

Designing of polyoleosin-proinsulin fusion gene and its transformation to rapeseed (*Brassica napus* L.)

Najmeh Ayat-Fard

M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.

Esmail Ghasemi-Goujani

Assistant Professors, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran. Tel: 09378005535, Email: ghasemi@ramin.ac.ir

Alireza Shafei-Nia

Assistant Professors, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.

Payam Pourmohammadi

Assistant Professors, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.

Abstract

Objective

The use of plant Oleosin gene is a recommended method for large-scale, easier and cheaper production of recombinant protein. Attachment of oleosin gene to target gene cause to accumulate recombinant protein on seed oil bodies surface. Recent researches indicate that application of tandem Oleosin Genes (polyoleosin) fused to the target gene to facilitate recombinant protein purification is more efficient than single Oleosin.

Materials and methods

In present research, we designed a synthetic fusion fragment containing 5'- Kozak sequence - His-tags, three Oleosin Genes, a proteolytic site for a peptidase enzyme, Proinsulin protein, and a tetranucleotide stop codon. This synthetic sequence was cloned in binary vector pBI121 by enzymatic digestion and ligation method. Then for transformation of cotyledon and hypocotyl

explants of Canola, confirmed recombinant construct is transformed to Agrobacterium LBA4404 strain. Probable transgenic shoots were regenerated on selective medium containing kanamycin after 4-6 weeks.

Results

The analysis of transgenic shoots at DNA level was performed by PCR and amplification of a 120-bp fragment indicate integration of fusion gene in transgenic plant genome. Finally, the Proinsulin gene transcription was also confirmed by RT-PCR.

Keywords: *Polyoleosin, Human Proinsulin, Recombinant Protein, Rapeseed.*

Citation: Ayat-Fard N, Ghasemi-Goujani E, Shafei-Nia A, Pourmohammadi P (2019) Designing of polyoleosin-proinsulin fusion gene and its transformation to rapeseed (*Brassica napus* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 10 (3), 1-16.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (3), 1-16.

DOI: 10.22103/jab.2018.2204

Received: June 19, 2018; Accepted: November 6, 2018

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

طراحی تلفیق ژنی پلی اولتوزین- پروانسولین و انتقال آن به گیاه کلزا (*Brassica napus L.*)

نجمه آیت فرد

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

اسماعیل قاسمی گوجانی

استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران. تلفن: 09378005535، ایمیل: ghasemi@ramin.ac.ir

علیرضا شافعی نیا

استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

پیام پورمحمدی

استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

تاریخ دریافت: 1397/03/29، تاریخ پذیرش: 1397/08/15

چکیده

هدف: استفاده از ژن اولتوزین گیاهی یک روش مناسب برای تولید و تجمع پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد و همچنین استخراج راحت تر و ارزان تر می باشد. اتصال اولتوزین به ژن موردنظر، موجب هدف گیری پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی بذر می شود. در سال های اخیر، به منظور افزایش کارایی اولتوزین در تولید پروتئین نوترکیب، چند ژن اولتوزین (پلی اولتوزین)، به ژن هدف متصل می شود. این امر سبب تولید و تجمع پروتئین نوترکیب در سطوح اقتصادی در بذر می گردد.

مواد و روش‌ها: از این رو برای افزایش میزان تجمع پروتئین پروانسولین در بذر گیاه کلزا، یک سازه‌ی تلفیقی پلی‌اولنوزین-پروانسولین طراحی و ساخته شد. در طراحی این توالی به ترتیب از سمت 5' توالی، یک توالی کزاک، یک برچسب هیستیدین، سه ژن اولنوزین، یک جایگاه پروتئولیتیکی برای پروتاز، ژن پروانسولین و یک کدون پایان ترانوکلئوتید قرار گرفت. این تلفیق ژنی پس از سنتز در ناقل pUC57 قرار داده شد. تلفیق ژنی، پس از هضم آنزیمی به وسیله‌ی آنزیم‌های BamHI و SacI از pUC57 جداسازی و در ناقل دوتایی pBI121 همسانه‌سازی گردید. پس از تأیید درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 با استفاده از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی، ناقل نو ترکیب به سویه‌ی LBA4404 اگروباکتریوم انتقال داده شد. این باکتری برای تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل کلزا مورد استفاد قرار گرفت. نوساقه‌های باززایی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند.

نتایج: آنالیز گیاهان تراریخته در سطح DNA با استفاده از روش PCR انجام و یک قطعه‌ی 120 جفت بازی (مطابق با بخشی از ژن پروانسولین) تکثیر شد. همچنین تکثیر این قطعه‌ی 120 جفت‌بازی با روش RT-PCR، بیانگر بیان ژن هدف در گیاهان تراریخته بود.

واژگان کلیدی: پلی‌اولنوزین، پروانسولین انسانی، پروتئین نو ترکیب، کلزا.

مقدمه

استفاده از گیاهان به عنوان سیستم بیانی برای تولید پروتئین نو ترکیب بر سیستم‌های مبتنی بر باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات و سلول‌های پستانداران برتری دارد. گیاهان به آسانی تراریخته می‌شوند و هزینه‌ی تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان پایین است. همچنین گیاهان به دلیل آلودگی کمتر به پاتوژن‌های جانوری، سیستم‌های ایمن تری برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب خصوصاً پروتئین‌های دارویی می‌باشند (Bhatla *et al.*, 2010). علی‌رغم مزایای سیستم‌های گیاهی در تولید موفقیت‌آمیز پروتئین نو ترکیب، هضم پروتئینی، مانع قابل توجهی برای تجمع بالای پروتئین‌های خارجی بوده است. یک راه برای کم کردن هضم پروتئینی، هدف‌گیری پروتئین نو ترکیب به بافت‌های پایدار همانند بذر است (Schnell *et al.*, 2010). در بذر گیاهان، با وجود محتوای پروتئینی بالا، پروتئین هترولوگوس نیز به خوبی جمع‌آوری می‌شود. همچنین بدلیل فعالیت متابولیکی پایین در محیط نسبتاً خشک بذر، پروتئین‌های هترولوگوس برای چندین سال زیست‌فعال باقی خواهند ماند (Chen *et al.*, 2014). با وجود مزایای فراوان بذرها، تولید پروتئین در حجم زیاد و همچنین جداسازی و خالص‌سازی پروتئین‌های تولید شده در بذر مشکل و هزینه‌بر است (Ling, 2007). تحقیقات نشان داده است چنانچه پروتئین هدف به پروتئین اولنوزین (فراوان‌ترین پروتئین اختصاصی بذر) متصل شود، می‌توان تا حدود زیادی مشکلات و هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی پروتئین هدف را کاهش داد (Ling, 2007). اولنوزین‌ها در سطح اجسام روغنی موجود در دانه‌های روغنی جاسازی شده‌اند. با استفاده از اولنوزین می‌توان پروتئین نو ترکیب را به طور دقیق به اجسام روغنی بذر هدف‌گیری نمود. بدلیل مقدار بالای تری‌آسیل گلیسرئید (TAGs) اجسام روغنی،

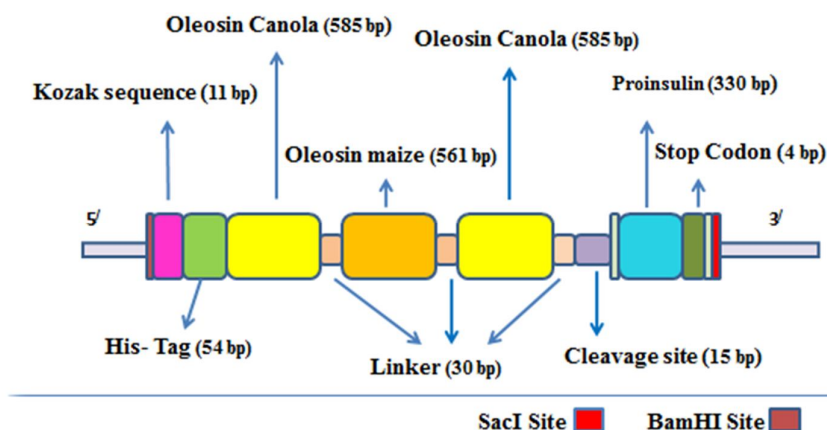
این بخش و پروتئین‌های متصل به آن به آسانی از سایر بخش‌ها جدا می‌شود (Boothe *et al.*, 1997). با کاربرد این روش بیش از 90% آلودگی‌های پروتئینی بذر به دنبال یک ساتریفیوژ ساده حذف خواهند شد (Parmenter *et al.*, 1995). علی‌رغم مزایای اولئوزین؛ هنوز کاربرد اولئوزین برای تولید اقتصادی پروتئین مناسب نمی‌باشد (Conley *et al.*, 2011). در سال‌های اخیر، جهت افزایش کارایی الحاق اولئوزین، از سیستم چند اولئوزینی یا پلی‌اولئوزین¹ استفاده شده است. در این روش، چند ژن اولئوزین به صورت متوالی به هم وصل، سپس این زنجیره‌ی اولئوزینی به ژن هدف متصل می‌شود. پلی‌اولئوزین در مقایسه با تک اولئوزین، سبب افزایش 18 برابری در تجمع پروتئین نوترکیب خواهد شد (Banilas *et al.*, 2011). در این پژوهش، با توجه به اهمیت گیاهان در تولید ارزان پروتئین نوترکیب؛ یک سازه‌ی ژنی برای تولید پروتئین هدف، در بذر گیاهان طراحی گردید. از طرفی در بین پروتئین‌های نوترکیب انسولین بیشترین حجم پروتئین نوترکیب (تولید سالانه 13 تن پروتئین) را به خود اختصاص داده است (Boothe *et al.*, 2010). همچنین به دلیل مشکلات مربوط به تأمین انسولین برای بیماران، همچنین هزینه بالای تهیه‌ی آن، تولید انسولین در سیستم‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Boothe *et al.*, 2010). بنابراین در این پژوهش، تلاش شد تا با طراحی یک سازه‌ی پلی‌اولئوزینی، امکان تولید انبوه، ارزان و اقتصادی این پروتئین ارزشمند، در بذر کلزا فراهم شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5 α به عنوان میزبانی برای مراحل مختلف همسانه‌سازی استفاده شد. همچنین برای تراریختی گیاهان از باکتری آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه‌ی LBA4404 و پلاسمید pBI121 حاوی پیش-برنده‌ی CaMV35S استفاده گردید. گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) رقم Okapi در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی تلفیق ژنی پلی‌اولئوزین-پروانسولین (شکل 1)، توالی‌های کمکی و تنظیمی به منظور افزایش و کارایی بیان، به ژن پروانسولین متصل گردید. به این ترتیب که از سمت 5' به 3' توالی کزاک، توالی برچسب هیستیدین، پلی‌اولئوزین شامل اولئوزین‌های کلزا BN-III (شماره دسترسی² X61937) و اولئوزین 18 کیلودالتون ذرت (شماره دسترسی³ J05212)، توالی اتصال‌دهنده³ (گالایسین، سرین) بین اولئوزین‌ها، توالی ژن پروانسولین انسانی با شماره‌ی دسترسی AY899304 و کدون پایان تترانوکلئوتید قرار گرفت. توالی به گونه‌ای طراحی گردید که رمز ژنتیکی خاتمه از انتهای توالی‌های اولئوزینی حذف شد. سپس تمایل کدونی توالی ژنی پلی‌اولئوزین-پروانسولین؛ توسط پایگاه اطلاعاتی تمایل کدونی (Codon Usage Database) برای بیان در کلزا بهینه شد.

1-Polyoleosin
2-Accession Number
3-Linker

پس از تغییر تمایل کدونی، دو طرف این سازه‌ی ژنی جایگاه آنزیم‌های برشی SacI و BamHI تعبیه شد. منحصر به فرد بودن جایگاه این آنزیم‌های برشی، توسط نرم افزار آنلاین Webcutter تأیید گردید. در نهایت پس از طراحی تلفیق ژنی و تغییر تمایل کدونی آن مطابق با گیاه کلزا، توالی مذکور جهت سنتز به آمریکا (شرکت kapa) ارسال گردید.



شکل 1. شمایی از تلفیق ژنی پلی‌اولئوزین-پروانسولین. 1) از سمت 5' به ترتیب، توالی کزاک مختص دولپه‌ای‌ها. 2) برجسب هیستیدین برای خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب. 3) اولئوزین‌های کلزا و ذرت. 4) توالی اتصال دهنده بین اولئوزین‌ها. 5) جایگاه برشی برای آنزیم پروتئناز. 6) پروانسولین. 7) کدون پایان تترانوکلئوتید

Figure 1. Synthetic polyoleosin-proinsulin fusion gene. 1) From 5' side respectively, the dicots kozak sequence. 2) Histidin-Tag for recovery of recombinant protein. 3) Canola and maize oleosins. 4) Oleosins linker sequence. 5) Cleavage Site for protease enzyme. 6) Human Proinsulin gene. 7) A tetranucleotide stop codon

تلفیق ژنی پس از سنتز و قرارگیری در ناقل pUC57 به صورت خشک شده توسط انجماد سخت¹ دریافت شد. پس از اضافه کردن آب مقطر استریل به سازه‌ی ژنی، این سازه به سلول‌های مستعد *E. coli* منتقل گردید (Sambrook *et al.*, 1989). در مرحله بعد، از کلونی‌های مثبت رشد کرده روی محیط انتخابی (حاوی آمپی‌سیلین)، عمل استخراج پلاسمید انجام شد (کیت خالص‌سازی شرکت Gen). (All)

سپس پلاسمید تخلیص شده، با استفاده از آنزیم‌های برشی SacI و BamHI مورد هضم دوتایی قرار گرفته و تلفیق ژنی با طول 2267 جفت باز از آن جدا شد. ناقل pBI121 نیز توسط آنزیم‌های برشی SacI و BamHI، برش یافت و ژن *gus* از آن حذف گردید (دستورالعمل شرکت Fermentas). در ناقل pBI121، تلفیق ژنی با طول 2267 جایگزین ژن *gus* و پایین دست پیش‌برنده‌ی CaMV35S

همسانه‌سازی گردید. سازه‌ی تهیه شده به سلول‌های مستعد E. coli منتقل گردید. به منظور شناسایی کلونی‌های حاوی ناقل نو ترکیب صحیح، بر روی کلونی‌های رشد کرده در محیط انتخابی (کانامایسین)، عمل کلونی-PCR با استفاده از آغازگرهای رفت For-col و برگشت Rev-col (جدول 1) انجام شد. این آغازگرها، منجر به تکثیر قطعه‌ای با طول 527 جفت باز در کلونی‌های نو ترکیب گردیدند، که با نتیجه مورد انتظار مطابقت داشت. پس از تأیید حضور تلفیق ژنی در ناقل pBI121 با استفاده از کلونی-PCR و هضم آنزیمی، جهت تأیید نهایی و حصول اطمینان از درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 عمل توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای عمومی طراحی شده از pBI121 صورت پذیرفت. سپس آنالیزهای لازم با استفاده از نرم‌افزار BLAST و برنامه‌ی Bio Edit انجام شد. نتیجه توالی‌یابی صحت درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 را تأیید نمود.

جدول 1. آغازگرهای مورد استفاده جهت انجام کلونی-PCR و RT-PCR

Table 1. Used Primers for Colony-PCR and sequencing

آغازگرها Primers	توالی Sequence (5'-3')	دمای اتصال Annealing Temperature	محل اتصال Annealing region of primers
For-col	5'/TGACGCACAATCCCCTATC 3'	59 °C	pBI121
Rev-col	5'/CACGACGTTGTAAAACGACG 3'	59 °C	Fusion gene
For-M13	5'/TGACCGGCAGCAAAATG 3'	56 °C	pBI121
Rev-M13	5'/CAGGAAACAGCTATGA 3'	56 °C	pBI121
For-ins	5'/TTCAGGTTGGACAGGTTGAG 3'	60/5°C	Proinsulin
Rev-ins	5'/GAGAGCAGATAGAGGTGCAG 3'	60/5°C	Proinsulin

ضد عفونی بذور کلزا در شرایط استریل (زیر هود لامینار)، با استفاده اتانول 70% به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم 2/5 درصد به مدت 20 دقیقه انجام گردید. سپس این بذور 3-4 مرتبه با آب مقطر استریل آبشویی شدند. به منظور جوانه‌زنی بذور و تهیه‌ی ریزنمونه، بذور در شرایط 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 روز نگهداری شدند (Bhalla and Singh, 2008). تراریختی مطابق با روش اوهااتا (Ohta et al., 1990)، با اندکی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که 5 روز پس از جوانه‌زنی بذور، ریزنمونه‌های برگ‌ی (برگ‌های کوتیلدونی از انتهای‌ترین محل دم‌برگ با حذف مریستم از انتهای دم‌برگ) و همچنین ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل با طول 2 میلی‌متر تهیه شد. یک روز قبل از انجام تلقیح، یک تک کلون از اگروباکتی حامل سازه‌ی تلفیق ژنی pBI121 انتخاب و در محیط

کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (100mg/L) و ریفاپیسین (50mg/mL) در دمای 28 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد، با رسیدن OD باکتری رشد کرده به حدود 1-0/6، سوسپانسیون باکتریایی تحت سرعت 5000 نیروی نسبی سانتریفیوژ (RCF) و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی (LB) تحت شرایط استریل حذف و محیط کشت تلقیح (نمک‌های محیط MS جامد، 20 گرم در لیتر گلوکز، BAP 0/5 mg/L، 2,4,D 0/5 mg/L) به رسوب باقی مانده اضافه شد و باکتری کاملاً در آن حل گردید. امولسیون باکتری به مدت 45 دقیقه در تاریکی و دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا باکتری به محیط کشت عادت کند. پس از آماده کردن سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه‌ها به مدت 1 ثانیه در تماس با اگروباکتریوم حاوی سازه‌ی ژنی قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها بر روی محیط هم‌کشت (نمک‌ها و مواد محیط MS جامد، 20 گرم در لیتر گلوکز، BAP 0/5 mg/L، 2,4,D 0/5 mg/L) قرار داده شدند و به مدت 2 روز در تاریکی و دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛ تا احتمال ورود اگروباکتریوم به آنها افزایش یابد (Baht *et al.*, 2012). بازرایی گیاهان تراریخته احتمالی مطابق دستورالعمل Alam *et al.* (2013) صورت گرفت. در این مرحله ریزنمونه‌ها روی محیط کشت انتخابی کالوس‌دهی شامل محیط هم‌کشتی به اضافه‌ی 100 mg/l کانامایسین (به منظور گزینش گیاهچه‌های تراریخته) و 500 mg/l سفوتاکسیم (برای کنترل اگروباکتریوم) انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار واکشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط بازرایی انتخابی (نمک‌ها و مواد محیط MS جامد، 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP، 0/5 میلی‌گرم در لیتر kinetin، 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA) با همان نسبت آنتی‌بیوتیکی مرحله قبل انتقال داده شدند. هر 14 روز یک بار عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط بازرایی صورت پذیرفت. سپس نوساقه‌های بدست آمده، به محیط ریشه‌زایی انتخابی (نمک‌ها و مواد محیط MS جامد، 2/5 میلی‌گرم در لیتر NAA، 0/5 میلی‌گرم در لیتر BAP، 200 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و 50 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین) انتقال داده شد. در نهایت گیاهان تراریخته‌ی احتمالی، جهت انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

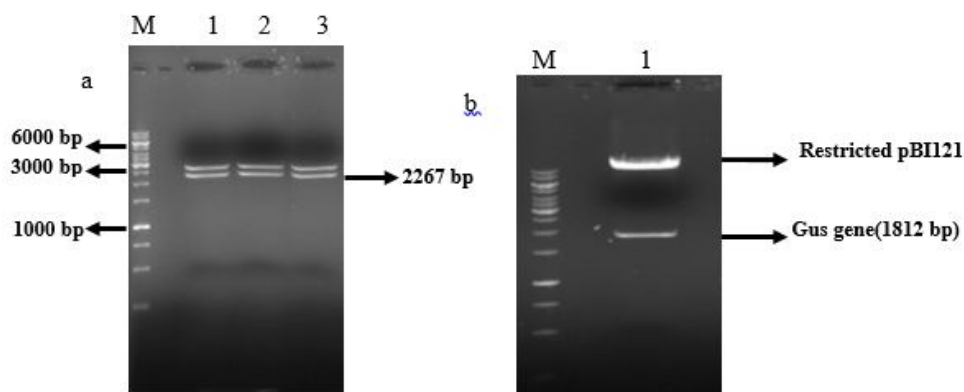
از برگ‌های گیاهان تراریخته‌ی احتمالی و شاهد (غیرتراریخته)، استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Richards *et al.*, 1994) انجام شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین واکنش PCR بر روی گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد.

برای بررسی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA از گیاهان شاهد و تراریخته‌ی احتمالی با استفاده از کیت تخلیص RNA (QIAGEN) انجام شد. سپس خلوص و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA در نمونه‌ی RNA تخلیص شده، از DNase استفاده شد. ساخت رشته‌ی cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Fermentas انجام شد. عمل RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین (رفت For-ins و برگشت Rev-ins) صورت پذیرفت.

نتایج

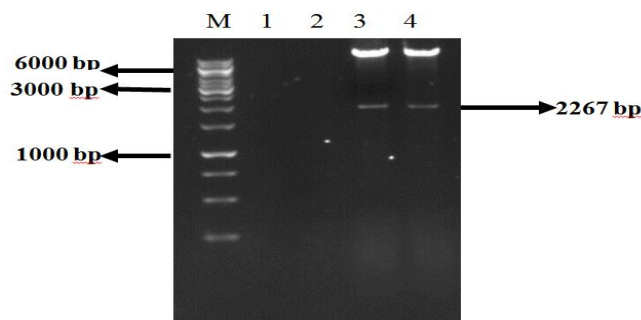
به منظور همسانسازی تلفیق ژنی پلی‌اولتوزین-پروانسولین در ناقل دوتایی گیاهی pBI121، ابتدا با استفاده از دستورالعمل هضم آنزیمی دوتایی، تلفیق ژنی (با اندازه جفت باز 2267) از ناقل pUC57 جدا سازی شد. همچنین، ناقل pBI121 با استفاده از آنزیم‌های BamHI و SacI برش یافت و ژن گزارشگر gus با اندازه 1812 جفت باز از ناقل جدا شد. نتایج حاصل از این برش‌ها در شکل 2 آمده است. پس از انجام واکنش اتصال، محصول واکنش به باکتری *E. coli*، منتقل شد. پس از ظهور کلونی‌های تراریخته احتمالی بر روی محیط کشت انتخابی، به منظور تأیید نو ترکیب بودن کلونی‌ها، تکنیک کلونی-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (آغازگراختصاصی پروانسولین (For-ins) و آغازگر طراحی شده از توالی بالادست ختم‌کنندهی Nos (Rev-col)) صورت گرفت. این آغازگرها منجر به تکثیر قطعه‌ای با طول حدود 527 جفت‌باز شدند، که با نتیجه مورد انتظار مطابقت داشت. علاوه بر این، عمل هضم دوتایی (با استفاده از آنزیم‌های BamHI و SacI) نیز به منظور تأیید درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 صورت گرفت. جداسازی قطعه‌ی 2267 جفت بازی نشان‌دهنده‌ی درج تلفیق ژنی در این ناقل بود (شکل 3). در نهایت به منظور تأیید نهایی حضور تلفیق ژنی در ناقل pBI121، عمل توالی‌یابی توسط آغازگرهای عمومی M13-20 (رفت For-M13-20 و برگشت Rev-M13-20) صورت گرفت. نتیجه‌ی توالی‌یابی صحت سازه‌ی ژنی ساخته شده و درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 را تأیید نمود. سپس سازه‌ی ژنی ساخته شده با روش انجام داد و ذوب (Holsters *et al.*, 1978)، به آگروباکتریوم منتقل و حضور سازه‌ی ژنی در آگروباکتریوم با روش کلونی-PCR تأیید گردید (شکل 4). از آگروباکتریوم حاوی سازه‌ی ژنی برای تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیل استفاده شد. این ریزنمونه‌ها از گیاهان 5 روزه‌ی کلزا تهیه گردید. ریزنمونه‌ها به مدت 4 هفته در محیط کالوس‌دهی قرار داشتند. سپس کالوس‌ها به محیط باززایی انتقال داده شدند. اولین ساقه‌های تراریخته‌ی احتمالی در هفته دوم از قرارگیری کالوس‌ها بر روی محیط باززایی، ظاهر شدند. پس از یک ماه ساقه‌ها به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شد و حدود 2 تا 3 هفته بعد اولین ریشه‌ها پدیدار شدند (شکل 5).

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی در سطح DNA، استخراج DNA از گیاهان تراریخته‌ی احتمالی صورت گرفت، سپس برای تأیید حضور الحاق ژنی در ژنوم گیاهان تراریخته، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (رفت For-ins و برگشت Rev-ins) انجام شد. تکثیر قطعه‌ی 120 جفت‌بازی مربوط به ژن پروانسولین، نشان‌دهنده‌ی درج تلفیق ژنی در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی بود. پس از تأیید درج ژن در ژنوم برخی گیاهان تراریخته‌ی احتمالی، برای تأیید نسخه‌برداری از روی تلفیق ژنی در گیاهان تراریخته، آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (رفت For-ins و برگشت Rev-ins) انجام شد. تکثیر قطعه‌ی 120 جفت‌بازی نشان‌دهنده‌ی بیان ژن پروانسولین (در سطح RNA) در تعدادی از گیاهان تراریخته‌ی احتمالی بود. همانند مرحله قبل در گیاه شاهد (غیر تراریخته) بانندی مشاهده نشد (شکل 6).



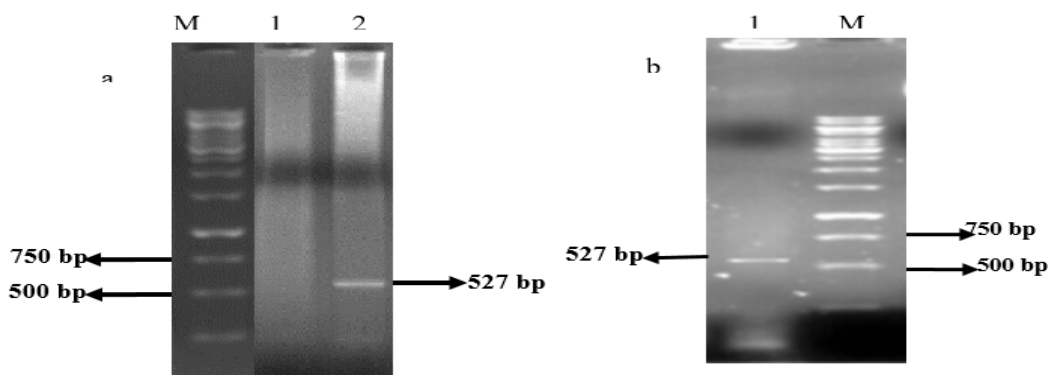
شکل 2. a) برش ناقل تلفیق ژنی pUC57+ با آنزیم‌های BamHI و SacI و جداسازی تلفیق ژنی. M) سایز مارکر 1Kb (شرکت Fermentas). 1، 2 و 3) جدا شدن تلفیق ژنی با اندازه 2267 جفت باز از ناقل pUC57. b) برش pBI121 با آنزیم‌های BamHI و SacI و جدا شدن gus (شرکت Fermentas). 1) جدا شدن ژن gus با اندازه 1812 جفت باز

Figure 2. a) Digestion of pUC57+gene fusion vector by BamHI and SacI enzymes and isolation of synthetic fusion gene. M) 1Kb ladder (Fermentas) 1,2 and 3) Arrows indicate position of the fusion gene after digestion. b) Digestion of pBI121 vector by BamHI and SacI enzymes and removing of gus gene. M) 1Kb ladder (Fermentas) 1, Arrows indicate the position of the gus gene and pBI121 after digestion



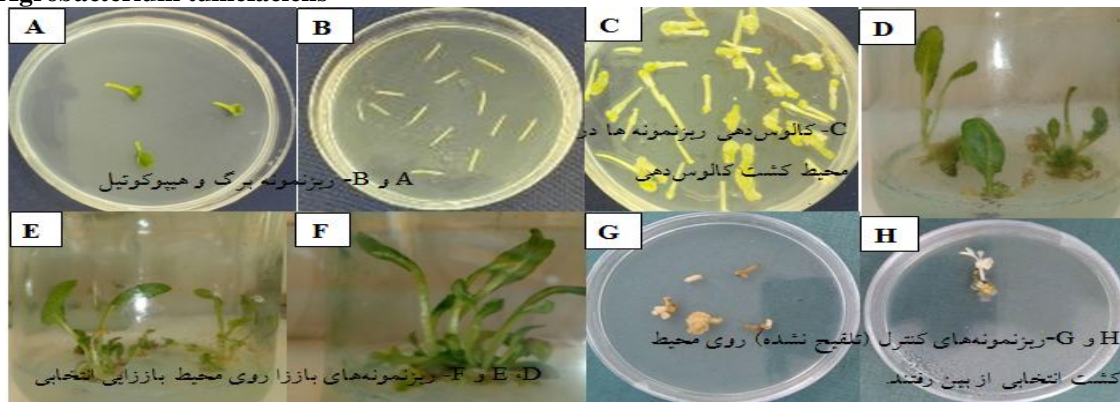
شکل 3. تأیید حضور تلفیق ژنی در pBI121 توسط برش همسانه‌های نوترکیب احتمالی (با آنزیم‌های BamHI و SacI) به منظور جداسازی تلفیق ژنی. M) سایز مارکر 1Kb (شرکت Fermentas). 3 و 4) هضم آنزیمی همسانه‌های صحیح و جدا شدن تلفیق ژنی

Figure 3. Confirmation of fusion gene presence into pBI121 by enzymatic digestion of probable recombinant clones (by BamHI and SacI enzymes) for isolation of synthetic fusion gene. M) 1Kb ladder (Fermentas) 3 and 4) Enzymatic digestion of correct clones and releasing of fusion gene



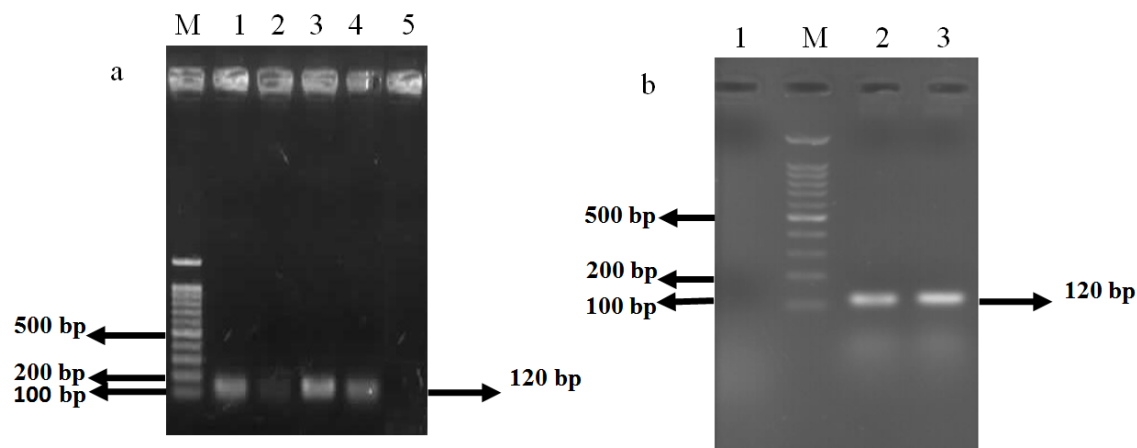
شکل 4. a) تأیید حضور سازه تلفیق ژنی +pBI121 در باکتری با استفاده از کلونی PCR. چاهک 1. نشان دهنده عدم دریافت پلاسمید نوترکیب توسط *E. coli*. 2. تکثیر یک قطعه 527 جفت بازی از کلونی دارای سازه تلفیق ژنی +pBI121. M سایز مارکر 1 kb (شرکت Fermentas). b) تأیید حضور سازه ژنی در اگروباکتری با استفاده از کلونی PCR. چاهک M سایز مارکر 1 kb (شرکت Fermentas). 2. چاهک 1 تکثیر قطعه 527 جفت بازی در کلونی دارای سازه ژنی را نشان می دهد

Figure 4. a) Confirmation of recombinant pBI121 (gene fusion+pBI121 construct) presence in bacteria by Colony-PCR. Lane 1, Colony PCR result of recombinant *E. coli*. Lane 2. Amplification of a 527-bp fragment from positive colonies M) 1Kb ladder (Fermentas). b) Confirmation of recombinant pBI121 presence in *Agrobacterium tumefaciens* by Colony-PCR. M) 1Kb ladder (Fermentas) 1. Amplification of a 527-bp fragment indicating recombinant pBI121 presence in *Agrobacterium tumefaciens*



شکل 5. مراحل مختلف تولید گیاهان کلزای تراریخته واجد تلفیق ژنی. (A و B)، ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ برای تلقیح. (C)، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت کالوس دهی انتخابی حاوی 100 میلی گرم بر لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین. (D، E و F)، ریزنمونه‌های باززا شده پس از حدود 8 هفته قرارگیری روی محیط باززایی انتخابی. (G و H)، ریزنمونه‌های تلقیح نشده پس از قرارگیری روی محیط حاوی کانامایسین سفید شده و از بین رفتند

Figure 5. Process of transgenic canola (containing the fusion gene) production, (A and B), Inoculation of hypocotyl and leaf explants. (C), Explants in selective callusing medium containing 100 mg/l kanamycin. (D, E and F). Regenerated explants after 8 weeks exposing on selective regeneration medium. (G and H), Control explant on selective medium, were bleached and died



شکل 6. b) تأیید اولیه وجود تلفیق ژنی در ژنوم گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون PCR. چاهک 1. نتیجه آزمون PCR روی گیاهان کلزای غیر تراریخته (شاهد). چاهک 2. سایز مارکر 100 bp (شرکت Fermentas). چاهک 3 و 2. شماره 3 تکثیر یک قطعه 120 جفت بازی (مطابق با ژن پروانسولین) در گیاهان تراریخته احتمالی. a) نتایج تأیید رونویسی سازه ژنی در برگ‌های کلزای تراریخته به روش RT-PCR. چاهک 1 تا 4. تکثیر یک قطعه 120 جفت بازی نشان دهنده بیان ژن پروانسولین در گیاهان تراریخته. چاهک 5. نشان دهنده عدم مشاهده باندها در گیاه شاهد غیر تراریخته

Figure 6. b) Confirmation of fusion gene integration in transgenic plant genome by PCR. Lane 1, PCR results of non-transformed Plants (control). Lane 2, 100 bp ladder (Fermentas). Lane 2 and 3, amplification of a 120-bp fragment (according to proinsulin gene) in transgenic plants. a) Confirmation of fusion gene transcription in transgenic shoots by RT-PCR, Lane 1 to 4, amplification of a 120-bp fragment indicating fusion gene transcription in transgenic plants. Lane 5 represents lack of amplified fragment in non-transformed Plants (control)

بحث

یکی از محدودیت‌های اصلی گیاهان در تولید پروتئین نوترکیب، سطح تجمع پایین پروتئین می‌باشد. متأسفانه ژن‌ها به سختی در میزبان‌های هترولوگوس بیان می‌شوند. بنابراین طراحی مجدد کل توالی ژن و درج توالی‌های کمکی در کنار ژن هدف، سبب افزایش بیان پروتئین در میزبان هترولوگوس خواهد شد (Gustafsson *et al.*, 2004).

توالی‌هایی مانند؛ کزاک، کدون پایان، پپتید نشانه، برچسب خالص‌سازی و همچنین بهینه کردن تمایل کدونی ژن هدف برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب، از بخش‌های ضروری در طراحی ژن‌های ساختگی می‌باشند. در پژوهش حاضر یک قطعه تلفیقی چند بخشی که از سمت

5¹ به 3¹ توالی به ترتیب دربرگیرنده توالی کزاک، برچسب خالص‌سازی، پپتید نشانه (اولئوزین)، توالی اتصال‌دهنده بین اولئوزین‌ها، ژن هدف (پروانسولین) و کدون پایان تترانوکلئوتیدی بود، طراحی و ساخته شد. یک اصل مهم در طراحی ژن‌های ساختگی به منظور افزایش بیان ژن هدف، بهینه کردن تمایل کدونی آن مطابق با تمایل کدونی میزبان هتروولوگوس می‌باشد. ممکن است ژن هدف دارای کدون‌های محدود کننده برای فرآیند ترجمه باشد. این مشکل زمانی بزرگ تر می‌شود که هدف ما از انتقال ژن، زراعت مولکولی و تولید حجم بالای از پروتئین نوترکیب باشد. بنابراین، یکی از ضروریات برای بیان کارای و افزایش بیان ژن هدف، تغییر تمایل کدونی ژن هدف مطابق با تمایل کدونی میزبان می‌باشد (Perlak *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 2000; Hiwasa-Tanase and Nyarubona, 2011). از این رو، در پژوهش حاضر، تمایل کدونی ژن پروانسولین انسانی برای افزایش بیان در گیاه میزبان (کلزا) بهینه شد. توالی کزاک نیز یک توالی بسیار مهم دیگر است که در طراحی ژن‌های ساختگی به منظور افزایش بیان پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. قرارگیری توالی کزاک در ابتدای ناحیه کد کننده ژن انتقالی، سبب افزایش کارایی و پایداری ترجمه ژن خواهد شد و میزان محصول ژن را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد (Kozak, 1999). بنابراین با توجه به اثر مثبت کزاک در افزایش بیان ژن هدف (Ólafsdóttir *et al.*, 2008; Winichayakul *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر یک توالی کزاک مختص دو لپه‌ای‌ها (Joshi *et al.*, 1997)، در سمت 5¹ توالی تلفیق ژنی و در ابتدای پلی‌اولئوزین قرار داده شد. بر اساس مطالعات انجام شده، محتوای کدون پایان نیز در کارایی ختم ترجمه و بیان موفقیت‌آمیز ژن‌های ساختگی موثر است. بر اساس پژوهش‌های براون و همکاران (Brown *et al.*, 1990)، ختم سنتز پروتئین در E coli با استفاده از سیگنال ختم¹ تترانوکلئوتید (UAAU) صورت می‌پذیرد. اسکات و همکاران (Scott *et al.*, 2010) و وینی‌چایکول و همکاران (Winichayakul *et al.*, 2012)، از کدون پایان تترانوکلئوتید UAAU برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان استفاده کردند. بر اساس نتایج این پژوهش‌ها، در پژوهش حاضر نیز در طراحی تلفیق ژنی پلی‌اولئوزین-پروانسولین یک کدون پایان تترانوکلئوتید UAAU در انتهای توالی و در سمت 3¹ ژن پروانسولین قرار داده شد.

هدف از طراحی تلفیق ژنی مذکور، تولید پروتئین نوترکیب در بذر می‌باشد. اگر چه خالص‌سازی پروتئین هدف از میان انبوه پروتئین‌های بذر دشوار است (Banilas *et al.*, 2011)، اما محققان برای رفع این مشکل و تسریع خالص‌سازی پروتئین هدف، از پپتید نشانه اولئوزین استفاده می‌نمایند (Parmenter *et al.*, 1995; Van Rooijen and moloney, 1995; Chaudhary *et al.*, 1998; Nykiforuk *et al.*, 2006). از این جهت، در این تحقیق از اولئوزین بعنوان پپتید نشانه برای تسهیل خالص‌سازی پروتئین پروانسولین استفاده گردید. علاوه بر این، در بین انواع اولئوزین‌ها، اولئوزین کلزا (Ling, 2007)، بعنوان حمل‌کننده‌ی مناسب پروانسولین انتخاب شد. در بین دانه‌های روغنی نیز کلزا به دلیل میزان روغن بسیار بالا و استعداد بالا جهت تراریختی (Boothe *et al.*, 1997)، بعنوان گیاه میزبان برای تولید پروتئین پروانسولین در نظر گرفته شد. همچنین، در سال‌های اخیر کاربرد پلی‌اولئوزین بعنوان یک راهکار بسیار مناسب برای افزایش تولید و تجمع پروتئین نوترکیب در سطوح اقتصادی استفاده شده است (Scott *et al.*, 2010; Banilas *et al.*, 2011; Scott

et al., 2012 and Winichayakul et al., 2012). بر اساس مطالعات انجام شده و مقایسه نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، در این پژوهش در طراحی سازه‌ی ژنی از پلی اولنوزین برای تسهیل خالص‌سازی پروتئین پروانسولین و افزایش تجمع آن در کلزا استفاده گردید. با توجه به تحقیقات صورت گرفته (Scott et al., 2010; Scott et al., 2012; and Winichayakul et al., 2012)، استفاده از نسخه سه تایی اولنوزین بر دیگر تکرارهای اولنوزینی ترجیح داده شده است. از این رو، در طراحی سازه‌ی ژنی از سه پروتئین اولنوزین در زنجیره‌ی اولنوزین استفاده گردید. مطابق مطالعات انجام شده (Banilas et al., 2011 and Winichayakul et al., 2012)، استفاده از یک اولنوزین هتروژنوس ذرت، سبب افزایش بیان پروتئین نوترکیب خواهد شد. از این رو، در طراحی سازه‌ی ژنی، اولنوزین 18 کیلودالتون ذرت (اولنوزین هتروژنوس)، بین اولنوزین‌های کلزا قرار داده شد. در نهایت زنجیره‌ی اولنوزینی، در سمت 5' ژن پروانسولین قرار گرفت. سازه‌ی فوق پس از طراحی در ناقل دوتایی pBI121 همسانه‌سازی و به کلزا انتقال داده شد.

References

- Alam S, Khaleda L, Mohammad Al-Forkan S (2013) Establishment of regeneration protocol for Canola (*Brassica napus* L.). *Global J Sci Frontier Res* 13, 7-11.
- Bhat WW, Lattoo SK, Rana S et al. (2012) Efficient plant regeneration via direct organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Picrorhiza kurroa*: an endangered medicinal herb of the alpine Himalayas. *In Vitro Cell Develop Biol Plant* 48, 295-303.
- Banilas G, Daras G, Rigas S, Moloney MM (2011) Oleosin di-or tri-meric fusions with GFP undergo correct targeting and provide advantages for recombinant protein production. *Plant Physiol Biochem* 49, 216-222.
- Bhalla PL, Singh MB (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of based vectors. *Plant Cell Rep* 6, 321-325
- Bhatla SC, Kaushik V, Yadav MK (2010) Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 28, 293-300.
- Boothe J, Nykiforuk C, Shen Y et al. (2010) Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnol J* 8, 588-606.
- Boothe JG, Saponja JA, Parmenter DL (1997) Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Develop Res* 42, 172-181.
- Brown CM, Stockwell PA, Trotman CN, Tate WP (1990) The signal for the termination of protein synthesis in procaryotes. *Nucleic Acids Res* 18, 2079-2086
- Brown TA (1990) *Gene cloning and DNA analysis an introduction*. Wiley-blackwell. P. 246.
- Chaudhary S, Parmenter DL, and Moloney MM (1998). Transgenic *Brassica carinata* as vehicle for the production of recombinant proteins in seeds. *Plant Cell Rep* 17, 195-200.

- Chen MX, Zheng SX, Yang YN et al. (2014) Strong seed-specific protein expression from the *Vigna radiata* storage protein 8SG α promoter in transgenic *Arabidopsis* seeds. *J Biotechnol* 174, 49-56.
- Chen R, Zhang C, Yao B et al. (2013) Corn seeds as bioreactors for the production of phytase in the feed industry. *J Biotechnol* 165, 120-126.
- Conley AJ, Joensuu JJ, Richman A, Menassa R (2011) Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol J* 9, 419-433.
- Feng L, Chan WW, Roderick SL, Cohen DE (2000) High-level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain. *Biochem* 39, 15399-15409.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22, 346-353.
- Hiwasa-Tanase K, Nyarubona M, Hirai T et al. (2011) High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator. *Plant Cell Reports* 30, 113-124.
- Holsters M, De Waele D, Depicker A et al. (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol General Genet MGG* 163, 181-187.
- Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol* 35, 993-1001.
- Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187-208.
- Ling H (2007) Oleosin fusion expression systems for the production of recombinant proteins. *Biologia* 62, 119-123.
- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW et al. (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J* 4, 77-85.
- Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31, 805-813.
- Ólafsdóttir G, Svansson V, Ingvarsson S et al. (2008) In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 1-7.
- Parmenter DL, Boothe JG, Van Rooijen GJH et al. (1995) Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol Biol* 29, 1167-1180.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA et al. (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 3324-3328.
- Richards E, Reichardt M, Rogers S (1994) Preparation of genomic DNA from plant tissue. *Current Protocols Mol Biol* 27, 2-3.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning, Vol. 2: 14-9.
- Schnell JA, Han S, Miki BL, Johnson DA (2010) Soybean peroxidase propeptides are functional signal peptides and increase the yield of a foreign protein. *Plant Cell Reports* 29, 987-996.
- Scott RW, Winichayakul S, Roldan M et al. (2010) Elevation of oil body integrity and emulsion stability by polyoleosins, multiple oleosin units joined in tandem head-to-tail fusions. *Plant Biotechnol J* 8, 912-927.
- Scott RW, Arcus VL, Roberts NJ (2012) Agriculture Victoria Services Pty Ltd and Agresearch Limited. Polyoleosins. U.S. Patent 8, 309-794.
- Van Rooijen GJ, Moloney MM (1995) Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Nature Biotechnol* 13, 72-77.
- Winichayakul S, Pernthaner A, Livingston S et al. (2012). Production of active single-chain antibodies in seeds using trimeric polyoleosin fusion. *J Biotechnol* 161, 407– 413.
- Wu Y, Zhao D, Song L, Xu W (2009) Heterologous expression of synthetic chicken IFN- γ in transgenic tobacco plants. *Biologia* 64, 1115-1122.