ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ٤٤٩ - ٤٤١

انتقال ژن ترکیبی زیرواحد B سم وبا– پروانسولین انسانی به قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) و ارزیابی حضور و بیان آن

Transformation of cholera toxin B subunit-human proinsulin chimeric gene to edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and evaluation of its presence and expression

صدیقه فابریکی اورنگ*[۱]، مختار جلالی جواران[۲]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۳]، هوشنگ علیزاده [٤]، حسین هنری[٥]

۱- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران
٥- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران

Fabriki-Ourang S*[1], Jalali-Javaran M[2], Mohammadi-Goltapeh E[3], Alizadeh H[4], Honari H[5]

1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2- Associate Profeessor, Department of Biotechnology, Tarbiat Modares University
3- Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Tehran,Iran
4- Associate Profeessor,Department of Biotechnology, Tehran University, Tehran, Iran
5- Associate Profeessor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.ourang910@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۵/۱۷)

چکیده

دیابت بیماری‌ای است که در اثر آن بدن نمی‌تواند انسولین تولید و یا به‌طور مؤثر از آن استفاده کند. اگرچه انسولین نوترکیب به‌طور تجاری در باکتری و یا مخمر تولید می‌شود، ولی نیاز به توسعه سیستم‌های جایگزین برای تولید انسولین وجود دارد. در این راستا قارچ خوراکی صدفی به‌عنوان میزبان برای تولید انسولین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ناقل دوتایی pcambCTB-Pins حاوی زیر واحد B سم وبا که به ژن پروانسولین انسانی الحاق شده بود، تحت کنترل پیش‌برنده gpd ساخته شد و با استفاده از روش انتقال ژن مبتنی بر اگروباکتریوم (سویه GV3101 با غلظت ۰/۸ (OD_{600nm})) در دمای هم‌کشتی ۲۵°C و محیط گزینشگر حاوی هیگرومایسین و سفوتاکسیم به بافت ژیل قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) جدایه ایرانی (Iran1649c) منتقل شد. پس از تائید اولیه قارچ‌های تراریخت با استفاده از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی، درج پایدار ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و زیر واحد B سم وبا (CTB) در ژنوم قارچ صدفی با آزمون لکه‌گذاری سادرن تایید شد. هم‌چنین بیان این ژن ترکیبی در سطح رونویسی و پروتئین با روش‌هایی نظیر RT-PCR، الایزا و ایمونوبلاتینگ مورد تائید واقع شد و در میسلیوم قارچ‌های تراریخت میزان پروتئین ترکیبی CTB و پروانسولین انسانی ۰/۰٤ درصد پروتئین محلول کل به‌دست آمد. با توجه به نتایج این تحقیق و بیان موفق ژن‌های خارجی در قارچ تراریخت، می‌توان به توسعه و تولید داروهای زیستی در قارچ‌های خوراکی امیدوار بود.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن
پروانسولین انسانی
پروتئین ترکیبی
دیابت
قارچ صدفی
CTB

Archive of SID

مقدمه

در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی[1] روز به روز در حال افزایش است و به‌دلیل اینکه معمولا قیمت این داروها زیاد و فراوانی آن‌ها محدود می‌باشد، لازم است سیستم‌هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند. وجود محدودیت فراوان در سیستم‌های بیان پروکاریوتی (باکتریایی) و یوکاریوتی (حیوانات) رایج و نیز افزایش نیاز به داروهای نوترکیب سبب شده‌است علاوه بر گسترش سیستم‌های مبتنی بر گیاهان توجه ویژه‌ای به قارچ‌های خوراکی به‌عنوان کارخانه‌های زیستی، برای تولید پروتئین‌های دارویی شود. سیستم‌های بیانی مبتنی بر قارچ‌های خوراکی همانند سایر یوکاریوت‌ها نظیر گیاهان توانایی تولید و پردازش پروتئین‌هایی که نیاز به تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون، ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی و انجام شکافت‌های آنزیمی جهت حذف توالی‌هایی مانند پپتیدهای نشانه را دارند دارا می‌باشند (Zhang et al. 2004). کوتاه بودن مدت زمان کشت تا برداشت محصول، تولید بیوماس بالاتر در مدت زمان کوتاه، قابلیت مصرف به‌صورت خام و در نتیجه امکان حذف هزینه‌های استخراج و استحصال پروتئین در صورت تولید پروتئین‌های نوترکیب در آن‌ها سبب شده است امروزه این دسته از موجودات به‌عنوان راکتورهای زیستی مورد توجه ویژه قرار گیرند (Nevalainen et al. 2005).

با توجه به ویژگی‌هایی مانند تولید پیوسته، امکان افزایش سریع مقیاس تولید و هزینه‌های پائین تاسیس تجهیزات و امکانات، قارچ‌های خوراکی یک محصول مدل برای Mushroom pharming محسوب می‌شوند (Romaine et al. 2004). با پیشرفت‌های روزافزون در زمینه دستورزی ژنتیکی قارچ‌های خوراکی، بیان هورمون رشد انسانی (Kim et al. 2010)، Platelet-Derived Growth Factor-BB (Choi et al. 2011)، آنزیم لاکاز (Kilaru et al. 2006) و آنزیم سلولاز (Zhao et al. 2010) در برخی از قارچ‌های خوراکی گزارش شده‌است.

اهمیت اصلاح مولکولی و پتانسیل بالقوه قارچ‌های خوراکی به‌عنوان میزبان‌های بیانی سبب تلاش روزافزون محققین در جهت ایجاد و گسترش روش‌های انتقال ژن به این دسته از قارچ‌ها شده است (Frandsen 2011). تراریختی قارچ‌های خوراکی با استفاده از اگروباکتریوم با دستورزی ژنتیکی قارچ دکمه‌ای در سال ۱۹۹۸ آغاز شد که ژن مقاومت به هیگرومایسین تحت کنترل پیش‌برنده gpd به قارچ دکمه‌ای منتقل شد (De Groot et al. 1998). از آن پس *Agrobacterium tumefaciens* به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای تراریختی ژنتیکی قارچ‌ها مطرح شد که توانایی دستورزی قارچ‌های سرسخت نظیر قارچ‌های خوراکی را نیز دارا می‌باشد. در تحقیقی ژن گزارشگر *gfp* با استفاده *A. tumefaciens* به‌طور موفقیت آمیزی به قارچ‌های خوراکی دکمه‌ای و *Coprinus cinereus* منتقل شده و برای بیان ژن گزارشگر در قارچ دکمه‌ای از پیش‌برنده gpdII و در قارچ *C. cinereus* از پیش‌برنده trp1 استفاده شد (Burns et al. 2005). ژن *afp* (Antifreeze protein) با استفاده از روش تراریختی مبتنی بر *A. tumefaciens* به میسلیوم‌های قارچ خوراکی *Volvariella volvacea* منتقل شده‌است. این ژن که سبب مقاومت به تنش سرمایی می‌شود به‌عنوان نشانگر انتخابگر و گزارشگر، تحت کنترل پیش‌برنده هترولوگوس gpd از منشا *Lentinus edodes* استفاده شده‌است. کارایی انتقال ژن با استفاده از این روش بیش از ۱۰۰ برابر مطالعات پیشین در این قارچ خوراکی گزارش شده‌است (Wang et al. 2008). انتقال ژن به قارچ خوراکی صدفی با روش اگروباکتریوم برای اولین بار برای انتقال ژن گزارشگر *egfp* گزارش شده‌است (Ding et al. 2011). در مطالعه اخیر از ناقل دوتایی pPEH برای تراریختی میسلیوم‌های این قارچ استفاده شد. در این ناقل برای بیان ژن گزارشگر و همچنین نشانگر انتخابگر hph از ناحیه پیش‌برنده ژن *gpd* با منشا قارچ صدفی به‌همراه دو اینترون ابتدایی این ژن استفاده شده‌است. در این تحقیق بیش‌ترین کارایی با استفاده از میسلیوم‌های قارچی به‌عنوان بافت گیرنده گزارش شد و آزمون PCR و لکه‌گذاری سادرن درج موفق ژن در ژنوم قارچ‌های تراریخت را تائید نمودند (Ding et al. 2011). پس از آن هیچ گزارشی مبنی بر تراریخت نمودن این دسته از قارچ‌های خوراکی با استفاده از این روش گزارش نشده‌است.

دیابت به شماری از بیماری‌هایی که با مشکلات هورمون انسولین مرتبط می‌باشند، اطلاق می‌شود. دیابت به دو نوع دیابت نوع یک

[1] Biopharmaceutical

Archive of SID
www.SID.ir

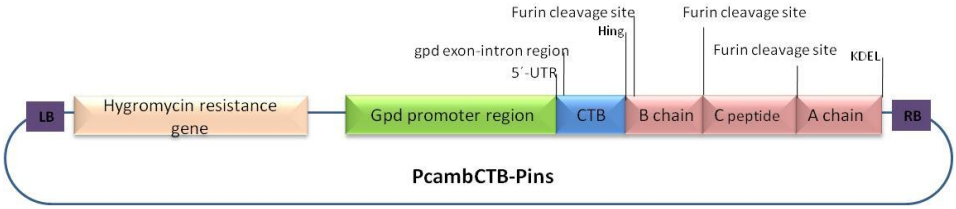
و نوع دو تقسیم‌بندی می‌شود. در افراد مبتلا به دیابت نوع یک، پانکراس قادر به ترشح انسولین نبوده و این افراد بایستی مادام العمر و به‌طور روزانه انسولین دریافت کنند. با توجه به اهمیت انسولین در پزشکی تلاش‌های بسیاری برای تولید انسولین نوترکیب در سیستم‌های مختلف نظیر پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها صورت گرفته است (Hay and Docherty 2003; Farinas et al. 2007). با توجه به توانایی قارچ‌های خوراکی به‌عنوان کارخانه‌های زیستی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با ارزش دارویی، تاکنون تلاشی در زمینه استفاده از قارچ‌های خوراکی برای تولید پروانسولین انجام نگرفته و نیز هیچ گزارشی مبنی بر بیان انسولین در قارچ‌های خوراکی وجود ندارد. بنابراین هدف اصلی این تحقیق تولید این پروتئین با ارزش در قارچ صدفی بود. برای دستیابی به این هدف، پس از طراحی سازه مناسب جهت تولید انسولین در قارچ خوراکی، استفاده از روش مناسب برای تراریخته کردن قارچ صدفی بود و در نهایت قارچ‌های تراریخت در سطوح DNA، RNA و پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر سازه ژنی نوترکیب حاوی ژن پروانسولین انسانی الحاق شده به زیر واحد B سم وبا (CTB) جهت دستورزی ژنتیکی قارچ خوراکی صدفی جدایه ایرانی (Iran1649c) مورد استفاده قرار گرفت لازم به‌ذکر است که ساخت این سازه توسط همین تیم تحقیقاتی به شرح زیر انجام گرفته است. جهت بیان این ژن ترکیبی در قارچ صدفی به‌عنوان میزبان یوکاریوتی، بهینه‌سازی توالی کد کننده پروتئین پروانسولین انسانی و CTB بر اساس ترجیح کدونی میزبان مزبور با استفاده از بانک اطلاعاتی موسسه تحقیقات Katzuso DNA Research انجام گرفت. از دیگر ویژگی‌های سازه ژنی (شکل ۱) دارابودن عناصر ژنی نظیر ناحیه پیش‌برنده ژن گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (gpd) جدا شده از قارچ صدفی، ناحیه 5´-UTR پیش‌برنده gpd، لولا بین دو جزء پروتئین ترکیبی (GPGP)، جایگاه‌های برشی آنزیم فورین و پپتید راهنمای KDEL می‌باشد (Fabriki et al. 2013). انتقال سازه ژنی به بافت ژیل قارچ صدفی با استفاده از ناقل بیانی PcambCTB-Pins با زمینه ژنتیکی pCAMBIA1304 و اگروباکتریوم تومه‌فاشینس سویه GV3101 انجام گرفت. به‌منظور انجام تراریزش، تلقیح ریزنمونه‌های قارچی در شرایط استریل با اگروباکتری نوترکیب با استفاده از ایجاد شرایط خلاء انجام گرفت. سپس هم‌کشتی قارچ و باکتری در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی به مدت سه روز انجام گرفت. پس از هم‌کشتی قارچ و باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط گزینشگر حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین ($۷۰ mg\ l^{-1}$) انتقال داده شدند. میسلیوم‌های رشد کرده در محیط گزینشگر به محیط گزینشی جدید منتقل شدند و فرایند زیرکشت کردن سه مرتبه با فاصله‌های دو هفته‌ای انجام شد. تراریختی و انتقال ژن بر اساس روش Fabriki et al. (2013) انجام گرفت.

از قارچ‌های رشد کرده در حضور آنتی‌بیوتیک برای بررسی‌های مولکولی استفاده شد. استخراج DNA و RNA از قارچ‌های رشد یافته در حضور آنتی‌بیوتیک و هم‌چنین نمونه شاهد با استفاده از DNeasy plant mini kit و RNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany) انجام گرفت. در مرحله اول نمونه‌ها با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از بخش‌های مختلف سازه ژنی و همچنین ژن مقاومت به هیگرومایسین بررسی شدند (جدول ۱) و پس از تایید اولیه درج ژن هدف در ژنوم قارچ، به‌منظور بررسی و تعیین تعداد نسخه ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB، آزمون لکه‌گذاری سادرن انجام شد. برای این منظور از آنزیم *Hin*dIII برای هضم کامل آنزیمی DNA ژنومی قارچ‌های تراریخت و شاهد استفاده شد. علت انتخاب این آنزیم برای لکه‌گذاری سادرن اینست که آنزیم مورد استفاده نباید دارای جایگاه تشخیصی در داخل ژن باشد در غیر اینصورت ممکن است ژن برش خورده و نتایج درستی از تعداد نسخه ژن به‌دست نیاید و سپس آزمون لکه‌گذاری به‌وسیله شناساگر طراحی شده از ناحیه ژن پروانسولین با استفاده از DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) و بر طبق روش Sambrook and Russelle (2001) انجام شد. در ادامه برای تایید نسخه‌برداری و بیان ژن پروانسولین در سطح RNA آزمون RT-PCR با آغازگرهای ناحیه ژن ترکیبی انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- ناقل بیانی PcambCTB-Pins حاوی سازه ژنی (پیشبرنده gpd، ژن ترکیبی پروانسولین-CTB) جهت انتقال ژن پروانسولین انسانی به قارچ صدفی

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات هیگرومایسین (HPH)، زیر واحد B سم وبا (CTB)، پروانسولین انسانی (INS) و پروانسولین-CTB در قارچ‌های صدفی تراریخت

نام آغازگر	توالی(′۳→′۵)
P1 (HPH R)	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC
P2 (HPH F)	CTATTTCTTTGCCCTCGGACG
P3 (gpd F)	CGTTCGTGACTCGCAATATCAGTGC
P4 (CTB F)	ACCCCTCAAAAACATCACCG
P5 (CTB R)	GTTAGCCATCGAGATAGCAG
P6 (INS R)	TTAGAGCTCGTCCTTGTTGCAGTAG
P7 (INS F)	TTCGTCAACCAACACCTCTGC

بدین منظور تخلیص RNA از میسلیوم قارچ‌های تراریخت و شاهد با استفاده از کیت RNeasy plant mini kit (Qiagen) انجام شد. پس از ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت Fermentas و مطابق با دستورالعمل کیت انجام گرفت. پس از ساخت cDNA و تیمار آن با DNaseI (Fermentas) واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی P4 و P6 (تکثیرکننده ژن ترکیبی پروانسولین و CTB با اندازه ٦١٢ bp) انجام گرفت.

در نهایت آزمون‌های الایزا، لکه‌گذاری نقطه‌ای و لکه‌گذاری وسترن جهت بررسی بیان ژن در سطح پروتئین در قارچ‌های تراریخت با استفاده از دستورالعمل Sambrook and Russelle (2001) انجام گرفت. برای انجام این آزمون‌ها از آنتی‌بادی‌های اولیه (Rabbit polyclonal antibody insulin Biotechnology, Inc. (Santa Cruz)) و ثانویه (Goat anti Rabbit IgGHRP conjugate (Sc-2030)) استفاده شد.

نتایج

رشد میسلیوم‌های قارچی روی محیط گزینشگر تاحدوی بیانگر تراریخت بودن آن‌ها بود، ولی در همین محیط در حضور آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین امکان فرار میسلیوم‌های غیرتراریخت نیز وجود داشت. بنابراین برای بررسی بیشتر، وجود سازه ژنی (gpd+CTB-INS) در میسلیوم‌های رشد کرده، بوسیله PCR با آغازگرهای اختصاصی (P3 و P6) تحت آزمون قرار گرفتند. قطعه تکثیری ١٦٤٠ جفت‌بازی دال بر انتقال T-DNA در نمونه‌های تراریخت مشاهده شد، درحالی‌که در قارچ‌های غیرتراریخت و نمونه شاهد (تیپ وحشی) با استفاده از همان آغازگرها هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۲). با توجه به نتایج به‌دست آمده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، می‌توان گفت ژنوم قارچ‌های تراریخت انتخاب شده حاوی حداقل یک کپی از T-DNA حاوی ژن پروانسولین بودند.

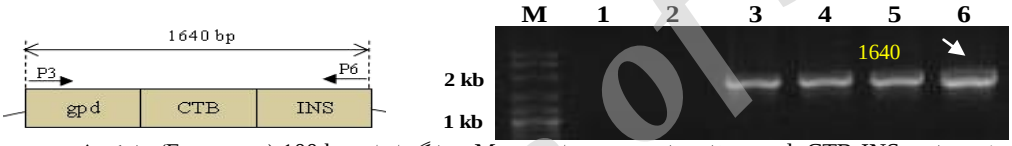
نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی که در بخش بالا به آن اشاره شد بیانگر وجود حداقل یک کپی از ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB در قارچ‌های تراریخت بود که برای این منظور نمونه‌های تراریخت توسط آزمون دورگه‌سازی سادرن مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آن درج ژن پروانسولین در ژنوم قارچ صدفی را تائید کرد. همان‌طور که از شکل ۳ استنباط می‌شود در نمونه غیر تراریخت مطابق انتظار سیگنالی دیده نشد و در نمونه‌های ٤، ٥، ٦ و ٨ یک نسخه و در نمونه ۳ دو نسخه ژن پروانسولین درج شده بود. در برخی از قارچ‌های تراریخت با وجود تائید حضور ژن با PCR، هیچ سیگنالی در دورگه‌سازی سادرن مشاهده نشد و این ممکن است به دلایل مختلفی باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

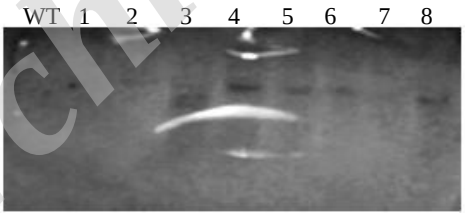
یک دلیل احتمالی این است که ژن پروانسولین از ژنوم قارچ تراریخت پس از چندین دور واکشت حذف شده باشد. دلیل دیگر می‌تواند ناشی از انتقال ناقص DNA از ژل به غشای نیتروسلولزی در فرایند آزمون لکه‌گذاری سادرن باشد.

به‌منظور تایید نسخه‌برداری و بیان ژن پروانسولین در سطح RNA آزمون RT-PCR انجام گرفت (شکل ٤). واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (تکثیر کننده ژن ترکیبی پروانسولین و CTB با اندازه ٦١٢ bp) انجام گرفت و برای اطمینان از عدم آلودگی نمونه‌های RNA استخراج شده با DNA ژنومی، یک واکنش نیز به‌عنوان کنترل منفی با استفاده از RNA استخراج شده از قارچ تراریخت و تیمار شده با DNaseI در نظر گرفته شد (RT منفی)؛ لازم به ذکر است که عدم تکثیر در این نمونه نمایانگر عدم آلودگی نمونه‌های RNA به DNA ژنومی بود.

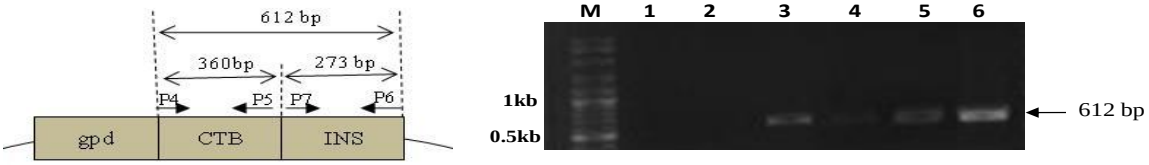
بررسی قارچ‌های تراریخت با این آزمون نشان داد ژن ترکیبی پروانسولین و CTB فرایند رونویسی را به درستی انجام می‌دهد و می‌توان انتظار داشت که پروتئین مورد نظر تولید خواهد شد. با این وجود جهت اطمینان از بیان صحیح پروتئین موردنظر باید قارچ‌های تراریخت در سطح پروتئین نیز مورد آزمون قرار بگیرند. لازم به ذکر است که از میان ۳۰ قارچ صدفی بررسی شده در مورد برخی از قارچ‌های تراریخت علی‌رغم این‌که نتایج PCR مثبت و نشان‌دهنده تراریخت بودن آن‌ها بود ولی در آزمون RT-PCR نتایج مثبتی مشاهده نشد. به‌عنوان یک دلیل احتمالی می‌توان بیان نمود که ممکن است ژن مورد بررسی در ناحیه مناسبی از ژنوم درج نشده و یا از لحاظ رونویسی فعالیت اندکی دارد.



شکل ۲- تایید حضور سازه ژنی حاوی gpd+CTB-INS در قارچ‌های صدفی تراریخت. M: نشانگر اندازه 100 bp (Fermentas)، ۱: کنترل منفی بدون DNA الگو۲: قارچ غیرتراریخت (تیپ وحشی)، ۳ الی ۵: قارچ‌های تراریخت و ٦: کنترل مثبت (ناقل pCAMBCTB-INS به‌عنوان الگو). جایگاه اتصال آغازگرها و طول قطعه مورد انتظار در شکل شماتیک سمت چپ نشان داده شده‌است.



شکل ۳- الگوی دورگ‌سازی لکه‌گذاری سادرن قارچ‌های تراریخت. ۱ الی ۸: قارچ‌های صدفی تراریخت (PCR مثبت) حاوی ژن پروانسولین، WT: قارچ غیر تراریخت.

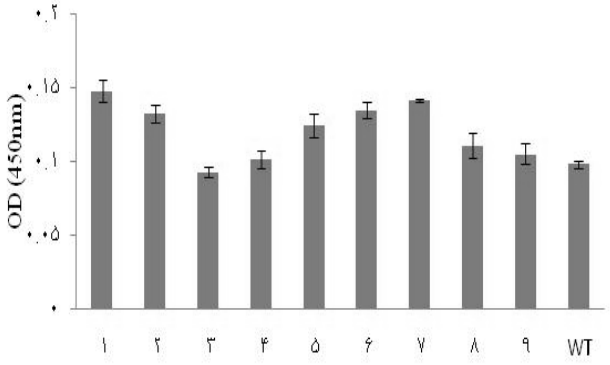


شکل ٤- الکتروفورز محصول واکنش RT-PCR به‌منظور تایید بیان ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB در قارچ‌های تراریخت. M: نشانگر اندازه 100 bp (Fermentas)، ۱: کنترل منفی با RNA استخراج شده از گیاه شاهد (تیپ وحشی) به‌عنوان الگو، ۲: واکنش RT منفی، ۳ الی ٦: قارچ‌های با cDNA قطعه ترکیبی حاوی ژن‌های پروانسولین انسانی و CTB به‌اندازه ٦١٢ bp. جایگاه اتصال آغازگرها (P4 و P6) و طول قطعه مورد انتظار در شکل شماتیک سمت چپ نشان داده شده‌است.

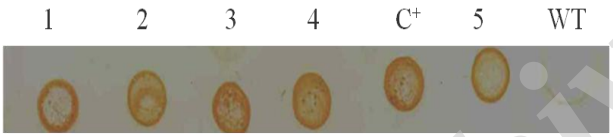
Archive of SID
www.SID.ir

در همین راستا نمونه‌هایی که رونویسی آن‌ها با استفاده از آزمون RT-PCR تایید شد انتخاب شدند و توسط آزمون‌های مولکولی دیگر مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمون PCR نمونه‌های مثبت گزینش و پس از تایید آن‌ها در سطح رونویسی ده نمونه قارچ تراریخت انتخاب و پس از استخراج پروتئین از آن‌ها، با استفاده از روش الایزا واکنش پروتئین استخراج شده از قارچ‌های تراریخت نسبت به آنتی‌بادی پروانسولین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطوح پروتئین‌های استخراج شده از برخی قارچ‌های تراریخت نسبت به قارچ‌های شاهد (غیرتراریخت) وجود دارد به‌طوری‌که نمونه شماره ۱ با ۰/۰٤ درصد پروانسولین از پروتئین محلول کل بیش‌ترین تفاوت را با شاهد نشان داد (شکل ۵). بر اساس این آزمون نمونه‌هایی که تفاوت بیشتری را نسبت به شاهد داشتند (نمونه‌های ۱، ۲، ۵، ٦ و ۷) انتخاب شدند و توسط آزمون‌های بعدی مورد بررسی قرار گرفتند.

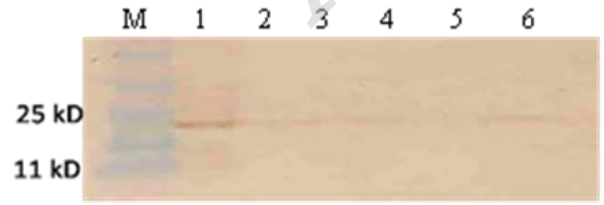
در ادامه جهت بررسی تولید پروتئین پروانسولین در قارچ‌های تراریخت بر اساس نتایج الایزا نمونه‌هایی که با شاهد اختلاف بیشتری داشتند انتخاب شدند و آزمون‌های لکه‌گذاری نقطه‌ای و ایمونوبلاتینگ یا لکه‌گذاری وسترن انجام گرفت. در روش لکه‌گذاری نقطه‌ای، پروتئین کل نمونه‌هایی که نتیجه الایزای آن‌ها مثبت بود به‌صورت نقطه‌ای روی غشاء نیتروسلولزی قرار داده شدند، لذا در این روش جداسازی پروتئین‌ها صورت نمی‌گیرد. سپس پروتئین‌ها در معرض آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پروانسولین قرار گرفتند و با به کاربردن آنتی‌بادی ثانویه، تولید پروتئین پروانسولین در قارچ‌های تراریخت اثبات شد (شکل ٦). آزمایش لکه‌گذاری وسترن با استفاده از پروتیئن‌های استخراج شده از نمونه‌های قارچ صدفی تراریخت و شاهد با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی پروانسولین انجام گرفت. طبق نتایج این آزمون (شکل ۷)، تولید این پروتئین در قارچ‌های تراریخت (با اندازه ۲۳ kDa) تایید شد درحالی‌که هیچ باندی در نمونه غیرتراریخت مشاهده نشد. بنابراین نتایج این آزمون‌ها حاکی از تولید موفق پروتئین پروانسولین در قارچ‌های تراریخت بود. نتایج آزمون‌های مختلف نشان داد که ژن پروانسولین انسانی علاوه بر اینکه در ژنوم قارچ صدفی درج شده‌است بلکه رونویسی و ترجمه آن به درستی انجام می‌شود. هرچند در برخی موارد با وجود مثبت بودن PCR، رونویسی آن‌ها تایید نشد و این ممکن است به‌دلیل قرار نگرفتن ژن در مناطق فعال از نظر رونویسی باشد. چنین نمونه‌هایی در آزمون‌های بعدی بیان موفق پروانسولین انسانی را نشان دادند.



شکل ۵- نمودار نتایج الایزا برای پروتئین‌های استخراج شده از قارچ‌های صدفی تراریخت (۱ الی ۹) در مقایسه با شاهد (قارچ غیرتراریخت WT)



شکل ٦- تایید تولید پروانسولین در قارچ‌های صدفی تراریخت با استفاده از آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای. ۱ الی ۵: نمونه پروتئینی قارچ‌های تراریخت، C^+: نمونه پروتئینی انسولین تجاری ($۳/۵\ ng\ \mu l^{-1}$)، WT: نمونه پروتئینی قارچ غیرتراریخت.



شکل ۷- آزمون ایمونوبلاتینگ برای تایید تولید پروتئین پروانسولین انسانی در قارچ‌های صدفی تراریخت. M: نشانگر اندازه پروتئینی (Cinnagen, PR901641)، ۱ الی ٦: قارچ‌های تراریخت.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در حال حاضر تقاضا برای پروتئین‌های نوترکیب انسانی جهت درمان و تشخیص بیماری‌ها بسیار بالاست و یکی از این بیماری‌ها دیابت می‌باشد. حدود ۰/۸ درصد جمعیت جهان از نوعی دیابت مرتبط با انسولین رنج می‌برند و پیش‌بینی شده‌است که در سال ۲۰۲۵ تعداد این بیماران تقریبا ۳۰۰ میلیون نفر باشد. میزان تقاضای بالای این هورمون، لزوم توسعه روش‌های ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را در آینده ضروری می‌نماید (Kjeldsen et al. 2001). روش‌های درمانی موجود برای دیابت هزینه‌بر بوده و در حالت معمول به‌دلیل تزریقی بودن آن برای بیماران بسیار دردناک می‌باشد، از سوی دیگر مشکلات زیادی در تزریق انسولین که معمول‌ترین راه استفاده از انسولین در بیماران دیابتی می‌باشد وجود دارد. تحویل خوراکی انسولین می‌تواند راه‌کاری مناسب باشد که در این خصوص قارچ‌های خوراکی می‌توانند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید داروهای خوراکی مطرح باشند در این صورت استخراج و استحصال پروتئین از فرایند تولید حذف خواهد شد و این امر به نوبه خود سبب کاهش هزینه‌های تولیدی می‌شود. این مسئله نه تنها برای شرکت‌های داروسازی بسیار مطلوب است بلکه مسیری را برای تامین دارو از منابع کم هزینه در کشورهای کمتر توسعه یافته ایجاد می‌کند (Kim et al. 2010; Choi et al. 2011). در راستای این هدف ارزشمند و با نظر به اینکه تاکنون هیچ دستاوردی مبنی بر تولید پروانسولین انسانی در قارچ‌های خوراکی گزارش نشده‌است؛ در تحقیق حاضر پتانسیل سیستم تولیدی قارچ‌های خوراکی به‌عنوان یکی از سیستم‌های تولید جهت بیان و تولید پروانسولین انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

امروزه برای تراریزش قارچ‌های خوراکی به‌طور گسترده از روش‌های مبتنی بر اگروباکتریوم استفاده می‌شود؛ اگرچه از روش‌هایی نظیر بمباران ذره‌ای و پلی اتیلن گلیکول و یا پروتوپلاست‌ها نیز استفاده شده‌است، ولیکن کارایی پائین انتقال، دشواری کنترل تعداد کپی منتقل شده، عدم درج صحیح DNA در ژنوم قارچ، نیاز به تهیه پروتوپلاست و محدودیت اندازه DNA از جمله معایب این روش‌ها می‌باشند (Van den Eede et al. 2004). از آنجا که فاکتورهای مختلف تاثیر گذار بر تراریزش قارچ صدفی در آزمایشات پیشین توسط مولفین بررسی و مشخص شده بودند (Fabriki et al. 2013)، بنابراین تراریزش بافت ژیل قارچ صدفی با اگروباکتریوم تومه‌فاشینس حاوی ناقل نوترکیب PcambCTB-Pins با موفقیت انجام شد و با استفاده از آزمون PCR و نیز الگوی دورگه‌سازی سادرن درج ژن پروانسولین در ژنوم قارچ صدفی تائید شد.

بررسی بیان ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB در سطح RNA در قارچ‌های تراریخت با استفاده از آزمون RT-PCR بررسی شد و رونویسی از ژن‌های پروانسولین و CTB در قارچ‌های تراریخت تایید شد. در توافق با نتایج تحقیقات متعددی که به طور موفقیت آمیز از پیش‌برنده gpd برای بیان خارجی استفاده شده است (Chen et al. 2000; Burns et al. 2005; Kuo et al. 2008)، رونویسی موفق از ژن پروانسولین–CTB تحقیق حاضر حاکی از انتخاب مناسب پیش‌برنده gpd برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در *P. ostreatus* می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های الایزا، لکه‌گذاری نقطه‌ای و وسترن میزان تولید پروانسولین انسانی در قارچ صدفی (*P. ostreatus*) تقریبا ۰/۰٤ درصد تعیین شد و نتایج حاصل از آزمون‌های فوق، تفاوت بیان در قارچ‌های تراریخت را نشان داد.

این مسئله می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد. ممکن است بیان پروتئین ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB در قارچ‌های تراریخت بسیار پایین باشد به نحوی که با روش‌های مذکور قابل شناسایی نباشند و یا این‌که فقدان بیان ژن ناشی از نوترکیبی در ناحیه T-DNA باشد که منجر به ساختار ژن ترکیبی پروانسولین انسانی و CTB شده باشد. میزان بیان یک پروتئین خارجی به محل درج ژن در ژنوم بستگی دارد و این امر ممکن است سبب ایجاد تفاوت بیان در نمونه‌های مورد بررسی شده باشد. عواملی نظیر اثرات مکانی و خاموشی ژن می‌توانند بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهند. همچنین T-DNA می‌تواند نزدیک یا دور از عناصر فعال کننده رونویسی یا درون مناطق هتروکروماتینی الحاق شود. عامل دیگر متیله شدن DNA انتقالی است که می‌تواند مانع از رونویسی شود (Meyer 2000, Kim and Gelvin 2007). تولید انسولین انسانی در سیستم گیاهی برای اولین بار در سیب‌زمینی گزارش شده و نتایج آن نشان داده است که انسولین انسانی در

Archive of SID
www.SID.ir

سیب‌زمینی تا ۰/۰۵ درصد پروتئین محلول کل (TSP) بیان می‌شود (Arakawa et al. 1998). در تحقیقی دیگر امکان بیان پروتئین ترکیبی زیر واحد B وبا و زنجیره B انسولین که به صورت سه توالی تکراری متوالی طراحی شده بودند، در توتون بررسی شده است که به میزان ۰/۱۱ درصد پروتئین کل برگ بیان شد (Li et al. 2006). در تحقیق مشابه دیگری بیان پروانسولین ترکیبی با پروتئین A در غده‌های سیب‌زمینی و کلروپلاست گیاه توتون به‌ترتیب به میزان ۰/۰۲۲ و ۰/۲ درصد پروتئین محلول کل گزارش شده‌است (Kashani et al. 2012; Yarbakht et al. 2014). با توجه به نتایج تحقیق حاضر، در مقایسه با نتایج مطالعات انجام شده در زمینه انتقال هسته‌ای ژن پروانسولین به گیاه سیب‌زمینی، میزان تولید پروتئین ترکیبی پروانسولین در قارچ صدفی مشابه با میزان بیان در سیب‌زمینی با میزان ۰/۰٤ درصد پروتئین محلول کل (TSP) بود.

در طی دو دهه اخیر تلاش‌های موفقیت‌آمیز بسیاری در زمینه انتقال ژن به گیاهان مختلف و کشاورزی مولکولی (Molecular farming) در ایران انجام شده‌است، ولی در زمینه دستورزی قارچ‌های خوراکی به‌ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب در این دسته از موجودات با ارزش، تحقیق حاضر اولین گزارش محسوب می‌شود. با وجود تلاش زیادی که در زمینه بهتر انجام شدن این پژوهش صورت گرفت، ولی هنوز گام‌های اولیه در این زمینه برداشته شده و نیاز به تحقیقات بیش‌تر برای آشکار شدن جنبه‌های مختلف آن می‌باشد.

منابع

Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH (1998) A plant-based cholera toxin B subunit insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nature Biotechnology 16: 934-938.

Burns C, Gregory KE, Kirby M, Cheung MK, Riquelme M, Elliott TJ, Challen MP, Bailey A, Foster GD (2005) Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. Fungal Genetics and Biology 42: 191-199.

Challen M, Gregory K, Sreenivasaprasad S, Rogers C, Cutler S, Diaper D (2000) Transformation technologies for mushrooms. Mushroom Science 15: 165-172.

Chen X, Stone M, Schlagnhaufer C, Romaine CP (2000) A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 4510-4513.

Choi JH, Kim S, Sapkota K, Park SE, Kim SJ (2011) Expression and production of therapeutic recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pleurotus eryngii*. Applied Biochemistry and Biotechnology 165: 611-623.

De Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM (1998) *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of filamentous fungi. Natural Biotechnology 16: 839-842.

Ding Y, Liang S, Lei J, Chen L, Kothe E, Maa A (2011) *Agrobacterium tumefaciens* mediated fused *egfp-hph* gene expression under the control of *gpd* promoter in *Pleurotus ostreatus*. Microbiological Research 166: 314-322.

Fabriki-Ourang S, Jalali-Javaran M, Mohammadi-Goltapeh E, Alizadeh H, Honari H (2013) Optimization of agrobacterium-mediated transformation in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by vector containing human pro-insulin gene. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 2: 1-9.

Farinas CS, Leite A, Miranda EA (2007) Recombinant human proinsulin from transgenic corn endosperm: solvent screening and extraction studies. Brazilian Journal of Chemical Engineering 24: 315-323.

Frandsen RJN (2011) A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Journal of Microbiological Methods 87: 247-262.

Hay CW, Docherty K (2003) Enhanced expression of a furin-cleavable proinsulin. Journal of Molecular Endocrinology 31: 597-607.

Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. Current Genetics 37: 209-212.

Kashani K, Jalali Javaran M, Mohebodini M, Moieni A, Sheikhi M (2012) Regeneration and *agrobacterium*-mediated transformation of three potato cultivars (*Solanum tuberosum*) by human proinsulin gene. Australian Journal of Crop Science 6: 1212-1220.

Kilaru S, Hoegger PJ, Majcherczyk A, Burns C, Shishido K, Bailey A, Foster GD, Kues U (2006) Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 200-10.

Kim S, Sapkota K, Choi BS, Kim SJ (2010) Expression of human growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. Central European Journal of Biology 5: 791-799.

Kim SI, Gelvin SB (2007) Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the Arabidopsis genome generated under non-selective conditions. The Plant Journal 51: 779-791.

Archive of SID
www.SID.ir

Kjeldsen T, Balschmidt P, Diers I, Hach M, Kaarsholm NC, Ludvigsen S (2001) Expression of insulin in yeast: the importance of molecular adaptation for secretion and conversion. Biotechnology and Genetic Engineering Review 18: 89-121.

Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. The proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98: 1871-1876.

Kuo, C. Y. and Huang, C. T. (2008) A reliable transformation method and heterologous expression of b-glucuronidase in *Lentiluna edodes*. Journal of Microbiological Methods, 72: 111-115.

Li D, Oleary J, Huang Y, Huner NP, Jevnikar AM, Ma S (2006) Expression of cholera toxin B subunit and the B chain of human insulin as a fusion protein in transgenic tobacco plants. Plant Cell Report 25: 417-424.

Meyer, P (2000) Transcriptional transgene silencing and hromatin components. Plant Molecular Biology 43: 221-34.

Moor AJ, Challen MP, Warner PJ, Elliotte TJ (1995) Billistics for the delivery of transforming DNA to mushrooms. Mushrooms Science 14: 63-70.

Nevalainen KMH, Teo VSJ, Bergquist PL (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends in Biotechnology 23: 468-474.

Romaine CP, Chen X, Schlagnhaufer C (2004) Fruiting body gene transfer method for *Agaricus bisporus* potentates crop improvement and pharming. In C. P. Romaine, C. B. Keil, D. L. Rinker and D. J. Royse. Science and Cultivation of Edible Fungi and Medical: University Park: The Pennsylvania State University, 117-124.

Sunagawa M, Magae Y (2002) Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. FEMS Microbiology Letters 211: 143-46.

Van den Eede, G., Aarts, H., Buhk, H. J., Corthier, G., Flint, H. J., Hammes, W., Jacobsen, B., Midtvedt, T., Van der Vossen, J., von Wright, A., Wackernagel, W. and Wilcks, A. (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. Food and Chemical Toxicology, 42: 1127-1156.

Wang J, Guo L, Zhang K, Wu Q, Lin J (2008) Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*. Bioresource Technology 99: 8524-8527.

Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Research 16: 31-44.

Yarbakht M, Jalali-Javaran M, Nikkhah M, Mohebodini M (2014) Dicistronic expression of human proinsulin-protein a fusion in tobacco chloroplast. Biotechnology and Applied Biochemistry.

Zhang C, Odon V, Kim HK, Challen MP, Burton KS, Hartley D, Elliott TJ (2004) Mushrooms for molecular pharming. Science and Cultivation of Edible Fungi and Medicinal Fungi. Pp: 611-8.

Zhao FY, Lin JF, Zeng XL, Guo L, Wang YH, You LR (2010) Improvement in fruiting body yield by introduction of the *Ampullaria crossean* multi-functional cellulase gene into *Volvariella volvacea*. Bioresource Technology 101: 6482-6486.

Archive of SID

www.SID.ir