Archive of SID

همسانه‌سازی و انتقال ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی(tPA) با منشاء انسانی به گیاه توتون

اسد معصومی اصل[۱]، مختار جلالی جواران*[۱]، فریدون مهبودی[۲] و هوشنگ علیزاده[۳]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

[۲] تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

[۳] کرج، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۵

چکیده

گیاهان جهت تولید پروتئینهای نوترکیب به عنوان یک جایگزین امیدبخش سیستمهای تخمیر میکروبی و کشت سلولهای جانوری پیشنهاد شده اند، به دلیل اینکه مزایایی همچون ایمنی بالا، هزینه پایین، تغییرات پس از ترجمه و حجم بالای تولید دارند. در این تحقیق، cDNA ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی(tPA) به گیاهان توتون منتقل شده است. این ژن نوترکیب تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت. توالی افزایش دهنده Kozak و ترادف کد کننده پپتید نشانه KDEL، به ترتیب به انتهای آمینی و کربوکسیلی ژن tPA افزوده شدند. سازه تهیه شده(pBI(tPA به روش انتقال ژن مبتنی بر اگروباکتریوم به ژنوم گیاه توتون منتقل و گیاهان تراریخته روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب شدند. جوانه های تراریخت ریشه دار شده ابتدا به پرلیت و سپس به خاک منتقل گردیدند و بذور نسل اول (T_0) از آنها جمع آوری شد. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) و RT-PCR و وسترن بلات انجام شد.

واژه های کلیدی: پروتئین نوترکیب، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، انتقال ژن، توتون

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤١٩٦٥٢٤، پست الکترونیک: m_jalali@modares.ac.ir

مقدمه

اصطلاحاتی از قبیل Plant molecular farming و Biopharming همگی برای تولید پروتئینهای نوترکیب در مقیاس انبوه در سلولهای زنده و یا ارگانیسمها بکار می روند؛ که از گیاهان زراعی و یا حیوانات اهلی به عنوان میزبان استفاده می شود (۵، ۲۳).

امکان بهره برداری از گیاهان برای ساخت پروتئینهای نوترکیب پستانداران برای اولین بار در سال ۱۹۸۹، با بیان موفقیت آمیز آنتی بادی فعال با اندازهٔ کامل، در توتون تراریخت اثبات گردید. این امر نشان داد که گیاهان قادر به سرهم کردن کمپلکس های گلیکو پروتئینی عملکردی، با چندین زیر واحد می باشند (۸ ، ۹).

صحت ساختار پروتئینهای نوترکیب گرفته شده از گیاهان، در سال ۱۹۹۲ هنگامی که برای اولین بار از گیاهان برای تولید واکسن (آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBV) استفاده شد، اثبات گردید(۱۵). همان گروه، در تحقیقات بعدی نشان دادند که واکسن تولید شده در گیاهان توتون، پس از تزریق به موش پاسخ ایمنی را افزایش داد (۳۰). با گسترش سریع فناوری کشاورزی مولکولی، بسیاری از پروتئینهای درمانی با ارزش، با

www.SID.ir

Archive of SID

موفقیت در گیاهان تراریخت تولید شدند که مشتمل بر آنتی بادیهای نوترکیب (rAbs)، (۱۲، ۱۳، ۲٤)، هورمونها (۱۱)، سیتوکین ها، اینترلوکین ها (۱٤)، پروتئینهای پلاسما (۲۵)، آلفا-۱- آنتی تریپسین انسانی (۲۸، ۲۹) و واکسنهای خوراکی (۱۵) می باشند. انعقاد خون یک واقعه آنزیمی است که با پیش ماده هایی از بافتهای مجروح شروع شده و منجر به ایجاد مونومر های فیبرینی تشکیل دهنده لخته می شود. پس از چند روز، لخته فیبرینی توسط سیستم آنزیمی فیبرینولیتیک تخریب می شود. مشخص شده که فعال کننده های پلاسمینوژن نقش مهمی در سیستم فیبرینولیتیک دارند. این آنزیمها قادر به تبدیل پلاسمینوژن به فرم فعال کاتالیتیک آن (پلاسمین) می باشند که شبکه فیبرینی همراه با لخته های خونی را تخریب می کند. دو نوع اصلی فعال کننده های پلاسمینوژن وجود دارند که عبارتند از: فعال کننده پلاسمینوژن نوع اروکیناز (u-PA) و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی(t-PA) .(٤ و۱۷). پروتئین tPA، فعال کننده اصلی پلاسمینوژن در خون است در صورتی که نقش اصلی uPA پروتئولیز وابسته به بافت بوده و عقیده بر این است که نقش آن در حذف فیبرین داخل عروقی نسبت به tPA ، ثانویه می باشد. فیبرینولیز به طور عمده در سطح فیبرین آغاز و منتشر می شود زیرا این سطح، محلهای اتصال برای تماس بهینه بین تعدادی از اجزای سیستم فیبرینولیتیک بخصوص پلاسمینوژن و tPA را مهیا می کند. این اثر تحریکی، غلظت بالائی از پلاسمینوژن و tPA را در رسوبات فیبرین بوجود می آورد و موجب متمرکز شدن فعالیت پلاسمین در این ناحیه می گردد (۱). tPA ی مشتق شده از سلولهای Bowes Melanoma از یک زنجیره پلی پپتیدی با ۵۲۷ اسیدآمینه تشکیل شده است و ۱۷ باند دی سولفیدی بین ۳٤ اسیدآمینه سیستئین از ۳۵ سیستئین آن در پیچش این زنجیره دخالت می کنند. این پروتئین گلیکوزیله بوده و تقریباً ۷ درصد وزن کل مولکول را کربوهیدرات تشکیل می دهد. tPA یک سرین پروتئاز با وزن مولکولی ۷۰ کیلو دالتون و PI=7.5 است (۱).

با توجه به آمار سازمان بهداشت جهانی در مورد تعداد مبتلایان به بیماریهای قلبی- عروقی و ضرورت تولید پروتئینهای نوترکیب دارویی از منابع دائمی و ارزان، تولید پروتئینهای نوترکیب دارویی مثل tPA از طریق منابع دیگر مانند گیاهان اجتناب ناپذیر می باشد. با توجه به مزیتهای گیاهان به عنوان بیوراکتور در مقایسه با سایر سیستمها نظیر باکتری، مخمر، قارچ و سلولهای پستانداران، می توان از گیاه به عنوان یک جایگزین مناسب برای تولید پروتئینهای نوترکیب دارویی مثل tPA استفاده کرد(۲٦). توتون زراعی تاریخچه موفقیت آمیز و طولانی در تولید پروتئینهای نوترکیب دارد. توتون یک محصول غیر غذایی و غیرعلوفه ای بوده و یک انتخاب مناسب جهت تولید پروتئینهای دارویی می باشد. یکی از دلایل این انتخاب، انعطاف پذیری نسبی آن به دستورزی ژنتیکی است. توتون تولید وزن تازه بالایی (حدود ۵۰ تا ۱۰۰ تن عملکرد برگ تازه در یک فصل زراعی) داشته و بذر زیادی نیز تولید می کند (بیش از یک میلیون بذر در هر بوته). بنابراین در مدت زمان کوتاه می توان با تکثیر توتون تراریخت در سطح وسیع، محصول پروتئین نوترکیب موردنظر را تولید و وارد بازار نمود.

طی سالهای اخیر تحقیقاتی بر روی تولید tPA در سیستمهای مختلف بیانی تعریف و اجرا گردیده است که در طی یکی از این تحقیقها cDNA ژن tPA از سلولهای انسانی جداسازی شده و در ناقل مناسبی همسانه سازی گردید. تا به حال این پروتئین در سیستمهای لیشمانیا و اشیریشیاکولی با موفقیت بیان شده است(۲٦و ۳۱). با توجه به نیاز روزافزون بیماران قلبی - عروقی به این دارو و هزینه بالای تولید آن در سایر سیستمهای بیانی و نبود گزارشی در مورد تولید این دارو در سیستم بیان گیاهی، ضروری است به دلیل مزایای نسبی این سیستم، امکان

www.SID.ir

Archive of SID

تولید این پروتئین در گیاه توتون بررسی شود تا بتوان امکان تولید این پروتئین دارویی نوترکیب را در گیاهان غیر مدل، در سطح وسیع وحجم زیاد و با قیمت ارزان ارزیابی کرد.

مواد و روشها

باکتریها: در این تحقیق از دو باکتری *Eschrichia coli* سویه *DH5α* (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) و*Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA4404* (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر ساختارهای تهیه شده استفاده گردید و از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها: با توجه به اینکه ناقل pTZ57R حاوی ژن tPA دارای مکانهای برشی *Nco*I و *Not*I می باشد، به منظور تغییر این مکانها، آغازگرهای مناسب ژن موردنظر با توجه به مکانهای برشی ناقل بیانی pBI121 یعنی *Xba*I و *BamH*I ، توالی های دو طرف ژن و توالی افزایش دهنده بیانی Kozak (TAAACA) و سیگنال KDEL (TAGCTCATCTTT) (۱۹) در سیستمهای گیاهی طراحی گردید.

آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA از طریق شرکت سیناژن تهیه گردید. توالی این آغازگرها (A1, A2) عبارتند از: آغازگر پیشرو(A1)(Forward Primer): 5' GAG TCT AGA TAA ACA ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG 3' و آغازگر معکوس(A2)(Backward Primer): 5' ATA GTC AAC TCA TAG CTC ATC TTT CGG TCG CAT GTT G 3' و آغازگرهای وسط ژن(B1, B2) عبارتند از: آغازگر پیشرو(B1) : 5'TTG ATG CGA AAC TGA GGC TG3' و آغازگر معکوس (B2): 5'CTT CTC AGA TTT CGT GTG CC 3'.

ناقلها: ناقل pTZ57R که حاویcDNA ژن tPA (با شماره شناسایی IO1047) بود که از مهبودی وهمکاران دریافت گردید(۲۶) و ناقل همسانه سازی pCR2.1 شرکت Invitrogene که جهت همسانه سازی cDNA ژن tPA بوده و ناقل بیانی گیاهی pBI121 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین بود، استفاده شد.

مواد گیاهی: در این آزمایش از گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) استفاده شد (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری). ساقه گیاه توتون رشد یافته در شرایط درون شیشه ای به قطعاتی به طول ۲ الی ۳ سانتیمتر که حاوی یک جوانه و یک برگ بود، تقسیم و به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از ۲ هفته گیاهان رشد کرده و جهت تراریختی آماده شدند.

تکثیر ژن tPA با PCR و همسانه سازی ژن: DNA تهیه شده از انستیتو پاستور (با شماره شناسایی IO1047) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (A1, A2) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۰ سیکل، غلظت آغازگر ۱ میلی مولار، غلظت یون منیزیم ۲ میلی مولار، غلظت DNA ۱ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت آنزیم *SmarTaq* ۰/۵ میلی مولار، تکثیر و محصول PCR در ناقل pCR2.1 شرکت Invitrogene همسانه سازی گردید. جهت همسانه سازی ژن در ناقل pBI121 ، پس از تعیین جهت ژن با استفاده از برشهای آنزیمی اختصاصی، از مکانهای برشی موجود در دو طرف ژن جهت همسانه سازی ژن در ناقل pCR2.1 استفاده گردید. با توجه به مکانهای برشی دو طرف ژن در ناقل pCR2.1 و مکانهای برشی ناقل بیانی pBI121 ، از آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Xba*I جهت برش ژن استفاده و در نهایت ژن tPA در ناقل بیانی گیاهی pBI121 همسانه سازی گردید.

تراریختی *E.coli* و اگروباکتریوم با سازواره های تهیه شده: برای تراریختی باکتری*E.coli* روش شوک حرارتی و

www.SID.ir

Archive of SID

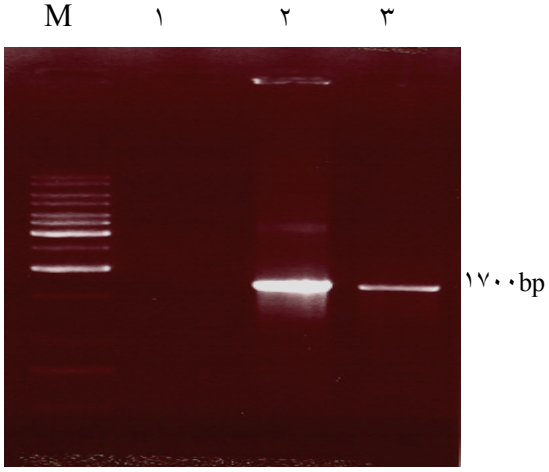
برای تراریختی اگروباکتریوم روش استاندارد انجماد و ذوب با استفاده از $CaCl_2$ (۲۰ میلی مولار) به کار گرفته شد(۲۲).

تراریختی توتون با استفاده از اگروباکتریوم حاوی tPA: گیاهان توتون بر روی محیط کشت MS (۱۸) رشد داده شدند و جوانترین برگها (با طول ٤ سانتیمتر) برای تراریخت نمودن انتخاب شدند. جهت تراریختی گیاه توتون از روش قطعات برگی (Leaf disk) استفاده شد (٦). حدود ۱ ماه پس از انتقال گیاهان به خاک مناسب، مرحله گلدهی آغاز گردید. گلهای توتون جهت خودگشنی وتولید نسل T1 بوسیله پاکتهای مخصوص پوشانده شدند و حدود ۱ ماه بعد بذور توتون (نسلT1) برداشت شدند. آزمایشات مولکولی برروی گیاهان نسل اول(T_0) انجام شد.

آنالیز گیاهان تراریخت: برگهای جوان از گیاهان باززایی شده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA با روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) انجام و آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(A1, A2) در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد و ۳۵ سیکل، غلظت آغازگر ۱ میلی مولار، غلظت یون منیزیم ۲ میلی مولار، غلظت DNA ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت آنزیم *Taq* ۰/٦ میلی مولار انجام و گیاهان دارای ژن tPA شناسایی و انتخاب شدند. جهت بررسی نحوه بیان تراژنها، استخراج RNA کل از برگهای جوان و با استفاده از کیت RNX-Plus شرکت سیناژن انجام گرفت. سپس cDNA از روی RNAاستخراج شده با استفاده از کیت شرکت Fermentas ساخته شد. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(A1, A2 وB1, B2) انجام شده (ساختن cDNAبا روش حرارتی کیت و واکنش RT-PCR در دمای ^{o}C ٦۰ و ۳۵ سیکل آغازگر ۱ میلی مولار، غلظت یون منیزیم ۲ میلی مولار، غلظت cDNA ۱ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت آنزیم *Taq* ۰/٦ میلی مولار) و گیاهان دارای mRNA ژن tPA شناسایی و انتخاب شدند. در آزمون وسترن بلات مقدار ۱۵۰ میکروگرم از پروتئین در ژل ۱۲ درصد ران شده و سپس با استفاده از دستگاه ترانسفر، باندها به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. سپس بلاک کردن کاغذ نیتروسلولز با استفاده از BSA(1.5%) انجام شد. پس از سه بار شستشو با PBS و تریتون، آنتی بادی اولیه tPA افزوده و به مدت ۳ ساعت شیکر و دوباره ۳ بار شستشو داده و سپس آنتی بادی ثانویه افزوده شده و ۱/۵ ساعت شیکر گردید. در نهایت ۳ بار دیگر شستشو داده و سوبسترای Dab را روی کاغذ نیتروسلولز اضافه نموده و حضورپروتئین موردنظر به صورت باند مشخص شد (۲۲).

نتایج

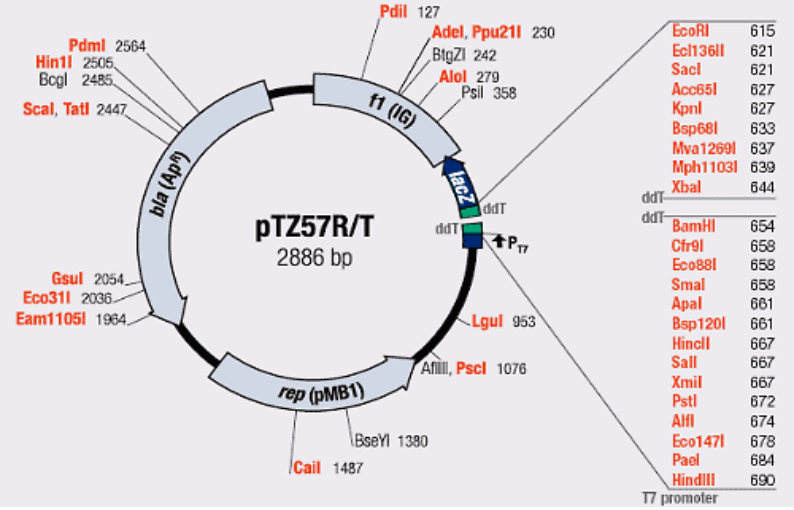
همسانه سازی ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) : ژن tPA از پلاسمید pTZ57R با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر گردید. محصول PCR به دست آمده در ناقل همسانه سازی pCR2.1، همسانه سازی گردید. جهت تعیین کلونهای مثبت از واکنش PCR استفاده گردید. در تعدادی از کلونها قطعه ۱/۷ کیلوبازی تکثیر گردید که همسانه سازی را در آن کلونها تأیید می کرد (شکل ۱).



شکل ۱- محصول PCR ژن tPA انسانی بر روی ژل آگارز ۱٪. ۱- کنترل(آب مقطر بدون DNA)، ۲- محصول ناشی از تکثیر ژن tPA در ناقل pTZ57R (کنترل مثبت)، ۳- محصول ناشی از تکثیر ژن tPA در ناقل pCR2.1، M- نشانگر مولکولی ۱۰۰۰ bp (Fermentas).

www.SID.ir

Archive of SID

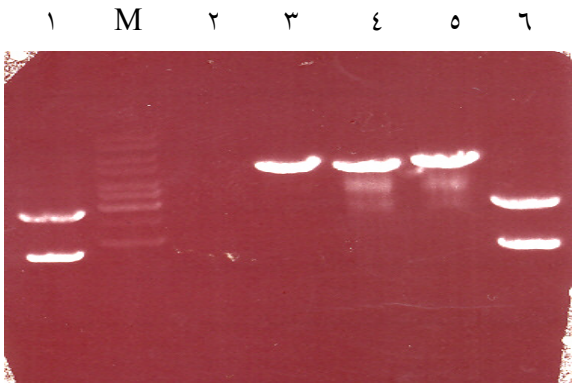


شکل ۲- نقشه کامل ناقل pTZ57R

همسانه سازی tPA در ناقل بیانی pBI121 و تأیید صحت ساختار حاصله: بر اساس دو سر چسبنده ژن (*Xba* I , *BamH* I) نمی توان ژن GUS را حذف کرد. چون این دو آنزیم در بالا دست ژن GUS بوده و با برش ناقل بیانی با این دو آنزیم ژن GUS حذف نمی شد. پس از تعیین جهت ژن در ناقل pTZ57R، ژن tPA در ناقل بیانی pBI121 همسانه سازی گردید. برای تعیین جهت ژن در ناقل، با توجه به محلهای برش آنزیمهای مختلف موجود در دو طرف ژن، برشهای خاصی ا انجام و بر اساس نتایج حاصله جهت ژن در ناقل تعیین شد.

با توجه به نقشه ناقل pCR2.1 (شکل ۲)، برشهای تکی و جفتی با استفاده از آنزیمهای *BamHI*, *HincII*, *XbaI* و *NotI* انجام شد. نتایج نشان داد که ژن tPA در ناقل pCR2.1 به صورت وارونه قرار گرفته است. پس می توان بر اساس محلهای برش موجود در دو طرف ژن تکثیر شده در ناقل pTZ57R ، از محلهای برش *BamHI* و *XbaI* استفاده کرد (شکل ۳).

همسانه سازی ژن tPA در ناقل بیانی pBI121 : ناقل بیانی pBI121 با آنزیمهای برشی *BamH* I و *Xba*I برش داده شد. سپس ناقل pTZ57R نیز بصورت جفتی با دو آنزیم *Xba* I و *BamH* I برش و پس از اطمینان از درستی برشها، واکنش اتصال صورت پذیرفت. جهت تأیید همسانه سازی از واکنش های برش و PCR استفاده گردید (شکل ۲). انتقال سازواره pBItPA به اگروباکتریوم پس از انجام واکنش Colony PCR و بردن محصول واکنش روی ژل آگارز اثبات گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی حضور یک باند۱/۷ کیلوبازی را نشان داد (شکل٤).



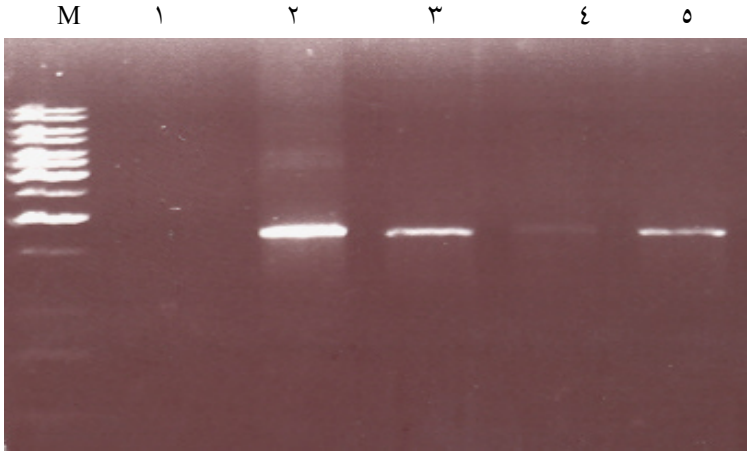
شکل ۳- نتایج برش ناقلpTZ57R حاوی ژن tPA برای تعیین جهت ژن در ناقل. ۱ : محصول برش با آنزیمهای *NotI* و *BamHI* M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی(Fermentas). ۲ : کنترل(آب). ۳: محصول برش با آنزیم *XbaI* ٤و٥ : محصول برش با آنزیم *HincII*. ٦ : محصول برش با آنزیمهای*XbaI* و*HincII*.

انتقال ژن tPA به گیاه توتون: تراریخت کردن گیاهان توتون بواسطه تلقیح با آگروباکتریوم صورت گرفت. پس از چند هفته ریز نمونه های تلقیح شده گیاهچه تولید کردند (شکل ٥-الف) در حالی که بر روی ریز نمونه های

www.SID.ir

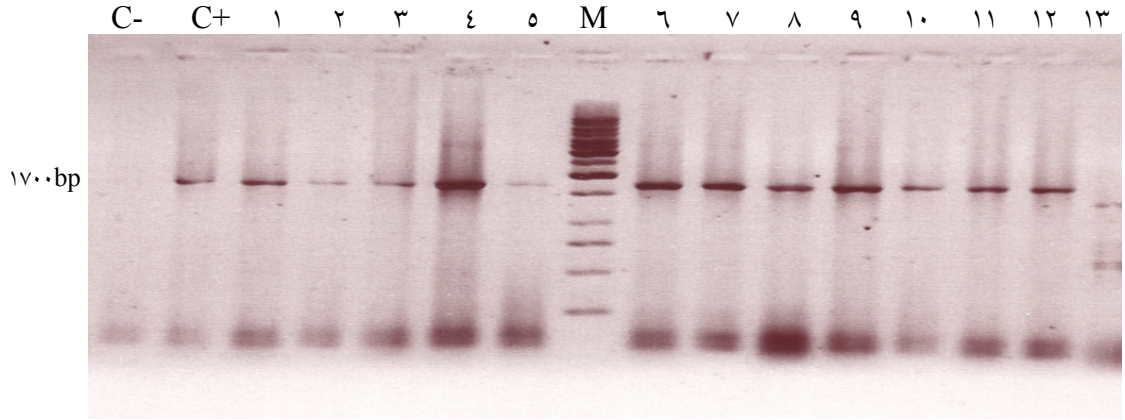
Archive of SID

شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون ناقل pBI121) هیچگونه باززایی مشاهده نشد. گیاهچه هایی که روی محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین باززایی شدند(تعداد ۳٦ گیاه تراریخت و میانگین باززایی ۱/٦) (شکل های ۵–ب و ج)، با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و گیاهان تراریخت احتمالی حاوی ژن tPA انتخاب شد.



شکل٤- تأییدحضور ژن tPA (قطعه حدود ۱۷۰۰bp) در ناقلpBI121 با استفاده از تکنیک PCR: M : نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰۰(Fermentas). ۱ : کنترل منفی(واکنش PCR با آب)، ۲ : کنترل مثبت (ناقل pTZ57R حاوی tPA)، ۵و٤و۳ : ناقل pBI121 حاوی ژن tPA.

شکل۵- تولید گیاهان تراریخت احتمالی از ریز نمونه های برگی توتون : الف. ریزنمونه های برگی که با اگروباکتریوم حاوی ناقل بیانیpBI121 دارای ژن tPA تلقیح شده اند (در روی محیط انتخابی). ب. انتقال گیاهچه های رشد کرده به شیشه های بزرگتر حاوی کانامایسین. ج. انتقال گیاهان توتون تراریخته به ورمیکولایت و در نهایت به خاک گلدان.



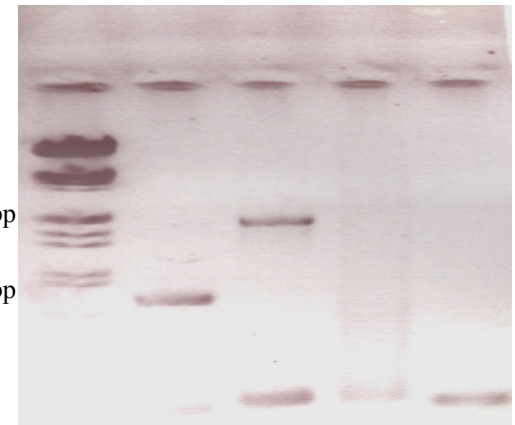
شکل٦- آنالیز DNA ژنومی استخراج شده از گیاهچه های باززایی شده نسل اول (T0) با استفاده از تکنیک PCR و آغازگر های اختصاصیtPA. یک باند حدودbp ۱۷۰۰ در گیاهان تراریخت مشاهده گردید، در صورتیکه در گیاه تیپ وحشی(۱۳) هیچگونه باندی مشاهده نشد. +C: پلاسمید pCR2.1 حاوی ژن tPA. -C: کنترل منفی. ۱ الی۱۲ : گیاهان تراریخت. M: نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰۰(Fermentas).

www.SID.ir

Archive of SID

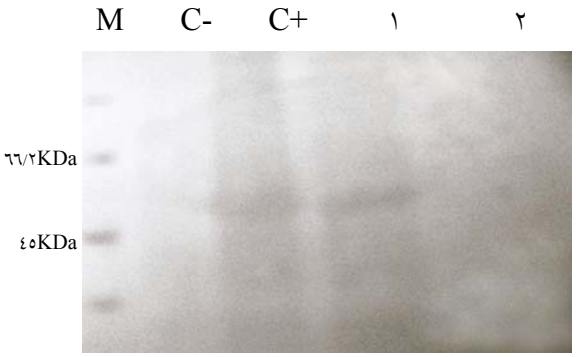
بررسی گیاهان تراریخت در سطح DNA : نتایج واکنش PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی تراریخت بودن بعضی گیاهان را تأیید کرد. استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام شد. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی وجود یک قطعه ۱۷۰۰bp را نشان داد در حالی که درگیاهان شاهد هیچگونه باندی مشاهده نشد (شکل ٦).

آنالیز گیاهان تراریخت در سطح RNA: برای بررسی انجام رونویسی از ژن tPA واقع در گیاهان تراریخت، پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA واکنش RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی(A1, A2 وB1, B2) تکثیر کننده قطعات ۱۷۰۰ و٦٣٥ جفت بازی (به ترتیب) انجام گرفت. پس از انجام ژل الکتروفورز، باند های ٦٣٥ و ۱۷۰۰ جفت بازی روی ژل مشاهده شد. در حالی که در گیاهان شاهد هیچگونه باندی مشاهده نشد(شکل ۷).



شکل ۷- بررسی ساخت رونوشت mRNA از ژن tPA در گیاهان تراریخت با روش RT-PCR. M : نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas). ۱: باند ٦٣٥ جفت بازی (وسط ژن). ۲ : باند ۱۷۰۰ جفت بازی (کل ژن) و ۳و٤ : به ترتیب کنترل منفی و گیاه غیرتراریخت.

در آزمون وسترن بلات که برروی تعدادی از گیاهان تراریخت انجام شد در بعضی از آنها (مثل گیاه شماره ۱ در شکل۸) حضور باند مورد نظر، بیان ژن tPA را اثبات نمود.



شکل ۸- نتایج وسترن بلات. M : نشانگر وزنی پروتئین. +C : کنترل مثبت (داروی اکتیلاز). -C : گیاه غیر تراریخت. ۲و۱ : گیاهان تراریخت.

بحث

سکته، سومین عامل مرگ و میر افراد بالغ در کشورهای توسعه یافته است. هر ساله، بیش از سه میلیون نفر در آمریکا فقط از این بیماری رنج می برند. داروی لخته شکن tPA ، تنها دارویی است که FDA (آژانس غذا و داروی آمریکا) تزریق آن را برای غلبه بر سکته مجاز شمرده است(۳). در افراد بیمار، میزان تولید این پروتئین(tPA) به دلایلی کاهش پیدا می کند که منجر به بسته شدن رگهای خونی شده و سکته های مغزی و قلبی را به دنبال دارد. فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) به خاطر تمایل بالای آن به فیبرین، یک عامل ترومبولیتیک ارزشمند است. tPA نوعی سرین پروتئاز است که از اندوتلیوم رگهای تحت شرایط آسیب یا تنش به گردش خون می ریزد و تا پیش از اتصال به فیبرین، فعالیت کاتالیزوری ندارد. پروتئین tPA پس از اتصال به فیبرین، پلاسمینوژن درون لخته را تجزیه می کند و پلاسمین را می سازد، پلاسمین هم با هضم فیبرین، از آن محصولات تجزیه ای محلول می سازد و لذا لخته را حل می کند (١٦). از آلتپلاز حاصل از فن آوری DNA نوترکیب و نیز استرپتوکیناز به عنوان داروی فیبرینولیتیک در درمان استفاده می شود ولی هزینه تقریبی هر بار درمان با tPA ۲۹۰۰ دلار می باشد (۱). سیستمهای تولید سنتی پروتئینهای نوترکیب دارویی که از تخمیر های میکروبی، کشت سلولهای

www.SID.ir

Archive of SID

حشرات و پستانداران و حیوانات تراریخت استفاده می کنند، از لحاظ هزینه، سطح تولید، ایمنی تولید و درستی محصول اشکالاتی دارند (۱۰، ۱۳). هدف از این پژوهش، تولید پروتئین نوترکیب دارویی (tPA) در گیاه توتون می باشد. پروتئین دارویی tPA دارای چندین ویژگی بوده که باعث برتری آن نسبت به سایر پروتئینهای دارویی مشابه می شود. مثلاً در مقایسه با رتپلاز، ساروپلاز و لانوتپلاز نیمه عمر پلاسمائی کمتری دارد و دز مصرفی آن در مقایسه با رتپلاز و لانتوپلاز پایین تر است (۲). علاوه بر این، فعال کننده پلاسمینوژن انسانی در سه مکان N–گلیکوزیله می شود که گلیکوزیلاسیون یکی از این مکانها در حدود ۵۰ درصد مولکولها کارایی دارد (۲۱). نیمه انتهای آمینی دارای بخش موسوم به F است که با توالی موجود در فیبرونکتین مشابه ، و یک بخش G و دو ساختار K (K1 و K2) دارد که با ساختار های موجود در پلاسمینوژن مشابه است. نیمه انتهای کربوکسیلی، بخشP دارد که با تریپسین و کیموتریپسین مشابهت دارد. از اینرو، ساختار شماتیک tPA را می توان بصورت F-G-K1-K2-P نشان داد(۲۰). امروزه در جهت هرس کردن این ژن تلاش می شود تا با کوچک کردن اندازه مولکول، بتوان آن را در سیستم باکتری یا سایر سیستمها بیان کرد. مثلاً برای بیان آن در اشیریشیاکولی ترکیب K2P را ایجاد و آن را بیان کردند (۳۱).

گیاهان به طور بالقوه یک منبع ارزان جهت تولید پروتئینهای نوترکیب می باشند. کوسنادی و همکاران تخمین زده اند که هزینه تولید پروتئینهای نوتوکیب در گیاهان ۱۰ الی ۵۰ برابر کمتر از تولید همان پروتئین اشیریشیاکولی در فرمانتور است (به نقل از ۷). تا کنون گزارشی در مورد تراریختی و تولید پروتئین tPA درگیاه وجود نداشته است. گرچه گزارشاتی از تولید tPA در باکتری اشیریشیاکولی(۱۶) و لیشمانیای غیر بیماریزا (۲۶) وجود دارد ولی هیچگونه گزارشی از تولید پروتئین دارویی tPA در گیاه وجود نداشته و این اولین گزارش از انتقال ژن tPA به گیاه می‌باشد. در این تحقیق، از توالیهای افزایش دهنده بیانی (Kozak sequence)، جهت افزایش بیان استفاده گردید. این توالی از بررسی توالیهای قبل از کدون شروع، در ژنهایی با بیان بالا در گیاهان به دست آمد و در طراحی آغازگر پیشبرنده مد نظر قرار گرفت(۲۷). جهت کمک به پیچش و تولید بهتر پروتئین، از توالی نشانه KDEL نیز استفاده شد. پپتید چهارتائیKDEL، در سلولهای پستانداران و گیاهان، به عنوان یک سیگنال تأخیری برای شبکه آندوپلاسمی عمل می کند (۱۹). حضور باند موردنظر در آزمون وسترن بلات ، بیان ژن tPA در گیاهان تراریخت اثبات شد. در این تحقیق علاوه بر آزمون وسترن بلات از آنالیز زیموگرافی نیز استفاده شده که این آزمون نیز فعال بودن پروتئین tPA را اثبات نمود.

باید توجه داشت که عملیات تخلیص تحت شرایط آزمایشگاهی که با استفاده از بافرها و افزودنیهای گرانقیمت صورت می گیرد، ممکن است که در مقیاس آزمایشگاهی توجیه پذیر باشد اما در مقیاس وسیع قابل توجیه نمی باشند. بنابراین مواد گرانقیمت را باید با مواد ارزانقیمتی نظیر نمکهای فسفات یا استات جایگزین کرد. برای حل این مشکلات، باید ضمن بکارگیری روشهای جدید برای افزایش بیان پروتئین های نوترکیب، روشهای تخلیص جدید که علاوه بر ارزان بودن دارای قابلیت مقیاس پذیری نیز باشند مورد ارزیابی و اصلاح قرارگیرد. در واقع وظیفه و چالش جدید کشاورزی مولکولی در زمینه تولید زیست داروها، ترکیب روشهای مهندسی ژنتیک جهت افزایش بیان با روشهای تخلیص اقتصادی و در نهایت رسیدن به یک جایگاه تولیدی مناسب می باشد.

سپاسگزاری: از حمایتهای مادی و معنوی مرکز صنایع نوین وزارت صنایع و معادن و همکاریهای علمی انستیتو پاستور ایران و دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کمال سپاسگزاری را می نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- نیاورانی، ا.، ن. ملک نیا و پ. پاسالار(۱۳۸۱). بیوشیمی هارپر. چاپ سوم. انتشارات سماط(ترجمه).

2- Allan M, Ross MD. (1999). New plasminogen activators: A clinical review. Clin. Cardiol. 22:165-171.

3- Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, Touzani O, Vivien D.(2004).Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in storke-induced injury. TRENDS in Neurosciences. 27(3):155-160.

4- Brown M, Tyrell A.(1985). Isolation of human t-PA genomic DNA clone and itsexpression in mouse L cells. Gene. 33:279-284.

5- Fischer, R; and Schillberg, S. (2004). Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical protein, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, pp: 114.

6- Gallois P, Marinho P. (1995). Leaf disk transformation *using* Agrobacterium tumefaciens – expression heterologous genes in tobacco. Methods in Molecular Biology. 49:39-48.

7- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. and Carter, A.(2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotechnology, 18: 1151-1155.

8- Hiatt, A.H., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342:76-78.

9- Hogue RS, Lee JM, and An G. (1990). Production of a foreign protein product with genetically modified plant cells. Enzyme Microbiology Technolology, 12: 533–538.

10- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S. (2001). Plant-derived measeles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. Vaccine. 19:2163-2171.

11- Leite A, Kemper E, Da Silva M, Luchessi A, Siloto R, Bonaccorsi E, El-Dorry H. and Arruda P. (2000). Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco. plants Molecular Breeding, 6: 47–53.

12- Ma JK, Lehner T, Stabila P, Fux CI, and Hiatt A. (1994). Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. European Journal of Immunology, 24: 131–138.

13- Ma JKC, Drake PMW, and Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews, 4: 794-805.

14- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, Hayglass K. and Lee JM. (1998). Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. Protein Expression and Purification, 13: 45–52.

15- Mason, HS., Lam, DM. and Arntzen, CJ. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. PNAS. 89(24): 11745-11749.

16- Mattes R. (2001). The production of improved tissue-type plasminogen activator in Escherichia coli. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 27(4):325-335.

17- Mosher DF. (1990). Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. Clin Cardiol. 13(VI):5-11.

18- Murashige, S. and Skoog, M. (1962). Arevised medium for rapid grawth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol., 15: 473-497.

19- Okamoto T, Nakayama H, Seta K, Isobe T, Minamikawa T. (1994). Posttranslational processing of a carboxy-terminal propeptide containing a KDEL sequence of plant vascular cysteine endopeptidase(SH-EP). FEBS letter. 351:31-34.

20- Pathy L. (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. Cell. 41:657-663.

21- Pohl G, Kenne L, Nilsson B, and Einarsson M. (1987). Isolation and characterization of three different chains from melanoma tissue plasminogen activator. Eur. J. Biochem. 170:69-75.

22- Sambrook J, Russel D. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. NY.

23- Schillberg, S., Emans, N., Fishcher, R. (2002). Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemical Reviews.1: 45-54.

24- Shillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A. and R. Fisher. (1999). Apoplastic and cytosolic

www.SID.ir

Archive of SID

expression of full size antibodies and antibodies fragments in *Nicotiana tabacum*. Transgenic Res. 8:255-263.

25- Sijmons, PC., Dekker, BM., Schrammeijer, B., Verwoerd, TC., van den Elzen PJ. and Hoekema A. (1990)Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants.*Biotechnology (NY)*, 8:217-221.

26- Soleimani M, Davudi N, Fallahian F, Mahboudi F.(2006). Cloning of tissue Plasminogen Activator cDNA in nonpathogenic Leishmania. Yakhteh Medical Journal. 8(3):196-203.

27- Taylor, J., Jones, J.D.G., Sandler, S., Muller, G.M. and Bedbrook, J.(2000). Optimizing of expression of chimeric genes in plant cells. Mol.Gen. Genet, 210: 572-577.

28- Terashima, M., Ejiri, Y., Hashikawa, N. and Yoshida, H. (1999). Effect of Osmotic Pressure on Human a1-Antitrypsin Production by Plant Cell Culture Biochem. Eng. J. 4: 31-36.

29- Terashima, M., Murai, Y., Kawamura, M., Nakanishi, S., Stoltz, T., Chen, L., Drohan, W., Ropdriguez, R.L. and Katoh, S. (1999). Production of Functionaluman a1-Antitrypsin by Plant Cell Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 516-523.

30- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS. and Arntzen C J. (1995).Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proc. National Academy of Science USA, 92:3358–3361.

31- Waldenstrom M, Holmgren E, Attersand A, Kalderen Ch, Lowenadler B, Raden B, Hansson L, Pohl G. (1991). Synthesis and secretion of a fibrinolytically active tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. Gene. 99:243-248.

Cloning and Transformation of human tissue Plasminogen Activator (t-PA) gene in Tobacco Plants

Masoumiasl A.[1], Jalali-Javaran M.[1], Mahboudi F.[2], and Alizadeh H.[3]

[1]Plant Breeding Dept., School of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

[2]Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of IRAN

[3] Plant Breeding Dept., School of Agriculture, Tehran University, Karaj, I.R. of IRAN

Abstract

Plants offer a promising alternative to microbial fermentation and animal cell cultures for production of recombinant proteins, because of features such as high safety, low cost, post-translation modifications and high volume of production. In this report, recombinant cDNA of tissue Plasminogen activator was transformed to tobacco plants. This gene was expressed under the control of CaMV35S promoter and NOS terminator. Kozak sequence and KDEL signal were linked at amino and carboxy-termini of tPA gene, respectively. The constructed cassette pBI(tPA) was transferred to agrobacterium and the tPA gene was inserted into the plant genome by agrobacterium-mediated transformation. Transgenic plants were grown on selective medium and then transferred into perlite and soil, to obtain subsequent generation(T_0). The transgenic plants were tested by polymerase chain reaction (PCR), RT-PCR and Western blotting.

Keywords: recombinant protein, tissue Plasminogen activator, tobacco, gene transfer

www.SID.ir