مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۵
صفحه ۷۵-۶۷

همسانه‌سازی و انتقال آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاژ T7 به توتون

Cloning and Transformation of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Tobacco

کبری نعلبندی[۱]، اصغر میرزایی اصل[*۲]، لیلا خدایی[۳]، غلام خداکرمیان[۴]
Kobra Nalbandi[1], Asghar Mirzaie Asl[2*], Leila Khodaei[3], Gholam Khodakaramian[4]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی و ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه پیام نور همدان،
۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[1,2]Department of Biotechnology, [4] Plant Protection Dept.
College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
[3]Department of Agriculture, Payam Noor University, Hamedan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۴)

چکیده

کشاورزی مولکولی به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی توسط گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یکی از مهمترین آنزیم‌هاست که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، از قبیل سنتز و مطالعه ساختار و عملکرد RNA ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. RNAهای سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی در هیبریداسیون، ریزآرایه، آزمایشات RNAi و RNA آنتی‌سنس کاربرد دارد. این آنزیم همچنین در سیستم‌های بیانی وابسته به پیشبر و خاتمه دهنده T7 کاربرد فراوان دارد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز یک آنزیم باکتریوفاژی بوده و فعالیت اصلی آن در سیتوپلاسم می‌باشد. تحقیق حاضر جهت همسانه‌سازی، انتقال ژن آنزیم *T7RNA* پلیمراز به هسته سلولهای یوکاریوتی و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت. آغازگرهای مناسب از روی توالی ژن *T7RNA* پلیمراز به همراه توالی‌های مناسب برای آنزیم‌های برشی، طراحی و ژن *T7RNA* پلیمراز مورد نظر پس از جداسازی در ناقل بیانی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. به منظور اطمینان از همسانه‌سازی، سازه تهیه شده با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بررسی شده و همردیفی آن در بانک اطلاعاتی اسیدهای نوکلئیک تأیید گردید. سپس، سازه نوترکیب به کمک سویه LB4404 آگروباکتریوم به گیاهان توتون منتقل و گیاهان تراریخته بر روی محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم، باززا شدند. حضور و بیان ژن *T7RNA* پلیمراز در گیاهان تراریخته با روشهای PCR و RT- PCR تأیید شد.

واژه‌های کلیدی

**آنزیم *T7RNA* پلیمراز،
همسانه‌سازی،
انتقال ژن،
توتون،
کشاورزی مولکولی**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

مقدمه

تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی گویند. تولید پروتئین‌های نوترکیب و آنزیم‌ها در سیستم بیانی گیاهی دارای مزیت‌های بیشماری از جمله: اقتصادی‌تر بودن تولید نسبت به سیستم‌های صنعتی، بیان بالای ژن و تولید در مقیاس زیاد پروتئین‌های نوترکیب، پایداری بیشتر، حفظ ساختار اصلی پروتئین و عدم آلودگی می‌باشد (Shinmyo and Kato. 2010; Tekoah et al. 2015). بنابراین گیاهان تراریخته برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و آنزیم‌های صنعتی جایگزین مناسبی می‌باشند. گونه‌های گیاهی زیادی در کشاورزی مولکولی استفاده شده است. محصولات برگی، بذر خشک، دانه‌های روغنی، میوه و سبزیجات، گیاهان مدل غیر زراعی مانند آرابیدوپسیس و زراعی از قبیل توتون از جمله آنها می‌باشد. توتون زراعی (*Nicotiana tabacum*) به عنوان یک محصول غیر غذایی و غیر علوفه‌ای، محصول برگی است که تاکنون برای تولید پروتئین‌های نوترکیب بیشتر استفاده گردیده است و محصول بیشتری بعلت چند بار برداشت در سال تولید می‌کند. توتون دارای انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به دستورزی ژنتیکی می‌باشد و همچنین تولید کننده وزن تر عالی (۵۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار در عملکرد برگ تازه در یک فصل کاشت)، تولید کننده بذر زیاد (بیش از یک میلیون بذر در یک گیاه) می‌باشد(Daniell et al. 2003; Ganaphathi et al. 2004; Dhingra et al. 2008; Leslie et al. 2004; Twyman et al. 2013). بدلیل خود گرده افشان بودن گیاه توتون و کم بودن خویشاوندان زراعی و وحشی برای آن، فرار ژنها از این گیاه بسیار کم می‌باشد. علاوه بر این هر دو روش نر عقیمی و عقیمی بذر قبلاً در توتون ایجاد شده‌اند و تکنولوژی پیشرفته‌ای برای جلوگیری از انتقال و فرار ژن از طریق گرده یا بذر به گیاهان دیگر به آسانی در دسترس است (Ma et al. 2003). بنابراین بر خلاف بسیاری از بیوراکتورهای گیاهی، توتون از نظر مسائل ایمنی زیستی و اخلاق زیستی و کمترین احتمال آلودگی زنجیره‌های گیاهی و جانوری بهترین شرایط را دارد.

آنزیم *T7RNA* پلیمراز باکتریوفاژ T7 یک آنزیم تک زیرواحدی می‌باشد. رونویسی توسط این آنزیم به سرعت و بسیار اختصاصی بوده و فقط به راه‌انداز T7 اتصال پیدا می‌کند و ۵ برابر سریعتر از RNA پلیمراز باکتری انجام می‌گیرد. رونویسی با اتصال اختصاصی آنزیم به راه‌انداز شروع شده و خاتمه نسخه‌برداری نیاز به سیگنالهای بخصوصی دارد که باعث می‌شود این آنزیم قادر به رونویسی از هر DNA ای نباشد. این آنزیم رونویسی را در T7 DNA و ژن‌های دارای راه‌انداز T7 و خاتمه دهنده T7 انجام می‌دهد (Studier and Moffatt., 1986; Carter et al., 1981; Borkotoky et al. 2016). زنجیره پلی‌پپتیدی این آنزیم دارای ۸۸۳ آمینواسید با وزن مولکولی ۹۸۰۹۲ دالتون می‌باشد. آنزیم *T7RNA* پلیمراز اولین بار از باکتریوفاژ T7 آلوده‌کننده باکتری ای کولای در سال ۱۹۶۹ جداسازی گردیده است (Chamberlin et al., 1970). ساختار اولیه این آنزیم در سال ۱۹۸۰ تعیین گردید و ساختار کریستالی آن بوسیله اشعه ایکس تجزیه و تحلیل گردید(Sousa et al., 1993; Cheetham and Steitz., 1999; Basu et al. 2014). غلظت mRNA تولیدی توسط آنزیم *T7RNA* پلیمراز با غلظت RNA های ریبوزمی قابل مقایسه هست و بنابراین تولید پروتئین توسط این آنزیم ۵۰٪ کل پروتئینها در عرض چند ساعت خواهد بود (Studier and Moffatt, 1986). آنزیم *T7RNA* پلیمراز برای سنتز RNA نه تنها در محیط *In vivo* بلکه برای سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) نیز مناسب می‌باشد. سنتز RNA در شرایط آزمایشگاهی بوسیله *T7RNA* پلیمراز به طور گسترده‌ای در انواع دستورالعمل‌های تکثیر از جمله روش ابروین (Eberwine) و دستورالعمل اسمارت (SMART)، استفاده می‌شود (Pamela et al. Liang. 2007; 2004).

پیش از این سنتز RNA و cDNA بر اساس روش PCR و فعالیت ترانس کریپتاز معکوس انجام می‌گرفت ولی به دلیل تکثیر متغیر cDNA و خطای Tag پلیمرازها، یک روش جدیدی برای سنتز RNA و cDNA ابداع گردید که روش ابروین نامیده می‌شود که اساس آن رونویسی در شرایط آزمایشگاهی بر اساس راه‌انداز T7 و *T7RNA* پلیمراز می‌باشد. اساس بسیاری از کیت‌های سنتز RNA استفاده از این روش و آنزیم *T7RNA* پلیمراز می‌باشد (Russel et al. 2008).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

RNAهای سنتز شده توسط آنزیم *T7RNA* پلیمراز در مطالعه ساختار و عملکرد RNA در شرایط آزمایشگاهی در آزمایشات هیبریداسیون از جمله سادرن بلات، ریزآرایه، RNA مداخله‌گر (RNA interference)، آزمایشات آنتی سنس و... استفاده می‌شوند. برای سنتز RNA بوسیله آنزیم *T7RNA* پلیمراز ژن‌های مورد نظر در ناقلهایی که دارای راه‌انداز T7 می‌باشد، همسانه سازی می‌شود (Pamela et al. 2004; Novak et al. 2004 ; Yang et al. 2007). خالص‌سازی و جداسازی این آنزیم از سلول‌های تحت تاثیر باکتریوفاژ مناسب نیست چون آنزیم به میزان کم، بلافاصله بعد از عفونت تولید می‌شود. همچنین بلافاصله پس از تولید این آنزیم، لیز شدن سلول در مدت کوتاهی انجام می‌شود. بنابراین با همسانه سازی ژن این آنزیم در یک ناقل مناسب و انتقال آن به داخل سلول میزبان می‌توان مقادیر زیادی از این آنزیم را تولید نمود (Nilson et al . 2013; Davanloo et al. 1984). در دهه‌های گذشته تولید تجاری و در مقیاس وسیع این آنزیم به منظور توسعه تکنولوژهای مبتنی بر آنزیم *T7RNA* پلیمراز بوجود آمده است و بیشتر این آنزیم‌ها در باکتریها تولید گردیده است (Davanloo et al. 1984). به طور معمول تولید آنزیم *T7RNA* پلیمراز نوترکیب عمدتاً به سیستم‌های میکروبی وابسته است. همچنین فرمهای تجاری این آنزیم گران می‌باشد. با توجه به اهمیت روزافزون این آنزیم در پژوهش‌های بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، تولید انبوه و کم هزینه آن در قالب کشاورزی مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به نیاز روزافزون تولید تجاری این آنزیم در شکل صحیح و مقیاس گسترده، در این تحقیق از گیاه توتون به عنوان یک منبع مناسب برای تولید این آنزیم استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ژن *T7RNA* پلیمراز پس از تکثیر از طریق PCR با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pCAMBIA1304 بین راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *Bst*EII همسانه سازی گردید و به باکتری *E .coli* منتقل و تکثیر شد. سازه ژنی تهیه شده با استفاده از آزمون‌های PCR، واکنش هضم آنزیمی و در نهایت توالی‌یابی و همردیف-سازی آن در بانک‌های اطلاعاتی مورد تأیید قرار گرفت. این سازه سپس به آگروباکتریوم منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم جهت تلقیح گیاهان توتون استفاده شد. گیاهان توتون حاوی ژن *T7RNA* پلیمراز با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی باززایی شدند. جهت اثبات انتقال ژن از روش PCR و RT-PCR استفاده گردید.

باکتریها

در این پژوهش از دو باکتری *E. coli* سویه DH5α و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان نگهداری و تکثیر سازه تهیه شده استفاده شد و از *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن مورد نظر به گیاه توتون استفاده شد.

آغازگرها

برای تکثیر ژن *T7RNA* پلیمراز طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد که حاوی جایگاه‌های برشی *Bgl*II و *Bst*EII برای درج در ناقل pCAMBIA1304 باشند. به منظور افزایش کارایی هضم توسط آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم، به دو طرف آغازگر افزوده شد (جدول ۱).

جدول۱- آغازگرها برای همسانه‌سازی در ناقل pCAMBIA1304

Table1. Primers for cloning in pCAMBIA1304

نام آغازگر	توالی آغازگر
آغازگر پیشرو	**GGAAGATCTGATCCGGATTTACTAACTGGAGAG**
آغازگر معکوس	**CCGGTCACCTCCGGAGTCGTATTGATTTGG**

ناقل‌ها

در مطالعه حاضر ژن *T7RNA* پلیمراز، از ناقل pAR3283 (تهیه شده از دکتر ویلیام استودیر، آزمایشگاه ملی بروکهیون، ایالات متحده، آمریکا) به ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 منتقل شد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش باکتریایی، ژن مقاومت به هیگرومایسین جهت گزینش در گیاه، راه‌انداز

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

CaMV35S و توالی خاتمه دهنده NOS است.

گیاهان توتون

در این تحقیق گیاه توتون *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi استفاده شد (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری). بذور استریل شده و در محیط ۱/۲MS، بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. ساقه گیاه توتون به قطعاتی به طول۲-۳ سانتیمتر حاوی یک جوانه و یک برگ بریده شده و به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. بعد از دو هفته گیاهان رشد کرده و جهت تلقیح آماده شدند.

تکثیر با PCR و تخلیص محصول PCR

تکثیر قطعه DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مواد واکنش دهنده PCR (در حجم ۲۵µl) عبارت بودند از : ۰/۲ mM از dNTP، mM MgCl2 ۱/۵، mM ۰/۵ از هر یک از آغازگرها، ۱۰۰-۳۰۰ نانوگرم از DNA به عنوان الگو و نیم واحد از آنزیم *pfu* پلیمراز. شرایط PCR برای تکثیر آنزیم *T7RNA* پلیمراز شامل دمای واسرشت سازی ^{o}C ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ^{o}C۶۲ برای ۴۰ ثانیه و دمای طویل شدن ^{o}C۷۲ به مدت ۵ دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه می‌باشد. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص *Vivantis* استفاده گردید. سپس محصول تخلیص شده و همچنین ناقل pCAMBIA1304 با آنزیم‌های *Bgl*II و *BstE*II هضم گردیده و دوباره خالص‌سازی گردیدند. در نهایت ژن *T7RNA* پلیمراز در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. سازه بدست آمده pACT7 نامیده شد.

تراژن نمودن *E. coli* با سازه تهیه شده

برای تراژن نمودن باکتری از روش شوک حرارتی استفاده شد. بدین صورت که باکتری‌های مستعد شده *E. coli* ذوب گردیده همراه با محصول همسانه‌سازی به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتریها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ^{o}C۴۲ و دوباره در یخ به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به میکروتیوب‌ها اضافه شده به مدت ۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور در دمای ^{o}C۳۷ قرار داده شدند. در نهایت محلول باکتری حاصل روی پتری دیش حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توزیع شد و در دمای ^{o}C۳۷ به مدت ۱۶ ساعت نگهداری گردید.

تراریختی توتون با استفاده از آگروباکتریوم

گیاهان توتون بر روی محیط MS کشت داده شدند و جوانترین برگها (طول ۴ سانتیمتر) برای تلقیح انتخاب شدند. سوسپانسیون آگروباکتریوم (OD_{600}=0.8) حاوی سازه مورد نظر تهیه گردید. برگهای آماده شده به ۱۰ قطعه تقسیم شدند و در داخل پتری دیش‌های حاوی۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود نگهداری شدند. در این مدت هر چند دقیقه یکبار شیک آرامی به پتری‌ها داده شد. قطعات برگی بر روی محیط هم کشتی (محیط MS+۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA+ 2 میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل و در دمای ^{o}C۲۶ در تاریکی به مدت ۲ روز نگهداری شدند. در مرحله بعدی این قطعات برگی بر روی محیط MSIII (شامل محیط هم کشتی + ۱۵و ۲۵ میلی-گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) در دمای^{o}C ۲۶ با یک دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۴ هفته منتقل شدند. بعد از ساقه زایی، گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط ریشه زایی (محیط پایه MS+ ۲۵ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) انتقال و در دمای ^{o}C۲۶ با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا ریشه زایی صورت گرفت. در نهایت بعد از ریشه زایی، گیاهان توتون به گلدانهای حاوی ورمیکولات منتقل و سپس به خاک انتقال داده شدند.

استخراج DNA و بررسی PCR

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. بررسی PCR با استفاده از

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

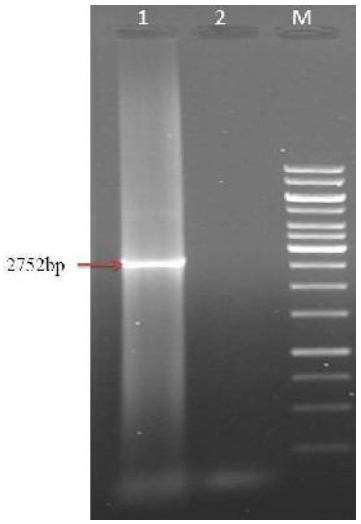
آغازگرهای اختصاصی انجام و گیاهان حاوی ژن *T7RNA* پلیمراز شناسایی و انتخاب شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

برگهای جوان گیاهان باززایی شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. RNA استخراج شده برای بررسی کمیت و کیفیت روی ژل آگارز بررسی گردید. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA استخراجی، تیمار با آنزیم *DNase* I انجام شد و جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA، از RNA های استخراج شده واکنش PCR صورت گرفت. برای استخراج RNA از محلول استخراج RNA، RNX Plus (سیناکلون) استفاده شد. **سپس** برای سنتز cDNA از کیت (SuperscriptII شرکت Invitrogene) استفاده گردید. قبل از افزودن مخلوط PCR برای حذف ساختارهای ثانویه RNA، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. رونویسی معکوس از روی RNA ها به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای تصادفی، dT و همچنین آغازگر معکوس اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز انجام گرفت. سپس cDNAی سنتز شده توسط آب استریل رقیق سازی شد و در دمای ۲۰°c- نگهداری گردید. برای رقیق‌سازی به مخلوط حاصل واکنش RT- PCR میزان ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. واکنش‌های PCR به شرح قبل انجام شدند. برای تأیید صحت سنتز cDNA (Jain et al., 2006; Xiao et al. 2012; Lee et al. 2010)، از ژنهای دایم بیان شونده استفاده می‌شود. در این تحقیق آغازگرهای ژن گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز *GAPDH* (با توالی F: TATGTTTGTTGTTGGTGTCAACGAGCACGAATACAAG و R: ATGTTAAATGATGCAGCCCTTCCACCTCTC) به عنوان ژن دایم بیان شونده و کنترل مثبت استفاده گردید.

تکثیر ژن *T7RNA* پلیمراز بوسیله PCR با آغازگرهای اختصاصی

ژن *T7RNA* پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و محل‌های برشی *Bgl*II (درآغازگر پیشرو) و *BstE*II (در آغازگر معکوس) طراحی شده بود، از طریق PCR تکثیر گردید. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بیانگر تکثیر مناسب می‌باشد (شکل۱).



شکل۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR، تکثیر *T7RNA* پلیمراز، M: مارکر Kb ۱، ۱: محصول PCR، تکثیر قطعه ۲۷۵۲bp ژن *T7RNA* پلیمراز ۲: واکنش شاهد (آب به عنوان الگو)

Figure 1. Electrophoresis of the PCR product, amplification of T7RNA polymerase 1: PCR product 2: control (water as template) M: 1 kb DNA Ladder.

نتایج

همسانه‌سازی ژن *T7RNA* پلیمراز در ناقل بیانی گیاهی (pCAMBIA1304)

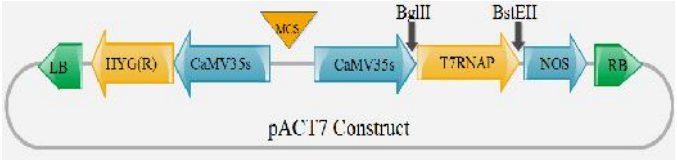
محصول PCR و همچنین ناقل با آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *BstE*II برش داده شدند. پس از صحت برش‌ها، واکنش اتصال صورت گرفت و در نهایت محصول هضم آنزیمی در وکتور pCAMBIA1304 همسانه سازی گردید. سازه ایجاد شده (شکل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

۲) به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد DH5α منتقل گردید. جهت تأیید همسانه‌سازی از واکنش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bgl*II و *BstE*II (شکل ۳)، و تعیین توالی استفاده شد. اندازه ناقل نوترکیب خطی شده در اثر هضم با یک آنزیم *Bgl*II و *BstE*II به طول ۱۵۱۱۴ نوکلئوتیدی صحت همسانه سازی را نشان می‌دهد و همچنین هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II خروج قطعه همسانه سازی شده به اندازه ۲۷۵۲ نوکلئوتیدی را تأیید کرد (شکل ۳). آنالیز همردیفی این ژن شباهت ۹۷-۹۸ درصدی را با توالی پایگاه NCBI به شماره دسترسی JQ436739.1 نشان می‌دهد که آنزیم *T7RNA* پلیمراز است. انتقال سازه بیانی pACT7 به آگروباکتریوم با استفاده از الکتروپوراسیون انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی ژن مورد نظر روی محیط کشت LB دارای آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین رشد داده شد. بررسی کلونی ها با روش PCR با آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را در آگروباکتریوم تأیید کرد.

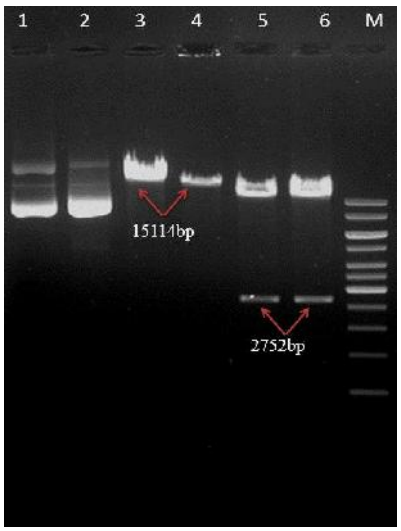
انتقال ژن *T7RNA* به توتون

عمل تراریخته نمودن گیاهان توتون با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد LB4404 صورت گرفت. برگهای توتون که با اگروباکتریوم (حاوی سازه pACT7) تلقیح شدند بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (۱۵ و ۲۵ میلی-گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند.



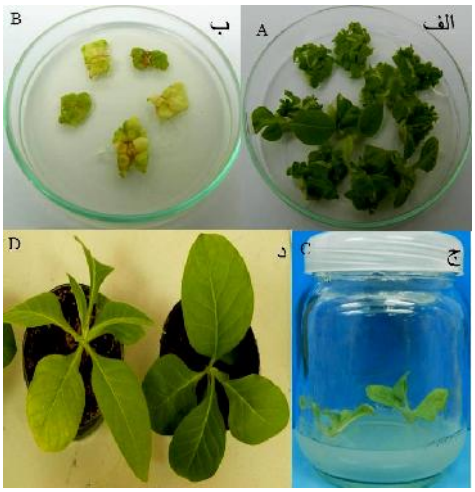
شکل ۲- سازه pACT7. این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسین، محل برشی *Bgl*II و *BstE*II، راه‌انداز CaMV35S، توالی خاتمه دهنده NOS، توالی-های مرزی چپ و مرز راست و ژن *T7RNA* پلیمراز می‌باشد.

Figure 2. T-DNA region of pACT7. LB and RB: Left and Right Borders, HYG(R): Hygromycin selectable marker, CaMV35S: Cauliflower Mosaic Virus promoter and NOS: Nopaline Synthase terminator.



شکل ۳- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pACT7، ۱ و ۲: پلاسمید نوترکیب ۳: هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم *Bgl*II و خطی شدن پلاسمید ۴: هضم با آنزیم *BstE*II و خطی شدن پلاسمید ۵: هضم با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II پلاسمید۱ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده ۶: هضم با دو آنزیم *Bgl*II و *BstE*II پلاسمید۲ و خروج قطعه ۲۷۵۲bp ژن همسانه سازی شده، M: مارکر ۱Kb

Figure 3. Proof of the presence of *T7RNAP* gene by digestion reaction. 1 and 2: recombinant vector, 3: recombinant vector after digestion by *BglII* enzyme, 4: recombinant vector after digestion by *BstElII* enzyme, 5: recombinant vector 1 after digestion by *BglII* and *BstEII* enzymes, 6: recombinant vector 2 after digestion by *BglII* and *BstEII* enzymes. M: 1 kb DNA Ladder.



شکل ۴- الف: پیدایش و رشد جوانه‌های اولیه از ریزنمونه‌ها بر سطح محیط انتخابی اولیه حاوی ۱۵mg.L^{-1} هیگرومایسین. ۳ الی ۴ هفته بعد از تلقیح، ریزنمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه نمودند، ب: هیچ گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های شاهد (تلقیح با آگروباکتریوم بدون ناقل) مشاهده نشد.ج: گسترش ریشه‌ها در محیط ریشه‌زایی، د: رشد گیاهچه‌ها در گلدان.

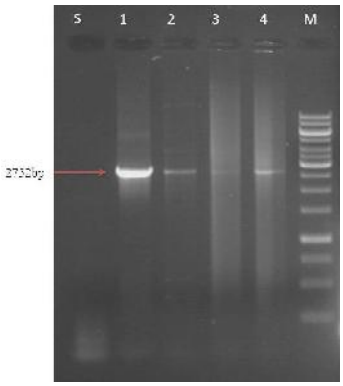
Figure 4 A: Regeneration of plants on selection medium containing hygromycin (15 mg/l), B: negative Control C: plants on selection medium, D: Transgenic tobacco plants in pots.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

پس از چند هفته ریز نمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند (شکل ۴- الف) در حالی که که هیچگونه باززایی بر روی برگهای توتون گیاهان شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه) مشاهده نگردید (شکل۴- ب).

استخراج DNA ژنومی و آنالیز PCR

استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام گرفت. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل۵).

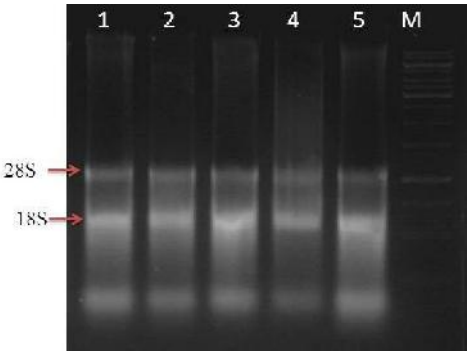


شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی *T7RNAP* بر روی گیاه تراریخته لاین ۱ تا ۴ حضور قطعه ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد S: توتون شاهد هیچ گونه باندی را نشان نمی‌دهد M : مارکر ۱Kb

Figure 5 Electrophoresis of the PCR product in transgenic plant by PCR, M: 1 kb DNA Ladder, 1-4 : transgenic plant, S: wild type plant.

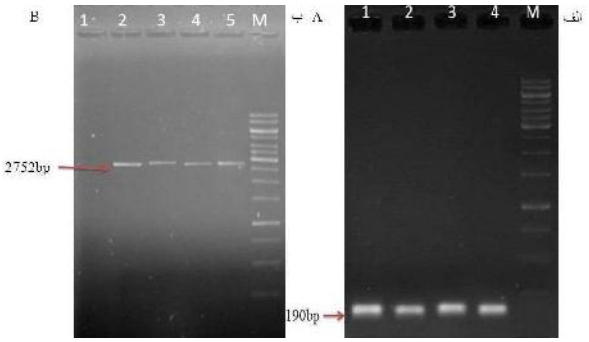
استخراج RNA و سنتز cDNA (RT-PCR)

استخراج RNA از برگهای جوان گیاهان باززایی شده (لاین ۱الی۵) انجام گرفت. RNA های استخراجی دارای کیفیت مناسب و زیر واحد ۲۸S و ۱۸S بود (شکل ۶). تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. RNA تیمار شده با آنزیم *DNase* در واکنش PCR، به عنوان الگو استفاده شد و با حذف کامل DNA هیچ تکثیری انجام نشد. در این مرحله سنتز cDNA برای RNA استخراج شده انجام شد برای رقیق سازی به مخلوط حاصل واکنش RT-PCR، ۴۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد و ۳ میکرولیتر از آن برای انجام PCR به عنوان الگو استفاده گردید. صحت ساخت cDNA با آغازگر ژن دایم بیان شونده *GAPDH* (گلیسیرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز) و تکثیر باند مربوط به ژن *GAPDH*، تأیید شد (شکل ۷- الف). آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز بر روی cDNA ساخته شده، وجود قطعه ۲۷۵۲ جفت باز را نشان می‌دهد در حالی که در گیاهان شاهد هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل۷- ب).



شکل ۶- الکتروفورز RNA استخراج شده از گیاهان تراریخته لاین ۱ الی ۴، ۵: RNA استخراجی از توتون شاهد (غیر تراریخته) M: مارکر ۱Kb

Figure 6. Electrophoresis of RNA extracted from transgenic plants Line 1 to 4, 5: RNA extracted from non-transgenic plant M: 1 kb DNA Ladder.



شکل ۷- الف: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای ژن *GAPDH* بر روی cDNA های سنتز شده (لاین ۱ -۴) ب: الکتروفورز محصول واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *T7RNA* پلیمراز بر روی cDNAهای سنتز شده ۱: گیاه شاهد (عدم تکثیر) ۲-۵: گیاه تراریخته، باند ۲۷۵۲ جفت بازی را نشان می‌دهد M : مارکر ۱Kb

Figure 7. A: Electrophoresis of PCR product with GAPDH primers on the cDNA synthesized (lane 1 -4) B: Electrophoresis of PCR product with T7RNA-specific primers on the cDNA synthesized 1: control plant 2 -5: Transgenic plants. M: 1 kb DNA Ladder

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

بحث

آنزیم *T7RNA* پلیمراز در سیستم‌های مختلف باکتریایی همسانه سازی و تولید شده است ولی همسانه سازی و تولید آن در گیاه کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش از ناقل بیانی pCAMBIA1304 جهت همسانه‌سازی و انتقال ژن *T7RNAP* به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری از ویژگیها به میزان زیادی درانتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسن (جهت انتخاب باکتری حاوی ناقل) و ژن مقاومت به هیگرومایسین (جهت انتخاب گیاه تراریخته) به عنوان ژن‌های گزینشگر، راه‌انداز CaMV35S، خاتمه دهنده NOS می‌باشد (Pratheesh et al. 2013). اندازه کوچک این ناقل، تعدد نسخه‌ها و پایداری در آگروباکتریوم از سایر ویژگیهای این ناقل می‌باشد. در دولپه‌ای هایی مثل توتون راه‌انداز CaMV35S یک انتخاب مناسب و عمومی می‌باشد که باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر می‌شود (Raha et al. 2008). جهت انتقال ژن به گیاه توتون از آگروباکتریوم استفاده شد که به طور گسترده‌ای جهت تراریختی گیاهان بخصوص دو لپه‌ایها استفاده می‌شود. گیاه توتون به تلقیح با نژاد آگروباکتریوم حساس است، گیاهچه‌ها به طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس، باززا می‌گردند و از محل لبه‌های بریده شده ریزنمونه برگی تلقیح شده با آگروباکتریوم حاوی ناقل رشد می‌کنند (Gubis et al. 2007). بررسی‌های مولکولی با روش PCR بر روی گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد، انتقال ژن *T7RNA* پلیمراز به گیاهان باززا شده را نشان داد. در این تحقیق تیمار RNA استخراج شده با آنزیم *DNase* برای حذف DNA انجام گردید. در صورت عدم حذف DNA ژنومی از RNA های استخراجی cDNA سنتز شده خالص نخواهد بود و نتایج RT-PCR برای تأیید تراریختی فاقد اعتبار لازم خواهد بود (Bustina and Tania. 2004). پس از ارزیابی ملکولی گیاهان تراریخته از طریق PCR و RT- PCR این گیاهان به گلخانه منتقل شدند، تا در نسل‌های بعدی مورد آنالیز قرار گیرند.

آنزیم *T7RNA* پلیمراز یکی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی، علوم پایه، پزشکی و صنعت، کاربردهای فراوانی دارد. در سالهای گذشته همچنین از این آنزیم در سیستم‌های مختلف بیانی برای افزایش بیان و پایداری بیان ژن استفاده شده است. آنزیم T7RNA پلیمراز دارای خصوصیاتی است که برای استفاده در سیستم‌های بیانی مناسب می‌باشد از جمله عدم نیاز به فاکتور اضافی برای شناسایی راه‌انداز، بسیار اختصاصی عمل می‌کند و فقط ژنهای تحت کنترل راه‌انداز اختصاصی را بیان می کند (Tunitskaya et al. 2002). با توجه به کاربرد وسیع این آنزیم در پژوهش‌ها، تولید انبوه و کم هزینه این آنزیم از طریق کشاورزی مولکولی ارزشمند خواهد بود.

منابع

Basu RS, Warner BA, Molodtsov V, Pupov D, Esyunina D, Fernández-Tornero C, Kulbachinskiy A, Murakami KS. 2014. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *The Journal of Biology Chemistry*. 289 (35): 24549–24559.

Borkotoky S, Meena CK, Murali A. 2016. Interaction Analysis of T7 RNA Polymerase with Heparin and Its Low Molecular Weight Derivatives - An In Silico Approach. *Bioinformatics and Biology Insights*. 29 (10):155-66.

Bustin S.A, Tania N. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*.15:155–166.

Carter A. D, Morris C. E, and McAllister W. T. 1981. Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA. *Journal of Virology*. 37: 636-642.

Chamberlin M, and Ring J. 1970. Characterization of T7-specific Ribonucleic Acid Polymerase. *The Journal of Biology Chemistry*. 248: 2235-2244.

Cheetham G. M, Jeruzalmi D, and Steitz T. A. 1999. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature*. 399: 80-83.

Daniell H. 2003. Medical molecular farming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via chloroplast genome (Vasil, I.K. Ed.). *Kluwer Academic Publishers. Netherlands*, pp: 371-376.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]

Davanloo P, Alan H,R, John J.D, and Studier F.W. 1984. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81: 2035-2039.

Dhingra A, James V.A, Koop H.U,3, Mok M.C, Paepe R. D, Gallo M, Folta K.M. 2008. Tobacco. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0.

Ganapath R, Suprasanna P, Rao P, Bapat V.A. 2004. Tobacco *(Nicotiana tabacum* L.) A model system for tissue culture interventions and genetic engineering**.** *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 171-184.

Gubis J, Vankova R, Cervena V, Dragunova M, Lichtnerova H, Dokupil T, Jurekova Z. 2007. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany*. 73: 505–511.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK,Khurana JP .2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345:646-651.

Lee J.M, Roche J.R, Donaghy D,Thrush A, Sathish P. 2010. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Molecular Biology*.11:8.

Leslie M, Shama Robert K, Peterson D. 2004. Agricultural and Biological Risk Assessment. Montana State University, Bozeman, MT 59717.

Liang K. 2007.Transcriptomics & Functional Genomics. http://www.ipc.nxgenomics.org/newsletter/no7.htm.

Ma J.K.C, Drake P.M.W, and Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4: 794-805.

Nilsen T. W, Rio D, Manuel M. 2013. High-Yield Synthesis of RNA Using T7 RNA Polymerase and Plasmid DNA or Oligonucleotide Templates. *Cold Spring Harbor*, NY, USA.

Novak P.K, Lee J.S, Mikaelyan A, Patel V, andThorgeirsson S.S. 2004. Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *BioTechniques*. 37: 580-588.

Pamela R, Duschl J, Klaus R. 2004. Optimized RNA ampliffication using T7-RNA-polymerase based in vitro transcription. *Analytical Biochemistry*. 334: 164–174.

Pratheesh P T, Kurup G.M. 2013. Molecular cloning and expression of Tb antigene protein in Microalga *Chlamydomonas reinhardtii. Indian gournal of Biotechnology*. 12: 350-355.

Raha S, Pattanaik S, Maiti I.B. 2008. KTRDC-developed genetic promoters for use in plant genetic engineering**.** Kentucky Tobacco Research and Development Center. 8-17-108**.**

Russell S, Meadows L.A, Roslin R. R. 2008. Microarray Technology in Practice. pp.464.

Shinha P, Saxena R.k, Singh V.K, Krishnamurthy L, Varshney R.K. 2015. Selection and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) under Heat and Salt Stress Conditions. *Front Plant Sci*. 6: 1071.

Shinmyo A, Kato K. 2010. Molecular farming: production of drugs and vaccinesin higher plants. *The Journal of Antibiotics*. 63: 431–433.

Sousa R, Chung Y. T, Rose J. P, and Wang B.C. 1993.Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 A resolution. *Nature*. 364: 593-599.

Studier F. W, and Moffatt B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to directselective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 189: 113-130.

Tekoah Y, Shulman A, KizhnerT, Ruderfer l, Fux L, Nataf Y, Bartfeld D, Ariel T, Gingis–Velitski S, Hanania U, Shaaltiel Y. 2015. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience. *Plant Biotechnology Journal*. 13: 1199–1208.

Tunitskaya V.L, and Kochetkov S.N. 2002. Structural–Functional Analysis of Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Biochemistry (Moscow*). 67(10): 1124-1135.

Twyman R. M, Schillberg S, Fischer R. 2013. Optimizing the Yield of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. Current Pharmaceutical Design. 19: 5486-5494. University of London.

Xiao D, Zhang N.W, Zhao J.J, Bonnema G, Hou X.L. 2012. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalisation in non-heading Chinese cabbage. *Functional Plant Biology*. 39 (4): 342-350.

Yang M , Tsoi P.Y, Wing Li C, Zhao J. 2007. Analysis of interactions of template/primer duplexes with T7 DNA polymerase by oligonucleotide microarray. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 115: 428–433.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.11.8]