

**بیان پروتئین انسولین گیاهی در مخمر پروبیوتیک *Saccharomyces boulardii***مریم رحیمی^۱، احد یامچی^{۲*}، مجید عزیزی^۳، مجید شهبازی^۴^۱دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران^۲استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران^۳استاد، گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران^۴استاد، گروه پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۶

چکیده

سابقه و هدف: دیابت نوعی اختلال مزمن در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین هاست و مشخصه آن افزایش قند خون در بیمار است. نارسایی قلبی - عروقی، کلیوی و کاهش فعالیت عصبی از جمله عوارض طولانی مدت این بیماری می باشد. کاربرد داروهای گیاهی برای درمان دیابت، روز به روز بیشتر میشود و این مسئله سبب شده شناخت داروی گیاهی کارآمد اهمیت بیشتری پیدا کند. داروهای گیاهی به دلیل عوارض کمتر، قیمت مناسب و در دسترس بودن نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته اند. یکی از گیاهان موثر، خربزه تلخ یا کارلا با نام علمی *Momordica charantia* یک گیاه دارویی متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) است که به دلیل دارا بودن ترکیباتی از جمله پلی پپتیدی به نام پلی پپتید P یا P- انسولین در درمان دیابت موثر می باشد. P- انسولین متشکل از ۱۷۲ اسید آمینه است و مقدار آن در گیاه بسیار کم (کمتر از ۱ میلی گرم پلی پپتید خالص در هر ۱۰۰ گرم بذر خشک) است. همسانه سازی ژن *p-انسولین* و بیان بالای آن در میکروارگانیزم، راه حلی سریع و مفید برای حل این مشکل است. استفاده از مخمر پروبیوتیک این مزیت را دارد که پس از تولید پروتئین هدف نیاز به خالص سازی آن نیست در صورتیکه تولید پروتئین نوترکیب در سایر میزبان های بیانی مستلزم خالص سازی آن جهت مصرف می باشد. بدین منظور در این تحقیق توالی ژن *p-انسولین* پس از بهینه سازی از لحاظ توالی در میزبان مخمر پروبیوتیکی *Saccharomyces boulardii* بیان شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق بهینه سازی توالی ژن *p-انسولین* جهت بیان در مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* به دو طریق بهینه سازی کدونی و بهینه سازی ساختار ثانویه mRNA انجام گردید. توالی ژن بهینه سازی شده در وکتور بیانی pESC تحت پروموتور القایی Gal10 همسانه سازی و به سلول مستعد *S. boulardii* انتقال یافت. از مخمر نوترکیب استخراج DNA و در ادامه با آغازگرهای اختصاصی ژن *p-انسولین* واکنش PCR انجام گرفت. مخمر نوترکیب توسط گالاکتوز القاء و تولید پروتئین P- انسولین در سیتوپلاسم مخمر نوترکیب از طریق SDS-PAGE و طیف سنجی جرمی تایید گردید.

یافته ها: واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *p-انسولین* قطعه ۳۵۰ جفت بازی را از وکتور بیانی نوترکیب تکثیر کرد که نشان از همسانه سازی موفق ژن مذکور بود. الگوی الکتروفورز SDS-PAGE برای *S. boulardii* میزبان و *S. boulardii* نوترکیب حاوی ناقل pESC/p-insulin مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج الکتروفورز پروتئین نشان داد که باند پروتئین P- انسولین با وزن مولکولی 18.5 KD و بصورت افتراقی فقط در مخمر نوترکیب بیان گردید. همچنین نتایج طیف سنجی جرمی

*مسئول مکاتبه: yamchi@gau.ac.ir

نتیجه گیری: در این تحقیق برای اولین بار از مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* به عنوان میزبان موفق برای تولید پروتئین P-انسولین استفاده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که از مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* می توان به عنوان میزبان مناسب برای تولید سایر محصولات در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: *Momordica charantia*، پروتئین P-انسولین، *Saccharomyces boulardii*، SDS-PAGE، طیف سنجی جرمی

مقدمه

دیابت از جمله بیماری های مزمن است که به دلیل کمبود یا کاهش عملکرد انسولین موجب افزایش میزان قند خون و اختلالات متابولسمی بدن می شود (۲۰). مشاهدات اپیدمیولوژی گواه آن است که با تغییر فرهنگ مصرف رژیم غذایی و روش زندگی از سنتی به صنعتی میزان شیوع بیماری دیابت افزایش یافته است. رعایت رژیم غذایی و درمان های جایگزین علاوه بر کاهش هزینه درمان در بسیاری از موارد موجب پیشگیری و بهبودی دیابت نوع دوم و در بعضی موارد بهبودی رضایت بخش برای بیماران دیابتی نوع اول می شود. هم اکنون داروهای متعددی جهت کاهش میزان قند خون بالا ارایه شده است ولی به دلیل عدم بهبودی کامل این بیماری با مصرف داروهای موجود، تمایل به استفاده از درمان های جایگزین و سنتی افزایش یافته است. در این میان، نقش گیاهان دارویی با خواص کاهش دهنده قند خون در درمان بیماران دیابتی را نمی توان نادیده گرفت گیاهان متنوعی برای درمان دیابت مورد استفاده قرار می گیرند و در واقع در کشورهای فقیر ممکن است تنها راه ممکن برای معالجه دیابت استفاده از گیاهان باشد هر چند مصرف گیاهان دارویی در کشورهای غربی نیز به طور گسترده ای عمومیت یافته است (۲۳). یکی از موثرترین گیاهان، گیاه *Momordica charantia* از خانواده Cucurbitaceae و نام عمومی کارلا و خیار یا کدوی تلخ می باشد (۱۸). کارلا به علت داشتن سه گروه از

ترکیبات موثر بر تنظیم قند خون به صورت علمی مورد بررسی قرار می گیرد. این ترکیبات عبارتند از چارانتین (کارانتین)، پلی پپتید P (p-انسولین) و آلکالوئیدها است (۱۱).

p-انسولین یک پلی پپتید با وزن مولکولی حدود ۱۱۰۰۰ دالتون و متشکل از ۱۷۲ اسید آمینه است. مقدارش بسیار متغیر است و بستگی به رقم، محل کشت و فصل برداشت دارد ولی در کل مقدارش در گیاه کم است که همسانه سازی ژن p-انسولین و بیان بالای آن در میکروارگانیسم، راه حلی سریع و مفید برای حل این مشکل است (۱۷).

دو میزبان مفید برای تولید پروتئین نوترکیب در غلظت بالا عبارتند از باکتری *Escherichia coli* BL21(DE3) و مخمر که بیش از ۵۰ درصد پروتئین کلی داخل سلول را به پروتئین نوترکیب هدف اختصاص می دهند (۸). میزان تولید پروتئین نوترکیب در *E. coli* بیشتر از مخمر است ولی دارای برخی مشکلات شامل عدم اعمال تغییرات بعد از ترجمه، گاهی تولید پروتئین نوترکیب به گونه ای است که فاقد ساختار فضایی درست و نیاز به رناتوراسیون می باشد. از طرف دیگر، تولید پروتئین نوترکیب در سلول های پستانداران هزینه بر است لذا مخمر به عنوان میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است (۶).

دسته ای از میکروارگانیسم ها به میکروارگانیسم های پروبیوتیک معروف

میزبان مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* بیان شد. مخمر نوترکیب توسط گالاکتوز القاء و تولید پروتئین *p*-انسولین در سیتوپلاسم مخمر نوترکیب از طریق SDS-PAGE و طیف سنجی جرمی تأیید گردید.

مواد و روش‌ها

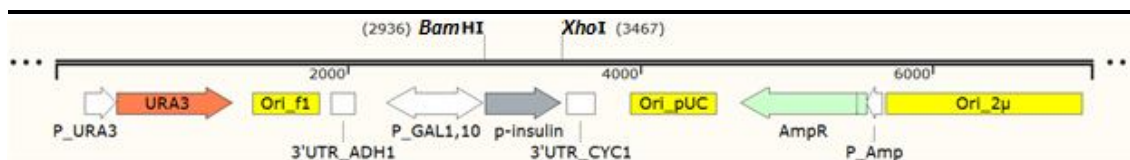
۱- تهیه سویه مخمر: در این تحقیق از جدایه *Saccharomyces boulardii* (ATCC74012) تهیه شده از انستیتو پاستور تهران به عنوان مخمر میزبان برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده گردید.

۲- بهینه‌سازی کدون های ژن *p*-انسولین جهت سنتز و بیان در میزبان های مخمر: توالی ژن *p*-انسولین از لحاظ Codon adaptation index (CAI) برای بیان در مخمر ساکارومایسیس بهینه شد. همچنین جهت افزایش بیان ژن *p*-انسولین در سلول میزبان مخمر، ساختار ثانویه mRNA ژن مذکور بهینه سازی شد. موارد بهینه شده شامل حذف ساختار ثانویه در ناحیه شروع mRNA، وجود نوکلئوتید A در موقعیت ۳- از شروع ترجمه در توالی Kozak و ایجاد یک ساختار ثانویه با انرژی پایین در موقعیت ۱۴+ از شروع ترجمه برای بیان در سلول یوکاریوت بود.

۳- همسانه سازی ژن *p*-انسولین بهینه شده برای بیان در وکتور مخمر: پس از بهینه سازی ژن *p*-انسولین برای CAI و ساختار ثانویه mRNA، ژن مورد نظر از طریق شرکت GenScript سنتز و در وکتور بیانی pESC-URA تحت پروموتور القایی Gal10 همسانه سازی شد. شکل سازه نوترکیب بیانی توسط نرم افزار SnapGene Viewer 3.3.4 ترسیم شد (شکل ۱).

هستند. پروبیوتیک‌ها علاوه بر کمک به گوارش، مولکول‌های پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشد. شواهد نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها با تاثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب لوسیون‌ها و ترکیبات القاکننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش موثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند (۴).

آزمایشات ساترن بلاتینگ بر روی DNA میتوکندری و نشانگر مولکولی میکروساتلایت مشخص کرد که *Saccharomyces boulardii* یک گونه جدید از جنس ساکارومایسیس نیست بلکه یک جدایه (واریانت) از گونه *Saccharomyces cerevisiae* می‌باشد که غیر بیماری‌زا و خاصیت پروبیوتیک دارد (۹، ۱۲). این مخمر پروبیوتیک در سال ۲۰۰۴ مجوز سازمان غذا و دارو (FDA) را در کشور آمریکا کسب کرد و هم اکنون بسیاری از کمپانی‌های تولید کننده دارو، این مخمر را به تنهایی به عنوان مکمل دارویی تولید و به بازار عرضه می‌کنند. مکانیسم عمل این مخمر از طریق ممانعت از فعالیت پاتوژن‌های روده، ممانعت از عمل توکسین‌های میکروبی و تحریک ایمونوگلوبولین‌ها است. بنابراین استفاده از این نوع مخمر به عنوان میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب ارزش بالایی خواهد داشت (۵). اخیراً تولید آنزیم نوترکیب فیتاز و پروتئین ضد آلرژی به ترتیب در باکتریهای پروبیوتیک *Lactococcus lactis* و *E. coli* Nissle 1917 گزارش شده است (۱۶، ۱۹). در این تحقیق توالی ژن *p*-انسولین پس از بهینه سازی از لحاظ توالی در



شکل ۱- نقشه وکتور بیانی pESC-URA/p-insulin
Figure 1. Map of the expression vector, pESC-URA/p-insulin

ژن *p-انسولین* از طریق PCR برای تأیید وجود ژن در وکتور بیانی و بازدهی ترانسفورماسیون استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *p-انسولین* به ترتیب آغازگر فوروارد: ATGGGCTGCGATGAAGC و آغازگر ریورس: ATCGGTGTCGACTATCG به کمک نرم افزار Oligo7.0 طراحی و سنتز شد. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم DNA ژنومیک مخمر نوترکیب، ۱۰ پیکومول آغازگر فوروارد و ریورس و ۵ میکرولیتر از مستر میکس (2X) امپلیکون در برنامه PCR سه مرحله ای شامل ۱ سیکل دمای دناتوره ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای دناتوره ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه و دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، و ۱ سیکل دمای بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Biometra-Germany) انجام گردید.

۶- کشت مخمر نوترکیب و القا آن برای تولید پروتئین *p-انسولین*: یک کلنی از مخمر حاوی پلاسمید نوترکیب pESC/p-insulin به همراه یک کلنی مخمر میزبان (فاقد پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل منفی) بطور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر محیط مایع حداقل SD در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد. بعد از رشد میزان کدورت با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و در OD معادل ۰/۴ نمونه به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی حذف و رسوب مخمر با آب شستشو داده شد و در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت

ت- انتقال وکتور بیانی نوترکیب *pESC-URA3⁻ insulin* به مخمر به روش شوک حرارتی (۷): سه میکروگرم پلازمید حاوی ژن *p-انسولین*، به داخل سلول مستعد مخمر اضافه گردید. ۳۰۰ میکرو لیتر محلول انتقال (PEG 3000 40%+ LiAc 0/1 M+) (TrisHCl pH 7.5 10mM+ EDTA 1mM) به سلول مستعد اضافه شد. ویال ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی گراد گذاشته شد تا شوک حرارتی صورت گیرد سپس پنج دقیقه در یخ و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محصول بر روی پتری های حاوی محیط کشت جامد حداقل SD فاقد اوراسیل (SD: 6.7g/) پخش (1L YNB without uracil, 2% glucose) پخش گردید و به مدت دو الی سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کلنی های مربوطه ظاهر شود.

۴- استخراج DNA ژنومی از مخمر نوترکیب: روش هافمن (۱۰) انجام شد.

۵- تأیید وکتور بیانی حاوی ژن *p-انسولین* در میزبان مخمر نوترکیب از طریق PCR: جهت انتخاب مخمرهای نوترکیب، از ژن سنتز کننده اوراسیل موجود در وکتور بیانی در محیط کشت حداقل SD فاقد اوراسیل استفاده گردید. همچنین پس از استخراج پلازمید حاوی ژن هدف، از آغازگرهای اختصاصی

(biowave-UK) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش و خط رگرسیون رسم گردید.

۹- تائید بیان پروتئین p- انسولین در مخمر حاوی وکتور بیانی pESC/p-insulin از طریق الکتروفورز SDS-PAGE: با توجه به اندازه پروتئین نوترکیب ژل ۱۲ درصد اکریل آمید (۲۱/۵ میلی لیتر آب مقطر، ۱۵ میلی لیتر اکریل آمید ۴۰ درصد، ۱۲/۵ میلی لیتر تریس ۱/۵ مولار pH ۸/۸، ۰/۵ میلی لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۵ میلی لیتر APS ۱۰ درصد، ۰/۵ میلی لیتر TEMED که به حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر رسانده شدند) به عنوان ژل جداکننده و ژل ۴ درصد اکریل آمید (۱۸/۷ میلی لیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی لیتر اکریل آمید ۴۰ درصد، ۳/۱۱ میلی لیتر تریس ۱ مولار pH ۶/۸، ۰/۲۵ میلی لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۲۵ میلی لیتر TEMED که به حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر رسانده شدند) به عنوان ژل متراکم کننده تهیه گردید. پس از آماده شدن ژل، بافر الکتروفورز (۱۵ گرم تریس، ۱۴۴ گرم گلیسین و ۵ گرم SDS ۱۰ درصد که با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده) به دستگاه اضافه شد و بعد از پر کردن چاهکها با نمونه‌های پروتئین استخراج شده از مخمرهای نوترکیب و میزبان، دستگاه الکتروفورز (Apelex-Germany) با ولتاژ ۲۵ mA به مدت ۱۰ دقیقه و سپس با ۵۵ mA به مدت چهار ساعت روشن شد.

۱۰- رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE به روش کوماسی بلو: پس از پایان الکتروفورز، ژل درون ۱۰۰ میلی لیتر محلول فیکساتور (۴۰ میلی لیتر متانول و ۱۰ میلی لیتر اسید استیک با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده) گذاشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. بعد از آن ژل به مدت ۴۵ دقیقه در آب مقطر قرار گرفت، جهت مشاهده باندهای پروتئینی از محلول رنگ آمیزی (۰/۱۲ گرم

حداقل SG فاقد اوراسیل و القا کننده برای تولید پروتئین نوترکیب (SG: 6.7g/ 1L YNB without uracil, 2% galactose) به مدت سه روز کشت شد.

۷- استخراج پروتئین از مخمر حاوی وکتور بیانی pESC/p-insulin: رسوب مخمر رشد یافته در محیط SG با ۲۰۰ میکرولیتر استات لیتیم دو مولار حل گردید. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف فاز رویی به رسوب مخمر ۱۰۰ میکرولیتر آب اتوکلاو شده و ۳۰۰ میکرولیتر NaOH ۰/۴ مولار اضافه شد و پس از مخلوط کردن مخمر، مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از حذف فاز رویی پنج میکرولیتر بافر بارگذاری شامل ۶۰ میلی مولار Tris-HCl با pH ۶/۸، چهار درصد SDS، پنج درصد گلیسرول، دو دهم درصد برموفنل بلو و چهار درصد دی تیو تریتول به نمونه اضافه گردید و پس از حل شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۸- تعیین غلظت پروتئین به روش سنجش برد فورد (۳): محلول پروتئین استاندارد BSA با غلظت ۱ میکروگرم در هر میکرولیتر تهیه شد. شش ویال شماره گذاری شده از ۱ الی ۶ به ترتیب از محلول پروتئین استاندارد ذکر شده به هر کدام به اندازه صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر ریخته و با آب دوبار تقطیر به حجم ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پنج میکرولیتر از نمونه پروتئین استخراج شده نیز به وسیله آب دوبار تقطیر به حجم ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شد و ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ بردفورد ۵X شامل ۲۰ گرم کوماسی بلو، ۱۰ گرم متانول، ۲۰ گرم اسید فسفریک ۸۵ درصد که با آب دوبار تقطیر به حجم ۴۰ میلی لیتر رسانده شد، به نمونه‌ها اضافه گردید و ورتکس شد و رنگ آبی حاصل به کمک اسپکتروفتومتر (wpa

شناسایی پروتئین، نتایج حاصل از طیف سنجی جرمی با ESI-MS/MS به کمک نرم افزار Mascot با پروتئین های موجود در بانک های (Viridiplantae) sport-trembl (All species)، sport-trembl مقایسه شدند. پارامترهای مورد استفاده برای نرم افزار Mascot شامل: (C) carbamidomethyl به عنوان تغییر ثابت پروتئین و (NQ) deamidated و (M) به عنوان تغییرات متغیر به نرم افزار معرفی شدند.

نتایج و بحث

۱- انتقال وکتور بیانی pESC/p-insulin به میزبان مخمری بولاردی: به منظور انتخاب مخمرهای نوترکیب، از محیط حداقل SD که فاقد اوراسیل می باشد، استفاده گردید و مخمرهای ترنسفورم شده به دلیل حمل وکتور بیانی که حاوی ژن سازنده اوراسیل می باشد توانستند در این محیط رشد کنند لذا همان طور که در شکل ۲ قابل مشاهده است کلنی های مخمر رشد یافته در محیط حداقل، کلنی های نوترکیب می باشد و از این کلنی ها برای ادامه بیان ژن هدف استفاده گردید.

۲- تایید مخمرهای نوترکیب از طریق کلنی PCR: به جهت اینکه محتمل است که تمام کلنی های مخمر حاوی وکتور بیانی حمل کننده ژن هدف نباشند لذا تعداد زیادی از کلنی های مخمر نوترکیب از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *p-insulin*، پایش شدند. بدین منظور از کلنی های مخمر به مقدار خیلی کمی روی محیط SD واکشت شدند و پس از سه روز رشد مناسب، استخراج DNA از مخمرها انجام گرفته و بر روی ژل آگارز TAE یک درصد الکتروفورز گردید که نتایج آن در شکل (۳) نشان داده شده است. در ادامه PCR با

کوماسی بلو، ۲۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ گرم آمونیوم سولفات، ۱۱/۷۶ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد که با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده استفاده گردید و ۱۰۰ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی را روی ژل ریخته و ۲۴ ساعت در شیکر با سرعت ۱۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از شفاف شدن زمینه ژل، ژل با آب مقطر شسته و از ژل عکسبرداری شد.

۱۱- تایید بیان پروتئین p- انسولین در مخمر حاوی وکتور بیانی pESC/p-insulin از طریق طیف سنجی جرمی: پس از مقایسه الگوی ژل های حاصل از الکتروفورز پروتئین حاصل از مخمر نوترکیب و میزبان (کنترل منفی)، باند با بیان افتراقی (پروتئین هدف) از روی ژل ها بریده شده و رنگ کوماسی بوسیله تیمار رنگبری با محلول استونیتریل و ۲۵ میلی مولار بی کربنات آمونیوم به نسبت های مساوی (v/v) ۱:۱ حذف گردید. سپس لکه های ژل با سانتریفوژ تحت شرایط خلاء خشک شدند. به لکه های خشک شده ۲۰ میکرو لیتر بی کربنات آمونیوم ۲۵ میلی مولار اضافه گردید و در پی آن به این محلول آنزیم تریپسین (Sequencing grade modified trypsin, Promega) با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرو لیتر واکنش اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. جهت خاتمه واکنش هضم آنزیمی، ۸۰ میکرو لیتر محلول (10% formic acid, 62.5% acetone, 27.5% H₂O) اضافه گردید. روشناور حاوی پروتئین هضم شده از رسوب ژل جداسازی و برای شناسایی پروتئین از طریق طیف سنجی جرمی از نوع ESI-MS/MS (Thermo Fisher-USA) استفاده شد. در طیف سنجی جرمی ESI-MS/MS از یک کروماتوگرافی مایع (LC) که به یک دستگاه طیف سنجی جرمی Q-Trap جفت شده است، برای تعیین توالی پروتئین هضم شده استفاده گردید. برای

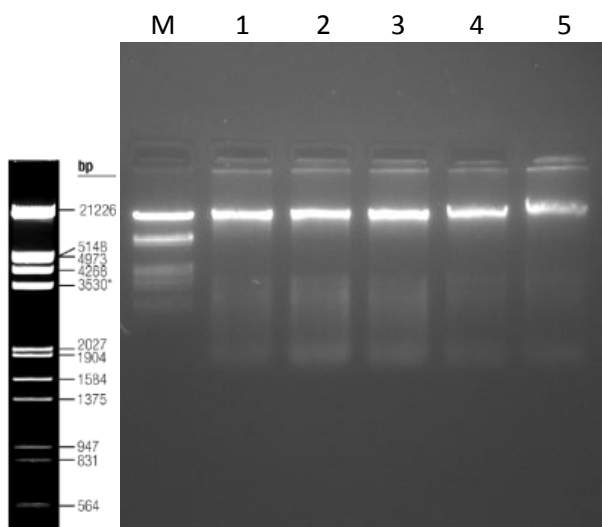
آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت که نتیجه در کلنی‌های مثبت تکثیر کرد (شکل ۴).

PCR قطعه ۳۵۰ جفت بازی ژن *p-insulin* را



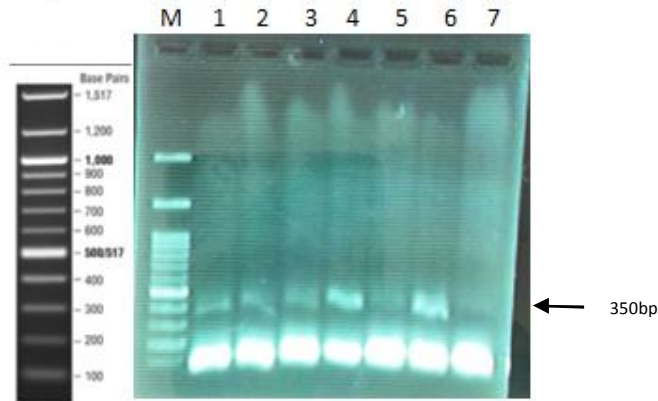
شکل ۲- انتقال وکتور بیانی *pESC/p-insulin* به میزبان مخمری بولاردی

Figure 2. Transformation of *pESC/p-insulin* expression vector into the host *Saccharomyces boulardii*



شکل ۳- استخراج DNA از ۵ کلنی مخمر نو ترکیب حاوی وکتور نو ترکیب *pESC/p-insulin*

Figure 3. DNA extraction from the five transformed yeast colonies carrying *pESC/p-insulin*



شکل ۴- تایید مخمرهای نوترکیب حاوی وکتور pESC/p-insulin از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *p-insulin*

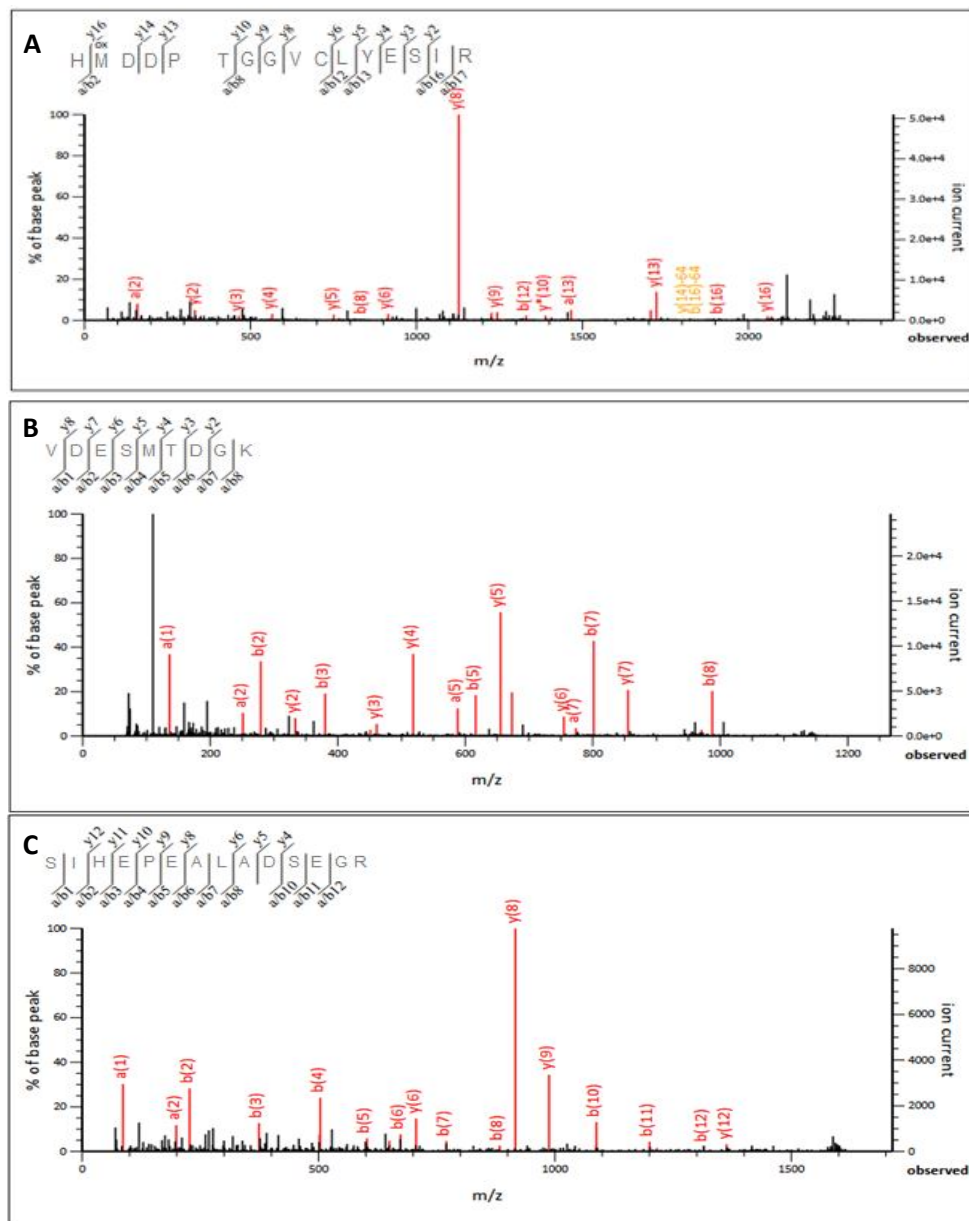
M- مارکر ۱۰۰ جفت باز (فرمتناز)، ۱- محصول PCR بر روی پلازمید نوترکیب pESC/p-insulin (کنترل مثبت)، ۲ تا ۷-

محصول PCR بر روی DNA استخراج شده از کلنی های نوترکیب حاوی وکتور pESC/p-insulin

Figure 4. PCR reaction on the recombinant yeast host cells with p-insulin specific primers; M. 100 bp marker (Fermentas), well 1. The positive PCR production (350bp) from pESC /p-insulin plasmid, well 2-7 the PCR production from the transformed colonies carrying pESC /p-insulin vector.

میکروگرم) از آنها بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید. نتیجه مقایسه الگوی الکتروفورز مخمر میزبان و نوترکیب حاوی ناقل pESC/p-insulin نشان داد که باند پروتئین ۱۸/۵ کیلو دالتون مرتبط با پروتئین p-insulin فقط در مخمر نوترکیب بصورت افتراقی بیان شده است. در ادامه، باند افتراقی از روی ژل بریده و پس از رنگ بری، بوسیله آنزیم تریپسین در پیوندهای پپتیدی آرژنین و یا لیزین هضم شد نتیجه حاصل از طیف سنجی جرمی بر روی باند افتراقی از طریق LC-MS/MS و آنالیز داده ها بوسیله نرم افزار MASCOT در پایگاه پروتئین http://www.matrixscience.com/cgi/search_form. Swiss Prot (pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS منتج به شناسایی سه قطعه پپتیدی از پروتئین *p-insulin* (شکل ۵، A تا C) شد. قطعات پپتیدی شناسایی شده به تعداد ۳۹ آمینو اسید، ۲۲/۶۷ درصد از توالی پروتئین را پوشش می داد. نتیجه همردیف سازی سه قطعه حاصل از طیف سنجی جرمی با پروتئین کامل *p-insulin* نشان داد که هر سه قطعه مشابهت کامل با پروتئین *p-insulin* دارد (شکل ۶).

۳- تایید بیان پروتئین نوترکیب در مخمر نوترکیب از طریق الکتروفورز SDS-PAGE و طیف سنجی جرمی: به منظور عدم از دست رفتن وکتور نوترکیب در داخل مخمر از محیط حداقل SD فاقد اوراسیل می باشد برای کشت مخمر استفاده شد. زمانی که OD مخمر به ۰/۴ رسید مخمر حاوی وکتور نوترکیب pESC/p-insulin را رسوب داده و بخش رویی را حذف و رسوب مخمر به محیط حداقل SG (فاقد اوراسیل) اضافه شد. قابل ذکر است که محیط SG در تمام مواد متشکل خود شبیه به محیط SD است و تنها تفاوت این دو محیط در جابجا شدن قند گلوکز SD به قند گالاکتوز در SG است به این دلیل که گلوکز پروموتور Gal10 را سرکوب می کند ولی با حذف آن در محیط SG که حاوی قند گالاکتوز است، پروموتور Gal10 بوسیله گالاکتوز القاء و پروتئین نوترکیب تولید می شود. در این تحقیق، از مخمر بولاردی شاهد به عنوان کنترل استفاده گردید. پس از رشد مخمرها به مدت ۳ روز در محیط SG، استخراج پروتئین از آنها صورت گرفت و غلظت پروتئین استخراج شده به روش بروفورد محاسبه و به میزان مساوی (۵۰

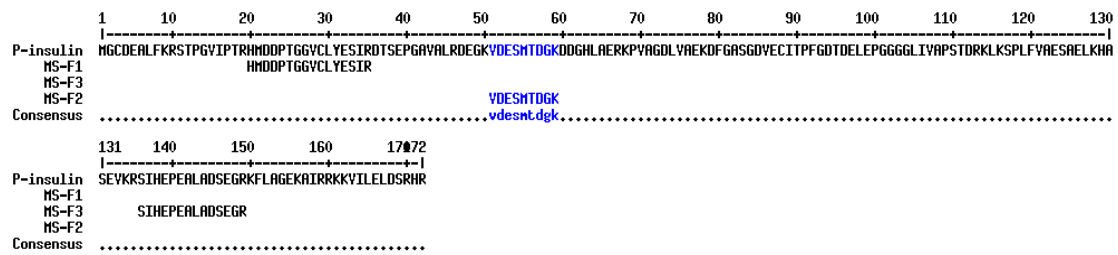


شکل ۵- نتایج حاصل از طیف سنجی جرمی بر روی باند افتراقی مربوط به پروتئین نو ترکیب از طریق LC-MS/MS و آنالیز داده‌ها از طریق نرم افزار MASCOT در پایگاه پروتئین Swiss Prot: شناسایی سه قطعه پپتیدی A تا C از طریق هضم آنزیمی پروتئین نو ترکیب با تریپسین و تعیین توالی آنها از طریق دوبار طیف سنجی پشت سرهم.

Figure 5. The results of mass spectrometry on the differentially expressed band for recombinant protein via LC-MS / MS and data analysis using MASCOT software in Swiss Prot protein database: Identification of three peptide fragments A through C by enzymatic digestion of recombinant protein with Trypsin and sequencing by tandem mass spectroscopy.

کمک نرم افزار (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) mFold انجام گرفت که نتایج آن در شکل های ۷، ۸ و ۹ گزارش شد.

۴- نحوه بهینه‌سازی توالی ژن هدف، جهت بیان در مخمر: جهت بیان بالای ژن هترو لوگ p -انسولین در مخمر *S.boulevardii*، توالی ژن از دو جهت بهینه‌سازی شد که شامل بهینه‌سازی کدون‌ی سازگار با میزبان مخمر و بهینه‌سازی ساختار ثانویه mRNA، به



شکل ۶- هم‌مدیف سازی قطعات حاصل از طیف سنجی جرمی با پروتئین کامل *p*- انسولین گزارش شده در بانک ژنی یونی پرات (E2JCD2).
 Figure 6. Alignment of three fragments obtained from mass spectrometry result with the whole sequence of *p*- insulin protein reported in UniProt data bank (AC: E2JCD2).

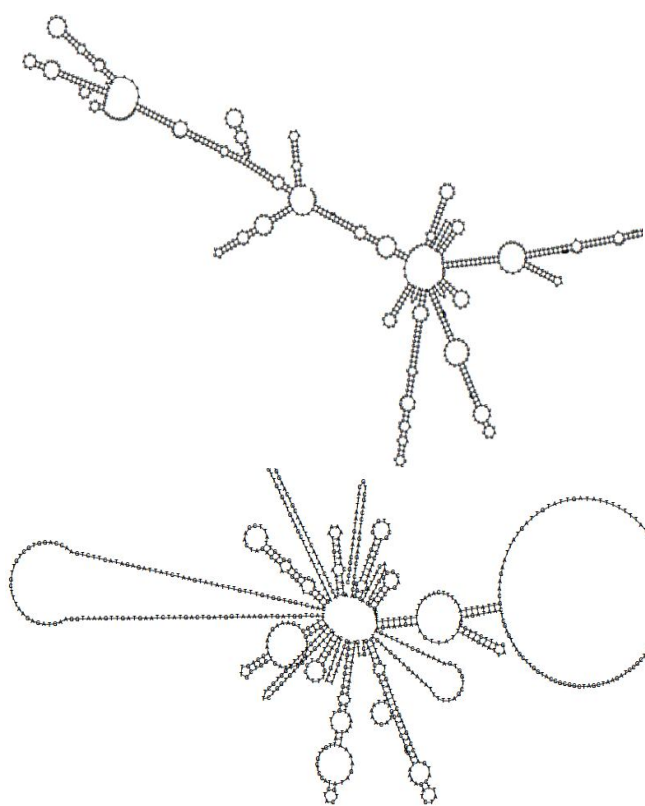
عامل رونویسی eIF4E به *cap* 5' می‌شود (۱). در بهینه سازی mRNA ژن *p*- انسولین ساختار ثانویه ضعیف (۵,۵۰- کیلوکالری بر مول) در موقعیت +۲ برای 5'-UTR طراحی شد (شکل ۷). طول کامل ناحیه کد کننده mRNA ژن *p*- انسولین به گونه‌ای بهینه سازی شد که دارای ساختار ثانویه ۵۰ نوکلئوتیدی ضعیفی در سنجاق سر باشد. انرژی آزاد (MFE) ساختار ثانویه mRNA کامل ژن *p*- انسولین (شامل نواحی 5'-UTR، CDS و 3'-UTR) بهینه نشده ۲۲۰,۸۰- کیلو کالری برمول و در بهینه شده ۱۱۳,۱- کیلو کالری بر مول بود (شکل ۸). کاهش انرژی آزاد در ساختار ثانویه در mRNA باعث افزایش کارایی ریبوزوم در باز کردن ساختار ثانویه و افزایش سرعت ترجمه می‌شود (۱۴؛ ۲۱). گزارش شده است که وجود ساختار ثانویه ای ضعیف به فاصله ۱۲-۳۰ نوکلئوتید از کدون آغازین باعث تشخیص بهتر کدون آغازین توسط ریبوزوم می‌گردد (۱۲؛ ۱۳؛ ۲۲). لذا در این پژوهش نیز ساختار ثانویه ای با انرژی ۳,۵۰- کیلو کالری بر مول در فاصله نوکلئوتید ۱۷ از کدون آغازین ژن *p*- انسولین طراحی شد (شکل ۹).

برای بهینه‌سازی کدونی ژن *p*- انسولین برای بیابان در مخممر از سایت <http://www.kazusa.or.jp/codon> استفاده شد. پس از بهینه کردن کدون ها، دو فاکتور ترجیح کدونی و محتوی GC ژن *p*- انسولین از طریق نرم افزار محاسبه گردید (<https://www.genscript.com>) که به ترتیب ۹۸ و ۳۴,۷۶ درصد بود که این مقادیر برای بیان ژن هدف در میزبان مخمر مناسب بود (۲۱). محتوی GC است که هر چه این مقدار بالاتر باشد انرژی بیشتری برای باز کردن دو رشته DNA نیاز است. از طرفی دیگر افزایش بی رویه محتوی GC احتمال دارد باعث ایجاد باندهای غیراختصاصی در دو رشته DNA شود. بنابراین محتوی GC باید حدود ۵۰ درصد باشد (۲۴).

بهینه سازی ساختار ثانویه mRNA در سه ناحیه انجام شد. مطالعات قبلی نشان داده است که شکل گیری ساختار ثانویه در ناحیه 5'-mRNA cap تا ۵۰ برابر تاثیر بازدارنده معنی داری بر روی ترجمه mRNA دارا می باشد. گزارش شده است که ساختار سنجاق سری پایدار بیش از ۳۰ کیلوکالری بر مول در موقعیت +۱ الی +۱۲ در مطالعات *In vitro* و +۱ الی +۴ در مطالعات *In vivo* باعث کاهش دسترسی



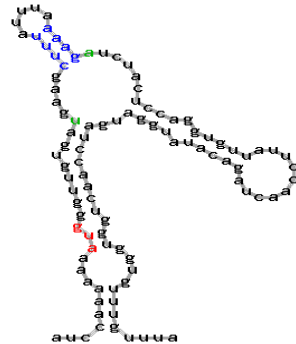
شکل ۷- پیش بینی ساختار لوپ ساقه در ناحیه نزدیک 5'-UTR با میزان انرژی ۰.۵۰- کیلوکالری در هر مول
Figure 7. Prediction of stem-loop formation in the region near the cap of 5'-UTR with a minimum free energy of 5.50 kcal/mol.



شکل ۸- پیش بینی پایداری ساختار ثانویه mRNA زن *p-insulin* برای توالی بهینه نشده (بالا) و بهینه شده (پایین) با انرژی به ترتیب ۲۲۰.۸۰- و ۱۱۳.۱- کیلوکالری در هر مول

Figure 8. Hairpin thermal stability prediction for the total secondary structures of non-optimized (upper) and optimized (lower) *p-insulin* gene with a minimum free energy of -220.80 kcal/mol and -113.1 kcal/mol respectively.

Energy of secondary structure = -18.3 kcal/mol
Position of Hairpin start: 17
Energy of double strands in Hairpin: -3.5 kcal/mol



شکل ۹- پیش بینی ساختار ثانویه ناحیه آغازین CDS مربوط به ژن *p-انسولین*. محل پیش بینی ساختار ثانویه در موقعیت ۱۲-۳۰ ام با رنگ سبز، ساقه با ساختار سنجاق سری مناسب با رنگ آبی و کدون آغازین با رنگ قرمز نشان داده شده است.

Figure 9. Predicted local secondary structure at the CDS beginning of *p-insulin* gene. Borders of the critical region (12th and 30th pos.) were marked with green color; stem region of the eligible hairpin was marked with blue color; start codon was marked with red color.

توالی ژن *p-انسولین* را از لحاظ کدون و ساختار ثانویه mRNA بوسیله نرم افزارهای اختصاصی بهینه سازی و پس از سنتز ژن *p-انسولین* بهینه شده توانستیم پروتئین *p-انسولین* را به کمک پرموتور القایی Gal10 در مخمر پروبیوتیک *S.bouardii* بیان کنیم. در این تحقیق برای اولین بار از مخمر پروبیوتیک *S.bouardii* به عنوان میزبان موفق برای تولید پروتئین *p-انسولین* استفاده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که از مخمر پروبیوتیک *S.bouardii* می توان به عنوان میزبان مناسب برای تولید سایر محصولات در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

اخیرا باقرپور و همکاران (۲) از مخمر *S.bouardii* برای بیان پروتئین Ovalbumin جهت تحریک سیستم ایمنی در موش استفاده کردند. آن تحقیق از پرموتور القایی Gal1 برای بیان ژن Ovalbumin استفاده گردید. نتایج تحقیق ذکر شده نشان داد که پروتئین نوترکیب Ovalbumin در *Saccharomyces cerevisiae* موتانت By4742 بهتر از *S.bouardii* تحت القاء گالاکتوز بیان شد و لذا آنها موفق به تولید پروتئین نوترکیب در *S.bouardii* نشدند. لذا به نظر می رسد که تولید پروتئین نوترکیب در مخمر *S.bouardii* نسبت به *S.cerevisiae* پائین تر است. بر این اساس در این تحقیق ما ابتدا

منابع

1. Babendure J.R., Babendure J.L., Ding J.H., and Tsien R.Y. 2006. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. RNA 12: 851-861.
2. Bagherpour, G., Ghasemi, H., Zand, B., Zarei, N., Roohvand, F., Ardakani, EM., Azizi, M., and Khalaj, V. 2018. Oral Administration of Recombinant *Saccharomyces bouardii* Expressing Ovalbumin. CPE Fusion Protein Induces Antibody Response in Mice. Front Microbiol. 9:723.
3. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
4. Burns, AJ., and Rowland, IR. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. Curr Issues Intest Microbiol. 1: 13-24.

5. Da Silva, NA., Srikrishnan, S. 2012. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 12: 197-214.
6. Demain, AL., and Vaishnav, P. 2009 .Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 27: 297-306.
7. Drocourt, D., Calmels, T., Reynes, J.P., Baron, M., Tiraby, G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. Nucleic Acids Res.18:4009.
8. Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodriguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, ML., Mattanovich, D., and Villaverde, A.2008. Protein folding and conformational stress in microbialcells producing recombinant protein: a host comparative overview. Microb Cell Fact.7:11.
9. Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G. Nguyen, H.V., C., Gaillardin, and Dujon, B. 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. J. Clin. Microbiol. 39: 551-559.
10. Hoffmann C.S., and Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene, 57: 267-272.
11. Kole, C. and Chen, F. 2012. Genomic resources for discovery of genescontrolling biosynthesis of charantin and polypeptide-P, and molecular breeding in bitter melon. REEIS.
12. Kochetov, A., Palyanov, A., Titov, I., Grigorovich, D., Sarai, A., and Kolchanov, N. 2007. AUG_hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. BMC Bioinformatics, 8: 318.
13. Kozak M. 1990. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. Proc Nat. Acad. Sci. USA, 87: 8301-8305.
14. Kudla, G., Murray, A.W., Tollervey, D., and Plotkin J.B. 2009. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. Science, 324: 255-258.
15. Mallie, M., van Nguyen, P., Bertout, S., Vaillant, C. and Bastide, J. 2001. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. J. Mycol. Med. 11:19-25.
16. Pakbaten, B., Heravi, R.M., Kermanshahi, H., Sekhavati, M.H., Javadmanesh, A., and Ziarat, M.M. 2018. Production of phytase enzyme by a bioengineered probiotic for degrading of phytate phosphorus in the digestive tract of poultry. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-8.
17. Paul, A., and Raychaudhuri, S. 2010. Medicinal Uses and Molecular Identification of Two *Momordica charantia* Varieties – a review, Electronic, Journal of Biology, 6: 43-51.
18. Rahman A and Zaman, K. 1989. Medicinal plants with hypoglycemic activity. J, Ethnopharmacol. 26:1-55.
19. Sarate, P.J., Heinel, S., Poiret, S., Drinić, M., Zwicker, C., Schabussova, I., Daniel, C., and Wiedermann, U. 2019. *E. coli* Nissle 1917 is a safe mucosal delivery vector for a birch-grass pollen chimera to prevent allergic polysensitization. *Mucosal Immun.*12: 132-144.
20. Tolman, K.G., and Chandramouli, J. 2003. Hepatotoxicity of the thiazolidinediones. Clin Liver Dis. 7: 369-379.
21. Tuller, T., Waldmanc, Y.Y., Kupiec, M., and Ruppinc, E. 2010. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 107: 3645–3650.
22. Tuller T., and Zur, H. 2015. Multiple roles of the coding sequence 5 end in gene expression regulation. Nucleic Acids Research, 43:13-28.
23. Venkatesh, S., Reddy, GD., Reddy, BM., Ramesh, M., and Rao, A.V. 2003. Antihyperglycemic activity of

-
- Caralluma attenuata*. Fitoterapia 74:274-279.
24. Zylicz-Stachula A., Zolnierkiewicz O., Sliwinska K., Jezewska-Frackowiak J., and Skowron P.M. 2014. Modified 'one amino acid-one codon' engineering of high GC content TaqII-coding gene from thermophilic *Thermus aquaticus* results in radical expression increase. Microbial Cell Factories 13:7.

Expression of plant insulin in probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*

M.Rahimi¹, A.Yamchi^{2*}, M.Azizi³, M.Shahbazi⁴

¹PhD.student of medicinal plant, Horticulture Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Assistant professor, Department of Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³Professor, Horticulture Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴Professor, Department of Genetics and Medical Molecular Medicine, Golestan university of Medical Science, Gorgan, Iran

Received: 2019/03/27; Accepted: 2019/09/28

Abstract

Background and objectives: Diabetes mellitus is a chronic disorder in carbohydrate, fat and protein metabolism characterized by increase in blood sugar in the patient. The long-term complications of this disease is cardiovascular, renal failure and neurological activity. The use of herbal medicines for the treatment of diabetes is increasing day by day and this has made it more important to recognize the effective herbal medicine. Herbal remedies have been taken into consideration because of fewer complications, reasonable prices, and availability of chemical drugs. The *Momordica charantia* (Linn Family: Cucurbitaceae), whose fruit is known as Karela or bittergourd, is an important anti-diabetic plant. One of the anti-diabetic agents of Karela is Polypeptid-P (p- insulin), a 172 amino acid. The content of polypeptide-P in cultivated plants is relatively low so gene cloning and expression of this polypeptide in microorganism is a quick and useful alternative for solving such problem. The probiotic host has the advantage that after the production of target protein, it is not necessary to purify it but producing recombinant protein in other expression hosts need to be purified. Therefore, in this study p- insulin gene was optimized and expressed in probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*.

Materials and methods: In this research, the sequence of p- insulin gene was optimized for both codon bias and secondary structure of mRNA to effectively express in the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. The optimized gene was cloned into the pESC expression vector under Gal10 promoter and transformed to competent cell. Recombinant yeast was extracted DNA then the PCR reaction was done by p- insulin specific primers. Recombinant yeast was induced by galactose and production of P-insulin protein in the recombinant yeast cytoplasm was verified by SDS-PAGE and mass spectrometry.

Results: A 350 base pair production was amplified by p-insulin specific primers in the polymerase chain reaction. SDS-PAGE electrophoresis pattern was compared host *S. boulardii* and transformed *S. boulardii* carrying pESC/p-insulin construct. Electrophoresis results showed that the 18.5 KD molecular weight p- insulin protein differential band was expressed just in the recombinant yeast and also mass spectrometry results confirmed differential band as a p- insulin protein.

Conclusion: In this study, probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* was used as a successful host to producing p- insulin protein for the first time. This research showed that probiotic yeast *S. boulardii* can be used as a suitable host cell to producing other products in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Momordica charantia*, P- insulin protein, *Saccharomyces boulardii*, SDS-PAGE, Mass spectrometry

*Corresponding Author: yamchi@gau.ac.ir

