

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده سیب زمینی تراریخته

فاطمه قربانی پارسا**

افقی حمیده*

چکیده

گیاهان به دلیل داشتن مسیر اصلاحات پس از ترجمه مشابه سلول های جانوری، سیستمی ارزان جهت تولید پروتئین های نو ترکیب در مقیاس بالا را فراهم نموده اند. هدف این تحقیق بررسی بیان اختصاصی هورمون دارویی کلسی تونین انسانی (hCT) که در درمان بیماری های استخوانی نقش دارد در غده گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) به عنوان میزبان بود. ژن سنتتیک کلسی تونین با توالی بهینه سازی شده بر اساس رمز های ترجیحی میزبان تحت کنترل پروموتور ژن Class I Patatin با قابلیت ابراز اختصاصی در غده سیب زمینی و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت و پس از کلون سازی در ناقل دوتایی از طریق آگروباکتریوم به غده گیاه سیب زمینی منتقل گردید. پس از تراریختی و تکثیر، نسل اول گیاهان تراریخته از نظر وجود ژن فوق توسط PCR و نیز میزان بیان پروتئین نو ترکیب هدف بوسیله ELISA مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین بیان حاصل از واریته کاردال، با بیانی معادل ۱/۵ng بود.

واژه های کلیدی: زراعت مولکولی، کلسی تونین انسانی، پروموتور Patatin، سیب زمینی

**سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

**دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات Ofoghi@irost.ir

۲۴ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

تراریخته (Solanum tuberosum) .

مقدمه

امروزه سیستم های مختلف بر مبنای کشت سلولی و یا استفاده از موجودات تراریخته جهت تولید پروتئین های نو ترکیب ارزشمند ابداع شده است. از جمله باکتری ها، قارچ ها، سلول های حیوانی و گیاهی و همچنین استفاده از حیوانات کامل، گیاهان و حشرات که هر یک از این سیستم های تولید از مزایا و محدودیت های خاص خود برخوردارند. در باکتری ها که رایج ترین سیستم تولید پروتئین نو ترکیب هستند بایستی به عدم تغییرات پس از ترجمه و خطر آلودگی با آندوتوکسین توجه کرد (۶). از سوی دیگر در سلول های جانوری یا حیوانات تراریخته نیز محدودیت هایی چون دشواری مراحل کشت با احتمال آلودگی زیاد و نیازمندی به مواد و تجهیزات گران بها وجود دارد و با مسائل اخلاقی و قانونی مواجه می باشند. همچنین احتمال آلودگی با توالی های سرطان زا نیز وجود دارد (۱۰).

پیشرفت های بیوتکنولوژی، گیاهان را قادر ساخته که به عنوان بیوراکتور جهت تولید پروتئین ها، چربی ها و کربوهیدرات ها بکار گرفته شوند و مبحث جدیدی تحت عنوان زراعت مولکولی (Molecular Farming) مطرح شده است (۱۰). گیاهان به سادگی و با روش های طبیعی تراریخته می شوند و مسیر ساخت پروتئین و تغییرات پس از ترجمه در آنها مشابه سلول های جانوری است، محدودیتی در اندازه ژن دخولی نداشته و راهکارهای متنوعی مثل استفاده از پپتیدهای نشانه و پروموتورهای مختص ارگان یا ارگانل برای تجمع پروتئین های نو ترکیب در آنها وجود دارد (۶ و ۱۷).

روش های متنوعی برای ادغام ژن های خارجی در قسمت های مختلف گیاه وجود دارد. این ژن های خارجی از منابع مختلف باکتریایی، قارچ ها، حیوانات و سایر گیاهان هستند روش رایج برای انتقال ژن به سلول های گیاهی، انتقال توسط *Agrobacterium tumefaciens* است که سبب کاهش موانع موجود در مهندسی ژنتیک گیاهی شده است. تاکنون ژن های مختلفی از جمله ژن هورمون رشد، انسولین و پروتئین های ویروسی و باکتریایی با این شیوه به گیاهان منتقل شده اند (۴).

هورمون کلسی تونین انسانی نیز پپتیدی ۳۲ اسید آمینه ای و غیر گلیکوزیله است که نقش اساسی

۲۶ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

در متابولیسم کلسیم - فسفر داشته و به عنوان هورمون درگیر در ترمیم استخوان شناخته می‌شود. مشتقات کلسی تونین برای درمان پوکی استخوان، بیماری پاژه و غیره کاربرد دارویی دارد (۱۷). تاکنون تلاش‌های گسترده‌ای برای تولید این هورمون دارویی اعم از نوع انسانی یا حیوانی آن به صورت نوترکیب در میزبان‌های مختلف باکتریایی، حشرات و گیاه انجام شده است (۳ و ۹).

در بین گیاهان مورد توجه در عرصه بیوتکنولوژی سیب زمینی به دلیل داشتن مزایایی همچون قابلیت گیاه به عنوان یکی از میزبان‌های باکتری آگروباکتریوم جهت انتقال ژن و بازده مطلوب آن، سهولت تکثیر و باززایی (Regeneration) از کشت بافت، قابلیت تکثیر غیرجنسی، دوره زمانی کوتاه تا تولید محصول، تولید بیوماس زیاد، وجود پروموتورهای مختلف جهت بیان ژن در قسمت‌های مختلف گیاه، قابلیت نگه داری و انبارکردن این محصول و استفاده از غده‌های خام به صورت مستقیم و خوراکی در صورت تولید واکسن اهمیت دارد (۱ و ۱۳). در این پژوهش تلاش شد تا با بهینه سازی کدون‌های ژن دخولی میزان بیان در میزبان گیاهی افزایش یابد و بعلاوه از پروموتور مختص اندام استفاده شد که امکان تجمع پروتئین نوترکیب تولیدی در اندامی خاص را فراهم می‌کند و به این ترتیب استخراج پروتئین تسهیل و مزیت‌هایی نیز در رابطه با ایمنی زیستی و جلوگیری از بیان همه جایی و تداخل احتمالی با رشد نرمال گیاه فراهم گردد (۱۹ و ۱۰).

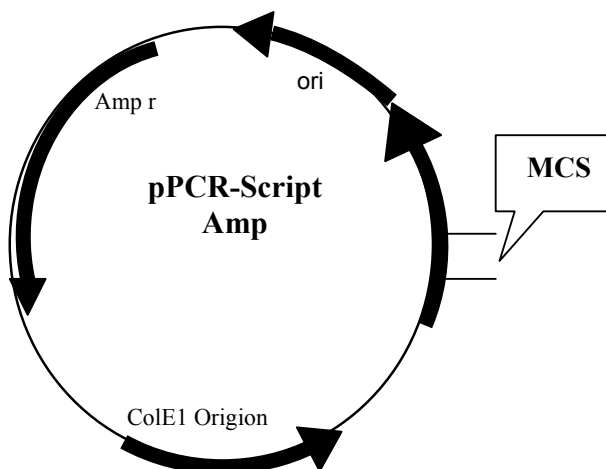
مواد و روش‌ها

گیاه مورد پژوهش: سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) رقم‌های کاردال و مارفونا بود. این گیاه تتراپلوئید و تعداد هاپلوئید کروموزوم‌های آن ۱۲ می‌باشد و به صورت جنسی و غیر جنسی تکثیر می‌یابد.

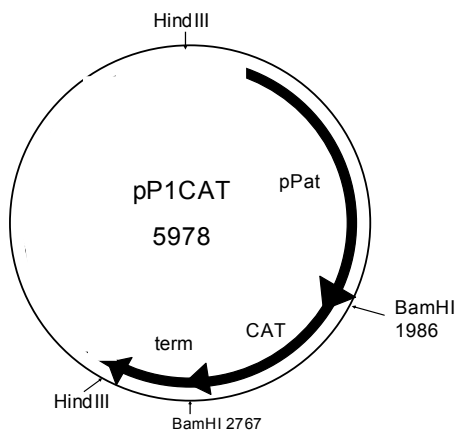
ناقلین مورد استفاده: برای بیان هورمون کلسی تونین انسانی (hCT) در گیاه سیب زمینی از ناقلین pPCR-Script Amp (تهیه شده از Intelechon) حاوی توالی مربوط به ژن hCT بهینه سازی شده برای بیان در سیب زمینی (شکل ۱)، pPI1 حاوی پروموتور ژن Class I Patatin مختص ابراز در غده سیب زمینی و خاتمه دهنده NOS (شکل ۲) و ناقل دوتایی Bin19 (شکل ۳) استفاده شد (pPI-CAT و Bin19 تهیه شده از Institute of

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده ۲۷

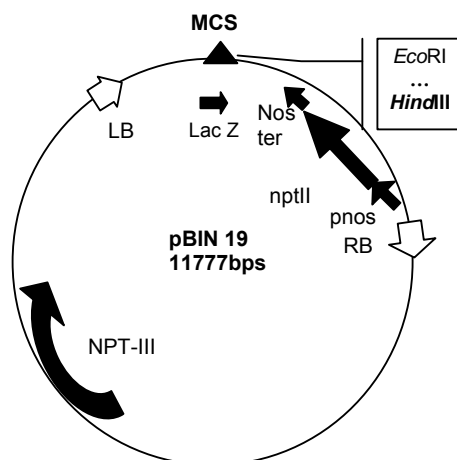
(molecular Genetics, Moscow



شکل ۱- تصویر شماتیک پلاسمید PCR-Script Amp



شکل ۲- تصویر شماتیک پلاسمید pPI-CAT



شکل ۳- تصویر شماتیک پلاسمید Bin 19

سویه های باکتریایی: برای انجام مراحل کلونینگ و نیز انتقال ژن به گیاه از دو سویه باکتریایی *E. coli DH5α* و *Agrobacterium tumefaciens LBA4404* استفاده شد. مراحل همسانه سازی (کلونینگ): پلاسمید PCR-Script Amp حاوی قطعه hCT سنتز شده توسط شرکت Intelchon، مورد هضم آنزیم *BamHI* قرار گرفت. قطعه ژن hCT با اندازه تقریبی ۱۱۴ نوکلئوتید از روی ژل آگاروز با استفاده از کیت خالص گردید که توالی این ژن به شرح زیر بود.

5'GGATCCATGTGTGGGAATCTGAGTACTTGCATGCTTGGC
ACATACCCCAAGATTTCAACAAGTTTCATACTTTTCCACAGA
CAGCTATTGGTGTGGAGCACCTTAAGGATCC 3'

از سوی دیگر پلاسمید pP1 در جایگاه *BamHI* بریده شده و به صورت خطی درآمد و از روی ژل بوسیله کیت اختصاصی برای استخراج DNA (تهیه شده از شرکت Bioneer) خالص سازی شد. سپس قطعه hCT در جایگاه *BamHI* بین پروموتور Class I Patatin و توالی خاتمه دهنده پلاسمید pP1 وارد گردید. برای تعیین وجود و جهت قطعه در ناقل از هضم آنزیمی *ScaI/XbaI* استفاده شد (۳۸۱ bp = sense، ۴۵۵ bp = antisense) همچنین با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی، عمل PCR با پرایمرهای طراحی شده پیشرو (forward) و پیرو (reverse) کلسی تونین و نیز پیرو nos terminator (ساخته شده توسط سیناژن) انجام شد.

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده... .. ۲۹

توالی پرایمرها به شرح زیر است:

CalF: 5'-CCGGATCCATGTGCGGTAATCTGAGTACTTGC-3'

CalR: 5'-GGGGATCCTTAAGGTGCTCCAACCC-3'

Nos terR: 5'-CGCGCGATAATTTATCCTAGT-3'

PCR با یک مرحله واسرشتگی ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد آغاز و در ۳۰ سیکل حرارتی با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی گراد و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت و در پایان نیز یک مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مد ۵ دقیقه انجام شد. پس از اطمینان از حضور قطعه و صحیح بودن جهت آن برش با آنزیم *HindIII* انجام گرفت (شکل ۹) و قطعه ۲۶۵۰ نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی شامل کاست حاوی پروموتور، توالی کد کننده hCT و توالی پلی آدنیلایسون در جایگاه *HindIII* ناقل دوتائی *Bin19* برای انتقال به گیاه کلون شد. کلنی های به دست آمده از نظر وجود قطعه فوق مورد بررسی مجدد بوسیله هضم با آنزیم *BamHI* و نیز با PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پیشرو (cal (forward) و پیرو (nos(reverse) با سیکل دمایی همانند مرحله قبل قرار گرفت.

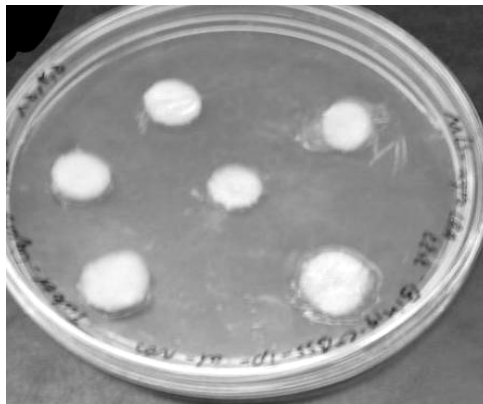
کشت بافت سیب زمینی: کشت بافت سیب زمینی با روش کشت جوانه های حاصل از دیسک غده (shoot tip culture) انجام شد.

برای انجام فرایند ترانسفورماسیون در این گیاه دست یابی به رشد کافی و در ادامه غده زایی گیاه ضروری بود که به این منظور محیط کشت رشد و تکثیر MS جامد (MURASHIGE & SKOG Medium) (میزان سوکروز ۰.۳٪) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با ترتیب دمایی ۲۰ و ۱۸ درجه سانتی گراد استفاده شد که پس از به دست آوردن ساقه های ۷ تا ۸ گرهی برای القای غده به آن ها محیط کشت MS غده زایی (میزان سوکروز ۰.۸٪) افزوده شد. پس از افزوده شدن محیط غده زایی، گیاهان به مدت ۱۰ روز در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۴ درجه سانتیگراد و پس از آن با حفظ شرایط تاریکی مطلق به دمای ۱۸ درجه سانتیگراد منتقل شدند.

تراریختی گیاهان و باززایی آن ها: عمل تراریختی در گیاه سیب زمینی شامل دو مرحله آماده سازی آگروباکتریوم تومه فاسینس حامل پلاسمید *Bin19* و آماده نمودن ریز غده ها

۳۰ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

می‌شود. به این ترتیب که ریزغده‌ها ی تولید شده در شرایط استریل با عمر کمتر از شش ماه به صورت دیسک‌هایی با قطر 1-2 mm بریده شد و این دیسک‌ها روی سطح محیط MLS (MURASHIGE & LINSMAIER & SKOG Medium) جامد بدون آنتی‌بیوتیک قرار گرفت و با سوزن استریل سطح آن‌ها زخمی گردید. آگروباکتریوم تومه فاسینس حامل پلاسمید *Bin19* و کاست بیانی (کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در محیط LB و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار) که OD آن معادل ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ nm بود رسوب داده شد و سپس در محیط MLS مایع وارد شد و حدود ۲۰ میکرولیتر از آن روی دیسک‌های آماده سازی شده ریخته شد (شکل ۴).



شکل ۴- هاله رشد آگروباکتریوم در کناره غده‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت

پتری‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از شستشو جهت حذف آگروباکتریوم و ایجاد شرایط انتخابی دیسک‌ها به محیط MLS محتوی آنتی‌بیوتیک (سفوتاکسیم ۵۰۰ mg/L و کانامایسین ۱۰۰ mg/L) انتقال یافتند و باز هم در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای جوانه‌زایی قرار گرفتند. جوانه‌های ثانویه (secondary shoot) به طول 1/5-2 cm حاصل از دیسک‌ها برای به دست آوردن گیاه کامل جدا و در محیط مشابه (cefo -kn -Mls) در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی با ترتیب دمایی ۲۰ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. زمانی که طول گیاهان به حدود 4/5 cm رسید به محیط بدون سفوتاکسیم منتقل شدند پس از رشد گیاه تراریخته به

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده... ۳۱

حد تقریباً ۵ گرهی روی آن محیط MS غده زائی ریخته شد.
استخراج DNA و پروتئین از گیاه تراریخت: برای تایید وجود سازه بیانی در گیاهان تراریخته به دست آمده از محیط انتخابی، DNA از اندام های سبز با روش CTAB (۱۱) استخراج و توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ۳۰ سیکل حرارتی با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی گراد و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفته شد. برای بررسی میزان پروتئین بیان یافته، غده از گیاهان تراریخته جدا و مجموع پروتئین های محلول (TSP) آن با استفاده از بافر استخراج پروتئین (شامل 2% 2-Mercaptoethanol, Triton X-100, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, NaCl 10mM) به دست آمد و سپس به صورت اختصاصی میزان کلسی تونین بیان یافته توسط روش ELISA با استفاده از کیت اختصاصی (BioSource CT-US) مورد بررسی قرار گرفته شد.

نتایج و بحث

کشت سیب زمینی: از گیاه اولیه غده به دست آمد (شکل ۵) و از جوانه های حاصل از غده های آلوده شده با آگروباکتریوم گیاهان ترانس ژنیک حاصل شد (شکل ۶) که در محیط MLS دارای آنتی بیوتیک کانامایسین ریشه زایی کرده و به این ترتیب شناسایی شدند (شکل ۷) و از آن ها مجدد غده به دست آمد.
کلونینگ: جداسازی ژن hCT از ناقل (شکل ۸) و خطی کردن پلاسمید pPI انجام شد (شکل ۹).



شکل ۵- کشت بافت سیب زمینی در محیط MS

۳۲ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱



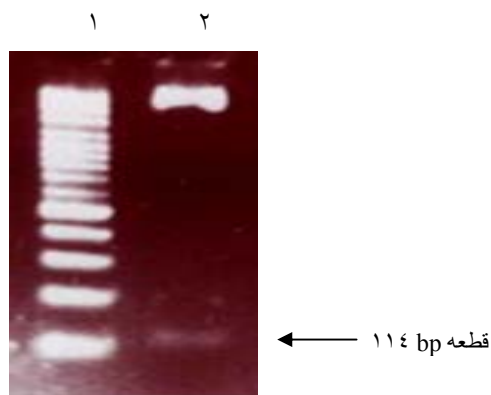
شکل ۶- جوانه زایی غده های آلوده شده با آگروباکتریوم روی محیط MLS



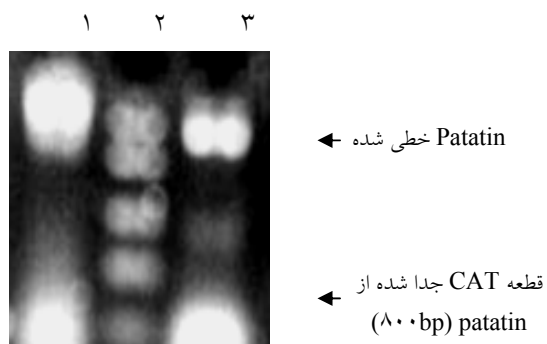
Transgenic - Nontransgenic

شکل ۷- انتخاب گیاه تراریخته در محیط کشت انتخابی

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده..... ۳۳



شکل ۸- خارج کردن ژن کلسی تونین از پلاسمید Scrip Amp - PCR توسط *Bam*HI. ردیف اول DNA سایز مارکر ۱۰۰bps است و ردیف دوم پلاسمید Scrip Amp - PCR بریده شده توسط *Bam*HI.

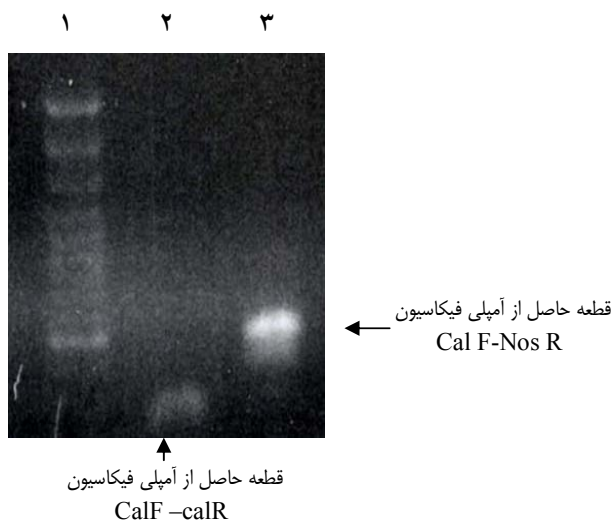


شکل ۹- جداسازی قطعه CAT از پلاسمید Patatin. ردیف اول پلاسمید Patatin، ردیف دوم DNA سایز مارکر middle range و ردیف سوم پلاسمید Patatin که قطعه CAT از آن جدا شده است.

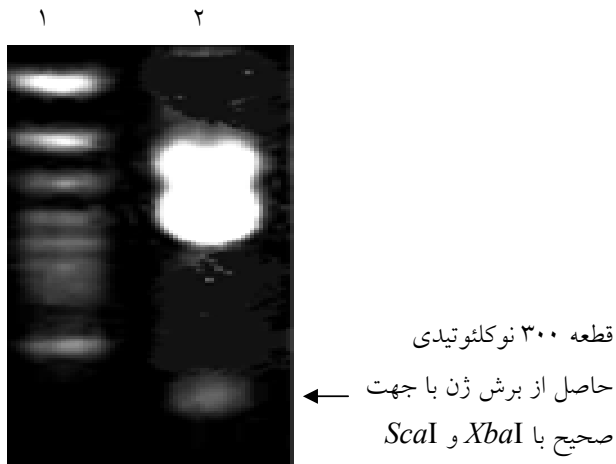
کلون کردن قطعه ژن hCT در ناقل pPI با موفقیت انجام شد و سازه pPI/hCT در

جهت sense به دست آمد. (شکل ۱۰ و ۱۱)

۳۴ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱



شکل ۱۰- تعیین جهت ژن CT توسط PCR. ردیف اول DNA سایز مارکر ۱۰۰ bps، ردیف دوم باند ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی حاصل ازدیاد ژن کلسی توئین و ردیف سوم باند ۷۰۰ نوکلئوتیدی که حاصل ازدیاد کلسی توئین و Nos ترمیناتور است.

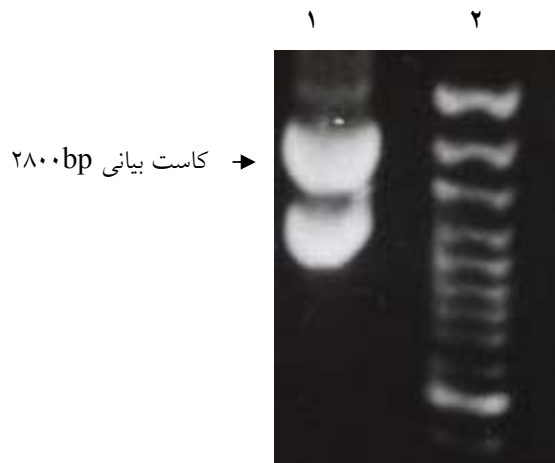


شکل ۱۱- تعیین جهت ژن کلسی توئین با نقشه ژنتیکی. ردیف اول DNA سایز مارکر ۱۰۰ bps، ردیف دوم پلاسمید pPI-Cal بریده شده با *ScaI* و *XbaI*

برش با آنزیم *HindIII* انجام شد و قطعه ۲۶۵۰ نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی شامل

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده... ۳۵.....

کاست حاوی پروموتور، توالی کد کننده hCT و توالی پلی آدنیلایسیون جدا شد. (شکل ۱۲)



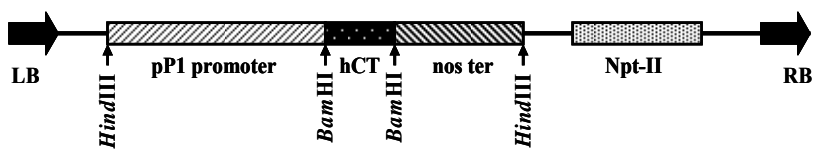
شکل ۱۲- بریده شدن پلاسمید Patatin با آنزیم HindIII. ردیف اول باند های حاصل از هضم پلاسمید

Patatin با آنزیم HindIII است و ردیف دوم DNA سایز مارکر 1000bps.

با استفاده از کاست جدا شده، سازه Bin19/pP1/hCT تهیه شد که در تصویری

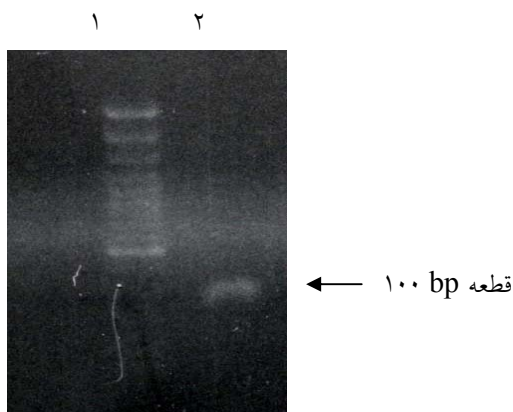
شماتیک ساختار این سازه نشان داده شده است (شکل ۱۳) و وجود ژن در پلاسمید Bin 19 با

آنزیم BamHI مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱۴).



شکل ۱۳- تصویر شماتیک ساختار سازه Bin19/pP1/hCT

۳۶ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱



شکل ۱۴- تایید وجود ژن CT در پلاسمید ۱۹ Bin. ردیف اول DNA سائز مارکر ۱۰۰ bps و ردیف دوم باند ۱۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از برش با BamHI پس از استخراج از *E.coli*.

در آزمایش‌های PCR و ELISA انجام گرفته بر روی غده‌ها و برگ‌های گیاهان تراریخته وجود ژن کلسی‌تونین انسانی در غده و عدم وجود آن در برگ تایید و میزان بیان هورمون کلسی‌تونین انسانی در آن به صورت اختصاصی مشخص شد. بیشترین بیان از واریته کاردال به دست آمد و برابر ۱,۵ ng بود در حالیکه این میزان در واریته مارفونا برابر ۰/۵ ng بود. با توجه به اهمیت هورمون کلسی‌تونین و نقش آن در تنظیم سطح کلسیم پلاسما، تاکنون کلسی‌تونین برای کاربرد درمانی از غدد اولتیمو برانشیال ماهی سالمون (Salmon Calcitonin) استخراج و یا کلسی‌تونین انسانی (Human Calcitonin) به وسیله سنتزهای شیمیایی تولید می‌شده اما هزینه‌های بالای چنین تولیدی و نیز توجه به این نکته که فعالیت بیولوژیکی محصول سینتتیک بیش از ۱۰ بار در مقایسه با نوع طبیعی کم تر می‌باشد (۸) و افزایش نیازمندی به hCT سبب آغاز فعالیت‌های تحقیقاتی برای توسعه فرایندهای بیوتکنولوژی جهت تولید کلسی‌تونین انسانی نوترکیب شده است (۱۲).

تلاش‌های اولیه برای بیان hCT به صورت نوترکیب در *E.coli* رضایت بخش نبود و محصول اندکی از آن حاصل می‌شد که احتمال داده شد کم بودن میزان بیان پروتئین مربوط به تجزیه پروتئین توسط سیستم پروتئاز درون سلولی باشد که برای رفع این مشکل دو شیوه به

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده... .. ۳۷

کار رفت. راهکار اول تولید hCT به صورت فیوژن با ژن هایی بود که بیان بالا داشتند اما زمانی که ارغام با چنین پروتئین هایی انجام شد جداسازی پپتید هدف از پروتئین های همراه شده نیازمند فرایندهای اختصاصی و پرهزینه بود (۱۲ و ۳). روش دیگر الیگومریزه کردن ژن کلسی تونین انسانی که با این هدف تولید hCT در پروکاریوت ها مثل *E.coli* (۱۸) و *Staphylococcus carnosus* انجام شد اما این پروکاریوت ها تنها می توانند پیش ساز کلسی تونین (precursor hCT) را تولید کنند و توانایی تولید کلسی تونین فعال (دارای آمیداسیون در انتهای C) را ندارند (۱۲ و ۳).

همچنین غیر از کلسی تونین انسانی، کلسی تونین تولید شده از منابع دیگر مثل سالمون، مارماهی و خوک برای درمان انواع بیماری های متابولسمی استخوان به کار رفته و برای تولید آن ها با روش های نو ترکیبی نیز تلاش های گسترده ای شکل گرفته از جمله گزارش تولید sCT در شیر خرگوش (۷) و نیز تولید آن در *Streptomyces avermitilis* اما بایستی توجه داشت که همه کلسی تونین ها به جز نوع انسانی بالقوه در انسان آنتی ژن هستند و استفاده دراز مدت از sCT کاهش فعالیت آن را به دنبال دارد (۲ و ۱۴).

تاکنون بیان پروتئین های مختلفی در گیاهان با موفقیت به انجام رسیده است و گیاهان ترانس ژنیک به عنوان بیوراکتورهای مناسب برای تولید پروتئین نو ترکیب شناخته می شوند (۱۶).

سیب زمینی یکی از گیاهان زراعی است که در پروژه های زراعت مولکولی مورد توجه قرار گرفته و پروتئین های بسیاری در آن بیان شده و به عنوان بزرگترین سیستم گیاهی تولید واکسن نو ترکیب مطرح گشته است. از جمله پروتئین هایی که در آن بیان شده پروتئین کپسیدی روتاویروس (VP6) برای واکسیناسیون علیه گاستروانتریت حاد ویروسی (۱۵) و بیان آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به عنوان واکسن نو ترکیب علیه هپاتیت B بوده است (۱۰).

از مزایای به کارگیری این گیاه در نقش کارخانه تولید پروتئین های نو ترکیب قابلیت نگهداری و انبار داری غده برای مدت طولانی، استفاده از غده های خام آن به صورت مستقیم و خوراکی در صورت تولید واکسن، عملکرد بالای محصول در مزرعه و در نتیجه تولید بیوماس بالا و تکثیر غیر جنسی و نبود تفرق ژنتیکی در نسل های بعدی آن است. (۱۴ و ۱)

در ادامه تلاش ها برای افزایش بیان کلسی تونین انسانی، انتقال آن به میزبان گیاهی با توجه

۳۸ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

به مزیت هایی که ذکر شد مورد توجه قرار گرفت. در تحقیقات قبلی که در آن تولید کلسی تونین انسانی در گیاه سیب زمینی مورد توجه قرار گرفته بود ژن کلسی تونین به دو صورت مونومر و تترامر تحت کنترل پروموتور CaMV 35S قرار گرفت و از دو تقویت کننده Tobacco Mosaic Virus (TMV) و Tobacco Each Virus (TEV) برای افزایش میزان بیان استفاده شد که در نهایت با توجه به اینکه pCaMV پروموتوری دائمی و غیر اختصاصی است و در همه بافت های گیاه بیان می شود کلسی تونین تولید شده تقریباً ۲۰۰ پیکوگرم از (TSP) Total Soluble Protein غده گیاه را تشکیل می داد (۸).

با توجه به تحقیقات دیگر از جمله تولید آلبومین سرمی انسان (HSA) در سیب زمینی که تولید آن تحت کنترل هر دو پروموتور CaMV 35S و Patatin بررسی و افزایش بیان از 0.02% TSP غده به 0.2% هنگام استفاده از پروموتور Patatin گزارش شده بود (۴). در این پژوهش که ادامه تحقیقات قبلی جهت تولید کلسی تونین انسانی در سیب زمینی است تلاش شد با استفاده از پروموتور اختصاصی غده و نیز بهینه سازی کدون ها برای بیان در سیب زمینی افزایش بیان حاصل شود.

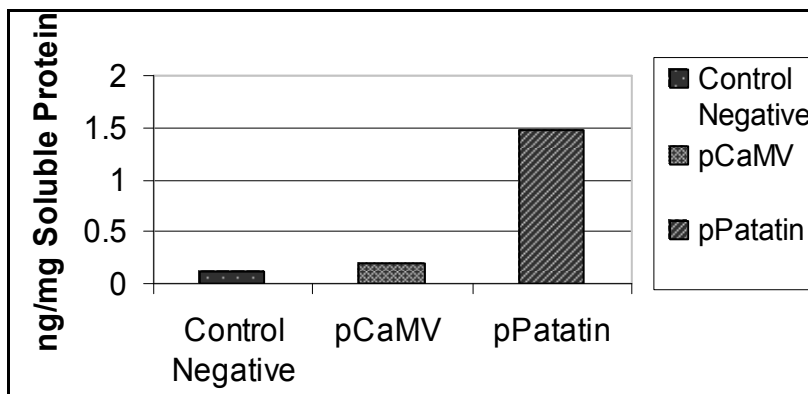
نتیجه گیری

در این تحقیق که اولین گزارش از تولید اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده سیب زمینی بود با استفاده از پلاسمید Bin19 و *Agrobacterium* سویه LBA4404 ژن کلسی تونین انسانی به کروموزوم سیب زمینی منتقل شد. در این سیستم بیان ژن تحت کنترل پروموتور Class I Patatin که اختصاصی غده سیب زمینی است قرار گرفت تا از بیان همه جایی پروتئین هدف جلوگیری و تغلیظ آن امکان پذیر شود. کدون های این ژن را براساس رمزهای ترجیحی (codon bios) برای بیان در سیب زمینی طراحی نموده و در انتهای 3' آن سیگنال پلی آدینلاسیون NOS قرار گرفت. در نهایت برای بررسی میزان کلسی تونین بیان شده از روش ELISA استفاده شد و نتایج حاصل بیانی معادل ۱۴۷۲/۸۵۸۰pg/g پروتئین کلسی تونین در یک گرم غده تازه وارسته کاردال و ۵۶۸/۳۵۴۴ pg/g پروتئین کلسی تونین در یک گرم غده تازه وارسته مارفونا را نشان داد. این میزان بیان افزایش قابل توجهی نسبت به

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده... ۳۹

زمانی که ژن کلسی تونین انسانی تحت کنترل پرموتر CaMV 35S با بیان غیر اختصاصی قرار گرفته بود نشان می داد که در نمودار ۱ به آن پرداخته شده است.

نمودار ۱- مقایسه میزان بیان هورمون کلسی تونین انسانی در غده سبب زمینی (وارثه کاردال) با دو پرموتر



→

تشکر و قدردانی

از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و EMRO-WHO برای حمایت مالی و فراهم نمودن امکان این تحقیق نهایت سپاس و قدردانی را داریم.

منابع

1. Bajaj Y.P.S. (1987). "Biotechnology in agriculture and forestry 3 potato". Springer-Verlag
2. Chakraborty C, Nandi ss, Sarkar B, Sinha S ,(2005) "Overexpression and purification of recombinant eel calcitonin and its phylogenetic analysis". Protein Peptid Letter. 2005 Apr;12(3):263-9
3. Dilsen S, Tippe D, Sandgathe A., Halfar M. (2000) "Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression –secrection system". Appl Microbiol Biotechnol. 54(3):361-9
4. Farran Inma, Jos'e J. S'anchez-Serrano, Juan F. Medina, Jes'us Prieto, Angel M. Mingo-Castell. (2002) "Targeted expression of human serum albumin to potato tubers". Transgenic Research 11: 337–346, 2002.
5. Fischer R, Drossard J, Commandeur U, Schillberg S, Emans N. (1999) "Towards molecular farming in the future moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants". Biotechnology Applied Biochemistry. 30 (Pt 2):101-8.
6. K-C. Ma1 Julian, Eugenia Barros, Ralph Bock, Paul Christou, Philip J. Dale, Philip J. Dix, Rainer Fischer, Judith Irwin, Richard Mahoney, Mario Pezzotti, Stefan Schillberg, Penny Sparrow5, Eva Stoger, Richard M. -Twyman. (2005) "Molecular farming for new drugs and vaccines Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants". EMBO reports. 6(7) 2000-2005.
7. McKee Colin, Gibson Allan, Darliple Mike, Emslie Liz. (1998) "Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits". Nature Biotechnology. 16,1234-1239
8. Ofoghi H, Moazami N., Domonsky N.N., Ivanov I. (2000),

انتقال هدایت شده و بیان اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده..... ۴۱

“Cloning and expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant”. Biotechnology Letters. 22,611-615

9. Twyman, Richard M., Stoger Eva, Schillberg Stefan, Christou Paul Fischer Rainer. (2003). “Molecular farming in plants: host systems and expression technology”. TRENDS in Biotechnology. 21(12), 143-176.

10. Liz J Richter, Thanavala Yasmin, J. Arntze Charles, Mason Hugh S. (2000) “Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization”. Nature Biotechnology. 18: 123-128

11. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., (1989). “Molecular Cloning a Laboratory Manual” 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

12. Sandgathe A., D. Tippe, S. Dilsen, J. Meens, M. Halfar. (2003) “Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption”. Process Biochemistry. 38, 1351-63

13. Stanton B. Gelvin. (2003) “Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool”. Microbiology And Molecular Biology Reviews. 16-37

14. Yabuta M., Suzuki Y., Ohsuye K. (1995) “High expression of a recombinant human calcitonin precursor peptide in *E. coli*”. Appl Microbiology Biotechnology. 42:703-70

15. Yu, J. and Langridge, W. (2003), Expression of Rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice, Transgenic Res. 12, 163-9

16. Yoshida Kazuya & Shinmyo Atsuhiko. (2000) “Transgene expression system in plants a current perspective”, J Plant-Bioscience & Bioengineering. 90(4), 353-362

17. Zaidi M, Inzerillo A. M., Moonga B. S., Bevis P. J., Huang C. (2002) Forty years of Calcitonin – “Where are we now? A tribute to the work of Iain MacIntyre”, FRS. Bone. 30(5), 655-663

18. Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW. (2002) “Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression”. Plant Journal. 30(4), 489-97.