

سنتز و همسانه‌سازی ژن کدکننده پروتئین شیرین برازئین

شیما کرمی^۱، خدیجه باقری^{۲*}، وهب جعفریان^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

* نویسنده مسئول (khbagheri2001@yahoo.com)

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

چکیده

امروزه مشکلاتی که جذب ساکارز برای سلامتی افراد به‌وجودآورده، تقاضا برای شیرین‌کننده‌های طبیعی دارای مزه مطلوب‌تر و جذب کمتر از جمله پروتئین‌های شیرین را افزایش داده است. در میان آنها برازئین به واسطه شیرینی قوی، منشاء طبیعی و پایداری مطلوب جایگزینی مناسب برای ساکارز محسوب می‌شود. برازئین از میوه گیاه آفریقایی *Pentadiplandra brazzeana* Baillon که تولید تجاری آن در مقیاس بالا غیرعملی است، جدا شده است. بنابراین تولید تجاری وسیع این پروتئین نیازمند بیان آن در یک سیستم هترولوگوس از طریق تکنولوژی DNA نو ترکیب است. در این پژوهش با توجه به در دسترس نبودن ژنوم گیاه *P. brazzeana* سنتز مصنوعی ژن برازئین با استفاده از تکنیک‌های Assembly PCR و SOEing PCR انجام شد. ابتدا توالی اسید آمینه‌ای پروتئین برازئین با سرور Emboss Backtranseq براساس کدون‌های ترجیحی ذرت به توالی ۱۶۲ نوکلئوتیدی ترجمه شد. سپس با استفاده از ۶ آغازگر هم‌پوشان طی ۵ واکنش متوالی PCR توالی کامل ژن برازئین سنتز شد. نتایج حاصل از واکنش PCR صحت کار را نشان داد. سپس قطعه حاصله در وکتورهای بیانی گیاهی pBI121 با پیشبر عمومی CaMV35S و پیشبر اختصاصی بذر Napin کلون شد و نتایج تعیین توالی صحت قطعه سنتزی کلون‌شده را تأیید کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۳

واژه‌های کلیدی

برازئین

ژن سنتتیک

شیرین‌کننده پروتئینی

pBI121

مقدمه

شیرین‌کننده به‌کارگرفته شده‌اند، عاری از مشکل نبوده‌اند. بنابراین امیدها به گروهی از ترکیبات طبیعی شیرین، یعنی پروتئین‌های شیرین بیشتر شده است (Temussi, 2006). پروتئین‌های شیرین‌کننده گروهی از شیرین‌کننده‌های طبیعی را تشکیل می‌دهند که در میوه‌های خوراکی یافت می‌شوند و هزاران بار شیرین‌تر از ساکارز هم‌وزن خود هستند (Berlec et al., 2006). از بین شیرین‌کننده‌های پروتئینی، برازئین به دلیل کیفیت طعم، مزه و خواص فیزیکی مناسب، مورد توجه است. اندازه کوچک، پایداری حرارتی بالا، مقاومت به دامنه وسیع pH و نیز مشابهت شیرینی آن با ساکارز، برازئین را به یک ترکیب استثنایی تبدیل

شیرین‌کننده‌ها از افزودنی‌های پرکاربرد در صنایع غذایی هستند که امروزه بسته به نیاز، از انواع مختلف آنها در تولید مواد غذایی استفاده می‌شود (Zhao et al., 2003). استفاده از شیرین‌کننده‌های کم‌کالری به‌ویژه به دلیل افزایش تعداد افراد مبتلا به بیماری‌هایی مانند دیابت، چاقی و پوسیدگی دندان و استخوان که کم‌وبیش به‌طور مستقیم با اثرات ثانویه مصرف قند مرتبط هستند امری مهم است (Temussi, 2006).

در طول قرن‌ها، صدها شیرین‌کننده مصنوعی و طبیعی شناسایی شده است. با این حال، هیچ یک از ترکیبات کشف و یا سنتز شده زمانی که به‌عنوان

تولید پروتئین برازئین در میزبان‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است Li و همکاران (۲۰۰۳) ژن برازئین را براساس کدون‌های مناسب برای بیان در باکتری *E. coli* طراحی و از طریق PCR سنتز کردند. سپس آن را در وکتور بیانی پروکاریوتی pET30a(+) کلون و در سلول میزبان *E. coli* BL21(DE3) بیان کردند. همچنین برازئین در باکتری اشیرشیاکلی^۱ و لاکتوکوکوس لاکتیس^۲ تولید شده اما پروتئین تولیدشده در *E. coli* به صورت نامحلول بوده و پروتئین تولیدشده در *L. lactis* نیز کم و با میزان شیرینی کمتر بوده است. سیستم‌های بیانی باکتریایی (پروکاریوت‌ها) گرچه دارای مزایایی نظیر دست‌کاری ژنتیکی سریع و آسان هستند اما بازده این سیستم‌ها برای تولید پروتئین‌های کوچک با چندین پیوندهای دی‌سولفید مانند برازئین پایین است (Jo et al., 2013). Bo (۲۰۰۷) ژن برازئین را برای بیان در *Aspergillus awamori* به وسیله روش پرایمرهای هم‌پوشان و SOEing PCR سنتز کرد و طول کامل ژن را به وسیله ۲ قطعه الگو از طریق overlapping PCR و کلون در وکتور *pMD18-T* به دست آورد. بیان ژن مصنوعی برازئین در مخمر *Kluyveromyces lactis* نیز مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور ژن برازئین را با کدون‌های مناسب مخمر طراحی و ژن مصنوعی سنتز شده را در ناقل pKLAC2 کلون کردند. اگرچه نتایج نشان داد که سیستم بیانی *K. lactis* برای تولید برازئین نوترکیب در فرم فعال، با عملکرد بالا و دارای ویژگی‌های مفید در صنعت مواد غذایی سودمند است (Jo et al., 2013). اما عمده‌ترین اشکال مخمر برای بیان پروتئین‌های نوترکیب ناتوانی از انجام بعضی تغییرات پس از ترجمه بخصوص گلیکوزیلاسیون می‌باشد که برای فعالیت پروتئین‌ها بسیار مهم است (Peeters et al., 2001).

از طرف دیگر استفاده از گیاهان به عنوان کارخانه‌های زیستی برای تولید پروتئین‌های باارزش در مقیاس تجاری به طور روزافزون در حال افزایش است. تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان مزیت‌های متعددی دارد. ۱: گیاهان توانایی تولید پروتئین‌های با

کرده است (Assadi-Porter et al., 2007; Mansouri et al., 2011).

حلالیت در آب یکی از ویژگی‌های حیاتی برای شیرین‌کننده‌های با قدرت بالا در کاربردهای تجاری است که برازئین با حلالیت ۵۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر آب به نظر می‌رسد محلول‌ترین عضو از خانواده پروتئین‌های شیرین مزه باشد. از نظر شیرینی برازئین دارای شیرینی ذاتی ۵۰۰ الی ۲۰۰۰ برابری نسبت به ساکارز است (Ming & Hellekant, 1994).

نظر به اینکه منبع برازئین، گونه گیاهی کمیاب و گرمسیری *Pentadiplandra brazzeana* Baillon با فرایند کشت سخت و طولانی است، تولید اقتصادی آنها در مقیاس بزرگ عملی نبوده و از این رو در دسترس بودن آنها برای استفاده در صنایع غذایی محدود می‌باشد (Lamphear et al., 2005). همچنین این گیاه در خارج از رویشگاه طبیعی خود به سختی میوه تولید می‌کند (Jin et al., 2003). بنابراین استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب و بیوتکنولوژی گزینه‌ای جهت تولید ارزان‌تر و بیشتر آن فراهم می‌کند (Faus, 2000).

امروزه می‌توان ژن یا cDNA کدکننده هر پروتئین را جدا و به یک سیستم بیانی مناسب وارد نمود تا پروتئین در یک موجود بیگانه تولید شود. در مواردی که DNA الگو به آسانی در دسترس نیست، سنتز مصنوعی توالی‌های ژن ممکن است بهترین انتخاب باشد. در سالهای اخیر، تقاضا برای سنتز کامل ژن به طور چشمگیری به منظور مطالعه ساختار، بیان و عملکرد ژن افزایش یافته است. فناوری سنتز ژن به طور گسترده در بسیاری از برنامه‌های کاربردی، از جمله بهینه‌سازی کدون (Gustafsson et al., 2004, 2006) و یا دسترسی ساده به توالی DNA شناخته شده زمانی که الگوی اصلی در دسترس نیست، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Li et al., 2013). در میان روش‌هایی که برای سنتز ژن گزارش شده است روش‌هایی که بر پایه PCR و استفاده از الیگونوکلئوتیدهای هم‌پوشان برای ساخت ژن هستند مناسب‌ترینند و به طور گسترده‌ای گزارش شده‌اند (Zhang et al., 2013).

¹ *Escherichia coli*

² *Lactococcus lactis*

خواهد بود. بنابراین به‌وسیله سرور Emboss Backtranseq ترجمه معکوس با کدون‌های ترجیحی ذرت صورت گرفت (Lamphear *et al.*, 2005) و توالی نوکلئوتیدی ژن برازئین به طول ۱۶۲ نوکلئوتید با کدون‌های بهینه گیاه ذرت به‌دست آمد.

لازم به ذکر است که در ادامه این تحقیق بیان ژن برازئین در بذر گیاه ذرت انجام خواهد شد به همین جهت کدون‌های ترجیحی ذرت در سنتز ژن مدنظر قرار گرفته شده است. در مرحله بعد با کمک نرم‌افزارهای Gene runner و vector NTI اقدام به طراحی آغازگرهای هم‌پوشان شد و ۳ سری آغازگر به شرح جدول (۱) تهیه شد که هرکدام از آنها قسمتی از ژن برازئین را شامل می‌شود به طوری که با انجام چند واکنش PCR قطعه مورد نظر سنتز شود.

سری اول و دوم آغازگرها که شامل بخشی از توالی ژن برازئین است به‌گونه‌ای طراحی شد که تعدادی از نوکلئوتیدهای انتهای ۳' آغازگرهای مستقیم و معکوس هر سری با هم مکمل باشد همچنین نوکلئوتیدهای انتهای ۵' آغازگر مستقیم سری اول با نوکلئوتیدهای انتهای ۳' آغازگر مستقیم سری سوم هم‌پوشانی داشت و انتهای ۵' آغازگرهای مستقیم و معکوس سری دوم نیز هرکدام به ترتیب با نوکلئوتیدهای انتهای ۵' آغازگر معکوس سری اول و نوکلئوتیدهای انتهای ۳' آغازگر معکوس سری سوم هم‌پوشان در نظر گرفته شد.

طراحی سری سوم آغازگرها نیز به‌گونه‌ای بود که علاوه بر اینکه قسمتی از نوکلئوتیدهای ژن برازئین را شامل شد توالی‌های اضافی دیگری نیز در طراحی آنها در نظر گرفته شد که در اهداف بعدی این پژوهش که بیان ژن برازئین در گیاه می‌باشد کاربرد خواهند داشت. به این صورت که در انتهای ۵' آغازگر مستقیم به ترتیب جایگاه آنزیم برشی *XbaI*، کدون شروع رونویسی، توالی پپتید نشانه تعبیه شد. در آغازگر معکوس نیز از انتهای ۵' به ترتیب جایگاه آنزیم برشی *SacI*، توالی MAR، کدون خاتمه رونویسی، توالی KDEL و قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن برازئین جایگذاری شد. از این رو طول قطعه طراحی شده دارای توالی ژن برازئین از ۱۶۲ به ۲۷۳ نوکلئوتید تغییر یافت. توالی MAR جهت افزایش بیان و پایداری ژن

ساختار صحیح را دارند و تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها را که برای کارکرد صحیح آنها لازم و ضروری است به درستی انجام می‌دهند. ۲: گیاهان را می‌توان در مقیاس وسیع و با هزینه کم تولید کرد. ۳: پاتوژن‌های انسانی در گیاهان وجود ندارد به همین دلیل خطر آلودگی به حداقل مقدار ممکن می‌رسد. ۴: تولید پروتئین‌های نوترکیب در بذر گیاه یک محل ذخیره طولانی مدت را فراهم می‌کند. ۵: تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهانی که مصارف انسانی دارند این مزیت را دارند که به‌طور مستقیم و بدون نیاز به فراوری قابل استفاده هستند (Lamphear *et al.*, 2005). در حال حاضر غلات، از جمله ذرت، برنج، جو و گندم، رایج‌ترین گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در دانه هستند و در میان آنها ذرت دارای بالاترین عملکرد سالانه دانه، محتوای پروتئین دانه نسبتاً بالا، همراه با بالاترین عملکرد پروتئین در هر هکتار است (Lau & Sun, 2009).

باتوجه به در دسترس نبودن گیاه *P. brazzeana* جهت جداسازی ژن برازئین، در این تحقیق سنتز مصنوعی ژن برازئین مطابق با کدون‌های معمول و مناسب برای گیاه ذرت و سپس کلونینگ آن در ناقل گیاهی مدنظر بوده تا مقدمه‌ای باشد بر بیان پروتئین ارزشمند برازئین در دانه گیاه ذرت که تا به امروز به صورت بسیار محدودی گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرها و سنتز مصنوعی ژن برازئین

ابتدا توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین برازئین با شماره دسترسی gi|218218144 و gi|355327735 با استفاده از اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI به دست آمد، سپس نوکلئوتیدهای کدون‌ها به نحوی که توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین تغییری نکند، به کدون‌های مناسب بیان در گیاه تغییر داده شد چرا که توالی‌های مهندسی شده براساس کدون یوزیج به دلیل پیوندهای قوی بازهای GC می‌تواند منتج به ایجاد یک ساختار ثانویه پایدار mRNA شود (Kim *et al.*, 1997). همچنین تغییرات نوکلئوتیدها به نحوی صورت گرفت که توالی نهایی دارای درصد GC مناسبی باشد بدین دلیل که مناسب بودن درصد GC بر بیان، مؤثر

برشی *XbaI* و *SacI* جهت کلونینگ ژن در پلاسمید بیانی گیاهی pBI121 به دلیل وجود جایگاه‌های این ۲ آنزیم برشی در این پلاسمید است.

انتقال یافته و توالی KDEL جهت تجمع پروتئین‌های نو ترکیب در گیاه و نگهداری آن در شبکه آندوپلاسمی در سازه قرار داده شد. همچنین انتخاب آنزیم‌های

جدول ۱ - توالی آغازگرها

نام آغازگر	توالی
مستقیم ۱ (F1)	5'CTTCTTGTTGACTAACGCTGAGGACAAGTGCAAGAAGGTGTACGAGAACTA CCCGGTGTC3'
معکوس ۱ (R1)	5'CTTGACGTCGTAGTTGCACTGGTTGGCCAGCTGGCACTTGGACACCGGGTA G3'
مستقیم ۲ (F2)	5'GACTGCAAGCTGGACAAGCACGCCAGGTCCGGCGAGTGCTTCTACGACGA GAAGAGGAAC3'
معکوس ۲ (R2)	5'GTACTCGCAGTAGTCGCAGATGCACTGCAGTTCTCTTCT3'
مستقیم ۳ (F3)	5'ATTCTAGAATGGCTAACAAGTTGTTCTTGGTTTCTGCTACTTTGGCTTTCTTC TTCTT3'
معکوس ۳ (R3)	5'GGGAGCTCTTATTATCTCATTAATAATTATAGTTCATCTTGTACTCGCAGTA GTC3'

جدول (۳) آورده شده است. لازم به ذکر است که در واکنش‌های Assembly PCR به وسیله تعداد کم سیکل‌ها نیز می‌توان به اتصال قطعات دست یافت اما در واکنش‌های PCR اول و دوم، جهت افزایش محصول و همچنین استفاده بهینه از آغازگرها تعداد سیکل ۲۰ در نظر گرفته شد.

جهت سنتز ژن براژین طراحی شده ابتدا با استفاده از آغازگرهای سری اول و دوم هرکدام به‌طور جداگانه واکنش Assembly PCR انجام شد. مواد تمامی واکنش‌های PCR مطابق با PCR استاندارد در نظر گرفته شد. آغازگرها و الگوی استفاده شده در هریک از واکنش‌ها در جدول (۲) و چرخه‌های دمایی و تعداد سیکل‌ها در هریک از واکنش‌های PCR در

جدول ۲ - آغازگر و DNA الگو واکنش‌های PCR

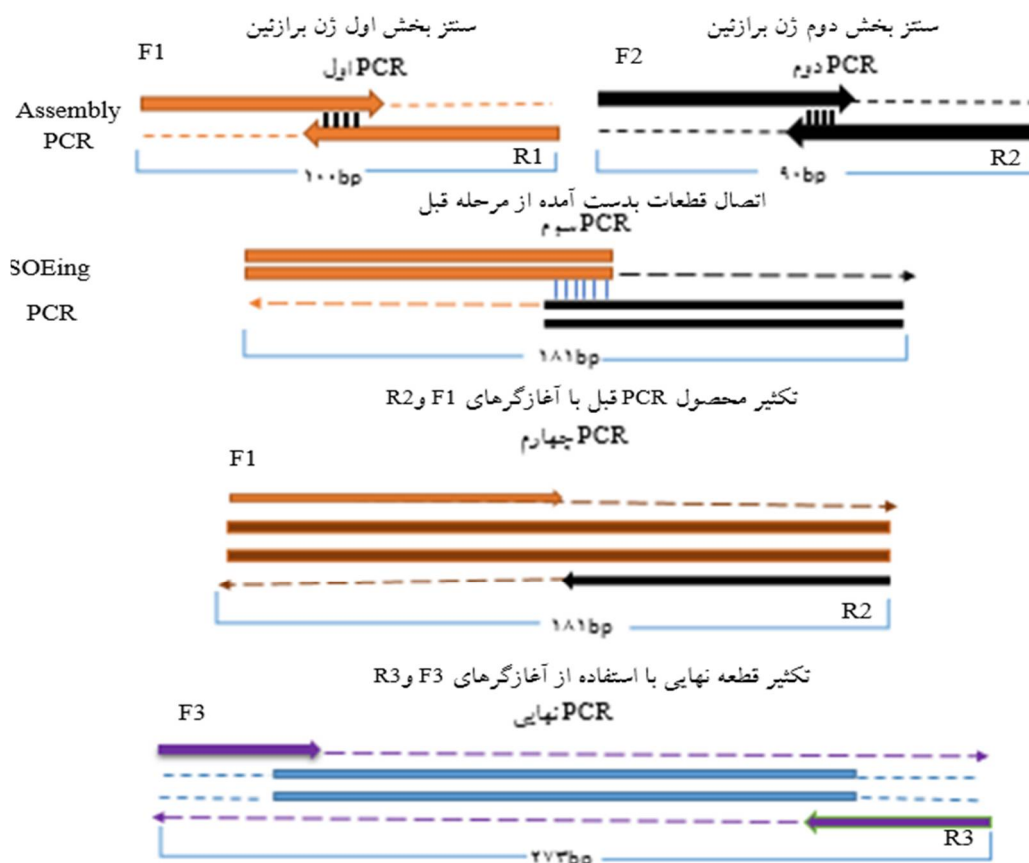
مواد واکنش	PCR اول	PCR دوم	PCR سوم	PCR چهارم	PCR پنجم
آغازگر مستقیم	مستقیم ۱ (F1)	مستقیم ۲ (F2)	-	مستقیم ۱ (F1)	مستقیم ۳ (F3)
آغازگر معکوس	معکوس ۱ (R1)	معکوس ۲ (R2)	-	معکوس ۲ (R2)	معکوس ۳ (R3)
الگو	-	-	محصول PCR اول و دوم	محصول PCR سوم	محصول PCR چهارم

جدول ۳ - چرخه‌های دمایی و تعداد چرخه‌ها در مراحل مختلف PCR

چرخه	دما PCRهای					زمان PCRهای				
	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم
۱ واسرشته‌سازی اولیه	-	-	-	-	۹۵°C	-	-	-	-	۳'
۲ واسرشته‌سازی	-	-	۹۵°C	۹۵°C	۹۵°C	-	-	۱'	۱'	۱'
اتصال	۶۵°C	۶۵°C	۶۵°C	۷۰°C	۵۰°C	۱'	۱'	۱'	۱'	۱'
بسط	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۳'	۳'	۵۰"	۳۰"	۳۰"
۳ بسط نهایی	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۷۲°C	۵'	۵'	۵'	۵'	۵'
۴ نگهداری نهایی	۴°C	۴°C	۴°C	۴°C	۴°C	۱'	۱'	۱'	۱'	۱'
تعداد سیکل	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۵					

محصول واکنش PCR سوم به‌عنوان DNA الگو استفاده شد. در انتها باهدف به‌دست‌آوردن طول کامل قطعه طراحی‌شده، پنجمین واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای مستقیم ۳ (F3) و معکوس ۳ (R3) و محصول PCR چهارم به‌عنوان DNA الگو انجام شد. نمای شماتیکی از مراحل سنتر قطعه مورد نظر در شکل (۱) آورده شده است.

از آنجاکه طراحی آغازگرهای سری اول و دوم به نحوی انجام شده بود که محصولات آنها دارای نواحی انتهایی هم‌پوشان باشند، بنابراین در مرحله بعد با استفاده از محصول PCRهای اول و دوم و بدون استفاده از آغازگر، واکنش SOEing PCR انجام شد. واکنش PCR چهارم نیز باهدف تکثیر قطعه حاصل از SOEing انجام شد. بدین ترتیب که از آغازگرهای مستقیم ۱ (F1) و معکوس ۲ (R2) به‌عنوان آغازگر و



شکل ۱- نمای شماتیکی از مراحل سنتر ژن برازئین

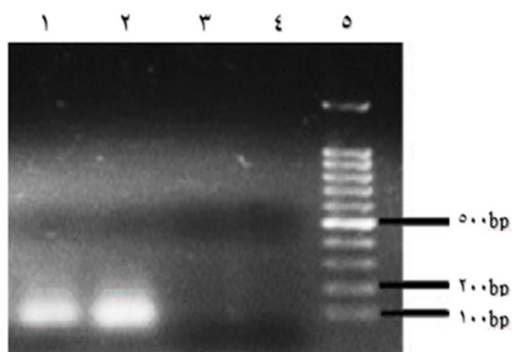
لازم بود این پلاسمید از ژن گزارشگر GUS تخلیه شود، و محصول PCR آماده جایگزینی با قطعه خارج شده باشد. برای این منظور، پلاسمید pBI121 و محصول PCR پس از طی مراحل استخراج، تکثیر، تخلیص با استفاده از ۲ آنزیم *XbaI* و *SacI* (شرکت Jenabioscience) مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. باتوجه به فعال بودن هر ۲ آنزیم در بافر 10X B2 جهت واکنش هضم دوگانه آنزیمی انجام شد. جهت جلوگیری از خوداتصال پلاسمیدهای خطی‌شده از آنزیم آلکالین فسفاتاز (شرکت Fermentas) استفاده

باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده

در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه DH5α جهت تکثیر و نگهداری پلاسمیدهای اولیه و پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد. از پلاسمید دوگانه pBI121 تحت پیشبر عمومی CaMV35S و پیشبر اختصاصی بذر Napin که حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین به‌عنوان نشانگر انتخابی است، استفاده شد.

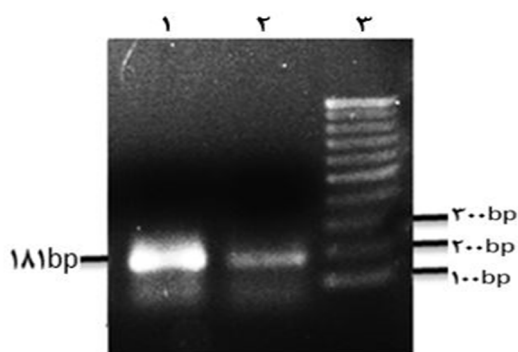
کلونینگ ژن برازئین در ناقل بیانی pBI121

برای کلونینگ ژن برازئین در پلاسمید pBI121 ابتدا



شکل ۲ - نتایج واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگرهای سری اول و دوم. ۱: محصول PCR به طول قطعه ۹۰ bp با آغازگرهای سری دوم ۲: محصول PCR به طول قطعه ۱۰۰ bp با آغازگرهای سری اول ۳ و ۴: کنترل منفی ۵: مارکر ۱۰۰ bp

در مرحله بعد با استفاده از محصولات تولیدی PCR اول و دوم به ترتیب با طول ۱۰۰ و ۹۰ جفت باز واکنش SOEing PCR (واکنش سوم) انجام شد و از این محصولات به عنوان الگو استفاده شد. و با توجه به هم‌پوشانی این ۲ قطعه در انتهای ۳ خود هریک به عنوان آغازگر برای رشته دیگر عمل کرده و بدین ترتیب انتظار می‌رفت قطعه‌ای به طول ۱۸۱ جفت باز حاصل شود که نتایج حاصل از الکتروفورز تحقق این امر را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳ - نتیجه واکنش SOEing PCR. ۱ و ۲: محصول PCR با محصول PCR سری اول و دوم با طول قطعه ۱۰۰ bp ۳: مارکر ۱۸۱ bp

در مرحله بعدی واکنش SOEing PCR از آغازگرهای مستقیم ۱ (F1) و معکوس ۲ (R2) محصول PCR قبلی به عنوان الگو استفاده شد و بدین ترتیب در حجم بالا تکثیر گردید (واکنش

شد. پس از تخلیص محصول PCR و پلاسمید هم‌شده با استفاده از کیت‌های تخلیص محصول PCR و تخلیص از ژل شرکت Bioneer واکنش اتصالی بین آنها به وسیله آنزیم T4 DNA Ligase (شرکت Fermentas) به مدت ۱۴ تا ۱۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد سپس محصول حاصل از واکنش اتصال به سلول‌های *E. coli* سویه DH5α که به روش لیزقلیایی به وسیله محلول کلریدکلسیم مستعد شده بودند (Sambrook & Russell, 2001) توسط شوک حرارتی انتقال داده شد و سپس جهت انتخاب کلونی‌های نوترکیب روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کشت داده شدند (Sambrook & Russell, 2001). کلون‌های رشد یافته در محیط انتخابی حاوی کانامایسین در واکنش کلونی PCR مورد بررسی قرار گرفتند و همچنین از کلونی‌هایی که نتایج کلونی PCR آنها مثبت بود استخراج پلاسمید به روش لیزقلیایی صورت گرفت و جهت اطمینان از عدم تغییر توالی قطعه کلون‌شده برای تعیین توالی ارسال گردید.

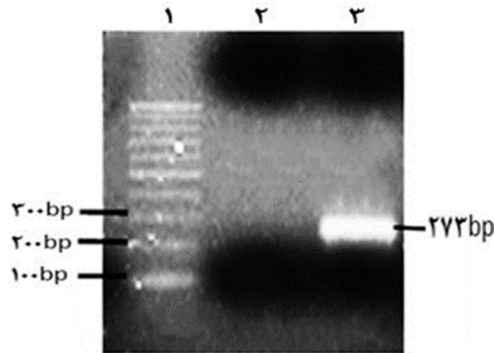
نتایج و بحث

سنترژن براژئین

باتوجه به طول آغازگرهای طراحی شده سری اول و سری دوم که با استفاده از آنها ۲ واکنش Assembly PCR به طور جداگانه انجام شد، انتظار می‌رفت که محصول PCRهای آنها به ترتیب قطعاتی به طول ۱۰۰ و ۹۰ جفت باز باشد که باندهایی با این اندازه‌ها روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۲). در هریک از این واکنش‌ها آغازگر مستقیم با آغازگر معکوس از نواحی هم‌پوشان به هم متصل شده و به عنوان الگو برای همدیگر قرار گرفته و آنزیم Taq پلیمرز عمل سنتر را انجام می‌دهد بنابراین نیازی به DNA الگو نیست همچنین در این ۲ واکنش مرحله واسرشته‌سازی رشته‌های DNA لازم نیست بدین دلیل که آغازگرها تک رشته‌های DNA هستند و نیازی به واسرشته‌سازی آنها وجود ندارد.

توالی KDEL، ۱۷ نوکلئوتید توالی MAR و کدون شروع، پایان و سایت‌های برشی با ۱۹ نوکلئوتید، انتظار می‌رفت که قطعه‌ی نهایی به طول ۲۷۳ جفت باز داشته باشیم که نتایج الکتروفورز نیز صحت این امر را تأیید کرد (شکل ۴).

چهارم). در نهایت در آخرین واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای مستقیم ۳ (F3) و معکوس ۳ (R3)، قطعه‌ی نهایی از روی محصول PCR واکنش چهارم تکثیر شد در این مرحله با توجه به اینکه ژن برازئین دارای ۱۶۲ جفت باز است به همراه سایر توالی‌های اضافی شامل ۶۳ نوکلئوتید توالی نشانه، ۱۲ نوکلئوتید

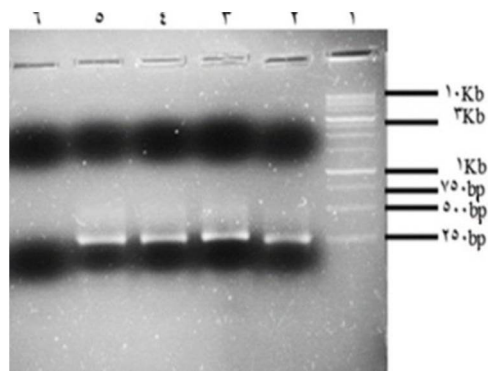


شکل ۴ - نتیجه واکنش پنجم PCR با استفاده از آغازگرهای سری سوم. ۱: مارکر ۱۰۰ bp؛ ۲: کنترل منفی؛ ۳: محصول PCR با آغازگر مستقیم و معکوس سری سوم با طول قطعه ۲۷۳ bp

تأیید نو ترکیب بودن آنها توسط Colony PCR الزامی است. بنابراین با استفاده از سری سوم آغازگرها و مطابق با برنامه PCR پنجم کلونی PCR انجام گرفت و قطعه‌ای به طول ۲۷۳ جفت باز حاصل شد که تأییدکننده حضور قطعه در کلونی‌ها بود پس از آن جهت اطمینان از نتایج حاصل از کلونی PCR از کلونی‌هایی که در این مرحله نو ترکیب بودن آنها تأیید شد استخراج پلاسمید صورت گرفت و با استفاده از سری سوم آغازگرها مطابق برنامه PCR پنجم واکنش PCR انجام گرفت و نتایج الکتروفورز نو ترکیب بودن کلونی‌ها را مورد تأیید نهایی قرار داد (شکل ۵).

نتایج حاصل از کلونینگ

پلاسمید pBI121-Bra یک ناقل بیانی گیاهی است که به عنوان ژن گزینش‌گر دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است بنابراین تنها باکتری‌های تراریخت حاوی این پلاسمید توانایی رشد در محیط حاوی این آنتی‌بیوتیک را دارند از این رو کلونی‌های رشد یافته روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین بیانگر دریافت پلاسمید pBI121-Bra است. نظریه اینکه کلونی‌های حاوی پلاسمید pBI121-Bra غیرنو ترکیب نیز در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین توانایی رشد دارند،



شکل ۵ - نتایج PCR با پلاسمیدهای نو ترکیب. ۱: مارکر ۱ kb و ۲: PCR با استفاده از پلاسمید نو ترکیب pBI121 حاوی ژن برازئین با پیشبر Napin ۵۴؛ ۳: PCR با استفاده از پلاسمید نو ترکیب pBI121 حاوی ژن برازئین با پیشبر CaMV35S؛ ۴: کنترل منفی

تأیید صحت توالی قطعه توسط تعیین توالی

نتیجه تعیین توالی پلاسمیدهای نو ترکیب pBI-Bra صحت توالی سنتز شده را تأیید کرد و مقایسه توالی با توالی‌های موجود در بانک ژن مشابهت ۹۰ درصدی را با ژن برازئینی که متناسب با کدون‌های بهینه قارچ *A. awamori* سنتز شده نشان داد (شکل ۶). در توضیح عدم مشابهت ۱۰ درصدی به این نکته اشاره می‌شود که توالی‌های سنتز شده برازئین موجود در

بانک ژن مطابق با کدون‌های بهینه، میزبان‌های خاص هستند و در این تحقیق نیز ژن برازئین مطابق با توالی‌های بهینه ذرت سنتز شده است، از این رو تفاوتی که در تعدادی از نوکلئوتیدها مشاهده شده به واسطه تفاوتی است که بین کدون‌های بهینه میزبان‌های مختلف وجود دارد. این در حالی است که توالی اسید آمینه‌ای آنها مطابقت کامل دارد.

Download ▾ GenBank Graphics

Synthetic construct brazzein gene, partial cds

Sequence ID: gb|EU883595.1| Length: 162 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 162 GenBank Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
219 bits(242)	2e-53	145/161(90%)	0/161(0%)	Plus/Plus
Query 73	AGGACAAGTGCAAGAAGGTGTACGAGA	ACTACCCGGTGTCCAAGTGCCAGCTGGCCAACC	132	
Sbjct 2	AGGACAAGTGCAAGAAGGTCTACGAGA	ACTACCCGGTGTCCAAGTGCAACTGGCTAATC	61	
Query 133	AGTGCAACTACGACTGCAAGCTGGACA	AGCAGCCAGGTCCGGCGAGTGCTTCTACGAGC	192	
Sbjct 62	AGTGCAACTACGATTGCAAGCTCGACA	AGCAGCTCGCTCCGGCGAATGCTTCTACGATG	121	
Query 193	AGAAGAGGAACCTGCAGTGCATCTGCG	ACTACTGCGAGTAC	233	
Sbjct 122	AGAAGCGCAACCTGCAGTGCATTGCG	ACTACTGCGAGTAC	162	

شکل ۶ - نتیجه Blast توالی‌های به دست آمده از تعیین توالی ژن در بانک ژن

از آنجاکه DNA اغلب به آسانی در دسترس نیست و یا توالی‌های طبیعی DNA ممکن است به صورت بهینه در سیستم‌های هترو لوگ، بیان نشود، از این رو در بسیاری از موارد، سنتز شیمیایی توالی‌های ژن می‌تواند بهترین انتخاب باشد (Li et al., 2013). در این پژوهش از تکنیک Assembly PCR و SOEing PCR برای سنتز ژن برازئین استفاده شد. این تکنیک به دلیل عدم نیاز به استفاده از آنزیم‌های برشی جهت ایجاد قطعه مورد نظر، مشکل محدودیت استفاده از آنزیم‌های برشی که در آزمایش‌های همسانه سازی وجود دارد را برطرف می‌سازد همچنین سبب کاهش مراحل همسانه سازی و صرفه جویی در هزینه می‌شود (Horton et al., 1989).

طراحی مناسب سازه‌های ژنی می‌تواند در دستیابی به عملکرد بالا در گیاهان تراریخت با به حداکثر رساندن میزان رونویسی و ترجمه کمک کند

از آنجاکه DNA اغلب به آسانی در دسترس نیست و یا توالی‌های طبیعی DNA ممکن است به صورت بهینه در سیستم‌های هترو لوگ، بیان نشود، از این رو در بسیاری از موارد، سنتز شیمیایی توالی‌های ژن می‌تواند بهترین انتخاب باشد (Li et al., 2013). در این پژوهش از تکنیک Assembly PCR و SOEing PCR برای سنتز ژن برازئین استفاده شد. این تکنیک به دلیل عدم نیاز به استفاده از آنزیم‌های برشی جهت ایجاد قطعه مورد نظر، مشکل محدودیت استفاده از آنزیم‌های برشی که در آزمایش‌های همسانه سازی وجود دارد را برطرف می‌سازد همچنین سبب کاهش مراحل همسانه سازی و صرفه جویی در هزینه می‌شود (Horton et al., 1989).

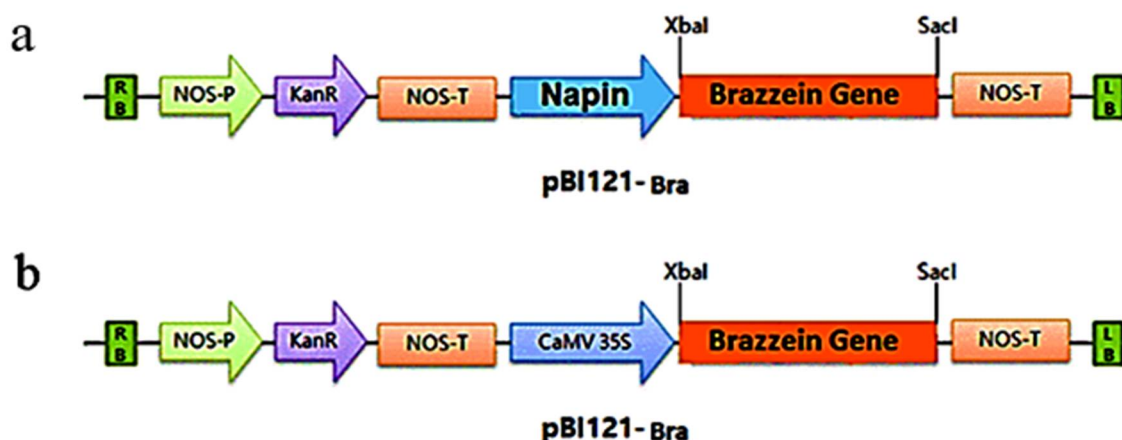
طراحی مناسب سازه‌های ژنی می‌تواند در دستیابی به عملکرد بالا در گیاهان تراریخت با به حداکثر رساندن میزان رونویسی و ترجمه کمک کند

یکی از مهم‌ترین جنبه‌ها در طراحی سازه استفاده از پیشبرهایی است که برای بیان تراژن استفاده می‌شود (Stoger et al., 2005). در این پژوهش پیشبر ویروس موزایک گل کلم 35S (CaMV) به کار برده شده است، چرا که یک پیشبر قوی و عمومی است، اما در برخی از آزمایش‌ها این پیشبر فعالیت کمی در غلات نشان داده است (Stoger et al., 2005). از آنجایی که در بسیاری از موارد بیان عمومی پروتئین نو ترکیب سبب رشد ضعیف گیاه می‌شود و این امر بازدهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hood et al., 2003)، استفاده از پیشبرهایی که سبب بیان ژن در بافت خاصی از گیاه می‌شوند، می‌تواند سودمند باشد. در میان تمام بافت‌های گیاهی تولید پروتئین‌های نو ترکیب در دانه به طور خاصی جذاب است زیرا دانه‌ها به منظور تسهیل در تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای در یک حجم کوچک و در یک

(Swarnalatha *et al.*, 2010). بنابراین در این تحقیق کلونینگ ژن برازئین در دو نوع پلاسمید pBI121 صورت گرفت که یکی از آنها با پیشبر عمومی CaMV35S و دیگری با پیشبر اختصاصی بذر Napin می‌باشد و از این‌رو سازه‌های ژنی مطابق با شکل (۷) تهیه شد. این کلون‌ها در نهایت برای بیان پروتئین برازئین در گیاه ذرت مورد استفاده قرار می‌گیرد چرا که ذرت یکی از اصلی‌ترین گیاهان برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب است.

محیط با ثبات، تکامل پیدا کرده‌اند (Stoger *et al.*, 2005). تحقیق‌های اخیر نشان داده است که پیشبرهای خاص دانه به‌طور کلی عملکرد بهتری را منجر شود (Lau & Sun, 2009).

Napin یک پیشبر اختصاصی بذر است که از ژن BcNA1 کلزا جداسازی شده است و در سطح بالایی در بذرهای در حال رشد کلزا بیان می‌شود و توانایی بیان اختصاصی در بذر در سیستم‌های بیگانه را نیز دارد از این‌رو در بسیاری از آزمایش‌های مهندسی ژنتیک مرتبط با بیان تراژن‌ها به‌کاربرده می‌شود



شکل ۷ - نمای شماتیک پلاسمید نو ترکیب pBI121-Bra. a: پلاسمید نو ترکیب pBI121-Bra با پیشبر Napin b: پلاسمید نو ترکیب pBI121-Bra با پیشبر CaMV35S

در گیاهان، نسبت به رفع این موانع گام برداشت.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره طرح ۹۰۰۰۷۲۹۰ انجام شده است.

نتیجه گیری

نظر به اهمیت پروتئین‌های سودمند و محدودیت دسترسی به منابع آنها جهت تولید اقتصادی در مقیاس بالا، می‌توان با استفاده از روش‌های سنتز مصنوعی ژن و همچنین بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی آن و تهیه سازه‌های ژنی مناسب با پیشبرهای قوی و اختصاصی جهت افزایش بیان پروتئین‌های نو ترکیب

منابع

- 1- Assadi-Porter, F.M., Aceti, D.J., & Markley, J.L. 2007. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. Protein Expression and Purification, 58(2):259-365.
- 2- Berlec, A., Jevnikar, Z., Majhenič, A., Rogelj, I., & Štrukelj, B. 2006. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 73(1):158-165.

- 3- Bo, C. 2007. Synthesize the plant sweet protein brazzein gene with overlapping PCR. *Journal of Biotechnology*, 17(4):43-45.
- 4- Faus, I. 2000. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2):145-151.
- 5- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *TRENDS in Biotechnology*, 22(7):346-353.
- 6- Hood, E.E., Bailey, M.R., Beifuss, K., Magallanes-Lundback, M., Horn, M.E., Callaway, E., Drees, C., Delaney, D.E., Clough, R., & Howard, J.A. 2003. Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnology Journal*, 1(2):129-140.
- 7- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., & Pease, L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77(1):61-68.
- 8- Jin, Z., Danilova, V., Assadi-Porter, F.M., Aceti, D.J., Markley, J.L. & Hellekant, G. 2003. Critical regions for the sweetness of Brazzein. *FEBS letters*, 544:33-37.
- 9- Jo, H.J., Noh, J.S., & Kong, K.H. 2013. Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expression and Purification*, 90(2):84-89.
- 10-Kim, C.H., Oh, Y., & Lee, T.H. 1997. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cell. *Gene*, 199:293-301.
- 11-Lamphear, B.J., Barker, D.K., Brooks, C.A., Delaney, D.E., Lane, J.R., Beifuss, K., & Howard, J.A. 2005. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. *Plant Biotechnology Journal*, 3(1):103-114.
- 12-Lau, O.S., and Sun, S.S. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology advances*, 27(6):1015-1022.
- 13-Li, G., Guo, A., & Fan, S. 2003. Cloning and expressing of brazzein gene. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 24(7):1271-1274.
- 14-Li, G., Dong, B.X., Liu, Y.H., Li, C.J., & Zhang, L.P. 2013. Gene synthesis method based on overlap extension PCR and DNAWorks Program. P. 9-17. In K.M. Polizzi & C. Kontoravdi (eds.) *Synthetic Biology*. Chapter 2. Humana Press.
- 15-Mansouri, F., Modarressi, M.H., Abolhassani, M., & Parivar, K. 2011. Synthesis and production of Sweet-tasting protein in *E. coli* and purification by amylose resin. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 22:105-110.
- 16-Ming, D., & Hellekant, G. 1994. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS letters*, 355(1):106-108.
- 17-Peeters, K., De-Wilde, C., & Depicker, A. 2001. Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 268(15):4251-4260.
- 18-Sambrook, P. Maccallum, D. Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual third ed.*, Cold Springs Harbour Press, New York, 2001. p. 2344.
- 19-Stoger, E., Ma, J.K., Fischer, R., & Christou, P. 2005. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2):167-173.
- 20-Swarnalatha, I., Dinesh kumar, V., Ansari, N.A., & Sivasankar, A. 2010. Studies on the expression pattern of seed-specific napin promoter (BcNAI) in transgenic (*Nicotiana tabacum* L.) tobacco seeds. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1(1):20-23.
- 21-Temussi, P. 2006. The history of sweet taste: not exactly a piece of cake. *Journal of Molecular Recognition*, 19(3):188-199.

-
- 22-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):570-578.
- 23-Xiong, A.S., Yao, Q.H., Peng, R.H., Zhang, Z., Xu, F., Liu, J.G., & Chen, J.M. 2006. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5):1039-1047.
- 24-Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J., & Zuker, C.S. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3):255-266.
- 25-Zhang, P., Ding, Y., Liao, W., Chen, Q., Lee, H., Qi, P., & Pan, W. 2013. A simple, universal, efficient PCR-based gene synthesis method: Sequential OE-PCR gene synthesis. *Gene*, 524(2):347-354.

Artificial Synthesis and Cloning of the Sweet-tasting Protein Brazzein Coding Gene

Shima Karami¹, Khadije Bagheri^{2*}, Vahab Jafarian³

1- M.Sc. Graduated Student of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

2- Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

* Corresponding author (khabagheri2001@yahoo.com)

3- Assistant Professor of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Iran

Abstract

Today, sucrose intake caused problems for people's health. So, the demand for low-caloric natural sweeteners with good taste properties such as sweet proteins increased. Among the sweeteners, Brazzein is an attractive alternative to sucrose. Because of its intense sweetness, natural origin and good stability. Brazzein was isolated from the fruit of the African plant *Pentadiplandra hrazzeana* Baillon, that is impractical to produce economically on a large scale. Therefore, widespread commercial production of this protein will probably require the transfer of protein expression to a heterologous system by means of recombinant DNA technology. In this study, due to the unavailability of genome of *P. brazzeana* Baillon plant for Brazzein gene isolation, artificial synthesis of Brazzein gene was done by the assembly of PCR and SOEing PCR. Amino acid sequence of Brazzein protein was translated to 162 nucleotides based on the preferred codon usage of maize using the Emboss Backtranseq program. Then, by using six overlapping primers in five consecutive PCR reactions Brazzein gene sequence was synthesized. The results of the PCR reaction showed accuracy. Then the synthetic fragment was cloned into pBI121 plant expression vectors that contained a constitutive promoter CaMV35S and seed-specific promoter Napin, which was confirmed by nucleotide sequencing.

Keywords: Brazzein, Gene synthesis, pBI121, Protein sweetener