



بیان فاکتور رشد استخوانی نو ترکیب انسانی ۲ (rhBMP2) در ریشه‌های موئین تراریخت توتون

بلال دهقانی^۱، امیر موسوی^{۲*}، صادق حسن نیا^۳، علی هاتف سلمانیان^۴، علی شرفی^۵، محمد رضا افتخاریان قمصری^۶

^۱ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^۲ دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^۳ دانشیار، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۴ استاد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^۵ استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران.

^۶ مربی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۹

چکیده

با توجه به افزایش جمعیت جهان، امروزه تقاضا برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در بافت‌های گیاهی در حال افزایش است. ریشه‌های موئین بخاطر زیست توده و ثبات ژنتیکی بالا به عنوان بافت هدفی مناسب مدنظر می‌باشند. گلیکوپروتئین تنظیمی BMP2، به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای رشد با کاربرد درمانی و تحقیقاتی در مهندسی بافت مطرح می‌باشد. انتخاب میزبان گیاهی مناسب، بافت مطلوب و سازه ژنی مناسب، از عوامل مهم در بالا بردن میزان تولید پروتئین نو ترکیب است. در راستای حصول این هدف، در مطالعه حاضر تولید پروتئین نو ترکیب BMP2 در ریشه‌های موئین تراریخت گیاهان توتون و کلزا مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه سازه ژنی، در بالادست ژن BMP2، توالی‌های (5' UTR) TMV و KOZAK جهت افزایش بیان و در پایین دست ژن، توالی شش تایی هیستیدینی جهت تخلیص پروتئین و توالی KDEL بعنوان سیگنال نگهدارنده پروتئین در شبکه اندوپلاسمی تعبیه شدند. این توالی ژنی تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S بیان شد. برای انتقال سازه ژنی مذکور به ریز نمونه‌های برگی توتون یک ماهه به عنوان گیاه مدل و انتهای کوتیلدون کلزا شش روزه به عنوان یک گیاه زراعی از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* استفاده گردید. پس از رشد ریشه های موئین و غربالگری آن‌ها به روش PCR، تایید در سطح رونویسی با روش RT-PCR انجام گرفت. در عین حال، تایید بیان پروتئین نو ترکیب در میزبان با روش‌های آزمون الیزا و لکه گذاری وسترن صورت پذیرفت. نتایج این تحقیق بیان گر کارایی بالای سیستم ریشه های موئین برای تولید فاکتورهای نو ترکیب درمانی می‌باشد، که استفاده از آنها را در راکتورهای زیستی مطرح می‌سازد.

کلمات کلیدی: پروتئین نو ترکیب، BMP، کشاورزی مولکولی، توتون، ریشه موئین، کلزا.

مقدمه

بافت استخوانی جانوران به وفور یافت می‌شوند (Sieber C, 2009). در ژنوم انسان ۲۰ نوع از این فاکتورها کد می‌شود که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به BMP2 و BMP7 اشاره نمود، فاکتور شماره‌ی دو بعنوان یک فاکتور قوی در استخوان زایی مطرح است (Tang, 2012). علی‌رغم کاربردهای درمانی این دو فاکتور در ترمیم ضایعات استخوانی، مشکلاتی چون عدم مقرون به صرفه بودن به علت دوز مصرف بالا، عوارض جانبی و مشکلات استخراج و خالص سازی، نیاز به بهبود کمی و کیفی این محصول را ایجاد کرده است. یکی از راه حل- های فائق آمدن بر این مشکل استفاده از BMPهای با قابلیت فیزیولوژیک بالاتر است که در دوز کمتری قادر به القای بافت استخوانی باشند، می‌باشد (Tang, 2012). با پیشرفت مهندسی ژنتیک طی سالیان گذشته، بیان فاکتور نوترکیب BMP2 در سیستم‌های مختلفی از جمله *E. coli*، لاین‌های سلولی جانوری همچون سیستم‌های CHO، COS و حتی در لاروهای کرم ابریشم مورد بررسی قرار گرفته است (Tang, 2012). سیستم‌های مذکور، معایبی چون هزینه بالا، میزان کم محصول، فعالیت زیستی پایین و خطر بالای آلودگی به عوامل بیماری‌زای مشترک انسانی (پریون و ویروس) را در بر دارند (Ishida, 1994). جهت تولید محصولات نوترکیب، بافت‌های

امروزه پتانسیل بالای سیستم‌های تولید بر پایه ی میزبان گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب اثبات شده است (Yoo, 2014). سیستم‌های بیانی و میزبان‌های گیاهی با توجه به دارا بودن مزایایی چون هزینه تولید پایین‌تر، ساختار صحیح محصول پروتئینی نوترکیب و مشابهت تقریباً یکسان فرایند تغییرات پس از ترجمه همچون گلیکوزیلاسیون با سلول‌های جانوری نسبت به سیستم‌های بیانی دیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (da Cunha, Vianna, da Almeida Lima, & Rech, 2014; Xu, 2011). در گیاهان محصولات می‌توانند در ابعاد صنعتی در اندام‌های ذخیره‌ای مناسب مانند بذر، غده و یا ریشه‌های مویین تولید شوند (Castilho, 2012). تاکنون انواع پروتئین‌های درمانی مانند دارو- های زیستی انسانی، زیرواحدهای نوترکیب واکسن و آنتی‌بادی‌های نوترکیب و پروتئین‌های غیر درمانی مانند تریپسین با موفقیت در میزبان‌های مختلف گیاهی تولید و تجاری شده‌اند (da Cunha et al., 2014; Yoo, 2014). فاکتورهای رشدی Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) عضو خانواده‌ی فاکتورهای رشد ترانسفرمی بتا (β -TGF) بوده و از گلیکوپروتئین‌های تنظیمی درگیر در مسیرهای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند (Capra P, 2009). این فاکتورهای رشد در تبدیل مرحله جنینی سلول‌ها به بافت استخوانی نقش اساسی داشته و در

دهقانی و همکاران، ۱۳۹۷

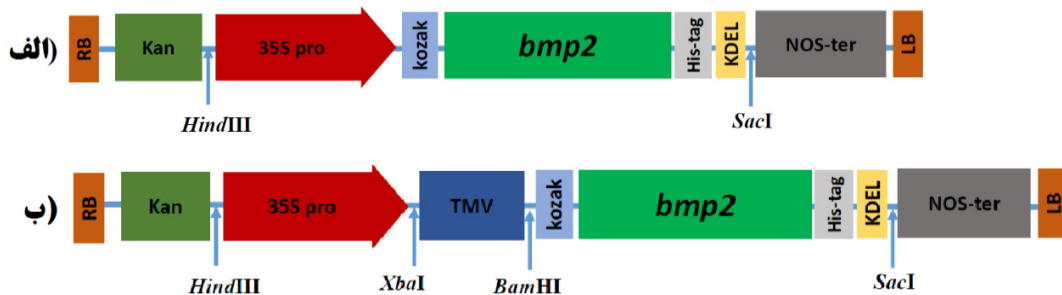
اندوپلاسمی و در قسمت ۵' آن در نظر گرفته شد. این سازه‌ی نوترکیب بعد از بهینه سازی ترجیح کدونی گیاهی در نهایت برای سنتز مصنوعی به شرکت (Shinegene Biotech Co.) فرستاده شد. سازه ژنی ساخته شده پس از دریافت در ناقل pUC19، در ناقل بیانی گیاهی pBI121 تحت کنترل پیش برنده CaMV 35S زیر همسانه سازی شد (شکل ۱). انتقال سازه های ژنی نوترکیب pBI121/BMP2 & pBI121/ΩBMP2 با واسطه *Agrobacterium rhizogenes* سویه ۱۵۸۳۴ به ریزنمونه‌های گیاهی انجام پذیرفت (Bhalla, 2008). ریز نمونه‌های برگی گیاهان توتون یک ماهه دو گونه *Nicotiana tabacum* cv. Samson و *Nicotiana benthamiana* و انتهای کوتیلدونی جوانه‌ی کلزاهای شش روزه (*Brassica napus* cv. PF-7045-91) با *Agrobacterium rhizogenes* سویه ۱۵۸۳۴ ناقل سازه های pBI121/ΩBMP2 & pBI121/BMP2 آلوده شدند. غربالگری لاین- محیط انتخابی حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین به ترتیب (غلظت های ۵، ۸ و ۱۲ میلی گرم در لیتر برای ریز نمونه‌های کلزا و غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر برای ریز نمونه‌های توتون) صورت گرفت.

مختلف گیاه، از جمله برگ، بذر، میوه و ریشه می-تواند به عنوان یک بستر تولیدی مناسب استفاده شوند. در میان این میزبان‌ها ریشه‌های موئین به دلایلی همچون آسان بودن امکان بهره‌وری در سطح صنعتی، سرعت رشد بالا، عدم نیاز به هورمون‌ها و پایداری بیشتر محتوای ژنتیکی، برتری نسبی به سایر بافت‌های تراریخت گیاهی دارند (Häkkinen, 2013). در این تحقیق، ما برای تولید فاکتور نوترکیب انسانی BMP2 (rhBMP2) گیاهچه‌های توتون و کلزا را با هدف تولید زیست توده‌ی ریشه‌های موئین تراریخت مورد استفاده قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

طراحی و ساخت سازه ژنی pBI121/BMP2

در این تحقیق برای بالا بردن بیان پروتئین نوترکیب در میزبان‌های گیاهی، از توالی کزاک و توالی نوکلئوتیدی غیرترجمه شونده‌ی ویروس موزائیک توتون TMV (Ω) در بالا دست کدون شروع استفاده شد (Lucy W, 2012). برای ایجاد امکان حذف توالی Ω و بررسی نقش آن جایگاه برشی BamHI در بالا دست KOZAK و به منظور همسانه سازی سازه در ناحیه 5' جایگاه برشی XbaI و در ناحیه 3' آن جایگاه برشی SacI تعبیه شد. همچنین یک دنباله‌ی هیستیدینی شش تایی و پپتید نشانه‌ی KDEL برای انتقال پروتئین به شبکه‌ی

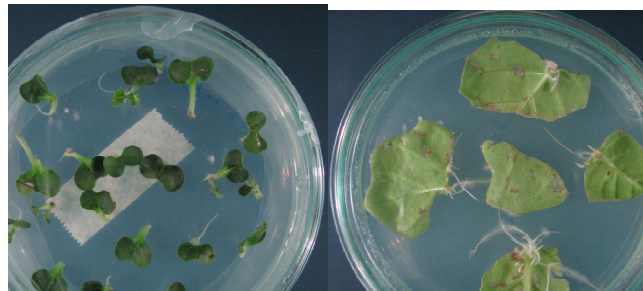


شکل ۱ - نقشه ناقل pBI121 حاوی ژن نو ترکیب BMP2 (الف) سازه فاقد توالی TMV (ب) سازه دارای توالی افزایش دهنده TMV.

Figure 1- The vector map of pBI121 containing recombinant BMP2 gene. The above construct lacks TMV sequence and the below construct has a TMV inducer sequence.

برای رشد ریشه‌های گونه *N. tabacum* و گونه‌ی *N. benthamiana* از محیط کشت رشدی B5 استفاده شد (Larsen, 2012).

در نهایت از هر گونه‌ی گیاهی برای هر کدام از سازه‌ها ۲۰ لاین موئین تراریخت حاصل شد. برای رشد ریشه‌های موئین کلزا از محیط کشت MS استفاده گردید (Murashige T, 1962).



شکل ۲- نمونه‌های جدا کشت برگی توتون (راست) و دمبرگ های لپه ای کلزا (چپ) که ریشه‌های موئینه از آنها جوانه زده اند.

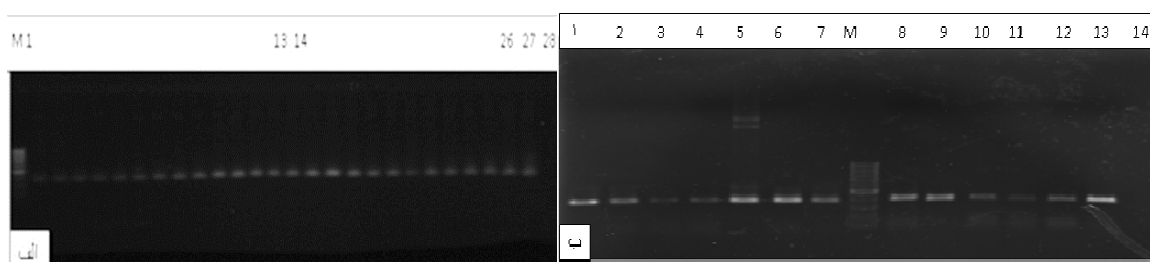
Figure 2- Tobacco leaf explants (right) and cotyledonary petioles of canola (left) in which the hairy roots have emerged.

گردید (Bradford, 1976). بعد از تایید بیان mRNA ژن نو ترکیب برای بررسی‌های کمی پروتئین آزمون سنجش الایزا گذاشته شد، تا لاین-هایی که بیان بیشتری داشتند برای لکه گذاری کیفی پروتئینی (Western blot) انتخاب شوند (Cornuault, 2011; Illana.V.O, 2012). ساندریج الایزا در پلیت ۹۶ تایی (NUNCLON Co. Denmark) برای هیبریداسیون با آنتی بادی (HRP-Conjugate) آنتی His-tag (Sigma Co.) (1:1000) انجام گردید. سپس جذب نوری واکنش در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. پروتئین تام استخراجی لاین‌های تراریخت توتون بر روی ژل SDS-PAGE حاوی ۱۲ درصد آکریل آمید جداسازی شد. بارگذاری مقدار مساوی محلول پروتئین از هر کدام از نمونه‌ها بر روی ژل انجام شد. پس از جدا شدن پروتئین‌ها از یکدیگر بر اساس وزن مولکولی، آنها را به غشای PVDF (BIO-RAD Co.) منتقل گردید. با توجه به اینکه در کاست ژنی در انتهای ۳' دنباله ی هیستدینی بکار برده شد بنابراین برای شناسایی پروتئین نو ترکیب از آنتی بادی استفاده شد که به دنباله ی هیستدینی متصل می‌شود. هیبریداسیون آنتی بادی HRP کانجوگه (Sigma 1:1000) علیه (متصل شونده به) دنباله هیستدینی که این دنباله ۶ تایی در انتهای rhBMP2 وجود دارد انجام

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های موئین ۲۰ روزه رشد یافته در محیط انتخابی صورت گرفت (Kang, 2004). از ژنوم به عنوان الگو به همراه آغازگرهای اختصاصی ژن rhBMP2 در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) استفاده گردید. جهت تایید وجود mRNA مربوط به rhBMP2 در لاین‌های PCR مثبت از روش RT-PCR استفاده شد (Hoffmann.B, 2013). استخراج RNA تام با استفاده از کیت RNX-Plus (SinaClon BioScience Co.) صورت پذیرفت. قبل از انجام RT-PCR برای اطمینان از حذف کامل آلودگی DNA ژنومی احتمالی از تیمار آنزیمی RNase-free DNase I (TaKaRa Co.) استفاده گردید و در ادامه، سنتز رشته ی cDNA از روی الگوی mRNA صورت پذیرفت. از بافت تازه ریشه‌های تراریخت، پروتئین محلول تام استخراج شد. از هر لاین مقدار ۰/۵ گرم ریشه در هاون چینی استریل حاوی نیتروژن مایع پودر و به ویال‌های استریل منتقل شد. یک میلی لیتر از بافر استخراج پروتئین (PBS, pH 6.0) به همراه 5mM EDTA 2-، 5mM mercaptoethanol و 2mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) اضافه و طبق دستورالعمل استخراج انجام گرفت و غلظت پروتئین تام استخراجی با روش برادفورد تعیین

موئین کلزا رشد مناسبی نداشتند. به منظور تایید تراریختی لاین‌های رشد یافته در محیط انتخابی کانامایسین دار از واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی ژن BMP2 استفاده شد. نتایج حاصله تراریختی ژنومی لاین‌ها ریشه موئین را تایید کردند. نتایج واکنش غربالگری زنجیره‌ای پلی مرز روی DNA ژنومی در شکل ۳ نشان داده شده است، طول قطعه‌ی تکثیر شده ۳۸۰ نوکلئوتید بود.

گرفت. لکه گذاری بر روی غشا با کیت وسترن بلات (NAJM Biotech CO. Iran) انجام گرفت (Chankova, 2013; Martina D, 2016). به منظور حصول زیست توده‌ی تراریخت جهت بیان BMP2 در میزبان‌های گیاهی، ریز نمونه‌های گونه‌های مورد آزمایش با آگروباکتری نو ترکیب، تیمار شدند و پس از ۱۴ روز میزان ۲ گرم زیست توده‌ی تولیدی گونه‌ی *N. tabacum* و ۱/۷ گرم گونه‌ی *N. benthamiana* بود. اما ریشه‌های

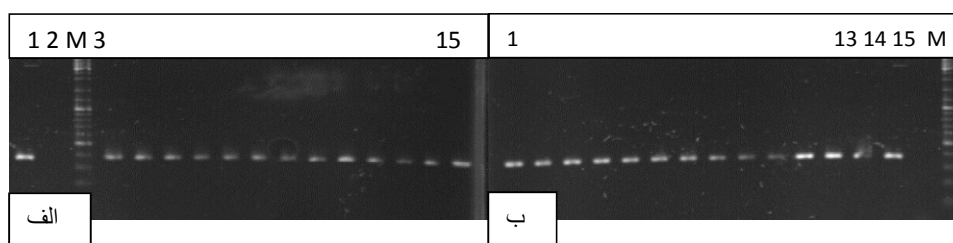


شکل ۳- تصویر الکتروفورز ژل آگارز به منظور غربالگری ریشه‌های تراریخت از طریق PCR از روی DNA ژنومی (طول قطعه ۳۸۰ نوکلئوتید). الف. نمونه‌های توتون (*N. tabacum* و *N. benthamiana*): M. نشانگر وزن مولکولی (100 bp Fermentas); ۱-۱۳. لاین‌های تراریخت *N. tabacum*; ۱۴-۲۶. لاین‌های تراریخت *N. benthamiana*; ۲۷. کنترل مثبت (pUC19/BMP2); ۲۸. کنترل منفی (ریشه موئین توتون حاصل از آگروباکتری فاقد سازه ژنی). ب. نمونه‌های کلزا: M. نشانگر وزن مولکولی (100 bp Fermentas); ۱. کنترل مثبت (pUC19/BMP2); ۲-۱۳. لاین‌های تراریخت; ۱۴. کنترل منفی (ریشه موئین کلزا حاصل از آگروباکتری فاقد سازه ژنی).

Figure 3- Agarose gel electrophoresis for screening of transgenic roots by PCR using genomic DNA (the target fragment is a 380 bp band). Left image shows the gel containing tobacco samples (*N. benthamiana* and *N. tabacum*): M, 100 bp molecular weight marker (Fermentas); 1-13. Transgenic lines *N. tabacum*; 14-26. Transgenic lines *N. benthamiana*; 27. Positive control (pUC19 / BMP2); 28. Negative control (tobacco hairy root derived from Agrobacterium without gene construct). Right image shows the gel containing canola samples: M, 100 bp molecular weight marker (Fermentas); 1, Positive Control (pUC19 / BMP2); 2-13. transgenic lines; 14. Negative control (canola hairy root derived from Agrobacterium without gene construct).

نتایج RT-PCR که نشان دهنده‌ی تأیید حضور mRNA مربوط به ژن rhBMP2 می‌باشند، در شکل ۴ نشان داده شده است. طول قطعه‌ی تکثیر شده ۳۸۰ نوکلئوتید بود.

پس از تأیید تراریختی ژنومی، به منظور بررسی مولکولی BMP2 در سطح mRNA واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشتی ژن BMP2 بر روی cDNA مربوطه انجام شد. نتایج حاصل حضور mRNA را تأیید کردند.



شکل ۴- تصویر الکتروفورز ژل آگارز قطعات مربوط به غربالگری ریشه های تراریخت از طریق RT-PCR (طول قطعه ۳۸۰ نوکلئوتید): الف. لاین‌های *N. benthamiana* و *N. tabacum*: ۱۵-۳. لاین تراریخت؛ ۱. کنترل مثبت (pUC19/BMP2)؛ ۲. کنترل منفی (نمونه شاهد حاوی آب به جای DNA)؛ M. نشانگر وزن مولکولی (Ladder Mix Fermentas). ب. لاین‌های *B.napus*: ۱ تا ۱۳ لاین تراریخت؛ ۱۴. کنترل مثبت (pUC19/BMP2)؛ ۱۵. کنترل منفی (نمونه شاهد)؛ M. نشانگر وزن مولکولی (Ladder Mix Fermentas).

Figure 4- Agarose gel electrophoresis of the fragments amplified from transformed roots using RT-PCR (the target fragment is a 380 bp band); Left image shows the gel containing the fragments of the lines of *N. benthamiana* and *N. tabacum*: 3-15. transgenic line; 1. Positive control (pUC19 / BMP2); 2. Negative control (control sample containing distilled water instead of DNA); M. Ladder mix (Fermentas). Right image shows the gel containing *B.napus* lines: 1 to 13, transgenic lines; 14, Positive control (pUC19 / BMP2); 15. Negative control (blank sample); M. Ladder mix (Fermentas).

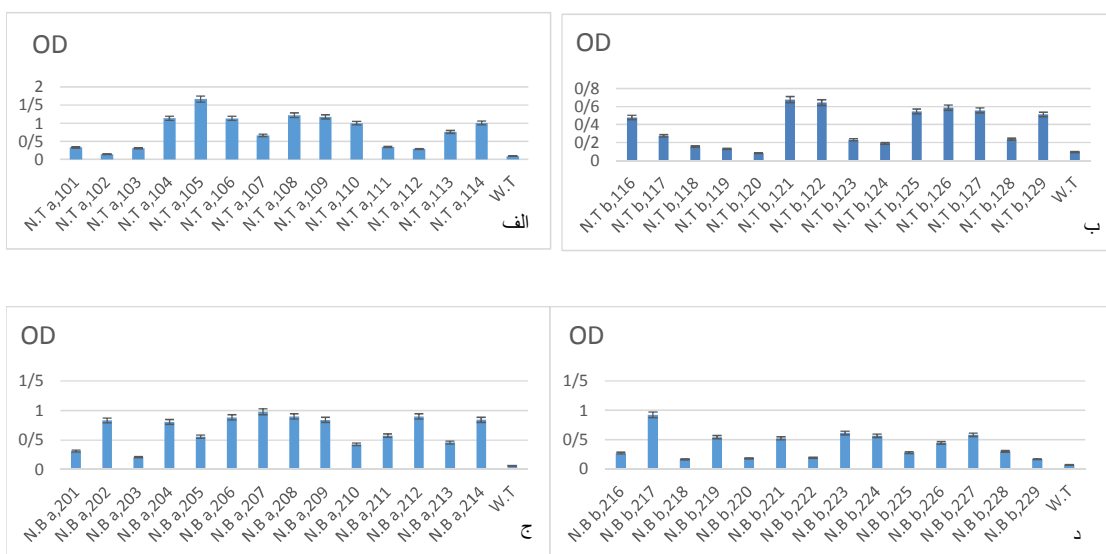
مولکولی پروتئین فقط برای پروتئین تام استخراجی از لاین‌های تراریخت دو گونه‌ی توتون انجام شد. پس از بررسی‌های غلظت پروتئینی در نمونه‌های RT-PCR مثبت مختلف با آزمون برادفورد، از هر

در این مرحله به دلیل عدم تولید زیست توده‌ی مناسب از ریشه‌های موئینی کلزا، استخراج پروتئین تام جهت انجام آزمون‌های مرتبط با پروتئین ممکن نبود، بنابراین نتایج بررسی‌های

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷)

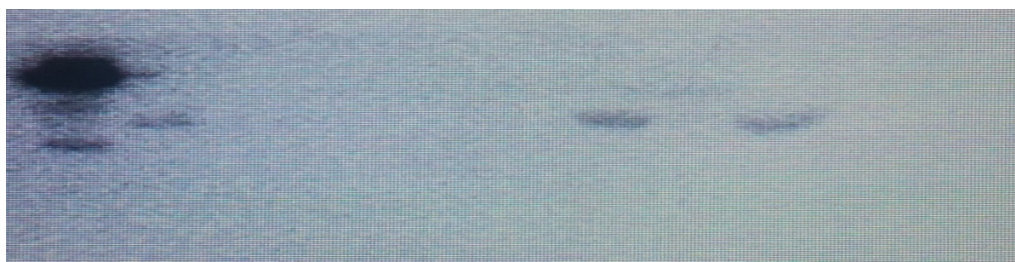
که بر اساس نتایج به دست آمده از نمونه‌هایی که در آزمون کمی الایزا بیشترین جذب OD مربوطه را داشتند انجام شد. نتایج حاصله که تایید بیان ژن در سطح پروتئین است در شکل ۶ آورده شده است.

نمونه غلظت یکسانی از پروتئین تام را در آزمون الایزا استفاده گردید، که نتایج حاصل بیانگر تفاوت‌های بیانی در لاین‌های مختلف را دارند. نتایج آزمون الایزا در شکل ۵ نشان داده شده است. جهت تایید کیفی بیان پروتئین از واکنش وسترن بلات با آنتی بادی ضد توالی هیستدینی استفاده شد



شکل ۵- نتایج آزمون کمی الایزا: الف. نمونه‌های *N. tabacum*: N.T (*Nicotiana tabacum*); a, expression affected by omega sequence; 101 to 114 numbers of studied lines. Upper right image shows *N. tabacum* samples: b, expression without omega sequencing; 116 to 129 numbers of studied lines. Left bottom image shows *N. benthamiana* samples: N.B (*Nicotiana benthamiana*); a, expression affected by omega sequencing; 201 to 214, numbers of examined lines. Right bottom image shows *N. benthamiana* samples: b (expression without omega sequence); 216 to 229 numbers of studied lines. بدون تاثیر توالی امگا؛ ۱۰۱ تا ۱۱۴ تعداد لاین‌های بررسی شده. ب. نمونه‌های *N. tabacum*: b. (بیان بدون تاثیر توالی امگا)؛ ۱۱۶ تا ۱۲۹ تعداد لاین‌های بررسی شده. ج. نمونه‌های *N. benthamiana*: N.B (*Nicotiana benthamiana*); a: (بیان تحت تاثیر توالی امگا)؛ ۲۰۱ تا ۲۱۴ تعداد لاین‌های بررسی شده. د. نمونه‌های *N. benthamiana*: b (بیان بدون تاثیر توالی امگا)؛ ۲۱۶ تا ۲۲۹ تعداد لاین‌های بررسی شده.

Figure 5- Quantitative test results of ELISA: Upper left image shows *N. tabacum* samples: N.T (*Nicotiana tabacum*); a, expression affected by omega sequence); 101 to 114 numbers of studied lines. Upper right image shows *N. tabacum* samples: b, expression without omega sequencing; 116 to 129 numbers of studied lines. Left bottom image shows *N. benthamiana* samples: N.B (*Nicotiana benthamiana*); a, expression affected by omega sequencing; 201 to 214, numbers of examined lines. Right bottom image shows *N. benthamiana* samples: b (expression without omega sequence); 216 to 229 numbers of studied lines.



شکل ۶- آشکار سازی قطعات پروتئینی توسط دستگاه IMAGE SCANNING Typhon (Amersham Co. UK):
 چاهک ۱- نمونه‌ی کنترل مثبت پروتئین نوترکیب غیر از rhBMP2 که حاوی توالی His-tag تولید شده در *E. coli* جهت تایید واکنش لکه گذاری؛ چاهک ۲. لاین توتون N.T a,105 (در واکنش الیزا بیشترین OD را داشت)؛
 چاهک ۳. N.T a,108؛ چاهک ۴. N.T b,121؛ چاهک ۵. N.B a,207؛ چاهک ۶. N.B a, 212؛ چاهک ۷. *N. benthamiana* (پروتئین تغلیظ شده با اولترا فیلتر آمیکون Millipore Co.)؛ چاهک ۸. N.B b,217؛ چاهک ۹. *N. tabacum* (پروتئین تغلیظ شده با اولترا فیلتر آمیکون Millipore Co.).

Figure 6- Detecting protein fragments by IMAGE SCANNING Typhon (Amersham Co. UK). 1, Positive test sample of a recombinant protein other than rhBMP2 containing the His-tag sequence expressed in *E. coli* to confirm the blotting reaction; 2, The N. T a, 105 (in the ELISA response had the highest OD); 3, NT a, 108; 4, NT b, 121; 5, NB a, 207; 6, NB a, 212; 7, *N. benthamiana* (Millipore Co. filtered ultrafiltration protein); 8, NB b, 217; 9, *N. tabacum* (Millipore Co. Ultra Ammonon Filter Condensation Protein).

آسان (Yoo, 2014) و کلزا به دلیل کشت وسیع و میزان پایین تولید ترکیبات آلکالوئیدی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Robinson, 2013). انتخاب گونه‌ی گیاهی و بافتی که پروتئین می‌بایست در آن بیان و تجمع یابد، بسیار حائز اهمیت است (He, 2011). جهت تولید پروتئین در گیاه، در اکثر موارد بهتر است پروتئین هدف به صورت اختصاصی و فقط در یک بافت خاص بیان شود. تاکنون بافت‌های مختلفی از گیاهان مانند برگ، ریشه، میوه و دانه هدف تراریختی قرار گرفته‌اند. استفاده از کشت ریشه‌های موئن دارای مزایای متعددی است؛ به

انتخاب میزبان جهت تولید یک پروتئین نوترکیب را توالی و نوع مصرف آن پروتئین مشخص می‌کند. بدین منظور میزبان‌های مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی استفاده می‌شوند. امروزه بسیاری از گیاهان از جمله گوجه فرنگی، موز، سیب زمینی، برنج، بادام زمینی، ذرت، کاهو، اسفناج، هویج، آراییدوبسیس، سویا، یونجه، به منظور تولید پروتئین‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Franconi, 2010). هر کدام از این گیاهان دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند، از میان اینها توتون به دلیل دست ورزی و تکثیر

2012). در واقع نحوه عملکردش هم بیشتر وابسته به این ساختار ثانویه است، بدین گونه که پس از اتصال کامل کمپلکس ریبوزوم به mRNA این ساختار اومگا شکل سرعت حرکت کمپلکس ریبوزوم روی mRNA را به نحو مطلوبی کنترل می-کند که شناسایی کدون متیونین اولیه برای کمپلکس ریبوزوم در بهترین حالت رخ دهد و از طریق میزان بیان را افزایش می-دهد (Edgar Garcia., 2013). راه انداز CaMV35S که از فاکتورهای کلیدی در بیان یک ژن می-باشند نیز استفاده شد. نتایج بررسی-های مولکولی DNA ژنومی، RT-PCR، آزمون الایزا و وسترن بلات نشان دادند که ژن rhBMP2 در ژنوم ریشه‌های توتون و کلزا وارد و با موفقیت بیان شد. اما طبق مشاهدات این مطالعه بیان BMP2 در ریشه‌های موئین کلزا مانع از رشد ریشه-ها در مقایسه با لاین ریشه موئین کلزا غیرتراریخت گردید. این اثر در گزارش های افراد قبلی در رابطه با القای ریشه‌ی موئین کلزا که هم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه اجرا گردیده نیز مشاهده شده بود. در گزارشات دیگری القای ریشه‌ی موئینه در گونه های مختلف جنس کلزا و بیان ژن GUS بطور موفقیت آمیزی صورت پذیرفته است (Bhalla, 2008). در پاره‌ای از موارد، آنتی بیوتیک انتخابی از محیط کشت ریشه‌های کلزا حذف گردید اما باز رشدی صورت نگرفت، در گزارشات قبلی برای رشد بهتر ریشه موئینه کلزا از محیط نیمه جامد استفاده شده است (Edgar

طور معمول دست ورزی گیاه به منظور ایجاد ریشه-های موئین آسان بوده و ریشه‌های ایجاد شده نیز با سرعت زیادی رشد می-کنند، خصوصا ریشه‌های موئین توتون که در گزارشات قبلی هم به این مهم اشاره شده است (Georgiev, 2012; Häkkinen, 2013). گلیکو پروتئین BMP2 به عنوان فاکتور رشد مورد نیاز در درمان‌های کلینیکالی و تحقیقات آزمایشگاهی مهندسی بافت مطرح است (Du Y, 2010). سیستم‌های بیانی گیاهی دارای فواید ویژه-ای مانند پایین بودن هزینه، ایمنی محصول و فعالیت بالای پروتئین می باشند (Tadatoshi Sugio., 2008). مشخص شده که ویژگی‌های ساختاری ناحیه غیرترجمه شونده‌ی بالا دست کدون شروع (5'UTR) می‌تواند تأثیر زیادی روی میزان آغاز ترجمه‌ی ژن بگذارد (Edgar Garcia., 2012; Lucy W, 2013). این نحوه کارایی ترجمه‌ی mRNA های یوکاریوتی به توالی نوکلئوتیدی مجاور کدون شروع مثل توالی کزاک بستگی دارد (Kozak, 1989; Mozafari A., 2015). هدف ما مطالعه و بررسی بیان rhBMP2 در ریشه‌های موئین سه میزبان مختلف بود. در این تحقیق از توالی کزاک ACCACCATGGCT برای افزایش کارایی آغاز ترجمه، توالی 5'UTR (TMV) استفاده شد. توالی 5'UTR (TMV) را در اصطلاح اومگا هم می‌گویند به دلیل اینکه در قسمت 5' mRNA تشکیل ساختاری ثانویه ای به شکل حرف اومگای یونانی می‌دهد (Larsen,

برای BMP2 میزبان مناسبی است. همین فاکتور شماره ۷ در سلول‌های *E. coli* و CHO و HEK تولید و تجاری سازی شده که قیمت فاکتور تولیدی در توتون چند برابر محصول *E. coli* و برابر با محصول CHO می‌باشد. این قیمت ارزاتر احتمالاً به دلیل این است که باکتری سیستم چاپرون‌ها را ندارد و توانایی گلیکوزیلاسیون هم ندارد (Kwang, 2016). پروتئین‌های نوترکیب امروزه کاربردهای فراوانی در پزشکی و صنعت دارند و بهینه کردن روش‌های تولید این محصولات از ملزومات پروسه تولید است. بررسی‌های بیان rhBMP2 در ریشه موئین از طریق RT-PCR و لکه گذاری پروتئینی نشان دهنده‌ی موفقیت این پروژه بوده است و میزبان ریشه موئین توتون را بعنوان میزبان کارآمدی در این عرصه معرفی می‌کند. نتیجه‌ی حاصل در پیچه ای بر روی تحقیقات پروتئین نوترکیب می‌گشاید چرا که تغییرات در کاست ژنی در این بیان کارآمد بود و با میزبان گیاهی توتون، در وهله اول می‌توان محصول ایمنی برای تحقیقات سلولی به دست آورد و از طرفی هم هزینه‌های تولید کاهش می‌یابد.

(Garcia., 2013). اما، این شیوه پس از بکارگیری در این مطالعه اثری مشاهده نگردید. با توجه به نتایج حاصل ریشه‌های موئینه‌ی *N. tabacum* برای تولید BMP2 از میان این سه میزبان گیاهی مناسب‌تر است، این گونه میزان زیست توده‌ی و پروتئین بیشتری نسبت به گونه‌ی *N. benthamiana* بیان پروتئین بیشتری داشت. نتایج نشان دادند که استفاده از ناحیه‌ی غیرترجمه شونده در گونه‌ی *N. tabacum* تاثیر بیشتری دارد (نتایج پروتئینی حاصل از لاین شماره ۱۰۵، که این لاین بدون استفاده از پروتوکل تغلیظ پروتئین در واکنش لکه گذاری کیفی به خوبی باند مربوطه را ظاهر کرد). در خصوص فعالیت زیستی rhBMP2 می‌توان به گزارشات ساختاری و عملکردی پروتئین‌های نزدیک به این پروتئین تقریباً استناد کرد، BMP7 در کشت سوسپانسیسون *N. benthamiana* توسط شرکت ProspecBio تولید و تجاری سازی شده که ساختار و عملکردی مشابه BMP2 دارد، به دلیل مشابهت عملکردی فاکتور ۷ و ۲ می‌توان نتیجه گرفت که میزبان توتون استفاده شده در این مطالعه

منابع

- Bhalla PL, Singh MB (2008). Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. Nature protocols 3: 181-189.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.
- Capra P, Conti B (2009). The role of BoneMorphogenetic Proteins (BMPs) in bone tissueengineering: a mini review. Scientifica Acta 3: 25-32 .

- Castilho A, Steinkellner H (2012). Glyco-engineering in plants to produce human-like N-glycan structures. *Biotechnology journal* 7: 1088-1098 .
- Chankova S, Mitrovskaa Z, Yurina N (2013). Western Blot analysis of chloroplast HSP70B in *Chlorella* species . *Bio-protocol.org*
- Cornuault V, Knox JP (2011). Sandwich Enzyme--linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analysis of Plant Cell Wall Glycan Connections. <http://wwwbio-protocol.org/e45> .
- da Cunha NB, Vianna GR, da Almeida Lima T, Rech E (2014). Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins. *Biotechnology Journal* 9: 39-50 .
- Du Y, Yip H (2010). Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. *Differentiation* 79: 84-92.
- Edgar Garcia, Ramirez EG, Guzman OG, Calva GC, Ariza-Castolo A, Perez-Vargas J, Rodriguez HGM (2013). MALDI-TOF Characterization of hGH1 Produced by Hairy Root Cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* Grown in an Airlift with Mesh Bioreactor. *Wiley Online Library* 3: 1-1.
- Franconi R, Demurtas OC, Massa S (2010). Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems. *Expert review of vaccines* 9: 877-892 .
- Georgiev MI, Agostini E, Ludwig-Müller J, Xu J (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in biotechnology* 30: 528-537.
- Häkkinen ST, Raven N, Henquet M, Laukkanen ML, Anderlei T, Pitkänen JP, Ritala A (2013). Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnology and bioengineering* 111: 336-346.
- He Y, Ning T, Xie T, Qiu Q, Zhang L, Sun Y, Jiang D, Fu K, Yin F, Zhang W, Shen L, Wang H, Li J, Yang D (2011). Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19078-19083.
- Hoffmann B, Grewe B (2013). Detection and cloning of spliced transcripts by RT-PCR *Bio-protocol* 3: e486. DOI: [10.21769/BioProtoc.486](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.486)
- Illana VO, Farhaeus R (2012) Protein-RNA ELISA Assay. *Bio-protocol* 2: e257. DOI: [10.21769/BioProtoc.257](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.257).
- Ishida N, Tsujimoto M, Kanaya T, Shimamura A, Tsuruoka N, Kodama S, Nakazato H (1994). Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of biochemistry* 115: 279-285 .
- Kang TJ, Yang MS (2004). Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC biotechnology*, 4: 20-28.

- Kozak M (1989). The scanning model for translation: an update. *The Journal of cell biology*, 108: 229-241.
- Kwang-Chul K, Daniell H (2016). Oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Molecular Therapy* 24: 1342-1350.
- Larsen JS, Curtis WR (2012). RNA viral vectors for improved *Agrobacterium*-mediated transient expression of heterologous proteins in *Nicotiana benthamiana* cell suspensions and hairy roots. *BMC biotechnology* 12: 21.
- Lucy W, Fletcher S, (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci*, 69(3), 3613–3634 .
- Martina D, Tschofen M, Maresch D, Konig J, Juarez P, Orzaez D, Altmann F, Steinkellner H, Strasser R (2016). Transient Glyco-Engineering to Produce Recombinant IgA1 with Defined N- and O-Glycans in Plants. *Front Plant Science* 7: 18.
- Mozafari A, Kazemi R, Amani J, Jafari M, Salmanian AH (2015). Molecular analysis of transgenic canola plant containing chimeric B subunit of bacterial toxin STX2 and CTX from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Crop Biotechnology* 11: 1-13.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473–497.
- Robinson C, Holland N, Leloup D, Muilerman H (2013). Conflicts of interest at the European Food Safety Authority erode public confidence. *Journal of epidemiology and community health* 67: 717-720
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Reviews* 20: 343-355.
- Tadatoshi Sugio T, Satoshi J, Matsuura H, Shinmyo A, Kato K (2008). The 5'-Untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105: 300-302.
- Tang S, Zhao J, Xu S, Li J, Teng Y, Quan D, Guo X (2012). Bone induction through controlled release of novel BMP-2-related peptide from PTMC11-F127-PTMC11 hydrogels. *Biomedical Materials* 7: 015-008.
- Xu J, Ge X, Dolan MC (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology advances* 29: 278-299.
- Yoo JY, Ko KS, Lee SY, Lee KO (2014). Glycoengineering in plants for the development of N-glycan structures compatible with biopharmaceuticals. *Plant Biotechnology Reports* 8: 357-376.

**Expression of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP2)
in tobacco transgenic hairy roots**

**Dehqani B.¹, Mousavi A.^{2*}, Hasannia S.³, Salmanian A.H.⁴, Sharafi A.⁵, Eftekhariyan
Ghamsari M.R.⁶**

¹M.Sc. Agriculture Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

²Associated Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

³Associated Professor, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

⁴Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

⁵Assistant Professor, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁶M.Sc. Plants Biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Abstract

Today, demand for production of recombinant proteins in different tissues of transgenic plants is increasing day by day. Meanwhile, hairy roots are under consideration due to their high levels of biomass and high genetic stability as appropriate target tissue. Among pharmaceutical proteins, regulatory glycoproteins, are proposed as one of the most important growth factors with therapeutic and research applications in tissue engineering. Selection of proper host species, plant tissue and desirable gene, are of the most important factors to elevate the levels of recombinant protein production. In order to achieve this goal, in the present study, production of recombinant protein BMP2 in transgenic hairy roots of tobacco and canola were investigated. For optimal transgene expression, TMV (5'-UTR) and KOZAK sequences were inserted upstream the BMP2 gene to increase expression level, furthermore, six-histidine sequence for protein purification and KDEL sequence as ER retention signal protein were inserted downstream of the target gene. The transgene was designed to be under the control of CaMV 35S promoter. One-month old tobacco leaf explants and six-day-old cotyledons of canola were transformed with *Agrobacterium rhizogenes* carrying the construct. Transformed hairy roots that grew well in the medium were confirmed by gPCR analysis for transgene integration. Moreover, to verify mRNA transcription as well as protein production, RT-PCR, ELISA and western blot analyses were performed. The results of this study demonstrated the efficiency of the current systems for the production of rhBMP2 in tobacco hairy roots suggesting them as an efficient bioreactor.

Keywords: *Recombinant Protein, BMP2, Molecular Farming, Tobacco, Hairy Root, Rapeseed.*

* Corresponding Author: Mousavi A.

Tel: (+98) 21 44787301-27

Email: m-amir@nigeb.ac.ir