مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۲، پاییز وزمستان ۱۴۰۰
صفحه ۲۳۶-۲۲۵

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8

DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بهینه‌سازی کدون و همسانه‌سازی ژن پروکیموزین گاوی برای بیان مناسب در گیاه توتون

Codon optimization and cloning of bovine prochymosin gene for proper expression in tobacco plant

شهنام عزیزی درگاهلو، محمد احمدآبادی*، رعنا ولی‌زاده کامران
Shahnam Azizi Dargahlou, Mohammad Ahmadabadi*, Rana Valizadeh Kamran

به ترتیب، دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email:
m.ahmadabadi@azaruniv.ac.ir؛ ahmadabadiir@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۹)

چکیده

آنزیم کیموزین گاوی یکی از آنزیم‌های رایج مورد استفاده در صنعت لبنیات می‌باشد. تهیه این آنزیم از منبع طبیعی آن جوابگوی نیاز این صنعت عظیم نمی‌باشد. تولید کیموزین گاوی نوترکیب در گیاهان می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تهیه این آنزیم باشد. درج و بیان ژن‌های خارجی در گیاهان می‌تواند در اندامک هسته و کلروپلاست انجام گیرد. میزان بیان ژن خارجی در میزبان‌های هترولوگ یوکاریوت را می‌توان با بهینه‌سازی کدون‌های آن و همچنین سوق دادن پروتئین هترولوگ بعد از بیان به اندامک‌های محصور شده از قبیل کلروپلاست افزایش داد. در این تحقیق، بهینه‌سازی کدون‌های ژن پروکیموزین گاوی طوری انجام گرفت که هم‌زمان برای بیان در هسته و کلروپلاست گیاه توتون مناسب باشد. پس از بهینه‌سازی، شاخص CAI این ژن برای اندامک هسته و کلروپلاست به ترتیب ۰/۹۲۹ و ۰/۹۴۷ بدست آمد. توالی بهینه شده این ژن پس از سنتز مصنوعی روی ناقل پایه pUC57 سوار شده، و از طریق توالی‌یابی تایید شد. عملکرد ژن سنتز شده از طریق بیان در باکتری *E. coli* و آزمایش لخته شدن شیر تایید گردید. برای تهیه ناقل بیانی مناسب برای انتقال ژن به ژنوم هسته گیاهان، ژن پروکیموزین در ناقل بیانی p35S-TP-GFP جایگزین ژن *GFP* گردید. این ناقل برای انتقال ژن به روش تفنگ ژنی مناسب بوده و با دارا بودن پپتید نشانه کلروپلاستی، باعث تجمع پروتئین در کلروپلاست می‌شود. همچنین، این ژن در ناقل pBI121، که برای انتقال ژن به روش آگروباکتریوم مناسب است، جایگزین ژن *GUS* شد. ناقل‌های نوترکیب ساخته شده در این تحقیق می‌توانند برای انتقال و بیان مؤثر این آنزیم صنعتی در گیاهان بکار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم لخته‌کننده شیر،
ترجیح کدونی،
کیموزین نوترکیب،
ناقل بیانی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Bovine chymosin enzyme is one of the most commonly used enzymes in the dairy industry. The production of this enzyme from its natural source does not meet the needs of this huge industry. The production of recombinant bovine chymosin in plants can be a good alternative to native enzyme. Insertion and expression of foreign genes in plants can occur in the nucleus and chloroplast organelles. The expression of foreign genes in eukaryotic heterologous hosts can be increased by optimizing its codons as well as translocation of the heterologous protein after expression to encapsulated organs such as chloroplasts. In this study, codons of the bovine prochymosin gene were optimized to be suitable for expression in the nucleus and chloroplasts of tobacco plants. After optimization, the CAI index of this gene for nucleus and chloroplasts was 0.929 and 0.947, respectively. The optimized sequence was cloned in the pUC57 basic vector after artificial synthesis, and was confirmed by sequencing. The function of the synthesized gene was confirmed by expression in *E. coli* and milk coagulation test. To provide a suitable expression vector for gene transfer to the plant genome, the GFP gene was replaced by the prochymosin gene in the p35S-TP-GFP expression vector. This vector is suitable for gene transfer by gene gun method, and with the presence of chloroplast signal peptide, it causes protein accumulation in chloroplasts. The gene was also replaced with the GUS gene in the pBI121 vector, which is suitable for gene transfer by the *Agrobacterium* method. The recombinant vectors constructed in this study can be used to effectively transfer and express this industrial enzyme in plants.

Keywords: Milk coagulation enzyme, Codon preference, Recombinant chymosin, Expression vector

مقدمه

آنزیم کیموزین یکی از پروتئین‌های انعقاد کننده شیر است که در صنعت لبنیات برای تولید پنیر استفاده می‌شود. این آنزیم که از هزاران سال پیش در پنیرسازی استفاده می‌شود، به نظر می‌رسد که قدیمی‌ترین کاربرد شناخته شده آنزیم‌ها باشد (Shah et al. 2014). کیموزین به‌صورت سنتی از معده چهارم گوساله شیرخوار استخراج می‌شود. با این حال، عوامل مختلفی از قبیل کمبود منابع و قیمت بالای این آنزیم، جستجو برای منابع جایگزین منعقد کننده شیر را اجتناب‌ناپذیر کرده است. در حال حاضر، رشد مداومی در استفاده از آنزیم‌های پروتئاز گیاهی در صنعت پنیر مشاهده می‌شود، زیرا به راحتی در دسترس هستند و فرآیندهای استخراج و تصفیه ساده‌ای دارند (Shah et al. 2014). این مورد، به‌ویژه در کشورهایی که آنزیم‌های حیوانی را به دلایلی از قبیل رژیم غذایی و مسائل مذهبی استفاده نمی‌کنند، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. با این‌حال، ماهیت پروتئولیتیکی بیش از حد منعقد کننده‌های گیاهی موجب بازده کمتر پنیر، طعم تلخ و نقص بافت شده، و بنابراین، استفاده از آنها را در تولید پنیر محدود کرده است. مهندسی ژنتیک ابزار قدرتمندی است که بیان پروتئین‌های نوترکیب از هر منبع ژنتیکی را در موجودات هدف امکان‌پذیر کرده است. این سیستم، امکان تولید کیموزین حیوانی را در گیاه به منظور حذف معایب نسخه گیاهی و استفاده از مزایای گیاهان، فراهم کرده است. در حال حاضر، آنزیم‌های نوترکیب تولید شده در موجودات مختلف، یکی از مهم‌ترین جایگزین‌ها برای برآورده کردن نیازهای آنزیم کیموزین در تولید پنیر هستند (Kumar et al. 2010). با توجه به اینکه کیموزین گاوی به دلیل دارا بودن فعالیت لخته‌کنندگی بیشتر، گزینه مناسب‌تری برای تولید پنیر می‌باشد (Mohanty et al. 1999)، تولید هترولوگوس آن از طریق مهندسی ژنتیک در رآکتورهای زیستی مختلفی از قبیل میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و سایر حیوانات مورد توجه قرار گرفته است (Wei Zheng-Yi et al. 2016). در مقایسه با سیستم‌های حیوانی، تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های گیاهی دارای مزایای متعددی از قبیل هزینه پایین و سادگی تولید در مقیاس وسیع می‌باشد (Fischer *et al.* 2004). در مقایسه با باکتری‌ها نیز، تغییرات

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

پس از ترجمه روی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سلول-های گیاهی، معمولا بطور صحیح اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، فولدینگ و مونتاژ پروتئین‌های چندواحدی از قبیل آنتی‌بادی‌ها، در سلول-های گیاهی امکان‌پذیر است (Sindarovska *et al.* 2010). گیاهان حاوی توکسین‌های باکتریایی و پاتوژن‌های انسانی از قبیل ویروس‌ها و پریون‌ها نیستند. ازاین‌رو، پروتئین‌های نوترکیب به‌دست‌آمده از گیاهان، از نظر ایمنی در رتبه بالاتری قرار دارند. در برخی موارد، پروتئین‌های خارجی تولید شده در گیاهان را می‌توان بدون خالص‌سازی و به‌صورت خوراکی مصرف کرد، که حذف مرحله‌ی خالص‌سازی باعث کاهش چشمگیر هزینه‌ی تولید می‌شود (Larrick and Thomas 2001). در میزبان‌های گیاهی، انتقال ژن خارجی می‌تواند به ژنوم هسته یا کلروپلاست انجام گیرد. با وجود این‌که کارایی انتقال ژن به کلروپلاست پایین بوده و تنها در تعداد معدودی از گیاهان بهینه شده است، با این-حال، درج ژن خارجی در کلروپلاست گیاهان به دلیل سطوح پلوئیدی بالا در این اندامک (Fathi Roudsari *et al.* 2009)، می-تواند تولید پروتئین نوترکیب را حتی به میزان بیش از ۷۰ درصد (Oey *et al.* 2009) کل پروتئین محلول افزایش دهد. همچنین، برخلاف ژنوم هسته، انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان تصادفی نبوده و درج ژن‌های خارجی در مکان‌های مشخص و از پیش تعیین شده انجام می‌گیرد، که دلیل آن وجود نوترکیبی همولوگی فعال در این اندامک است (Day and Goldschmidt-Clermont 2011; Kaushal *et al.* 2020; Siddiqui *et al.* 2020). با این حال، در صورت درج ژن هدف در ژنوم هسته، می‌توان محصول پروتئین را با استفاده از یک پپتید نشانه اختصاصی، به اندامک-هایی از قبیل کلروپلاست منتقل کرد. تجمع پروتئین هترولوگ در این اندامک‌ها هم می‌تواند پروتئین خارجی را از تأثیر پروتئازهای سیتوزولی محافظت کند، و هم سمیت پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاه میزبان را کاهش دهد (Tran *et al.* 2013). این عوامل در نهایت می‌توانند منجر به تولید بیشتر پروتئین هترولوگ شوند. گیاه توتون با دارا بودن مزایایی از قبیل زیست‌توده قابل-توجه و محتوای پروتئین محلول بالا، به‌عنوان یک گیاه مهم برای کشاورزی مولکولی محسوب می‌شود (Tremblay *et al.* 2010). همچنین، با توجه به وجود سیستم کارآمد انتقال و بیان ژن در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون، مقایسه بیان این ژن در دو اندامک این گیاه نیز امکان‌پذیر می‌باشد.

بهینه‌سازی کدون‌ها یکی دیگر از عوامل بسیار مهم و تاثیرگذار در افزایش بیان ژن‌های هترولوگ می‌باشد. انحراف کاربرد کدونی یا ترجیح کدونی که در آن هر موجود زنده، از بین کدون‌هایی که اسیدهای آمینه مشابهی را کد می‌کنند، معمولا یک کدون خاص را به سایر کدون‌های هم‌معنی ترجیح می‌دهد، با شدت‌های مختلف در تمامی گونه‌های موجودات زنده دیده می‌شود (Grantham *et al.* 1980). بنابراین، با تغییر کدون‌های یک ژن و منطبق کردن آن با کدون‌های رایج موجود میزبان می‌توان مقدار بیان پروتئین هترولوگ مورد نظر را افزایش داد.

در این تحقیق، به‌منظور بیان بیشتر، توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروکیموزین از آنزیم کیموزین گاوی با کدون‌های غالب ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون بهینه‌سازی گردیده، سپس در ناقل‌های بیانی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان با هر دو روش معمول شامل آگروباکتریوم و تفنگ ژنی همسانه‌سازی شد. آنزیم کیموزین گاوی یک زیموژن است که قبل از بلوغ کامل آنزیم، دارای قسمت‌های پری- و پرو-پپتید می‌باشد. قسمت پری یک پپتید نشانه است که در ترشح آنزیم به معده‌ی گوساله نقش داشته و قسمت پرو به جایگاه فعال آنزیم متصل شده و آن را غیرفعال نگه می‌دارد. زمانی‌که آنزیم در شرایط اسیدی قرار گیرد، ناحیه پرو-پپتید به‌صورت خودبخودی از آنزیم جدا شده و آنزیم فعال می‌شود (Kumar *et al.* 2010). با توجه به این نکته مهم، برای جلوگیری از فعال بودن آنزیم در داخل بافت‌های گیاهی که می-تواند باعث ایجاد سمیت شود، در این پژوهش، سنتز و همسانه-سازی فرم پروکیموزین ترجیح داده شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا توالی ژن پروکیموزین گاوی (*Bos taurus*) از سایت NCBI با شماره دسترسی EC3.4.23.4 تهیه شد. الگوهای ترجیح کدونی گیاه توتون برای اندامک هسته و کلروپلاست از سایت http://www.kazusa.or.jp/codon/ استخراج شدند (شکل ۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

***Nicotiana tabacum* [gbpln]: 1534 CDS's (609684 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: **per thousand**] ([number])

```
UUU F 0.58 25.1 ( 15282)  UCU S 0.26 20.0 ( 12211)  UAU Y 0.57 17.8 ( 10827)  UGU C 0.58  9.8 (  5969)
UUC F 0.42 18.0 ( 10986)  UCC S 0.13 10.2 (  6207)  UAC Y 0.43 13.5 (  8220)  UGC C 0.42  7.2 (  4375)
UUA L 0.15 13.4 (  8186)  UCA S 0.23 17.6 ( 10733)  UAA * 0.42  1.1 (   656)  UGA * 0.39  1.0 (   602)
UUG L 0.24 22.3 ( 13614)  UCG S 0.07  5.3 (  3232)  UAG * 0.19  0.5 (   303)  UGG W 1.00 12.2 (  7428)

CUU L 0.26 24.0 ( 14658)  CCU P 0.37 18.7 ( 11372)  CAU H 0.61 13.4 (  8169)  CGU R 0.15  7.5 (  4583)
CUC L 0.13 12.3 (  7524)  CCC P 0.13  6.6 (  3995)  CAC H 0.39  8.7 (  5328)  CGC R 0.08  3.9 (  2359)
CUA L 0.10  9.4 (  5754)  CCA P 0.40 19.8 ( 12101)  CAA Q 0.58 20.7 ( 12639)  CGA R 0.11  5.3 (  3213)
CUG L 0.11 10.2 (  6205)  CCG P 0.10  5.0 (  3028)  CAG Q 0.42 15.0 (  9149)  CGG R 0.08  3.7 (  2251)

AUU I 0.50 27.8 ( 16937)  ACU T 0.39 20.3 ( 12399)  AAU N 0.61 28.0 ( 17042)  AGU S 0.17 13.3 (  8094)
AUC I 0.25 13.9 (  8445)  ACC T 0.19  9.7 (  5901)  AAC N 0.39 17.9 ( 10916)  AGC S 0.13 10.0 (  6070)
AUA I 0.25 14.0 (  8509)  ACA T 0.34 17.4 ( 10634)  AAA K 0.49 32.6 ( 19851)  AGA R 0.33 16.0 (  9774)
AUG M 1.00 25.0 ( 15251)  ACG T 0.09  4.5 (  2761)  AAG K 0.51 33.5 ( 20430)  AGG R 0.25 12.2 (  7466)

GUU V 0.41 26.8 ( 16340)  GCU A 0.43 31.2 ( 19003)  GAU D 0.69 36.9 ( 22478)  GGU G 0.33 22.3 ( 13585)
GUC V 0.17 11.1 (  6742)  GCC A 0.17 12.5 (  7617)  GAC D 0.31 16.9 ( 10294)  GGC G 0.17 11.2 (  6856)
GUA V 0.17 11.4 (  6937)  GCA A 0.32 23.1 ( 14055)  GAA E 0.55 36.0 ( 21936)  GGA G 0.34 23.2 ( 14130)
GUG V 0.25 16.7 ( 10161)  GCG A 0.08  5.8 (  3546)  GAG E 0.45 29.4 ( 17945)  GGG G 0.16 10.5 (  6420)
```

Coding GC 43.38% 1st letter GC 50.91% 2nd letter GC 39.69% 3rd letter GC 39.53%
Genetic code 1: Standard

***chloroplast Nicotiana tabacum* [gbpln]: 137 CDS's (34756 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: **per thousand**] ([number])

```
UUU F 0.62 34.2 (  1189)  UCU S 0.28 22.1 (   768)  UAU Y 0.78 27.3 (   949)  UGU C 0.73  8.0 (   279)
UUC F 0.38 20.6 (   717)  UCC S 0.16 12.8 (   445)  UAC Y 0.22  7.7 (   266)  UGC C 0.27  3.0 (   105)
UUA L 0.30 31.0 (  1078)  UCA S 0.19 15.0 (   522)  UAA * 0.50  2.0 (    69)  UGA * 0.26  1.0 (    35)
UUG L 0.21 22.1 (   769)  UCG S 0.10  8.0 (   279)  UAG * 0.24  0.9 (    33)  UGG W 1.00 17.1 (   596)

CUU L 0.22 22.6 (   786)  CCU P 0.41 17.1 (   594)  CAU H 0.75 16.7 (   582)  CGU R 0.21 12.3 (   428)
CUC L 0.08  7.9 (   274)  CCC P 0.17  7.3 (   253)  CAC H 0.25  5.5 (   191)  CGC R 0.07  4.0 (   140)
CUA L 0.13 13.6 (   474)  CCA P 0.29 12.1 (   422)  CAA Q 0.74 26.0 (   903)  CGA R 0.24 14.3 (   498)
CUG L 0.07  7.4 (   257)  CCG P 0.13  5.6 (   195)  CAG Q 0.26  9.0 (   313)  CGG R 0.08  5.0 (   174)

AUU I 0.49 39.2 (  1363)  ACU T 0.39 20.0 (   694)  AAU N 0.74 36.5 (  1269)  AGU S 0.19 14.9 (   517)
AUC I 0.21 17.2 (   598)  ACC T 0.20 10.0 (   348)  AAC N 0.26 12.8 (   444)  AGC S 0.07  5.4 (   189)
AUA I 0.30 24.4 (   847)  ACA T 0.30 15.1 (   526)  AAA K 0.72 37.3 (  1298)  AGA R 0.29 17.5 (   608)
AUG M 1.00 24.5 (   851)  ACG T 0.11  5.4 (   189)  AAG K 0.28 14.5 (   504)  AGG R 0.11  6.8 (   237)

GUU V 0.35 20.1 (   700)  GCU A 0.45 25.9 (   900)  GAU D 0.79 31.5 (  1096)  GGU G 0.33 23.3 (   809)
GUC V 0.13  7.2 (   251)  GCC A 0.17  9.8 (   340)  GAC D 0.21  8.5 (   297)  GGC G 0.11  8.0 (   279)
GUA V 0.38 21.3 (   742)  GCA A 0.27 15.6 (   541)  GAA E 0.73 39.6 (  1375)  GGA G 0.38 27.1 (   943)
GUG V 0.14  8.1 (   283)  GCG A 0.10  5.8 (   202)  GAG E 0.27 14.6 (   509)  GGG G 0.17 12.2 (   424)
```

Coding GC 38.94% 1st letter GC 46.54% 2nd letter GC 38.78% 3rd letter GC 31.51%
Genetic code 1: Standard

شکل۱- الگوی ترجیح کدونی اندامک‌های هسته (بالا) و کلروپلاست (پایین) که برای بهینه‌سازی کدون‌های ژن پروکیموزین گاوی به‌منظور بیان مناسب آن در این اندامک‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تعویض کدون‌های ژن پروکیموزین طبیعی با توجه به فراوانی کدون‌های مربوط به هر اسید آمینه و با درنظرگیری ملاحظات هر دو اندامک به گونه‌ای انجام شد که در نهایت شاخص سازگاری کدون (CAI) برای هر دو اندامک نزدیک به یک باشد (جدول ۱). برای مثال، بیشترین فراوانی مربوط به کدون اسید آمینه فنیل آلانین (F) در هر دو اندامک کلروپلاست و هسته، کدون UUU می‌باشد، و بنابراین، در کل توالی ژن پروکیموزین مصنوعی، این کدون جایگزین کدون‌های طبیعی شد.

Fig. 1. Codon usage pattern of nuclear (upper) and chloroplast (lower) organelles used to optimize bovine prochymosin gene codons for proper expression in these organelles. Substitution of natural prochymosin gene codons was carried out according to the frequency of codons related to each amino acid and taking the considerations of both organelles into account so that finally the codon adaptation index (CAI) for both organelles would be close to one (Table 1). For example, the highest frequency of the phenylalanine (F) amino acid codon in both chloroplast and nucleus organelles is UUU, and therefore, in the entire synthetic prochymosin gene sequence, this codon replaced the natural codons.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

برای بهینه‌سازی و محاسبه‌ی شاخص سازگاری کدون (CAI) از ابزارهای آنلاین شامل GenSmart™ (https://www.genscript.com) و E-CAI (http://genomes.urv.cat/CAIcal/E-CAI/) (Puigbò *et al.* 2008) استفاده شد. توالی بهینه‌سازی شده پس از بررسی توالی اسید آمینه و تطبیق آن با توالی اسید آمینه پروتئین کیموزین طبیعی، برای سنتز مصنوعی از شرکت GenScript® (https://www.genscript.com) سفارش داده شد. پس از سنتز، ژن در ناقل پایه pUC57 قرار گرفت که این ناقل pUC57-CYM نام‌گذاری شد. برای اطمینان از توالی سنتز شده، این ناقل برای توالی‌یابی به دانشگاه لیل فرانسه ارسال شد. نتیجه نشان داد که توالی سنتزشده کاملا منطبق بر توالی ژن پروکیموزین بهینه‌سازی شده می‌باشد. ناقل تایید شده برای تهیه ناقل‌های بیانی مناسب برای گیاهان استفاده شد. از ناقل‌های p35S-TP-GFP (Chiu *et al.* 1996)، اهدایی پروفسور رالف بوک از موسسه ماکس پلانک) و pBI121 (Chen *et al.* 2003) برای تهیه ناقل‌های بیانی مناسب برای انتقال و بیان ژن در گیاهان استفاده شد. از نرم‌افزار GenomeCompiler (http://www.genomecompiler.com) برای *in silico cloning* و طراحی آغازگر استفاده شد. همچنین، در طراحی آغازگر از بخش Primer-Blast سایت NCBI هم استفاده گردید. در آزمایش‌های مربوطه، از آنزیم‌های برشی و لیگاز T_4 ساخت شرکت ترموفیشر استفاده شد.

از باکتری *E. coli* سویه‌ی *TOP10F'* برای تکثیر ناقل‌ها و آزمایش‌های همسانه‌سازی استفاده شد. برای گزینش ناقل‌های نوترکیب p35S-TP-CYM و pBI121-CYM به ترتیب از آنتی-بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد.

برای تکثیر DNAی مربوط به ژن کیموزین از جفت آغازگر اختصاصی CYM-F(SmaI/NdeI):5'-AAA CCC GGG CAT ATG GGA GAA GTA GCT TCT GTA C-3' و CYM-R(SacI/XbaI): 5'-AAA GAG CTC TCT AGA TTA AAT AGC TTT AGC TAA TCC TAC-3' که به ترتیب آغازگر روبه‌جلو و روبه‌عقب بودند، استفاده شد. برنامه PCR شامل یک مرحله ٤ دقیقه ای در دمای ۹۵ °C، ۳۰ چرخه، هر کدام شامل s ٤٥ در ۹۵ °C، s ٤٥ در ۵۵ °C و s ٤٥ در ۷۲ °C، و در پایان، یک مرحله ۱۰ دقیقه ای در دمای ۷۲ °C بود.

خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از کیت DNA Ambiclean (شرکت Vivantis–مالزی) و بر اساس پروتوکول توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام گردید. برای اتصال دو قطعه‌ی DNA (واکنش لیگاسیون)، مواد لازم برای ۱۵ میکرولیتر واکنش شامل ٤۰۰–۲۰۰ نانوگرم DNAی ناقل برش یافته با آنزیم‌های مورد نظر، DNAی الحاقی به نسبت ۱ تا ۳ برابر ناقل، ۱/۵ میکرولیتر بافر $10\times T_4$-DNA ligase و ۲ واحد آنزیم T_4-DNA ligase، در میکروتیوب ریخته شده و در دمای ۲۵°C به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند. پس از آن، نصف محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* منتقل شد. برای استخراج پلاسمید از کلونی‌های بدست آمده، از روش پیشنهاد شده توسط Birnboim و Doly استفاده شد (Birnboim and Doly 1979). غلظت اسیدهای نوکلئیک از طریق اندازه‌گیری چگالی نوری آن‌ها در طیف ۲٦۰ نانومتر و یا الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین گردید.

جهت بررسی طراحی صحیح ژن برای تولید پروتئین عملکردی، از بیان در باکتری *E. coli* سویه Rosetta استفاده شد. برای این منظور، ژن سنتز شده با استفاده از سایت‌های برشی *Sac*I و *Bam*HI در ناقل بیانی pET-28a (Rosenberg *et al.* 1987) همسانه‌سازی شد. باکتری‌های نوترکیب حاوی ناقل pET-28a روی محیط حاوی کانامایسین گزینش شدند. جهت القای بیان پروتئین، ۲۰۰ میکرومولار IPTG به محلول باکتری با ۰/۷–۰/٦ OD_{600}= اضافه شد. پس از ٤ ساعت، باکتری‌ها برداشت شده و رسوب آن‌ها در بافر PBS حل شد. سپس سلول‌ها در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه لیز شدند و بعد از ورتکس شدید، یک دور سانترفیوژ کوتاه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ انجام شد. برای حذف ناحیه پرو و فعال شدن پروتئین کیموزین، فاز رویی به مدت ۲ ساعت تحت تیمار اسیدی قرار گرفت. پس از این مرحله، pH عصاره باکتری دوباره با استفاده از هیدروکسید سدیم ٤ نرمال در محدوده ۷–٦ تنظیم شد. در نهایت، برای بررسی فعالیت بیولوژیکی آنزیم کیموزین، ٤۰۰ میکرولیتر شیرتازه، 55 میکرولیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره باکتری

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شده و نمونه‌ها در دمای °C ۳۵ و سرعت rpm ۷۰ نگهداری شدند.

نتایج و بحث

برای بهینه‌سازی کدون‌های ژن پروکیموزین گاوی، تمام کدون‌های مربوط به ۲۰ نوع اسید آمینه با کدون‌های رایج ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون بر اساس اطلاعات شکل ۱ تعویض شدند. در این تغییرات، ملاحظات هر دو اندامک در نظر گرفته شد تا توالی بهینه‌شده برای بیان در هر دو مناسب باشد. برای مثال، توالی‌های مشابه شاین دالگارنو (SD:AGGAGG) که در اندامک‌های پروکاریوتی برای اتصال ریبوزوم‌ها و شروع ترجمه کاربرد دارند، با کدون‌های رایج دیگر جایگزین شدند. وجود این نوع توالی‌ها در داخل ژن می‌تواند منجر به تولید نسخه‌های ناقص پروتئین از طریق اتصال ریبوزوم‌ها به این نواحی شود (Leith *et al.* 2019). همچنین، توالی‌های مزاحم احتمالی دیگر از قبیل نوکلئوتیدی‌های تکراری که می‌توانند باعث سرخوردن DNA پلی‌مراز و ایجاد جهش در این نواحی با گذشت زمان شوند (Castillo-Lizardo *et al.* 2014)، تا جای ممکن با کدون‌های مناسب دیگر جایگزین شدند. ژن‌های کلروپلاست به‌صورت هم‌زمان رونویسی و ترجمه می‌شوند (Zoschke and Bock 2018)، در صورتی‌که ژن‌های هسته در این اندامک رونویسی و در سیتوپلاسم ترجمه می‌شوند. این وقفه‌ی مکانی و زمانی در رونویسی و ترجمه می‌تواند باعث ایجاد ساختارهای ثانویه در mRNA شده و بیان آن را با مشکل مواجه کند. به همین دلیل، توالی‌ها به‌ویژه در ناحیه ´۵ ژن کیموزین (که محل اتصال ریبوزوم‌ها می‌باشد) از نظر ایجاد ساختارهای ثانویه با استفاده از ابزار طراحی پرایمر نرم‌افزار GenomeCompiler بررسی و توالی‌های مناسب با کمترین احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه استفاده شدند. در پایان، توالی بهینه‌سازی شده نهایی از نظر شاخص سازگاری کدون (CAI) ارزیابی شد که نتایج آن در جدول شماره ۱ آمده است (جدول ۱). همان‌طور که دیده می‌شود، مقدار CAI برای ژن پروکیموزین بهینه‌سازی شده در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست به‌طور قابل توجهی نسبت به ژن پروکیموزین گاوی طبیعی افزایش یافته است، که نشان‌دهنده کارایی بهینه‌سازی کدون می‌باشد.

شکل ۲- هم‌ترازسازی توالی نوکلئوتیدی رشته‌ی سنس ژن پروکیموزین گاوی طبیعی (Native) و ژن سنتز شده با کدون‌های بهینه‌شده (Codon-optimized) برای بیان مناسب در اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون. توالی‌های نشان‌دار شده با ستاره در دو توالی با هم مشابه هستند.

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment of the sense strand of the native bovine prochymosin gene and the synthesized gene with codon-optimized codons for proper expression in the nucleus and chloroplast organelles of the tobacco plant. The sequences marked with an asterisk are similar in both sequences.

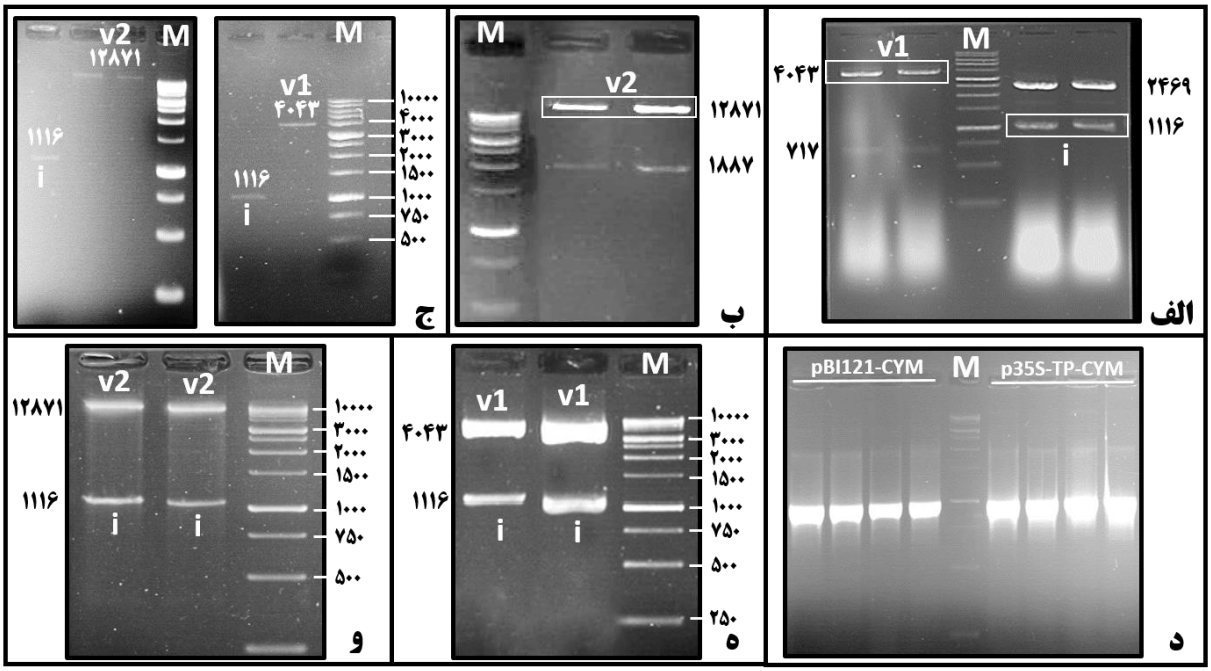
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

جدول ۱- شاخص CAI برای ژن پروکیموزین طبیعی و بهینه‌سازی شده نسبت به ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون. شاخص CAI برای ژن مصنوعی PlyGBS (Oey *et al.* 2009) که با موفقیت در کلروپلاست گیاه توتون بیان شده است، برای مقایسه آورده شده است.

Table 1. CAI index for natural and optimized prochymosin gene relative to the nucleus and chloroplast genome of tobacco plant. The CAI index for the synthetic PlyGBS gene (Oey et al. 2009), which has been successfully expressed in tobacco chloroplasts, is given for comparison.

توالی ژن	شاخص CAI نسبت به ژنوم هسته‌ی توتون	شاخص CAI نسبت به ژنوم کلروپلاست توتون
پروکیموزین گاوی طبیعی	۰/۶۲۸	۰/۴۷۷
پروکیموزین بهینه‌شده	۰/۹۲۹	۰/۹۴۷
ژن مصنوعی PlyGBS	۰/۹۲۹	۰/۹۳۹

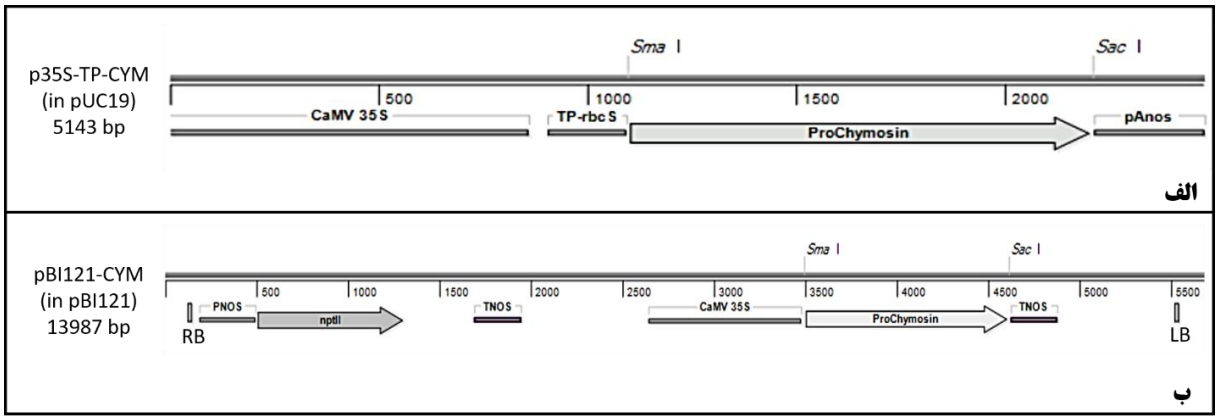
جهت تهیه ناقل بیانی مناسب برای انتقال ژن با استفاده از دو روش مرسوم در انتقال ژن به گیاهان شامل تفنگ ژنی و آگروباکتریوم، دو ناقل بیانی p35S-TP-GFP و pBI121 استفاده شدند. ابتدا هر دو ناقل با استفاده از دو آنزیم برشی *Sac*I و *Sma*I برش داده شدند. در p35S-TP-GFP این برش باعث جدا شدن قطعه ۷۱۷ جفت بازی مربوط به ژن GFP می‌شود (شکل ۳- الف).



شکل ۳- تصویر الکتروفورز مراحل مختلف همسانه‌سازی ژن پروکیموزین در ناقل‌های بیانی p35S-TP-GFP و pBI121. (الف) هضم آنزیمی pUC57-CYM (سمت راست مارکر) و p35S-TP-GFP (سمت چپ مارکر) با آنزیم‌های برشی *Sac*I و *Sma*I. باند مربوط به ژن پروکیموزین سنتزی با اندازه ۱۱۱۶ جفت‌باز (مشخص شده با حرف انگلیسی i) از سازه pUC57-CYM جدا و خالص‌سازی شد و برای جاسازی در ناقل بیانی استفاده شد. قطعه ۴۰۴۳ جفت‌بازی حاصل از هضم آنزیمی p35S-TP-GFP (v1) به عنوان یکی از ناقل‌های بیانی برای همسانه‌سازی پروکیموزین خالص‌سازی شده استفاده شد. (ب) الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pBI121 با آنزیم‌های برشی *Sac*I و *Sma*I. قطعه ۱۲۸۷۱ جفت‌بازی حاصل از هضم آنزیمی pBI121 (v2) به عنوان ناقل بیانی مناسب انتقال ژن با روش آگروباکتریوم، برای همسانه‌سازی پروکیموزین خالص‌سازی شده استفاده شد. (ج) تصویر الکتروفورز قطعات خالص‌سازی شده حاصل از قسمت (الف) و (ب) برای ارزیابی کمیت و کیفیت آن‌ها جهت استفاده در واکنش لیگاسیون. (د) تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن پروکیموزین در تعدادی از کلونی‌های حاصل از انتقال محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli*. وجود باند اختصاصی ژن پروکیموزین در تمام کلونی‌ها، نوترکیب بودن آن‌ها را تایید می‌کند. (ه-و) تصویر الکتروفورز هضم آنزیمی ناقل‌های نوترکیب p35S-TP-CYM (ه) و pBI121-CYM (و) با آنزیم‌های برشی *Sac*I و *Sma*I. بازیابی قطعات استفاده شده در واکنش لیگاسیون برای هر دو ناقل نوترکیب، درستی ناقل‌های نوترکیب را تایید می‌کند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

Fig. 3. Electrophoresis image of different stages of prochymosin gene cloning in p35S-TP-GFP and pBI121 expression vectors. (A) Enzymatic digestion of pUC57-CYM (right marker) and p35S-TP-GFP (left marker) with *Sac*I and *Sma*I restriction enzymes. The 1116 bp synthetic prochymosin gene band (identified by the letter i) was isolated from the pUC57-CYM construct and used for insertion into the expression vector. A 4035 bp fragment derived from enzymatic digestion of the p35S-TP-GFP (v1) was used as one of the expression vectors for cloning of purified prochymosin. (B) Electrophoresis of the digestive product of pBI121 vector with *Sac*I and *Sma*I enzymes. The 12871 bp fragment resulting from enzymatic digestion of pBI121 (v2), as a suitable expression vector for gene transfer by *Agrobacterium* method, was used for cloning of purified prochymosin. (C) Electrophoresis image of the purified components from (a) and (b) to evaluate their quantity and quality for use in the ligation reaction. (D) Electrophoresis of the PCR product resulting from the amplification of the prochymosin gene in a number of colonies resulting from the transfer of the ligation product to *E. coli*. The presence of a specific prochymosin gene band in all colonies confirms their recombination. (E-f) Image of electrophoresis of enzymatic digestion of recombinant vectors p35S-TP-CYM (e) and pBI121-CYM (f) with restriction enzymes *Sac*I and *Sma*I. The recovery of components used in the ligation reaction for both recombinant vectors confirms the accuracy of the recombinant vectors.



شکل ٤- نقشه فیزیکی ناقل‌های بیانی p35S-TP-CYM (الف) و pBI121-CYM (ب). در ساختار ناقل p35S-TP-CYM ژن گزینشگر تعبیه نشده است. این ناقل برای انتقال ژن به روش تفنگ ژنی مناسب است، به‌طوری‌که با استفاده از ناقل دوم حاوی ژن گزینشگر و انتقال توام دو ناقل، حذف ژن گزینشگر پس از باززایی گیاهان تراریخت با استفاده از تفکیک ژن‌های گزینشگر و کیموزین در نسل بعدی امکان‌پذیر است. در ناقل pBI121-CYM کاست‌های بیانی ژن گزینشگر و ژن کیموزین در داخل T-DNA که با دو توالی حاشیه راست (RB) و چپ (LB) مشخص شده است، قرار دارد.

Fig. 4. Physical map of the expression vectors p35S-TP-CYM (a) and pBI121-CYM (b). The selectable marker gene is not embedded in the p35S-TP-CYM vector structure. This vector is suitable for gene transfer by biolistic gun method, so that by using the second vector containing the selectable marker gene and the simultaneous transfer of two vectors, the marker can be eliminated after regeneration of transgenic plants using the segregation of the selectable marker and chymosin genes in the next generation. In the pBI121-CYM vector, the expression cassettes of the selectable marker gene and the chymosin gene are located inside the T-DNA, which is characterized by two sequences of right (RB) and left (LB) boarders.

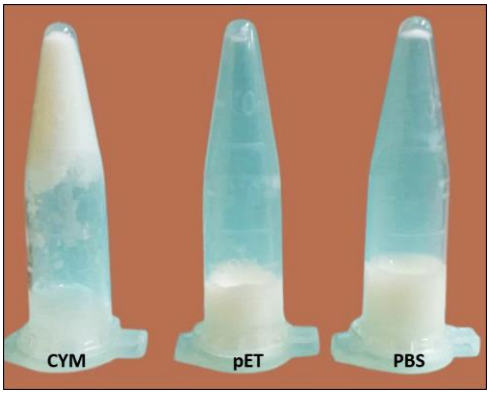
در ناقل pBI121 نیز قطعه ۱۸۸۷ جفت بازی مربوط به ژن GUS با این برش جدا می‌شود (شکل ۳-ب). قطعات باقیمانده از دو ناقل به ترتیب با اندازه ٤٠٤٣ (v1) و ۱۲۸۷۱ (v2) برای جاسازی قطعه ۱۱۱٦ جفت‌بازی مربوط به پروکیموزین مصنوعی (i) که از ناقل pUC57-CYM با هضم آنزیمی بوسیله *Sac*I و *Sma*I ایجاد شده بود (شکل ۳-الف و ب)، استفاده شدند. پس از خالص-سازی، کمیت و کیفیت این قطعات روی ژل آگارز ارزیابی شده (شکل ۳-ج) و واکنش لیگاسیون انجام گرفت. پس از انتقال محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* و گزینش کلونی‌ها روی محیط گزینشی، تعدادی از کلونی‌ها با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن کیموزین مصنوعی تایید شدند (شکل ۳-د). تایید نهایی دو مورد از هر ناقل نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های *Sac*I و *Sma*I انجام گرفت (شکل ۳-ه-و).

تصویر فیزیکی ناقل‌های نوترکیب تهیه شده در شکل ٤ نمایش داده شده است. همچنان‌که در تصویر دیده می‌شود، در ناقل بیانی p35S-TP-CYM، ژن مصنوعی پروکیموزین تحت کنترل راه‌انداز قوی 35S ویروس موزائیک گل کلم قرار دارد (شکل ٤-الف). این ناقل برای انتقال ژن کیموزین به گیاهان از طریق تفنگ ژنی مناسب است. ناقل pBI121-CYM (شکل ٤-ب) هم با دارا بودن کاست‌های بیانی ژن گزینشگر و ژن کیموزین در داخل T-DNA، مناسب انتقال ژن به روش آگروباکتریوم می‌باشد.

به منظور تایید صحیح بودن چارچوب و عملکرد ژن کیموزین سنتز شده، انتقال و بیان آن در باکتری *E. coli* بررسی شد. نتایج

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

نشان داد که، بـر خـلاف کنتـرل، عصـاره‌ی بـاکتری حامـل ناقـل نوترکیب حاوی ژن پروکیموزین باعث لخته شدن شـیر مـی‌شـود (شکل ۵). این نتایج عملکردی بودن ژن سنتز شده را تایید کرد.



شکل۵- نتایج حاصل از آزمایش لخته شدن شیر تازه با عصاره بـاکتری حـاوی ناقل pET-28a-bCYM (CYM). عصاره باکتری حـاوی ناقـل خـالی pET-28a (pET) و بافر (PBS) به‌عنوان کنترل استفاده شد.

Fig. 5. Results of fresh milk coagulation test using bacterial extract harboring pET-28a-bCYM recombinant vector (CYM). Extract of bacteria having empty pET-28a (pET) vector and buffer (PBS) were used as control.

پروتئازهای آسپارتیک دسته‌ای از پروتئازها با فعالیت بهینه در محیط‌های اسیدی هستند که کاربردهای گسترده‌ای در صنعت غذا دارند (Wang *et al.* 2021). کیموزین یکی از آنزیم‌های مهم این گروه در صنعت پنیرسازی است که نقش تعیین‌کننده در طعم و بافت محصول دارد. هر اندازه که آنزیم مورد استفاده فعالیت لخته‌کنندگی بیشتری نسبت به فعالیت پروتئولیتیک داشته باشد، ترجیح داده می‌شود، چراکه فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر منجر به ضعیف شدن طعم و بافت پنیر می‌شود. کیموزین گاوی به دلیل اینکه فعالیت لخته‌کنندگی بیشتری در مقایسه با فعالیت پروتئولیتیکی دارد، گزینه‌ی مناسبی برای تولید پنیر می‌باشد (Mohanty *et al.* 1999; Wei Zheng-Yi *et al.* 2016)، و به همین دلیل، به‌صورت گسترده استفاده شده و اغلب برای تولید هترولوگوس در سایر رآکتورهای زیستی از قبیل میکروارگانیسم-ها، گیاهان و سایر حیوانات استفاده می‌شود (Wei Zheng-Yi *et al.* 2016). در یک پژوهش، نسخه طبیعی پری‌پروکیموزین گاوی تحت کنترل راه‌انداز 35S ویروس موزاییک گل کلم به ژنوم هسته تنباکو منتقل شد. نتایج این تحقیق نشان داد که کیموزین نوترکیب با موفقیت در گیاه توتون بیان شده، و فعالیت لخته‌کنندگی مشابهی با کیموزین گاوی دارد (Wei Zheng-Yi *et al.* 2016). در مطالعه دیگر، بیان کیموزین طبیعی بز با توانایی لخته کردن شیر، با موفقیت در بذر ذرت گزارش شده است (Liu *et al.* 2017). این نتایج نشان می‌دهند که گیاهان گزینه مناسبی برای تولید کیموزین نوترکیب فعال می‌باشند. در این پژوهش، با توجه به این ویژگی‌ها، ژن کیموزین گاوی برای همسانه‌سازی و تهیه ناقل‌های بیانی مناسب انتقال و بیان در گیاهان انتخاب شد.

از روش‌هایی که می‌تواند بیان پروتئین خـارجی در موجـودات را افزایش دهد، بهینه‌سازی کدون‌های ژن هترولـوگ بـا کـدون‌هـای رایج در میزبان است (Fu *et al.* 2020; Lewis *et al.* 2020). نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد که انحراف کاربرد کدونی یا ترجیح کدونی در موجودات مختلف با سطح بیان ژن در ارتباط می‌باشـد (Gouy and Gautier 1982; Duret and Mouchiroud 1999; Espinoza-Molina *et al.* 2016). در نتیجـه، انحـراف کـدونی به‌عنوان یک پارامتر مهم برای افزایش بیان پروتئین‌هـای نوترکیـب در میزبان‌های بیانی هترولوگ پیشنهاد شده است (Gustafsson *et al.* 2004). علت انحراف کاربرد کدونی در موجودات، بیشـتر بـه انتخاب طبیعی، جهش و رانـش ژنتیکـی نسـبت داده شـده اسـت (Hershberg and Petrov 2008). در این تحقیق، کـدون‌هـای ژن پروکیموزین گاوی به نحوی بهینه‌سازی شد که قابلیت بیان بالا در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست گیـاه توتـون را داشـته باشـد. میزان شـاخص CAI بـرای ایـن دو انـدامک بـه ترتیـب ۰/۹۲۹ و ۰/۹٤۷ بدست آمد که یک مقدار مناسب برای بیـان کارآمـد مـی-باشد. برآورد این شاخص رایج‌ترین روش برای بررسـی انحـراف کاربرد کدونی است (Sharp and Li 1987). مقدار شـاخص CAI بین صفر و یک بوده و هر اندازه این مقدار به عـدد یـک نزدیـک باشد، نمایانگر بیان بالای آن پروتئین در میزبان هترولوگ خواهـد بـود (Sharp and Li 1987). از آنجـائی کـه کـدون‌هـای ژن پروکیموزین گاوی برای بیان مناسب در هـر دو انـدامک هسـته و کلروپلاست گیاه توتون بهینه‌سازی شد، احتمال مـی‌رود بیـان آن در سایر گیاهان (به‌ویژه در اندامک کلروپلاست) به‌مراتب بیشتر از ژن کیموزین گاوی طبیعی باشد. یکی از پروتئین‌های هترولوگ که تا به امروز بیشترین بیان (بیش از ۷۰ درصد کل پروتئین محلـول)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

را در کلروپلاست گیاه توتون نشان داده است، ژن مصنوعی PlyGBS می‌باشد (Oey *et al.* 2009). این ژن برای بیان مناسب در ژنوم پلاستید گیاهان عالی که غنی از AT است (Shimda and Sugiuro 1991)، بهینه‌سازی شده بود. شاخص CAI محاسبه شده برای ژن کیموزین مصنوعی در این پژوهش، با مقدار CAI ژن مصنوعی PlyGBS قابل مقایسه بود (جدول ۱)، که نشان‌دهنده مناسب بودن آن برای بیان در ژنوم گیاه توتون می‌باشد. در یک پژوهش، بهینه‌سازی کدون ژن کیموزین گاوی باعث افزایش سطح بیان پروتئین نوترکیب در *Kluyveromyces lactis* گردید (Feng *et al.* 2010). در گزارشی دیگر، بهینه‌سازی کدون ژن کیموزین گاوی اثر قابل توجهی در افزایش بیان آن در *Pichia pastoris* نشان داد (Espinoza-Molina *et al.* 2016). بنابراین، می توان گفت که بهینه‌سازی کدون یک استراتژی مناسب برای بهبود سطح بیان ژن کیموزین نوترکیب در موجودات هدف است.

پس از سنتز مصنوعی و تایید توالی، ژن پروکیموزین گاوی در ناقل‌های بیانی p35S-TP-GFP و pBI121 با توالی ژن‌های گزارشگر جایگزین شد. ناقل‌های نوترکیب به ترتیب p35S-TP-CYM و pBI121-CYM نام‌گذاری شدند. در ناقل p35S-TP-CYM پپتید نشانه زیرواحد کوچک روبیسکو از گیاه توتون انتقال پروتئین کیموزین به اندامک کلروپلاست را هدایت خواهد کرد. مطالعات مختلفی نشان داده که این عمل به کمک انتقال‌دهنده‌های خاصی از قبیل پروتئین‌های Hsp70، Hsp90، FKBP و کمپلکس‌های TOC و TIC که به ترتیب در غشاهای بیرونی و داخلی کلروپلاست قرار دارند، انجام می‌شود (Jarvis 2008; Flores-Pérez and Jarvis 2013)، و می‌تواند علاوه بر محافظت پروتئین هترولوگ از پروتئازهای سیتوپلاسمی، از سمیت آن برای میزبان هترولوگ نیز کاسته، و در نهایت منجر به تولید بیشتر پروتئین هترولوگ شود (Kim *et al.* 2010). پپتید نشانه TP که از زیرواحد کوچک روبیسکو در ژنوم توتون گرفته شده، در انتهای آمین به توالی ژن پروکیموزین چسبیده است که هدایت پروتئین حاصل به اندامک کلروپلاست را کنترل می‌کند. این ناقل برای انتقال ژن به گیاهان با روش تفنگ ژنی مناسب است (Chiu *et al.* 1996). در انتقال ژن از طریق تفنگ ژنی امکان انتقال هم‌زمان دو ناقل وجود دارد. بنابراین، ناقل بیانی بدست آمده می‌تواند هم‌زمان با یک ناقل حاوی ژن گزینشگر مناسب، برای انتقال پایدار ژن کیموزین استفاده شود. مزیت این روش این است که انتقال ژن‌های هدف و گزینشگر به ژنوم گیاه بصورت مستقل و به احتمال زیاد در نواحی متفاوت از ژنوم میزبان صورت می‌گیرد. این روش انتقال می‌تواند در حذف ژن گزینشگر پس از گزینش گیاهان تراریخت از طریق تفرق نتاج استفاده شود (Puchta 2000).

ناقل pBI121 در موارد متعدد برای انتقال ژن خارجی به ژنوم گیاهان مختلف استفاده شده است (Kasuga *et al.* 1999; Yamamoto *et al.* 2005; Wei Qiuhui *et al.* 2017; Sun *et al.* 2020). برای این منظور، به‌طور معمول ژن موردنظر جایگزین ژن گزارشگر GUS می‌شود. در ناقل بیانی pBI121-CYM نیز ژن کیموزین مصنوعی تحت کنترل راه‌انداز قوی 35S به همراه کاست ژن گزینشگر *nptII* که در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی از قبیل کانامایسین، نئومایسن و پرومایسین ایجاد مقاومت می‌کند، در ناحیه T-DND قرار دارد. این ناقل برای انتقال ژن کیموزین مصنوعی به گیاهان با روش آگروباکتریوم مناسب است.

همچنان‌که اشاره شد، بهینه‌سازی کدون به ترتیبی انجام شد که در مطالعات بعدی بتوان ژن کیموزین را در ناقل‌های بیانی کلروپلاستی برای انتقال و بیان پروتئین در پلاستید استفاده کرد. تولید پروتئین نوترکیب در کلروپلاست مزایایی مختلفی از قبیل بیان بسیار بالای پروتئین هترولوگ دارد (Adem *et al.* 2017)، که از موارد اساسی و تعیین‌کننده در تولید آنزیم‌های صنعتی در گیاهان است. در یک مورد، تولید بالای ۷۰ درصد کل پروتئین محلول در کلروپلاست گیاه توتون هم دیده شده هست (Oey *et al.* 2009)، که این اندامک را به یک بیوراکتور وسوسه‌انگیز برای تولید آنزیم‌های صنعتی و واکسن‌ها تبدیل کرده است.

در آزمایش بررسی بیان ژن سنتز شده در باکتری *E. coli*، اگرچه، مدت زمان لازم برای لخته شدن شیر نسبتا طولانی بود (حدود ٤٠ دقیقه)، با این حال، نتایج این آزمایش، صحیح بودن ساختار و عملکرد ژن را تایید کرد. کند بودن فرآیند لخته شدن شیر با غلظت آنزیم کیموزین رابطه مستقیم دارد (Panthi *et al.* 2019). بنابراین، احتمال می‌رود میزان آنزیم تولید شده در باکتری پایین باشد. این نتیجه با میزان CAI ژن سنتز شده نسبت به ژنوم باکتری

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

E. coli که ۰/۶۲ محاسبه شد، هم‌خوانی دارد، که خود نشان‌دهنده اهمیت بهینه‌سازی کدون‌ها در افزایش بیان ژن می‌باشد.

به‌طورکلی، در این پژوهش، ژن پروکیموزین مصنوعی با کدون بهینه‌سازی‌شده سنتز و پس از تایید توالی، در دو ناقل بیانی گیاهی مناسب شامل pBI121 و p35S-TP-GFP جایگزین ژن گزارشگر شد. شاخص سازگاری کدون برای ژنوم هسته توتون ۰/۹۲۹ و برای ژنوم پلاستید توتون ۰/۹۴۷ محاسبه گردید. بنابراین، ژن کیموزین سنتز شده برای بیان در ژنوم هسته و کلروپلاست توتون مناسب است. با توجه به قرار گرفتن تعدادی از گیاهان خوراکی از قبیل گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی در تیره سولاناسه، کدون‌های بهینه‌شده احتمالا برای بیان در این گیاهان نیز مناسب باشد. شاخص CAI ژن مصنوعی برای توالی‌های ثبت شده ژنوم هسته این گیاهان به ترتیب ۰/۸۳۹ و ۰/۸۸۳ محاسبه شد، درحالی‌که این مقادیر برای ژن کیموزین طبیعی به ترتیب ۰/۵۸۷ و ۰/۵۳۳ بدست آمد. به‌علاوه، با توجه به شباهت بسیار زیاد ژنوم‌های کلروپلاستی گیاهان مختلف، ژن مصنوعی طراحی شده، می‌تواند برای انتقال و بیان در اندامک کلروپلاست گیاهان مختلف استفاده شود. برای تایید این موضوع شاخص CAI ژن پروکیموزین مصنوعی نسبت به ژنوم کلروپلاست تعدادی از گیاهان شامل گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، ذرت و گندم نان محاسبه شد که به ترتیب ۰/۹۴۹، ۰/۹۵۰، ۰/۹۴۴ و ۰/۹۴۳ بدست آمد. بطور کلی می‌توان گفت نتایج این پژوهش، مهمترین ابزار لازم برای تولید پروتئین کیموزین نوترکیب را در هسته و کلروپلاست تعدادی از گیاهان مهم را فراهم نموده است. با توجه به تایید بیان و عملکرد ژن سنتز شده در باکتری *E. coli* علی‌رغم مناسب نبودن کدون برای این میزبان، انتقال و بیان این ژن در گیاهان می‌تواند امکان تولید آنزیم کیموزین در گیاهان را به عنوان یک بیوراکتور سالم و کم‌هزینه فراهم کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و ستاد زیست‌فناوری تشکر و قدردانی می‌نمایند. قسمتی از حمایت مالی این پژوهش از طریق ستاد زیست‌فناوری (شماره ۰۰/۱۰۹۱۰) تامین شده است. همچنین، از زحمات آقای دکتر پژوهنده در انجام آزمایشات توالی‌یابی در دانشگاه لیل فرانسه قدردانی می‌شود

منابع

Adem M, Beyene D, Feyissa T. 2017. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. Plant Methods 13:30.

Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523.

Castillo-Lizardo M, Henneke G, Viguera E. 2014. Replication slippage of the thermophilic DNA polymerases B and D from the Euryarchaeota *Pyrococcus abyssi*. Frontiers in microbiology 5:403.

Chen P-Y, Wang C-K, Soong S-C, To K-Y. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding 11:287-293.

Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. Curr Biol 6:325-330.

Day A, Goldschmidt-Clermont M. 2011. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. Plant biotechnology journal 9:540-553.

Duret L, Mouchiroud D. 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in Caenorhabditis, Drosophila, and Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 96:4482-4487.

Espinoza-Molina JA, Acosta-Muniz CH, Sepulveda DR, Zamudio-Flores PB, Rios-Velasco C. 2016. Codon Optimization of the "Bos Taurus Chymosin" Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol 58:657-664.

Fathi Roudsari M, Salmanian AH, Mousavi A, Hashemi Sohi H, Jafari M. 2009. Regeneration of glyphosate-tolerant *Nicotiana tabacum* after plastid transformation with a mutated variant of bacterial aroA gene. Iranian Journal of Biotechnology 7:247-253.

Feng Z, Zhang L, Han X, Zhang Y. 2010. Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:895-901.

Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. Current opinion in plant biology 7:152-158.

Flores-Pérez Ú, Jarvis P. 2013. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1833:332-340.

Fu H, Liang Y, Zhong X, Pan Z, Huang L, Zhang H, Xu Y, Zhou W, Liu Z. 2020. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression. Scientific reports 10:1-9.

Gouy M, Gautier C. 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. Nucleic Acids Res 10:7055-7074.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]

Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pave A. 1980. Codon catalog usage and the genome hypothesis. Nucleic acids research 8:197-197.

Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. Trends Biotechnol 22:346-353.

Hershberg R, Petrov DA. 2008. Selection on codon bias. Annu Rev Genet 42:287-299.

Jarvis P. 2008. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. New phytologist 179:257-285.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature biotechnology 17:287-291.

Kaushal C, Abdin MZ, Kumar S. 2020. Chloroplast genome transformation of medicinal plant Artemisia annua. Plant biotechnology journal 18:2155-2157.

Kim S, Lee D-S, Choi IS, Ahn S-J, Kim Y-H, Bae H-J. 2010. *Arabidopsis thaliana* Rubisco small subunit transit peptide increases the accumulation of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel5A in chloroplasts of transgenic tobacco plants. Transgenic Research 19:489-497.

Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish V. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. Critical Reviews in Biotechnology 30:243-258.

Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. Current opinion in biotechnology 12:411-418.

Leith EM, O'Dell WB, Ke N, McClung C, Berkmen M, Bergonzo C, Brinson RG, Kelman Z. 2019. Characterization of the internal translation initiation region in monoclonal antibodies expressed in *Escherichia coli*. J Biol Chem 294:18046-18056.

Lewis CJ, Dixit B, Batiuk E, Hall CJ, O'Connor MS, Boominathan A. 2020. Codon optimization is an essential parameter for the efficient allotopic expression of mtDNA genes. Redox biology 30:101429.

Liu W-G, Wang Y-P, Zhang Z-J, Wang M, Lv Q-X, Liu H-W, Meng L-C, Lu M. 2017. Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. Protein expression and purification 135:78-82.

Mohanty A, Mukhopadhyay U, Grover S, Batish V. 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. Biotechnology Advances 17:205-217.

Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. 2009. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. The plant journal 57:436-445.

Panthi RR, Kelly AL, Sheehan JJ, Bulbul K, Vollmer AH, McMahon DJ. 2019. Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. J Dairy Sci 102:177-189.

Puchta H. 2000. Removing selectable marker genes: taking the shortcut. Trends in plant Science 5:273-274.

Puigbò P, Bravo IG, Garcia-Vallvé S. 2008. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). BMC Bioinformatics 9:65.

Rosenberg AH, Lade BN, Dao-shan C, Lin S-W, Dunn JJ, Studier FW. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56:125-135.

Shah MA, Mir SA, Paray MA. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. Dairy Science & Technology 94:5-16.

Sharp PM, Li W-H. 1987. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic acids research 15:1281-1295.

Shimda H, Sugiuro M. 1991. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. Nucleic acids research 19:983-995.

Siddiqui A, Wei Z, Boehm M, Ahmad N. 2020. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. Biotechnology and applied biochemistry 67:30-40.

Sindarovska Y, Gerasymenko I, Sheludko Y, Olevinskaya Z, Spivak N, Kuchuk N. 2010. Production of human interferon ALPHA 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by Agrobacterium-mediated transient expression. Cytology and genetics 44:313-316.

Sun B, Zhu Z, Liu R, Wang L, Dai F, Cao F, Liu S. 2020. TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) regulates leaf trichome density in tea *Camellia sinensis*. Nordic Journal of Botany 38.

Tran M, Henry RE, Siefker D, Van C, Newkirk G, Kim J, Bui J, Mayfield SP. 2013. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. Biotechnology and bioengineering 110:2826-2835.

Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S. 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. Biotechnol Adv 28:214-221.

Wang S, Zhang P, Xue Y, Yan Q, Li X, Jiang Z. 2021. Characterization of a novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Aspergillus niger* and its application in production of ACE-inhibitory peptides. Foods 10:2949.

Wei Q, Zhang F, Sun F, Luo Q, Wang R, Hu R, Chen M, Chang J, Yang G, He G. 2017. A wheat MYB transcriptional repressor TaMyb1D regulates phenylpropanoid metabolism and enhances tolerance to drought and oxidative stresses in transgenic tobacco plants. Plant Science 265:112-123.

Wei Z-Y, Zhang Y-Y, Wang Y-P, Fan M-X, Zhong X-F, Xu N, Lin F, Xing S-C. 2016. Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. International journal of molecular sciences 17:624.

Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T. 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. Journal of Experimental Botany 56:1785-1796.

Zoschke R, Bock R. 2018. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. The Plant Cell 30:745-770.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.6.8]