فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی
شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۱۵ تا ۲۵

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

حمیده افقی[۱]، فاطمه قربانی پارسا[۱و۲]
۱- سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی Ofoghi@irost.org
۲- دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت:۹۱/۸/۱ تاریخ پذیرش:۹۱/۸/۳۰

چکیده

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

واژه های کلیدی: زراعت مولکولی، کلسی تونین انسانی، پروموتر Patatin، سیب زمینی تراریخته(Solanum tuberosum) .

مقدمه

امروزه سیستم های مختلف برمبنای کشت سلولی و یا استفاده از موجودات تراریخته جهت تولید پروتئین های نوترکیب ارزشمند ابداع شده است. از جمله باکتری ها، قارچ‌ها، سلول‌های حیوانی و گیاهی و همچنین استفاده از حیوانات کامل، گیاهان و حشرات که هر یک از این سیستم های تولید از مزایا و محدودیت های خاص خود برخوردارند. در باکتری ها که رایج‌ترین سیستم تولید پروتئین نوترکیب هستند بایستی به عدم تغییرات پس از ترجمه و خطر آلودگی با اندوتوکسین توجه کرد(۶). از سوی دیگر در سلول های جانوری یا حیوانات تراریخته نیز محدودیت هایی چون دشواری مراحل کشت با احتمال آلودگی زیاد و نیازمندی به مواد و تجهیزات گران بها وجود دارد و با مسائل اخلاقی و قانونی مواجه می‌باشند. همچنین احتمال آلودگی با توالی های سرطان زا نیز وجود دارد(۱۰). پیشرفت های بیوتکنولوژی، گیاهان را قادر ساخته که به عنوان بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌ها، چربی ها و کربوهیدرات‌ها بکار گرفته شوند و مبحث جدیدی تحت عنوان زراعت مولکولی (Molecular Farming) مطرح شده است(۱۰). گیاهان به سادگی و با روش های طبیعی تراریخته می‌شوند و مسیر ساخت پروتئین و تغییرات پس از ترجمه در آن‌ها مشابه سلول‌های جانوری است، محدودیتی در اندازه ژن دخولی نداشته و راهکارهای متنوعی مثل استفاده از پپتیدهای نشانه و پروموترهای مختص ارگان یا ارگانل برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب در آن ها وجود دارد (۱۷،۶). روش های متنوعی برای ادغام ژن های

خارجی در قسمت های مختلف گیاه وجود دارد. این ژن‌های خارجی از منابع مختلف باکتریایی، قارچ ها، حیوانات و سایر گیاهان هستند روش رایج برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی، انتقال توسط Agrobacterium tumefaciens است که سبب کاهش موانع موجود در مهندسی ژنتیک گیاهی شده است. تاکنون ژن‌های مختلفی از جمله ژن هورمون رشد، انسولین و پروتئین های ویروسی و باکتریایی با این شیوه به گیاهان منتقل شده اند(۴). هورمون کلسی تونین انسانی نیز پپتیدی ۳۲ اسیدآمینه‌ای و غیر گلیکوزیله است که نقش اساسی در متابولیسم کلسیم- فسفر داشته و به عنوان هورمون درگیر در ترمیم استخوان شناخته می‌شود. مشتقات کلسی تونین برای درمان پوکی استخوان، بیماری پاژه وغیره کاربرد دارویی دارد (۱۷). تاکنون تلاش‌های گسترده ای برای تولید این هورمون دارویی اعم از نوع انسانی یا حیوانی آن به صورت نوترکیب در میزبان های مختلف باکتریایی، حشرات و گیاه انجام شده است (۳، ۹). در بین گیاهان مورد توجه در عرصه بیوتکنولوژی سیب زمینی به دلیل داشتن مزایایی همچون قابلیت گیاه به عنوان یکی از میزبان های باکتری آگروباکتریوم جهت انتقال ژن و بازده مطلوب آن، سهولت تکثیر و باززایی (Regeneration) از کشت بافت، قابلیت تکثیر غیرجنسی، دوره زمانی کوتاه تا تولید محصول، تولید بیوماس زیاد، وجود پروموترهای مختلف جهت بیان ژن در قسمت های مختلف گیاه، قابلیت نگه داری و انبارکردن این محصول و استفاده از غده‌های خام به صورت مستقیم و خوراکی در صورت تولید واکسن اهمیت دارد(۱، ۱۳). در این پژوهش تلاش شد تا با بهینه سازی کدون های ژن دخولی میزان بیان در میزبان گیاهی افزایش یابد و بعلاوه از پروموتر مختص اندام استفاده شد که امکان تجمع پروتئین نوترکیب تولیدی در اندامی خاص را فراهم می کند و به این ترتیب استخراج پروتئین تسهیل و مزیت هایی نیز در رابطه با ایمنی زیستی و جلوگیری از بیان همه جایی و تداخل احتمالی با رشد نرمال گیاه فراهم گردد (۹،۱۰).

مواد و روش ها

گیاه مورد پژوهش

سیب زمینی *(Solanum tuberosum)* رقم های کاردال و مارفونا بود.این گیاه تتراپلوئید و تعداد هاپلوئید کروموزوم های آن ۱۲ می باشد و به صورت جنسی و غیر جنسی تکثیر می یابد.

ناقلین مورد استفاده

برای بیان هورمون کلسی تونین انسانی (hCT) در گیاه سیب زمینی از ناقلین pPCR-Script Amp (تهیه شده از Intelechon) حاوی توالی مربوط به ژن hCT بهینه سازی شده برای بیان در سیب زمینی (شکل ۱)، pP1 حاوی پروموتر ژن Class I Patatin مختص ابراز در غده سیب زمینی و خاتمه دهنده NOS (شکل ۲) و ناقل دوتایی Bin19 (شکل ۳) استفاده شد (pPI-CAT و Bin19 تهیه شده از Institute of molecular Genetics, Moscow).

سویه های باکتریایی

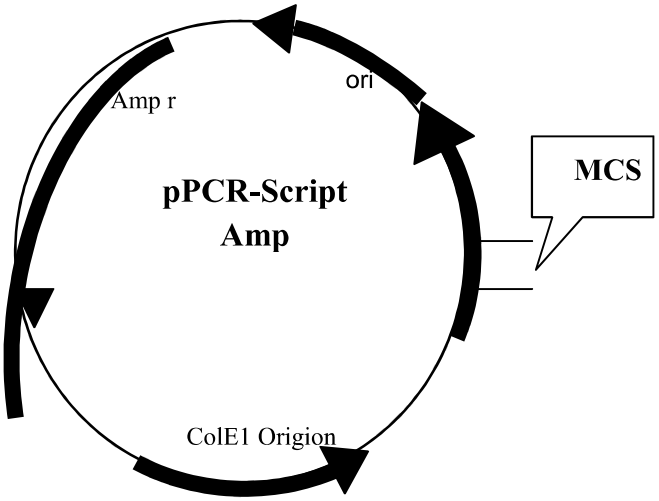
برای انجام مراحل کلونینگ و نیز انتقال ژن به گیاه از دو سویه باکتریایی *E.coli DH5α* و *Agrobacterium tumefacience LBA4404* استفاده شد.

مراحل همسانه سازی (کلونینگ)

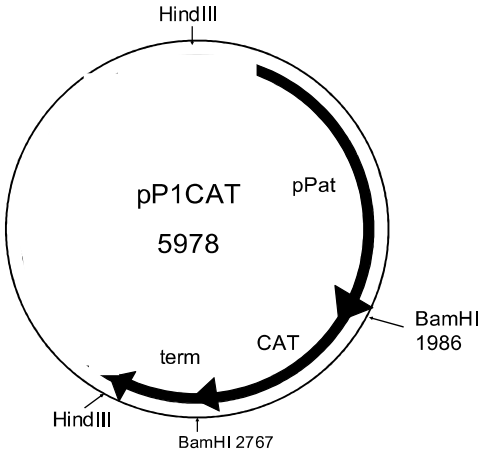
پلاسمید PCR-Script Amp حاوی قطعه hCT سنتز شده توسط شرکت Intelechon، مورد هضم آنزیم *Bam*HI قرارگرفت. قطعه ژن hCT با اندازه تقریبی ۱۱۴ نوکلئوتید از روی ژل آگاروز با استفاده از کیت خالص گردید که توالی این ژن به شرح زیر بود.

5'GGATCCATGTGTGGGAATCTGAG
TACTTGCATGCTTGGCACATACCCCA
AGATTTCAACAAGTTTCATACTTTTC
CACAGACAGCTATTGGTGTTGGAGCA
CCTTAAGGATCC 3'

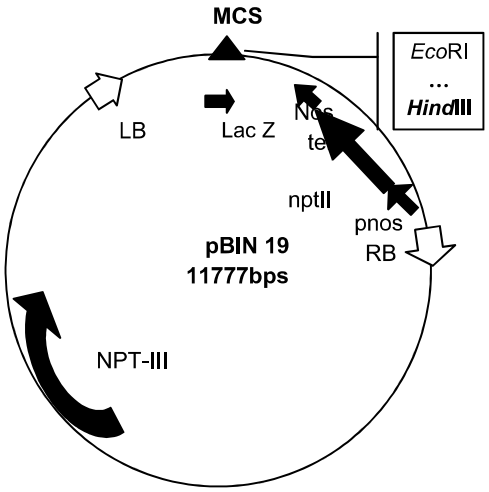
از سوی دیگر پلاسمید pP1 در جایگاه *BamHI* بریده شده و به صورت خطی درآمد و از روی ژل بوسیله کیت اختصاصی برای استخراج (DNA تهیه شده از شرکت Bioneer) خالص‌سازی شد.



شکل ۱- تصویر شماتیک پلاسمید PCR-Script Amp



شکل ۲- تصویر شماتیک پلاسمید



شکل۳- تصویر شماتیک پلاسمید Bin 19

سپس قطعه hCT در جایگاه *Bam*HI بین پروموتر Class I Patatin و توالی خاتمه دهنده پلاسمید pP1 وارد گردید. برای تعیین وجود وجهت قطعه در ناقل از هضم آنزیمی *Sca*I/*Xba*I استفاده شد(۳۸۱ bp = sense، ۴۵۵ bp = antisense) همچنین با

استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی، عمل PCR با پرایمرهایطراحی شده پیشرو (forward) و پیرو (reverse)کلسی-تونین و نیز پیرو nos terminator (ساخته شده توسط سیناژن) انجام شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

CalF:5'CCGGATCCATGTGCGGTAATCTGAGTACTTGC-3'

CalR: 5'GGGGATCCTTAAGGTGCTCCAACCC-3'

Nos terR: 5'-CGCGCGATAATTTATCCTAGT-3'

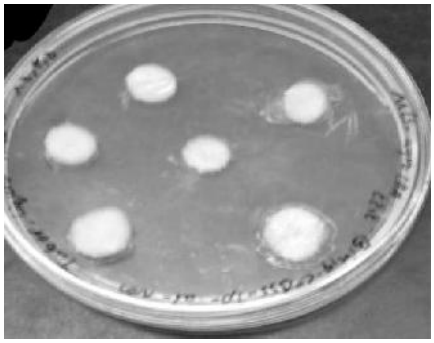
PCR با یک مرحله واسرشتگی ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد آغاز و در۳۰ سیکل حرارتی با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی گراد و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت و در پایان نیز یک مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گرادبه مد ۵ دقیقه انجام شد.پس از اطمینان از حضور قطعه و صحیح بودن جهت آنبرش با آنزیم *Hind*III انجام گرفت (شکل۹) و قطعه ۲۶۵۰ نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی شامل کاست حاوی پروموتر، توالی کد کننده hCT و توالی پلی آدنیلاسیون در جایگاه *Hind*III ناقل دوتائی Bin19 برای انتقال به گیاه کلون شد. کلنی های به دست آمده از نظر وجود قطعه فوق مورد بررسی مجدد بوسیله هضم با آنزیم *Bam*HI و نیز با PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پیشرو cal(forward) و پیرو nos(reverse) با سیکل دمایی همانند مرحله قبل قرار گرفت.

کشت بافت سیب زمینی

کشت بافت سیب زمینی با روش کشت جوانه های حاصل از دیسک غده (shoot tip culture) انجام شد.برای انجام فرایند ترانسفورماسیون در این گیاه دست یابی به رشد کافی و در ادامه غده‌زایی گیاه ضروری بود که به این منظور محیط کشت رشد و تکثیر MS جامد (MURASHIGE & SKOG Medium) (میزان سوکروز ۳درصد) بادوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با ترتیب دمایی ۲۰ و ۱۸ درجه سانتی گراد استفاده شد که پس از به دست آوردن ساقه های ۷ تا ۸ گرهی برای القای غده به آن ها محیط کشت MS غده زایی (میزان سوکروز ۸ درصد) افزوده شد. پس از افزوده شدن محیط غده زایی، گیاهان به مدت ۱۰ روز در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۴ درجه سانتیگراد و پس از آن با حفظ شرایط تاریکی مطلق به دمای ۱۸ درجه سانتیگراد منتقل شدند.

تراریختی گیاهان و باززایی آن ها

عمل تراریختی در گیاه سیب زمینی شامل دو مرحله آماده سازی آگروباکتریوم تومه فاسینس حامل پلاسمید *Bin19* و آماده نمودن ریز غده ها می‌شود. به این ترتیب که ریزغده ها ی تولید شده در شرایط استریل با عمر کمتر از شش ماه به صورت دیسک هایی با قطر ۱-۲ میلی متر بریده شد و این دیسک ها روی سطح محیط MLS (MURASHIGE & LINSMAIER & SKOG Medium) جامد بدون آنتی بیوتیک قرار گرفت و با سوزن استریل سطح آن ها زخمی گردید. آگروباکتریومتومه فاسینس حامل پلاسمید *Bin19* و کاست بیانی (کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در محیط LB و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار) که OD آن معادل ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر بود رسوب داده شد و سپس در محیط MLS مایع وارد شد و حدود ۲۰ میکرولیتر از آن روی دیسک های آماده سازی شده ریخته شد (شکل۴). پتری های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای۲۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از شستشو جهت حذف آگروباکتریوم و ایجاد شرایط انتخابی دیسک ها به محیطMLS محتوی آنتی بیوتیک (سفوتاکسیم ۵۰۰ mg/L و کانامایسین ۱۰۰ mg/L) انتقال یافتند و باز هم در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد برای جوانه زایی قرار گرفتند.



شکل۴- هاله رشد آگروباکتریوم در کناره غده ها پس از گذشت ۲۴ ساعت

جوانه های ثانویه (secondry shoot) به طول ۱/۵- ۲ سانتی متر حاصل از دیسک ها برای به دست آوردن گیاه کامل جدا و در محیط مشابه(cefo –kn –Mls) در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی با ترتیب دمایی ۲۰ و ۱۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت. زمانی که طول گیاهان به حدود ۴/۵ سانتی متر رسید به محیط بدون سفوتاکسیم منتقل شدند پس از رشد گیاه تراریخته به حد تقریباً ۵ گرهی روی آن محیط MS غده زائی ریخته شد.

استخراج DNA و پروتئین از گیاه تراریخت

برای تایید وجود سازه بیانی در گیاهان تراریخته به دست آمده از محیط انتخابی، DNA از اندام های سبز با روش CTAB (۱۱) استخراج و توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ۳۰ سیکل حرارتی با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی گراد و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفته شد. برای بررسی میزان پروتئین بیان یافته، غده از گیاهان تراریخته جدا و مجموع پروتئین های محلول (TSP) آن با استفاده از بافر استخراج پروتئین (شامل $MgCl_2$ 5mM ،EDTA 1mM ،NaCl 10mM ،Triton X-100 ،2-Mercaptoethanol2%) به دست آمد و سپس به صورت اختصاصی میزان کلسی تونین بیان یافته توسط روش ELISA با استفاده از کیت اختصاصی (BioSource CT-US) مورد بررسی قرار گرفته شد.

نتایج و بحث

کشت سیب زمینی

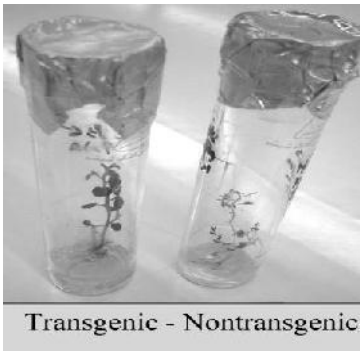
از گیاه اولیه غده به دست آمد (شکل۵) و از جوانه های حاصل از غده‌های آلوده شده با آگروباکتریوم گیاهان ترانس ژنیک حاصل شد (شکل۶) که در محیط MLS دارای آنتی بیوتیک کانامایسین ریشه زایی کرده و به این ترتیب شناسایی شدند (شکل ۷) و از آن ها مجدد غده به دست آمد.

کلونینگ

جداسازی ژن hCT از ناقل (شکل۸) و خطی کردن پلاسمید pPI انجام شد (شکل ۹).

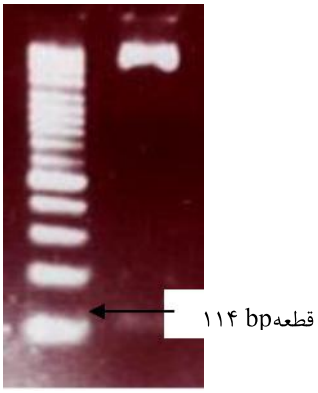
شکل۵- کشت بافت سیب زمینی در محیط MS

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



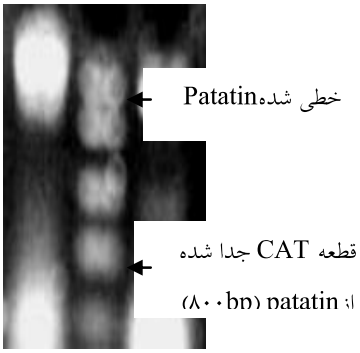
شکل۷- انتخاب گیاه تراریخته در محیط کشت انتخابی

۱ ۲



شکل۸- خارج کردن ژن کلسی تونین از پلاسمید PCR – Scrip Amp **توسط** *Bam*HI**..ردیف اول** DNA **سایز مارکر** ۱۰۰bps **است و ردیف دوم پلاسمید** PCR – Scrip Amp **بریده شده توسط** *Bam*HI**.**

۱ ۲ ۳



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

کلون کردن قطعه ژن hCT در ناقل pPI با موفقیت انجام شد و سازه pP1/hCT در جهت sense به دست آمد (شکل ۱۰و۱۱).

شکل۱۰- تعیین جهت ژن CT توسط PCR. ردیف اول DNA سایز مارکر ۱۰۰bps، ردیف دوم باند ۱۰۰ نوکلئوتیدی حاصل ازدیاد ژن کلسی تونین و ردیف سوم باند ۷۰۰ نوکلئوتیدی که حاصل ازدیاد کلسی تونین و Nos ترمیناتور است.

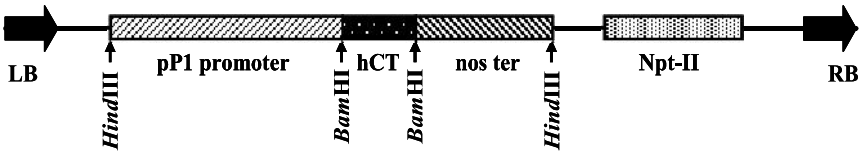
شکل۱۱- تعیین جهت ژن کلسی تونین با نقشه ژنتیکی. ردیف اول DNA سایز مارکر bps ۱۰۰، ردیف دوم پلاسمید pPI-Cal بریده شده با *Xba*I و *Sca*I

برش با آنزیم *Hind*III انجام شد و قطعه ۲۶۵۰ نوکلئوتیدی حاصل از هضم آنزیمی شامل کاست حاوی پروموتر، توالی کد کننده hCT و توالی پلی آدنیلاسیون جدا شد. (شکل ۱۲)

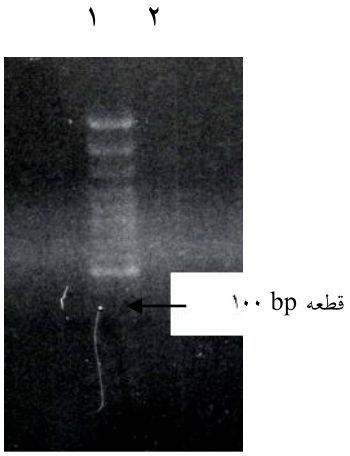
شکل ۱۲- بریده شدن پلاسمید Patatin با آنزیم *Hind*III. ردیف اول باند های حاصل از هضم پلاسمید Patatin با آنزیم

***Hind*III است و ردیف دوم DNA سایز مارکر ۱۰۰bps.**

با استفاده از کاست جدا شده، سازه Bin19/pP1/hCT تهیه شد که در تصویری شماتیک ساختار این سازه نشان داده شده است (شکل۱۳) و وجود ژن در پلاسمید *Bin 19* با آنزیم *Bam*HI مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱۴).

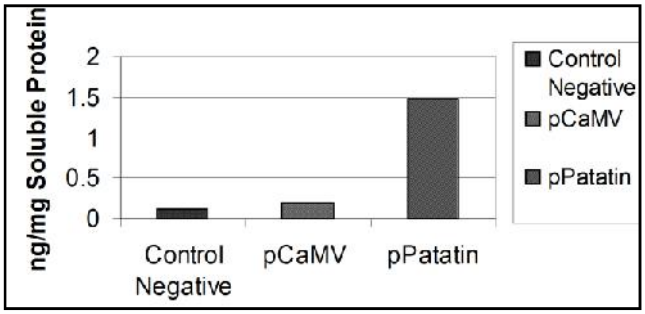


شکل ۱۳- تصویر شماتیک ساختار سازهBin19/pP1/hCT



شکل ۱۴- تایید وجود ژن CT در پلاسمید19 Bin . ردیف اول DNA سایز مارکر ۱۰۰bps و ردیف دوم باند ۱۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از برش با *Bam*HI پس از استخراج از *E.coli*

نمودار ۱- مقایسه میزان بیان هورمون کلسی تونین انسانی در غده سیب زمینی (واریته کاردال) با دو پروموتر



در آزمایش‌های PCR و ELISA انجام گرفته بر روی غده ها و برگ های گیاهان تراریخته وجود ژن کلسی تونین انسانی در غده و عدم وجود آن در برگ تایید و میزان بیان هورمون کلسی تونین انسانی در آن به صورت اختصاصی مشخص شد. بیشترین بیان از واریته کاردال به دست آمد و برابر ۱/۵ نانوگرم بود در حالیکه این میزان در واریته مارفونا برابر ۰/۵ نانوگرم بود.

با توجه به اهمیت هورمون کلسی تونین و نقش آن در تنظیم سطح کلسیم پلاسما، تاکنون کلسی تونینبرای کاربرد درمانی از غدد اولتیمو برانشیال ماهی سالمون(Salmon Calcitonin) استخراج و یا کلسی تونین انسانی (Human Calcitonin) به وسیله سنتزهای شیمیایی تولید می شده اما هزینه های بالای

چنین تولیدی و نیز توجه به این نکته که فعالیت بیولوژیکی محصول سینتتیک بیش از ۱۰ بار در مقایسه با نوع طبیعی کم تر می‌باشد (۸) و افزایش نیازمندی به hCT سبب آغاز فعالیت های تحقیقاتی برای توسعه فرایندهای بیوتکنولوژی جهت تولیدکلسی تونین انسانی نوترکیب شده است (۱۲).تلاش های اولیه برای بیان hCT به صورت نوترکیب در*E.coli* رضایت بخش نبود و محصول اندکی از آن حاصل می شد که احتمال داده شد کم بودن میزان بیان پروتئین مربوط به تجزیه پروتئین توسط سیستم پروتئاز درون سلولی باشد که برای رفع این مشکل دو شیوه به کار رفت. راهکار اول تولید hCT به صورت فیوژن با ژن هایی بود که بیان بالا داشتند اما زمانی که ارغام با چنین پروتئین هایی انجام شد جداسازی پپتید هدف از پروتئین های همراه شده نیازمند فرایندهای اختصاصی و پرهزینه بود (۳،۱۲). روش دیگر الیگومریزه کردن ژن کلسی تونین انسانی که با این هدف تولید hCT در پروکاریوت ها مثل *E.coli* (۱۸) و *Staphylococcus carnosus* انجام شد اما این پروکاریوت ها تنها می توانند پیش ساز کلسی تونین (precursor hCT) را تولید کنند و توانایی تولید کلسی تونین فعال (دارای آمیداسیون در انتهای C) را ندارند (۳، ۱۲). همچنین غیر از کلسی تونین انسانی، کلسی تونین تولید شده از منابع دیگر مثل سالمون، مارماهی و خوک برای درمان انواع بیماری های متابولیسمی استخوان به کار رفته و برای تولید آن ها با روش های نوترکیبی نیز تلاش های گسترده‌ای شکل گرفته از جمله گزارش تولید sCT در شیر خرگوش (۷) و نیز تولید آن در *Streptomyces avermitilis* اما بایستی توجه داشت که همه کلسی تونین ها به جز نوع انسانی بالقوه در انسان آنتی ژن هستند و استفاده دراز مدت از sCT کاهش فعالیت آن را به دنبال دارد (۱۴،۲). تاکنون بیان پروتئین های مختلفی در گیاهان با موفقیت به انجام رسیده است و گیاهان ترانس ژنیک به عنوان بیوراکتورهای مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب شناخته می شوند (۱۶).سیب زمینی یکی از گیاهان زراعی است که در پروژه های زراعت مولکولی مورد توجه قرار گرفته و پروتئین های بسیاری در آن بیان شده و به عنوان بزرگترین سیستم گیاهی تولید واکسن نوترکیب مطرح گشته است. از جمله پروتئین‌هایی که در آن بیان شده پروتئین کپسیدی روتاویروس(VP6) برای واکسیناسیون علیه گاستروانتریت حاد ویروسی (۱۵) و بیان آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) به عنوان واکسن نوترکیب علیه هپاتیت B بوده است(۱۰).از مزایای به کارگیری این گیاه در نقش کارخانه تولید پروتئین های نوترکیب قابلیت نگه‌داری و انبار داری غده برای مدت طولانی، استفاده از غده های خام آن به صورت مستقیم و خوراکی در صورت تولید واکسن، عملکرد بالای محصول در مزرعه و در نتیجه تولید بیوماس بالا و تکثیر غیر جنسی و نبود تفرق ژنتیکی در نسل های بعدی آن است. (۱۴،۱) در ادامه تلاش ها برای افزایش بیان کلسی تونین انسانی، انتقال آن به میزبان گیاهی با توجه به مزیت هایی که ذکر شد مورد توجه قرار گرفت. در تحقیقات قبلی که در آن تولید کلسی-تونین انسانی در گیاه سیب زمینی مورد توجه قرار گرفته بود ژن کلسی تونین به دو صورت مونومر و ترامر تحت کنترل پروموتر CaMV 35S قرار گرفت و از دو تقویت کننده Tobacco Mosaic Virus (TMV) و Tobacco Each Virus (TEV) برای افزایش میزان بیان استفاده شد که در نهایت با توجه به اینکه pCaMV پروموتری دائمی و غیر اختصاصی است و در همه بافت های گیاه بیان می شود کلسی تونین تولید شده تقریباً ۲۰۰ پیکوگرم از Total Soluble (TSP) Protein غده گیاه را تشکیل می داد (۸).با توجه به تحقیقات دیگر از جمله تولید آلبومین سرمی انسان (HSA) در سیب زمینی که تولید آن تحت کنترل هر دو پروموتر CaMV 35S و Patatin بررسی و افزایش بیان از TSP 0.02% غده به ۰/۲ درصد هنگام استفاده از پروموتر Patatin گزارش شده بود (۴). در این پژوهش که ادامه تحقیقات قبلی جهت تولید کلسی تونین انسانی در سیب زمینی است تلاش شد با استفاده از پروموتر اختصاصی غده و نیز بهینه سازی کدون ها برای بیان در سیب زمینی افزایش بیان حاصل شود.

در این تحقیق که اولین گزارش از تولید اختصاصی هورمون کلسی تونین انسانی در غده سیب زمینی بود با استفاده از پلاسمید Bin19 و *Agrobacterium* سویه LBA4404 ژن کلسی تونین انسانی به کروموزوم سیب زمینی منتقل شد. در این سیستم بیان ژن تحت کنترل پروموتر Class I Patatin که اختصاصی غده سیب زمینی

است قرار گرفت تا از بیان همه جایی پروتئین هدف جلوگیری و تغلیظ آن امکان پذیر شود. کدون های این ژن را براساس رمزهای ترجیحی (codon bios) برای بیان در سیب زمینی طراحی نموده و در انتهای '3 آن سیگنال پلی آدنیلاسیون NOS قرار گرفت. در نهایت برای بررسی میزان کلسی تونین بیان شده از روش ELISA استفاده شد و نتایج حاصل بیانی معادل pg/g ۱۴۷۲/۸۵۸۵ پروتئین کلسی تونین در یک گرم غده تازه واریته کاردال و pg/g ۵۶۸/۳۵۴۴ پروتئین کلسی تونین در یک گرم غده تازه واریته مارفونا را نشان داد. این میزان بیان افزایش قابل توجهی نسبت به زمانی که ژن کلسی تونین انسانی تحت کنترل پروموتر CaMV 35S با بیان غیر اختصاصی قرار گرفته بود نشان می داد که در نمودار ۱ به آن پرداخته شده است.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Bajaj, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry 3 potato.3th volume. Springer-Verlag ; 1987.

2. Chakraborty, C., Nandi, ss., Sarkar, B., Sinha, S .(2005). Overexpression and purification of recombinant eel calcitonin and its phylogenetic analysis. Protein Peptid Letter.,12(3),263-9

3. Dilsen, S.,Tippe, D., Sandgathe, A.,Halfar, M. (2000). Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using Staphylococcus carnosus as an expression –secression system. Appl Microbiol Biotechnol, 54(3),361-9

4. Farran, I., Sánchez-Serrano, J.J., Medina, JF., Prieto, J., Mingo-Castel, A.M.(2002) Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. Transgenic Research, 11, 337–346..

5. Fischer, R., Drossard, J., Commandeur, U., Schillberg, S., Emans, N. (1999). Towards molecular farming in the futuremoving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants.Biotechnology Applied Biochemistery, 30 (Pt 2),101-8.

6. Ma, J.K., Barros, E., Bock, R,, Christou, P., Dale, P.J., Dix, P.J.,et.al. (2005). Molecularfarming for new drugs and vaccines Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. EMBO reports, 6(7), 2000-2005.

7. McKee, C., Gibson, A., Dalrymple, M., Emslie, L., Garner, I., Cottingham, I. (1998). Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. Nature Biotechnology, 16,1234-1239.

8. Ofoghi, H., Moazami, N., Domonsky, N.N., Ivanov, I. (2000). Cloning and expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant. Biotechnology Letters, 22,611-615.

9. Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. TRENDS in Biotechnology, 21(12), 143-176.

10. Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J., Mason, H.S. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotchnology, 18, 123-128.

11. Sambrook., J., Fritsch,E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning a Laboratori Manual. 2nd. Ed. cold spring Harbor Laboratory Press.

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

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

14. Yabuta, M., Suzuki, Y., Ohsuye, K.

(1995). High expression of a recombinant human calcitonin precursor peptide in E.coli. Appl Microbiology Biotechnology, 42,703-70.

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

16. Kazuya,Y., Atsuhiko, Sh. (2000). Transgene expression system in plants a current perspective. JPlant-Bioscience&Bioengineering, 90(4) , 353-362.

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

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