

## بهینه سازی کدون و همسانه سازی ژن پروکیموزین گاوی برای بیان مناسب در گیاه توتون

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

شهنام عزیزی درگاهلو، محمد احمدآبادی\*، رعنا ولی زاده کامران

Shahnam Azizi Dargahlou, Mohammad Ahmadabadi\*, Rana Valizadeh Kamran

به ترتیب، دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی

آذربایجان، تبریز، ایران

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Email: \*

[m.ahmadabadi@azaruniv.ac.ir](mailto:m.ahmadabadi@azaruniv.ac.ir); [ahmadabadiir@yahoo.com](mailto:ahmadabadiir@yahoo.com)

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

## چکیده

### واژه های کلیدی

آنزیم لخته کننده شیر،

ترجیح کدونی،

کیموزین نو ترکیب،

ناقل بیانی

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

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

**Abstract**

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

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

**مقدمه**

آنزیم کیموزین یکی از پروتئین‌های انعقاد کننده شیر است که در صنعت لبنیات برای تولید پنیر استفاده می‌شود. این آنزیم که از هزاران سال پیش در پنیرسازی استفاده می‌شود، به نظر می‌رسد که قدیمی‌ترین کاربرد شناخته شده آنزیم‌ها باشد (Shah et al. 2014). کیموزین به صورت سنتی از معده چهارم گوساله شیرخوار استخراج می‌شود. با این حال، عوامل مختلفی از قبیل کمبود منابع و قیمت بالای این آنزیم، جستجو برای منابع جایگزین منعقد کننده شیر را اجتناب‌ناپذیر کرده است. در حال حاضر، رشد مداومی در استفاده از آنزیم‌های پروتئاز گیاهی در صنعت پنیر مشاهده می‌شود، زیرا به راحتی در دسترس هستند و فرآیندهای استخراج و تصفیه ساده‌ای دارند (Shah et al. 2014). این مورد، به‌ویژه در کشورهایی که آنزیم‌های حیوانی را به دلایلی از قبیل رژیم غذایی و مسائل مذهبی استفاده نمی‌کنند، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. با این حال، ماهیت پروتئولیتیکی بیش از حد منعقد کننده‌های گیاهی موجب بازده کمتر پنیر، طعم تلخ و نقص بافت

شده، و بنابراین، استفاده از آنها را در تولید پنیر محدود کرده است. مهندسی ژنتیک ابزار قدرتمندی است که بیان پروتئین‌های نوترکیب از هر منبع ژنتیکی را در موجودات هدف امکان‌پذیر کرده است. این سیستم، امکان تولید کیموزین حیوانی را در گیاه به منظور حذف معایب نسخه گیاهی و استفاده از مزایای گیاهان، فراهم کرده است. در حال حاضر، آنزیم‌های نوترکیب تولید شده در موجودات مختلف، یکی از مهم‌ترین جایگزین‌ها برای برآورده کردن نیازهای آنزیم کیموزین در تولید پنیر هستند (Kumar et al. 2010). با توجه به اینکه کیموزین گاوی به دلیل دارا بودن فعالیت لخته‌کنندگی بیشتر، گزینه مناسب‌تری برای تولید پنیر می‌باشد (Mohanty et al. 1999)، تولید هترولوگوس آن از طریق مهندسی ژنتیک در راکتورهای زیستی مختلفی از قبیل میکروارگانیزم‌ها، گیاهان و سایر حیوانات مورد توجه قرار گرفته است (Wei et al. 2016). در مقایسه با سیستم‌های حیوانی، تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های گیاهی دارای مزایای متعددی از قبیل هزینه پایین و سادگی تولید در مقیاس وسیع می‌باشد (Fischer et al. 2004). در مقایسه با باکتری‌ها نیز، تغییرات

دو اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون، مقایسه بیان این ژن در دو اندامک این گیاه نیز امکان پذیر می باشد.

بهینه سازی کدون ها یکی دیگر از عوامل بسیار مهم و تاثیر گذار در افزایش بیان ژن های هترولوگ می باشد. انحراف کاربرد کدونی یا ترجیح کدونی که در آن هر موجود زنده، از بین کدون هایی که اسیدهای آمینه مشابهی را کد می کنند، معمولاً یک کدون خاص را به سایر کدون های هم معنی ترجیح می دهد، با شدت های مختلف در تمامی گونه های موجودات زنده دیده می شود (Grantham et al. 1980). بنابراین، با تغییر کدون های یک ژن و منطبق کردن آن با کدون های رایج موجود میزبان می توان مقدار بیان پروتئین هترولوگ مورد نظر را افزایش داد.

در این تحقیق، به منظور بیان بیشتر، توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروکیموزین از آنزیم کیموزین گاوی با کدون های غالب ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون بهینه سازی گردیده، سپس در ناقل های بیانی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان با هر دو روش معمول شامل آگروباکتریوم و تفنگ ژنی همسانه سازی شد. آنزیم کیموزین گاوی یک زیموژن است که قبل از بلوغ کامل آنزیم، دارای قسمت های پری- و پرو-پپتید می باشد. قسمت پری یک پپتید نشانه است که در ترشح آنزیم به معده ی گوساله نقش داشته و قسمت پرو به جایگاه فعال آنزیم متصل شده و آن را غیرفعال نگه می دارد. زمانی که آنزیم در شرایط اسیدی قرار گیرد، ناحیه پرو-پپتید به صورت خودبخودی از آنزیم جدا شده و آنزیم فعال می شود (Kumar et al. 2010). با توجه به این نکته مهم، برای جلوگیری از فعال بودن آنزیم در داخل بافت های گیاهی که می تواند باعث ایجاد سمیت شود، در این پژوهش، سنتز و همسانه سازی فرم پروکیموزین ترجیح داده شد.

### مواد و روش ها

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

پس از ترجمه روی پروتئین های نو ترکیب تولید شده در سلول های گیاهی، معمولاً بطور صحیح اتفاق می افتد. به علاوه، فولدینگ و مونتاژ پروتئین های چند واحدی از قبیل آنتی بادی ها، در سلول های گیاهی امکان پذیر است (Sindarovska et al. 2010). گیاهان حاوی توکسین های باکتریایی و پاتوژن های انسانی از قبیل ویروس ها و پرئون ها نیستند. از این رو، پروتئین های نو ترکیب به دست آمده از گیاهان، از نظر ایمنی در رتبه بالاتری قرار دارند. در برخی موارد، پروتئین های خارجی تولید شده در گیاهان را می توان بدون خالص سازی و به صورت خوراکی مصرف کرد، که حذف مرحله ی خالص سازی باعث کاهش چشمگیر هزینه ی تولید می شود (Larrick and Thomas 2001). در میزبان های گیاهی، انتقال ژن خارجی می تواند به ژنوم هسته یا کلروپلاست انجام گیرد. با وجود این که کارایی انتقال ژن به کلروپلاست پایین بوده و تنها در تعداد معدودی از گیاهان بهینه شده است، با این حال، درج ژن خارجی در کلروپلاست گیاهان به دلیل سطوح پلئویدی بالا در این اندامک (Fathi Roudsari et al. 2009)، می تواند تولید پروتئین نو ترکیب را حتی به میزان بیش از ۷۰ درصد (Oey et al. 2009) کل پروتئین محلول افزایش دهد. همچنین، برخلاف ژنوم هسته، انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان تصادفی نبوده و درج ژن های خارجی در مکان های مشخص و از پیش تعیین شده انجام می گیرد، که دلیل آن وجود نو ترکیبی همولوگی فعال در این اندامک است (Day and Goldschmidt-Clermont 2011; Kaushal et al. 2020; Siddiqui et al. 2020). با این حال، در صورت درج ژن هدف در ژنوم هسته، می توان محصول پروتئین را با استفاده از یک پپتید نشانه اختصاصی، به اندامک هایی از قبیل کلروپلاست منتقل کرد. تجمع پروتئین هترولوگ در این اندامک ها هم می تواند پروتئین خارجی را از تأثیر پروتئین های سیتوزولی محافظت کند، و هم سمیت پروتئین نو ترکیب تولید شده در گیاه میزبان را کاهش دهد (Tran et al. 2013). این عوامل در نهایت می توانند منجر به تولید بیشتر پروتئین هترولوگ شوند. گیاه توتون با دارا بودن مزایایی از قبیل زیست توده قابل توجه و محتوای پروتئین محلول بالا، به عنوان یک گیاه مهم برای کشاورزی مولکولی محسوب می شود (Tremblay et al. 2010). همچنین، با توجه به وجود سیستم کارآمد انتقال و بیان ژن در هر

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

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

|                          |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| UUU F 0.58 25.1 ( 15282) | UCU S 0.26 20.0 ( 12211) | UAU Y 0.57 17.8 ( 10827) | UGU C 0.58 9.8 ( 5969)   |
| UUC F 0.42 18.0 ( 10986) | UCC S 0.13 10.2 ( 6207)  | UAC Y 0.43 13.5 ( 8220)  | UGC C 0.42 7.2 ( 4375)   |
| UUA L 0.15 13.4 ( 8186)  | UCA S 0.23 17.6 ( 10733) | UAA * 0.42 1.1 ( 656)    | UGA * 0.39 1.0 ( 602)    |
| UUG L 0.24 22.3 ( 13614) | UCG S 0.07 5.3 ( 3232)   | UAG * 0.19 0.5 ( 303)    | UGG W 1.00 12.2 ( 7428)  |
| CUU L 0.26 24.0 ( 14658) | CCU P 0.37 18.7 ( 11372) | CAU H 0.61 13.4 ( 8169)  | CGU R 0.15 7.5 ( 4583)   |
| CUC L 0.13 12.3 ( 7524)  | CCC P 0.13 6.6 ( 3995)   | CAC H 0.39 8.7 ( 5328)   | CGC R 0.08 3.9 ( 2359)   |
| CUA L 0.10 9.4 ( 5754)   | CCA P 0.40 19.8 ( 12101) | CAA Q 0.58 20.7 ( 12639) | CGA R 0.11 5.3 ( 3213)   |
| CUG L 0.11 10.2 ( 6205)  | CCG P 0.10 5.0 ( 3028)   | CAG Q 0.42 15.0 ( 9149)  | CGG R 0.08 3.7 ( 2251)   |
| AUU I 0.50 27.8 ( 16937) | ACU T 0.39 20.3 ( 12399) | AAU N 0.61 28.0 ( 17042) | AGU S 0.17 13.3 ( 8094)  |
| AUC I 0.25 13.9 ( 8445)  | ACC T 0.19 9.7 ( 5901)   | AAC N 0.39 17.9 ( 10916) | AGC S 0.13 10.0 ( 6070)  |
| AUA I 0.25 14.0 ( 8509)  | ACA T 0.34 17.4 ( 10634) | AAA K 0.49 32.6 ( 19851) | AGA R 0.33 16.0 ( 9774)  |
| AUG M 1.00 25.0 ( 15251) | ACG T 0.09 4.5 ( 2761)   | AAG K 0.51 33.5 ( 20430) | AGG R 0.25 12.2 ( 7466)  |
| GUU V 0.41 26.8 ( 16340) | GCU A 0.43 31.2 ( 19003) | GAU D 0.69 36.9 ( 22478) | GGU G 0.33 22.3 ( 13585) |
| GUC V 0.17 11.1 ( 6742)  | GCC A 0.17 12.5 ( 7617)  | GAC D 0.31 16.9 ( 10294) | GGC G 0.17 11.2 ( 6856)  |
| GUA V 0.17 11.4 ( 6937)  | GCA A 0.32 23.1 ( 14055) | GAA E 0.55 36.0 ( 21936) | GGA G 0.34 23.2 ( 14130) |
| GUG V 0.25 16.7 ( 10161) | GCG A 0.08 5.8 ( 3546)   | GAG E 0.45 29.4 ( 17945) | GGG G 0.16 10.5 ( 6420)  |

Coding GC 43.38% 1st letter GC 50.91% 2nd letter GC 39.69% 3rd letter GC 39.53%

**Genetic code 1: Standard**
***chloroplast Nicotiana tabacum* [gbpln]: 137 CDS's (34756 codons)**

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

|                         |                        |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| UUU F 0.62 34.2 ( 1189) | UCU S 0.28 22.1 ( 768) | UAU Y 0.78 27.3 ( 949)  | UGU C 0.73 8.0 ( 279)  |
| UUC F 0.38 20.6 ( 717)  | UCC S 0.16 12.8 ( 445) | UAC Y 0.22 7.7 ( 266)   | UGC C 0.27 3.0 ( 105)  |
| UUA L 0.30 31.0 ( 1078) | UCA S 0.19 15.0 ( 522) | UAA * 0.50 2.0 ( 69)    | UGA * 0.26 1.0 ( 35)   |
| UUG L 0.21 22.1 ( 769)  | UCG S 0.10 8.0 ( 279)  | UAG * 0.24 0.9 ( 33)    | UGG W 1.00 17.1 ( 596) |
| CUU L 0.22 22.6 ( 786)  | CCU P 0.41 17.1 ( 594) | CAU H 0.75 16.7 ( 582)  | CGU R 0.21 12.3 ( 428) |
| CUC L 0.08 7.9 ( 274)   | CCC P 0.17 7.3 ( 253)  | CAC H 0.25 5.5 ( 191)   | CGC R 0.07 4.0 ( 140)  |
| CUA L 0.13 13.6 ( 474)  | CCA P 0.29 12.1 ( 422) | CAA Q 0.74 26.0 ( 903)  | CGA R 0.24 14.3 ( 498) |
| CUG L 0.07 7.4 ( 257)   | CCG P 0.13 5.6 ( 195)  | CAG Q 0.26 9.0 ( 313)   | CGG R 0.08 5.0 ( 174)  |
| AUU I 0.49 39.2 ( 1363) | ACU T 0.39 20.0 ( 694) | AAU N 0.74 36.5 ( 1269) | AGU S 0.19 14.9 ( 517) |
| AUC I 0.21 17.2 ( 598)  | ACC T 0.20 10.0 ( 348) | AAC N 0.26 12.8 ( 444)  | AGC S 0.07 5.4 ( 189)  |
| AUA I 0.30 24.4 ( 847)  | ACA T 0.30 15.1 ( 526) | AAA K 0.72 37.3 ( 1298) | AGA R 0.29 17.5 ( 608) |
| AUG M 1.00 24.5 ( 851)  | ACG T 0.11 5.4 ( 189)  | AAG K 0.28 14.5 ( 504)  | AGG R 0.11 6.8 ( 237)  |
| GUU V 0.35 20.1 ( 700)  | GCU A 0.45 25.9 ( 900) | GAU D 0.79 31.5 ( 1096) | GGU G 0.33 23.3 ( 809) |
| GUC V 0.13 7.2 ( 251)   | GCC A 0.17 9.8 ( 340)  | GAC D 0.21 8.5 ( 297)   | GGC G 0.11 8.0 ( 279)  |
| GUA V 0.38 21.3 ( 742)  | GCA A 0.27 15.6 ( 541) | GAA E 0.73 39.6 ( 1375) | GGA G 0.38 27.1 ( 943) |
| GUG V 0.14 8.1 ( 283)   | GCG A 0.10 5.8 ( 202)  | GAG E 0.27 14.6 ( 509)  | GGG G 0.17 12.2 ( 424) |

Coding GC 38.94% 1st letter GC 46.54% 2nd letter GC 38.78% 3rd letter GC 31.51%

**Genetic code 1: Standard**

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

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

۴۵ در ۹۵ °C، ۴۵ s در ۵۵ °C و ۴۵ s در ۷۲ °C و در پایان، یک مرحله ۱۰ دقیقه ای در دمای ۷۲ °C بود.

خالص سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از کیت DNA Ambiclean (شرکت Vivantis-مالزی) و بر اساس پروتوکول توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام گردید. برای اتصال دو قطعه ی DNA (واکنش لیگاسیون)، مواد لازم برای ۱۵ میکرولیتر واکنش شامل ۲۰۰-۴۰۰ نانوگرم DNA ناقل برش یافته با آنزیم های مورد نظر، DNA الحاقی به نسبت ۱ تا ۳ برابر ناقل، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10×T4-DNA ligase و ۲ واحد آنزیم T4-DNA ligase، در میکروتیوب ریخته شده و در دمای ۲۵°C به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند. پس از آن، نصف محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* منتقل شد. برای استخراج پلاسمید از کلونی های بدست آمده، از روش پیشنهاد شده توسط Birnboim و Doly استفاده شد (Birnboim and Doly 1979). غلظت اسیدهای نوکلئیک از طریق اندازه گیری چگالی نوری آن ها در طیف ۲۶۰ نانومتر و یا الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین گردید.

جهت بررسی طراحی صحیح ژن برای تولید پروتئین عملکردی، از بیان در باکتری *E. coli* سویه Rosetta استفاده شد. برای این منظور، ژن سنتز شده با استفاده از سایت های برشی *SacI* و *BamHI* در ناقل بیانی pET-28a (Rosenberg et al. 1987) همسانه سازی شد. باکتری های نو ترکیب حاوی ناقل pET-28a روی محیط حاوی کانامایسین گزینش شدند. جهت القای بیان پروتئین، ۲۰۰ میکرومولار IPTG به محلول باکتری با ۰/۷-OD<sub>600</sub>=۰/۶ اضافه شد. پس از ۴ ساعت، باکتری ها برداشت شده و رسوب آن ها در بافر PBS حل شد. سپس سلول ها در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه لیز شدند و بعد از ورتکس شدید، یک دور سانتریفیوژ کوتاه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm انجام شد. برای حذف ناحیه پرو و فعال شدن پروتئین کیموزین، فاز رویی به مدت ۲ ساعت تحت تیمار اسیدی قرار گرفت. پس از این مرحله، pH عصاره باکتری دوباره با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴ نرمال در محدوده ۶-۷ تنظیم شد. در نهایت، برای بررسی فعالیت بیولوژیکی آنزیم کیموزین، ۴۰۰ میکرولیتر شیر تازه، ۵۵ میکرولیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره باکتری

برای بهینه سازی و محاسبه ی شاخص سازگاری کدون (CAI) از ابزارهای آنلاین شامل GenSmart™ (<https://www.genscript.com>) و E-CAI (<http://genomes.urv.cat/CAIcal/E-CAI/>) (Puigbò et al. 2008) استفاده شد. توالی بهینه سازی شده پس از بررسی توالی اسید آمینه و تطبیق آن با توالی اسید آمینه پروتئین کیموزین طبیعی، برای سنتز مصنوعی از شرکت GenScript® (<https://www.genscript.com>) سفارش داده شد. پس از سنتز، ژن در ناقل پایه pUC57 قرار گرفت که این ناقل pUC57-CYM نام گذاری شد. برای اطمینان از توالی سنتز شده، این ناقل برای توالی یابی به دانشگاه لیل فرانسه ارسال شد. نتیجه نشان داد که توالی سنتز شده کاملاً منطبق بر توالی ژن پروکیموزین بهینه سازی شده می باشد. ناقل تایید شده برای تهیه ناقل های بیانی مناسب برای گیاهان استفاده شد. از ناقل های p35S-TP-GFP (Chiu et al. 1996)، اهدایی پروفیسور رالف بوک از موسسه ماکس پلانک) و pBI121 (Chen et al. 2003) برای تهیه ناقل های بیانی مناسب برای انتقال و بیان ژن در گیاهان استفاده شد. از نرم افزار GenomeCompiler (<http://www.genomecompiler.com>) برای *in silico cloning* و طراحی آغازگر استفاده شد. همچنین، در طراحی آغازگر از بخش Primer-Blast سایت NCBI هم استفاده گردید. در آزمایش های مربوطه، از آنزیم های برشی و لیگاز T4 ساخت شرکت ترموفیشر استفاده شد.

از باکتری *E. coli* سویه *TOP10F'* برای تکثیر ناقل ها و آزمایش های همسانه سازی استفاده شد. برای گزینش ناقل های نو ترکیب pBI121-CYM و p35S-TP-CYM به ترتیب از آنتی-بیوتیک های آمپی سیلین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد.

برای تکثیر DNA مربوط به ژن کیموزین از جفت آغازگر اختصاصی CYM-F(SmaI/NdeI):5'-AAA CCC GGG CAT CYM-3' ATG GGA GAA GTA GCT TCT GTA C-3' و R(SacI/XbaI): 5'-AAA GAG CTC TCT AGA TTA AAT AGC TTT AGC TAA TCC TAC-3' که به ترتیب آغازگر روبه جلو و روبه عقب بودند، استفاده شد. برنامه PCR شامل یک مرحله ۴ دقیقه ای در دمای ۹۵ °C، ۳۰ چرخه، هر کدام شامل ۵

مناسب دیگر جایگزین شدند. ژنهای کلروپلاست به صورت همزمان رونویسی و ترجمه می شوند (Zoschke and Bock, 2018)، در صورتی که ژنهای هسته در این اندامک رونویسی و در سیتوپلاسم ترجمه می شوند. این وقفه مکانی و زمانی در رونویسی و ترجمه می تواند باعث ایجاد ساختارهای ثانویه در mRNA شده و بیان آن را با مشکل مواجه کند. به همین دلیل، توالی ها به ویژه در ناحیه ۵' ژن کیموزین (که محل اتصال ریبوزوم ها می باشد) از نظر ایجاد ساختارهای ثانویه با استفاده از ابزار طراحی پرایمر نرم افزار GenomeCompiler بررسی و توالی های مناسب با کمترین احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه استفاده شدند. در پایان، توالی بهینه سازی شده نهایی از نظر شاخص سازگاری کدون (CAI) ارزیابی شد که نتایج آن در جدول شماره ۱ آمده است (جدول ۱). همان طور که دیده می شود، مقدار CAI برای ژن پروکیموزین بهینه سازی شده در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست به طور قابل توجهی نسبت به ژن پروکیموزین گاوی طبیعی افزایش یافته است، که نشان دهنده کارایی بهینه سازی کدون می باشد.

به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری اضافه شده و نمونه ها در دمای °C ۳۵ و سرعت ۷۰ rpm نگهداری شدند.

## نتایج و بحث

برای بهینه سازی کدون های ژن پروکیموزین گاوی، تمام کدون ها-ی مربوط به ۲۰ نوع اسید آمینه با کدون های رایج ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون بر اساس اطلاعات شکل ۱ تعویض شدند. در این تغییرات، ملاحظات هر دو اندامک در نظر گرفته شد تا توالی بهینه شده برای بیان در هر دو مناسب باشد. برای مثال، توالی های مشابه شاین دالگارنو (SD:AGGAGG) که در اندامک های پروکاریوتی برای اتصال ریبوزوم ها و شروع ترجمه کاربرد دارند، با کدون های رایج دیگر جایگزین شدند. وجود این نوع توالی ها در داخل ژن می تواند منجر به تولید نسخه های ناقص پروتئین از طریق اتصال ریبوزوم ها به این نواحی شود (Leith et al., 2019). همچنین، توالی های مزاحم احتمالی دیگر از قبیل نوکلئوتیدی های تکراری که می توانند باعث سرخوردن DNA پلی مراز و ایجاد جهش در این نواحی با گذشت زمان شوند (Castillo-Lizardo et al., 2014)، تا جای ممکن با کدون های

|                 |                                                               |                 |                                                               |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| Native          | ATGGCTGAGATCACCAGGATCCCTCTGTATAAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGCGCTGAAG   | Native          | GACAGGAATGGCCAGGAGAGCATGCTCACGCTGGGGCCATCAACCGCTCTACTACACA    |
| Codon-optimized | ATGGCTGAAATTTACTAGAAATTCCTTTATATAAAGCAAAATCTTTAAGAAAGCTTTAAAA | Codon-optimized | GATAGAAATGGACAAGAAATCTATGTTAACTCTGGAGCTATTATCCTCTTATTATACT    |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GAGCATGGGCTTCTGAGGACTTCTCTGAGAAACAGCATGTGGCATCAGCAGCAAGTAC    | Native          | GGGTCCCTGCAGTGGGTGCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGT   |
| Codon-optimized | GAACATGGATTTATTAGAGATTTTTACAAAACAAATATGGAAATTTCTTCTAAATAT     | Codon-optimized | GGATCTTTACATTGGGTACCTGTAACGTACAACAAATATTTGGCAATTTACTGTAGATTCT |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | TCCGGCTTCGGGAGGTGGCGAGCGTCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTT     | Native          | GTCACCATCAGCGGTGTGGTGTGGCTGTGAGGGTGGCTGTGAGGCCATCTTGGACAG     |
| Codon-optimized | TCTGGATTTGGAGAAGTAGCTTCTGTACCTTTAACTAATTTATTAGATTTCTCAATATTT  | Codon-optimized | GTAACATTTCTGGAGTAGTAGCTTGTGAAGGTGGATGTCAAGCTATTTTAGATACT      |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GGGAAGATCTACCTCGGACCCCGCCAGGAGTTTACCCTGTCTTTGACACTGGCTCC      | Native          | GGCACCTCCAAGTGGTGGGCCAGCAGCATCTCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGA       |
| Codon-optimized | GGAAAATTTATTAGGAACCTCCTCAAGAATTACTGTATTATTGACTGGATCT          | Codon-optimized | GGAACTCTAAATTAGTAGGACCTCTCTGATATTTAAATATTCAACAAGCTATTGGA      |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | TCTGACTTCTGGTACCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCTGCAAAAACACCAAGCGC     | Native          | GCCACACAGAACCATGAGTGGATTTGACATGCTGCGACAACCTGAGCTACATGCC       |
| Codon-optimized | TCTGATTTTGGGTACCTCTATTATTGTAATCTAATGCTTGTAAAAATCATCAAGA       | Codon-optimized | GCTACTCAAAATCAATGGAGAATTGATATTGATGTGATAATTTATCTATATGCTCT      |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | TTGACCCGAGAAAGTCGTCACCTTCCAGAACTGGGCAAGCCCTGTCTATCCACTAC      | Native          | ACTGTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCTCCGCCTATACAGC    |
| Codon-optimized | TTTGATCTAGAAAATCTTCTACTTTTCAAAATTTAGGAAACCTTTATCTATTCTATT     | Codon-optimized | ACTGTAGTATTGAAATTAATGGAAAAATGTATCTTTAACTCTCTGCTTATATCTCT      |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GGGACAGCAGCATGCAAGGCTTCTAGGTATGACACCTGCTGCTTCAACATTTGTG       | Native          | CAAGACAGGGCTTCTGACCAAGTGGCTTCCAGATGAAAATCATTTCCAGAAATGGATC    |
| Codon-optimized | GGAACTGGATCTATGCAAGGAATTTAGGATATGATCTGTAACCTGATCTAATATTGT     | Codon-optimized | CAAGATCAAGGATTTGTACTTCTGGATTCAAGTCAAGATCATCTCAAAAATGGATT      |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GACATCCAGCAGCAGTAGGCTGAGCAGCCAGGAGCCGGGAGCTCTTCACTATGCC       | Native          | CTGGGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTGTACAGGGCCAACCTCTGTG    |
| Codon-optimized | GATATTCACCAACTGTAGGATTTATCTACTCAAGAACTGGAGATGATTTACTTATGCT    | Codon-optimized | CTTGGTGATGATTTATTAGAGAATATTATCTGTATTTGATAGAGTAATAATTTAGTA     |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GAATTCGACGGGATCTGGGATGGCTACCCCTCGCTCGCTCAGAGTACTGATACCC       | Native          | GGGCTGGCCAAAGCCATCTGA                                         |
| Codon-optimized | GAATTTGATGGAATTTAGGAATGGCTTATCTCTTTAGCTTCTGAATATTCTATTCTCT    | Codon-optimized | GGATTAGCTAAAGCTATTGA                                          |
|                 | *****                                                         |                 | *****                                                         |
| Native          | GTGTTTGACAACATGATGAACAGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATG   |                 |                                                               |
| Codon-optimized | GTATTTGATAATATGATGAATAGACATTTAGTAGCTCAAGATTATTCTGTATATATG     |                 |                                                               |
|                 | *****                                                         |                 |                                                               |

شکل ۲- هم تراز سازی توالی نوکلئوتیدی رشته ی سنس ژن پروکیموزین گاوی طبیعی (Native) و ژن سنتز شده با کدون های بهینه شده (Codon-optimized) برای بیان مناسب در اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون. توالی های نشان دار شده با ستاره در دو توالی با هم مشابه هستند.

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

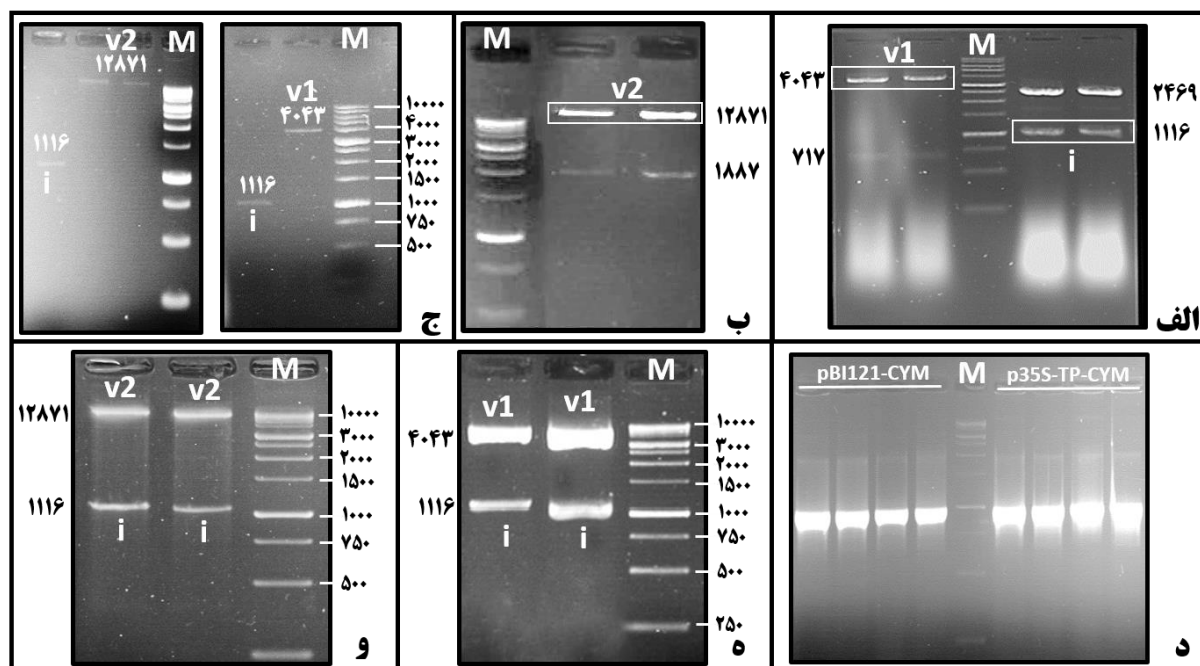
جدول ۱- شاخص CAI برای ژن پروکیموزین طبیعی و بهینه سازی شده نسبت به ژنوم هسته و کلروپلاست گیاه توتون. شاخص CAI برای ژن مصنوعی PlyGBS (Oey *et al.* 2009) که با موفقیت در کلروپلاست گیاه توتون بیان شده است، برای مقایسه آورده شده است.

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

| توالی ژن              | شاخص CAI نسبت به ژنوم هسته ی توتون | شاخص CAI نسبت به ژنوم کلروپلاست توتون |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| پروکیموزین گاوی طبیعی | ۰/۶۲۸                              | ۰/۴۷۷                                 |
| پروکیموزین بهینه شده  | ۰/۹۲۹                              | ۰/۹۴۷                                 |
| ژن مصنوعی PlyGBS      | ۰/۹۲۹                              | ۰/۹۳۹                                 |

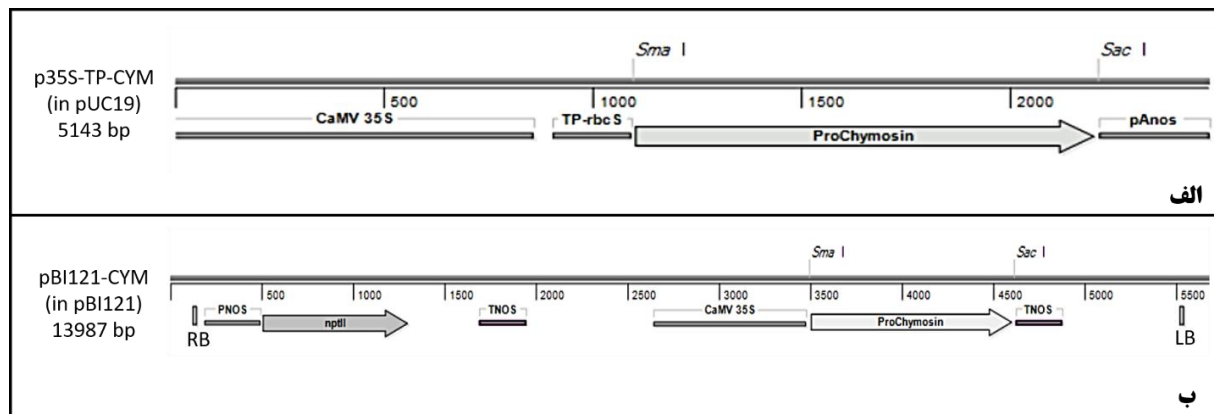
برش داده شدند. در p35S-TP-GFP این برش باعث جدا شدن قطعه ۷۱۷ جفت بازی مربوط به ژن GFP می شود (شکل ۳- الف).

جهت تهیه ناقل بیانی مناسب برای انتقال ژن با استفاده از دو روش مرسوم در انتقال ژن به گیاهان شامل تفنگ ژنی و آگروباکتریوم، دو ناقل بیانی p35S-TP-GFP و pBI121 استفاده شدند. ابتدا هر دو ناقل با استفاده از دو آنزیم برشی *SmaI* و *SacI*



شکل ۳- تصویر الکتروفورز مراحل مختلف همسانه سازی ژن پروکیموزین در ناقل های بیانی p35S-TP-GFP و pBI121. (الف) هضم آنزیمی pUC57-CYM (سمت راست مارکر) و p35S-TP-GFP (سمت چپ مارکر) با آنزیم های برشی *SacI* و *SmaI*. باند مربوط به ژن پروکیموزین سنتزی با اندازه ۱۱۱۶ جفت باز (مشخص شده با حرف انگلیسی i) از سازه pUC57-CYM جدا و خالص سازی شد و برای جاسازی در ناقل بیانی استفاده شد. قطعه ۴۰۴۳ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی p35S-TP-GFP (v1) به عنوان یکی از ناقل های بیانی برای همسانه سازی پروکیموزین خالص سازی شده استفاده شد. (ب) الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pBI121 با آنزیم های برشی *SacI* و *SmaI*. قطعه ۱۲۸۷۱ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی pBI121 (v2) به عنوان ناقل بیانی مناسب انتقال ژن با روش آگروباکتریوم، برای همسانه سازی پروکیموزین خالص سازی شده استفاده شد. (ج) تصویر الکتروفورز قطعات خالص سازی شده حاصل از قسمت (الف) و (ب) برای ارزیابی کمیت و کیفیت آن ها جهت استفاده در واکنش لیگاسیون. (د) تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن پروکیموزین در تعدادی از کلونی های حاصل از انتقال محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli*. وجود باند اختصاصی ژن پروکیموزین در تمام کلونی ها، نو ترکیب بودن آن ها را تایید می کند. (ه) تصویر الکتروفورز هضم آنزیمی ناقل های نو ترکیب p35S-TP-CYM (ه) و pBI121-CYM (و) با آنزیم های برشی *SacI* و *SmaI*. بازایی قطعات استفاده شده در واکنش لیگاسیون برای هر دو ناقل نو ترکیب، درستی ناقل های نو ترکیب را تایید می کند.

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



شکل ۴- نقشه فیزیکی ناقل‌های بیانی p35S-TP-CYM (الف) و pBI121-CYM (ب). در ساختار ناقل p35S-TP-CYM ژن گزینشگر تعبیه نشده است. این ناقل برای انتقال ژن به روش تفنگ ژنی مناسب است، به طوری که با استفاده از ناقل دوم حاوی ژن گزینشگر و انتقال توام دو ناقل، حذف ژن گزینشگر پس از باززایی گیاهان تراریخت با استفاده از تفکیک ژن‌های گزینشگر و کیموزین در نسل بعدی امکان‌پذیر است. در ناقل pBI121-CYM کاست‌های بیانی ژن گزینشگر و ژن کیموزین در داخل T-DNA که با دو توالی حاشیه راست (RB) و چپ (LB) مشخص شده است، قرار دارد.

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

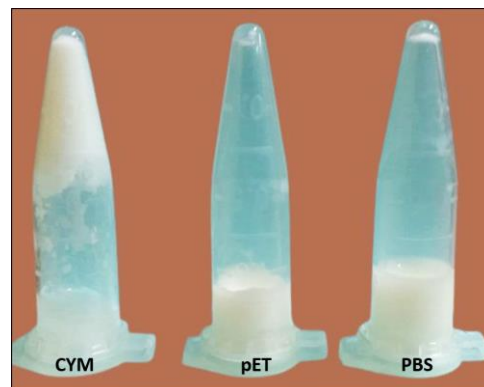
نهایی دو مورد از هر ناقل نو ترکیب با استفاده از هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های *SacI* و *SmaI* انجام گرفت (شکل ۳-ه و). تصویر فیزیکی ناقل‌های نو ترکیب تهیه شده در شکل ۴ نمایش داده شده است. همچنان‌که در تصویر دیده می‌شود، در ناقل بیانی p35S-TP-CYM، ژن مصنوعی پروکیموزین تحت کنترل راه‌انداز قوی 35S ویروس موزائیک گل کلم قرار دارد (شکل ۴-الف). این ناقل برای انتقال ژن کیموزین به گیاهان از طریق تفنگ ژنی مناسب است. ناقل pBI121-CYM (شکل ۴-ب) هم با دارا بودن کاست‌های بیانی ژن گزینشگر و ژن کیموزین در داخل T-DNA، مناسب انتقال ژن به روش آگروباکتریوم می‌باشد. به منظور تایید صحیح بودن چارچوب و عملکرد ژن کیموزین سنتز شده، انتقال و بیان آن در باکتری *E. coli* بررسی شد. نتایج

در ناقل pBI121 نیز قطعه ۱۸۸۷ جفت بازی مربوط به ژن GUS با این برش جدا می‌شود (شکل ۳-ب). قطعات باقیمانده از دو ناقل به ترتیب با اندازه ۴۰۴۳ (v1) و ۱۲۸۷۱ (v2) برای جاسازی قطعه ۱۱۱۶ جفت‌بازی مربوط به پروکیموزین مصنوعی (i) که از ناقل pUC57-CYM با هضم آنزیمی بوسیله *SacI* و *SmaI* ایجاد شده بود (شکل ۳-الف و ب)، استفاده شدند. پس از خالص‌سازی، کمیت و کیفیت این قطعات روی ژل آگارز ارزیابی شده (شکل ۳-ج) و واکنش لیگاسیون انجام گرفت. پس از انتقال محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* و گزینش کلونی‌ها روی محیط گزینشی، تعدادی از کلونی‌ها با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن کیموزین مصنوعی تایید شدند (شکل ۳-د). تایید

با موفقیت در گیاه توتون بیان شده، و فعالیت لخته‌کنندگی مشابهی با کیموزین گاوی دارد (Wei Zheng-Yi *et al.* 2016). در مطالعه دیگر، بیان کیموزین طبیعی بز با توانایی لخته کردن شیر، با موفقیت در بذر ذرت گزارش شده است (Liu *et al.* 2017). این نتایج نشان می‌دهند که گیاهان گزینه مناسبی برای تولید کیموزین نوترکیب فعال می‌باشند. در این پژوهش، با توجه به این ویژگی‌ها، ژن کیموزین گاوی برای همسانه‌سازی و تهیه ناقل‌های بیانی مناسب انتقال و بیان در گیاهان انتخاب شد.

از روش‌هایی که می‌تواند بیان پروتئین خارجی در موجودات را افزایش دهد، بهینه‌سازی کدون‌های ژن هترولوگ با کدون‌های رایج در میزبان است (Fu *et al.* 2020; Lewis *et al.* 2020). نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد که انحراف کاربرد کدونی یا ترجیح کدونی در موجودات مختلف با سطح بیان ژن در ارتباط می‌باشد (Gouy and Gautier 1982; Duret and Mouchiroud 1999; ) (Espinoza-Molina *et al.* 2016). در نتیجه، انحراف کدونی به‌عنوان یک پارامتر مهم برای افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های بیانی هترولوگ پیشنهاد شده است (Gustafsson *et al.* 2004). علت انحراف کاربرد کدونی در موجودات، بیشتر به انتخاب طبیعی، جهش و رانش ژنتیکی نسبت داده شده است (Hershberg and Petrov 2008). در این تحقیق، کدون‌های ژن پروکیموزین گاوی به نحوی بهینه‌سازی شد که قابلیت بیان بالا در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون را داشته باشد. میزان شاخص CAI برای این دو اندامک به ترتیب ۰/۹۲۹ و ۰/۹۴۷ بدست آمد که یک مقدار مناسب برای بیان کارآمد می‌باشد. برآورد این شاخص رایج‌ترین روش برای بررسی انحراف کاربرد کدونی است (Sharp and Li 1987). مقدار شاخص CAI بین صفر و یک بوده و هر اندازه این مقدار به عدد یک نزدیک باشد، نمایانگر بیان بالای آن پروتئین در میزبان هترولوگ خواهد بود (Sharp and Li 1987). از آنجائی که کدون‌های ژن پروکیموزین گاوی برای بیان مناسب در هر دو اندامک هسته و کلروپلاست گیاه توتون بهینه‌سازی شد، احتمال می‌رود بیان آن در سایر گیاهان (به‌ویژه در اندامک کلروپلاست) به‌مراتب بیشتر از ژن کیموزین گاوی طبیعی باشد. یکی از پروتئین‌های هترولوگ که تا به امروز بیشترین بیان (بیش از ۷۰ درصد کل پروتئین محلول)

نشان داد که، بر خلاف کنترل، عصاره‌ی باکتری حامل ناقل نوترکیب حاوی ژن پروکیموزین باعث لخته شدن شیر می‌شود (شکل ۵). این نتایج عملکردی بودن ژن سنتز شده را تایید کرد.



شکل ۵- نتایج حاصل از آزمایش لخته شدن شیر تازه با عصاره باکتری حاوی ناقل pET-28a-bCYM (CYM). عصاره باکتری حاوی ناقل خالی pET-28a (pET) و بافر (PBS) به‌عنوان کنترل استفاده شد.

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

پروتئازهای آسپارتیک دسته‌ای از پروتئازها با فعالیت بهینه در محیط‌های اسیدی هستند که کاربردهای گسترده‌ای در صنعت غذا دارند (Wang *et al.* 2021). کیموزین یکی از آنزیم‌های مهم این گروه در صنعت پنیرسازی است که نقش تعیین‌کننده در طعم و بافت محصول دارد. هر اندازه که آنزیم مورد استفاده فعالیت لخته‌کنندگی بیشتری نسبت به فعالیت پروتئولیتیک داشته باشد، ترجیح داده می‌شود، چراکه فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر منجر به ضعیف شدن طعم و بافت پنیر می‌شود. کیموزین گاوی به دلیل اینکه فعالیت لخته‌کنندگی بیشتری در مقایسه با فعالیت پروتئولیتیکی دارد، گزینه‌ی مناسبی برای تولید پنیر می‌باشد (Mohanty *et al.* 1999; Wei Zheng-Yi *et al.* 2016)، و به همین دلیل، به‌صورت گسترده استفاده شده و اغلب برای تولید هترولوگوس در سایر راکتورهای زیستی از قبیل میکروارگانیزم-ها، گیاهان و سایر حیوانات استفاده می‌شود (Wei Zheng-Yi *et al.* 2016). در یک پژوهش، نسخه طبیعی پری پروکیموزین گاوی تحت کنترل راه‌انداز 35S ویروس موزایک گل کلم به ژنوم هسته تنباکو منتقل شد. نتایج این تحقیق نشان داد که کیموزین نوترکیب

را در کلروپلاست گیاه توتون نشان داده است، ژن مصنوعی PlyGBS می باشد (Oey et al. 2009). این ژن برای بیان مناسب در ژنوم پلاستید گیاهان عالی که غنی از AT است (Shimda and Sugiuro 1991)، بهینه سازی شده بود. شاخص CAI محاسبه شده برای ژن کیموزین مصنوعی در این پژوهش، با مقدار CAI ژن مصنوعی PlyGBS قابل مقایسه بود (جدول ۱)، که نشان دهنده مناسب بودن آن برای بیان در ژنوم گیاه توتون می باشد. در یک پژوهش، بهینه سازی کدون ژن کیموزین گاوی باعث افزایش سطح بیان پروتئین نوترکیب در *Kluyveromyces lactis* گردید (Feng et al. 2010). در گزارشی دیگر، بهینه سازی کدون ژن کیموزین گاوی اثر قابل توجهی در افزایش بیان آن در *Pichia pastoris* نشان داد (Espinoza-Molina et al. 2016). بنابراین، می توان گفت که بهینه سازی کدون یک استراتژی مناسب برای بهبود سطح بیان ژن کیموزین نوترکیب در موجودات هدف است. پس از سنتز مصنوعی و تایید توالی، ژن پروکیموزین گاوی در ناقل های بیانی pBI121 و p35S-TP-GFP با توالی ژن های گزارشگر جایگزین شد. ناقل های نوترکیب به ترتیب p35S-TP-CYM و pBI121-CYM نام گذاری شدند. در ناقل p35S-TP-CYM پپتید نشانه زیرواحد کوچک روبیسکو از گیاه توتون انتقال پروتئین کیموزین به اندامک کلروپلاست را هدایت خواهد کرد. مطالعات مختلفی نشان داده که این عمل به کمک انتقال دهنده های خاصی از قبیل پروتئین های Hsp90، Hsp70، FKBP و کمپلکس های TOC و TIC که به ترتیب در غشاهای بیرونی و داخلی کلروپلاست قرار دارند، انجام می شود (Jarvis 2008; Flores-Pérez and Jarvis 2013)، و می تواند علاوه بر محافظت پروتئین هترولوگ از پروتئازهای سیتوپلاسمی، از سمیت آن برای میزبان هترولوگ نیز کاسته، و در نهایت منجر به تولید بیشتر پروتئین هترولوگ شود (Kim et al. 2010). پپتید نشانه TP که از زیرواحد کوچک روبیسکو در ژنوم توتون گرفته شده، در انتهای آمین به توالی ژن پروکیموزین چسبیده است که هدایت پروتئین حاصل به اندامک کلروپلاست را کنترل می کند. این ناقل برای انتقال ژن به گیاهان با روش تفنگ ژنی مناسب است (Chiu et al. 1996). در انتقال ژن از طریق تفنگ ژنی امکان انتقال هم زمان دو ناقل وجود دارد. بنابراین، ناقل بیانی بدست آمده می تواند هم زمان

با یک ناقل حاوی ژن گزینشگر مناسب، برای انتقال پایدار ژن کیموزین استفاده شود. مزیت این روش این است که انتقال ژن های هدف و گزینشگر به ژنوم گیاه بصورت مستقل و به احتمال زیاد در نواحی متفاوت از ژنوم میزبان صورت می گیرد. این روش انتقال می تواند در حذف ژن گزینشگر پس از گزینش گیاهان تراریخت از طریق تفرق نتاج استفاده شود (Puchta 2000).

ناقل pBI121 در موارد متعدد برای انتقال ژن خارجی به ژنوم گیاهان مختلف استفاده شده است (Kasuga et al. 1999; Yamamoto et al. 2005; Wei Qiuhui et al. 2017; Sun et al. 2020). برای این منظور، به طور معمول ژن مورد نظر جایگزین ژن گزارشگر GUS می شود. در ناقل بیانی pBI121-CYM نیز ژن کیموزین مصنوعی تحت کنترل راه انداز قوی 35S به همراه کاست ژن گزینشگر *nptII* که در برابر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی از قبیل کانامایسین، نتومایسن و پرومایسین ایجاد مقاومت می کند، در ناحیه T-DND قرار دارد. این ناقل برای انتقال ژن کیموزین مصنوعی به گیاهان با روش آگروباکتریوم مناسب است.

همچنان که اشاره شد، بهینه سازی کدون به ترتیبی انجام شد که در مطالعات بعدی بتوان ژن کیموزین را در ناقل های بیانی کلروپلاستی برای انتقال و بیان پروتئین در پلاستید استفاده کرد. تولید پروتئین نوترکیب در کلروپلاست مزایایی مختلفی از قبیل بیان بسیار بالای پروتئین هترولوگ دارد (Adem et al. 2017)، که از موارد اساسی و تعیین کننده در تولید آنزیم های صنعتی در گیاهان است. در یک مورد، تولید بالای ۷۰ درصد کل پروتئین محلول در کلروپلاست گیاه توتون هم دیده شده هست (Oey et al. 2009)، که این اندامک را به یک بیوراکتور وسوسه انگیز برای تولید آنزیم های صنعتی و واکسن ها تبدیل کرده است.

در آزمایش بررسی بیان ژن سنتز شده در باکتری *E. coli*، اگرچه، مدت زمان لازم برای لخته شدن شیر نسبتاً طولانی بود (حدود ۴۰ دقیقه)، با این حال، نتایج این آزمایش، صحیح بودن ساختار و عملکرد ژن را تایید کرد. کند بودن فرآیند لخته شدن شیر با غلظت آنزیم کیموزین رابطه مستقیم دارد (Panthi et al. 2019). بنابراین، احتمال می رود میزان آنزیم تولید شده در باکتری پایین باشد. این نتیجه با میزان CAI ژن سنتز شده نسبت به ژنوم باکتری

مصنوعی نسبت به ژنوم کلروپلاست تعدادی از گیاهان شامل گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، ذرت و گندم نان محاسبه شد که به ترتیب ۰/۹۴۹، ۰/۹۵۰، ۰/۹۴۴ و ۰/۹۴۳ بدست آمد. بطور کلی می‌توان گفت نتایج این پژوهش، مهمترین ابزار لازم برای تولید پروتئین کیموزین نو ترکیب را در هسته و کلروپلاست تعدادی از گیاهان مهم را فراهم نموده است. با توجه به تایید بیان و عملکرد ژن سنتز شده در باکتری *E. coli* علی‌رغم مناسب نبودن کدون برای این میزبان، انتقال و بیان این ژن در گیاهان می‌تواند امکان تولید آنزیم کیموزین در گیاهان را به عنوان یک بیوراکتور سالم و کم‌هزینه فراهم کند.

#### تشکر و قدردانی

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

#### منابع

- Adem M, Beyene D, Feyissa T. 2017. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods* 13:30.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Castillo-Lizardo M, Henneke G, Viguera E. 2014. Replication slippage of the thermophilic DNA polymerases B and D from the Euryarchaeota *Pyrococcus abyssi*. *Frontiers in microbiology* 5:403.
- Chen P-Y, Wang C-K, Soong S-C, To K-Y. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 11:287-293.
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6:325-330.
- Day A, Goldschmidt-Clermont M. 2011. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant biotechnology journal* 9:540-553.
- Duret L, Mouchiroud D. 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4482-4487.

*E. coli* که ۰/۶۲ محاسبه شد، هم‌خوانی دارد، که خود نشان‌دهنده اهمیت بهینه‌سازی کدون‌ها در افزایش بیان ژن می‌باشد. به‌طور کلی، در این پژوهش، ژن پروکیموزین مصنوعی با کدون بهینه‌سازی شده سنتز و پس از تایید توالی، در دو ناقل بیانی گیاهی مناسب شامل pBI121 و p35S-TP-GFP جایگزین ژن گزارشگر شد. شاخص سازگاری کدون برای ژنوم هسته توتون ۰/۹۲۹ و برای ژنوم پلاستید توتون ۰/۹۴۷ محاسبه گردید. بنابراین، ژن کیموزین سنتز شده برای بیان در ژنوم هسته و کلروپلاست توتون مناسب است. با توجه به قرار گرفتن تعدادی از گیاهان خوراکی از قبیل گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی در تیره سولاناسه، کدون‌های بهینه‌شده احتمالاً برای بیان در این گیاهان نیز مناسب باشد. شاخص CAI ژن مصنوعی برای توالی‌های ثبت شده ژنوم هسته این گیاهان به ترتیب ۰/۸۳۹ و ۰/۸۸۳ محاسبه شد، درحالی‌که این مقادیر برای ژن کیموزین طبیعی به ترتیب ۰/۵۸۷ و ۰/۵۳۳ بدست آمد. به‌علاوه، با توجه به شباهت بسیار زیاد ژنوم‌های کلروپلاستی گیاهان مختلف، ژن مصنوعی طراحی شده، می‌تواند برای انتقال و بیان در اندامک کلروپلاست گیاهان مختلف استفاده شود. برای تایید این موضوع شاخص CAI ژن پروکیموزین

- Espinoza-Molina JA, Acosta-Muniz CH, Sepulveda DR, Zamudio-Flores PB, Rios-Velasco C. 2016. Codon Optimization of the "Bos Taurus Chymosin" Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 58:657-664.
- Fathi Roudsari M, Salmanian AH, Mousavi A, Hashemi Sohi H, Jafari M. 2009. Regeneration of glyphosate-tolerant *Nicotiana tabacum* after plastid transformation with a mutated variant of bacterial *aroA* gene. *Iranian Journal of Biotechnology* 7:247-253.
- Feng Z, Zhang L, Han X, Zhang Y. 2010. Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:895-901.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* 7:152-158.
- Flores-Pérez Ú, Jarvis P. 2013. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833:332-340.
- Fu H, Liang Y, Zhong X, Pan Z, Huang L, Zhang H, Xu Y, Zhou W, Liu Z. 2020. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression. *Scientific reports* 10:1-9.
- Gouy M, Gautier C. 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res* 10:7055-7074.

- Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pave A. 1980. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic acids research* 8:197-197.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346-353.
- Hershberg R, Petrov DA. 2008. Selection on codon bias. *Annu Rev Genet* 42:287-299.
- Jarvis P. 2008. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New phytologist* 179:257-285.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* 17:287-291.
- Kaushal C, Abidin MZ, Kumar S. 2020. Chloroplast genome transformation of medicinal plant *Artemisia annua*. *Plant biotechnology journal* 18:2155-2157.
- Kim S, Lee D-S, Choi IS, Ahn S-J, Kim Y-H, Bae H-J. 2010. *Arabidopsis thaliana* Rubisco small subunit transit peptide increases the accumulation of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel5A in chloroplasts of transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 19:489-497.
- Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish V. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology* 30:243-258.
- Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current opinion in biotechnology* 12:411-418.
- Leith EM, O'Dell WB, Ke N, McClung C, Berkmen M, Bergonzo C, Brinson RG, Kelman Z. 2019. Characterization of the internal translation initiation region in monoclonal antibodies expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 294:18046-18056.
- Lewis CJ, Dixit B, Batiuk E, Hall CJ, O'Connor MS, Boominathan A. 2020. Codon optimization is an essential parameter for the efficient allotopic expression of mtDNA genes. *Redox biology* 30:101429.
- Liu W-G, Wang Y-P, Zhang Z-J, Wang M, Lv Q-X, Liu H-W, Meng L-C, Lu M. 2017. Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. *Protein expression and purification* 135:78-82.
- Mohanty A, Mukhopadhyay U, Grover S, Batish V. 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances* 17:205-217.
- Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. 2009. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The plant journal* 57:436-445.
- Panthi RR, Kelly AL, Sheehan JJ, Bulbul K, Vollmer AH, McMahon DJ. 2019. Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *J Dairy Sci* 102:177-189.
- Puchta H. 2000. Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends in plant Science* 5:273-274.
- Puigbò P, Bravo IG, Garcia-Vallvé S. 2008. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics* 9:65.
- Rosenberg AH, Lade BN, Dao-shan C, Lin S-W, Dunn JJ, Studier FW. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56:125-135.
- Shah MA, Mir SA, Paray MA. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology* 94:5-16.
- Sharp PM, Li W-H. 1987. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research* 15:1281-1295.
- Shimada H, Sugiuro M. 1991. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucleic acids research* 19:983-995.
- Siddiqui A, Wei Z, Boehm M, Ahmad N. 2020. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and applied biochemistry* 67:30-40.
- Sindarovska Y, Gerasymenko I, Sheludko Y, Olevinskaya Z, Spivak N, Kuchuk N. 2010. Production of human interferon ALPHA 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by Agrobacterium-mediated transient expression. *Cytology and genetics* 44:313-316.
- Sun B, Zhu Z, Liu R, Wang L, Dai F, Cao F, Liu S. 2020. TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) regulates leaf trichome density in tea *Camellia sinensis*. *Nordic Journal of Botany* 38.
- Tran M, Henry RE, Siefker D, Van C, Newkirk G, Kim J, Bui J, Mayfield SP. 2013. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnology and bioengineering* 110:2826-2835.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S. 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* 28:214-221.
- Wang S, Zhang P, Xue Y, Yan Q, Li X, Jiang Z. 2021. Characterization of a novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Aspergillus niger* and its application in production of ACE-inhibitory peptides. *Foods* 10:2949.
- Wei Q, Zhang F, Sun F, Luo Q, Wang R, Hu R, Chen M, Chang J, Yang G, He G. 2017. A wheat MYB transcriptional repressor TaMyb1D regulates phenylpropanoid metabolism and enhances tolerance to drought and oxidative stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Science* 265:112-123.
- Wei Z-Y, Zhang Y-Y, Wang Y-P, Fan M-X, Zhong X-F, Xu N, Lin F, Xing S-C. 2016. Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *International journal of molecular sciences* 17:624.
- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T. 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany* 56:1785-1796.
- Zoschke R, Bock R. 2018. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *The Plant Cell* 30:745-770.