مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۶۷-۱۵۷

10.61186/gebsj.12.2.157

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 157-167

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

استفاده از پلتفرم سوسپانسیون سلول‌های گیاهی BY-2 برای تولید آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز

Utilizing Plant BY-2 Cell Suspension Platform for the Production of Beta-1, 3-Glucanase Enzyme

رضا محمدزاده [۱،۲]، مصطفی مطلبی [۱*] و زهرا مقدسی جهرمی [۱]

Reza Mohammadzadeh[1,2], Mostafa Motallebi[1*] and Zahra Moghaddassi Jahromi[1]

۱-گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران
۲-گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه مراغه، مراغه

1. Plant Molecular Biotechnology Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
2. Cell and Molecular Biology Department, University of Maragheh

Corresponding Author, Email: نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی
motalebi@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۷)
Received: 2023/06/19 | Accepted: 2023/09/8 | Published: 2024/03/14

چکیده

به دلیل افزایش تقاضا برای پروتئین‌های نوترکیب عاری از فرآورده‌های حیوانی، سلول‌های گیاهی به عنوان یک پلتفرم مناسب برای تولید این پروتئین‌ها مورد توجه می‌باشند. نگهداری ارزان، ساده بودن جداسازی و خالص‌سازی محصول تولید شده و کشت مستقل از شرایط آب و هوایی، کیفیت خاک، فصل‌ها، طول روز و وضع هوا از مزیت‌های استفاده از سوسپانسیون‌های سلولی می‌باشد. در این تحقیق از سلول‌های گیاهی BY-2 استفاده شد که علاوه بر مزیت‌های فوق، سرعت تقسیم بالای سلولی از ویژگی‌های مهم سلول‌های BY-2 است. به منظور بهینه‌سازی انتقال و بیان ژن در سلول‌های BY-2، ابتدا ژن گزارشگر *β-glucuronidase* (*gus*) به این سلول‌ها منتقل شد. برای اثبات حضور ژن *gus* در سلول‌های BY-2، قطعه ۵۲۱bp مورد انتظار با استفاده از PCR تکثیر شد. جهت تایید بیشتر تراریخته بودن سلول‌های BY-2، از سنجش بیوشیمیایی GUS که باعث تغییر رنگ (آبی) سلول‌ها می‌شود استفاده شد. جهت بیان آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز، ژن *β-1,3 glucanase* (*bgnI*) حاوی اینترون از جدایه قارچ *Trichoderma virens* در وکتور دوگانه pBI121^{GUS-} همسانه‌سازی و سازه بدست آمده به سلول‌های BY-2 جهت بیان پروتئین منتقل شد. بررسی بیان آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در سلول‌های تراریخته، با استفاده از الگوی پروتئینی توسط SDS-PAGE انجام گرفته و بیان آنزیم مورد نظر در سلول‌های BY-2 مورد تایید قرار گرفت. برای تعیین فعالیت آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز (BgnI) از روش دی نیترو سالسیلیک اسید (DNS)، جهت اندازه‌گیری مقدار قندهای احیا شده حاصل از عمل این آنزیم استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که سلول‌های BY-2 تراریخته قادر به بیان آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز فعال می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز،
پروتئین نوترکیب،
ژن *bgnI*،
سلول BY-2،
گلوکان

Mohammadzadeh R, Motallebi M, Moghaddassi Jahromi Z. Utilizing Plant BY-2 Cell Suspension Platform for the Production of Beta-1, 3-Glucanase Enzyme. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :157-167. doi:10.61186/gebsj.12.2.157
URL: http://gebsj.ir/article-1-463-fa.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Due to the increasing demand for recombinant proteins free from animal products, plant cells are considered as a suitable platform for the production of these proteins. Plant cells have advantages such as low maintenance cost, ease of separation and purification of the produced products, and independent cultivation from weather conditions, soil quality, seasons, day length, and weather conditions. In this study, BY-2 plant cells were used as a platform for producing recombinant proteins. BY-2 cells have a high cell division rate, which is an important feature of these cells. To optimize the transfer and expression of genes in BY-2 cells, the *gus* reporter gene was transferred to these cells. Expression of this gene leads to a measurable phenotype. To confirm the presence of the *gus* gene in BY-2 cells, the expected 521bp fragment was observed using PCR. Additionally, to further confirm the biochemical expression of GUS in BY-2 cells, cell blue staining was observed. To express the beta-1,3-glucanase enzyme, the intron containing *bgn*I gene from the *T. virens* fungal strain was transferred to BY-2 cells using the pBI121^{GUS-} dual vector. The expression of the protein in BY-2 cells was confirmed by SDS-PAGE analysis. The activity of the beta-1,3-glucanase enzyme (BgnI) was determined using the dinitrosalicylic acid (DNS) method to measure the amount of reducing sugars produced by the enzyme. The results showed that the transgenic BY-2 cells were capable of expressing active beta-1,3-glucanase enzyme.

Keywords: beta-1,3-glucanase enzyme, recombinant proteins, *bgn*I gene, BY-2 cell, glucan.

مقدمه

بتاگلوکان‌ها دسته بزرگ و متنوعی از پلی ساکاریدهای طبیعی هستند که از مونومرهای گلوکز با پیوند بتا-۱و۳ و یا تلفیقی از دو پیوند بتا-۱و۳ و بتا-۱و٤ ساخته شده‌اند.گلوکان‌ها به طور گسترده در طبیعت پراکنده هستند و می‌توان آنها را در مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌های دریایی و غلات، جایی که نقش‌های ذخیره سازی، ساختاری و حفاظتی را ایفا می‌کنند یافت (Du *et al*., 2019; Murphy *et al*., 2021; Saito *et al*., 1968; Usoltseva *et al*., 2020).

آنزیم‌های بتا-۱و۳ گلوکانازی دسته‌ای از Pathogenesis (PR) Related پروتئین‌ها بوده که به خانواده PR-2 تعلق دارند و به طور گسترده در طبیعت پراکنده هستند (C.-T. Wu *et al*., 2001). این آنزیم‌ها بیشتر توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و برخی از بی‌مهرگان بیان می‌شوند، که در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف نقش دارند(Mackay et al., 1985; Sova et al., 2013). این فرایندها شامل تولید انرژی، بازسازی و رشد سلولی، دفاع در برابر پاتوژن‌های قارچی، جوانه‌زنی بذر، هضم و تولید مثل می‌شوند (Dong & Dunstan, 1997; Sova *et al*., 2003; Q. Wu *et al*., 2018; Carvalho *et al*., 2021; Ghazavi Esfahani *et al*., 2023). از این آنزیم‌ها در مواردی مانند: تبدیل مواد لیگنوسلولزی به قندهای قابل تخمیر برای تولید بیواتانول؛ مکمل‌های خوراک دام برای کاهش تاثیر سوء بتاگلوکان‌ها درغلات و نیز در سایر صنایع می‌توان استفاده نمود (Marco & Felix., 2007; Claus & Mojsov., 2018; Mohamadkhani *et al*., 2018; Brazil *et al*., 2019; Bai *et al*., 2021; Karunaratne *et al*., 2022;). استفاده از کشت سلول‌های گیاهی گزینه جذابی برای تولید بیومولکول‌ها می‌باشد. درمقایسه با گیاهان کشت شده در مزارع، سلول‌های کشت شده در محیط کشت می‌توانند در محیطی محدود و کنترل شده پرورش داده شوند. فناوری کشت سلول گیاهی ابزار مناسبی برای کاربردهای زیست فناوری مختلف است که امکان بهینه‌سازی تولید را بدون تأثیرات آب و هوایی و محیطی فراهم می‌کند. سلول‌های گیاهی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که آنها را از سلول‌های باکتریایی و پستانداران متمایز می‌سازد، به عنوان مثال در الگوی گلایکوزیله کردن Strasser, (2016) و تنوع مولکول‌های کوچکی که تولید می‌کنند. از لاین سلولی BY-2 (*Nicotiana tabacum* L.cv Bright Yellow 2) به عنوان یک سیستم مدل استفاده می‌شود(Verpoorte & Alfermann, 2000). سلول‌های BY-2 مانند سلول‌های Hela پایدارند (Nagata *et al*., 1992). لاین‌های سلولی BY-2 میزان قابل توجهی از یک پروتـئین را در شرایط بیان موقت (Transient expression) تولید می‌کنند. سلول‌های BY-2 به سرعت تقسیم می‌شوند و می‌توانند جرم سلولی خود را در یک هفته تا ۱۰۰

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

برابر افزایش دهند. این یک مزیت واضح در تولید انبوه پروتـئین‌ها می‌باشد. روش آسان انتقال ژن، تکثیر سریع سلولی و استفاده ازمحیط کشت ارزان MS تغییر یافته، باعث شده که از سلول‌های BY-2 بیشتر از سایر سلول‌های گیاهی برای تولید پروتئین‌ها استفاده شود (Nagata & Kumagai,1999; Doran, 2013). پروتئین‌های متنوعی از جمله آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها، پروتئین‌های درمانی و سایر پروتئین‌ها با موفقیت در سلول‌های BY-2 بیان شده‌اند (Sakamoto *et al*., 2008; Kirchhoff *et al*., 2012; Reuter *et al*., 2017).

از آنجا که سلول‌های BY-2 دارای مزیت‌های مختلفی برای بیان پروتئین‌ها بصورت هترولوگ می‌باشند و با توجه به اهمیت و کاربرد آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز در صنایع مختلف، هدف از این پژوهش بیان و بررسی فعالیت این آنزیم در پلتفرم BY-2 است. ژن *β-1,3 glucanase* (*bgn*I) به طول حدود ۲/۳ کیلو باز از جدایه قارچ *Trichoderma virens* مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین منظور ابتدا بهینه‌سازی انتقال و بیان ژن گزارشگر *gus* که دارای فنوتیپ قابل مشاهده و سنجش است انجام شده و سپس انتقال ژن کد کننده آنزیم مذکور به سلول گیاهی BY-2 انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سویه‌های باکتریایی مورد استفاده: سلول‌های گیاهی BY-2 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. از باکتری *Escherichia coli* DH5α (از شرکت Fermentas) برای انجام مراحل کلونینگ و تهیه سازه و از *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 برای انتقال ژن به سلول‌های BY-2 جهت تراریختی استفاده شده است.

پلاسمیدها و مواد مورد استفاده: ناقل پلاسمیدی pBI121 (نواژن) به‌عنوان ناقل بیانی گیاهی مورد استفاده قرارگرفت. پلاسمید $pBI121^{GUS-}$ که در پژوهش‌های قبلی این گروه تهیه شده بود، برای تهیه سازه‌های ژنی جهت انتقال به گیاه استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از آنزیم *Taq*-polymerase و *Pfu*-DNA polymerase (از شرکت Fermentas) استفاده شد. آنزیم های مورد استفاده برای هضم آنزیمی DNA و آنزیم لیگاز از شرکت Fermentas تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بیولوژی ملکولی و نیز کیت خالص سازی DNA از شرکت Roche تهیه شد. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت گیاهی و باکتریایی از شرکت Merck تهیه شد. تهیه باکتری‌های مستعد، استخراج DNA پلاسمیدی و هضم آنزیمی طبق دستورالعمل Sambrook و Russell انجام شد (Sambrook & Russell, 2001).

شرایط انجام PCR: انجام PCR اختصاصی پس از بهینه‌سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی مولار $MgSO_4$، ۳۰ نانوگرم DNA، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTP، و۲/۵ واحد آنزیم *Pfu*-DNA polymerase و۵ میکرولیتر بافر (10X) صورت پذیرفت. ابتدا واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد و سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه، دمای متناسب با جفت آغازگرهای مورد استفاده (جدول ۱) به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه انجام گرفت. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۹۵ ولت و جریان۵۰ آمپر الکتروفورز شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. primers used in this study

Primers name	Primers sequence	Tm
FbgnI	5'-CG TCTAGA ATG TTGAAGTCACTGGCCTTTG-3	66.8ºC
RbgnI	5'-GCTCTAGA CTA GGTTGTGTAGCGGCCAACATC -3'	70.8ºC
GUS F	5′-GGT GGT CAG TCC CTT ATG TTA CG –3′	62ºC
GUSR	5′–CCG GCA TAG TTA AAG AAA TCA TG –3′	57ºC
NPTF	5′-GTC GCC TAA GGT CAC TAT CAG CTA GC –3′	66.4ºC
35SF	5′-GGC GAA CAG TTC ATA CAG AGT CT-3′	55ºC
nosR	5′-CGCGATAATTTATCCTAGTTTGC-3′	55.9ºC

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

همسانه‌سازی ژن *bgn*I در وکتور بیانی گیاهی pBI121: ناقل pUCRM1 حاوی ژن *bgn*I به روش لیز قلیایی (Sambrook & Russell,2001) از باکتری *E. coli* DH5α استخراج شده و همراه با ناقل بیانی $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم *Xba*I برش داده شده و مراحل همسانه‌سازی و انتقال به باکتری *E. coli* DH5α طبق روش استاندارد انجام گرفت. جهت انتخاب پلاسمیدهای نوترکیب از آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ µg/mL) در محیط کشت استفاده شد. پلاسمید $pBI121^{GUS-}$ حاوی ژن *bgn*I به روش انجماد و ذوب با استفاده از کلرید کلسیم (۲۰ میلی مولار) و ازت مایع به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شد (Sambrook & Russell, 2001).

کشت سلول‌های گیاهی BY-2: انجام دقیق کشت سلول گیاهی یکی از مهمترین مراحل انتقال ژن به شمار می‌رود. قبل از شروع انتقال ژن، باید روش کشت سلول‌های گیاهی BY-2 بهینه‌سازی شود. در این تحقیق از سلول‌های BY-2 گیاه توتون استفاده شد. برای این منظور سلول‌های BY-2 در محیط کشت پایه MS تغییر یافته شامل(1mg/L) Myo-،2-4-D (100mg/L)Imositol، (10.1 mg/L) Thiamine.HCl، ۳۰ g/L ساکارز، pH 5.7 و میزان ۷ g/L آگار کشت شدند. از این سلول‌ها برای انتقال ژن با شرایط مناسب استفاده شد. جهت رشد بهتر سلول‌های BY-2 کشت شده، به فاصله زمانی هر چهار هفته یک بارسلول‌های BY-2 به محیط جدید زیر کشت می‌شدند.

استخراج پروتئین گیاهی: برای استخراج پروتئین، سلول‌های BY-2 با آب مقطر استریل شستشو شدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای۶۰- درجه سانتیگراد و فشار ۰/۰۱ اتمسفر لیوفلیزه شدند. استخراج آنزیم BgnI از سلولهای BY-2 به روش ترکیبی Cervoneو Favaron همراه با اندکی تغییر انجام گرفت (Cervone et al., 1987; Favaron, 2001). یک گرم از پودر لیوفلیزه شده در ۲۵ میلی لیتر از بافر کم نمک (Low- Salt Solution Buffer) شامل سدیم استات pH 5 ۵۰ میلی مولار، EDTANa2 pH 5 ۳ میلی مولار، DTT ۱ میلی مولار و گلیسرول ۱۰٪ حل شد و به مدت نیم ساعت در ٤ درجه سانتیگراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس در ۱۲۰۰۰ g در ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به ظرف تمیز منتقل شد و رسوب به منظور استخراج مجدد در ۱۵ میلی لیتر از بافر با نمک بالا(High-Salt Solution Buffer) شامل بافر کم نمک و کلرید سدیم ۱ میلی مولار حل شد و به مدت نیم ساعت در ٤ درجه سانتیگراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس دوباره در همان شرایط سانتریفیوژ شد و فاز رویی به ظرف قبلی اضافه شد. محلول جمع آوری شده به منظور کدورت زدایی در ۱۵۰۰۰ g در ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس با آمونیوم سولفات در غلظت نهایی ۸۵٪ رسوب دهی شد. رسوب در ۵ میلی لیتر از بافر فسفات حل شده و یک شب در بافر استات دیالیز شد و بعد از افزودن محلول فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) تا غلظت نهایی یک میلی مولار در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

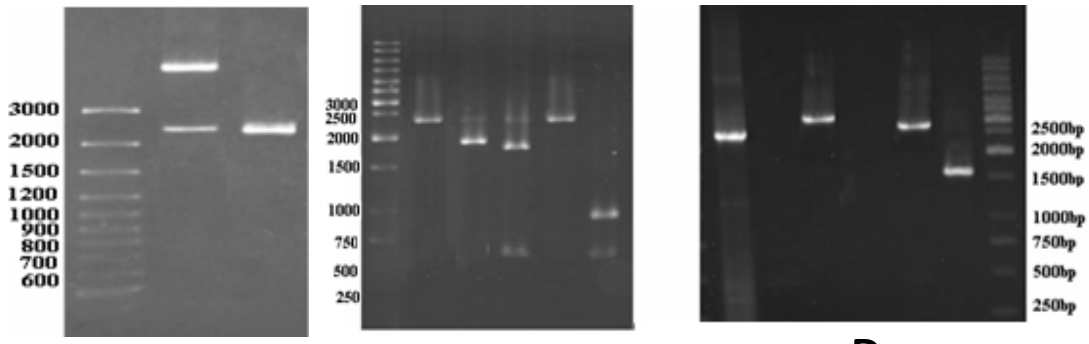
سنجش فعالیت آنزیمی: سنجش بیوشیمیایی GUS به روش Gallagher انجام شد(Gallagher, 2012). سنجش فعالیت آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز به روش بهرامسری و همکاران انجام گرفت(Bahramsari *et al*. 2005).

نتایج و بحث

برای بیان آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز در سلول گیاهی BY-2، قطعه حاوی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز (*bgn1*) از پلاسمید pUCRM1 (*Mohammadzadeh et al*., 2008) در وکتور دوگانه $pBI121^{GUS-}$ زیر همسانه سازی و سازه نوترکیب حاصل به نام pBIRM1 نام گذاری شد (شکل A-۱). سازه مذکور توسط الگوی هضم آنزیمی (شکل B-۱) و همچنین الگوی هضم آنزیمی محصول PCR بدست آمده از آن با استفاده از آغازگرهای Fbgn1 و Rbgn1 (آغازگرهای دو طرف ژن)، توسط آنزیم *Sac*I، *Pst*I، *Hind*III و *Sal*I(روش PBR) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده صحت پلاسمید نوترکیب pBIRM1 را مورد تایید قرار داد (شکل C-۱). با توجه به اینکه دو انتهای قطعه حاوی ژن *bgn*I دارای محل برش برای آنزیم *Xba*I است، به منظور بررسی صحت قرارگیری قطعه مورد نظر در جهت صحیح، از جفت آغازگرهای متفاوتی استفاده شد. در این صورت چنانچه ژن در جهت مستقیم

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

کلون شده باشد، قطعات مورد انتظار بوسیله آغازگرهای (RbgnI/35sF) حدود (۲۳٤٤+۵۰۰bp)، آغازگرهای (nosR/FbgnI) حدود (۲٤۷ bp +۲۳٤٤)، ایجاد می‌شود. در حالیکه آغازگرهای (FbgnI/35sF) و (RbgnI/nosR) (با توجه به هم جهت بودن) نباید محصول PCR ایجاد کنند. با انجام PCR بوسیله این آغازگرها و بدست آوردن قطعات مورد انتظار، صحت جهت ژن کلون شده تایید شد (شکل D-۱).



شکل۱-A) شکل شماتیک پلاسمید PBIRM1 حاوی قطعه ۲۳٤٤ جفت بازی حاوی ژن *bgn*I، **B)** تایید هضم آنزیمی، ۱) تایید پلاسمید pBIRM1 با استفاده از الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم *Xba*I در دو طرف ژن، (قطعه ۲۳٤٤ جفت بازی)، ۲) محصول PCR بدست آمده با جفت آغازگرهای (RbgnI/FbgnI) (2344 bp) از DNA ژنومی قارچ *T.virens*، M) مارکر، **C)** تایید پلاسمید نوترکیب pBIRM1 با استفاده ازالگوی PCR و روشPBR ، ۱) محصول PCR ژن *bgn*I با جفت آغازگرهای (RbgnI/FbgnI) (2344 bp) از DNA پلاسمیدی، ۲ تا ۵) به ترتیب محصول PCR ژن *bgn*I با جفت آغازگرهای (RbgnI/FbgnI) هضم شده با آنزیم‌های *Sac*I، *Pst*I، *Hind*III و *Sal*I با ایجاد الگوی مورد انتظار، M) مارکر، **D)** تایید جهت صحیح کلون شدن ژن *bgn*I در پلاسمید pBIRM1، ۱) محصول PCR با آغازگرهای (RbgnI/FbgnI) (2344 bp)، ۲) محصول PCR با آغازگرهای (FbgnI/35sF) (0bp)، ۳) محصول PCR با آغازگرهای (RbgnI/35sF) (2344+500bp)، ٤) محصول PCR با آغازگرهای (GusR/35sF) (0bp)، ۵) محصول PCR با آغازگرهای (nosR/Fbgn1) (2344+247bp)، ٦) محصول PCR با آغازگرهای (nosR/netF) (1550bp)، M) مارکر. تمام اندازه‌های بدست آمده مورد انتظار می‌باشند.

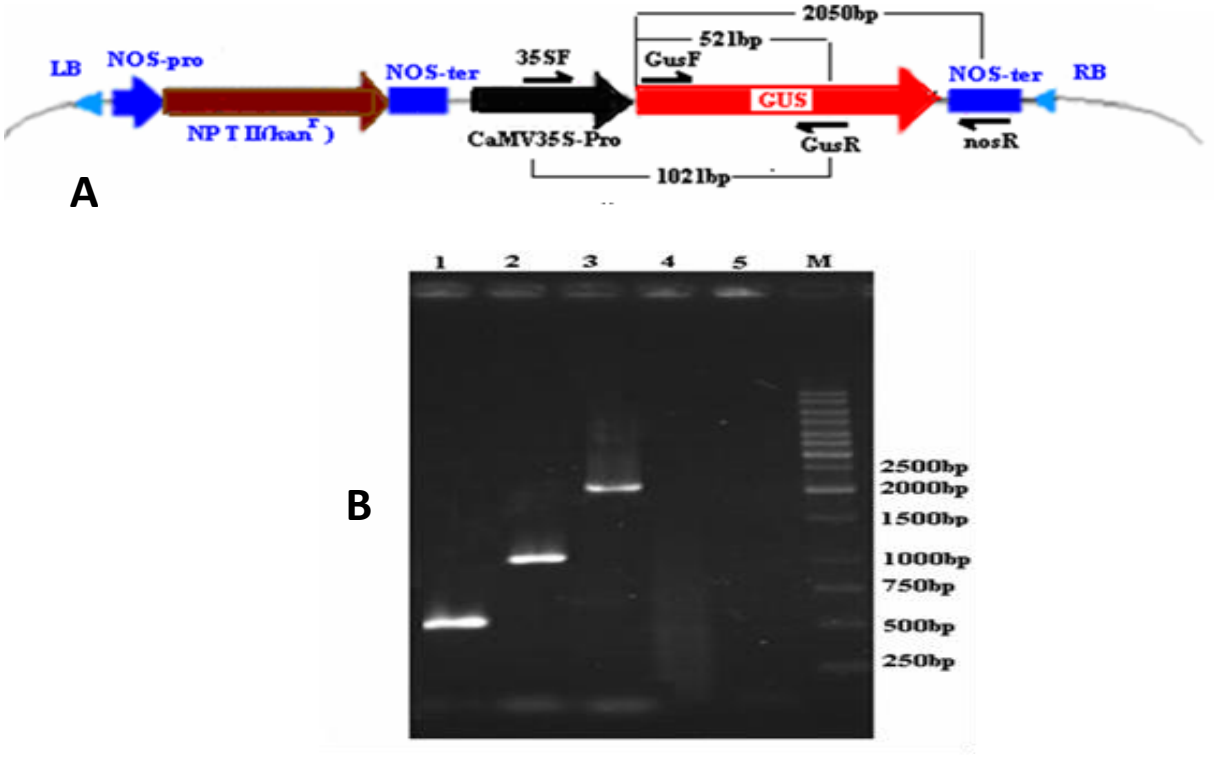
Fig1. A) Schematic diagram of plasmid pBIRM1 containing a 2344 bp fragment of the *bgn*I gene. **B)** Restriction pattern Digestion, 1)Confirmation of the plasmid pBIRM1 using the enzyme digestion pattern by *Xba*I (2344 bp), 2) PCR product obtained from genomic DNA and (FbgnI/RbgnI) (2344 bp) , M) Marker, **C)** Verification of the plasmid pBIRM1 using PCR and PBR technique, 1) The PCR product of the *bgn*I gene using (FbgnI/RbgnI) (2344 bp) from plasmid DNA , 2-5) PCR product digested with *Sac*I, *Pst*I, *Hind*III, and *Sal*I created the expected pattern. M**)** Marker, **D)** Verification of the correct orientation of the *bgn*I gene cloned into the plasmid pBIRM1, 1) PCR product obtained using primers FbgnI/RbgnI (2344 bp), 2) PCR product obtained using 35sF/FbgnI (0 bp) 3) PCR product obtained using 35sF/RbgnI (2344+500bp), 4) PCR product obtained using 35s F/GusR (0 bp), 5) PCR product obtained using Fbgn1/nosR (2344+247bp), 6) PCR product obtained using netF/nosR (1550bp), M) Marker. The fragment sizes are as expected.

پلاسمید pBIRM1 به باکتری اگروباکتریوم (LBA4404) منتقل و از طریق رشد باکتری بر روی محیط گزینشگر حاوی کانامایسین و آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی حضور سازه حاوی ژن در اگروباکتریوم مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

منابع علمی گزارش شده در خصوص استفاده از سلول‌های BY-2 جهت بیان پروتئین‌های هترولوگ، در این تحقیق نیز سلول‌های BY-2 بعنوان میزبان برای بیان ژن *bgnI* انتخاب شد.

بهینه‌سازی انتقال ژن به سلول‌های BY-2 با استفاده از ژن گزارشگر *gus*: از آنجاکه در این تحقیق ابتدا لازم بود انتقال و بیان ژن در سلول‌های BY2 بهینه‌سازی شود، بدین منظور از ژن گزارشگر *gus* استفاده شد. بیان این ژن منجر به فنوتیپ قابل سنجش می‌شود. از سیستم ژن گزارشگر برای بررسی و تحلیل بیان ژن در سلول‌های گیاهی و همچنین بهینه‌سازی پارامترهای انتقال موفقیت آمیز ژن استفاده می‌شود. بدین منظور پلاسمید $pBI121^{GUS+}$ به اگروباکتریوم (LBA4404) منتقل و از طریق رشد باکتری بر روی محیط گزینشگر حاوی کانامایسین و آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (GusR/GusF)، (GusR/35sF)، (nosR/GusF)، (RbgnI/FbgnI) و (RbgnI/35sF) تأیید شد (شکل ۲).



شکل۲-A) شکل شماتیک پلاسمید $pBI121^{GUS+}$ **B)** تأیید پلاسمید $pBI121^{GUS+}$ توسط الگوی PCR در باکتری اگروباکتریوم.۱) محصول PCR با آغازگرهای (GusR/ GusF) (521bp)، ۲) محصول PCR با آغازگرهای (GusR /35sF) (1021 bp)، ۳) محصول PCR با آغازگرهای (nosR/GusF) (2050 bp) ، ٤) محصول PCR با آغازگرهای (RbgnI/FbgnI) (0bp)، ٥) محصول PCR با آغازگرهای (RbgnI/35sF) (0bp) ، M) مارکر.

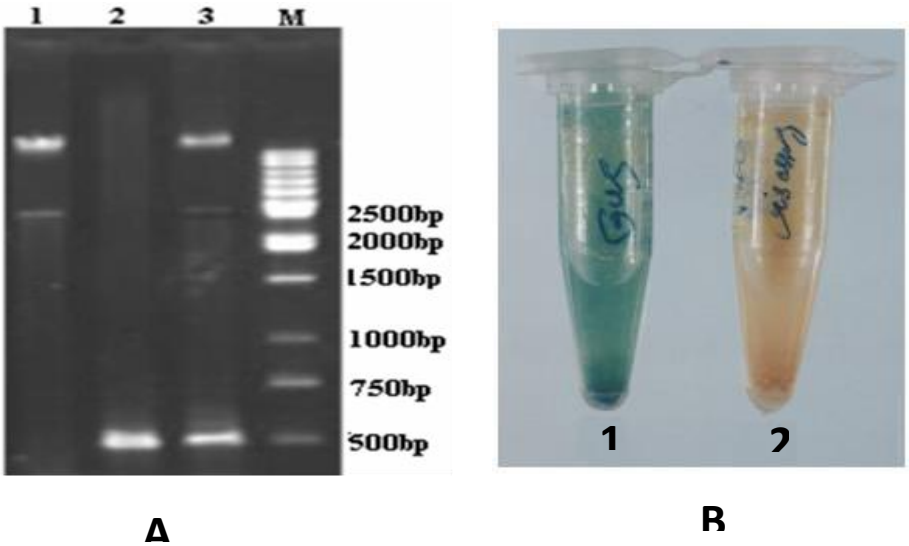
Fig 2. A) Schematic diagram of plasmid $pBI121^{GUS+}$ **B)** Confirmation of plasmid $pBI121^{GUS+}$ in Agrobacterium by PCR. 1) PCR product using primers GusR/GusF (521 bp), 2) PCR product using primers 35sF/GusR (1021 bp), 3) PCR product using primers GusF/nosR (2050 bp), 4) PCR product using primers FbgnI/RbgnI (0 bp), 5) PCR product using primers 35sF/RbgnI (0 bp), M) Marker.

آزمون PCR و سنجش بیوشیمیایی جهت اثبات حضور و بیان ژن *gus* در سلول‌های BY-2: از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید $pBI121^{GUS+}$ جهت انتقال ژن *gus* به سلول‌های BY-2 استفاده شد. از طریق رشد سلول‌های BY-2 تراریخت، بر روی محیط گزینشگر حاوی کانامایسین (بعنوان آنتی‌بیوتیک انتخابی) و سفوتاکسیم وآزمون PCR توسط آغازگرهای اختصاصی، انتقال ژن *gus* به سلول‌های BY-2، تایید شد. سفوتاکسیم بمنظورحذف اگروباکتریوم از محیط کشت استفاده می‌شود. سلول‌های BY-2 تراریخت هر سه هفته یک بار در محیط حاوی سفوتاکسیم و کانامایسین زیرکشت می‌شدند. در نهایت برای اطمینان از حذف اگروباکتریوم از محیط کشت سلول و تراریخت بودن سلول‌های BY-2، این سلول‌ها به محیط کشت حاوی کانامایسین و بدون

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

سفوتاکسیم زیرکشت شدند. عدم رشد مجدد اگروباکتریوم در این شرایط نشان داد که محیط کشت سلول‌های BY-2 عاری از آلودگی اگروباکتریوم می‌باشد. همچنین با زیرکشت کردن متوالی سلول‌ها در محیط انتخابی و بررسی‌های متوالی محیط و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، از عاری بودن محیط از اگروباکتریوم و همچنین تقریبا از تراریخت بودن سلول‌ها اطمینان حاصل شد. برای اثبات حضور ژن *gus* در سلول‌های BY-2، از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (GusF/GusR) استفاده شد و قطعه ۵۲۱bp مورد انتظار مشاهده شد که نشان دهنده انتقال این ژن به سلول‌های BY-2 می‌باشد(شکل A-۳). در سنجش بیوشیمیایی GUS در سلول‌های BY-2 تراریخته، آبی شدن سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های BY-2 شاهد، مشاهده شد (شکل B-۳).

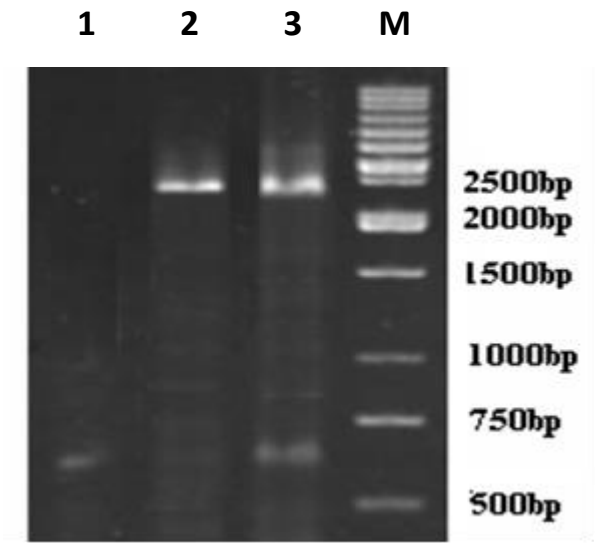
انتقال ژن *bgn*I به سلول‌های BY-2 با استفاده از اگروباکتریوم (LBA4404): پس از بهینه‌سازی انتقال ژن به سلول‌های BY-2 توسط ژن گزارشگر *gus*، ژن *bgn*I حاوی اینترون با استفاده از همین روش، به سلول‌های BY-2 منتقل شد. از طریق رشد سلول‌های BY-2 تراریخت بدست آمده بر روی محیط گزینشگر حاوی کانامایسین و سفوتاکسیم و آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (RbgnI/FbgnI) انتقال ژن *bgn*I به سلول های BY-2 مورد بررسی قرار گرفت و قطعه مورد انتظار به طول ۲۳۴۳bp مشاهده شد (شکل ٤).



شکل۳- A) آزمون PCR با استفاده از DNA ژنوم سلول‌های BY-2 و آغازگرهای (GusR/GusF)، ۱) محصول PCR با استفاده از DNA استخراج شده از سلول‌های BY-2غیر تراریخت (کنترل منفی)، ۲) محصول PCR با استفاده از DNA پلاسمید $pBI121^{GUS+}$ (کنترل مثبت)(521bp)، ۳) محصول PCR با استفاده از DNAاستخراج شده از سلول‌های BY-2 تراریخت (521 bp)، M) مارکر. **B)** سنجش بیوشیمیایی GUS جهت اطمینان از بیان ژن در سلول‌های BY-2 تراریخته، ۱) سنجش بیوشیمیایی GUS با استفاده از سلول‌های BY-2 تراریخته، ۲) سنجش بیوشیمیایی GUS با استفاده از سلول‌های BY-2 غیرتراریخته.

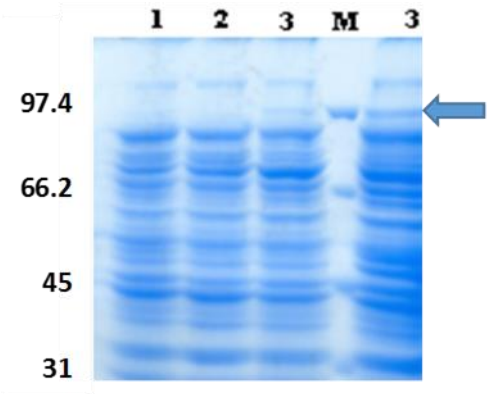
Fig 3. A) PCR assay using genomic DNA from BY-2 cells and primers (GusF/GusR), 1)PCR product using DNA extracted from non-transgenic BY-2 cells (negative control), 2)PCR product using DNA from the $pBI121^{GUS+}$ plasmid (positive control) (521 bp), 3)PCR product using DNA extracted from transgenic BY-2 cells (521 bp), M) Marker. B) Biochemical GUS assay to confirm gene expression in transgenic BY-2 cells, 1) Biochemical GUS assay using transgenic BY-2 cells, 2) Biochemical GUS assay using non-transgenic BY-2 cells.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]



شکل٤- آزمون PCR برای اثبات انتقال ژن *bgn*I به سلول‌های BY-2 با استفاده از آغازگرهای (Rbgn1/Fbgn1)، ۱) محصول PCR با استفاده از DNA سلول‌های BY-2 غیر تراریخت (کنترل منفی)، ۲) محصول PCR پلاسمید نوترکیب pBIRM1 حاوی ژن *bgn*I (کنترل مثبت) (2344 bp)، ۳) محصول PCR با استفاده از DNA سلول‌های BY-2 تراریخت (2344 bp)، M) مارکر

Fig 4. PCR assay to demonstrate the transfer of the *bgn*I gene to BY-2 cells using primers (Rbgn1/Fbgn1). 1) PCR product using DNA from non-transgenic BY-2 cells (negative control), 2) PCR product using DNA from the pBIRM1 recombinant plasmid containing the *bgn*I gene (positive control) (2344 bp), 3) PCR product using DNA from transgenic BY-2 cells (2344 bp), M) Marker.



شکل۵- نتایج SDS-PAGE حاصل از بیان ژن *bgn*I در سلول‌های BY-2. ۱) الگوی پروتئینی سلول‌های BY-2 بدون پلاسمید، ۲) الگوی پروتئینی سلول‌های BY-2 واجد پلاسمید $pBI121^{GUS-}$، ۳) الگوی پروتئینی سلول‌های BY-2 واجد پلاسمید pBIRM1 (حاوی ژن *bgn*I)، M) مارکر

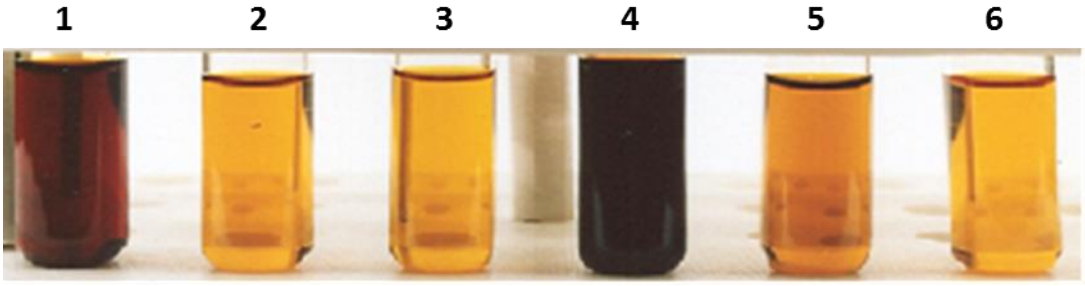
Fig 5. SDS-PAGE results of *bgn*I gene expression in BY-2 cells. 1) Protein pattern of BY-2 cells without plasmid, 2) Protein pattern of BY-2 cells with $pBI121^{GUS-}$ plasmid, 3) Protein pattern of BY-2 cells with pBIRM1 (containing the *bgn*I gene) M) Marker.

بیان و سنجش فعالیت آنزیمی بتا-۱و۳ گلوکاناز در سلول های BY-2: به‌منظور بررسی بیان آنزیم بتا-۱و۳ گلوکاناز(BgnI) در سلول‌های تراریخت از سلول‌های BY-2 شاهد و تراریخت، استخراج پروتئین انجام گرفت. مقایسه الگوی پروتئینی (پروتئین استخراج شده از سلول‌های BY-2 (شاهد و تراریخت) با استفاده از SDS-PAGE حضور باند مربوط به آنزیم بیان شده را در سلول‌های BY-2 نشان داد (شکل۵).

برای تعیین فعالیت آنزیم BgnI از روش دی نیترو سالسیلیک اسید (DNS)، جهت اندازه‌گیری مقدار قندهای احیا شده حاصل از عمل این آنزیم استفاده شد. معرف DNS در برابر قندهای احیا شده بر حسب غلظت قند از رنگ زرد به رنگ قرمز ارغوانی تغییر رنگ می‌دهد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که آنزیم BgnI بیان شده در سلول‌های BY-2 دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد. لازم به ذکر است که اضافه کردن گلوکز به محیط کشت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

قارچ باعث تغییر رنگ قابل توجهی در نمونه می‌شود (کنترل مثبت). از سلول‌های BY-2 حاوی $pBI121^{GUS-}$ (سازه فاقد ژن *bgn*I) به عنوان کنترل منفی استفاده شده است (شکل٦). بررسی نتایج بدست آمده از تولید آنزیم BgnI در سلول‌های BY-2 نشان می‌دهد که این سلول‌ها می‌توانند به عنوان یک پلتفرم برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی و استفاده قرار گیرند.



شکل٦- نمونه‌های سنجش آنزیمی به روش DNS از پروتئین استخراج شده از سلول‌های BY-2 ، ۱) سنجش آنزیمی با پروتئین استخراج شده از سلول‌های BY-2 تراریخته حاوی ژن *bgn*I، ۲) سنجش آنزیمی با پروتئین استخراج شده از سلول‌های BY-2 حاوی $pBI121^{GUS-}$ (کنترل منفی)، ۳) سنجش آنزیمی با پروتئین استخراج شده از سلول‌های BY-2 غیر تراریخته، ٤) سنجش آنزیمی با محیط کشت قارچ *Trichoderma virens* حاوی گلوکز (کنترل مثبت)، ٥) سنجش آنزیمی با محیط کشت القایی قارچ *T. Virens*، ٦) سنجش آنزیمی باآب بعنوان شاهد.

Fig 6. Samples for enzyme assay by DNS method from BY-2 cells protein. 1) Protein extracted from transgenic BY-2 cells containing the *bgn*I gene, 2) Protein extracted from BY-2 cells containing $pBI121^{GUS-}$, 3) Protein extracted from non-transgenic BY-2 cells, 4) Fungal culture medium containing glucose, 5) an induced culture medium of *Trichoderma virens*, 6) Water as a control.

بتاگلوکان‌ها که دسته بزرگ و متنوعی از پلی ساکاریدهای طبیعی می‌باشند به طور گسترده در طبیعت پراکنده هستند و در منابع مختلفی مانند مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌های دریایی و غلات یافت می‌شوند (Saito *et al*., 1968; Du *et al*., 2019; Usoltseva *et al*., 2020; Murphy *et al*., 2021). از طرفی توانایی گلوکانازها برای هیدرولیز کردن گلوکان‌ها به الیگوساکاریدهای کوچک یا حتی گلوکز، مجموعه‌ای از کاربردهای زیست‌فناورانه را ایجاد کرده است. برخی از موارد استفاده مناسب این آنزیم‌ها عبارتند از: تبدیل مواد لیگنوسلولزی به قندهای قابل تخمیر برای تولید بیواتانول؛ مکمل‌های خوراک دام برای کاهش تاثیر سوء بتاگلوکان‌ها درغلات؛ افزایش سرعت جوانه‌زنی در طول فرآیند مالت‌سازی؛ جلوگیری از تجمع بتاگلوکان جو در تولید ماءالشعیر و به عنوان عوامل کنترل زیستی در برابر قارچ‌های بیماری‌زا در محصولات مختلف (Marco & Felix, 2007; Claus & Mojsov, 2018; Brazil *et al*., 2019; Bai *et al*., 2021; Karunaratne *et al*., 2022).

از جمله کاربردهای معمول بتا-۱و۳ گلوکانازها، استفاده از آنها به عنوان مکمل خوراکی در تغذیه طیور برای بهبود رشد و عملکرد می‌باشد. رژیم‌های مبتنی بر جو در حیوان‌ها تک معده‌ای می‌تواند ویسکوزیته گوارشی را به طور قابل توجهی افزایش دهد که باعث عبور کندتر از روده و کاهش جذب مواد مغذی می‌شود. به منظور پیشگیری از این اثرها ضد تغذیه‌ای، استفاده از مکمل خوراکی حاوی بتا-۱و۳ گلوکانازها یک گزینه رایج می‌باشد (Józefiak *et al*., 2006; Gilani *et al*., 2021; Karunaratne *et al*., 2022).

همچنین در تولید نوشیدنی‌های حاوی بتا-گلوکان، افزایش ویسکوزیته ممکن است باعث ایجاد مشکلات متعددی نظیر کاهش نرخ جداسازی شیره، ایجاد کدورت و تولید رسوب شود. به همین دلیل، بتا-۱و۳ گلوکانازها به طور گسترده در صنایع نوشابه سازی استفاده می‌شوند. این آنزیم‌ها می‌توانند کاهش ویسکوزیته شیره، بهبود عملکرد فیلتراسیون و حذف کدورت غیرمطلوب نوشابه را تسهیل کنند. همچنین نشان داده شده‌است بتا-۱و۳ گلوکانازها می‌توانند بدون تاثیر منفی بر کیفیت و ویژگی‌های ظاهری نوشابه، سرعت جوانه‌زنی در فرآیند مالت‌سازی را افزایش دهند (Butler & Moo-Young, 2011; Brazil *et al*., 2019). ضمنا از این آنزیم به عنوان بخشی از بیوسنسورها برای تشخیص لامینارین نیز استفاده شده‌است(Miyanishi *et al*., 2004).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

از آنجا که کاندیدا آلبیکانس یکی ازمعمولترین عوامل عفونت قارچی در دنیای پزشکی محسوب می‌شود (Kourkoumpetis *et al.*, 2010; Gavanji & Larki, 2017) با توجه به وجود بتا-۱و۳ گلوکان‌ها به عنوان اجزای اصلی دیواره سلولی این قارچ، از آنزیم‌های بتا-۱و۳ گلوکاناز که هیچ اثر سمی برای سلول‌های حیوانی ندارند، می‌توان به عنوان یک راه حل پتانسیلی و ایمن استفاده نمود(Bai *et al.*, 2021).

از مزایای کشت سلول‌های گیاهی (BY-2)، نگهداری ارزان آن‌ها، ساده بودن جداسازی و خالص‌سازی محصول تولید شده و کشت سلول گیاهی مستقل از شرایط آب و هوایی، کیفیت خاک، فصل‌ها، طول روز و وضع هوا می‌باشد(Häkkinen *et al.*, 2018).

در این تحقیق از ژن *bgn*I از گونه *T. virence* که در تحقیقات قبلی این گروه نشان داده شده بود دارای فعالیت آنزیم گلوکانازی مناسبی می‌باشد (Bahramsari *et al.*, 2005) جهت بیان در سلول‌های BY-2 استفاده شد. بدین منظور ژن *bgn*I با استفاده از ناقل بیانی گیاهی pBI121 و از طریق اگروباکتریوم به سوسپانسیون سلولی BY-2 منتقل شد.

وجود ژن *gus* بعد از MCS باعث می‌شود که هر ژنی که در MCS این پلاسمید قرار گیرد همراه با ژن *gus* رونویسی شود. چنانچه ژن *bgn*I به همراه ژن *gus* باشد، ممکن است در انتقال T-DNA از اگروباکتریوم به سلول گیاهی به علت اندازه بزرگ قطعه، امکان شکستگی ضمن عبور از مجرای پیلی وجود داشته باشد. در صورت انتقال کامل نیز، پس از نسخه‌برداری، قطعه mRNA حاصل بسیار بزرگ بوده و شامل mRNA مربوط به ژن *gus* و *bgn*I می‌باشد که البته به علت وجود کدون خاتمه دهنده در انتهای ژن *bgn*I، ژن *gus* بیان نمی‌شود ولی وجود یک mRNA بزرگ، احتمال بروز ساختارهای ثانویه در این مولکول را موجب شده، کارایی ترجمه را کاهش داده و عملاً هدف اصلی تحقیق که تولید آنزیم BgnI درسلول گیاهی است محقق نخواهد شد. راه حل اساسی برای غلبه بر این مشکل، حذف ژن *gus* و جایگزینی ژن *bgn*I قارچی با آن است. به منظور حصول این نتیجه از $pBI121^{GUS-}$ (فاقد ژن *gus*) استفاده شد.

با توجه به اینکه بیان ژن در سوسپانسیون سلولی BY-2 و چگونگی تراریختی آن نیاز به بررسی شرایط بهینه داشت، در این تحقیق ابتدا تراریختی سلول‌های BY-2 از طریق اگروباکتریوم و با استفاده از ژن *gus* بعنوان یک ژن گزارشگر که به سهولت میتوان بیان آن را در سلول‌های تراریخته شده مشخص نمود مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نتایج بیوشیمیایی GUS شرایط بهینه بدست آمده جهت انتقال ژن‌های دیگر به سلول‌های گیاهی (BY-2) از طریق اگروباکتریوم و وکتور pBI121 مشخص شد. این شرایط بهینه‌سازی شده جهت انتقال ژن *bgn*I قارچ *T. virens* به سلول‌های BY-2 مورد استفاده قرار گرفت.

از طرفی DNA ژنومی ژن *bgn*I جهت کلونینگ مورد استفاده قرار گرفته است و این ژن دارای اینترون می‌باشد. از آنجا که باکتری‌ها فاقد سیستم پیرایش (splicing) می‌باشند بنابراین بیان این ژن در سوسپانسیون سلولی تنها در صورتی امکانپذیر می‌باشد که ژن توسط سلول‌های BY-2 بیان شده باشد و احتمال بیان این ژن توسط اگروباکتریوم منتفی می‌شود. بررسی SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های BY-2 تراریخته نشان داد که این آنزیم در این سلول‌ها بیان شده است. ضمن اینکه بررسی فعالیت آنزیمی (بتا-۱و۳ گلوکاناز) نشان داد که آنزیم بیان شده در سلول‌های BY-2 دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد. با توجه به موفقیت بیان ژن *bgn*I از قارچ *T. virens* با فرم DNA ژنومی در سلول‌های گیاهی BY-2 و فعال بودن آنزیم بیان شده امکان استفاده از این آنزیم در کاربردهای زیست‌فناورانه مهیا می‌باشد. ضمنا می‌توان از ژن مذکور جهت انتقال به گیاه در راستای ایجاد مقاومت علیه قارچ‌های فیتوپاتوژن استفاده نمود. همچنین می‌توان سلول‌های BY-2 را به عنوان یکی از پلتفرم‌ها برای بیان سایر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار داد.

سپاسگزاری

نویسندگان این پژوهش از دکتر محمد رضا زمانی برای ارائه راهنمایی مفید بسیار سپاسگزاری می‌کنند. از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]

منابع

Bahramsari N., M.R. Zamani and M. Motallebi. (2005). β-1,3-glucanase production in Trichoderma isolates. Iranian Journal of Biology. 18(3): 261-271. (In Persian)

Bai, L., Kim, J., Son, K.-H., Shin, D.-H., Ku, B.-H., Kim, D. Y., & Park, H.-Y. (2021). Novel Anti-Fungal d-Laminaripentaose-Releasing Endo-β-1,3-glucanase with a RICIN-like Domain from Cellulosimicrobium funkei HY-13. Biomolecules, 11(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/biom11081080

Brazil, C., Oliveira, D. F. de, Duarte, R. A., Galo, J. M., Lucchetta, L., Santos, E. da C. dos, & Hashimoto, E. H. (2019). β-Glucanase Addition in Brewing Malt Produced by Reduced Time of Germination. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62, e19180315. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180315

Butler, M., & Moo-Young, M. (2011). Comprehensive biotechnology (2nd ed). Elsevier. http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=858607

Cervone, F., De Lorenzo, G., Degrà, L., Salvi, G., & Bergami, M. (1987). Purification and Characterization of a Polygalacturonase-Inhibiting Protein from Phaseolus vulgaris L. 1. Plant Physiology, 85(3), 631–637. https://doi.org/10.1104/pp.85.3.631

Claus, H., & Mojsov, K. (2018). Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications. Fermentation, 4(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/fermentation4030052

Du, B., Meenu, M., Liu, H., & Xu, B. (2019). A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β-Glucan. International Journal of Molecular Sciences, 20(16), Article 16. https://doi.org/10.3390/ijms20164032

Favaron, F. (2001). Gel detection of Allium porrum polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. Physiological and Molecular Plant Pathology, 58(6), 239–245. https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0333

Gallagher, S. R. (2012). GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press.

Gavanji, S., & Larki, B. (2017). Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on Candida albicans. Chinese Journal of Integrative Medicine, 23(3), 201–207. https://doi.org/10.1007/s11655-015-2074-9

Ghazavi Esfahani, M., Yousefi Kopaei, F., & Mirtalebi, M. (2023). Effects of Some Isolates of Trichoderma spp. And Rhizobacteria in Control of the Causal Agent of Cantaloupe Fusarium Wilt (Fusarium oxysporum f. Sp. Melonis). Gebsj, 12(1), 0–0. 20.1001.1.25885073.1402.12.1.11.5 (In Persian).

Gilani, S., Gracia, M. I., Barnard, L., Dersjant-Li, Y., Millán, C., & Gibbs, K. (2021). Effects of a xylanase and beta-glucanase enzyme combination on growth performance of broilers fed maize-soybean meal-based diets. Journal of Applied Animal Nutrition, 9(2), 77.

Häkkinen, S. T., Reuter, L., Nuorti, N., Joensuu, J. J., Rischer, H., & Ritala, A. (2018). Tobacco BY-2 media component optimization for a cost-efficient recombinant protein production. Frontiers in Plant Science, 9, 45.

Józefiak, D., Rutkowski, A., Jensen, B. B., & Engberg, R. M. (2006). The effect of **β**-glucanase supplementation of barley- and oat-based diets on growth performance and fermentation in broiler chicken gastrointestinal tract. British Poultry Science, 47(1), 57–64. https://doi.org/10.1080/00071660500475145

Karunaratne, N. D., Classen, H. L., Ames, N. P., Bedford, M. R., & Newkirk, R. W. (2022). Effects of diet hulless barley and beta-glucanase levels on ileal digesta soluble beta-glucan molecular weight and carbohydrate fermentation in laying hens. Poultry Science, 101(5), 101735. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101735

Kourkoumpetis, T., Manolakaki, D., Velmahos, G. C., Chang, Y., Alam, H. B., De Moya, M. M., Sailhamer, E. A., & Mylonakis, E. (2010). Candida infection and colonization among non-trauma emergency surgery patients. Virulence, 1(5), 359–366. https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12795

Marco, J. L. de, & Felix, C. R. (2007). Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by Trichoderma harzianum showing biocontrol potential. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50, 21–29. https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100003

Miyanishi, N., Inaba, Y., Okuma, H., Imada, C., & Watanabe, E. (2004). Amperometric determination of laminarin using immobilized β-1,3-glucanase. Biosensors & Bioelectronics, 19, 557–562. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00253-7

Mohamadkhani, M., Mirakhorli, N., Emamzadeh, R., & Khajali, fariborz. (2018). Expression of β (1-3)(1-4) glucanase gene in Lactococcus lactis to produce an animal probiotic feed. Gebsj, 6(2), 213–221. (In Persian)

Mohammadzadeh, R., Motalebi, M., Zaman,i M.R., Bidmeshkipour, A. (2008). IDENTIFICATION, CLONING AND STRUCTURE ANALYSIS OF β, 3 GLUCANASE (BGNL) GENE FROM TRICHODERMA VIRENS (10). IRANIAN JOURNAL OF BIOLOGY, 21, 483–492. (In Persian)

Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N., & Laffey, J. G. (2021). β-Glucans. Encyclopedia, 1(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/encyclopedia1030064

Saito, H., Misaki, A., & Harada, T. (1968). A Comparison of the Structure of Curdlan and Pachyman. Agricultural and Biological Chemistry, 32(10), 1261–1269. https://doi.org/10.1271/bbb1961.32.1261

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSHL Press.

Usoltseva, R. V., Belik, A. A., Kusaykin, M. I., Malyarenko, O. S., Zvyagintseva, T. N., & Ermakova, S. P. (2020). Laminarans and 1,3-β-D-glucanases. International Journal of Biological Macromolecules, 163, 1010–1025. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.034

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.157]