتدا به سلول‌های پذیرا/شرشیاکلی سویه DH5 α انتقال داده شد و پس از تأیید کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک و توالی یابی به باکتری آگروباکتریوم تومه فاشینس GV3101 انتقال داده شدند.

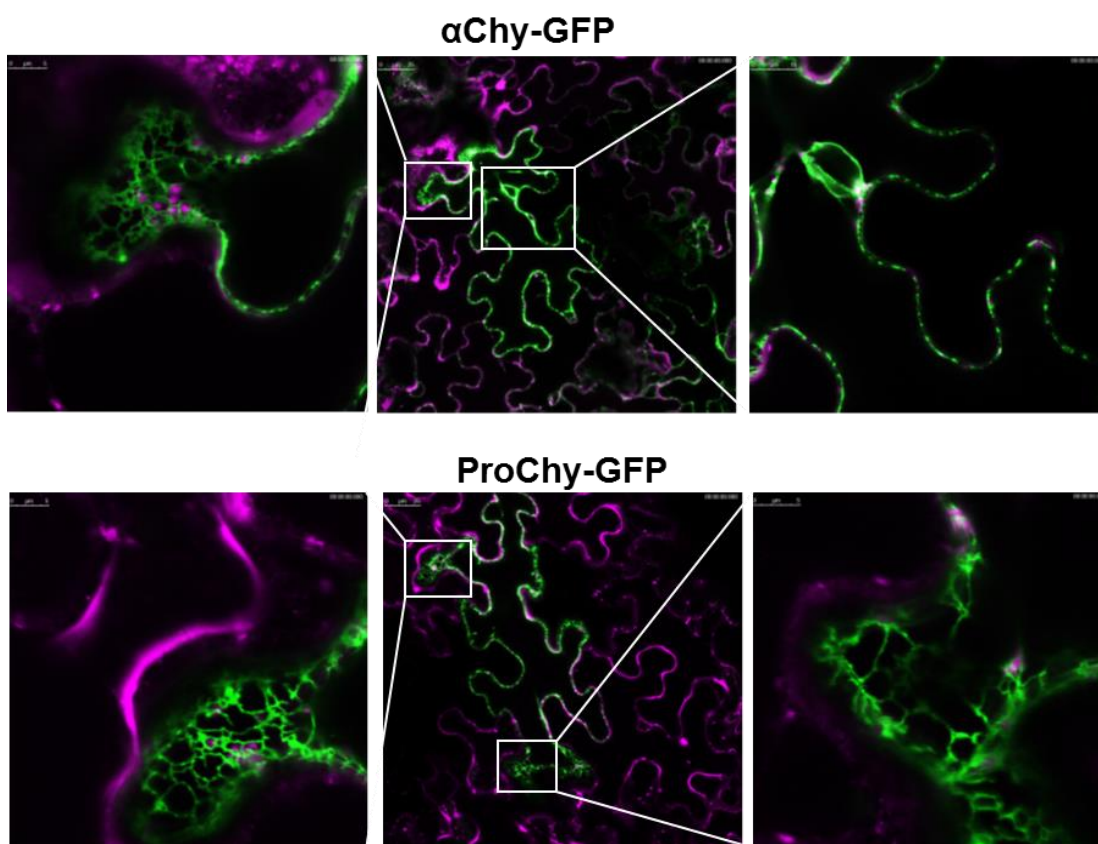
بررسی محل قرارگیری پروتئین نو ترکیب در اندامک‌های سلول‌های گیاه توتون: به منظور بررسی محل

قرارگیری کیموزین و پروکیموزین در اندامک‌های سلول‌های گیاه توتون، کیموزین و پروکیموزین متصل شده به پروتئین فلورسنت سبز یعنی p20achymosin^{GFP} و p20prochymosin^{GFP} تهیه گردید. بیان پروتئین نو ترکیب کیموزین و پروکیموزین در سازه‌های ژنی تهیه شده با استفاده از روش وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی علیه GFP (anti-GFP) مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۳-ا). سلول‌های برگ گیاه توتون تولید کننده پروتئین chymosin^{GFP} و prochymosin^{GFP} در روز دوم پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفتند. تصاویر بدست آمده نشان دهنده یک الگوی رنگی شبکه‌ای که مشابه قشر شبکه آندوپلاسمی می‌باشد بود، که این تصاویر نشان می‌دهد پروتئین تولید شده در شبکه آندوپلاسمی قرار می‌گیرد. مطالعه بررسی همزمان تصاویر بدست آمده از محل قرارگیری chymosin^{GFP} و prochymosin^{GFP} و پروتئین GnTI-CAAATS^{mRFP} به عنوان نشانگر قرارگیری پروتئین در شبکه آندوپلاسمی تأیید کرد که حداقل بخشی از پروتئین مورد نظر تولید شده در گیاه توتون در شبکه آندوپلاسمی قرار می‌گیرد (شکل ۲).

بیان موقت پروکیموزین و کیموزین در برگ‌های گیاه توتون: در مورد وکتورهای دو تایی، بیان کیموزین و

پروکیموزین با استفاده از روش وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین‌های استخراج شده از مایعات آپوپلاستیک، پروتئین محلول کل و پروتئین کل پس از ۲ و ۳ روز پس از تزریق سلول باکتری آگروباکتریوم به برگ گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج وسترن بلات علیه هر دو آنتی‌بادی GFP و mRFP نشان داد که فقط در پروتئین کل استخراج شده یک باند با وزن مولکولی مورد انتظار برای prochymosin در روز دوم پس از تزریق مشاهده گردید (شکل ۳، a-b) که به ترتیب برابر وزن مولکولی پروکیموزین

(40 kDa) به اضافه GFP با وزن مولکولی ۲۶ کیلودالتون و mRFP با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون به ترتیب در سازه ژنی $p31prochymosin^{mRFP}$ و $p20prochymosin^{GFP}$ بود.

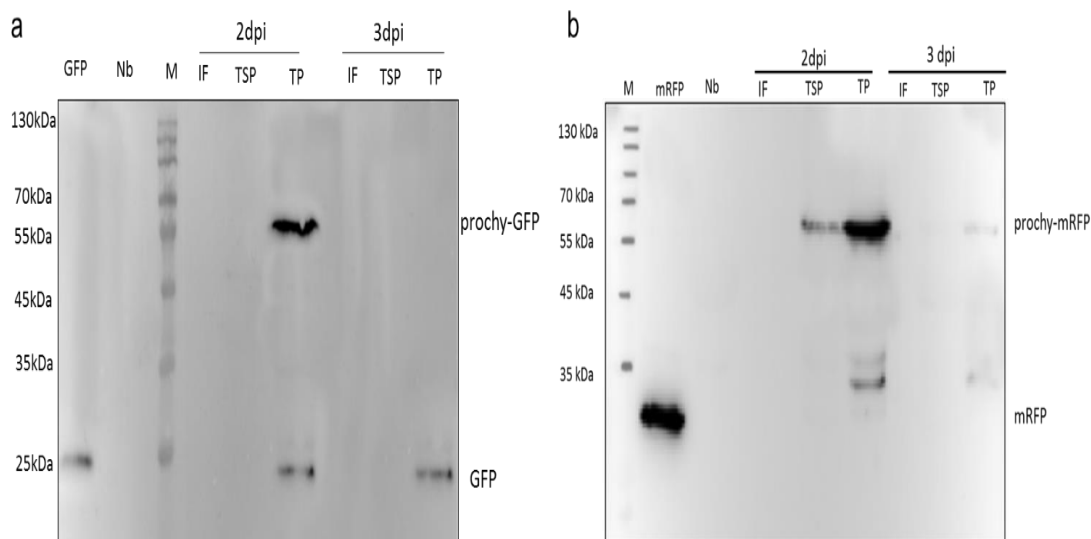


شکل ۲. تصاویر فلور سنت از پروتئین کیموزین و پروکیموزین متصل شده به پروتئین سبز فلور سنت بیان شده در برگ گیاه توتون

Figure 2. Fluorescence imaging of chymosin and prochymosin. Subcellular localization of the recombinant enzymes was determined by live-cell imaging of *N. benthamiana* leaf epidermal cells expressing $p20\alpha chymosin^{GFP}$ and $p20prochymosin^{GFP}$.

به هر حال اندازه‌گیری فعالیت تشکیل لخته بر روی نمونه‌های اصلی و نمونه‌های ۱۰ برابر غلیظ شده از پروتئین‌های کل نشان دهنده باند، نشان داد که این نمونه‌ها هیچ فعالیت تشکیل لخته‌ای نداشتند و از بین رفتن این باندها در نمونه‌های روز سوم پس از تزریق و عدم فعالیت تشکیل لخته نشان از مشکلات احتمالی در تغییرات نامناسب یا تشکیل ساختار سوم نامناسب بر روی کل پروتئین پروکیموزین یا بخشی از آن می‌باشد. در مورد نتایج بدست آمده از وسترن بلاتینگ بر روی نمونه‌های بدست آمده از

برگ‌های تزریق شده با سازه ژنی p20αchymosin^{GFP} نتایج بدست آمده نشان داد هر دوی پروتئین محلول کل و پروتئین کل دارای یک باند با وزن مولکولی حدود ۶۳ کیلودالتون که برابر با وزن مولکولی کیموزین متصل شده با GFP در روز دوم پس از تزریق به برگ‌های گیاه توتون می‌باشد (شکل ۴). انجام تست فعالیت تشکیل لخته بر روی پروتئین‌های استخراج شده از برگ‌های گیاه توتون تزریق شده با p20αchymosin^{GFP} نشان داد که پروتئین محلول استخراج شده دارای فعالیت تشکیل لخته می‌باشد و می‌تواند به میزان بسیار کمی پروتئین‌های شیر را تبدیل به لخته کرده، اگرچه میزان فعالیت تشکیل لخته بسیار کم بود.

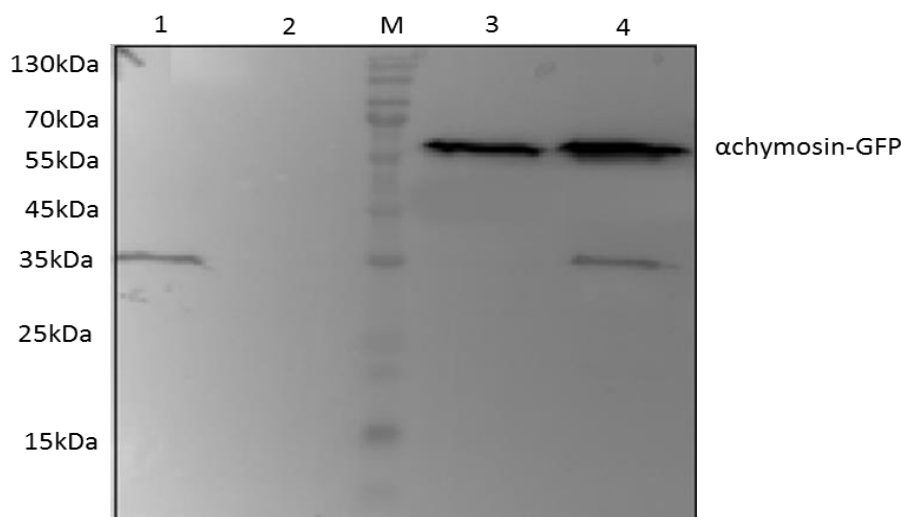


شکل ۳. آنالیز وسترن بلا تینگ بر روی پروتئین‌های استخراج شده از فضای بین سلولی، پروتئین محلول کل و پروتئین کل نمونه‌های برگ گیاه توتون تزریق شده با باکتری حاوی ناقل‌های p20prochymosin^{GFP} و p31prochymosin^{mRFP} پس از ۲ و ۳ روز بعد از تزریق

Figure 3. Secreted proteins (AF), total soluble protein (TSP) and total protein (TP) extracts from *N. benthamiana* leaves expressing prochymosin^{GFP} and prochymosin^{mRFP} were analysed by immunoblotting at 2 and 3 days post-infiltration (dpi)

از طرف دیگر در مورد سازه‌های ژنی ویروسی، چهار روز پس از تزریق باکتری آگروباکتریوم حامل ناقل‌های ویروسی به برگ‌های گیاه توتون، در برگ‌های تزریق شده علائم نکروزه شدن برگ‌ها مشاهده گردید و ۷ روز پس از تزریق، برگ‌های توتون در محل‌های تزریق کاملاً نکروزه شده و برگ‌های گیاه خشک گردیدند، در حالی که برگ‌های تزریق نشده یا برگ‌های تزریق شده با سلول‌های آگروباکتریوم خالی یا آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای دوتایی کاملاً سالم بوده و هیچ نشانه‌ای از نکروزه شدن در

آن‌ها مشاهده نگردید (شکل ۵). این مشاهدات مطابق با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر که آنها نیز وجود نکرده شدن را در بیان موقت با استفاده از ناقل‌های بر پایه TMV که منجر به از بین رفتن کامل برگ‌های گیاه در بیان موقت هورمون رشد انسانی (Gils et al. 2005)، آنتی ژن ه پاتیت (Huang et al. 2006; Huang et al. 2008)، آنتی بادی‌های مونوکلونال IgG (Giritch et al. 2006) و بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب دیگر (Dorokhov et al. 2007; Matoba et al. 2010; Pinkhasov et al. 2011) می‌باشد گزارش کردند.



شکل ۴. بیان پروتئین کیموزین کلون شده در پائین دست سیگنال ترشحی آلفا آمیلاز جو و بالاد دست پروتئین فلور سنت سبز در پروتئین محلول و پروتئین کل استخراج شده از برگ گیاه توتون پس از ۲ روز تزریق باکتری آگروباکتریوم حاوی ناقل α chymosin^{GFP} p20

Figure 1. Total soluble protein (TSP) and total protein (TP) extracts from *N. benthamiana* leaves expressing α chymosin^{GFP} were analysed by immunoblotting at 2 day post-infiltration (dpi)

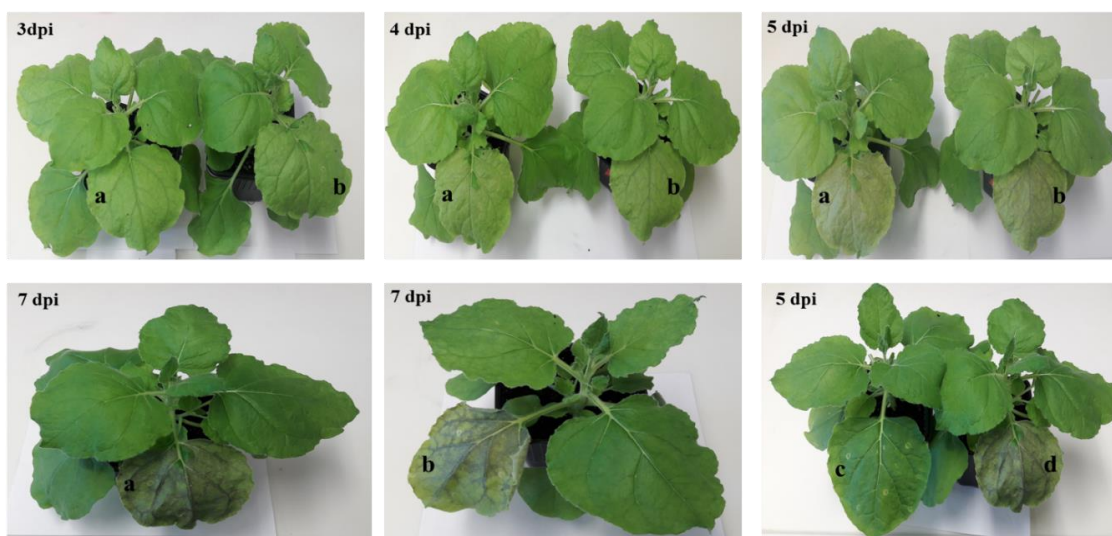
آنالیز و سترن بلاتینگ آنتی استرپ بر روی پروتئین‌های استخراج شده از مایعات آپوپلاستیک، پروتئین محلول کل و پروتئین کل استخراج شده از برگ‌های گیاه توتون تزریق شده با باکتری آگروباکتریوم *تومه فا شینس* حاوی ناقل‌های ویروسی در شکل ۶ آورده شده است. در مورد نمونه‌های پروتئین استخراج شده از مایعات آپوپلاستیک و پروتئین محلول کل از برگ‌های گیاه توتون تزریق شده با استفاده از باکتری آگروباکتریوم *تومه فا شینس* حاوی ناقل ویروسی *TMVprochymosin* و *TMVprochymosin^{KDEL}* هیچ گونه باندی مشاهده نگردید ولی در نمونه پروتئین محلول کل استخراج شده از برگ گیاه

توتون تزریق شده با استفاده از باکتری *آگروباکتریوم تومیفاشینس* حاوی ناقل ویروسی TMV α chymosin در روز سوم پس از تزریق یک باند با وزن مولکولی مشابه با کیموزین مشاهده گردید که این نتایج روشن کننده ایده احتمالی مشکل گیاه با بخش ابتدایی پروتئین پروکیموزین یعنی بخش پرو می باشد، به طوری که هم در مورد ناقل های دوتایی و هم در مورد ناقل های ویروسی مشاهده گردید که زمانی که پروتئین پروکیموزین به گیاه تزریق می گردد فقط یک باند بدون هر گونه فعالیت تشکیل لخته در پروتئین کل استخراج شده مشاهده گردید ولی زمانی که پروتئین کیموزین به گیاه تزریق گردید در پروتئین محلول کل نیز باند با وزن مولکولی برابر وزن مولکولی مورد انتظار برای کیموزین مشاهده گردید. اگرچه این تغییر برطرف کننده عامل ایجاد پدیده نکروزه شدن برگ های گیاه توتون نگردید و از روز چهارم پس از تزریق باکتری *آگروباکتریوم* به برگ های گیاه توتون نکروزه شدن برگ ها آغاز شده و باندهای مشاهده شده در پروتئین کل و پروتئین محلول کل کاملاً از بین رفتند.

خالص سازی پروتئین کیموزین بیان شده در برگ های گیاه توتون: همانطور که بسیاری از محققین گزارش

کرده اند، نوع و محل قرارگیری توالی های کوتاه که عمدتاً برای خالص سازی یا شناسایی های بر پایه روش های بلاتینگ مورد استفاده قرار می گیرند بر میزان بیان پروتئین های نوترکیب اثر گذار می باشد. در این تحقیق از توالی strep II-tag به منظور خالص سازی پروتئین تولید شده و شناسایی با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی علیه strep استفاده گردید. نتایج بدست آمده از خالص سازی پروتئین کیموزین استخراج شده از برگ های گیاه توتون تزریق شده با استفاده از باکتری *آگروباکتریوم* حاوی ناقل ویروسی TMV α chymosin در شکل ۶، b نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان می دهد که توالی strep متاسفانه نتوانسته پروتئین کیموزین را از سایر پروتئین ها جداسازی کند. بنابراین از توالی هیبرید FC (hyFC) برای خالص سازی پروتئین کیموزین استفاده گردید. بدین منظور توالی کیموزین در پائین دست سیگنال ترشخی آلفا آمیلاز جو و بالادست توالی هیبرید FC در ناقل ویروسی TMV همسانه سازی گردید و به صورت موفقیت آمیز به باکتری *آگروباکتریوم تومیفاشینس* انتقال داده شد. نتایج بدست آمده از گیاهان تزریق شده با استفاده از باکتری *آگروباکتریوم* حاوی ناقل ویروسی TMV α chymosin^{hyFC} نشانه های کمتری از نکروزه شدن برگ ها را نشان دادند و اولین نشانه های نکروزه شدن برگ ها پس از ۵ روز مشاهده گردید (شکل ۵-f). نتایج SDS-PAGE پروتئین خالص شده نشان داد که در ژل فقط دو باند مربوط به کیموزین با وزن مولکولی حدود ۳۶ کیلو دالتون و کیموزین متصل شده به بخش FC با وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون وجود داشت (شکل ۷). نتایج وسترن بلاتینگ علیه آنتی بادی IgG و اندازه گیری فعالیت نسبی تشکیل لخته نشان داد که سطح بیان پروتئین کیموزین در مقایسه با سازه های ژنی قبلی بیشتر می باشد (شکل ۷). متاسفانه دلیل بروز نکروزه برگ های گیاه توتون مشخص نگردید و اگرچه با ایجاد تغییراتی در سازه های ژنتیکی این مشکل کمتر شد ولی باعث حل کامل آن نگردید. بنابراین بیان پروکیموزین در برگ های گیاه توتون با استفاده از باکتری *آگروباکتریوم*

تومه‌فائینیس حاوی ناقل ویروسی $TMV\alpha chymosin^{hyFC}$ تا روز پنجم پس از تزریق بررسی گردید و پس از بروز پدیده نکروزه شدن برگها سطح بیان به طور چشمگیری کاهش پیدا کرد.

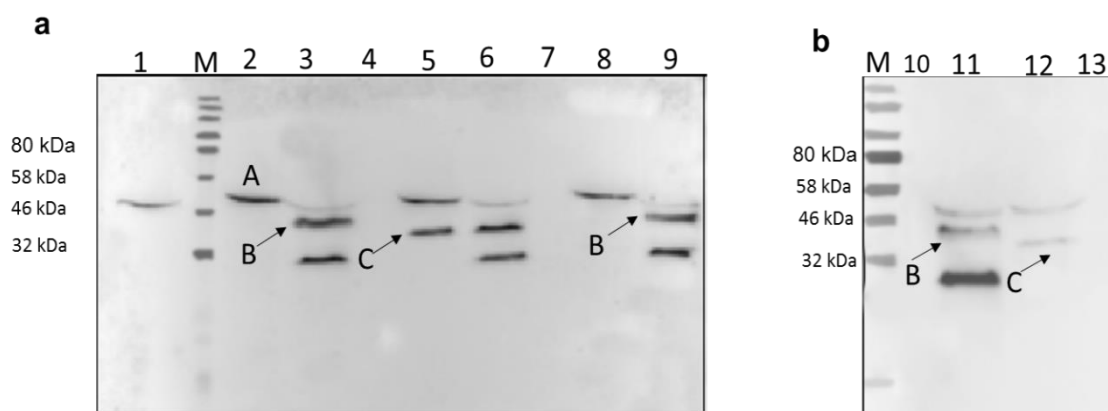


شکل ۵. نکروزه و خشک شدن برگهای گیاه توتون تزریق شده با استفاده از باکتری حاوی ناقل ویروسی $TMV\alpha chymosin$ (برگهای مشخص شده با حرف a) و $TMVprochymosin^{KDEL}$ (برگهای مشخص شده با حرف b) از روز سوم پس از تزریق تا روز هفتم پس از تزریق. مقایسه نکروزه شدن برگها در برگهای گیاه توتون تزریق شده با باکتری آگروباکتریوم تومه فائینیس حاوی ناقل ویروسی $TMV\alpha chymosin^{hyFC}$ (برگهای مشخص شده با حرف c) و $TMVprochymosin^{KDEL}$ (برگهای مشخص شده با حرف d) در روز پنجم پس از تزریق.

Figure 5. Necrosis in the *Nicotiana benthamiana* leaves infiltrated by (a) $TMV\alpha chymosin$ and (b) $TMVprochymosin^{KDEL}$ from 3 dpi to 7dpi. *Nicotiana benthamiana* leaves infiltrated by (c) $TMV\alpha chymosin^{hyFC}$ and (d) $TMVprochymosin^{KDEL}$ after 5 dpi

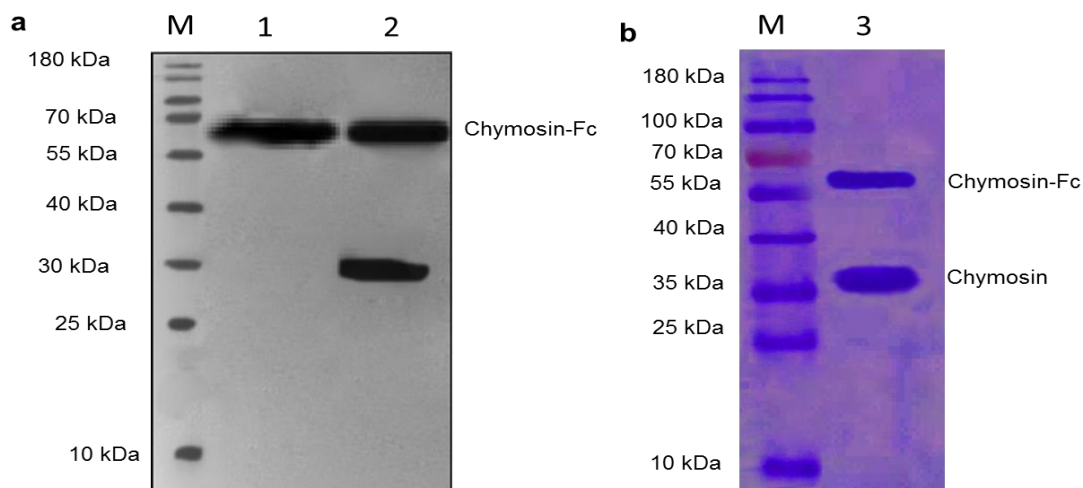
اندازه‌گیری فعالیت نسبی کیموزین و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی: فعالیت تشکیل لخته پروتئین کیموزین فقط بر روی پروتئین خالص شده از برگهای گیاه توتون تزریق شده با استفاده از باکتری آگروباکتریوم تومه‌فائینیس حاوی ناقل ویروسی $TMV\alpha chymosin^{hyFC}$ اندازه‌گیری گردید. بدین منظور از گیاهان تزریق شده از روز دوم پس از تزریق تا روز هفتم نمونه‌گیری گردید. فعالیت نسبی تشکیل لخته به صورت تدریجی از روز دوم تا روز پنجم پس از تزریق افزایش یافت به صورتی که از $3/3$ U/g به $16/8$ U/g رسید و پس از آن با بروز پدیده نکروزه شدن برگها فعالیت نسبی کیموزین به شدت کاهش پیدا کرد. به منظور بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاه توتون پروتئین خالص شده در دماهای مختلف از 10 تا 70 درجه سلسیوس به مدت 30 دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. فعالیت نسبی تشکیل لخته کیموزین با افزایش دما کاهش

یافته به گونه‌ای که بیشترین فعالیت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بدست آمد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس فعالیت تشکیل لخته به صورت کلی از بین رفت (جدول ۲).



شکل ۶. (a) نتایج و سترن بلاتینگ پروتئین کیموزین و پروکیموزین در برگ‌های گیاه توتون تزریق شده با باکتری آگروباکتریوم تومه فاشینیس حاوی ناقل ویروسی TMVprochymosin، TMVachymosin و TMVprochymosin^{KDEL} چاهک ۱: پروتئین محلول کل استخراج شده از برگ‌های تزریق نشده گیاه توتون، چاهک ۲ و ۳: به ترتیب پروتئین محلول کل و پروتئین کل استخراج شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVprochymosin، چاهک ۴، ۵ و ۶ به ترتیب پروتئین فضای بین سلولی، پروتئین محلول کل و پروتئین کل استخراج شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVachymosin، چاهک ۷، ۸ و ۹ به ترتیب پروتئین فضای بین سلولی، پروتئین محلول کل و پروتئین کل استخراج شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVprochymosin^{KDEL}، (A) پروتئین روییسکو، (B) پروکیموزین، (C) کیموزین. (b) خالص‌سازی پروتئین پروکیموزین و کیموزین از نمونه‌های ران شده در ستون ۳ و ۵. چاهک ۱۰: نمونه پروکیموزین خالص شده، چاهک ۱۱: پروتئین کل استخراج شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVprochymosin، چاهک ۱۲: پروتئین محلول کل استخراج شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVachymosin، چاهک ۱۳: نمونه کیموزین خالص شده از برگ تزریق شده با باکتری حاوی سازه TMVachymosin

Figure 6. (a) Immunoblot analysis of pro-chymosin and chymosin in Secreted proteins (AF), total soluble protein (TSP) and total protein (TP) extracts from *N. benthamiana* leaves at 3 days post-infiltration (dpi) using antibodies against the strep II tag. Lane 1: TSP extracted from non-infiltrated *N. benthamiana* leaves served as negative control; M: protein marker; Lane 2 and 3 TSP and TP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVprochymosin respectively; Lane 4, 5 and 6 shows IF, TSP and TP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVachymosin respectively; Lane 7, 8 and 9 shows IF, TSP and TP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVprochymosin^{KDEL} respectively. (A) Rubisco (B) pro-chymosin (C) chymosin. (b) Purification of pro-chymosin and chymosin from lane 3 and 5. Lane 10: purified pro-chymosin; lane 11: TP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVprochymosin; lane 12: TSP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVachymosin; lane 13: purified chymosin from infiltrated *N. benthamiana* leaves by TMVachymosin



شکل ۷. (a) بررسی بیان پروتئین کیموزین متصل شده به هیبرید FC در پروتئین محلول کل (چاهک ۱) و پروتئین کل (چاهک ۲) استخراج شده از برگ گیاه توتون تزریق شده با باکتری حاوی ناقل ویروسی (چاهک ۳) استفاده از آنتی بادی علیه ایمونوگلوبولین G. (b) خالص سازی کیموزین با استفاده از رزین پروتئین A که دارای تمایل اتصال به بخش هیبرید FC از پروتئین محلول کل استخراج شده از برگ گیاه توتون تزریق شده با باکتری حاوی ناقل ویروسی $TMVachymosin^{hyFC}$ در روز پنجم پس از تزریق

Figure 7. (a) Monitoring expression of chymosin^{FC} in total soluble protein (TSP) and total protein (TP) extracts from *N. benthamiana* leaves at 5 days post-infiltration (dpi) using antibodies against IgG. M: Protein marker; Lane 1: TSP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by $TMVachymosin^{hyFC}$; Lane 2: TP extracted from infiltrated *N. benthamiana* leaves by $TMVachymosin^{hyFC}$. (b) Coomassie staining of chymosin^{hyFC} purified by protein A immunoaffinity out of total soluble proteins at 5-days post infiltration

جدول ۲. تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت تشکیل لخته کیموزین تولید شده در برگ گیاه توتون

Table 2. Effect of different temperatures on milk clotting activity of expressed chymosin in tobacco

Temperature (°C)		دما (درجه سلسیوس)					فعالیت باقی مانده Residual activity
70	60	50	40	30	20	10	
nd	16.0±4.0 ^E	52.0±4.0 ^{CD}	88.0±3.0 ^B	96.0±2.0 ^A	57.7±2.5 ^C	44.0±4.5 ^D	

همچنین در مورد تاثیر pH های مختلف بر فعالیت کیموزین خالص سازی شده بیشترین فعالیت تشکیل لخته در pH برابر ۶ و با افزایش pH فعالیت تشکیل لخته کاهش یافته و در pH برابر ۸ فعالیت تشکیل لخته کاملاً از بین رفت (جدول ۳).

جدول ۳. تاثیر شرایط اسیدی مختلف بر فعالیت تشکیل لخته کیموزین تولید شده در برگ گیاه توتون

Table 3. Effect of different acidic conditions on milk clotting activity of expressed chymosin in tobacco

pH						فعالیت باقی مانده Residual activity
9	8	7	6	4.5	2.5	
nd	2.7±1.1 ^D	44.7±4.1 ^B	83.3±3.0 ^A	28.3±2.9 ^C	nd	

نتیجه گیری: در این تحقیق سعی گردید برای اولین بار با استفاده از ناقل های ویروسی و استفاده از پتانسیل های بیان موقت سطح بیان و سرعت تولید پروتئین نوترکیب کیموزین در گیاه افزایش یابد. بنابراین سازه های ژنتیکی مختلف همسانه سازی گردید و میزان بیان پروتئین نوترکیب کیموزین در برگ گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت به طوری که بیشترین فعالیت نسبی بدست آمده برابر ۱۶/۸ U/g بود که در برابر مقادیر دیگر پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از ناقل های ویروسی و با استفاده از بیان موقت مقدار کمی می باشد. مهمترین مشکل مشاهده شده در این تحقیق بروز پدیده نکروزه شدن برگ های گیاه بود که اگرچه در این تحقیق تلاش گردید با تغییرات مختلف تا حدودی این مشکل برطرف گردد ولی این پدیده به طور کامل برطرف نشد. بنظر می رسد با رفع این مشکل مقدار بیان پروتئین نوترکیب افزایش یابد.

سپاسگزاری: بر خود لازم می دانیم از تمامی کارشناسان محترم بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه شیراز و همچنین پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، خصوصاً سرکار خانم مهندس فرزانه آرام به خاطر تمامی زحماتی که در طی این پروژه متقبل شدند تشکر و قدردانی به عمل آوریم. همچنین از دکتر Alexandra Castilho استاد گروه ژنتیک گیاهی دانشگاه University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU) کشور اتریش به خاطر راهنمایی های ارزشمند و فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می آوریم.

منابع

- احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی مسعود و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلستاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰ (۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Arima K, Iwasaki S, Tamura G (1967) Milk clotting enzyme from microorganisms: Part I. Screening test and the identification of the potent fungus part II. The enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agri Biologic Chem* 31, 540-551.
- Cardoza R, Gutiérrez S, Ortega N et al. (2003) Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnol Bioeng* 83, 249-259.
- Conley AJ, Zhu H, Le LC et al. (2011) Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnol J* 9, 434-444.
- Doran PM (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trend Biotechnol* 24, 426-432.
- Dorokhov YL, Sheveleva AA, Frolova OY, et al. (2007) Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. *Tuberculosis* 87, 218-224.
- Espinoza-Molina JA, Acosta-Muñiz CH, Sepulveda D et al. (2016) Codon Optimization of the “*Bos Taurus Chymosin*” Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 58, 657-664.
- Feng Z, Zhang L, Han X, Zhang Y (2010) Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis*. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 895-901.

- Fischer R, Stoger E, Schillberg S et al. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7, 152-158.
- Gils M, Kandzia R, Marillonnet S et al. (2005) High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J* 3, 613-620.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C et al. (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *PNAS* 103, 14701-14706.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23, 2042-2048.
- Huang Z, LePore K, Elkin G, et al. (2008) High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnol J* 6, 202-209.
- Huang Z, Santi L, LePore, K et al. (2006) Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 24, 2506-2513.
- Jiang X, Yin M, Chen P, Yang Q (2012) Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 2087-2093.
- Kawaguchi Y, Kosugi S, Sasaki K et al. (1987) Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agri Biologic Chem* 51, 1871-1877.
- Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish V (2010) Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit Rev Biotechnol* 30, 243-258.
- Liu WG, Wang YP, Zhang ZJ et al. (2017) Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. *Protein Expr Purif* 135, 78-82.
- Ma T, Li ZY, Wang S (2019) Production of Bioactive Recombinant rPA (Reteplase) by Virus-based Transient Expression System in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 10, 1225-1234.
- Matoba N, Husk AS, Barnett BW, et al. (2010) HIV-1 neutralization profile and plant-based recombinant expression of actinohivin, an Env glycan-specific lectin devoid of T-cell mitogenic activity. *PloS One* 5, 11143-11154.
- Menzella HG (2011) Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 10, 15-24.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.

- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Nausch H, Mikschofsky H, Koslowski R et al. (2012) High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. *PloS One* 7, 1-16.
- Pinkhasov J, Alvarez ML, Rigano MM et al. (2011) Recombinant plant-expressed tumour-associated MUC1 peptide is immunogenic and capable of breaking tolerance in MUC1. Tg mice. *Plant Biotechnol J* 9, 991-1001.
- Schneider J, Castilho A, Pabst M et al. (2015) Characterization of plants expressing the human β 1, 4-galactosyltransferase gene. *Plant Physiol Biochem* 92, 39-47.
- Sheen S (1983) Biomass and chemical composition of tobacco plants under high density growth. *Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research* 12, 35-42.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (In Persian).
- Tusé D, Tu T, McDonald KA (2014) Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *BioMed Res Int* 2014, 1-16.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S et al. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trend Biotechnol* 21, 570-578.
- Tyagi A, Kumar A, Mohanty AK et al. (2017) Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT* 84, 733-739.
- Ward M, Wilson LJ, Kodama KH et al. (1990) Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnol* 8, 435-440.
- Wei ZY, Zhang YY, Wang YP et al. (2016) Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *Int J Mol Sci* 17, 624-632.
- Zhang W, Song X, He X, Gan B (2011) Optimization of culture media of *Bacillus licheniformis* with high yield of chymosin. *China Brew* 2, 24-32.