

## بیان پروانسولین انسانی در گیاه با استفاده از ناقل pVUT (Plasmid Viral University of Tehran)

مهناز خیراللهی<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر شاه نجات بوشهری<sup>۲</sup>، دکتر مجید خیراللهی<sup>۳</sup>،  
فریبا ابوئی مهریزی<sup>۴</sup>، دکتر هوشنگ علیزاده<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** انسولین هورمون پروتئینی است که توسط سلول‌های بتای پانکراس ترشح می‌شود. به علت معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در میکروارگانسیم‌ها، هزینه به نسبت بالا، امکان آلودگی با پروتئین‌های سمی و مراحل هزینه‌بر خالص‌سازی، تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان امری قابل بررسی است. توسعه سیستم بیان گذرا بر پایه‌ی نوع حذف شده‌ی RNA-2 ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی (CPMV-HT) یا (Cowpea Mosaic Virus-Hyper Translatable)، امکان تولید سریع و سطوح بالای پروتئین‌ها را بدون استفاده از همانندسازی ویروسی فراهم کرده است.

**روش‌ها:** در این مطالعه، سازه‌های pBI121-Proinsulin-Zera (pBI-ProZ) در بر دارنده‌ی توالی ژن پروانسولین انسانی و Zera (دومین انتهایی N غنی از پرولین گاما- زئین ذرت) و pCAMBIA1304-Proinsulin-Extensin (pCAMBIA-ProE) در بر دارنده‌ی سیستم بیانی CPMV-HT، به منظور بهبود ترجمه‌ی ژن پروانسولین انسانی و توالی سیگنال پپتید اکستنسین هویج ساخته شد. این دو سازه، به واسطه‌ی باکتری *Agrobacterium tumefaciens* pv. C58، به صورت بیان گذرا به گیاهان کاهو و یونجه انتقال داده شدند. تحلیل آماری این پژوهش بر پایه‌ی آزمایش فاکتوریل، در قالب طرح به‌کلی تصادفی بر روی غلظت پروانسولین تولیدی در هر گرم برگ تراریخت صورت گرفت. بیان ژن پروانسولین در بافت گیاهی تراریخت در سطح رونویسی، با استفاده از واکنش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) و در سطح ترجمه، با استفاده از آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای و Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) مورد تأیید قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان پروانسولین فعال تولیدی با سازه‌های pCAMBIA-ProE و pBI-ProZ در برگ‌های یونجه تراریخت، به ترتیب ۶/۸۲ و ۴/۳۲ نانوگرم در هر گرم برگ تر و در برگ‌های کاهوی تراریخت، به ترتیب ۶/۶ و ۳/۸ نانوگرم در هر گرم برگ تر بود.

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، میزان بیان پروتئین پروانسولین در سازه‌ی pCAMBIA-ProE در بر دارنده‌ی خصوصیات سیستم بیانی CPMV-HT، بیشتر از سازه‌ی pBI-ProZ بود.

**واژگان کلیدی:** ژن پروانسولین انسانی، بیان گذرا، سیستم بیانی Cow Pea Mosaic Virus-Hyper Translatable (CPMV-HT)، بافت گیاهی تراریخت

**ارجاع:** خیراللهی مهناز، شاه نجات بوشهری علی اکبر، خیراللهی مجید، ابوئی مهریزی فریبا، علیزاده هوشنگ. بیان پروانسولین انسانی در گیاه با استفاده از ناقل pVUT (Plasmid Viral University of Tehran). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۷): ۳۴۶-۳۴۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Email: halizade@ut.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر هوشنگ علیزاده

## مقدمه

انسولین، هورمونی پروتئینی است که توسط سلول‌های بتای پانکراس ترشح می‌شود و در کنترل بیماری دیابت بسیار حائز اهمیت می‌باشد. انسولین، پپتیدی با ۵۱ آمینواسید و دارای وزن مولکولی ۵/۸ کیلودالتون است که از پیش‌ماده‌ی خود، یعنی پروانسولین، مشتق می‌شود. پروانسولین به صورت یک پپتید ۱۱۰ آمینواسیدی در پانکراس تولید می‌شود که شامل یک توالی راهنما با ۲۴ و مولکول پروانسولین با ۸۶ آمینواسید است. مولکول پروانسولین شامل زنجیره‌ی B با ۳۰، زنجیره‌ی C با ۳۴ و زنجیره‌ی A با ۲۱ آمینواسید است. در طول سنتز انسولین در پانکراس، زنجیره‌ی C توسط فعالیت پروهورمون کانورتازهای ۲ و ۳ به ترتیب در اتصال‌های بین زنجیره‌های B/C و A/C شکسته می‌شود و انسولین با ۵۱ آمینواسید از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی بین زنجیره‌های A و B شکل می‌گیرد (۱).

گیاهان، از نظر اقتصاد و سلامت محصول تولیدی، در مقایسه با سیستم‌های تولید باکتریایی، مخمر و سلول‌های حیوانی، دارای مزایای زیادی نظیر تولید در مقیاس وسیع، توانایی تولید پروتئین‌های پیچیده و فعال از نظر بیولوژیک و عدم حضور پاتوژن‌های حیوانی آلوده‌کننده هستند (۲). همچنین، بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان به ۱۰-۲ درصد از هزینه‌ی سیستم‌های میکروبی نیاز دارد (۳).

بیان گذرا، روشی رایج جهت ارزیابی ظرفیت سلول‌های گیاهی در تولید یک پروتئین خاص یا سنجش سازه‌های بیانی مختلف است که با استفاده از آگرواینفیلتریشن انجام می‌شود. در این روش، به جای الحاق و وارد کردن ژن به داخل ژنوم گیاه، ژن

خارجی به داخل هسته‌ی گیاه تحویل داده می‌شود و در آن جا، به سرعت به تولید موقت پروتئین هدف هدایت می‌گردد. این روش دارای مزایایی شامل سطوح بسیار بالای تجمع، به همراه تولید سریع‌تر پروتئین است (۴). به طور کلی، بیان موقت محدود به بافتی می‌شود که با سوسپانسیون آگروباکتریوم نفوذپذیر شده است و به ناچار، تعداد بافت‌های موجود را محدود و در نتیجه بر روی حداکثر سطوح بیان پروتئین تأثیر می‌گذارد (۵-۶).

یک راه دستیابی به حداکثر سطوح بیان پروتئین شامل استفاده از ناقل‌های ویروسی بر پایه‌ی همانندسازی مانند ویروس دوبخشی موزائیک لوبیا چشم بلبلی است؛ این سیستم‌ها دارای معایبی نظیر محدودیت اندازه و طبیعت توالی‌های ورودی، تجمع موتاسیون‌ها در داخل توالی مورد نظر و مشکلات آلودگی زیستی هستند (۷، ۵).

به عنوان یک روش جایگزین، استفاده از سیستم‌های بیانی قابل همانندسازی، به تازگی سیستم بیان گذرا بر پایه‌ی نوع حذف شده‌ی RNA-2 ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی (CPMV-HT یا Cow Pea Mosaic Virus- Hyper Translatable) توسعه پیدا کرده است که امکان تولید سریع و سطوح بالای پروتئین‌ها را بدون استفاده از همانندسازی ویروسی فراهم می‌کند. در این سیستم، با قرار دادن ژن مورد نظر بین ناحیه‌ی 5'UTR تغییر یافته و 3'UTR از ژنوم RNA-2 ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی، بیان تقویت و mRNA، به علت وجود سرکوبگر خاموشی P19 از ویروس کوتولگی انبوه گوجه فرنگی، پایدار می‌شود. در واقع، مشخص شده است که حذف کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ (از

همچنین، از ناقل pVUT در بر دارنده‌ی نواحی 5'UTR تغییر یافته و 3'UTR ژنوم RNA-2 ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی به عنوان ناقل حد واسط جهت الحاق ژن پروانسولین بین نواحی مورد نظر و از ناقل‌های pCAMBIA 1304 و pBI121 به عنوان ناقل‌های دو گانه‌ی حاوی ژن *GUS* (ژن گزارشگر)، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (ژن نشانگر) و راه‌انداز ویروسی 35SCaMV استفاده شد.

### آغازگرها

آغازگرهای پیشرو و برگشتی بر اساس توالی ژن پروانسولین موجود در ناقل pGH-X2759E به گونه‌ای طراحی شد که حاوی مکان آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI به منظور تسهیل کلون کردن ژن در ناقل‌های هدف باشد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها به صورت زیر بود:

5'CTGGGATCCTTTGTACATCAACATT  
TGTGTGG 3' Forward Primer  
5'GGTACCCCTCGAGACGTTGAATTTT  
AATCCAAAATTG3' Reverse Primer

### انتقال سازه‌ها به آگروباکتریوم

سازه‌های به دست آمده پس از تأیید توالی، به روش ذوب و انجماد به باکتری *A. tumefaciens* سویه‌ی C58 انتقال یافت و بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۲۵ µg/ml و ریفامپسین با غلظت ۱۰۰ µg/ml رشد داده شد.

### انتقال گذرای سازه‌ها به گیاهان کاهو و یونجه

کلونی‌های آگروباکتریوم حاوی سازه‌های ساخته شده در ۱۵ میلی‌لیتر محیط YEB حاوی ۱۰۰ µg/ml کانامایسین و ۲۵ µg/ml ریفامپسین به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد کرد.

طریق جایگزینی باز C به جای باز U در موقعیت ۱۶۲)، بالادست سایت اصلی شروع ترجمه در موقعیت ۵۱۲، باعث تقویت سطوح ترجمه‌ی ژن وارد شده در مقایسه با 5'UTR تغییر نیافته می‌شود (۸).

هدف از این تحقیق، تولید پروتئین پروانسولین در گیاه با استفاده از ناقل pVUT (Plasmid Viral University of Tehran) بود که در بر دارنده‌ی خصوصیات سیستم بیانی CPMV-HT بود و در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشگاه تهران آماده شد.

### روش‌ها

برگ‌های یونجه (رقم بمی) و کاهو پس از شست و شو با آب مقطر، به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد و سپس، برای آگرواینفیلتریشن مورد استفاده قرار گرفت. در کلیه‌ی مراحل این پژوهش، برای کشت باکتری‌های *Escherichia coli* (E. coli) و *Agrobacterium tumefaciens* (A. tumefaciens) از محیط کشت Lysogeny Broth (LB)، و برای انتقال آگروباکتریوم به داخل گیاه از محیط کشت Yeast Extract Broth (YEB) و از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ریفامپسین و آمپی‌سیلین به عنوان انتخابگر استفاده شد.

### باکتری‌ها و ناقل‌های مورد استفاده

در این تحقیق از باکتری‌های *E. coli* سویه‌ی DH5α به عنوان میزبان برای مراحل مختلف هم‌سازگی و از باکتری *A. tumefaciens* سویه‌ی C58 به عنوان ناقل ژن به گیاه استفاده شد. ناقل pTG19-T شرکت ویوانتیس برای سهولت هم‌سازگی ژن پروانسولین انسانی در سایر ناقل‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس دستورالعمل abCAM و با استفاده از کیت Monobind Inc. و آزمون ELISA، جهت بررسی میزان بیان پروتئین پروانسولین در برگ‌های تراریخت، با استفاده از کیت Monobind Inc. انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری این پژوهش بر پایه‌ی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی غلظت پروانسولین تولیدی در هر گرم برگ کاهو و یونجه‌ی تراریخت با دو سازه‌ی ساخته شده صورت گرفت. تجزیه‌ی واریانس با استفاده از برنامه‌ی SAS نسخه‌ی ۹.۲ (SAS Institute, Cary, North Carolina) و مقایسه‌ی میانگین‌های اثر متقابل گیاه و ناقل با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای Duncan و برنامه‌ی MSTATC (Michigan State University, East Lansing, MI) انجام شد.

### یافته‌ها

ژن پروانسولین انسانی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و واکنش PCR از روی ناقل pGH-X2759E در بر دارنده‌ی ژن پروانسولین انسانی به وسیله‌ی آنزیم Pfu تکثیر و در ناقل pTG19 کلون شد. سپس، با استفاده از آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱-الف).

ناقل‌های pVUT و pBI121-GUS نیز با دو آنزیم مذکور برش داده شد و قطعه‌ی ۳۳۷ جفت بازی پروانسولین به دو ناقل برش یافته الحاق گردید. در ادامه، ناقل حد واسط pVUT-ProE و ناقل pCAMBIA1304 با استفاده از آنزیم‌های BcuI و BstEII برش داده شد (شکل ۱-ب) و قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی در بر دارنده‌ی ژن پروانسولین

سپس، ۲ میلی لیتر از محیط کشت آگروباکتریوم در ۲۰۰ میلی لیتر محیط YEB حاوی  $25 \mu\text{g/ml}$  ریفامپسین و  $200 \mu\text{g/ml}$  کانامایسین و ۲۰۰ میکرولیتر استوسیرینگون  $0/02$  مولار رقیق‌سازی شد و به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط نگهداری شد تا به  $OD = 2$  (Optical density) در طول موج ۶۰۰ نانومتر برسد. پس از گذشت یک روز، ۲ میلی لیتر استوسیرینگون  $0/02$  مولار به همراه ۱۱ گرم شکر به محیط اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در همان شرایط رشد ادامه یافت. محیط به دست آمده، از طریق آگرواینفیلتریشن تحت شرایط خلأ و فشار ۲۵ میلی بار به گیاهان کاهو و یونجه انتقال یافت و سپس، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط رطوبت بالا نگهداری شد.

### آنالیز گیاهان تراریخت در سطح رونویسی

استخراج RNA از برگ‌های تراریخت و ساخت cDNA به ترتیب با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت TOPAZ GENE و کیت فرمتاز انجام شد. سپس، به منظور بررسی بیان ژن پروانسولین در برگ‌های تراریخت، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین، آزمون Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) صورت گرفت.

### استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از برگ‌های تراریخت با استفاده از بافر فسفات  $0/1$  مولار انجام شد.

### لکه‌گذاری نقطه‌ای و آزمون Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای، به منظور نشان دادن حضور پروتئین پروانسولین در بافت‌های تراریخت،

آب مقطر و در دیگری از cDNA گیاه شاهد استفاده شده بود، هیچ گونه بانندی مشاهده نشد (شکل ۳).

### تجزیه و تحلیل بافت‌های تراریخت در سطح پروتئین با استفاده از آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای و

#### ELISA

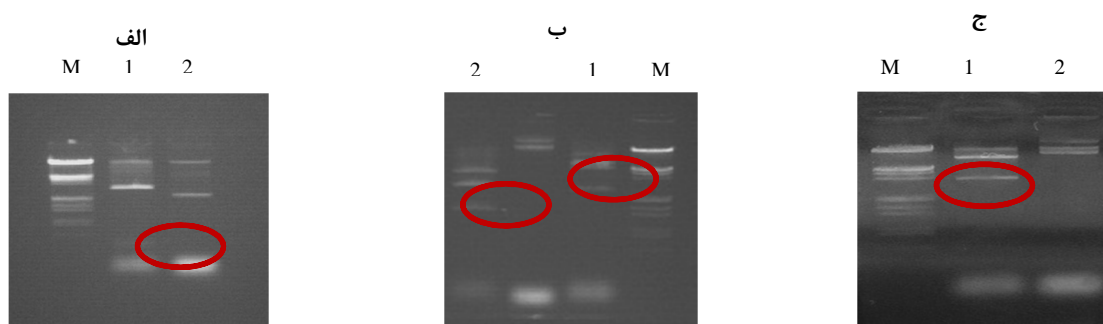
با استفاده از آنتی‌بادی، انسولین موجود در کیت تشخیصی Monobind و به روش لکه‌گذاری نقطه‌ای، حضور یا عدم حضور پروتئین پروانسولین در پروتئین‌های استخراج شده از برگ گیاهان تراریخت با سازه‌ی pCAMBIA ProE مورد سنجش قرار گرفت. با افزودن سوبسترای آنزیم، تغییر رنگ از بی‌رنگ به رنگ آبی تنها در عصاره‌های دارای پروتئین پروانسولین مشاهده شد؛ در حالی که، در گیاهان شاهد هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۴).

حاصل از هضم سازه‌ی pVUT-ProE در ناقل pCAMBIA1304 قرار گرفت. با استفاده از آنزیم SacI، کلون‌های به دست آمده مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱-ج).

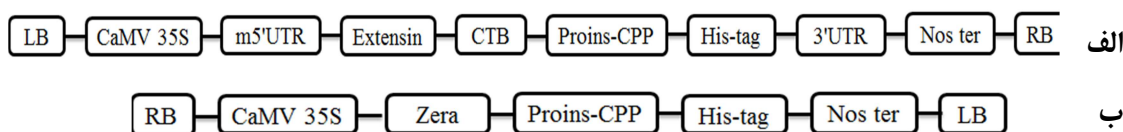
ساختار نهایی T-DNA سازه‌های pCAMBIA-ProE و pBI-ProZ ساخته شده در این تحقیق، در شکل ۲ نشان داده شده است. در نهایت، دو سازه جهت تأیید بیشتر از طریق شرکت پیشگام توالی‌یابی و سپس، به باکتری *A. tumefaciens* انتقال یافت.

### بررسی گیاهان تراریخت در سطح RNA با استفاده از روش RT-PCR

نتیجه‌ی RT-PCR وجود RNA ۳۳۷ جفت بازی را در بافت‌های تراریخت نشان داد؛ در حالی که، در کنترل‌های منفی که در یکی از آن‌ها به جای الگو از



شکل ۱. مراحل ساخت سازه‌های pBI-ProZ و pCAMBIA-ProE در این تحقیق؛ الف: ستون ۱، برش ناقل pTG19 با آنزیم‌های BamHI و XhoI جهت تأیید حضور قطعه‌ی ۳۳۷ جفت بازی پروانسولین (ناقل pTPro) و ستون ۲، پلاسمید برش نخورده، ب: برش ناقل pCAMBIA1304 و pVUT-ProE با استفاده از آنزیم‌های BstEII و BcuI. ستون ۱ جدا شدن ژن GUS به طول ۲۵۰۰ جفت باز از ناقل pCAMBIA1304 و ستون ۲، جدا شدن قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی در بر دارنده‌ی ژن پروانسولین از ناقل pVUT-ProE. ج: برش ناقل pCAMBIA-ProE با آنزیم SacI به منظور تأیید حضور سازه‌ی حد واسط pVUT. ستون ۱ جدا شدن قطعه‌ی حدود ۳۰۰۰ جفت بازی در بر دارنده ژن پروانسولین و ستون ۲، پلاسمید برش نخورده، M، نشانگر Lambda DNA/EcoRI+HindIII

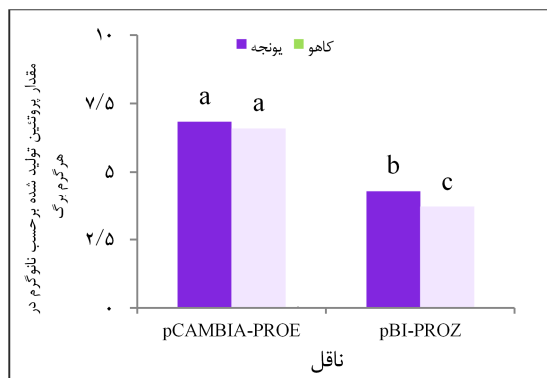


شکل ۲. طرح شماتیک از سازه‌های ساخته شده. الف- سازه‌ی pCAMBIA-ProE و ب- سازه‌ی pBI-ProZ

## نتیجه‌ی تجزیه و تحلیل آماری مقادیر پروانسولین

### تولید شده در گیاهان تراریخت

مقادیر پروانسولین تولید شده در کاهو و یونجه‌های تراریخت شده با دو سازه، با استفاده از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس تجزیه‌ی واریانس، اثر ناقل، گیاه و اثر متقابل ناقل در گیاه در سطح ۱ درصد معنی دار شد که با توجه به معنی دار بودن اثر متقابل ناقل در گیاه، اثرات ساده‌ی ناقل و گیاه قابل استناد نبود. بنابراین، میانگین‌های به دست آمده از اثر متقابل ناقل در گیاه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای Duncan در سطح ۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفت (نمودار ۱). با توجه به نمودار به دست آمده، میزان بیان پروتئین در ناقل pCAMBIA-ProE بیشتر از ناقل pBI-ProZ برای هر دو گیاه بود. از سوی دیگر، میزان بیان در گیاه کاهو کمتر از گیاه یونجه بود که این تفاوت در میزان بیان، در مورد ناقل pCAMBIA-ProE به لحاظ آماری معنی دار نبود.

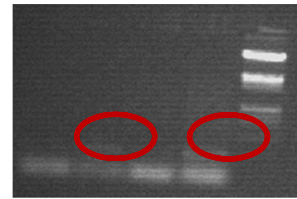


نمودار ۱. مقایسه‌ی میانگین‌های اثر متقابل ناقل در گیاه با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای Duncan در سطح ۱ درصد

## بحث

طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، میزان بیان

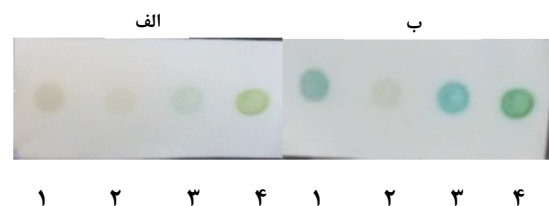
1 2 3 4 M



شکل ۳. واکنش Reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR) مربوط به گیاهان تراریخت کاهو و یونجه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن پروانسولین. ستون ۱ کنترل منفی (آب)، ستون ۲ و ۴، قطعه ۳۳۷ جفت بازی محصول RT-PCR گیاهان تراریخت و ستون ۳، چاهک مربوط به گیاه شاهد، M، نشانگر Lambda DNA/EcoRI+HindIII

همچنین، نتیجه‌ی آزمون ELISA، حضور پروتئین پروانسولین انسانی را در برگ‌های یونجه و کاهو آگرواینفیلتره شده با دو سازه‌ی ساخته شده‌ی pCAMBIA-ProE و pBI-ProZ نشان داد. بر اساس معادله‌ی منحنی کالیبراسیون استاندارد کیت Monobind، متوسط مقدار پروتئین پروانسولین انسانی نو ترکیب در گیاهان یونجه و کاهوی تراریخت شده با سازه‌ی pBI-ProZ به ترتیب ۴/۳۲ و ۳/۸ و با سازه‌ی pCAMBIA-ProE به ترتیب ۶/۸۲ و ۶/۶ نانوگرم به ازای یک گرم برگ برآورد شد.



شکل ۴. نتایج حاصل از لکه‌گذاری نقطه‌ای پروتئین استخراج شده

از برگ‌های آگرواینفیلتره شده با استفاده از سازه‌ی pCAMBIA-ProE بر روی کاغذ نیتروسولوزی؛ به ترتیب، اعداد از ۱ تا ۴ عبارتند از کاهوی تراریخت، کاهوی شاهد، یونجه‌ی تراریخت و یونجه‌ی شاهد.

الف: لکه‌های پروتئینی قبل از تیمار با آنتی‌بادی و سوبسترا و

ب: لکه‌های پروتئینی بعد از تیمار با آنتی‌بادی و سوبسترا

AUG در موقعیت ۱۱۵ اتفاق می‌افتد و یک کنارگذاری کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ به طور قابل توجهی امکان ترجمه‌ی کارآمد را از کدون AUG در موقعیت ۵۱۲ به دنبال شروع ترجمه مجدد فراهم می‌کند. این فرضیه از مشاهداتی به دست آمده است که نشان می‌دهد، کاهش بیان از کدون AUG در موقعیت ۵۱۲، زمانی که کدون AUG در موقعیت ۱۱۵ حذف و کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ باقی بماند، اتفاق می‌افتد. بنا بر این، به نظر می‌رسد که حذف کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ و به دنبال آن، حذف ممانعت از ترجمه به علت وجود این کدون شروع، باعث ترجمه‌ی آزاد می‌شود (۸).

در این پژوهش، در سازه‌ی سنتزی pVUT، توالی کزاک (ACCAUGG) در مجاورت کدون AUG در موقعیت ۵۱۲ به منظور جذب بیشتر ریبوزوم‌ها و بالا بردن کارایی ترجمه طراحی و درج شد. به نظر می‌رسد، عدم بیان بسیار بالای سازه‌ی pCAMBIA-ProE دارای ناحیه 5'UTR تغییر یافته، به علت وجود این توالی در کنار کدون AUG در موقعیت ۵۱۲ باشد که نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری دارد. نوع برگ نیز می‌تواند در میزان تولید پروتئین و پروسه‌های پایین دست تأثیرگذار باشد.

سبزیجات برگی، مانند یونجه و کاهو، گزینه‌های مناسبی برای کشاورزی مولکولی هستند. یونجه دارای مهم‌ترین مزیت استفاده از نیتروژن اتمسفری است، عملکرد زیست توده‌ی خشک بالایی در هکتار دارد و تا ۹ بار در سال می‌توان آن را برداشت کرد. از گیاه یونجه، به منظور تولید محصولات مختلفی نظیر آنتی‌بادی مونوکلونال تشخیصی استفاده شده است (۹). کاهو نیز به عنوان یک میزبان تولیدی برای

پروتئین پروانسولین در سازه‌ی pCAMBIA-ProE بیشتر از سازه‌ی pBI-ProZ بود؛ اما، مقدار پروتئین تولید شده با استفاده از سیستم CPMV-HT بسیار کمتر از مقادیر گزارش شده توسط Sainsbury و همکاران (۸) بود. در مطالعاتی که Sainsbury و همکاران بر روی ناحیه‌ی 5'UTR ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی انجام دادند، مشاهده شد که تغییر کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ بالادست سایت اصلی شروع ترجمه در موقعیت ۵۱۲، باعث تقویت سطوح ترجمه ژن وارد شده در مقایسه با 5'UTR تغییر نیافته می‌شود. سؤالی که در این جا مطرح می‌شود، این است که چرا حذف کدون AUG در موقعیت ۱۶۱، بیان را از کدون شروع AUG در موقعیت ۵۱۲ تقویت می‌کند؟

اگر چه، در RNA-2 نوع وحشی ویروس CPMV، ترجمه از کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ شروع می‌شود، افزایش شدید بیان در نتیجه‌ی حذف کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ پیشنهاد می‌کند که حضور کدون AUG در موقعیت ۱۶۱، بازدارنده‌ی کل ترجمه است. مکانیسم ممکن برای توضیح این موضوع آن است که بسیاری از ریبوزوم‌هایی که ترجمه را از کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ شروع نمی‌کنند، نمی‌توانند به کدون AUG در موقعیت ۵۱۲ پایین دست رهسپار شوند. این موضوع یک عملکرد ممکن را برای چارچوب قرائت باز کوتاه (ORF یا Open reading frame) پیشنهاد می‌کند، که از AUG در موقعیت ۱۱۵ شروع می‌شود و با کدون AUG در موقعیت ۱۶۱ هم‌پوشانی دارد و این کدون شروع را کنار می‌گذارد (۸).

مشخص شده است که شروع ترجمه از کدون

گیاه کاهو به علت عملکرد پایین این گیاه در تولید پروتئین را می‌توان با افزایش میزان برگ‌ها مدیریت کرد (۴).

### تشکر و قدردانی

از کلیه کارکنان و مسئولان محترم آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، که در طی انجام این پژوهش همکاری نمودند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

واکسن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب خوراکی در سری آزمایشات کلینیکی برای واکسن علیه ویروس هپاتیت B (۱۰) و تولید انسولین فعال و عملکردی جهت تحویل دهانی (۱) به کار رفته است.

یکی از مهم‌ترین معایب سبزیجات برگی این است که پروتئین‌های نوترکیب در محیط‌های آبی ساخته می‌شوند و اغلب ناپایدار هستند که در نتیجه، باعث کاهش تولید پروتئین نوترکیب می‌شود (۲). میزان بسیار کم پروتئین پروانسولین تولید شده در

### References

1. Boyhan D, Daniell H. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnol J* 2011; 9(5): 585-98.
2. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7(2): 152-8.
3. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 2003; 21(12): 570-8.
4. Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med* 2013; 1(1).
5. Canizares MC, Nicholson L, Lomonosoff GP. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(3): 263-70.
6. Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonosoff GP. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* 2009; 7(7): 682-93.
7. Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 2000; 9(4-5): 279-99.
8. Sainsbury F, Lomonosoff GP. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* 2008; 148(3): 1212-8.
9. Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, et al. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* 1999; 64(2): 135-43.
10. Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 1999; 13(13): 1796-9.



## Plant Expression of Human Proinsulin Using the Plasmid Viral University of Tehran (pVUT) Vector

Mahnaz Kheirollahi<sup>1</sup>, Ali Akbar Shahnejat-Bushehri PhD<sup>2</sup>, Majid Kheirollahi PhD<sup>3</sup>,  
Fariba Abooei-Mehrizi MSc<sup>4</sup>, Hooshang Alizadeh PhD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Insulin is a hormone exclusively produced by pancreatic beta cells. The production of recombinant proteins in microorganisms has some disadvantages such as high cost, the possibility of contamination with toxic proteins, and costly purification steps; so, the production of recombinant proteins in plants can be investigated. Development of transient expression system based on a deleted version of Cowpea mosaic virus RNA-2, Cowpea Mosaic Virus-Hyper Translatable (CPMV-HT), has provided the extremely high-level and rapid production of proteins without viral replication.

**Methods:** In this study, two constructions were prepared; pBI121-Proinsulin-Zera (pBI-ProZ) containing human proinsulin gene and Zera (N-terminal proline-rich domain of  $\gamma$ -zein) and pCAMBIA1304-Proinsulin-Extensin (pCAMBIA-ProE) containing CPMV-HT expression system for improvement of translation of human proinsulin gene and carrot extensin signal peptide. Both structures were transiently transferred in to lettuce and alfalfa leaves using *Agrobacterium tumefaciens* pv. C58. Statistical analysis of this study was conducted on the concentration of produced proinsulin per each gram of transgenic leaf using factorial arrangement of treatment in a complete randomized design. Gene expression was confirmed in transcription level using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method and in translation level using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Dot blot assay.

**Findings:** Protein accumulation for pCAMBIA-ProE and pBI-ProZ constructs were 6.82 and 4.32 ng/g in recombinant alfalfa leaves and 6.6 and 3.8 ng/g in recombinant lettuce leaves, respectively.

**Conclusion:** Results showed that the expression of proinsulin in pCAMBIA-ProE contains CPMV-HT expression system was more than pBI-ProZ.

**Keywords:** Human proinsulin gene, Transient expression, Cowpea Mosaic Virus-Hyper Translatable (CPMV-HT) expression system, Transgenic plant tissue

**Citation:** Kheirollahi M, Shahnejat-Bushehri AA, Kheirollahi M, Abooei-Mehrizim F, Alizadeh H. **Plant Expression of Human Proinsulin Using the Plasmid Viral University of Tehran (pVUT) Vector.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(327): 346-54

1- MSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

**Corresponding Author:** Hooshang Alizadeh PhD, Email: halizade@ut.ac.ir