مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۰۵-۹۶

انتقال و بیان ژن انسولین نوترکیب منومر در گیاه آرابیدوپسیس

Transformation and expression of recombinant insulin monomer in Arabidopsis plant

بهناز حسینی[۱]، غلامرضا شریفی سیرچی[۲*]

Behnaz Husseini[1], Gholam Reza Sharifi –Sirchi[2*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- دانشیار گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان

1. Master of Science, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, University of Shahid Bahonar of Kerman.

2. Associate Professor in Biotechnology, Agriculture Department, Agriculture and Natural Science College, University of Hormozgan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifisirchi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۹ – تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰)

چکیده

گسترش دیابت در جهان با افزایش قابل توجه‌ای در دهه‌های آینده پیش بینی شده است. میزان شیوع این بیماری در کشور ایران نیز هر ساله در حال افزایش است و جان هزاران نفر بیمار را تهدید می‌کند. پروتئین دارویی آسپارت یکی از آنالوگ‌های دارویی اصلی برای درمان دیابت است که نسبت به انسولین لیسپرو زمان اوج سریع‌تری دارد و می‌توان از آن در پمپ‌های انسولین، خودکار انسولین و در روش تزریق استفاده کرد. در این تحقیق ژن آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد و همچنین برای تراریخت کردن گیاه آرابیدوپسیس تالیانا از دو نژاد اگروباکتریوم EHA101 و GV3101 که حاوی پلاسمید دوگانه pJawohl3 حامل ژن انسولین مونومر آسپارت بود، استفاده شد. در این تحقیق گیاهان در مرحله گلدهی توسط اگروباکتریوم با روش غوطه‌ورسازی گل آذین تیمار شدند. صحت حضور ژن انسولین مونومر آسپارت و بیان آن با استفاده از تکنیک استخراج DNA ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از تراریخت شدن گیاه آرابیدوپسیس با پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن انسولین آسپارت نشان داد که آگروباکتری سویه EHA 101 کارایی بالاتری در انتقال ژن دارد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا
اگروباکتریوم
انتقال ژن
انسولین
آسپارت

مقدمه

پاره‌ای از بیماری‌های انسان به دلیل فقدان پروتئین‌ها یا عملکرد نامناسب آن‌ها در بدن بیمار بوجود می‌آیند. بسیاری از این بیماری‌ها را می‌توان با تجویز پروتئین مناسب درمان کرد، اما برای انجام چنین کاری در مرحله اول، پروتئین باید در مقادیر بالا وجود داشته باشد. اگر پروتئین مورد نظر انسانی باشد، بدست آوردن مقادیر مناسب پروتئین مشکل بزرگی محسوب می‌شود (Julian *et al.*2003). پروتئین‌های حیوانی اگر کارایی لازم را برای درمان بیماری‌های انسانی داشته باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما بیماری‌هایی که قابل درمان با پروتئین‌های حیوانی باشند، زیاد نیستند و در اغلب موارد امکان پیدایش عوارضی مثل پاسخ‌های حساسیتی وجود دارد (Chargelegus *et al.* 2000). بنابراین استفاده از سیستم‌های گیاهی برای بیان و تولید داروهای نوترکیب روشی ایمن‌تر و کاراتری است.

دیابت نوعی بیماری است که بدن نمی‌تواند هورمون انسولین را تولید و یا به درستی از آن استفاده نماید. بالغ بر ۳/۶ درصد از جمعیت جهان با دیابت زندگی می‌کنند که سالانه به مقدار زیادی از هورمون انسولین برای درمان این بیماران نیاز می‌باشد (Gurramkonda *et al.* 2010). این در حالی است که هیچ کدام از منابع طبیعی موجود قادر به تأمین این مقدار از انسولین نیستند. انسولین یک هورمون پروتئینی مهم است که باعث تنظیم میزان گلوکز خون در پستانداران می‌شود. امروزه، درمان از طریق تجویز انسولین تنها تیمار مؤثر برای درمان دیابت است، که از طریق تزریق اعمال می‌شود. این عمل (تزریق) سبب ناراحتی افراد و در بعضی موارد سبب عوارض ثانویه (ایجاد بافت اسکار و عفونت‌های پوستی) می‌شود. برای حل این مشکل، چندین روش مختلف در دست تحقیق می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تحویل انسولین به بدن از مسیرهای خوراکی و بینی اشاره کرد (Goldberg *et al.* 2003). هورمون انسولین، پروتئینی شامل زنجیر B با ۳۰ اسیدآمینه و زنجیر A با ۲۱ اسیدآمینه است (Faber *et al.* 1995). در سال ۱۹۲۱ دانشمندان کانادایی با موفقیت انسولین را از پانکراس سگ استخراج کردند. همچنین این دانشمندان در سال ۱۹۳۶ با اضافه کردن پروتئینی به نام پروتامین که در اسپرم ماهی وجود دارد به انسولین، راهی برای آزادسازی کندتر انسولین در خون، پس از تزریق پیدا کردند. در سال ۱۹۵۰ انسولینی با عملکرد کمی سریعتر تولید شد (Liu *et al.* 2003) . در سال ۱۹۷۷ یک گروه پژوهشی با قرار دادن ژن انسولین موش در باکتری، تولید انسولین کردند (Wang *et al.* 2001) تا سال ۱۹۷۹ سیستم تولید انسولین انسانی که بتواند مقادیر زیادی هورمون انسولین را تولید کند وجود نداشت تا این که با استفاده از DNA نوترکیب این کار راه اندازی شد (Murray *et al.* 1971). سرانجام در سال ۱۹۸۰ انسولین انسانی با استفاده از مهندسی ژنتیک تولید شد (Thim *et al.* 1986; Pais *et al.* 2003). تولید پروتئین‌های نوترکیب به عنوان دارو در پزشکی بدلیل اندک بودن میزان پروتئین‌های طبیعی در دسترس و مشکلات مربوط به استفاده از پروتئین‌های دارویی که از منابع طبیعی گرفته شده‌اند، اهمیت بسیاری پیدا کرده‌اند. برای مثال، بسیاری از افراد به دلیل استفاده از فرآورده‌های خونی و یا هورمون‌ها، دچار بیماری می‌شوند. بنابراین سیستم‌های ساده و ارزانی که تولید ایمن‌تر پروتئین‌های نوترکیب را در مقیاس انبوه و قیمت ارزان ممکن سازد بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Winter *et al.* 2001). اما در سال‌های گذشته دانشمندان در پی تغییرات در ساختار بیوشیمیایی انسولین و تولید آنالوگ‌های آن، برای افزایش کارایی و دوام انسولین می‌باشند (Goldberg *et al.* 2003). استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورها برای تولید مقدار زیادی پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شوند. تلاشهای زیادی در جهت تولید انسولین در گیاه انجام شده است که از جمله می توان تولید انسولین در غده‌های سیب زمینی (Arakawa *et al.* 1998)، تولید پروانسولین در کلروپلاست توتون (Ma *et al.* 1997)، انتقال پروانسولین به ذرت و گلرنگ در سال ۲۰۰۷ و انتقال ژن پروانسولین انسانی به توتون و کاهو را نام برد (Mohebodini *et al.* 2009).

در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان، باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان‌تر و ایمن‌تر بودند

(Julian *et al.* 2003). تولید زیست داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت مولکولی گویند. با گسترش سریع فن آوری کشاورزی مولکولی، بسیاری از پروتئین‌های درمانی با ارزش با موفقیت در گیاهان تراریخته تولید شدند. هم اکنون در ایالت کنتاکی آمریکا، گیاه توتون به کارخانه تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده است (Julian *et al.* 2003). در ایالت ویرجینیا ذرت برای معالجه بیماری سیستیک فیبروسیس برداشت می‌شود و در نبراسکا پژوهشگران امیدوارند که در مزارع، محصولاتی جهت درمان بیماری ایدز تولید کنند (Fisher *et al.* 2004). تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب (rAbs)، (Ma *et al.* 1994)، سیتوکنین‌ها اینترلوکین‌ها (Magnuson *et al.* 1998) و واکسن‌های خوراکی (Mason and Arntzen, 1995) از جمله فعالیت‌های دیگر می‌باشد که در این زمینه صورت گرفته است. از مهم‌ترین فعالیت‌های انجام گرفته در زمینه زراعت مولکولی در ایران می‌توان به بیان اینترفرون گامای انسانی در برگ و بذر کلزا (RahimiFar, 2009)، انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی به گیاه توتون (Azhdari, 2009)، تظاهر ژن *PA* از *Bacillus antracis* در کاهوی ایرانی (Honari, 2008)، انتقال ژن پروانسولین انسانی به کاهو و توتون (Mohebodini *et al.* 2009) اشاره کرد. مزیت اصلی گیاهان تراریخت جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، هزینه پایین و تولید در حجم بالا در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی می‌باشد. تخمین زده می‌شود که هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰-۲ درصد هزینه سیستم‌های میکروبی و ۱ درصد کشت‌های سلولی پستانداران باشد (Giddings, 2001). اگر بتوان برخی پروتئین‌های نوترکیب خاص را در قسمت‌های خوراکی مثل دانه و میوه بیان کرد بسیاری از هزینه‌ها کاهش می‌یابد و یا به طور کلی حذف می‌شود. این عمل به ویژه در واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌هایی که برای ایمنی درمانی کاربرد دارند موثر است (Daniell *et al.* 2001).

از زمانی که فریدریخ لیباخ گیاه‌شناس آلمانی ادعا کرد گیاهی عالی و بی نظیر برای پژوهش های ژنتیکی پیدا کرده است بیش از نیم قرن می‌گذرد. این گیاه آرابیدوپسیس تالیانا و از نظر اقتصادی یکی از کم اهمیت‌ترین گیاهان تیره‌ی خردل بود. آرابیدوپسیس یک گیاه کوچک گلدار بومی اروپا، آسیا و شمال غربی آفریقاست (Platt *et al.* 2010). این گیاه یک ساله با طول عمر نسبی کوتاه، یک نمونه رایج برای مطالعه در زیست شناسی گیاهی و ژنتیک است. و دارای کوچک‌ترین ژنوم گیاهی می‌باشد و نیز اولین گیاهی است که ژنوم آن توالی‌یابی کامل شد و مشخص شد که دارای ۱۵۷۰۰۰ میلیون جفت نوکلئوتید و ۵ کروموزوم می‌باشد. اندازه کوچک این گیاه آن را برای کشت در محیط آزمایشگاه مناسب ساخته است. طول عمر کوتاه، خود لقاحی طبیعی و تولید دانه‌های بسیار زیاد، این گیاه را به عنوان یک موجود زنده ژنتیکی، مهم ساخته است (Greilhuber *et al.* 2006).

اهداف این تحقیق کلونینگ ژن انسولین منومر کوتاه اثر آسپارت و ساخت کاست این آنالوگ در یک ناقل دوگانه به منظور بیان آن در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه آرابیدوپسیس تالیانا اکوتیپ کلمبیا صفر (Col-0) جهت بیان ژن انسولین منومر استفاده شد. بذور در گلدان های حاوی ۱/۳ ورمی کولایت + ۲/۳ خاک غنی از مواد آلی کاشته و بر روی آنها پیش تیمار ۴۸ ساعت سرمای ۴ °C و تاریکی اعمال شد. گیاهان در شرایط نوری ۱۵۰ $\mu EM^{-2}S^{-1}$ با دوره تناوب ۸/۵ ساعت روشنایی و ۱۵/۵ تاریکی و در دمای ۲۰ °C نگهداری شدند.

سویه های باکتری

در این تحقیق باکتری های *E. coli* سویه DH5α، آگروباکتریوم تومفاشینز سویه GV3101 حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین، کانامایسین و هایگرومایسین (Koncz *et al.* 1986)، و سویهEHA101 دارای ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین (Koncz *et al.* 1986) مورد استفاده قرار گرفتند. وکتور باکتریایی مورد استفاده در آزمایش شامل: پلاسمید pGEM-B1 (دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ژن lac Z′) و ناقل دوگانه pJawohl3 (دارای ژن

گزینشگر باکتریایی مقاوم به آمپی‌سیلین و ژن گزینشگر مقاوم به کربنیسیلین در آگروباکتریوم و ژن گزینشگر مقاومت به علف کش BASTA بودند. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از طراحی با نرم افزار Fast PCR با توالی های زیر توسط شرکت تکاپو زیست فراهم شدند.

F: 5′-CTCGAGATGAAGTACGAAGA-3′

R: 5′-GAATCCTTAATGATGATGAT-3′

طراحی ژن انسولین مونومر آسپارت

در ابتدا با بررسی منابع علمی و پژوهش های انجام شده در زمینه ساخت انسولین مونومر با توجه به دامنه موجودات زنده متعدد (گیاه، باکتری و مخمر)، کدون‌هایی که بیشترین کارایی بیان را داشتند منظور شدند و صحت آن توسط برنامه‌های آنلاین in silico و J-cat تایید شد. با توجه به نوع میزبان، آغازگرهای مناسب، سایت‌های برشی و تغییرات لازم برای تبدیل انسولین مونومر انسانی به انسولین آنالوگ آسپارت با اندازه ۲۲۸ bp طراحی و بهسازی شد و با برنامه‌های NEBcutter و WatCut بررسی شدند. سپس ساختار فرضی سه بعدی پروتئین آنالوگ آسپارت طراحی شده توسط گروه بیوانفورماتیک بخش زیست شناسی دانشگاه شیراز مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از تایید ساختار ژن، آنالوگ مورد نظر توسط شرکت ژاپنی Bioneer سنتز و در پلاسمید pGEM-B1 قرار داده شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب pGEM-B1 به باکتری *E. coli*

سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α با استفاده از روش‌های ارائه شده توسط Chung (۱۹۸۹) و همچنین Chen و همکاران (۲۰۰۱) تهیه شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش Inoue و همکاران، (۱۹۹۰) به باکتری *E. coli* انتقال داده شدند. پرگنه های آبی رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب رشد یافته بر روی محیط کشت LB، حاوی دو ماده X-gal و IPTG (محرک تولید آنزیم ایزوپروپیل تیو گالاکتوزید) + آمپی سیلین گزینش شدند. برای استخراج DNA پلاسمیدهای نوترکیب pGEM-B1 از سلول‌های باکتری DH5α از روش به کار برده شده در کیت استخراج پلاسمید AccuPrep® Plasmid Mini Kit (BiONEER) Extraction)) استفاده شد. جهت تایید حضور تراژن، DNA پلاسمید استخراج شده، با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Bam*HI توسط روش سامبروک و راسل برش داده شد و قطعات حاصل (باند ۲۲۸ bp ژن انسولین آسپارت و باند مربوط به پلاسمیدpGEM-B1) با انجام الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد تایید قرار گرفتند. خالص سازی قطعهbp ۲۲۸ ژن انسولین از ژل، طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از کیت استخراج از ژل ((Gel Extraction Kit (Fermentas) صورت پذیرفت. جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی، سه نمونه به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. پس از تایید توالی، تراژن بداخل پلاسمید دوگانه pJawohl3 جایگزین شد و سپس پلاسمید نوترکیب حاصل به سویه های باکتری آگروباکتریوم تومیفاشینز معرفی شد.

انتقال ژن به روش غوطه ورسازی گل آذین (Floral dip) به گیاه آرابیدوپسیس

وقتی که غنچه‌های گل دهنده ثانویه گیاه ظاهر شدند، قبل از باز شدن، غنچه‌های گیاهان با اگروباکتریوم تیمار شدند. تراریختی گل های آرابیدوپسیس بر طبق روش Clough و Bent، ۱۹۹۸ صورت پذیرفت.

انتخاب گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت

بعد از گذشت ۱۲ ساعت پوشش نایلونی گیاهان تیمار شده برداشته شد و گیاهان به گلخانه منتقل شدند. بعد از رشد کامل و رسیدن گیاهان، بذرهای آنها جمع آوری شد. برای انتخاب گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت، بذور در محیط کشت انتخابی (حاوی نصف نمکهای محیط کشت MS، 1x ویتامین های B5، $8grl^{-1}$ آگار و BASTA) در پتری دیش‌هایی به‌اندازه (۱۵×۱۵۰cm) کشت داده و به مدت یک هفته به منظور انجام بهاره سازی در داخل یخچال با دمای ۷ °C قرار داده شدند. سپس پتری دیش ها به اتاق رشد با دمای۲۵°C و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از انتقال پتری ها به اتاق رشد، گیاهچه های تراریخت که در محیط سبز

مانده، بخـوبی از جوانـه‌هـای غیـر تراریخـت کـه زرد شـده قابـل شناسایی بودند.

استخراج DNA ژنومی از گیاه آرابیدوپسیس

بـه منظـور اطمینـان از انتقـال ژن آنـالوگ انسـولین آسـپارت بـه گیاه آرابیدوپسـیس تالیانـا، اسـتخراج DNA از بـرگ نمونـه‌هـای گیاه آرابیدوپسـیس کـه بعـد از اسـپری بـا علـف کـش BASTA مقاومت کرده بودند، با استفاده از روشCTAB انجام شد.

استخراج RNA و واکنش نسخه برداری معکوس

RNA کل بافت برگ با استفاده از محلول استخراج (RNX- Plus, CinnaGen) RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج شد. جهت سنتز رشته cDNA از کیت (First Strand cDNA synthesis Kit, Fermentas) استفاده شد.

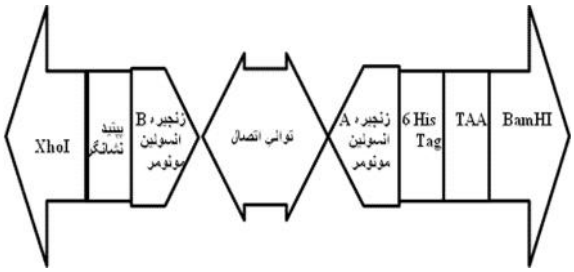
نتایج

ساختمان ژن انسولین آسپارت طراحی شده

همانطور که در شکل (۱) نشان داده شده است در ژن آسپارت طراحی شده از سر ′۵ به ترتیب، بعد از سایت برشی *Xho*I و کدون آغاز توالی پپتیدی نشانگر قرار گرفته است. در انتهای این توالی نشانگر، قبل از زنجیره B انسولین، اسیدآمینه لیزین قرار دارد که در واقع محل برش آنزیم اندوپرتئاز تریپسین می‌باشد. در زنخیره B انسولین آسپارت، اسیدآمینه گلوتامیک اسید جایگزین اسیدآمینه پرولین در ساختار طبیعی انسولین شده است. اتصال دو زنجیره B و A توسط اتصال با سه اسیدآمینه صورت گرفته است. اولین و سومین اسیدآمینه توالی ارتباطی در واقع سایت‌های برشی دیگر آنزیم تریپسین می‌باشند. پس از آن زنجیره A انسولین قرار دارد. در انتهای ساختار ژن انسولین طراحی شده یک توالی ۶ اسیدآمینه‌ای هیستیدین هدف به منظور خالص سازی پروتئین آسپارت در روش کروماتوگرافی قرار داده شد. پس از آن در انتهای ′۳، سایت بررشی *Bam*HI قرار دارد.

استخراج پروتئین کل از برگ و وسترن بلات

ابتدا ۱ گـرم بـرگ در هـاون و بـا اسـتفاده از ازت مـایع پـودر و هموژنیزه شد. سپس به مقدار مساوی به آن بـافر 2X SDS اضـافه شد و بعد از سانتریفیوژ (۳۰۰۰۰ g) به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد فاز بالایی جدا شد. پروتئین هـا بـر روی ژل SDS ٪۱۵ بارگذاری و با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی با ولتاژ ثابت ۲۵۰ از یکدیگر جدا شدند. آزمایش وسترن بـلات بـا اسـتفاده از آنتـی بـادی مونوکلونـال E2E3(ab9569; Abcam, Cambridge, MA, USA) بر طبق روش Nykiforuk و همکاران، 2005 انجـام شد.



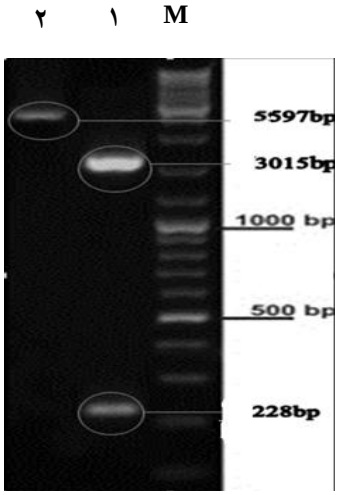
شکل ۱- ساختار کاست بیانی ژن آنالوگ مونومر آسپارت

Figure 1- Expression cassette of analog monomer Aspart gene

توالی ارتباطی طراحی شده بین زنجیره B و A آنالوگ انسولین در واقع یک توالی جایگزین برای زنجیره C انسولین طبیعی است. این توالی علاوه بر ایجاد پیوند بین دو زنجیره در واقع سایت برشی برای تیمار و برش انسولین توسط آنزیم تریپسین می‌باشد که در نهایت در شکل‌گیری نهایی انسولین و انعطاف‌پذیری مولکول برای ایجاد پیوند بین دو زنجیره موثر است. در این پژوهش ژن مونومر انسولین آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد.

شکل ۲- انتخاب کلونی های باکتریایی نوترکیب. کلونی های سفید، نوترکیب احتمالی هستند.

Figure 2- Selection of transformed bacterial colony. White colonies are probable recombinant.



شکل ۳- تصویر حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pGEM-B1 و pJawohl3. در چاهک اول (M) نشانگر، در ستون دوم (1)، پلاسمید برش خورده pGEM-B1 با آنزیم های *Xho*I و *Bam*HI همراه با ژن انسولین آسپارت و در ستون سوم ژل (2)، وکتور دوگانه pJawohl3 برش خورده با آنزیم های *Xho*I و *Bam*HI قرار گرفت.

Figure 3- Image of enzymatic digestion of pGEM-B1 and pJawohl3. The first well (M) marker, the second well (1) digestion of transformed plasmid pGEM-B1 which is associated with insulin gene Aspart with *Xho*I and *Bam*HI restriction enzymes and the third column (2), digestion of the pJawohl3 binary vector with *Xho*I and *Bam*HI restriction enzymes.

بررسی نتایج حاصل از همسانه سازی ژن آسپارت در وکتور pGEM-B1

پس از همسانه سازی پلاسمید نوترکیب pGEM-B1 در باکتری (شکل ۲)، پلاسمید کلون شده خالص سازی شد. پلاسمید نوترکیب به همراه وکتور دوگانه pJawohl3 بوسیله آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xho*I برش داده شدند. در ستون دوم ژل، پلاسمید نوترکیب دو باند مشاهده شد. یک باند مربوط به قطعه 3015 bp پلاسمید pGEM-B1 و یک قطعه 228 bp که باند مربوط به ژن انسولین آسپارت می‌باشد که این دو باند صحت عمل برش آنزیمی را نشان می‌دهد. در چاهک سوم باند مربوط به پلاسمید pJawohl3 برش خورده و خطی شده با اندازه bp 5597 مشاهده شد (شکل۳).

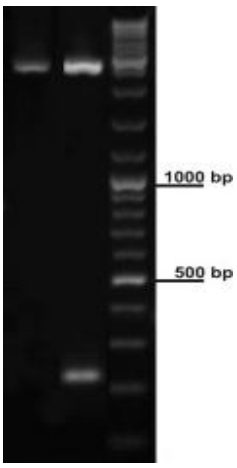
نتایج حاصل از قرار گرفتن قطعه ژن انسولین آسپارت در وکتور دوگانه pJawohl3:

در این مرحله پس از جداسازی ژن آسپارت از ژل، این قطعه 228 bp بوسیله آنزیم لیگاز به ناقل دوگانه بیانی pJawohl3 متصل شد و وکتور دوگانه حاوی ژن مذکور در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی شد. پس از استخراج پلاسمید حاوی ژن انسولین آسپارت، با استفاده از روش های هضم آنزیمی و توالی یابی، صحت توالی ژن انسولین مونومر آسپارت در ناقل pJawohl3 تایید شد. پس از روش هضم آنزیمی پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن انسولین آسپارت با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Bam*HI روی ژل الکتروفورز دو باند 5597bp مربوط به پلاسمید و یک باند 228bp مربوط به ژن آسپارت دیده می‌شود (شکل۴).

بررسی گیاه *Arabidopsis thaliana* تراریخت

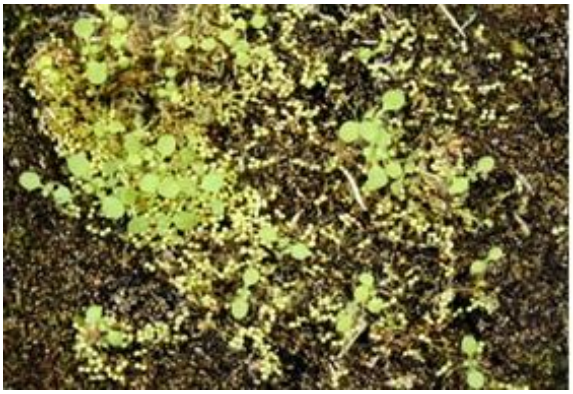
بذرهای گیاه آرابیدوپسیس تراریخت شده در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت انتخابی و هم در گلدان کشت شدند. ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از انتقال به اتاق رشد و اسپری با علفکش Basta، جوانه‌های تراریخت احتمالی در محیط سبز ماندند

و بخوبی از جوانه‌های غیر تراریخت که زرد شده بودند شناسایی شدند (شکل۵).



شکل ۴- برش آنزیمی پلاسمید pJawohl3 حاوی ژن آسپارت. در ستون اول از سمت راست، نشانگر. در ستون دوم ژل، باند 5597bp پلاسمید و باند 228bp ژن آسپارت. در ستون سوم کنترل منفی pJawohl3 برش خورده فاقد ژن انسولین دیده می‌شود.

Figure 4- pJawohl3 enzymatic digestion containing the insulin gene for Aspart. Frst line from right, DNA marker. Second line, plasmid band 5597bp and 228bp band of Aspart gene. The third line, negative control and digested pJawohl3 without insert.



شکل ۵-انتخاب گیاهچه های تراریخت بوسیله علفکش بستا

Figure 5- Selection of transformed plants by BASTA herbicide.

تحقیقات Clough و Bent، ۱۹۹۸ نشان داده است که حتی بین ارقام مختلف گیاه آرابیدوپسیس نیز از نظر میزان تراریخت‌های بدست آمده تفاوت وجود دارد. همچنین نژادهای اگروباکتریوم نیز از نظر نفوذ به داخل گیاه و آلوده سازی متفاوت می‌باشند. زیرا بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش مشاهده می‌شود که فراوانی تراریخت‌های بدست آمده از گیاهان تیمار شده توسط آگروباکتری سویه EHA101 بیشتر از تراریخت‌های بدست آمده از گیاهان تیمار شده توسط سویه GV3101 می‌باشد (جدول ۱). بنابراین صرف نظر از نوع گیاه و روش انتقال ژن، بین نژادهای اگروباکتریوم نیز از نظر نفوذ به داخل بافت گیاه تفاوت وجود دارد. تحقیقات Clough و Bent، ۱۹۹۸ نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد.

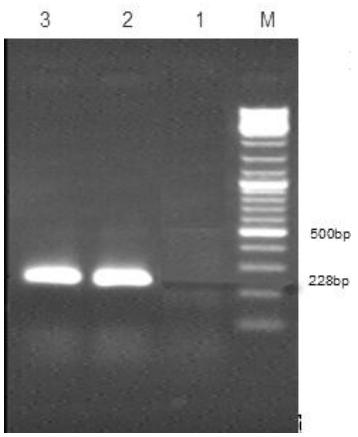
انتخاب گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس و بیان ژن مونومر انسولین آسپارت

با استفاده از روش های استخراج DNA، RNA و RT-PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن انسولین آسپارت بر روی گیاه آرابیدوپسیس تراریخت، حضور و بیان ژن انسولین مونومر آسپارت تایید شد (شکل ۶). همانطور که در شکل (۶) دیده می‌شود نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای ژن انسولین منومر با استفاده از DNA و cDNA از نمونه گیاهی تراریخته در ستون ۲ و ۳ دارای باند 228bp می‌باشد که این باند، صحت انتقال و بیان ژن انسولین آسپارت را به گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تایید می‌کند.

جدول ۱- مقایسه دو نژاد اگروباکتریوم از نظر درصد بذور تراریخت.

Table1- Comparison of two agrobacterium strains from percentage of transformed seed.

روش انتقال ژن	غوطه ورسازی گل آذین	
نوع گیاه	آرابیدوپسیس	
نژاد اگروباکتریوم	EHA101	GV3101
تعداد بذورآزمایش شده	۲۰۰۰	۲۰۰۰
تعداد جوانه‌های سبز	۴۰	۲۰
تعداد جوانه‌ها زنده مانده پس از ۱۰ روز	۱۳	۸
درصد گیاهان تراریخت	۰/۶۵	۰/۴

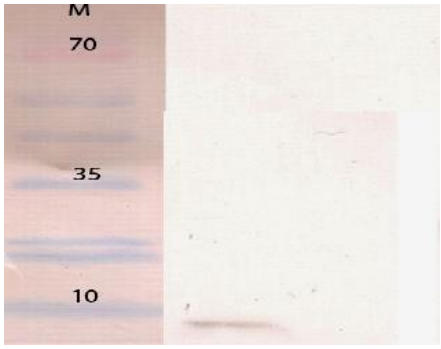


شکل ۶- شناسایی گیاهان تراریخت حاوی ژن انسولین آسپارت بوسیله PCR. راست: چاهک اول نشانگر ۱۰۰bp ، چاهک دوم (۱)، گیاه تراریخت فاقد ژن هدف. چاهک سوم (۲)، گیاه تراریخت حاوی ژن انسولین آسپارت ۲۲۸ bp. چاهک چهارم (۳)، بیان ژن انسولین آسپارت در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با استفاده از روش RT-PCR.

Figure 6- Identification of transformed plant with Aspart insulin gene by PCR. Right: first line, 100 bp DNA marker. Second line (1), transformed plant without target gene. Third line (2), transformed plant containing 228 bp Aspart insulin gene. Last line (3), Aspart insulin gene expression in *Arabidopsis thaliana* plant by RT-PCR.

نتایج حاصل از وسترن بلات پروتئین کل گیاهان تراریخت با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال E2E3 نشان داد که پروتئین انسولین آپارت نوترکیب در گیاه بیان و ترجمه شده است (شکل ۷).

با توجه به مطالعات صورت گرفته، در این پژوهش انسولین آنالوگ آسپارت با اندازه ۲۲۸ bp طراحی و بهسازی شد و ژن مونومر انسولین آسپارت بعنوان تراژن استفاده شد. بیشتر تغییرات ایجاد شده در آنالوگ‌های انسولین در مقایسه با ساختار طبیعی آن در محل اسیدآمینه‌های ۲۵ تا ۳۰ زنجیره B می‌باشد. زیرا این اسیدآمینه‌ها بیشترین تاثیر را در عملکرد پروتئین انسولین و خواص درمانی آن دارند. اسیدآمینه ۲۵ زنجیره B در ایجاد پیوند با گیرنده‌های انسولین نقش موثری دارد بنابراین هر نوع تغییری در این اسیدآمینه می‌تواند قدرت درمانی انسولین را کاهش دهد (Gusarov *et al.* 2008). توانایی تشکیل فرم دایمر توسط فعل و انفعالات آبگریز بین اسیدآمینه‌های شماره ۸، ۹، ۱۱، ۱۳،



شکل ۷- وسترن بلات پروتئین کل گیاه آرابیدوپسیس تراریخت و شاهد با آنتی بادی مونوکلونال E2E3. (M)، نشانگر پروتئینی. (۱)، آرابیدوپسیس تراریخت با تراژن انسولین آسپارت. (۲)، شاهد

Figure 7- Western blot of transformed and control Arabidopsis leaf total protein using E2E3 monoclonal antibody. (M), protein marker. (1), Transformed Arabidopsis plant with Aspart insulin transgene. (2) Control

۱۶، ۲۴، ۲۶ و ۲۸ زنجیره B از یک انسولین مونومر در مقابل یک زنجیره B از انسولین مونومر دیگر می‌باشد. بنابراین در انسولین آسپارت به علت تغییر در اسیدآمینه شماره ۲۸ زنجیره B و همچنین pH در حدود ۷/۲ تا۷/۶ از تشکیل دایمر و هگزامر تا حد زیادی جلوگیری می‌شود. عامل موثر در ایجاد فرم مونومر انسولین، نیروی دافعه الکتروستاتیکی است که از واکنش بین اسید آمینه‌های سرین و آسپارتیک اسید ایجاد می‌شود. آسپارتیک اسید به علت انعطاف پذیری بیشتر قادر به دور شدن و عدم ایجاد تشکیل پیوند است که این امر منجر به تثبیت فرم مونومر و عدم ایجاد تشکیل دایمر در انسولین آسپارت می‌شود (Gusarov *et al.* 2008). مطالعات نشان می‌دهد هر چه طول توالی لینکر بیشتر شود اثرها منفی زیادی در میزان بیان پروتئین انسولین در میزبان خواهد داشت. اما طول کمتر از ۳ اسید آمینه توالی لینکر نیز باعث ایجاد اختلال در فعالیت زیستی پروتئین دارویی انسولین می‌شود (Hua *et al.* 2008).

در گذشته دو زنجیره A و B انسولین به صورت جداگانه ساخته می‌شد و هر کدام در یک وکتور مناسب قرار می‌گرفت.

این روش نیاز به برخی از آنزیم‌های خاص مانند اندوپروتئازها را از بین می‌برد اما در عوض امکان ایجاد پل‌های دی سولفیدی بین دو زنجیره جدا از هم بسیار دشوار بود. اما از سال ۱۹۸۶ ساخت انسولین به صورت مولکول پروانسولین انجام می‌شود. در این روش ژن انسولین به طور مستقیم به صورت پروانسولین (شامل زنجیره‌های A, B و C) سنتز شده و در یک وکتور بیانی قرار می‌گیرد (Wan *et al.* 2005).

در این تحقیق انتقال تراژن انسولین آنالوگ آسپارت به روش غوطه وری گل آذین و بدون نیاز به کشت بافت صورت پذیرفت. انتقال بدون کشت بافت توسط اگروباکتریوم روشی آسان و ارزان برای تراریخت کردن گیاهان می‌باشد. این روش به طور موفقیت آمیزی در گیاه آرابیدوپسیس به کار رفته است و در حال حاضر تلاشهای زیادی برای کاربرد آن در دیگر گونه‌های گیاهی انجام می‌گیرد. از مشکلات اصلی روشهای انتقال ژن مبتنی بر کشت بافت، باززایی گیاهان سالم از سلولهای تراریخت شده می‌باشد (Bechtold *et al.* 1993). اگرچه روشهای زیادی برای باززایی موفقیت آمیز گیاهان توسعه یافته است اما اغلب این روشها بر پایه یک دستورالعمل ضدعفونی و شستشو می‌باشند. آزمون وسترن بلات گیاهان آرابیدوپسیس تولید پروتئین نوترکیب انسولین آنالوگ آسپارت را تایید کرد. کاشانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ ژن پروانسولین انسانی را به سه رقم سیب‌زمینی انتقال دادند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الکتروفورز SDS-PAGE وجود باند پروتئینی مربوط به تراژن با سایز kDa ۱۸–۱۷ را تایید کرد. تجزیه و تحلیل ELISA نیز با استفاده از آنتی بادی انسولین انسانی تراریخته شدن و بیان در گیاهان سیب زمینی را تایید کرد.

در این تحقیق طراحی و بهسازی ژن انسولین مونومر برای اولین بار در ایران صورت گرفت که با استفاده از این روش می‌توان در آینده از گیاهان دیگر نیز برای تولید و بیان انسولین آسپارت، استفاده کرد.

تشکر و سپاس

از مسئولین دانشگاه کرمان به دلیل همکاری بسیار صمیمانه و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی سپاس‌گذاری می‌نمایم. همچنین، از جناب آقای دکتر نیکولاس شلایش دانشگاه فنی آخن آلمان بخاطر راهنمایی ها و همکاری ارزشمندشان کمال تشکر را داریم.

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. Nat Biotechnol 16(10):934-8.

Azhdari H. 2009. Cloning and transformation of human IFN gene to tobacco plants. Transgenic Research 5: 213–218.

Bechtold N, Ellis j, Plletier G. 1993. In Planta *Agrobacterium* Mediated gene transfer by Infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Science Paris 316: 1194-1199.

Chargelegue D, Vine N, Van Dolleweerd C. 2000. A murine monoclonal antibody produced in mice. Transgenic Research 9:187-194.

Clough, S.J., Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 16(6): 735-743.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science 6(5): 219-226.

Faber KN, Harder W, Veenhuis M. 1995. Review: Methylotropic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. Yeast 11: 1331-1344.

Fischer R, Schinkel H, Schillberg S. 2012. One-step protein purification: Use of a novel epitope tag for highly efficient detection and purification of recombinant proteins. The open biotechnology journal 5: 1-6.

Fisher R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. 2004. Plant-Based production of biopharmaceuticals. Plant Biology 7:152-158.

Giddings G. 2001. Transgenic plants az protein factories. Current Opinion in Biotechnology 12:450-454.

Goldberg M, Gomez-Orellana I. 2003. Challenges for the oral delivery of macromolecules. Nature Rev 2: 289–295.

Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. 2006. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. Plant Biology 8: 770-777.

Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, Swaminathan S, Khanna N, Tisminetzky S, Rinas U. 2010. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. Microbial Cell Factories 9:31.

Gusarov DA, Gusarova VD, Bairamishvili DI. 2008. Gene engineered insulin and its pharmaceutical analogs. Biomed Khim 54(6):624-42.

Hua QX, Chu YC, Jia W, Phillips NF, Wang RY, Katsoyannis PG, Weiss MA. 2002. Mechanism of Insulin Chain Combination Asymmetric Roles of A-Chain α-Helices IN Disulfide Pairing J. Biol. Chem 277: 43443–43453.

Julian KC, Drank PMW, Christou P. 2003. The prodaction of recombination pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics 4:794-805.

Kashani K, Jalali-Javaran M, Mohebodini M, Moieni A, Sheikhi-Dehabadi M. 2012. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of three potato cultivars (*Solanum tuberosum* cv. Desiree, Agria and Marfona) by human proinsulin gene. Australian Journal of Crop Science. 6(7): 1212-1220.

Koncz C, Németh K, Redei GP, Scell J. 1994. In: p. 167-189, J Paszkowski (ed.). Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Dordrecht the Netherlands 28: 130–141.

Liu M, Ramos-Castaneda J, Arvan P. 2003. Role of the Connecting Peptide in Insulin Biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry 278: 14798–14805.

Ma H, Yanofsky MF, Klee HJ, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1992. Vectors for plant transformation and cosmid libraries. Gene 117: 161-166.

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

Mason HS, Arntzen CJ. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.

Mohebodini M, Jalali Javaran M, Mahbodi F, Alizadeh H, Azhdari H. 2009. Human Proinsulin Gene Cloning in Plant Expression Vector pCAMBIA1304. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran. (In Farsi).

Murray I. 1971. Paulesco and the Isolation of Insulin. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences 26 (2): 150–157.

Nykiforuk Cl, Boothe JG, Murray WE, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM. 2005. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. Plant Biotechnology Journal 3:20-30

Pais JM, Varas L, Valdes J, Cabello C, Rodriguez L, Mansur M. 2003. Modeling of mini-proinsulin production in Pichia pastoris using the AOX promoter. Biotechnol Lett 25:251-255.

Platt A, Horton M, Huang Anastasio AE. 2010. "The Scale of Population Structure in *Arabidopsis thaliana*". PLoS Gen 6 (2): e1000843.

Rahimifar P. 2009. Human IFN Gene transfer to canola. Journal of Biochemistry 269, 6042–6051.

Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, Fiil NP 1986. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6766– 6770.

Wan ZL, Huang K, Xu B, Hu SQ, Wang S, Chu YC, Katsoyannis PG, Weiss MA. 2005. Diabetes-associated mutations in human insulin: crystal structure and photo-cross-linking studies of a-chain variant insulin Wakayama. Biochemistry 44: 5000-5016.

Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, Tang YH, Zhu SQ, Cui DF, Feng YM. 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris and a simple procedure for purifying the expression product. Biotechnol Bioeng 73: 74–79.

Winter J, Neubauer P, Glockshuber R, Rudolph R. 2001. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of Escherichia coli by fusion to DsbA. Journal of Biotechnology 84: 175–185.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Transformation and expression of recombinant insulin monomer in Arabidopsis plant

Behnaz Husseini[1], Gholam Reza Sharifi –Sirchi[2*]

1. Master of Science, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, University of Shahid Bahonar of Kerman.

2. Associate Professor in Biotechnology, Agriculture Department, Agriculture and Natural Science College, University of Hormozgan

* Corresponding Author, Email: sharifisirchi@yahoo.com

A B S T R A C T

The prevalence of diabetes is predicted to rise significantly in the coming decades. Also, the incidence of this disease is increasing in Iran every year. Aspart is an insulin analog. Aspart insulin has a more rapid peak than Lispro and can be used in insulin pumps, insulin pens and injection methods. In this research, Two *Agrobacterium tumefaciens* strains, EHA101 and GV 3101, containing pJawohl3 carrying the Aspart insulin gene were used to transform *Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype plants by floral dip infiltration method. Seeds of floral dip infiltrated plants were sown on the pots. Then, seedlings were treated by BASTA herbicide. Expression of the Aspart insulin gene was detected in transgenic plants by RT-PCR and western blot. Evaluation of the infiltrated plants revealed that the EHA101 strain of Agrobacterium was more efficient than GV3101 strain in gene transformation.

Key Words

Agrobacterium, *Arabidopsis thaliana*, Aspart insulin, Transformation