

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

نجمه آیت فرد<sup>۱</sup>، اسماعیل قاسمی گوجانی<sup>۲\*</sup>، علیرضا شافعی نیا<sup>۳</sup>، پیام پورمحمدی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

<sup>۲،۳،۴</sup> استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۵

### چکیده

استفاده از ژن اولئوزین گیاهی یک روش مناسب برای تولید و تجمع پروتئین نوترکیب در مقیاس زیاد و همچنین استخراج راحت تر و ارزان تر می باشد. اتصال اولئوزین به ژن موردنظر، موجب هدف گیری پروتئین نوترکیب به اجسام روغنی بذر می شود. در سال های اخیر، به منظور افزایش کارایی اولئوزین در تولید پروتئین نوترکیب، چند ژن اولئوزین (پلی اولئوزین)، به ژن هدف متصل می شود. این امر سبب تولید و تجمع پروتئین نوترکیب در سطوح اقتصادی در بذر می گردد. از این رو برای افزایش میزان تجمع پروتئین پروانسولین در بذر گیاه کلزا، یک سازه ی تلفیقی پلی اولئوزین-پروانسولین طراحی و ساخته شد. در طراحی این توالی به ترتیب از سمت ۵' توالی، یک توالی کزاک، یک برچسب هیستیدین، سه ژن اولئوزین، یک جایگاه پروتئولیتیکی برای پروتئاز، ژن پروانسولین و یک کدون پایان ترانوکلوئید قرار گرفت. این تلفیق ژنی پس از سنتز در ناقل pUC57 قرار داده شد. تلفیق ژنی، پس از هضم آنزیمی به وسیله آنزیم های BamHI و SacI از pUC57 جداسازی و در ناقل دوتایی pBI121 همسانه سازی گردید. پس از تأیید درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 با استفاده از روش های PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی، ناقل نوترکیب به سویه ی LBA4404 آگروباکتریوم انتقال داده شد. این باکتری برای تراریختی ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل کلزا مورد استفاده قرار گرفت. نوساقه های باززایی شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین گزینش شدند. آنالیز گیاهان تراریخته در سطح DNA با استفاده از روش PCR انجام و یک قطعه ی ۱۲۰ جفت بازی (مطابق با بخشی از ژن پروانسولین) تکثیر شد. همچنین تکثیر این قطعه ی ۱۲۰ جفت بازی با روش RT-PCR، بیانگر بیان ژن هدف در گیاهان تراریخته بود.

واژگان کلیدی: پلی اولئوزین، پروانسولین انسانی، پروتئین نوترکیب، کلزا.

پروتئین هدف به پروتئین اولئوزین (فراوان‌ترین پروتئین اختصاصی بذر) متصل شود، می‌توان تا حدود زیادی مشکلات و هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی پروتئین هدف را کاهش داد (Ling, 2007). اولئوزین‌ها در سطح اجسام روغنی موجود در دانه‌های روغنی جاسازی شده‌اند. با استفاده از اولئوزین می‌توان پروتئین نوترکیب را به طور دقیق به اجسام روغنی بذر هدف‌گیری نمود. بدلیل مقدار بالای تری‌آسیل گلیسرئید (TAGs)<sup>۱</sup> 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 ۹۰٪ آلودگی‌های پروتئینی بذر به دنبال یک سانتریفیوژ 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 پلی‌اولئوزین<sup>۲</sup> استفاده شده است. در این روش، چند ژن اولئوزین به صورت متوالی به هم وصل، سپس این زنجیره‌ی اولئوزینی به ژن هدف متصل می‌شود. پلی-اولئوزین در مقایسه با تک اولئوزین، سبب افزایش ۱۸ برابری در تجمع پروتئین نوترکیب خواهد شد (Banilas *et al.*, 2011). در این

استفاده از گیاهان به عنوان سیستم بیانی برای تولید پروتئین نوترکیب بر سیستم‌های مبتنی بر باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات و سلول‌های پستانداران برتری دارد. گیاهان به آسانی تراریخته می‌شوند و هزینه‌ی تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان پایین است. همچنین گیاهان به دلیل آلودگی کمتر به پاتوژن‌های جانوری، سیستم‌های ایمن‌تری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب خصوصاً پروتئین‌های دارویی می‌باشند (Bhatla *et al.*, 2010). علی‌رغم مزایای سیستم‌های گیاهی در تولید موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب، هضم پروتئینی، مانع قابل توجهی برای تجمع بالای پروتئین‌های خارجی بوده است. یک راه برای کم کردن هضم پروتئینی، هدف‌گیری پروتئین نوترکیب 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

1-Triacylglycerols

2-Polyoleosin

تنظیمی به منظور افزایش و کارایی بیان، به ژن پروانسولین متصل گردید. به این ترتیب که از سمت ۵' به ۳'؛ توالی کزاک، توالی برچسب هیستیدن، پلی‌اولئوزین شامل اولئوزین‌های کلزا BN-III (شماره دسترسی<sup>۱</sup> X61937) و اولئوزین ۱۸ کیلودالتون ذرت (شماره دسترسی J05212)، توالی اتصال‌دهنده<sup>۲</sup> (گلايسين، سرين) 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.

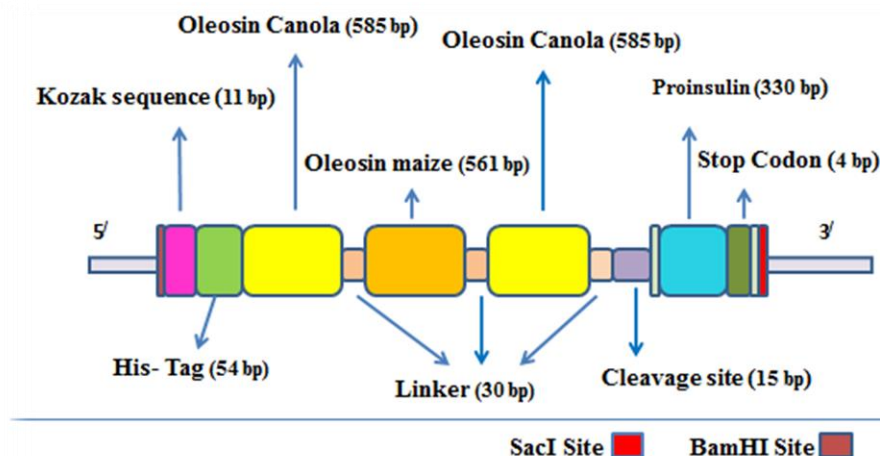
پس از تغییر تمایل کدونی، دو طرف این سازه‌ی ژنی جایگاه آنزیم‌های برشی BamHI و SacI تعبیه شد. منحصر به فرد بودن جایگاه این آنزیم‌های برشی، توسط نرم افزار آنلاین Webcutter تأیید گردید. در نهایت پس از طراحی تلفیق ژنی و تغییر تمایل کدونی آن مطابق با گیاه کلزا، توالی مذکور جهت سنتز به آمریکا (شرکت kapa) ارسال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

پژوهش، با توجه به اهمیت گیاهان در تولید ارزان پروتئین نو ترکیب؛ یک سازه‌ی ژنی برای تولید پروتئین هدف، در بذر گیاهان طراحی گردید. از طرفی در بین پروتئین‌های نو ترکیب انسولین بیشترین حجم پروتئین نو ترکیب (تولید سالانه ۱۳ 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 پلی-اولئوزینی، 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 $\alpha$  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 ۱)، توالی‌های کمکی و



شکل ۱- شمایی از تلفیق ژنی پلی اولئوزین- پروانسولین. ۱) از سمت ۵' به ترتیب، توالی کزاک مختص دولپه‌ای‌ها. ۲) برجسب هیستیدین برای خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب. ۳) اولئوزین‌های کلزا و ذرت. ۴) توالی اتصال دهنده بین اولئوزین‌ها. ۵) جایگاه برشی برای آنزیم پروتئاز. ۶) پروانسولین. ۷) کدون پایان ترانوکلئوتید.

**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.**

جفت باز از آن جدا شد. ناقل pBI121 نیز توسط آنزیم‌های برشی BamHI و SacI، برش یافت و ژن gus از آن حذف گردید (دستورالعمل شرکت Fermentas). در ناقل pBI121، تلفیق ژنی با طول ۲۲۶۷ 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 ۱) انجام شد.

تلفیق ژنی پس از سنتز و قرارگیری در ناقل pUC57 به صورت خشک شده توسط انجام ساخت<sup>۱</sup> 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 آمپی-سیلین)، عمل استخراج پلاسمید انجام شد (کیت خالص‌سازی شرکت Gen All).

سپس پلاسمید تخلیص شده، با استفاده از آنزیم‌های برشی BamHI و SacI مورد هضم دوتایی قرار گرفته و تلفیق ژنی با طول ۲۲۶۷

1-Lyophilized

این آغازگرها، منجر به تکثیر قطعه‌ای با طول ۵۲۷ 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

عمل توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای عمومی طراحی شده از pBI121، صورت پذیرفت. سپس آنالیزهای لازم با استفاده از نرم-افزار BLAST و برنامه‌ی Bio Edit انجام شد. نتیجه توالی‌یابی صحت درج تلفیق ژنی در ناقل pBI121 را تأیید نمود.

### جدول ۱- 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

که ۵ روز پس از جوانه‌زنی بذور، ریزنمونه‌های برگ‌ی (برگ‌های کوتیلدونی از انتهایی‌ترین محل دمبرگ با حذف مریستم از انتهای دمبرگ) و همچنین ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل با طول ۲ میلی‌متر تهیه شد. یک روز قبل از انجام تلقیح، یک تک کلون از اگروباکتری حامل سازه‌ی تلفیق ژنی+pBI121 انتخاب و در محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۱۰۰mg/L) و ریفامپیسین (۵۰mg/mL) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد، با رسیدن OD باکتری رشد کرده به حدود ۱-۰/۶،

ضد عفونی بذور کلزا در شرایط استریل (زیر هود لامینار)، با استفاده اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. سپس این بذور ۴-۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبشویی شدند. به منظور جوانه‌زنی بذور و تهیه‌ی ریزنمونه، بذور در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز نگهداری شدند (Bhalla and Singh, 2008). تراریختی مطابق با روش اوهاتا (Ohta et al., 1990)، با اندکی تغییرات انجام شد. به این ترتیب

واکشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط باززایی انتخابی (نمک‌ها و مواد محیط MS جامد، ۲/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر kinetin، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA) با همان نسبت آنتی‌بیوتیکی مرحله قبل انتقال داده شدند. هر ۱۴ روز یک بار عمل واکشت ریزنمونه‌ها در محیط باززایی صورت پذیرفت. سپس نوساقه‌های بدست آمده، به محیط ریشه‌زایی انتخابی (نمک‌ها و مواد محیط MS جامد، ۲/۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی گرم 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.

سوسپانسیون باکتریایی تحت سرعت ۵۰۰۰ نیروی نسبی سانتریفیوژ (RCF)<sup>۱</sup> و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی (LB) تحت شرایط استریل حذف و محیط کشت تلقیح (نمک‌های محیط MS جامد، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ mg/L BAP، ۰/۵ mg/L 2,4,D) به رسوب باقی مانده اضافه شد و باکتری کاملاً در آن حل گردید. امولسیون باکتری به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا باکتری به محیط کشت عادت کند. پس از آماده کردن سوسپانسیون باکتری، ریزنمونه‌ها به مدت ۱ ثانیه در تماس با آگروباکتریوم حاوی سازه‌ی ژنی قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها بر روی محیط هم‌کشت (نمک-ها و مواد محیط MS جامد، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ mg/L BAP، ۰/۵ mg/L 2,4,D)، قرار داده شدند و به مدت ۲ روز در تاریکی و دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛ تا احتمال ورود آگروباکتریوم به آنها افزایش یابد (Baht *et al.*, 2012). باززایی 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 ۱۰۰ mg/l کانامایسین (به منظور گزینش گیاهچه‌های تراریخته) و ۱ mg/l سفوتاکسیم (برای کنترل آگروباکتریوم) انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار

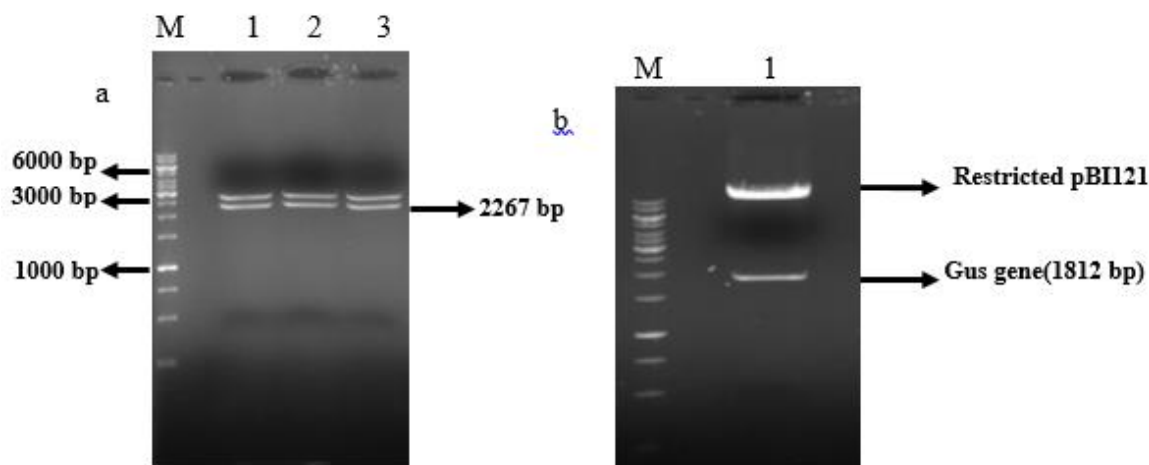
1-Relative Centrifuge Force

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 ۲۲۶۷ جفت بازی نشان‌دهنده‌ی درج تلفیق ژنی در این ناقل بود (شکل ۳). در نهایت به منظور تأیید نهایی حضور تلفیق ژنی در ناقل pBI121 عمل توالی‌یابی توسط آغازگرهای عمومی M13-Rev (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 انجماد و ذوب (Holsters *et al.*, 1978)، به آگروباکتریوم منتقل و حضور سازه‌ی ژنی در آگروباکتریوم با روش کلونی-PCR تأیید گردید (شکل ۴). از آگروباکتریوم حاوی سازه‌ی ژنی برای تراریختی ریزنمونه‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیل استفاده شد. این ریزنمونه‌ها از گیاهان ۵ روزه‌ی کلزا تهیه گردید. ریزنمونه‌ها به مدت ۴ 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 ۲ تا ۳ هفته بعد اولین ریشه‌ها پدیدار شدند (شکل ۵).

به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA در نمونه-ی 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.

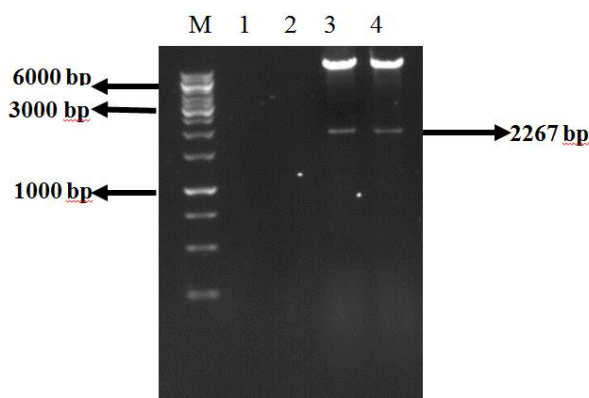
### نتایج

به منظور همسانه‌سازی تلفیق ژنی پلی‌اولئوزین-پروانسولین در ناقل دوتایی گیاهی pBI121، ابتدا با استفاده از دستورالعمل هضم آنزیمی دوتایی، تلفیق ژنی (با اندازه جفت باز ۲۲۶۷) از ناقل pUC57 جدا سازی شد. همچنین، ناقل pBI121 با استفاده از آنزیم‌های BamHI و SacI برش یافت و ژن گزارشگر gus با اندازه ۱۸۱۲ جفت باز از ناقل جدا شد. نتایج حاصل از این برش‌ها در شکل ۲ 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 ختم-کننده‌ی Nos (Rev-col)) صورت گرفت. این آغازگرها منجر به تکثیر قطعه‌ای با طول حدود ۵۲۷ جفت‌باز شدند، که با نتیجه مورد



شکل ۲- (a) برش ناقل تلفیق ژنی pUC57+ با آنزیم‌های BamHI و SacI و جداسازی تلفیق ژنی. (M) سایز مارکر ۱Kb (شرکت Fermentas). (۱، ۲، و ۳) جدا شدن تلفیق ژنی با اندازه ۲۲۶۷ جفت باز از ناقل pUC57. (b) برش pBI121 با آنزیم‌های BamHI و SacI و جدا شدن ژن gus. (M) سایز مارکر ۱Kb (شرکت Fermentas). ۱ جدا شدن ژن gus با اندازه ۱۸۱۲ جفت باز.

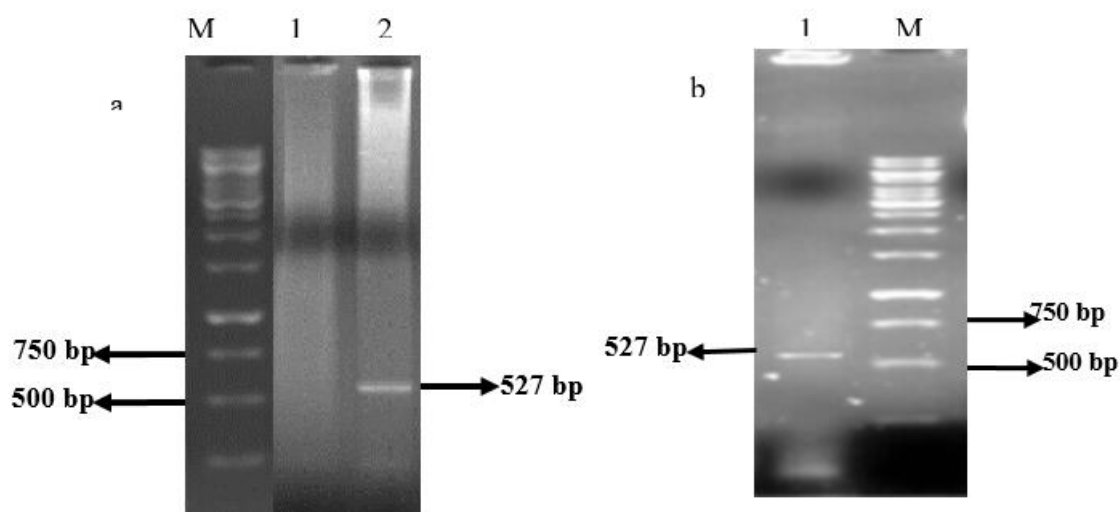
**Figure 2-** a) Digestion of pUC57+gene fusion vector by BamHI and SacI enzymes and isolation of synthetic fusion gene. M) 1Kb ladder (Fermentas) 1,2 and 3) Arrows indicate position of the fusion gene after digestion. b) Digestion of pBI121 vector by BamHI and SacI enzymes and removing of gus gene.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



شکل ۳- تایید حضور تلفیق ژنی در pBI121 توسط برش همسانه‌های نوترکیب احتمالی (با آنزیم‌های BamHI و SacI) به منظور جداسازی تلفیق ژنی. (M) سایز مارکر ۱Kb (شرکت Fermentas). (۳ و ۴) هضم آنزیمی همسانه‌های صحیح و جدا شدن تلفیق ژنی.

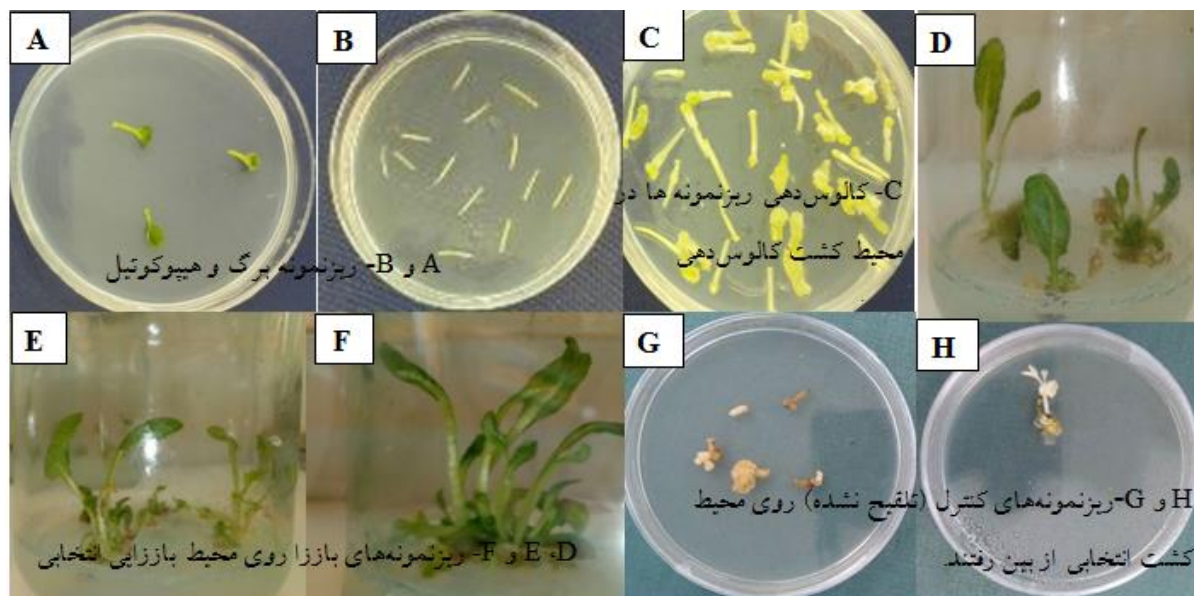
**Figure 3)** Confirmation of fusion gene presence into pBI121 by enzymatic digestion of probable recombinant clones (by BamHI and SacI enzymes) for isolation of synthetic fusion gene. M) 1Kb ladder (Fermentas) 3 and 4) Enzymatic digestion of correct clones and releasing of fusion gene.





شکل ۴-ا) تأیید حضور سازه تلفیق ژنی +pBI121 در باکتری با استفاده از کلونی PCR. چاهک ۱. نشان‌دهنده‌ی عدم دریافت پلاسمید نوترکیب توسط *E. coli*. ۲. تکثیر یک قطعه ۵۲۷ جفت بازی از کلونی دارای سازه‌ی تلفیق ژنی +pBI121. M سایز مارکر ۱ kb (شرکت Fermentas). b) تأیید حضور سازه‌ی ژنی در اگروباکتری با استفاده از کلونی PCR. چاهک M سایز مارکر ۱ kb (شرکت Fermentas). ۲. چاهک ۱ تکثیر قطعه‌ی ۵۲۷ جفت بازی در کلونی دارای سازه‌ی ژنی را نشان می‌دهد.

**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*.**

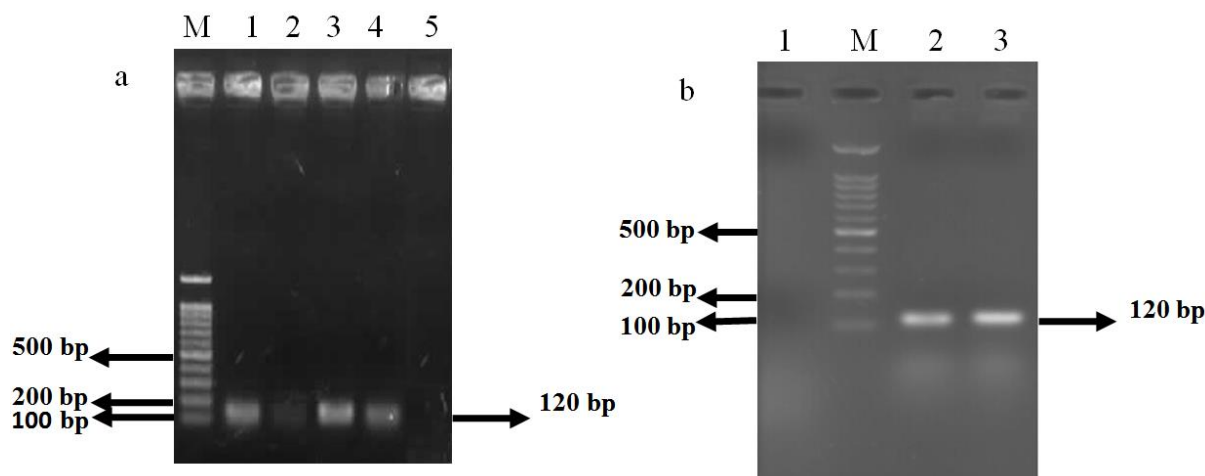


شکل ۵- مراحل مختلف تولید گیاهان کلزای تراریخته واجد تلفیق ژنی. (A و B)، ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و برگ برای تلقیح. (C)، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت کالوس‌دهی انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین. (D، E و F)، ریزنمونه‌های باززا شده پس از حدود ۸ هفته قرارگیری روی محیط باززایی انتخابی. (G و H)، ریزنمونه کنترل؛ 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.**

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 ۱۲۰ 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 ۶).

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 ۱۲۰ جفت-بازی مربوط به ژن پروانسولین، نشان‌دهنده‌ی درج تلفیق ژنی در گیاهان تراریخته‌ی احتمالی بود. پس از تأیید درج ژن در ژنوم برخی گیاهان



شکل ۶-ب) تأیید اولیه وجود تلفیق ژنی در ژنوم گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون PCR. چاهک ۱. نتیجه آزمون PCR روی گیاهان کلزای غیرتراریخته (شاهد). چاهک ۲. سایز مارکر ۱۰۰ bp (شرکت Fermentas). ۲ و ۳. چاهک شماره ۲ و شماره ۳ تکثیر یک قطعه ۱۲۰ جفت بازی (مطابق با ژن پروانسولین) در گیاهان تراریخته احتمالی. نتایج تأیید رونویسی سازه ژنی در برگ‌های کلزای تراریخته به روش RT-PCR. چاهک ۱ تا ۴. تکثیر یک قطعه ۱۲۰ جفت بازی نشان‌دهنده بیان ژن پروانسولین در گیاهان تراریخته. چاهک ۵. نشان‌دهنده عدم مشاهده باند 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

باشد. بنابراین، یکی از ضروریات برای بیان کارای و افزایش بیان ژن هدف، تغییر تمایل کدونی ژن هدف مطابق با تمایل کدونی میزبان می باشد (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 ژن های ساختگی به منظور افزایش بیان پروتئین نو ترکیب استفاده می شود. 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 می دهد (Kozak, 1999). بنابراین با توجه به اثر مثبت کزاک در افزایش بیان ژن هدف (Ólafsdóttir *et al.*, 2008; Winichayakul *et al.*, 2009 and Wu *et al.*, 2012)، در پژوهش حاضر یک توالی کزاک مختص دو لپه ای ها (Joshi *et al.*, 1997)، در سمت ۵' توالی تلفیق ژنی و در ابتدای پلی اولئوزین قرار داده شد. بر اساس مطالعات انجام شده، محتوای کدون پایان نیز در کارایی ختم ترجمه و بیان موفقیت آمیز ژن های ساختگی موثر است. بر اساس پژوهش های براون و همکاران (Brown *et al.*, 1990)، ختم سنتز پروتئین در *E coli* با استفاده از سیگنال ختم<sup>۱</sup> تترانوکلئوتید (UAAU) صورت می پذیرد. اسکات و همکاران (Scott *et al.*, 2010) و

یکی از محدودیت های اصلی گیاهان در تولید پروتئین نو ترکیب، سطح تجمع پایین پروتئین می باشد. متاسفانه ژن ها به سختی در میزبان های هترو لگوس بیان می شوند. بنابراین طراحی مجدد کل توالی ژن و درج توالی های کمکی در کنار ژن هدف، سبب افزایش بیان پروتئین در میزبان هترو لگوس خواهد شد (Gustafsson *et al.*, 2004).

توالی هایی مانند؛ کزاک، کدون پایان، پپتید نشانه، برجسب خالص سازی و همچنین بهینه کردن تمایل کدونی ژن هدف برای افزایش بیان پروتئین نو ترکیب، از بخش های ضروری در طراحی ژن های ساختگی می باشند. در پژوهش حاضر یک قطعه تلفیقی چند بخشی که از سمت ۵' به ۳' توالی به ترتیب دربرگیرنده توالی کزاک، برجسب خالص سازی، پپتید نشانه (اولئوزین)، توالی اتصال دهنده بین اولئوزین ها، ژن هدف (پروانسولین) و کدون پایان تترانوکلئوتیدی بود، طراحی و ساخته شد. یک اصل مهم در طراحی ژن های ساختگی به منظور افزایش بیان ژن هدف، بهینه کردن تمایل کدونی آن مطابق با تمایل کدونی میزبان هترو لگوس می باشد. ممکن است ژن هدف دارای کدون های محدود کننده برای فرآیند ترجمه باشد. این مشکل زمانی بزرگ تر می شود که هدف ما از انتقال ژن، زراعت مولکولی و تولید حجم بالای از پروتئین نو ترکیب

1-Stop Signal

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 پلی‌اولئوزین 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 اولئوزین بر دیگر تکرارهای اولئوزینی ترجیح داده شده است. از این رو، در طراحی سازه‌ی ژنی از سه پروتئین اولئوزین در زنجیره‌ی اولئوزین استفاده گردید. مطابق مطالعات انجام شده (Banilas *et al.*, 2011 and Winichayakul *et al.*, 2012)، استفاده از یک اولئوزین هتروژنوس ذرت، سبب افزایش بیان پروتئین نوترکیب خواهد شد. از این رو، در طراحی سازه‌ی ژنی، اولئوزین ۱۸ کیلودالتون ذرت (اولئوزین هتروژنوس)، بین اولئوزین‌های کلزا قرار داده شد. در نهایت زنجیره‌ی اولئوزینی، در سمت ۵' ژن پروانسولین قرار گرفت. سازه‌ی فوق‌پس از طراحی در ناقل دوتایی pBI121 همسانه‌سازی و به کلزا انتقال داده شد.

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 ۳' 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 حامل‌کننده‌ی 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

- Alam S, Khaleda L, Mohammad Al-Forkan S (2013). Establishment of regeneration protocol for Canola (*Brassica napus* L.). *Global Journal of Science Frontier Research* 13: 7-11.
- Bhat WW, Lattoo SK, Rana S, Razdan S, Dhar N, Dhar RS, Vishwakarma RA (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 Cellular & Developmental Biology-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 Physiology and Biochemistry* 49: 216-222.
- Bhalla P L, and Singh M B (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. *Biotechnology advances* 28: 293-300.
- Boothe J, Nykiforuk C, Shen Y, Zaplachinski S, Szarka S, Kuhlman P, Moloney MM, (2010). Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal* 8: 588-606.
- Boothe JG, Saponja JA, Parmenter DL (1997). Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Development Research* 42: 172-181.
- Brown CM, Stockwell PA, Trotman CN, Tate WP (1990). The signal for the termination of protein synthesis in procaryotes. *Nucleic acids research* 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, Xu C, Liu JS, Yang WD, Chye ML, Li HY (2014). Strong seed-specific protein expression from the *Vigna radiata* storage protein 8SG $\alpha$  promoter in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Journal of biotechnology* 174: 49-56.
- Chen R, Zhang C, Yao B, Xue G, Yang W, Zhou X, Fan Y (2013). Corn seeds as bioreactors for the production of phytase in the feed industry. *Journal of biotechnology* 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 Biotechnology Journal* 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. *Biochemistry* 39: 15399-15409.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology* 22: 346-353.
- Hiwasa-Tanase K, Nyarubona M, Hirai T, Kato K, Ichikawa T, Ezura H (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, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG* 163: 181-187.
- Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL (1997). Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant molecular biology* 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, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology Journal* 4: 77-85.
- Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K (1990). Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and Cell Physiology* 31: 805-813.
- Ólafsdóttir G, Svansson V, Ingvarsson S, Marti E, Torsteinsdóttir S (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, Yeung EC, Moloney MM (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant molecular biology* 29: 1167-1180.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (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 in molecular biology* 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, Cookson R, Willingham M, Castle M, Poeschei R, Peng CC, Tzen JTC, Roberts NJ (2010). Elevation of oil body integrity and emulsion stability by polyoleosins, multiple oleosin units joined in tandem head-to-tail fusions. *Plant biotechnology journal* 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 Biotechnology* 13: 72-77.
- Winichayakul S, Pernthaner A, Livingston S, Cookson R, Scott R, Roberts N (2012). Production of active single-chain antibodies in seeds using trimeric polyoleosin fusion 161: 407–413.
- Wu Y, Zhao D, Song L, Xu W (2009). Heterologous expression of synthetic chicken IFN- $\gamma$  in transgenic tobacco plants. *Biologia* 64: 1115-1122.

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

Ayat-Fard N.<sup>1</sup>, Ghasemi-Goujani E.\*<sup>2</sup>, Shafei-Nia A.R.<sup>2</sup>, Pourmohammadi P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khouzestan, Khouzestan, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professors, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khouzestan, Khouzestan, Iran.

### Abstract

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 . 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 pBI121by 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. 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.

**Key Words:** *Polyoleosin, Human Proinsulin, Recombinant Protein, Rapeseed.*

\* Corresponding Author: Ghasemi E.

Tel: 09378005535

Email: ghasemi@ramin.ac.ir