

طراحی و ساخت ناقل بیانی ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی برای قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus*

Design and Construction of Human Tissue Plasminogen Activator Expression Vector for The White Button Mushroom, *Agaricus bisporus*

محسن اشرفی^{۱*}، محمد فارسی^۲، امین میرشمسی کاخکی^۳ و مژگان پروندی^۴

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۰۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۵

چکیده

سیستم گلیکوزیلاسیون قارچ دکمه‌ای سفید مشابهت زیادی با سلول‌های پستانداران دارد و سبب شده است تا این قارچ برای بیان پروتئین‌های نوترکیب گلیکوزیله، از جایگاه قابل توجهی برخوردار گردد. فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای گلیکوزیله است که سبب از بین رفتن لخته‌های خونی می‌شود. راه‌انداز *gpdII* نژادهای IM008 و Holland737 قارچ دکمه‌ای سفید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و با قرار گرفتن راه‌انداز *gpdII* نژاد IM008 پیش از ژن گزینشگر *hph* پلاسمید pCAMBIA1304، سازه pCAMBIAH8 ساخته شد. با انتقال قطعات *gLI7* و *gLI8* (به ترتیب حاصل اتصال راه‌انداز *gpdII* نژادهای Holland737 و IM008 به اینترون شماره هفت ژن *gpdIII* و توالی ترشحی ژن *لاکاز 1* می‌باشند) به سازه pCAMBIAH8، سازه‌های بیانی p13H87 و p13H88 طراحی و ساخته شدند. سرانجام با ورود ژن *tPA* به سازه‌های p13H88 و p13H87، سازه‌های بیانی p13H87T و p13H88T ایجاد شدند. سازه‌های ایجاد شده را می‌توان برای تولید tPA و همچنین برنامه‌های بهبود نژادی قارچ دکمه‌ای سفید مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: اینترون، پروتئین نوترکیب، توالی ترشحی، راه‌انداز *gpdII*، قارچ دکمه‌ای سفید

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲، ۳ و ۴. به ترتیب استاد، استادیار و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
*: نویسنده مسوول
Email: abje64@gmail.com

مقدمه

سازی و بیان شده است که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. از آنجایی که سیستم گلیکوزیلاسیون قارچ دکمه‌ای سفید شباهت زیادی به سیستم گلیکوزیلاسیون پستانداران دارد، این قارچ گزینه‌ای مناسب برای تولید پروتئین‌های هترولوگ گلیکوزیله می‌باشد و در سال‌های اخیر به‌عنوان یک منبع مهم تولید دارو به شمار رفته است برنز و همکاران (Burns et al., 2006).

به‌منظور انتقال ژن به قارچ دکمه‌ای سفید از راه‌اندازهای متعددی استفاده شده است (برنز و همکاران، 2006). در ارتباط با انتخاب راه‌انداز مورد استفاده پارامترهای خاصی باید مدنظر قرار گرفته شود و که به اهداف فرآیند مهندسی بستگی دارند. برای مثال هرچند که بیان پایدار با استفاده از راه‌اندازهای ویروسی، مقادیر بالایی از پروتئین هدف را تولید می‌کند، ولی در برخی موارد اثرات زیان‌باری از قبیل خاموشی ژن از طریق هم سرکوبی را سبب می‌شود. استفاده از راه‌اندازهای همولوگ خانه‌دار نیز امکان‌پذیر می‌باشد به‌طوری‌که در مورد این راه‌اندازها خاموشی کمتر مشاهده می‌شود/سارد و همکاران (Lessard et al., 2000).

چن و همکاران (Chen et al., 2000) با استفاده از سه راه‌انداز *gpd* قارچ *A. bisporus*، *trpC* قارچ *Aspergillus nidulance* و *35S* ویروس موزاییک کلم (CaMV) قارچ دکمه‌ای سفید را تراریخته کرده‌اند. میزان تراریختی با راه‌اندازهای مذکور به ترتیب ۱۵، یک و صفر درصد می‌باشد. این آزمایش نشان‌دهنده نقش راه‌انداز *gpd* در میزان تراریختی قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشد.

در آزمایش دیگری برنز و همکاران (2006) با استفاده از راه‌اندازهای *gpdII*، *trp2* و *lcc1* قارچ *A. bisporus*، *gpdA* قارچ *Aspergillus nidulance* و *trp1* و *βtub* قارچ *Coprinus cinereus*، ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز *B* را به قارچ دکمه‌ای سفید منتقل کردند و کارایی راه‌اندازهای مذکور را در میزان بیان ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز *B* انتقال یافته به این قارچ مورد مقایسه قرار دادند. همچنین آن‌ها به این نتیجه رسیدند که راه‌انداز همولوگ *gpdII* و راه‌انداز هترولوگ *gpdA* با درصد تراریختی به ترتیب ۸۰/۴ و ۴۰/۹ بهترین راه‌اندازها برای تراریزش ژنتیکی قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشند و در این میان دو راه‌انداز *trp2* و *lcc1* با وجود همولوگ بودن، میزان پایینی از تراریختی را (۲۴/۸) و صفر به ترتیب برای *trp2* و *lcc1* سبب شدند. از طرف دیگر سایر راه‌اندازهای هترولوگ قارچ‌های تراریختی تولید نکردند.

اینترن‌ها و توالی ترشچی نیز به‌عنوان عوامل تأثیرگذار بر

باوجود ارزش اقتصادی و اهمیت بیوتکنولوژیکی فراوان قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، روش‌های اصلاحی برای به‌کارگیری پتانسیل‌هایی از این قبیل کارساز نبوده و با چالش‌هایی مواجه است. بزرگ‌ترین و جدی‌ترین مشکل در برنامه‌های اصلاحی *A. bisporus* چرخه زندگی هموتالیک ثانویه آن است (فارسی و پوریان‌فر، ۱۳۹۰)؛ لذا اصلاح نژاد در این گونه به‌دلیل تنوع ژنتیکی بسیار پایین در بین لاین‌های تجاری موجود، راندمان چندانی ندارد هورگن و کاستل (Horgen and Castle, 2002). در این‌گونه موارد، یکی از راه‌های جایگزین روش‌های اصلاحی سنتی، تراریختی ژنتیکی می‌باشد. ایجاد واریته تراریخته می‌تواند اهداف متفاوتی از جمله بهبود خصوصیات زراعی آن واریته و یا تولید محصولی خاص، مانند پروتئین‌های نو ترکیب را دنبال کند. هدف از تحقیق حال حاضر ایجاد سازه بیانی ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) انسانی جهت انتقال به قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشد.

فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی یک سرین پروتئاز ۶۸-۶۳ کیلو دالتونی می‌باشد که سبب از بین رفتن لخته‌های خونی می‌شود. این پروتئین در حالت نابالغ خود (pro tPA) از ۵۶۲ اسیدآمینه تشکیل شده که ۲۲ اسیدآمینه انتهای N آن مربوط به توالی ترشچی است. حذف ۱۳ اسیدآمینه‌ای که در جایگاه ۲۳ تا ۳۵ انتهای N، tPA نابالغ قرار دارند برای ایجاد شکل فعال (۵۲۷ اسیدآمینه) این پروتئین ضروری می‌باشد. این پروتئین یک پروتئین گلیکوزیله است که در سه جایگاه N-گلیکوزیله می‌شود برگ و گریننل؛ معصومی اصل و همکاران (Berg and Grinnell, 1991; Masoumiasl et al., 2010)

ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی در موجودات مختلفی از جمله باکتری *Escherichia coli* داتار و همکاران؛ گریفیتز و اکترا (Datar et al., 1993; Griffiths and Electricwala, 1987)، مگس میوه *Drosophila melanogaster* رُوف و همکاران (Rouf et al., 1996)، حشره *Spodoptera frugiperda* جارویس و سامرز (Jarvis and Summers, 1989)، مخمر نان *Saccharomyces cerevisiae* رُوف و همکاران (1996)، قارچ‌های رشته‌ای *Aspergillus nidulans* آپشال و همکاران (Upshall et al., 1987) و *Aspergillus niger* و همکاران (Wiebe et al., 2001)، پروتوزوای *Leishmania tarentolae* سلیمانی و همکاران (Soleimani et al., 2006)، گیاه تنباکو (معصومی اصل، 2010)، ریشه‌های مویین گیاه تخم‌گذار *Cucumis melo* کانگ و همکاران (Kang et al., 2011) و مرغ تخم‌گذار *کالری* و همکاران (Kaleri et al., 2011) همسانه-

از شرکت (Fermentas, USA) تهیه گردیدند. برش و اتصال قطعات طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم‌ها انجام گرفت.

انجام الکتروفورز، جداسازی قطعات از ژل آگارز و انتخاب کلنی‌های باکتریایی

تمامی قطعات بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از جداسازی محصولات حاصل از برش آنزیمی از روی ژل آگارز ۱٪ واکنش اتصال طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت، سپس سازه حاصل با روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد انتقال داده شد (سامبروک و راسل، ۲۰۰۱). باکتری‌های تراریخت شده بر روی محیط کشت LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (برای ناقل‌های همسانه‌سازی (+) pBluescript II SK و pTZ57R) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (برای ناقل بیانی pCambia1304 و مشتقات بعدی آن که در این آزمایش ایجاد شدند) به‌عنوان عامل انتخاب‌گر کشت داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و ساخت سازه‌ها

جداسازی راه‌انداز gpdII008 و ساخت سازه pBlue8
راه‌انداز gpdII قارچ دکمه‌ای سفید نژاد IM008 (GI: 751371698) توسط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (F1) gpdII و (R1) gpdII (جدول ۱) و DNA ژنومی قارچ دکمه‌ای سفید خالص‌سازی شده با روش CTAB تغییر یافته (چلوآفرش، ۱۳۹۰) به‌عنوان الگو، جداسازی شد. شرایط دمایی و زمانی مورد استفاده عبارت است از: واسرشت-سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در ۵۲°C به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز رشته در ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه (تکرار سه بار آخر به تعداد ۳۰ سیکل) و در انتها سنتز نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. آنزیم DNA پلی‌مراز مورد استفاده در واکنش بر اساس نسبت ۴:۱ آنزیم‌های Taq: Pfu تهیه شده است.

محصول PCR خالص شده با کیت خالص‌سازی محصول PCR و پلاسمید (+) pBluescript II SK، توسط آنزیم‌های برشی *BstXI* و *PstI* برش داده شدند و با همسانه‌سازی راه‌انداز به درون پلاسمید (+) pBluescript II SK، سازه pBlue8 ساخته شد. جهت تأیید سازه وارد شده به باکتری‌های ترانسفورم شده، الگوی PCR بر روی کلنی‌های باکتریایی انتخابی مورد استفاده قرار گرفت.

میزان تولید و ترشح پروتئین مطرح هستند (سارد و همکاران، ۲۰۰۰). هرچند سازوکار مربوط به اینترون‌ها کاملاً مشخص نیست، اما تلفیق این نواحی به درون ترانس-ژن اثر افزایش‌دهنده‌ای بر بیان ژن به همراه دارد. همچنین برخی از اینترون‌ها دارای توالی افزایش‌دهنده یا راه‌انداز جایگزین می‌باشند، درحالی‌که برخی از انواع دیگر سبب تجمع mRNA در فرایندهای مختلفی که افزایش به واسطه اینترون (IME) نامیده می‌شود، خواهند شد. اینترون‌های IME می‌بایست در درون توالی رونویسی شونده در نزدیکی کدون آغاز یعنی در مکان اصلی خود قرار بگیرند تا سبب افزایش بیان شوند رز (Rose, 2008).

استرن و همکاران (Stern et al., 2007) با تغییر توالی ترشچی ژن لوسیفراز با تعدادی از توالی‌های ترشچی با منشأ مختلف مشاهده کردند که بیان ژن تا صد برابر تغییر می‌کند و بیش‌ترین سطح بیان و ترشح مربوط به توالی ترشچی ژن لوسیفراز (توالی ترشچی دست‌کاری نشده) بوده است. در تحقیق دیگری با تعویض توالی ترشچی گلیکوپروتئین‌های E1 و E2 ویروس هپاتیت C با توالی ترشچی ژن *tPA* و لوسیفراز و بیان آن در سلول‌های پستانداران، میزان بیان و ترشح افزایش یافت ولی تأثیری بر روی گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های تولیدی نداشت و همکاران (Wen et al., 2011). در این تحقیق جهت بیان بهتر ژن‌های انتقالی به قارچ دکمه‌ای سفید و بهبود درصد تراریزش آن، از راه‌انداز gpdII استفاده شد. علاوه بر این راه‌انداز، اینترون شماره ۷ ژن *gpdII* و توالی ترشچی ژن لاکازا قارچ دکمه‌ای سفید نیز به ترتیب جهت افزایش بیان و افزایش ترشح پروتئین *tPA* در ساخت سازه بیانی مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد روش‌ها

باکتری، نژادهای قارچی و ناقل‌های پلاسمیدی

در این تحقیق از باکتری *E. coli* نژاد DH5 α استفاده شد. دو نژاد قارچ دکمه‌ای سفید به نام‌های IM008 و Holland737 و همچنین ناقل بیانی pCambia1304 و ناقل‌های همسانه‌سازی (+) pBluescript II SK و pTZ57R تغییر یافته نیز مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت کشت باکتری، تهیه باکتری مستعد و انتقال پلاسمید به باکتری‌های مستعد محیط کشت LB استفاده شد. استخراج DNA پلاسمیدی بر اساس روش سامبروک و راسل صورت گرفته است (سامبروک و راسل، Sambrook and Russell, 2001). آنزیم‌ها و محلول‌های موردنیاز برای واکنش PCR و هضم DNA از شرکت (Vivantis, Malaysia) و آنزیم T4 لیگاز

جداسازی ژن *hph* به‌عنوان DNA پلی‌مراز، جداسازی شد. ژن *hph* (پس از خالص‌سازی با کیت خالص‌سازی محصول PCR) و سازه pBlue8 ساخته‌شده در مرحله قبل توسط آنزیم‌های برشی *XhoI* و *PstI* برش داده شدند و پس از خالص‌سازی از ژل آگارز، با همسانه‌سازی ژن *hph* به پلاسمید pBlue8، سازه pBlueH8 ایجاد شد. جهت تأیید سازه وارد شده به باکتری‌های ترانسفورم شده، الگوی PCR بر روی کلنی‌های باکتریایی انتخابی مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی ژن *hph* و ساخت سازه pBlueH8
ژن *hph* پلاسمید pCAMBIA1304 به‌وسیله PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *hph* (F) و *hph* (R) (جدول ۱) و شرایط دمایی و زمانی، واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در ۵۳°C به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز رشته در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه (تکرار سه دمای آخر به تعداد ۳۰ سیکل) و در نهایت سنتز نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه و نسبت ۴:۱ آنزیم‌های

جدول ۱: آغازگرها و توالی‌های سنتزی مورد استفاده تحقیق حاضر

Table 1: Primers and synthesised sequences used in this research

توالی Sequence	نام Name
<i>XhoI</i> 5'-CACATCTCGAGTTCGGCATCTA-3'	<i>hph</i> (F)
<i>PstI</i> 5'-GCACCTGCAGATGAAAAAGCC-3'	<i>hph</i> (R)
<i>BstXI</i> 5'-CTGCCACCATGTTGGTAATTCAGAGGTCCGC-3'	gpdII (F1)
<i>PstI</i> 5'-ATAGCACCTGCAGCGATAAG-3'	gpdII (R1)
<i>EcoRI</i> 5'-GAAGAAGAATTCAGAGGTCCGC-3'	gpdII (F2)
<i>NcoI</i> 5'-AGACAAACCATGGCGATAAGC-3'	gpdII (R2)
<i>BamHI</i> 5'-AACTAATGGATCCATGCCCG-3'	tPA (F)
<i>BstEII</i> 5'-TAAGGTGACCTCACGGTCGCATGTTGTACGAATCCAGTCTAGGTAGTTAGTAAC-3'	tPA (R)
<i>PstI</i> 5'-TTTCTGCAGAGGCTGTCCAACGCTTTAGTATTGGTCGCCGCATGCATTTCAGTGTAGTTGCGAGCCAGGGGATCCATA-3'	Lac ss (F)
<i>BamHI</i> 5'-TATGGATCCCCTGGCTCGCAACTACACTCGAAATGCATGCGGCGACCAATACTAAAGCGTTGGACAGCCTCTGCAGAGAAA-3'	Lac ss (R)
<i>NcoI</i> 5'-TACCCATGGTGCCTTATCGATGCGAGCAAGCAATCATTATCTTCTGATGTTTCTGCAGAGG-3'	Int ss (F)
<i>PstI</i> 5'-CCTCTGCAGAAACATCAGAAGATATGAATGATTGCTTGCTCGCATCGATAACGCCATGGGTAC-3'	Int ss (R)

جداسازی راه‌انداز *gpdII* نژادهای IM008 و Holland737

و ساخت سازه‌های pT7 و pT8

راه‌انداز *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید نژادهای IM008 و Holland737 (GI:751371697) توسط PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2) (جدول ۱) بر روی DNA خالص‌سازی شده قارچ دکمه‌ای سفید (چلوارفروش، ۱۳۹۰) به‌عنوان الگو و با شرایط دمایی و زمانی، واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در ۵۲°C به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز رشته در ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه (تکرار سه دمای آخر به تعداد ۳۰ سیکل) و در انتها سنتز نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه و نسبت ۴:۱ آنزیم‌های Taq: Pfu به‌عنوان DNA پلی-مراز، جداسازی شدند.

محصول PCR و پلاسمید pTZ57R تغییریافته توسط آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *NcoI* برش خوردند و پس از

ساخت سازه pCAMBIAH8

پلاسمیدهای pBlueH8 و pCAMBIA1304 توسط آنزیم‌های برشی *XhoI* و *BstXI* برش داده شدند. قطعه حاصل از برش پلاسمید pBlueH8 با طول ۱۳۰۰ bp که دارای ژن *hph* و راه‌انداز *gpdII* می‌باشد، gH8 نامیده می‌شود. سپس با خالص‌سازی قطعات موردنظر از ژل آگارز و همسانه‌سازی قطعه gH8 به درون پلاسمید pCAMBIA1304، سازه pCAMBIAH8 ایجاد گردید. جهت تأیید ورود سازه حاصل به باکتری‌های ترانسفورم شده و همچنین درستی سازه به‌ترتیب از الگوی PCR با پرایمرهای *gpdII* (F1) و *hph* (F) (جدول ۱) بر روی کلنی‌های باکتریایی و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *XhoI* و *BstXI* بر روی پلاسمید استخراج شده از باکتری‌های تأیید شده در مرحله قبل استفاده شد.

حاصل از هضم پلاسمیدهای pGLI7 و pGLI8 به ترتیب gLI7 و gLI8 نام‌گذاری شدند که نشان‌دهنده یکی شدن راه‌انداز، اینترون و توالی ترشچی می‌باشد. پس از خالص‌سازی قطعات موردنظر از ژل آگارز با اتصال قطعات gLI7 و gLI8 به سازه pCAMBIAH88 به ترتیب سازه‌های pCAMBIAH88 و pCAMBIAH87 ایجاد شدند. برای تأیید وجود این سازه‌ها در باکتری‌های ترانسفورم شده انتخابی الگوی هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI*، *XhoI* و *NcoI* مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی ژن *tPA* و ساخت سازه‌های p13H87T و p13H88T

جهت جداسازی ژن *tPA* (GI:28274637) بدون توالی ترشچی، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی *tPA* (F) و *tPA* (R) (جدول ۱) بر روی پلاسمید pTZ57R که ناقل cDNA این ژن می‌باشد، انجام گرفت. شرایط دمایی و زمانی به کار گرفته شده عبارت است از: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در ۵۳°C به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز رشته در ۷۲°C به مدت ۱۰۰ ثانیه (تکرار سه دمای آخر به تعداد ۳۰ سیکل) و در انتها سنتز نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. نسبت ۴:۱ آنزیم‌های Taq:Pfu به‌عنوان آنزیم پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت.

ژن *tPA* و سازه‌های pCAMBIAH88 و pCAMBIAH87 ساخته شده در مرحله قبل توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *BstEII* برش داده شدند و سپس از ژل آگارز خالص‌سازی شدند. با وارد کردن ژن *tPA* به سازه‌های pCAMBIAH88 و pCAMBIAH87 به ترتیب سازه‌های p13H88T و p13H87T به وجود آمدند. جهت تأیید اتصال صحیح قطعات و ایجاد سازه دارای ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی با راه‌انداز و اینترون *gpdII* و همچنین توالی ترشچی لاکاز ۱، الگوی هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *EcoRI*، *XhoI*، *NcoI* و *PstI* مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

جداسازی راه‌انداز *gpdII008* و ساخت سازه *pBlue8*

محصول واکنش PCR بر روی DNA ژنومی قارچ دکمه‌ای سفید نژاد IM008 با آغازگرهای اختصاصی *gpdII* (F1) و *gpdII* (R1) پس از بارگیری بر روی ژل آگارز ۱٪ (شکل ۱) تکثیر راه‌انداز *gpdII* به طول ۲۹۰ نوکلئوتید را تأیید نمود. به‌منظور همسانه‌سازی این راه‌انداز محصول واکنش PCR پس از برش با آنزیم‌های *PstI* و *BstXI* به پلاسمید *pBluescript II* از برش SK(+) برش خورده با آنزیم‌های *PstI* و *BstXI* اتصال داده شد.

خالص‌سازی از روی ژل آگارز، واکنش اتصال راه‌اندازها به پلاسمید pTZ57R تغییر یافته انجام گرفت و سازه‌های pT7 و pT8 ایجاد شدند. جهت تأیید وجود این سازه‌ها در باکتری‌های ترانسفورم شده انتخابی واکنش هضم با آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت سازه *pTI7* و *TI8*

پس از دو رشته‌ای ساختن اینترون با برنامه دمایی ۸۵°C، ۶۰°C و ۳۵°C هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه، سازه‌های pT7 و pT8 و اینترون توسط آنزیم‌های برشی *NcoI* و *PstI* برش داده شدند. با وارد کردن اینترون به سازه‌های pT7 و pT8 به ترتیب سازه‌های pTI7 و pTI8 ایجاد شدند. وجود این سازه‌ها در باکتری‌های ترانسفورم شده با استفاده از واکنش هضم با آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* مورد تأیید قرار گرفتند.

ساخت سازه *pBlueL*

پس از دو رشته‌ای ساختن توالی ترشچی با برنامه دمایی ۸۵°C، ۶۰°C و ۳۵°C هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه، پلاسمید *pBluescript II SK (+)* و توالی ترشچی توسط آنزیم‌های برشی *PstI* و *BamHI* برش داده شدند. با اتصال توالی ترشچی به پلاسمید *pBluescript II SK (+)* سازه *pBlueL* تولید شد. جهت تأیید وجود این سازه در باکتری‌های ترانسفورم شده واکنش هضم با آنزیم‌های *XhoI* و *BamHI* مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت سازه‌های *pgLI7* و *pgLI8*

پلاسمیدهای *ptI7*، *ptI8* و *pBlueL* توسط آنزیم‌های برشی *PstI* و *EcoRI* برش داده شدند. قطعات حاصل از برش پلاسمیدهای *ptI7* و *ptI8* که دارای راه‌انداز و اینترون هستند، *gI7* و *gI8* نام‌گذاری شدند. پس از خالص‌سازی قطعات موردنظر از ژل آگارز قطعات *gI7* و *gI8* به سازه *pBlueL* وارد گشتند و به ترتیب سبب ایجاد سازه‌های *pgLI7* و *pgLI8* شدند. وجود این سازه‌ها در باکتری‌های ترانسفورم شده توسط واکنش هضم با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI* و همچنین واکنش توالی‌یابی با آغازگر T7 promoter (Bioneer, Korea) مورد تأیید قرار گرفتند.

ساخت سازه‌های بیانی و *pCAMBIAH87*

سازه‌های *pCAMBIAH87*، *pgLI7* و *pgLI8* توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *EcoRI* بریده شدند. قطعات ۳۵۰ نوکلئوتیدی

توسط آنزیم‌های برشی *BstXI* و *XhoI* همسانه‌سازی قطعه H8 (راه‌انداز *gpdII* و ژن *hph*) به درون پلاسمید pCAMBIA1304 صورت گرفت. الگوی هضم آنزیمی با آنزیم‌های *BstXI* و *XhoI* بر روی پلاسمید pCAMBIAH8 سبب ایجاد قطعات ۱۳۲۵ و ۱۰۴۸۱ نوکلئوتیدی شد که تأییدی بر ورود قطعه H8 به پلاسمید pCAMBIA1304 می‌باشد (شکل ۳).

جداسازی راه‌انداز *gpdII* نژادهای IM008 و Holland737 و ساخت سازه‌های pT7 و pT8

محصول واکنش PCR بر روی DNA ژنومی قارچ دکمه‌ای سفید نژادهای IM008 و Holland737 با آغازگرهای اختصاصی *gpdII* (R2) و *gpdII* (F2) (جدول ۱) پس از بارگیری بر روی ژل آگارز ۱٪ (شکل ۱) تکثیر راه‌انداز *gpdII* ۲۹۰ نوکلئوتیدی را تأیید نمود. برای همسانه‌سازی این راه‌انداز محصول واکنش PCR پس از برش با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *NcoI* به پلاسمید pTZ57R تغییر یافته برش خورده با آنزیم‌های *NcoI* و *EcoRI* اتصال داده شد. واکنش هضم با آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* بر روی سازه‌های pT7 و pT8 همانند انتظار سبب تولید قطعات ۲۹۹ و ۲۸۲۵ نوکلئوتیدی شدند که تأییدکننده ورود راه‌انداز *gpdII* به پلاسمید pTZ57R تغییر یافته می‌باشد (شکل ۴).

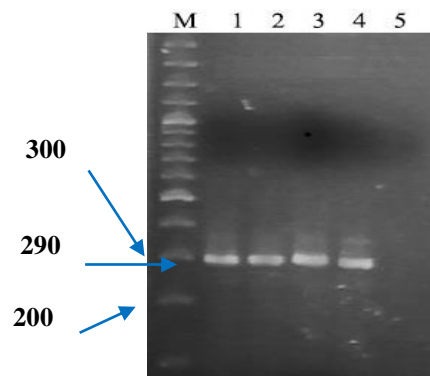
الگوی PCR با آغازگرهای اختصاصی *gpdII* (F1) و *gpdII* (R1) بر روی سازه pBlue8 و ایجاد قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی، تأییدکننده ورود راه‌انداز به پلاسمید pBluescript II SK(+) بود (شکل ۲).

جداسازی ژن *hph* و ساخت سازه pBlueH8

محصول واکنش PCR بر روی DNA پلاسمیدی pCAMBIA1304 با آغازگرهای اختصاصی *hph* (R) و *hph* (F) (جدول ۱) پس از بارگیری بر روی ژل آگارز ۱٪ (شکل ۲) تکثیر ژن *hph* به طول ۱۰۴۹ نوکلئوتید را تأیید نمود. به‌منظور همسانه‌سازی این راه‌انداز محصول واکنش PCR پس از برش با آنزیم‌های *BstXI* و *PstI* به پلاسمید pBlue8 برش خورده با آنزیم‌های *BstXI* و *PstI* اتصال داده شد. انجام واکنش PCR با آغازگرهای *gpdII* (F1) و *hph* (F) سبب تکثیر قطعه تقریباً ۱۳۰۰ نوکلئوتیدی شد که نشان‌دهنده ورود راه‌انداز به سازه pBlue8 می‌باشد (شکل ۳). این سازه دارای راه‌انداز *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (*hph*) می‌باشد.

ساخت سازه pCAMBIAH8

پس از برش پلاسمیدهای pCAMBIA1304 و pBlueH8



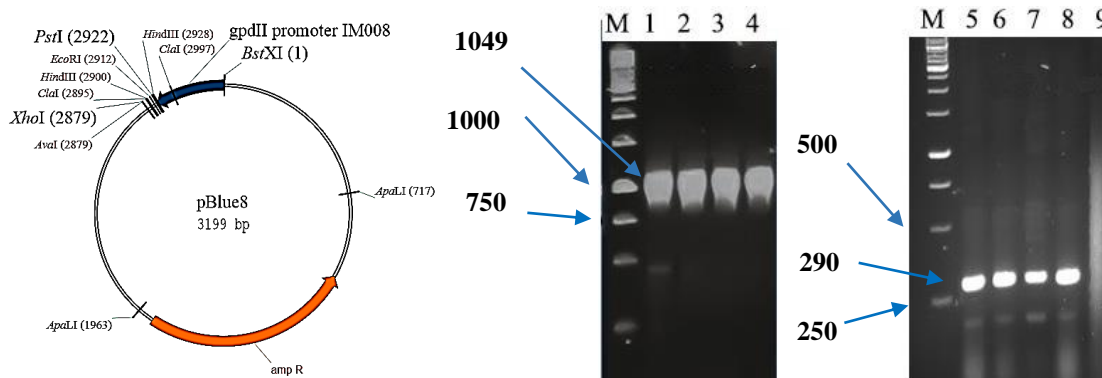
شکل ۱: تکثیر راه‌انداز *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید نژادهای IM008 و Holland737. (۱) محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F1) و *gpdII* (R1) بر روی DNA ژنومی نژاد IM008 و مشاهده قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار (۲) محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2) بر روی DNA ژنومی نژاد IM008 و مشاهده قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار (۳) محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F1) و *gpdII* (R1) بر روی DNA ژنومی نژاد Holland737 و مشاهده قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار (۴) محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2) بر روی DNA ژنومی نژاد Holland737 و مشاهده قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی مورد انتظار (۵) نمونه کنترل منفی (آب، آغازگرهای *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2)، نسبت ۴:۱ آنزیم‌های Taq: Pfu به‌عنوان DNA پلی‌مراز و بافر آن). (M) مارکر (100bp plus, Fermentas)

Fig. 1: Amplification of the button white mushroom strains IM008 and Holland737 *gpdII* promoter. (1) PCR product on starin IM008 genomic DNA by using *gpdII* (R1)/*gpdII* (F1) primer pair and observation of expected 290bp fragment. (2) PCR product on starin IM008 genomic DNA by using *gpdII* (R2)/*gpdII* (F2) primer pair and observation of expected 290bp fragment. (3) PCR product on starin Holland737 genomic DNA by using *gpdII* (R1)/*gpdII* (F1) primer pair and observation of expected 290bp fragment. (4) PCR product on starin Holland737 genomic DNA by using *gpdII* (R2)/*gpdII* (F2) primer pair and observation of expected 290bp fragment. (5) Negative control (water, *gpdII* (R2)/*gpdII* (F2) pimer pair, 4:1 ratio of Taq: Pfu polymerase as DNA polymerase and its buffer). (M) DNA ladder (100bp plus, Fermentas)

Holland737 و اینترون شماره ۷ ژن *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید و راه‌انداز *gpdII* نژاد IM008 و اینترون شماره ۷ ژن *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشند. ورود اینترون در سازه‌های pTI7 و pTI8 توسط هضم با آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* و ایجاد قطعات ۳۲۴ و ۲۸۲۶ نوکلئوتیدی تأیید شد (شکل ۴).

ساخت سازه‌های pTI7 و pTI8

پس از دو رشته‌ای کردن اینترون شماره ۷ ژن *gpdII* قارچ دکمه‌ای سفید این اینترون و پلاسمیدهای pt7 و pt8 توسط آنزیم‌های *NcoI* و *PstI* برش داده شدند و اینترون به پلاسمیدهای pt7 و pt8 وارد شد. سازه‌های حاصل pTI7 و pTI8 نام‌گذاری شدند که به ترتیب دارای راه‌انداز *gpdII* نژاد



شکل ۲: تکثیر ژن *hph* تأیید سازه pBlue8 توسط PCR و نمای شماتیک سازه pBlue8. چاهک‌های (۱-۲-۳-۴) تکرارهای محصول PCR با آغازگرهای *hph* (F) و *hph* (R) بر روی پلاسمید pCambia1304 و مشاهده قطعه تکثیر شده ژن *hph* به طول ۱۰۴۹ نوکلئوتید. تکرارهای محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2) بر روی سازه pBlue8 و مشاهده قطعه تکثیر شده *gpdII* نژاد IM008 به طول ۲۹۰ نوکلئوتید. (۹) نمونه کنترل منفی (پلاسمید (+) pBluescript II SK و آغازگرهای *gpdII* (F2) و *gpdII* (R2) آنزیم DNA Taq پلی‌مراز و بافر آن). (M) مارکر مولکولی (1Kb, Fermentas)

Fig. 2: Amplification of *hph* gene, confirmation of pBlue8 construct with PCR and schematic view of pBlue8 construct. Wells (1-2-3-4) are replicates of PCR product on pCambia1304 plasmid by using *hph* (F)/*hph* (R) primer pair and observation of expected 1049bp fragment of *hph* gene. Wells (5-6-7-8) are replicates of PCR product on pBlue8 construct by using *gpdII* (R2)/*gpdII* (F2) primer pair and observation of expected 290 bp fragment of IM008 *gpdII* promoter. (9) Negative control (pBluescript II SK (+) plasmid, *gpdII* (R2) and *gpdII* (F2) primers, Taq DNA polymerase and its buffer). (M) DNA ladder (1kb, Fermentas)

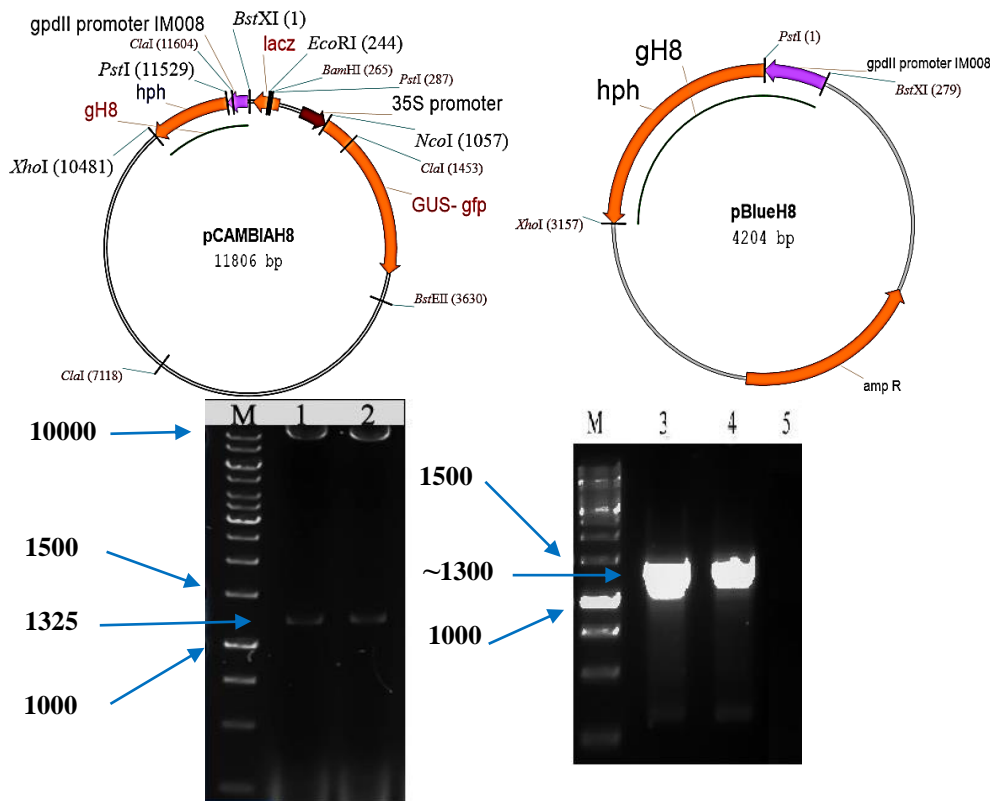
ساخت سازه‌های pgLI7 و pgLI8

قطعات gI7 و gI8 موجود در سازه‌های pTI7 و pTI8 توسط برش با آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* جداسازی شدند. سازه pBlueL نیز با آنزیم‌های برشی *PstI* و *EcoRI* برش خورد و قطعات gI7 و gI8 (راه‌انداز *gpdII* و اینترون شماره ۷ ژن *gpdII*) به سازه pBlueL وارد گردیدند و سازه‌های pgLI7 و pgLI8 ایجاد شدند. ورود قطعات gI7 و gI8 به سازه pBlueL توسط الگوی هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI* و ایجاد قطعات ۳۸۹ و ۲۹۴۲ نوکلئوتیدی و همچنین واکنش توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۶). واکنش توالی‌یابی که بر روی این سازه‌ها انجام شد نشان داد که سازه‌های حاصل دارای راه‌انداز *gpdII*، اینترون و توالی ترش‌چی می‌باشند که در جهت صحیحی نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند (داده‌ها نشان داده نشده).

اتصال توالی ترش‌چی به پلاسمید pBluescript II SK(+)

ساخت سازه pBlueL

پس از دو رشته‌ای کردن توالی ترش‌چی ژن لاکاز ۱ قارچ دکمه‌ای سفید، توالی ترش‌چی و پلاسمید pBluescript II SK (+) توسط آنزیم‌های *PstI* و *BamHI* برش داده شدند و توالی ترش‌چی به پلاسمید (+) pBluescript II SK اتصال داده شد. سازه حاصل pBlueL نام گرفت. الگوی هضم با آنزیم‌های *XhoI* و *BamHI* بر روی سازه pBlueL و ایجاد قطعات ۱۰۵ و ۲۹۱۱ نوکلئوتیدی مورد انتظار تأییدکننده ورود اینترون به پلاسمید (+) pBluescript II SK می‌باشد. الگوی هضم با آنزیم‌های *XhoI* و *BamHI* بر روی پلاسمید pBluescript II SK (+) به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت و قطعات ۵۰ و ۲۹۱۱ نوکلئوتیدی را ایجاد نمود (شکل ۵).

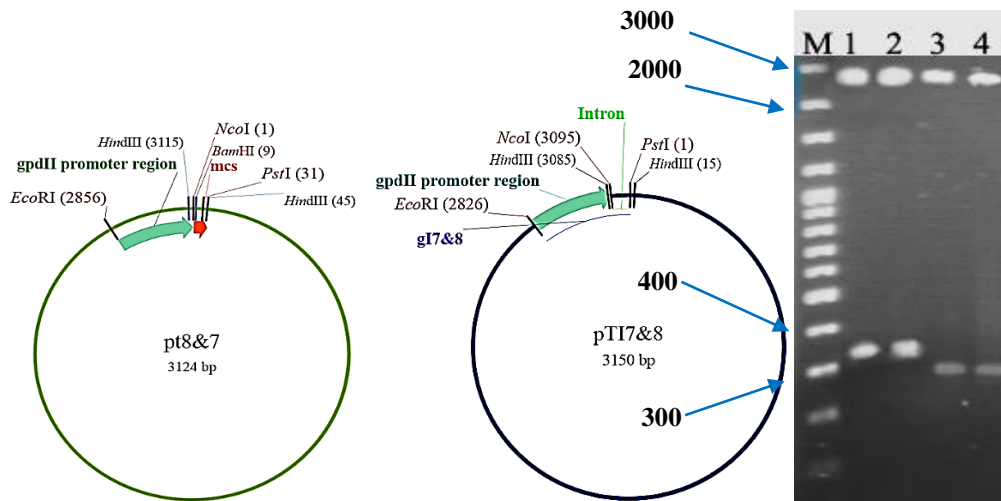


شکل ۳: تائید سازه‌های pCAMBIAH8 و pBlueH8 و ايجاد ژن *hph* و راه‌انداز *gpdII*. نمای شماتیک سازه‌های pBlueH8 و pCAMBIAH8 به همراه مکان اثر آنزیم‌های برشی نشان داده شده است. (۱-۲) تکرارهای هضم سازه pCAMBIAH8 با آنزیم‌های *XhoI* و *BstXI* و ایجاد قطعات ۱۳۲۵ و ۱۰۴۸۱ نوکلئوتیدی. (۳-۴) محصول PCR با آغازگرهای *gpdII* (F2) و *hph* (F) بر روی pBlueH8 و مشاهده قطعه تکثیر شده H8 به طول تقریباً ۱۳۰۰ نوکلئوتید. (۵) نمونه کنترل منفی (آب، آغازگرهای *gpdII* (F2) و *hph* (F) و آنزیم DNA Taq پلی‌مراز). (M) مارکر مولکولی (1Kb, Fermentas)

Fig. 3: Confirmation of pBlueH8 and pCAMBIAH8 constructs which contain *hph* gene and *gpdII* promoter and Schematic view of pBlueH8 and pCAMBIAH8 constructs with restriction enzymes site (RE). Wells (1-2) are replicates of enzymatic digestion of pCAMBIAH8 construct with *XhoI* and *BstXI* and observation of expected 10481 and 1325bp fragments. (3-4) PCR product on pBlueH8 construct by using *gpdII* (F2)/*hph* (F) primer pair and observation of 1300bp H8 fragment. (5) Negative control (water, *hph* (F)/*gpdII* (F) primer pair, Taq DNA polymerase and its buffer). (M) DNA ladder (1kb, Fermentas)

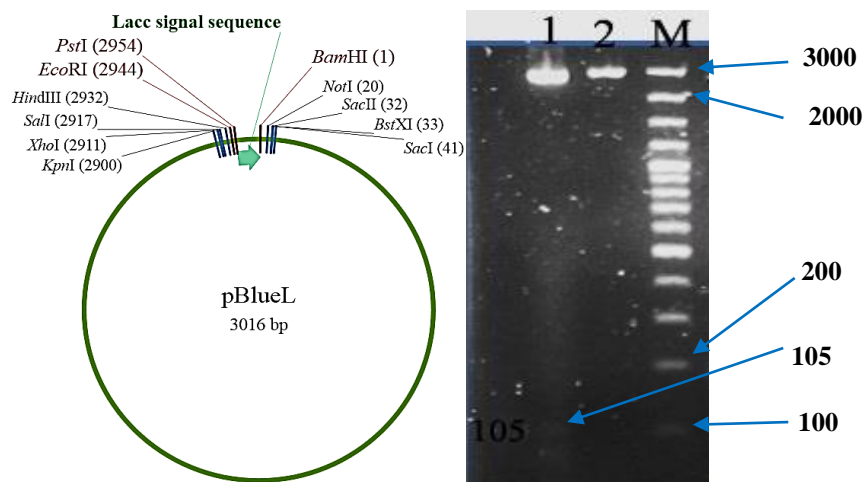
EcoRI و *BamHI* وارد شدند. ورود قطعات *gLI7* و *gLI8* به پلاسمید pCAMBIA1304 توسط هضم با آنزیم‌های *EcoRI*، *XhoI* و *NcoI* (شکل ۷) مورد تأیید قرار گرفت.

ساخت سازه‌های بیانی و pCAMBIAH88 و pCAMBIAH87
 قطعات *gLI7* و *gLI8* (پس از جداسازی از سازه‌های *pgLI7* و *pgLI8* توسط برش با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BamHI*) به پلاسمید pCAMBIA1304 برش خورده با آنزیم‌های برشی



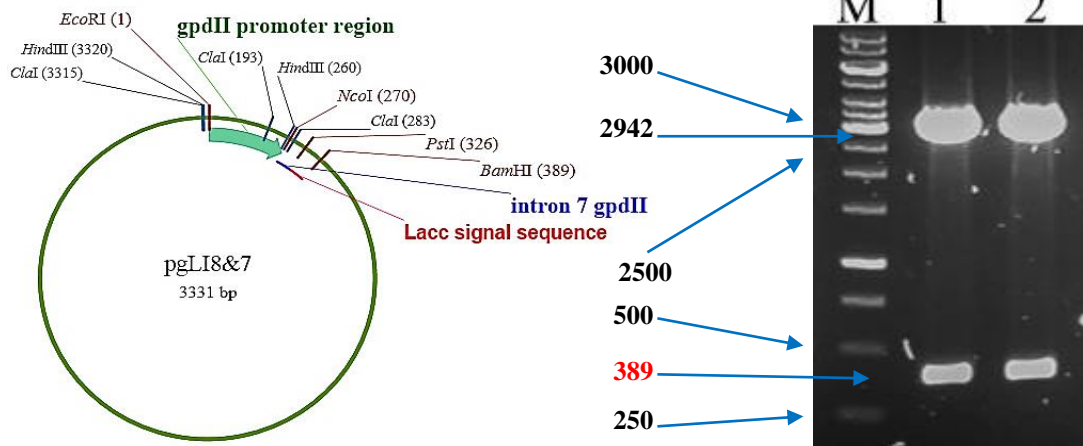
شکل ۴: تأیید سازه‌های pT7 و pT8 و سازه‌های pTI7 و pTI8 توسط الگوی هضم آنزیمی. جایگاه برشی آنزیم‌های *EcoRI* و *PstI* در شکل‌های شماتیک سازه‌های pT7، pT8، pTI7 و pTI8 نشان داده شده است. (۱) هضم آنزیمی سازه pTI7 با آنزیم‌های *EcoRI* و *PstI* و ایجاد قطعات ۳۲۴ و ۲۸۲۶ نوکلئوتیدی. (۲) هضم آنزیمی سازه pTI8 با آنزیم‌های *EcoRI* و *PstI* و ایجاد قطعات ۲۸۲۵ و ۲۹۹ نوکلئوتیدی. (۳) هضم آنزیمی سازه pT7 با آنزیم‌های *EcoRI* و *PstI* و ایجاد قطعات ۲۹۹ و ۲۸۲۵ نوکلئوتیدی. (۴) هضم آنزیمی سازه pT8 با آنزیم‌های *EcoRI* و *PstI* و ایجاد قطعات ۲۹۹ و ۲۸۲۵ نوکلئوتیدی. (M) مارکر مولکولی (100bp plus, Fermentas).

Fig. 4: Confirmation of pT7, pT8, pTI7 and pTI8 constructs with enzymatic digestion pattern. Restriction site of *EcoRI* and *PstI* are represented in schematic view of pT7, pT8, pTI7 and pTI8 constructs. (1) Obtained 324 and 2826bp fragments from enzymatic digestion of pTI7 construct with *EcoRI* and *PstI*. (2) Obtained 324 and 2826bp fragments from enzymatic digestion of pTI8 construct with *EcoRI* and *PstI*. (3) Obtained 299 and 2825bp fragments from enzymatic digestion of pT7 construct with *EcoRI* and *PstI*. (4) Obtained 299 and 2825bp fragments from enzymatic digestion of pT8 construct with *EcoRI* and *PstI*. (M) DNA ladder (100bp plus, Fermentas)



شکل ۵: تأیید سازه pBlueL و اجد توالی ترشچی ژن لاکاز ۱ توسط الگوی هضم آنزیمی. در شکل شماتیک سازه pBlueL جایگاه شناسایی آنزیم‌های *EcoRI* و *BstXI* نشان داده شده است. (۱) سازه pBlueL هضم شده با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BstXI* که سبب ایجاد قطعات ۱۰۵ و ۲۹۱۱ نوکلئوتیدی شد. (۲) هضم پلاسمید pBluescript II SK (+) با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *BstXI* به‌عنوان کنترل که قطعات ۵۰ و ۲۹۱۱ را تولید نمود (قطعه کوچک غیر واضح است). (M) مارکر مولکولی (100bp plus, Fermentas)

Fig. 5: Confirmation of pBlueL construct which contain *Laccase1* gene signal peptid with enzymatic digestion. Restriction site of *EcoRI* and *BstXI* are represented in schematic view of pBlueL construct. (1) Obtained 105 and 2911bp fragments from enzymatic digestion of pBlueL construct with *EcoRI* and *BstXI*. (2) Obtained 50 and 2911bp fragments from enzymatic digestion of pBlueL construct with *EcoRI* and *BstXI* as control (Smaller fragment is invisible). (M) DNA ladder (100bp plus, Fermentas)



شکل ۶: تأیید سازه‌های pgLI8 و pgLI7 توسط الگوی هضم آنزیمی. جایگاه برشی آنزیم‌های *EcoRI* و *BamHI* در شکل‌های شماتیک سازه‌های pgLI7 و pgLI8 نشان داده شده است. (۱) هضم آنزیمی سازه pgLI7 با آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* و ایجاد قطعات ۳۸۹ و ۲۹۴۲ نوکلئوتیدی. (۲) هضم آنزیمی سازه pgLI8 با آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* و ایجاد قطعات ۳۸۹ و ۲۹۴۲ نوکلئوتیدی. (M) مارکر مولکولی (1Kb, Fermentas)

Fig. 6: Confirmation of pgLI7 and pgLI8 constructs with restriction digestion pattern. Restriction site of *BamHI* and *EcoRI* are represented in schematic view of pgLI7 and pgLI8 constructs. (1) Obtained 389 and 2942bp fragments from enzymatic digestion of pgLI7 construct with *BamHI* and *EcoRI*. (2) Obtained 389 and 2942bp fragments from enzymatic digestion of pgLI8 construct with *BamHI* and *EcoRI*. (M) DNA ladder (1kb, Fermentas)

به دلیل یوکاریوت بودن توانایی ایجاد پیوندهای دی‌سولفید را دارند و تغییرات پس از ترجمه همچون گلیکوزیله شدن در آن‌ها بسیار مشابه انسان رخ می‌دهد ساندرز و همکاران (Saunders *et al.*, 1989). قارچ دکمه‌ای سفید جزء قارچ‌های رشته‌ای است و تا به امروز برای بیان پروتئین‌های نوترکیب گلیکوزیله مورد استفاده قرار نگرفته است. یکی از اولین گام‌ها در ایجاد موجودات تراریخت داشتن سازه بیانی مناسب می‌باشد.

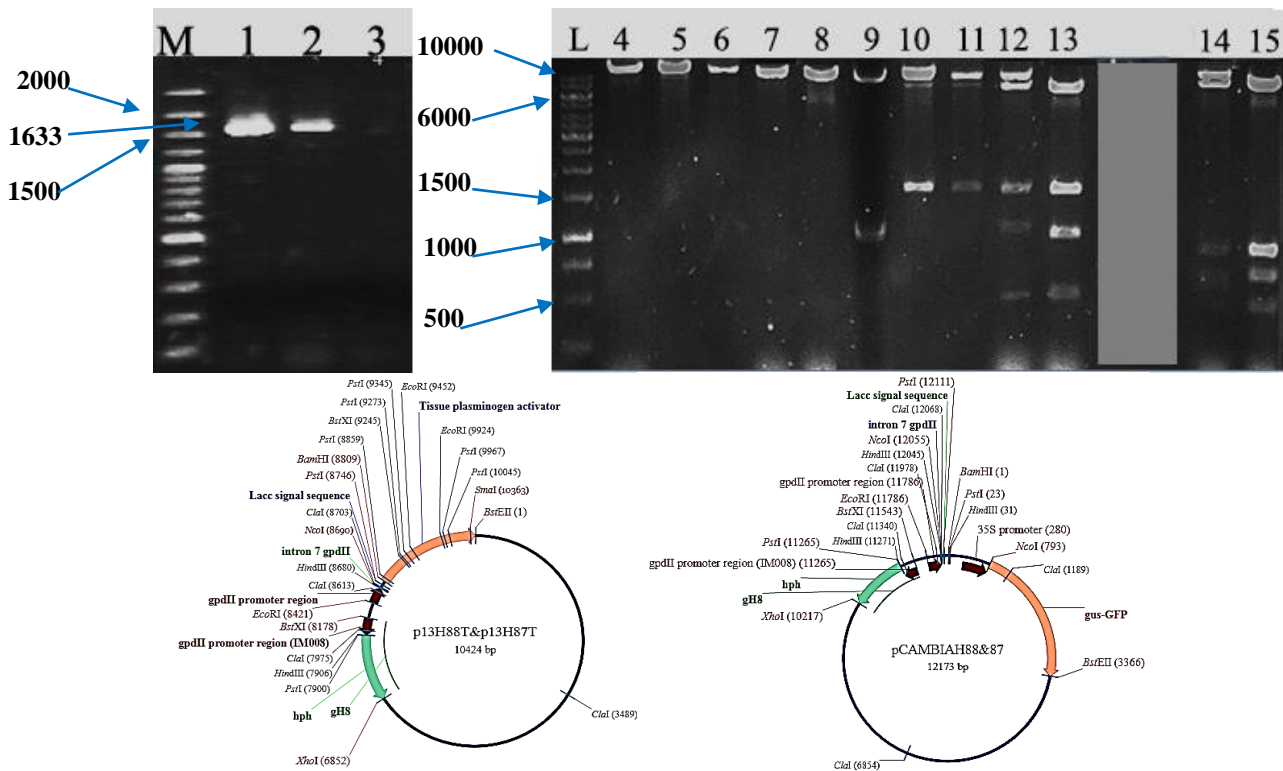
شاید بتوان گفت که راه‌انداز مهم‌ترین بخش یک سازه بیانی می‌باشد زیرا این قسمت سازه بیانی تعیین‌کننده زمان و مقدار بیان ژنی که تحت کنترل دارد، می‌باشد. برنر و همکاران (2006) اعلام کردند که راه‌انداز *gpdII* بهترین راه‌اندازی است که تا به امروز برای تراریخت کردن قارچ دکمه‌ای سفید مورد استفاده قرار گرفته است و همچنین *لسارد* و همکاران (2000) بیان کردند که خاموشی ژن از طریق هم سرکوبی در راه‌اندازهای همولوگ و خانه‌دار کمتر اتفاق می‌افتد، بنابراین راه‌انداز همولوگ و خانه‌دار *gpdII* برای بیان پروتئین *tPA* انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی ژن *tPA* و ساخت سازه‌های *p1H387T* و *p13H88T*

محصول واکنش PCR بر روی پلاسمید pTZ57R حاوی cDNA ژن *tPA* با آغازگرهای اختصاصی *tPA(F)* و *tPA(R)* (جدول ۱) پس از بارگیری بر روی ژل آگارز ۱٪ (شکل ۷) نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۱۶۳۳ نوکلئوتیدی مورد انتظار بود که همان ژن *tPA* بدون توالی ترش‌می‌باشد (شکل ۷). برای همسانه‌سازی ژن *tPA* محصول واکنش PCR پس از برش با آنزیم‌های *BamHI* و *BstEII* به سازه‌های بیانی *pCAMBIAH87* و *pCAMBIAH88* برش خورده با آنزیم‌های *BamHI* و *BstEII* وارد گردید. وجود ژن *tPA* در سازه‌های ساخته‌شده توسط الگوی هضم آنزیمی با آنزیم‌های *XhoI* و *EcoRI*، *NcoI*، *PstI* (شکل ۷) مورد تأیید قرار گرفت.

بحث

بیان پروتئین در سیستم بیانی قارچی ضمن بر خورداری از کارایی بالا، اقتصادی‌تر بوده و خیلی راحت‌تر از بیان در سلول‌های پستانداران می‌باشد. پروتئین‌های حاصل از قارچ، نگرانی‌های مربوط به آلودگی‌های بیولوژیکی پروتئین‌های حاصل از کشت سلول‌های جانوری را ندارد. قارچ‌های رشته‌ای



شکل ۷: تأیید سازه‌های pCAMBIAH87، pCAMBIAH88، p13H87T و p13H88T توسط الگوی هضم آنزیمی. جایگاه برشی آنزیم‌های *PstI* و *NcoI*، *EcoRI*، *XhoI* در شکل‌های شماتیک سازه‌های pCAMBIAH87، pCAMBIAH88، p13H87T و p13H88T نشان داده شده است. (۱ و ۲) تکرارهای محصول PCR بر روی cDNA ژن *tPA* موجود در پلاسمید pTZ57R با آغازگرهای tPA (F) و tPA (R) و مشاهده قطعه تکثیر شده tPA به طول ۱۶۳۳ نوکلئوتید. (۳) نمونه کنترل منفی (آب، آغازگرهای tPA (F) و tPA (R) و نسبت ۴:۱ Taq: Pfu به‌عنوان آنزیم‌های DNA پلی‌مراز). (۴) پلاسمید pCAMBIA1304 برش خورده با آنزیم *NcoI* و ایجاد شکل خطی پلاسمید به طول ۱۲۳۶۱ نوکلئوتید. (۵) سازه pCAMBIAH88 برش خورده با آنزیم *NcoI* و ایجاد شکل خطی پلاسمید به طول ۱۲۱۷۳ نوکلئوتید. (۶) سازه pCAMBIAH87 برش خورده با آنزیم *NcoI* و ایجاد شکل خطی پلاسمید به طول ۱۲۳۶۱ نوکلئوتید. (۷) سازه p13H88T برش خورده با آنزیم *NcoI* و ایجاد شکل خطی پلاسمید به طول ۱۲۳۶۱ نوکلئوتید. (۸) سازه p13H87T برش خورده با آنزیم *NcoI* و ایجاد شکل خطی پلاسمید به طول ۱۰۷۲۳ نوکلئوتید. (۹) سازه pCAMBIA1304 برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و ایجاد قطعات ۱۰۳۰، ۱۰۹۴ (به‌صورت یک قطعه دیده می‌شوند) و ۱۰۷۲۳ نوکلئوتیدی. (۱۰) سازه pCAMBIAH88 برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و ایجاد قطعات ۱۵۶۹ و ۱۰۶۰۴ نوکلئوتیدی. (۱۱) سازه pCAMBIAH87 برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و ایجاد قطعات ۱۵۶۹ و ۱۰۶۰۴ نوکلئوتیدی. (۱۲) سازه p13H88T برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و ایجاد قطعات ۴۷۲، ۱۰۳۱، ۱۵۶۹ و ۷۳۵۲ نوکلئوتیدی. (۱۳) سازه p13H87T برش خورده با آنزیم‌های *XhoI* و *EcoRI* و ایجاد قطعات ۴۷۲، ۱۰۳۱، ۱۵۶۹ و ۷۳۵۲ نوکلئوتیدی. (۱۴) سازه p13H88T برش خورده با آنزیم *PstI* و ایجاد قطعات ۷۲، ۷۸، ۱۱۳، ۸۴۶، ۶۲۲، ۴۱۴ و ۸۲۷۹ نوکلئوتیدی (سه قطعه کوچک غیرواضح است). (۱۵) پلاسمید p13H87T برش خورده با آنزیم *PstI* و ایجاد قطعات ۷۲، ۷۸، ۱۱۳، ۴۱۴، ۶۲۲، ۸۴۶ و ۸۲۷۹ نوکلئوتیدی (سه قطعه کوچک غیرواضح است). (M) مارکر مولکولی (100bp plus, Fermentas). (L) مارکر مولکولی (1kb, Fermentas)

Fig. 7: Confirmation of pCAMBIAH87, pCAMBIAH88, p13H87T and p13H88T constructs with restriction digestion pattern. Restriction site of *XhoI*, *NcoI*, *PstI* and *EcoRI* are represented in schematic view of pCAMBIAH87, pCAMBIAH88, p13H87T and p13H88T constructs. Wells (1-2) are replicates of PCR product on pTZ57R plasmid contain *tPA* gene cDNA by using tPA (F)/tPA (R) primer pair and observation of amplified 1633bp fragment of tPA. (3) Negative control (water, tPA (F)/tPA (R) primer pair, 4:1 ratio of Taq: Pfu polymerase as DNA polymerase and its buffer). (4) pCAMBIA1304 plasmid digested with *NcoI* and created a linearized 12361bp fragment. (5) pCAMBIAH88 construct digested with *NcoI* and created a linearized 12173bp fragment. (6) pCAMBIAH87 construct digested with *NcoI* and created a linearized 12361bp fragment. (7) p13H88T construct digested with *NcoI* and created a linearized 12361bp fragment. (8) p13H87T construct digested with *NcoI* and created a linearized 12361bp fragment. (9) Double digestion of pCAMBIA1304 plasmid with *XhoI* and *EcoRI* and obtaining 1030, 1094 and 10723bp fragments (the two small fragment seem as one fragment). (10) Obtained 1569 and 10604bp fragments from enzymatic digestion of pCAMBIAH88 construct with *XhoI* and *EcoRI*. (11) Obtained 1569 and 10604bp fragments from enzymatic digestion of pCAMBIAH87 construct with *XhoI* and *EcoRI*. (12) Obtained 472, 1031, 1569 and 7352bp fragments from enzymatic digestion of p13H88T construct with *XhoI* and *EcoRI*. (13) Obtained 472, 1031, 1569 and 7352bp fragments from enzymatic digestion of p13H87T construct with *XhoI* and *EcoRI*. (14) Obtained 72, 78, 113, 414, 622, 846 and 8279bp fragments from enzymatic digestion of p13H88T construct with *PstI* (Three smaller fragments are invisible). (15) Obtained 72, 78, 113, 414, 622, 846 and 8279bp fragments from enzymatic digestion of p13H87T construct with *PstI* (Three smaller fragments are invisible). (M) DNA ladder (100bp plus, Fermentas). (L) DNA ladder (1kb, Fermentas)

توالی ترش‌چی یکی دیگر از اجزای سازه بیانی ایجاد شده می‌باشد. با وجود آنکه توالی ترش‌چی در بین یوکاریوت‌های مختلف شناسایی می‌شود، اما توالی‌های ترش‌چی همولوگ و ترکیبی در برخی موارد بهتر از توالی‌های ترش‌چی هترولوگ عمل می‌کنند، البته عکس این موضوع نیز ممکن است رخ دهد. فوتاتسوموری و سوموتو (Futatsumori and Sumoto, 2010) نشان دادند که وجود اسیدهای آمینه با بار مثبت و اسیدهای آمینه قطبی به ترتیب در انتهای N و C توالی ترش‌چی کارآیی ترش‌چ را افزایش می‌دهد. با مقایسه توالی ترش‌چی ژن *tPA* و ژن *لاکاز 1* قارچ دکمه‌ای سفید مشخص شد که محل قرارگیری اسیدآمینه آرژنین (با بار مثبت) در توالی ترش‌چی ژن *لاکاز 1* نسبت به توالی ترش‌چی ژن *tPA* فاصله کمتری با انتهای N توالی ترش‌چی دارد و همچنین در انتهای C توالی ترش‌چی ژن *لاکاز 1* نسبت به توالی ترش‌چی ژن *tPA* تعداد اسیدهای آمینه قطبی بیشتری وجود دارد؛ بنابراین با توجه به اطلاعات موجود می‌توان این چنین نتیجه گرفت که با جایگزین کردن توالی ترش‌چی ژن *tPA* با توالی ترش‌چی ژن *لاکاز 1* قارچ دکمه‌ای سفید، کارآیی ترش‌چ پروتئین *tPA* تولید شده توسط این سازه بیشتر از حالت دست نخورده آن خواهد بود.

این ترونها نیز یکی دیگر از اجزای سازه‌های بیانی می‌باشند. آن‌ها ممکن است نقش‌های مختلفی از قبیل افزایش یا کاهش بیان ژن را سبب شوند و یا ممکن است هیچ اثری بر روی بیان ژن نداشته باشند. نقش حیاتی این ترونها که اغلب نادیده گرفته می‌شود این است که آن‌ها می‌توانند اثرات عمیقی بر روی بیان ژن داشته باشند. حذف این ترونها در توالی DNA ژنومی یک ژن، مانند cDNA (بدون حذف راه‌انداز و پایان‌دهنده) اغلب سبب کاهش بیان می‌شود. برعکس با افزودن یک این ترون به یک ژن که فاقد این ترون است صرف‌نظر از منشأ آن (یوکاریوتی یا پروکاریوتی) سبب افزایش بیان آن ژن خواهد شد (رز، 2008). در این تحقیق از cDNA ژن *tPA* استفاده شده که فاقد ۱۳ این ترونی که به صورت طبیعی در این ژن وجود دارد، می‌باشد لذا از این ترون شماره ۷ ژن *gpdIII* استفاده شد تا بیان این ژن در قارچ دکمه‌ای سفید افزایش یابد. همچنین طبق گزارش‌های چن و همکاران بیان ژن *gfp* در قارچ دکمه‌ای سفید به این ترون احتیاج دارد که دلیل آن را پردازش نامناسب RNA پیامبر و کدون ترجیحی ذکر کرده‌اند (چن و همکاران، 2000). لسارد و همکاران (2000) بیان کردند که این ترونها باید در بخش رونویسی شده ترانسکریپت ترجیحاً در درون توالی غیرقابل ترجمه ۵' قرار بگیرند تا سبب افزایش بیان ترانسکریپت گردند. برای ساخت این سازه این ترون شماره هفت ژن *gpdIII*

مورد استفاده قرار گرفت که در بین دیگر این ترونها این ژن از اندازه متوسطی برخوردار است. هنوز کارکرد این ترونها به خوبی مشخص نشده است، اما از آنجاکه این ژن یک ژن خانه‌دار است و بیان بالایی دارد، احتمال مثبت بودن تأثیرش در افزایش بیان ژن بیشتر از احتمال منفی بودنش است، به خصوص آنکه در ابتدای ۵' ژن *tPA* بلافاصله پس از کدون شروع ترجمه قرار داده شده است، همانند آنچه خود قارچ دکمه‌ای در طی زمان تکامل انتخاب کرده است. لذا با قرار دادن این این ترون در این سازه می‌توان از مزایای احتمالی این این ترون در افزایش بیان ژن بهره برد.

برگ و گرینتل (1991) گزارش کردند که توالی آمینواسیدی دخیل در تبدیل pro *tPA* به *tPA* بالغ با توالی Gly Ala Arg Ser در موقعیت‌های ۳۲ تا ۳۶ در انتهای C سیگنال پرو پپتیدی قرار دارند لذا جهش ایجاد شده در آمینواسید ۲۴ یعنی تبدیل گلوتامات (GAA) به گلیسین (GGG) در انتهای N سیگنال، در موقعیت ۲۴ انجام شده است تأثیری بر بیان و فرآیندهای پس از ترجمه پروتئین تولیدی نخواهد داشت. با تبدیل C به T در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۶۵۰ جهشی خاموش در توالی نوکلئوتیدی این ژن ایجاد شد تا جایگاه برشی آنزیم *BstEII* را که در مکانی ناخواسته درون ژن قرار داشت حذف شود که آن هم تأثیری بر بیان و فرآیندهای پس ترجمه‌ای این ژن نخواهد داشت زیرا تغییری در نوع آمینواسید ایجاد نشد. سازه‌های ساخته شده در این پروژه را می‌توان برای بیان ژن *tPA* به قارچ دکمه‌ای سفید انتقال داد. امید است با انتقال این سازه‌ها به قارچ دکمه‌ای سفید ژن *tPA* به خوبی بیان شود و از نظر بیولوژیکی نیز فعالیت داشته باشد و همچنین پروتئین تولیدی به واسطه این سازه‌ها علاوه بر میزان تولید و ترشح بالا، به خوبی گلیکوزیله شده باشد تا سبب ایجاد پاسخ‌های ایمنولوژیکی در انسان نشود.

همچنین سازه‌های ایجاد شده این توانایی را دارا می‌باشند تا در برنامه‌های بهبود نژاد قارچ دکمه‌ای سفید و بیان ژن در قارچ جوهری *Coprinus cinerea* استفاده شوند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از انستیتو پاستور ایران به دلیل در اختیار قرار دادن cDNA ژن *tPA* و مرکز زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد به دلیل در اختیار قرار دادن نژادهای قارچی سپاس‌گذاری می‌گردد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۹-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.