Archive of SID

طراحی و تهیه سازه حاوی ژن اینترفرون گاما و بیان آن در بذر گیاه کلزا

خدیجه باقری[۱]، مختار جلالی جواران*[۱]، فریدون مهبودی[۲]، احمد معینی[۱] و علیرضا زبرجدی[۳]

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

[۲]تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

[۳]کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۰

چکیده

از مهمترین عوامل مؤثر بر افزایش میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاه، بیان آن در بافت مناسب و نیز افزایش پایداری و تجمع پروتئین با استفاده از عوامل هدف گیری کننده به جایگاههای مناسب در سلول است. شبکه آندوپلاسمی به دلیل حضور پروتئینهای چپرونی مختلف و ایزومرازها موجب بسته بندی صحیح پروتئینها شده و پایداری و تجمع پروتئین نوترکیب به میزان قابل توجهی افزایش می یابد. از طرف دیگر بیان پروتئین نوترکیب در بذر، موجب تجمع پایدار آن در غلظت نسبتاً بالا درحجم کوچک و فشرده شده که برای استخراج و ذخیره سازی بسیار مناسب می باشد. در این تحقیق برای بیان اینترفرون گامای انسانی در بذر گیاه کلزا و قرار گرفتن آن در شبکه آندوپلاسمی از پیشبرنده اختصاصی بذر (Napin) و توالی KDEL در انتهای کربوکسیلی ژن اینترفرون گامای انسانی استفاده شد. ژن اینترفرون گاما ابتدا در ناقل pGEM®-T Easy کلون و پس از تأیید صحت آن با استفاده از روش PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی، قطعه موردنظر در ناقل بیانی گیاهی pBI121 ساب کلون گردید. ناقل نوترکیب pBI IFNγ با روش انجماد و ذوب به اگرباکتریوم سویه LBA_{4404} معرفی و این باکتری برای تراریختی گیاه کلزا از طریق ریزنمونه های کوتیلدونی مورد استفاده قرار گرفت. گزینش نوساقه های باززایی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین) انجام شد. آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با استفاده از PCR و در سطح پروتئین با استفاده از SDS-PAGE بیانگر انتقال موفقیت آمیز ژن IFNγ و بیان پروتئین بود. همچنین فعالیت پروتئین تولید شده با تست ELISA تأیید شد.

واژه های کلیدی: پیشبرنده اختصاصی بذر (Napin)، توالی KDEL، پروتئین نوترکیب، اینترفرون گامای انسانی، کلزای تراریخت

* **نویسنده مسئول، تلفن تماس:** ۰۹۱۲۳۰۹۱۹۱۷ ، **پست الکترونیکی:**m_jalali@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه برای تولید داروهای بیولوژیکی استفاده از سیستم میکروارگانیسمهایی مثل باکتری *E. coli*، مخمر و یا سلولهای جانوری رایج هستند. علی رغم مزایای هر یک از این ارگانیسمها مشکلاتی نیز در تولید وجود دارد که می توان به هزینه بالای تولید و نیز متفاوت بودن پروتئینهای تولید شده با شکل طبیعی آنها اشاره کرد. با استفاده از دست ورزی ژنتیکی سیستم گیاهی مناسب می توان پروتئینهای زیستی فعال، مطمئن، در حجم انبوه و با هزینه پایین تولید کرد. مزیت عمده گیاهان نسبت به میکروارگانیسمها این است که ساخت، ترشح و تغییرات پس از ترجمه که برای فعالیت پروتئینهای نوترکیب لازم است در گیاهان وجانوران بسیار به هم شبیه است. همچنین هزینه های تولید پروتئینهای نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می تواند ۲ تا ۱۰ درصد سیستم تخمیری و ۰/۱ درصد سلول جانوری باشد (۲۳).

پروتئینهای نوترکیب در اندامهای مختلف گیاهی مثل برگ، بذر و بافتهای ذخیره رویشی مثل غده تولید شده اند. از

www.SID.ir

Archive of SID

بین این اندامها به چند دلیل بذر گیاهان برای بیان پروتئینهای نوترکیب بیشتر مورد توجه هستند. از جمله مهمترین آنها، افزایش پایداری پروتئین، تجمع بالای پروتئین در حجم کوچک و ذخیره سازی آسان آن، استخراج نسبتاً راحت به دلیل کم بودن ترکیبات فنولیک و ترکیبات پیچیده پروتئینی و در نهایت محدود شدن بیان پروتئین به یک اندام ذخیره ای و جلوگیری از اختلال در رشد بافتهای دیگر می باشد. به همین دلیل تولید پروتئینهای نوترکیب در بذر گیاهان بسیار جالب توجه است(٤). برای بیان پروتئین نوترکیب در بافت و یا اندام خاصی از گیاه، استفاده از پیشبرنده اختصاصی آن بافت و یا اندام ضروری است. برای این منظور در این تحقیق از پیشبرنده اختصاصی بذر (Napin) استفاده شد. این پیشبرنده مربوط به پروتئین ذخیره ای Napin در بذر کلزا است.

علاوه بر نوع بافت گیاه، بخشی از سلول که پروتئین نوترکیب در آن بیان می شود نیز در تجمع و پایداری آن مؤثر است. بنابراین یکی دیگر از راههای افزایش تولید ، طراحی کاستهای بیانی مناسب و افزایش پایداری و تجمع پروتئین با استفاده از عوامل هدف گیری کننده به جایگاههای مناسب در سلول است (۹). شبکه آندوپلاسمی سلول (ER) حاوی پروتئینهای چپرونی مختلف است که موجب بسته بندی صحیح پروتئینها شده و از تجمع و تشکیل ساختارهای ۳ بعدی ناصحیح جلوگیری می کند، همچنین ایزومرازهای موجود در ER باندهای دی سولفیدی را تشکیل می دهند. به همین دلیل قرارگرفتن پروتئین نوترکیب در ER موجب بسته بندی صحیح پروتئین شده در نتیجه پایداری و تجمع آن افزایش می یابد. در شبکه آندوپلاسمی گیاهان نیز پروتئینهای مشابه پروتئینهای چپرونی BiP و GRP94 جانوری شناسایی شده است. از طرف دیگر به نظر می رسد که قرارگرفتن پروتئین نوترکیب در بیرون از ER (سیتوپلاسم و یا آپوپلاست) موجب تجزیه سریع آن می شود(٦). توالی KDEL از جمله عوامل نگهدارنده پروتئین در شبکه آندوپلاسمی است که برای قرارگرفتن پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در مطالعات متعددی استفاده و کارآیی آن به اثبات رسیده است.

اینترفرون گاما (IFNγ) از جمله پروتئینهایی است که ارزش درمانی بالایی دارد. IFNγ برای درمان بیماران با نقص مادرزادی از جمله گرانولوماتوس مزمن (Chronic granulomatous) (۲٦) و همچنین عوامل عفونی درون سلولی مانند لیشمانیا (۳) و سالمونلا تیفوموریوم (١٦) و غیره کاربرد دارد. استفاده از آن در درمان سرطانهای مختلف از جمله نوروبلاستوما (۲۲) و ملانوما (۲) نیز رایج است.

به دلیل کاربردهای وسیع IFNγ در پزشکی، تلاشهای زیادی در جهت تولید انبوه آن صورت گرفته اما پروتئین تولید شده در باکتری *E. coli* ساختار فضایی مناسب نداشته و بخش اعظم آن به فرم انکلوژن بادی (Inclusion bodies) در می آید (۲۵). استفاده از سلولهای یوکاریوتی جهت تولید آنها نیز هزینه بسیار بالایی دارد. بنابراین به نظر می رسد که دست ورزی ژنتیکی گیاهان برای تولید این گروه از پروتئینهای باارزش، یک روش جایگزین مناسب باشد. براساس تحقیقات انجام شده، بیان پروتئین نوترکیب در بذر گیاه و همچنین شبکه آندوپلاسمی سلول مزایای زیادی دارد، لذا در این تحقیق سازه بیانی طوری طراحی و ساخته شد تا پروتئین IFNγ در شبکه آندوپلاسمی بذر گیاه کلزا بیان شود.

مواد و روشها

پلاسمید و نژادهای باکتری: از باکتری *E. coli* سوش F'Top10 (این سویه دارای ژن مقاومت به تتراسایکلین در ژنوم است) و ناقل pGEM®-T Easy برای انجام مراحل کلونینگ استفاده شد. برای تراریخت کردن گیاهان از اگرباکتریوم تومی فاشینس سویه LBA_{4404} و ناقل گیاهی pBI121 استفاده گردید. مواد زیستی مورد استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

شرکتهایPromega, Fermentas، QIAGEN و سیناژن تهیه شد.

تکثیر و کلونینگ ژن IFNγ: ژن اینترفرون گامای انسانی از انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. mRNA این ژن توسط معین رضاخانلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ جدا و تعیین توالی شد و در بانک ژن با شماره AF506749 به ثبت رسیده است (۱۳).

براساس توالی موجود اینترفرون گاما در بانک ژن، دو آغازگر اختصاصی برای تکثیر آن طراحی شد. در آغازگر معکوس توالی KDEL (توالی نگه دارنده پروتئین در شبکه آندوپلاسمی) براساس کدنهای ترجیحی گیاه قرار داده شد. آغازگرهای طراحی شده از نظر ΔG، Tm، ایجاد دایمر و تشکیل لوپ با نرم افزار Gene Runner مورد آنالیز قرار گرفتند.

تکثیر ژن IFNγ با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر 5'-AGA GGA TCC ATG CAG GAC CCA TAT GTA AAA G-3' با محل برشی *Bam*HI (توالی که زیر آن خط کشیده شده است) و آغازگر معکوس 5'- GCA GAG CTC TTA CAA TTC GTC TTT CTG GGA TGC TCT TCG-3´ با محل برشی *Sac*I انجام شد. غلظت اجزای مختلف PCR عبارتند از DNA الگو (۱۰۰ ng، DNA الگو پلاسمید pRSETB بود که ژن IFNγ در آن قرار داشت)، غلظت یون Mg^{2+} (۱.۵ mM)، dNTP (0.2mM از هر نوکلئوتید)، بافر (1x)، آنزیم Taq DNA polymerase (1u)، آغازگر (12 pmol) و دمای اتصال آغازگر با رشته الگو ۶۳ درجه سانتی گراد انتخاب گردید. خالص سازی قطعات حاصل از تکثیر با اندازه تقریبا ۵۰۰bp با استفاده از کیت خالص سازی DNA از روی ژل با روش ارائه شده توسط شرکت سازنده از روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

پس از تکثیر و تخلیص، ژن موردنظر در ناقل pGEM®-T Easy کلون گردید. سازه تهیه شده به سلولهای مستعد *E.coli* منتقل شده و بر روی کلنیهای سفید رشد کرده در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و تتراسیکلین، IPTG و X-gal با غلظتهای استاندارد (۲۰)، کلنی-PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ انجام شد. سپس کلونهای PCR مثبت با هضم آنزیمی نیز تأیید گردید و در نهایت کلونهای مثبت توالی یابی شدند و نتایج توالی یابی با نرم افزارBlast و برنامه Clustalw مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه سازه حاوی ژن اینترفرون گاما (pBI IFNγ) : برای تهیه این سازه نیاز به پیشبرنده اختصاصی بذر بود که پیشبرنده Napin از خارج از کشور تهیه شد. ابتدا در ناقل بیانی pBI121، پیشبرنده Napin جایگزین پیشبرنده CaMV35S شد. برای این منظور از آنزیمهای برشی Bam HI و Hind III که در دو طرف پشبرنده CaMV35S قرار دارند، استفاده شد. پس از حذف ژن GUS (با هضم آنزیمی *Bam* HI و *Sac* I)، ژن IFNγ حاوی توالی KDEL در انتهای کربوکسیلی، با آنزیمهای مذکور در ناقل pBI121مجدداً کلون گردید. ناقل نوترکیب pBI IFNγ به روش انجماد و ذوب (Freeze and thaw) (۱۲) به اگرباکتریوم منتقل شد.

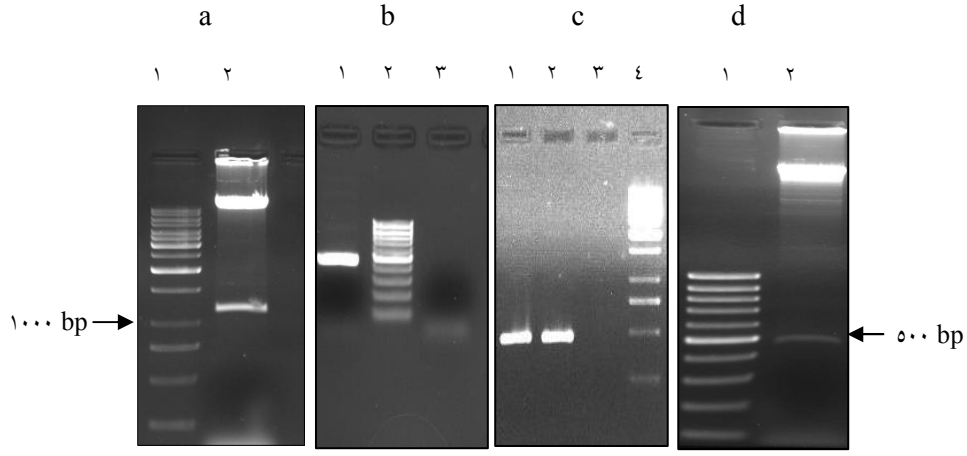
تراریزش کلزا و باززایی گیاهان تراریخت: ضدعفونی بذور کلزا (رقم PF4570/91) با استفاده از هیپوکلریت ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای جوانه زنی بذور از محیط MS (۱۵) در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. تراریزش و باززایی گیاهان مطابق با روش Moloney و همکاران (۱۴) انجام شد. برگهای کوتیلدونی (با طول دمبرگ تقریبا ۳ mm) با دقت از محل جوانه انتهایی (با حذف جوانه انتهایی) بریده شدند. اگرباکتریوم حاوی سازه مورد نظر به مدت یک شب در محیط LB + 50µg/ml کانامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و

www.SID.ir

Archive of SID

تاریکی روی شیکر rpm ۱۸۰ کشت داده شد، وقتی که OD_{600} باکتری رشد کرده به ۱-۰/۷ رسید، در دمای ٤ درجه سانتی گراد و دور rpm ۳۵۰۰ به مدت ۸-۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس سلولهای باکتری در محیط تلقیح (شامل MS+ gl^{-1} ۵۰ گلوکز) کاملاً هموژن شدند. ریزنمونه های کوتیلدونی به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه در تماس با سوسپانسیون اگرباکتریوم حاوی سازه مدنظر قرار گرفته و در محیط هم کشتی (شامل MS + BAP 4/5 mgl^{-1}) به مدت ٤٨ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲٦ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعد این ریزنمونه ها بر روی محیط کشت انتخابی شامل محیط هم کشتی به اضافه ۱۰mgl^{-1} کانامایسین (به منظور گزینش گیاهچه های تراریخت) و ۲۰۰ mgl^{-1} سفاتوکسیم (برای حذف اگرباکتریوم) در دما و دوره نوری مشابه مرحله قبل به مدت ٤ هفته نگهداری شدند. واکشت نمونه ها به فاصله هر ۱۵ روز یکبار بر روی همان محیط انجام شد. برای طویل شدن نوساقه های رشد یافته از محیط MS ۱/۲ حاوی ۲۵mgl^{-1} کانامایسین به اضافه ۲۰۰ mgl^{-1} سفاتوکسیم و برای ریشه زائی نوساقه ها از محیط MS ۱/۲+ ۱۰۰ mgl^{-1} سفاتوکسیم استفاده شد. در مرحله آخر گیاهان ریشه دار شده ابتدا به گلدانهای حاوی پرلیت (در دما و نور مشابه مرحله قبل) و سپس به خاک منتقل شده و در شرایط گلخانه (دمای ۱۵ درجه سانتی گراد با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. گیاهان تراریخت با پاکت گذاری از یکدیگر ایزوله شدند تا از دگرگشنی آنها جلوگیری شود. بذور جمع آوری شده از گیاهان تراریخت احتمالی جهت آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

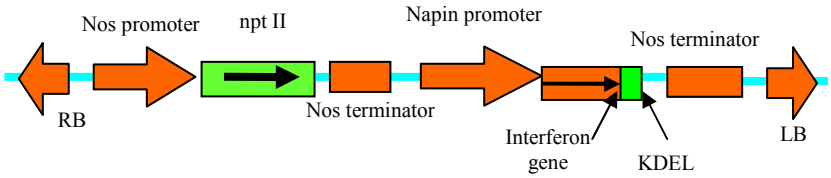
بررسی مولکولی گیاهان تراریخت: از برگهای جوان گیاهان تراریخت و شاهد (گیاهان شاهد مورد استفاده در مراحل مختلف غیرتراریخت بودند)، DNA ژنومی بر اساس روش دلاپورتا (۸) استخراج و کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از بیوفتومتر تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ واکنش PCR برای گیاهان گزینش شده در محیط انتخابی انجام شد.



شکل۱- a) تأیید جایگزینی پیشبرنده Napin به جای پیشبرنده CaMV 35S، خط ۱: نشانگر ۱kb خط ۲: ناقل pBI121 برش داده شده و قطعه bp ۱۱٤۰ آزاد شده؛ b) تکثیر ژن INFγ، خط ۱: قطعه ۵۰۰bp تکثیر شده، خط ۲: نشانگر ۱۰۰bp و خط۳: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA الگو)؛ c) تأیید کلون ژن IFNγ با کلنی- PCR، خط ۱و ۲ : قطعه تکثیر شده (قطعه ۵۰۰bp)، ۳: کنترل منفی و ٤: مارکر ۱kb؛ d) تأی ید کلون ژن IFNγ با هضم آنزیمی، خط ۱: نشانگر ۱۰۰bp، خط ۲: ناقل pBI IFNγ برش داده شده با آنزیم BamHI و SacI و قطعه ۵۰۰bp آزاد شده.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- سازه pBI IFNγ، حاوی ژن NPTII (مقاومت به کانامایسین)، پیشبرنده Napin، ژن IFNγ و توالی KDEL در انتهای کربوکسیلی آن که در ناقل بیانی pBI121 در بین دو ناحیه LB و RB قرار گرفته است.

به منظور بررسی بیان پروتئین IFNγ، استخراج پروتئین کل محلول از ۰/۱ گرم بذر گیاهان تراریخت (گیاهانی که PCR آنها مثبت بود) و شاهد به روش Guy و همکاران (۱۱) انجام شد. اندازه گیری غلظت نمونه های پروتئین به روش برادفورد (۵) انجام شد. سپس نمونه های استخراج شده با استفاده از روش SDS-PAGE (درصد ژل متراکم کننده برابر با ٤ درصد و ژل جداکننده برابر۱۲/۵ درصد) آنالیز شدند.

برای بررسی فعالیت پروتئین تولید شده از تست ELISA استفاده شد. ۲۰µg/۱۰۰µl از پروتئین استخراج شده از بذر گیاهان تراریخت و شاهد در پلیت الایزا قرار داده شد و به مدت ١٦ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس محلول ٤ درصد شیر خشک بدون چربی اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت (این محلول جهت بلوکه کردن فضاهای خالی پلیت الایزا می باشد). سپس آنتی بادی اختصاصی علیه IFNγ با منشاء خرگوشی با غلظت ۲/۵µg/۱۰۰µl به عنوان آنتی بادی اولیه ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پس از این مدت آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP (آنتی بادی موشی علیه آنتی بادی خرگوش) با رقت ۱/۱۸۰۰ استفاده شد. لازم بذکر است در تمام مراحل پلیت الایزا ۳ بار با بافر فسفات شستشو داده شد و پس از متوقف کردن واکنش با اسید سولفوریک دو نرمال، جذب نوری نمونه ها در طول موجب ٤٥٠ قرائت گردید.

نتایج و بحث

جایگزینی پیشبرنده Napin به جای CaMV35S با بهره گیری از هضم آنزیمی (HindIII و BamHI) تأیید شد به این ترتیب که قطعه ۱۱٤۰bp (مربوط به Napin) به جای قطعه ۸۳۵ bp (مربوط به CaMV35S) قرار گرفت (شکل۱a).

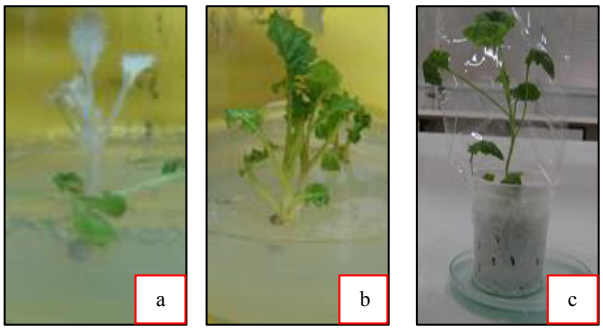
همانطور که انتظار می رفت تکثیر ژن IFNγ یک قطعه حدود ۵۰۰bp تولید نمود. (شکل۱b) پس از تأیید کلون این قطعه در ناقل TA برای توالی یابی اقدام گردید. بررسی نتایج توالی یابی با نرم افزارهای ذکر شده، میزان ۹۹ درصد همولوژی با توالی ژن IFN (با شماره دسترسی AF506749) موجود در بانک ژن نشان داد. کلون مجدد ژن IFNγ در ناقل بیانی گیاهی pBI121 با روش کلنی- PCR (شکل ۱c) و هضم آنزیمی تأیید گردید (شکل ۱d) و نهایتاً سازه pBI IFNγ ساخته شد (شکل ۲).

انتقال ناقل حاوی سازه pBI IFNγ به اگرباکتریوم با روش کلنی- PCR تأیید شد. از این باکتری برای تراریزش ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده شد. نوساقه هایی که با دریافت T-DNA اگروباکتریوم، ژن مقاومت به کانامایسین (NPTII) در آنها بیان شده بود در مقابل کانامایسین محیط مقاومت کرده و سبز باقی ماندند. نوساقه های غیرتراریخت در محیط انتخابی با شکل غیرطبیعی به رنگ سفید یا ارغوانی در آمدند (شکل۳a و ۳b). نوساقه هایی که تا مرحله ریشه دهی سبز مانده بودند به گلدانهای حاوی

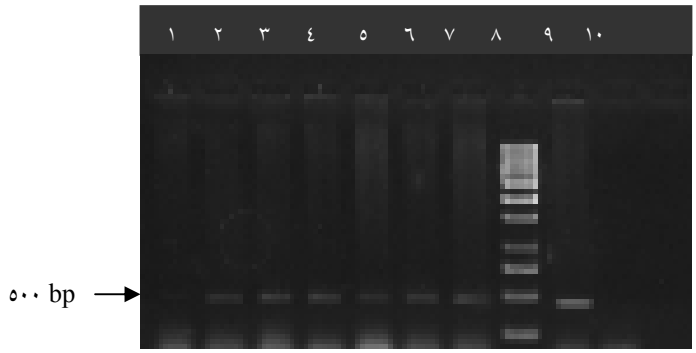
www.SID.ir

Archive of SID

پرلیت جهت سازگاری به شرایط محیط منتقل شدند (شکل۳c).



شکل۳- باززایی و رشد نوساقه ها بعد از تراریزش؛ a) نوساقه باززایی شده غیرتراریخت b) باززایی چند نوساقه سبز از یک ریزنمونه بر سطح محیط انتخابگر c) گیاه تراریخت منتقل شده به گلدان حاوی پرلیت.



شکل ٤- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی IFNγ؛ خط ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷ گیاهان تراریزش شده، خط۸: نشانگر kb ۱ ، خط۹: کنترل مثبت (پلاسمید pBI IFNγ)؛ خط ۱۰: کنترل منفی (گیاه شاهد)

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNAو اطمینان از انتقال ژن هدف به گیاهان تراریخت، پس از استخراج DNA ژنومی از برگ گیاهان نسل اول (T0) و شاهد (گیاه غیرتراریخت)، PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن IFNγ انجام شد و قطعه ۵۰۰bp مربوط به ژن IFNγ در گیاهان تراریخت (شماره۲،۳،٤،٥،٦،۷) مشاهده شد در حالی که در گیاهان شاهد (شماره ۱۰) باندی مشاهده نشد (شکل٤).

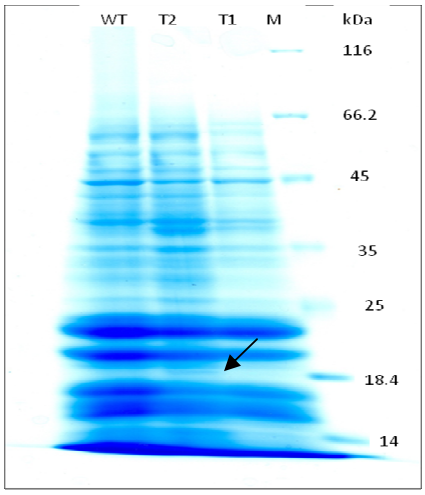
جهت بررسی بیان ژن IFNγ در سطح پروتئین، پروتئین کل محلول استخراج شده از بذر رسیده گیاهان تراریخت نسل اول (T0) و شاهد با تکنیک SDS-PAGE با ژل ۱۲.۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در تعدادی از نمونه ها باند جدید با وزن تقریباً ۱۸KD (احتمالاً مربوط به پروتئین IFNγ) مشاهده شد که در گیاهان شاهد این باند وجود نداشت (شکل ۵، خط ۲).

آزمون ELISA انجام شده جهت بررسی اینترکشن بین پروتئینهای استخراج شده از بذر گیاهان (که حاوی پروتئین INFγ نیز بود) نسبت به آنتی بادی INFγ نشان داد که با توجه به تفاوت جذب نوری بین بعضی گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد، پروتئین مورد نظر دارای فعالیت می باشد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود گیاهان T2، T4 و T1 بترتیب بیشترین تفاوت میزان OD را نسبت به گیاه شاهد دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

این تحقیق با هدف استفاده از پتانسیل بالای گیاهان جهت تولید پروتئین اینترفرون گامای انسانی که دارای کاربردهای وسیع در پزشکی است، طراحی و اجرا گردید. برای رسیدن به این هدف لازم است که بهینه سازی از جنبه های مختلف صورت گیرد. از عوامل بسیار مهم جهت بهینه سازی سیستمهای تولید پروتئینهای نوترکیب می توان به انتخاب پیشبرنده قوی مناسب، هدف گیری پروتئین مورد نظر به بافت مناسب گیاه و نیز قرارگرفتن پروتئین در جایگاه مناسب در داخل سلول اشاره کرد. در مطالعات مختلف به منظور افزایش پایداری پروتئین تولید شده در داخل سلول با استفاده از توالی ٤ آسیدآمینه (KDEL) آن را به شبکه آندوپلاسمی هدف گیری نموده اند. با اینکه نتایج این مطالعات تا حدی باهم متفاوت است اما تقریباً در تمام آنها یک نکته مشترک وجود دارد و آن اینکه این توالی موجب افزایش بیان پروتئین نوترکیب می شود. شوتن و همکاران در سال ۱۹۹٦ گزارش کردند که این توالی به خوبی توسط گیرنده های مربوطه شناسایی شده و موجب نگهداری آنتی بادی تولید شده در ER می شود. این مقدار افزایش تولید (تا ۱۰۰ برابر حالتی که از توالی KDEL استفاده نشود) به دلیل قرار گرفتن آنتی بادی در ER و در امان ماندن آن از تجزیه توسط پروتئازها است (۲۱).



شکل۵- آنالیز گیاهان تراریخت و شاهد با استفاده از SDS-PAGE. خط۱, نمونه پروتئینی گیاه شاهد، خط ۲ و ۳: نمونه پروتئینی گیاهان تراریخت (فلش محل قرار گرفتن پروتئین جدید را نشان می دهد)، خط ٤: نشانگر پروتئینی

واندلت و همکاران در سال ۱۹۹۲ نیز گزارش کردند که با افزودن توالی KDEL، ۲۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش را در بیان پروتئین Vicilin بذر نخود فرنگی مشاهده کردند. نیمه عمر پروتئین تولید شده ٤۸ ساعت بوده در حالی که نیمه عمر پروتئین بدون توالی KDEL حدود ٥-٤ ساعت بود (۲٤).

هدف دیگر از اضافه کردن توالی KDEL، ممانعت از ورود پروتئین تولید شده به دستگاه گلژی گیاه است. در غشای سیسترون گلژی، گلیکانهای گیاهی به پروتئین نوترکیب اضافه می شود که این گلیکانها در بدن انسان پاسخهای ایمنی را موجب می شوند، حضور توالی KDEL از وارد شدن پروتئین به دستگاه گلژی ممانعت به عمل می آورد. نتایج کار فرایگریو و همکاران (۲۰۰۱) نشان داده که توالی KDEL با کارآیی بالایی از قرار گرفتن پروتئین در دستگاه گلژی ممانعت به عمل می آورد (۱۰).

از طرف دیگر نتایج مطالعات جدید بیانگر این است که اگر در سازه بیانی، از پیشبرنده اختصاصی بذر و توالی KDEL به طور همزمان استفاده شود، میزان بیان پروتئین به طور چشمگیری بالا می رود. طبق گزارش کنراد و همکاران در سال ۱۹۹۸ بالاترین میزان بیان ScFv وقتی به دست آمد که از پیشبرنده بذری USP و سیگنال KDEL استفاده شد (٦). در تحقیق دیگری دروگن بروک و همکاران (۲۰۰٦) نیز گزارش کردند که با استفاده از کاست بیانی اختصاصی بذر و هدف گیری پروتئین نوترکیب به شبکه آندوپلاسمی بالاترین میزان بیان ScFv (بیش از ۳٦ درصد پروتئین محلول کل در بذور آرابیدوپسیس) را تولید کردند (۹). توالی KDEL تأثیر کمی در تجمع آنتی بادی در برگ توتون دارد ولی در بذر میزان تولید آن را به مقدار زیادی بالا می برد (۱۷).

براساس نتایج مطالعات قبلی، در این تحقیق، در کاست بیانی بذر از پیشبرنده Napin که بیان بالایی در بذر کلزا دارد، استفاده شد (در بذور رسیده کلزا، پروتئین Napin، ۳۰-۲۰ درصد پروتئین کل بذر را تشکیل می دهد) (۷).

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین توالی KDEL جهت هدف گیری پروتئین تولید شده به ER در انتهای کربوکسیلی تعبیه شد.

از فاکتورهای مهم در انتقال ژن به گیاه کلزا، نوع ریزنمونه، رقم کلزا، سویه اگرباکتریوم و مدت زمان تلقیح است که در بالا بودن فراوانی باززایی و تراریختی بسیار مؤثر هستند، در این تحقیق بر اساس نتایج زبرجدی و همکاران (۱) ریز نمونه کوتیلدون، رقم PF، سویه LBA_{4404} و مدت زمان تلقیح ۲۰-۱۰ ثانیه انتخاب شد. در خصوص مصرف کانامایسین در محیط انتخابی برای کلزا تراریخت گزارشات متعددی وجود دارد که اغلب آنها مقدار $25\ mg\ l^{-1}$ را توصیه نموده‌اند (۱۹ و ۲۷). در این تحقیق از استراتژی چند مرحله‌ای برای افزودن ماده انتخاب کننده استفاده شد. در مرحله اول غلظت $10\ mg\ l^{-1}$ کانامایسین استفاده گردید. به نظر می‌رسد که این غلظت برای حذف سلولهای غیرتراریخت کفایت می‌کند، اما قادر به حذف سلولهایی که تعداد نسخه‌های کمی از ساختار مورد نظر را دریافت کرده یا ژنهای وارد شده در ناحیه نامطلوبی از کروموزوم قرار گرفته‌اند، نمی‌باشد. در مرحله بعد از غلظت، $25\ mg\ l^{-1}$، استفاده شد. در این حالت فشار محیطی (غلظت کانامایسین) به قدری است که قادر است سلولهای تراریخت نامطلوب را نیز حذف نماید. در صورتی که در همان ابتدا از غلظت بالای کانامایسین استفاده گردد، احتمال از بین رفتن سلولهای تراریخت مطلوب نیز وجود دارد.

حضور ژن IFNγ از طریق PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن، در گیاهان تراریخت اثبات گردید. نتایج حاصل از بررسیهای SDS-PAGE و ELISA نشانگر بیان موفقیت آمیز پروتئین IFNγ در بذر گیاه کلزا بود ولی گیاهان مختلف از نظر میزان بیان ژن متفاوت بودند. میزان بیان یک ژن خارجی در گیاهان تراریخت بستگی کامل به تعداد نسخه‌های ژن منتقل شده و جایگاه قرارگیری آن در ژنوم هسته‌ای دارد. در سلول گیاهی، این ژن درون ژنوم گیاه قرار گرفته و پس از تراریختی، امکان تکثیر ژن (افزایش تعداد نسخه‌ها) وجود ندارد، مگر اینکه در ابتدای تراریختی تعداد نسخه‌های کافی در جایگاه مناسب در درون کروموزوم قرار گیرند (۱۹). لذا تفاوت در میزان بیان پروتئین IFNγ می تواند ناشی از تفاوت در جایگاه قرارگیری این ژن در ژنوم گیاه و یا تعداد متفاوت نسخه های ژن منتقل شده باشد. در مورد برخی از گیاهان تراریخت علی رغم اینکه نتایج PCR نشانگر تراریخت بودن آنها بود ولی در نتایج SDS-PAGE و ELISA تفاوتی با گیاه شاهد غیرتراریخت نشان ندادند (نمونه های T3 و T5 در نمودار۱). این مسئله می تواند دلایل متعددی از جمله بیان بسیار پایین پروتئین IFNγ در گیاهان مذکور باشد به نحوی که توسط تکنیکهای مذکور قابل شناسایی نباشد و یا اینکه فقدان بیان ژن ناشی از نوترکیبی ممکن در ناحیه T-DNA باشد که منجر به تغییر ساختار ژن IFNγ شده باشد(۱۸). جهت بهینه سازی تولید این پروتئین با ارزش باید مواردی مثل بررسیهای تکمیلی از جمله Western blotting، استخراج و خالص سازی آن در ادامه کار مدنظر قرار گیرد.

منابع

۱- زبرجدی، ع. جلالی جواران، م. سلمانیان، ع. ه. کریم زاده، ق (۱۳۸٤). بررسی تأثیر ساختارهای (سنس و آنتی سنس) انتقال یافته ژن کدکننده آنزیم β-ketoacyl CoA synthase بر میزان تولید اسید اورسیک در کلزا. رساله دکتری. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۸۳ ص.

2-Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF (1997). A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-γ gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. Cancer, 80: 401-12.

www.SID.ir

Archive of SID

3-Assreury J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. European Journal of Immunology, 24(3): 672-6.

4 - Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA (1997). "Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. Drug Development Research, 42(3-4): 172-181.

5 - Bradford MM (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72*:* 248-254.

6 - Conrad U and Fiedler U (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functiond and pathogen activity. Plant Molecular Biology, 38:101-109.

7 - Crouch ML and Sussex IM (1981). Development and storage- protein synthesis in *Brassica nap*us L. embryos in vivo and in vitro. Planta, 153:64-74.

8 - Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: verstion III. Plant Molecular Biology Reporter, 1:19-21.

9 - Droogenbroeck BV, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Lerberge EV, Terryn N, Montagu MV, Liang M, Depicker A, Jaeger GD (2006). Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. PNAS, 104(4): 1430-1435.

10 - Frigerio L, Pastres A, Vitale A (2001). Influence of KDEL on the Fate of Trimeric or Assembly-Defective Phaseolin: Selective Use of an Alternative Route to Vacuoles. The Plant Cell, 13:1109-1126.

11 - Guy CL, Haskell D, Neven L, Kelin P, Smelser C (1992). Hydration state responsive proteins link and drought stress in spinach. Planta, 188:265-270.

12 - Höfgen R and Willmitzer L (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucleic Acids Research, 16: 98-77.

13 -Moeenrezakhanlou A, Maghsoudi N, Mahboudi F (2002). Homo sapiens interferon-gamma mRNA, complete cds. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=20805895.

14 - Moloney MM. Walker JM, Sharma, KK (1989). High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports, 8:238-242.

15 - Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.

16 - Nauciel C and Espinasse-Maes F(1992). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. Infection and Immuty , 60(2): 450–454.

17 - Petruccelli S, Otegui MS, Lareu F, Dinh OT, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN (2006). A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, btis both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. Plant Biotechnology Journal, 4 (5): 511–527.

18-Prasad V, Satyavathi VV, Sanjaya VKM, Abha K, Shaila MS, Lakshmi SG (2003). Expression of biologically active Hemagglutinin-neuraminidase protein of *Peste des petits ruminants* virus in transgenic pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp]. Plant Science. 35: 102-107.

19-Radke SE, Turner JC, Facciotti C (1992). Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 11: 499-505.

20-Sambrook J and Russell DW (2001).Molecular Cloning . 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

21-Schouten A, Roosien J, Engelen FA, Jong GAM, Borst-Vrenssen AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology, 30(4):781-793.

22-Seeger RC, Rosenblatt JD, Duerst RE, Reynolds CP, Villablanca JG, Hasenauer B, Feig SA (1998). A Phase I Study of Human Gamma Interferon Gene-Transduced Tumor Cells in Patients with Neuroblastoma. Human Gene Therapy, 9(3): 379-390.

23-Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003). Molecular farming in plants:

www.SID.ir

Archive of SID

host systems and expression technology. Trends in Biotechnology, 21(12): 570-578.

24-Wandelt CI, Khan MR, Craig S, Schroeder HE, Spencer D, Higgins TJ (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. The Plant Journal, 2:181-192.

25-Wetzel R, Perry LJ, Veilleux C (1991). Mutations in human interferon gamma affecting inclusion body formation identified by a general immunochemical screen. Biotechnology, 9(8): 731–737.

26-Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte, JT (1992). Prolonged recombinant interferon-γ therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. Blood, 79(6): 1558-1562.

27-Zhang Y, Singh MB, Bhalla PL (1999). Genetic transformation of Australian cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). New Horizos for an old crop. The Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Designing and development of Gamma Interferon construct and expression ofthis proteinin *Brassica napus* seeds

Bagheri KH.[1], Jalali Javaran M.[1], Mahboudi F. [2], Moeini A. [1],and Zebarjadi A.[3]

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

[2]Biotechnology Dept., Pasture Institute, Tehran, I.R. of IRAN

[3]Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of IRAN

Abstract

Some important Strategies to increase recombinant protein yield in plants include expression of protein in suitable plant tissue and improvement of protein stability and accumulation by targeting into subcellular organs using specific targeting signals. The ER contain different molecular chaperons and isomerase for folding of nascent proteins, which can prevent aggregation and formation of incorrect three dimensional structure and promote correct protein folding leading to recombinant protein stability and accumulation. In this perspective, seed-based platforms are particularly attractive because they allow recombinant proteins to stably accumulate at a relatively high concentration in a compact biomass, which is beneficial for extraction and downstream processing. In this research for human Gamma interferon expression in *Brassica napus* seeds and targeting into ER, we used seed specific promoter (Napin) and C-terminal KDEL sequence (ER retention signal). The fragment was cloned into pGEM®-T Easy vector and then was confirmed by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing. The authentic PCR fragment was subcloned into a plant binary vector (pBI121). This construct cassette (pBI IFNγ) was transferred to *A. tumefaciens* LBA_{4404} and then used to transform *B. napus* using an *Agrobacterium*-mediated petiole cotyledonary transformation. The transformed plants were screened on antibiotic-contained media The presence and expression of the transgene was confirmed in the transformants by PCR and SDS-PAGE. ELISA test was used for biological activity.

Keywords: Seed specific promoter (Napin), KDEL retention signal, Recombinant protein, Human Gamma interferon, *Brassica napus*

www.SID.ir