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 ۱۸۳-۱۶۸
10.61186/gebsj.12.2.168

انتقال و بیان ژن اکسندین-٤ متصل به زیر واحد B سم وبا (CTB) در گیاه کاهو

Transfer and expression of exendin-4 fused to cholera toxin B subunit (CTB) in lettuce

ابراهیم مرادی [۱]، محمد ناجی [۲]، بهمن بهرام‌نژاد*[۳]، هیمن صالحی [٤]

Ebrahim Moradi[1], Mohammad Naji[2], Bahman Bahramnejad[3*], Hemn Salehi[4]

۱، ۲- دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه کردستان
۳- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه کردستان

1,2. MSc. students in Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan
3. Associate Professor, Department of Plant production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
4. Ph.D. student of Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
bbahramnejad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۷)
Received: 2023/07/2 | Accepted: 2023/08/29 | Published: 2024/03/14

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 168-183

http://gebsj.ir/

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

چکیده

اکسندین-٤ (EX4) یک پروتئین شبیه به پپتید شبه‌گلوکان (GLP-1) است و دارای نیمه‌عمر و تاثیر بیشتر در القای ترشح انسولین است. اتصال EX4 به زیر واحد غیرسمی وبا (CTB) موجب افزایش کارایی آن از طریق جذب در سیستم گوارشی می‌شود. در این تحقیق، با استفاده از ناقل pBI121 قطعه *CTB-EX4* توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه کاهو وارد شد. نتایج نشان داد ۲۰/۲۵٪ از ریزنمونه‌های تلقیح شده با موفقیت تراریخت و باززا شدند (نسل T_0). برای ایجاد گیاهان نسل دوم (T_2) بذرهای T_1 کشت گردید که ٤۲٪ از بذرهای کشت شده به بذر نشستند. گیاهان T_1 با استفاده آزمون PCR بررسی شد. بیان ژن *CTB-EX4* در سطح mRNA با استفاده از RT-PCR و Real time PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های ELISA و Western Blot مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تعداد نسخه‌های انتقال یافته به گیاهان T_1 با استفاده از دستگاه Real time PCR با استفاده از روش مطلق و منحنی استاندارد و همچنین روش نسبی، نسبت به ژن کنترل داخلی *Actin1* برآورد شد. نتایج حاکی از تراریختی ٦۰٪ گیاهان نسل دوم (T_1) و بیان ژن *CTB-EX4* در سطح mRNA و پروتئین بود. نتایج نشان داد که پروسه انتقال ژن *CTB-EX4* به گیاه کاهو با موفقیت‌آمیز انجام شد وگیاه کاهو قادر به بیان ژن مورد نظر در سطوح mRNA و پروتئین بود. با در نظر گرفتن پروسه‌های بعدی از جمله تخلیص و ارزیابی فعالیت بیولوژیکی پروتئین تولید شده، از گیاهان می‌توان به عنوان یک بیوراکتور مناسب جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب بهره برد.

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium tumefaciens،
اکسندین-۴،
انتقال ژن،
بیان ژن،
ناقل دوتایی pBI121،
پروتئین نوترکیب

Moradi E, Naji M, Bahramnejad B, Salehi H. Transfer and expression of exendin-4 fused to cholera toxin B subunit (CTB) in lettuce. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :168-183. Doi: 10.61186/gebsj.12.2.168
URL: http://gebsj.ir/article-1-464-fa.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

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

Abstract

Exendin-4 (EX4) is a protein similar to glucan-like peptide (GLP-1) and has a longer half-life and greater effect in inducing insulin secretion. The fusion of EX4 to the non-toxic cholera subunit (CTB) increases its efficiency through absorption in the digestive system. In this study, *CTB-EX4* gene was introduced into lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* using vector pBI121. The results showed that 20.25% of the inoculated explants were successfully transformed and regenerated (T_0 generation). To create T_2 plants, seeds of T_1 were cultivated, and 42% of the cultivated seeds germinated. T_1 plants were analyzed using PCR test. The mRNA expression of the *CTB-EX4* gene was examined through RT-PCR and Real-time PCR, while the protein expression was assessed using ELISA and Western Blot tests. The number of transferred copies to T_1 plants was determined using Real-time PCR. This estimation was performed using both the absolute method and the standard curve, as well as the relative method, with *Acitn* gene as a reference gene. The results showed that 60% of the T_1 plants were transgenic and the *CTB-EX4* gene was expressed at the mRNA and protein levels. The results showed that the process of transferring the *CTB-EX4* gene to the lettuce plant was successful and the lettuce plant was able to express the desired gene at the RNA and protein levels. Considering the subsequent processes, including the purification and evaluation of the biological activity of the produced protein, plants can be used as a suitable bioreactor for the production of recombinant proteins.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, Exendinp-4, gene expression, Gene transfer, pBI121 binary vector, Recombinant protein.

مقدمه

در چندین دهه اخیر با ظهور انواع روش‌های انتقال ژن، پروتئین‌های مختلف با خواص دارویی بالا به‌صورت موفقیت‌آمیزی به گیاهان انتقال یافته‌اند (Kumar *et al.*, 2003). گیاهان به دلایلی مانند یوکاریوتی بودن، دارا بودن سیستم ویرایشی پس از ترجمه، هزینه‌های پایین نگهداری، نبود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان، کشت و تولید در مقیاس بالا می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای انواع سیستم‌های باکتریایی، جانوری و مخمر در نظر گرفته شوند (Rukavtsova *et al.*, 2007). با توجه به افزایش نیاز به پروتئین‌های نوترکیب، در اختیار داشتن سیستمی که با استفاده از آن بتوان پروتئین‌های نوترکیب را با بازدهی بالا، هزینه پایین، و حجم کنترل شده تولید کرد، ارزش و اهمیت فراوانی دارد (Daniell *et al.*, 2001).

گیاه کاهو برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌های خوراکی گیاهی کاملا مناسب به‌نظر می‌رسد. کاهو توانایی مطلوبی را برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور از جهت نوع مصرف و حجم بالا زیست توده دارا می‌باشد (Kwon *et al.*, 2018). گزارش‌هایی شامل انتقال ژن گزارشگر *gus* (Torres *et al.*, 1993)، ژن اگزالات دکربوکسیلاز (Dias *et al.*, 2006)، ژن *ipt* (McCabe *et al.*, 2001)، ژن کیتیناز برنج (*chi*) (Sharma *et al.*, 2022) و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیک (*ARG*) (Riva *et al.*, 2022)، در گیاه کاهو موجود است.

انسولین انسانی از اولین هورمون‌هایی بود که به‌دلیل اهمیت بالا مورد توجه و تحقیق قرار گرفت (Banerjee *et al.*, 2009). یکی از عمده دلایل بیماری دیابت کمبود تولید انسولین در بدن است (Kolb and Burkart 2019). اکسندین-٤ یک پروتئین شبیه به پپتید شبه‌گلوکان (GLP-1) است که دارای نیمه‌عمر طولانی می‌باشد و مقدار گلوکز را در مسیر وابسته به گلوکز تنظیم و حساسیت به مقدار ترشح انسولین را بیشتر می‌کند (King *et al.*, 2020). در انسان تزریق زیرپوستی ۱۰ میکروگرم از اکسندین-٤ دارای اثرات بیولوژیکی به‌مدت ۵ تا ۷ ساعت می‌باشد. آنزیم دی‌پپتیدیل‌پپتیداز-٦ نمی‌تواند اکسندین-٤ را تخریب کند به این دلیل که اکسندین-٤ نیمه‌عمر بالاتری نسبت به GLP-1 دارد، در نتیجه می‌توان با استفاده از تزریق روزانه به بیماران دیابتی نوع ۲

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

از اکسندین-٤ به‌عنوان دارو استفاده کرد (Yang *et al.*, 2020). با اتصال اکسندین-٤ به زیرواحد B سم وبا (CTB) می‌توان کارایی پروتئین اکسندین-٤ را افزایش داد. عمدتا از CTB به‌عنوان حامل عصبی پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود، زیرا از طریق اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده باعث افزایش جذب پپتید متصل شده می‌شود و در صورت اتصال آنتی‌ژن به این زیر واحد می‌تواند پاسخ‌های ایمنی با شدت‌های بالاتری ایجاد کند (He *et al.*, 2022).

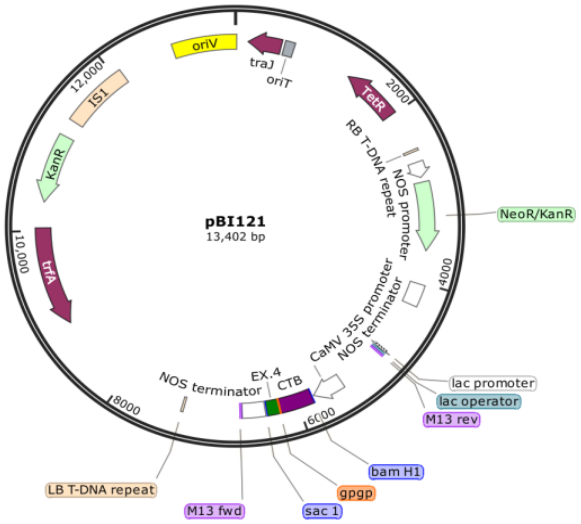
در مطالعه‌ای اکسندین-٤ متصل شده به CTB با روش بمباران ذره‌ای به کلروپلاست کاهو انتقال داده شد. نتایج نشان داد که ژن *CTB-EX4* بیان شده در کلروپلاست، سطح گلوکز خون را در موش کاهش داد و ترشح انسولین را در سلول‌های بتا TC-6 تحریک کرد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که بیان ژن مذکور بیش از ١٤/٣٪ از پروتئین کل برگ بود (Kwon *et al.*, 2013).

در تحقیقی دیگر نشان داده شد که پروتئین‌های نوترکیب حاوی اکسندین-٤ را می‌توان در سطوح بالا در گیاه تنباکو (*Nicotiana benthamiana*) تولید و به‌راحتی توسط دانه‌های سلولز میکروکریستالی (MCC) یا رزین Ni^{2+}-NTA خالص کرد. علاوه بر این، اکسندین-٤ فعال بدون هیچ گونه باقیمانده اضافی را می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب با برش پروتئولیتیک با استفاده از انتروکیناز تولید کرد (Akter *et al.*, 2022). در تحقیقی اکسندین-٤ به‌عنوان پروتئین متصل شده به CTB در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) به صورت موقت بیان شد و بیان ژن مذکور با استفاده از RT-PCR و ELISA تایید شد (Kokei and Bahramnejad 2020). در مطالعه‌ای ژن *CTB-EX4* تحت تنظیم راه‌انداز اختصاصی ریشه غده‌ای MLL با استفاده از آگروباکتریوم به گیاه هویج انتقال داده شد. نتایج حاکی از بیان ژن *CTB-EX4* به‌طور.اختصاصی در ریشه گیاه هویج در سطوح mRNA و پروتئین بودند (Zandinava *et al.*, 2024).

در پژوهشپیش‌رو، انتقال و بیان ژن اکسندین-٤ متصل به زیر واحد B سم وبا (CTB) در گیاه کاهو مورد بررسی قرار گرفت و مطالعات مولکولی روی نسل دوم گیاهان کاهوی تراریخته‌ی حاوی ژن *CTB-EX4* انجام شد. بررسی‌ها در سطح DNA، mRNA و پروتئین با توجه به تفرق صفات رخ داده در نسل دوم روی رخدادهایی (Lines) که حضور ژن خارجی مورد نظر در آنان تایید شد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ناقل pBI121 حاوی ژن *CTB-EX4* مربوط به تحقیق Kokei and Bahramnejad (2020) (شکل ١) با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به هسته گیاه کاهو انتقال داده شد. پس از انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخت شده از بذرهای بدست آمده از این گیاهان برای کشت گیاهان نسل T_1 و بررسی تراریختی آن‌ها استفاده شد.



شکل ١- نقشه ناقل نوترکیب pBI121_CTB-EX4 مورد استفاده در این تحقیق

Fig 1. The Map of the recombinant vector pBI121-CTB-EX4 used in this study

ضدعفونی و کشت بذرها: در این تحقیق از گیاه کاهو، رقم کاهوی برگی ایرانی (lettuce, *Lactuca sativa var.* longifolia) استفاده شد. ابتدا سطح بذرها با آب جاری شستشو داده شد. سپس بذرها به‌مدت ١٥ ثانیه در الکل ٧٥٪ و در ادامه به‌مدت ١٥ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ٢/٥٪، قرار داده شدند. بعد از هر مرحله، بذرها در آب مقطر استریل٣ بار شتستشو داده شدند. بذرها در شیشه‌های ٢٥٠ میلی‌لیتری حاوی محیط MS کشت داده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

شد و تا رشد اولین برگچه‌ها به‌مدت هفت روز در اتاقک رشد با متوسط دمای ٢٤ درجه سانتیگراد (٢±٢٤) و رطوبت نسبی ٤٠-٣٠ درصد با نسبت طول روز و شب ١٦ به ٨ ساعت نگهداری شدند.

محیط کشت‌های باززایی و ریشه‌زایی: در این مطالعه از محیط کشت عمومی باکتری (LB) Luria-Bertani (Sambrook and Russell 2006)، محیط کشت گیاهی (MS) Murashige and Skoog medium (Witte *et al*., 2002)، محیط کشت باززایی مستقیم که حاوی تمامی مواد موجود در محیط کشت MS به‌علاوه ٣ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ٠/٥ میلی‌گرم بر لیتر آلفا-نفتالین استیک‌اسید (α-NAA) و ٣٠ گرم بر لیتر ساکارز بود و محیط کشت ریشه‌زایی که علاوه بر مواد محیط کشت MS شامل ١ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتیریک اسید و ٢٠ گرم بر لیتر ساکارز بود، استفاده شد.

به‌منظور باززایی و غربالگری ریزنمونه‌هایی که ناقل حاوی ژن مورد نظر همراه با ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین را دریافت کرده بودند، ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت حاوی ٣٠ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین انتقال یافتند. همچنین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها در محیط باززایی مقدار ٥٠٠ میلی‌گرم بر لیتر در کشت‌های اولیه و مقدار ٣٠٠ میلی‌گرم بر لیتر در واکشت‌های بعدی سفوتاکسیم اضافه شد. در واکشت‌های بعدی روند کاهشی سفوتاکسیم ادامه پیدا کرد و مقدار آن به صفر رسید.

آماده‌سازی آگروباکتریوم برای انتقال ژن: در این تحقیق از باکتری *A. tumefaciens* سویه‌ی GV3101 حاوی پلاسمید نوترکیب pBI121_CTB-EX4 (Kokei and Bahramnejad 2020) و نیز آگروباکتریوم سویه‌ی C58 حاوی پلاسمید pKF2F S7 دارای ژن‌های *GFP_GUS* (Karimi *et al*., 2002) استفاده شد. دو روز قبل از تلقیح ریزنمونه‌ها، یک پرگنه از باکتری *A. tumefaciens* در ٥ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (١٠٠ mg/ml)، ریفامپیسین (٥٠ mg/ml) و جنتامایسین (٣٠ mg/ml)، به‌مدت ٣٦ ساعت درون انکوباتور لرزاننده در دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد و دور ١٢٠ rpm نگهداری شدند. سپس ١ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رشد یافته باکتری به ٢٥ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (١٠٠ mg/ml)، ریفامپیسین (٥٠ mg/ml) و جنتامایسین (٣٠ mg/ml) افزوده شد و تا زمانی که جذب نوری باکتری در طول موج ٦٠٠ نانومتر به ٠/٥ (OD_{600}= 0.5) رسید در انکوباتور لرزاننده در دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد و دور ١٢٠ rpm نگهداری شد. پس از این مرحله باکتری‌ها در سانتریفویوژ به‌مدت ١٥ دقیقه در ٥٠٠٠ rpm رسوب داده شدند. رسوب باقی‌مانده در ٢٥ میلی‌لیتر محیط MS حاوی $MgSO_4$ ١٠ میلی‌مولار و استوسیرینگون ١٥٠ میکرومولار به خوبی حل شد و پیش از تلقیح ریزنمونه‌های گیاه کاهو به‌مدت ٣ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.

تلقیح کاهو با آگروباکتریوم حاوی سازه هدف: ریزنمونه‌های تهیه شده از برگ گیاه کاهو، به‌مدت ٢٠ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار داده شد. پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگی با آگروباکتریوم، جهت هم‌کشتی در پتری‌دیش حاوی MS عاری از آنتی‌بیوتیک به‌مدت ٤٨ ساعت کشت شدند، سپس ریزنمونه‌ها با ٥٠٠ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم به‌مدت ١٥ دقیقه و پس از آن دوبار و هر بار به‌مدت ١٠ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها بعد از آبگیری روی کاغذ صافی به محیط کشت MS حاوی کانامایسین (٢٥ mg/ml) و سفوتاکسیم (٥٠٠ mg/ml) انتقال داده شدند (شکل ٢).

تایید تراریختی در گیاهان کاهوی نسل اول: استخراج DNA از برگ‌های گیاه کاهو به روشCTAB (بافر استخراج حاوی CTAB ٢٪ وزن به حجم، EDTA ٢٠ میلی‌مولار، Tris-HCl pH=8 ٠/١ مولار، NaCl ١/٤ مولار، به‌علاوه ١٪ بتا مرکاپتواتانول (قبل از استفاده بافر اضافه شود) انجام گرفت (Koh *et al*., 2021). کمیت و کیفیت DNA و RNAهای استخراجی با استفاده از ژل آگارز ١/٢٪ و اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر تعیین گردید. واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) با استفاده از Mastermix شرکت WizbioSolutions (Cat No. W1401) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در حجم ٢٠ میکرولیتر با شرایط دمایی ١ چرخه واسرشت اولیه ٥ دقیقه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد، ٣٠ چرخه شامل ٤٥ ثانیه ٩٥ درجه سانتی‌گراد، ٤٠ ثانیه ٦٠ درجه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

سانتی‌گراد ، ٤٥ ثانیه ٧٢ درجه سانتی‌گراد و ١ چرخه بسط نهایی به‌مدت ٧ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر قطعه ٥٤٣ جفت بازی *CTB-EX4*، با توالی آغازگر مستقیم ′٣-TGTGCAGAATACCACAACACAC-′٥ و توالی آغازگر معکوس ′٣-TCAAGAAGGAGGAGGAGCAC-′٥ هر کدام در حجم ٠/٥ میکرولیتر (غلظت اولیه ٥ µM و غلظت نهایی ٠/٥ µM)، DNA الگو به غلظت ١٠ نانوگرم، Master Mix در حجم ٥ میکرولیتر و آب برای حجم نهایی ١٠ میکرولیتر انجام شد.

استخراج RNA کل از برگ‌های گیاهان کاهوی نسل دوم به روش پیرز مارتینز و همکاران و با اندکی تغییر انجام شد (Pérez-Martínez *et al.*, 2020). حدود ٠/١ الی ٠/٢ گرم از نمونه برگ تازه با استفاده از ازت مایع در هاون به‌صورت کامل پودر شد و ٢ میلی‌لیتر از بافر استخراج به هاون‌ها اضافه گردید. در مرحله بعدی ١ میلی‌لیتر از محلول فنل-کلروفرم – ایزوآمیل‌الکل به نسبت حجمی ١:٢٤:٢٥ به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها در ١٣٠٠٠ rpm و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشتن روشناور و انتقال به میکروتیوب جدید به هر نمونه هم حجم آن محلول کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل به نسبت حجمی ١:٢٤ اضافه شد. در مرحله بعد فاز رویی شفاف برداشته شد و ٠/١ حجم آن محلول لیتیم‌کلراید ٨ مولار اضافه و پس از یک شب تیمار در ٢٠- درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها در ١٣٠٠٠ rpm و ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب تشکیل شده با اتانول ٧٠٪ شسته شد و سپس برای خشک شدن زیر هود قرار گرفت. در نهایت رسوب حاصل در ٣٠ میکرولیتر آب استریل تیمار شده با DEPC حل شد. جهت حذف DNA ژنومی، به ١٠ میکرولیتر RNA، ١ میکرولیتر آنزیم DNase I و هم حجم آن بافر آنزیم اضافه و به‌مدت ٣٠ دقیقه در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای غیرفعال کردن آنزیم DNase I، ١ میکرولیتر ETDA ٥٠ میلی‌مولار به هر نمونه اضافه شد و در نهایت نمونه‌ها به‌مدت ١٠ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. به‌منظور تولید cDNA از RNAهای تیمار شده با آنزیم DNase I از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Cat No: YT4500) با استفاده از آغازگر معکوس Oligo dT استفاده شد.

برای این منظور ابتدا در میکروتیوب‌های ٠/٢ میلی‌لیتری، ٦ میکرولیتر از RNA کل با غلظت نهایی ٥ µg، به همراه ١ میکرولیتر از آغازگر معکوس Oligo dT با غلظت ٥٠ میکرومولار، تهیه شد و برای حجم نهائی ١٣/٤ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه شد و به‌مدت ٥ دقیقه در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR یا thermal cycler قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به‌مدت ٢ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به آن‌ها محلولی با حجم ٦/٥ میکرولیتر حاوی ٤ میکرولیتر بافر 5X first strand، ١ میکرولیتر dNTP (١٠ میلی‌مولار)، ٠/٥ میکرولیتر آنزیم RNasin (40U/ul) و ١ میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس (M-MLV) اضافه شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها به آرامی، میکروتیوب‌ها دوباره در دستگاه PCR قرار داده شدند تا در دو چرخه با دماهای ٤٢ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦٠ دقیقه و ٧٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥ دقیقه واکنش رونوشت‌برداری معکوس از RNA و تبدیل آن به DNA مکمل یا cDNA انجام شود.

برای **انجام آزمون RT-PCR، میزان بیان نیمه‌کمی قطعه *CTB-EX4*** با ژن مرجع *Actin1* (توالی آغازگر مستقیم ′٣-TGATTGGAATGGAAGCTGCTG-′٥ وتوالی آغازگر معکوس ′٣-CAGTGATTTCCTTGCTCATCCG-′٥) مقایسه شد. RT-PCR با استفاده از cDNAهای تولیدی به عنوان الگو و آغازگرهای ژن مرجع F-*Actin* و R-*Actin* و آغازگرهای اختصاصی F-*CTB-EX4* و R-*CTB-EX4* و طبق نسبت‌های به کار رفته و چرخه‌های دمایی همانند آزمون PCR در ٣١ چرخه انجام گرفت. آغازگر ژن *CTB-EX4* و آغازگر ژن مرجع *Actin* در طی واکنش RT-PCR به صورت هم‌زمان مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس بیان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET و رعایت حداقل تکرار زیستی (سه تکرار) بیان ژن هدف کمی‌سازی شد. نتایج بیان ژن توسط نرم‌افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین مورد بررسی قرار گرفت.

گیاهان تراریخته‌ی درون شیشه نسل اول تایید شده در آزمون PCR، با محیط سازگار شدند و به محیط گلدان در گلخانه منتقل شدند (شکل ٢ a-g). از بذرهای به‌دست آمده از گیاهان کاهوی

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

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

تراریخته نسل اول حاوی ژن *CTB-EX4* برای کشت گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم استفاده شد.

تولید گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم حاوی ژن *CTB-EX4*: بذرهای نسل T_0 تراریخته همراه با بذر نمونه غیرتراریخت (شاهد) در ابتدا در محیط کشت MS حاوی کانامایسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کشت و پس از جوانه‌زنی، تعداد گیاهچه‌های حساس و مقاوم شمارش شدند (شکل ۲-i،h). پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ (۳۰ دقیقه)، آب دو بار تقطیر (۱ ساعت) (Pepe *et al.*, 2021)، بذور روی خاک مغذی شامل نسبت برابر خاک رس، ماسه، کود دامی، کوکوپیت و پیرلیت در گلدان کشت گردیدند (Patil *et al.*, 2020).

بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح mRNA: جهت بررسی کمی بیان ژن *CTB-EX4* از دستگاه Real time PCR ساخت شرکت Applied Biosystems، آغازگرهای مستقیم 3′- 5′-CAATTAGTATGGCAAATGG و معکوس 3′- 5′-TCAAGAAGGAGGAGGAGCAC ژن *CTB-EX4* و ژن کنترل داخلی *Actin1* در غلظت ۵ پیکومول و master mix SYBER green شرکت AMPLIQON حاوی رنگ ROX طبق دستورالعمل (Cat. No.: A325402) استفاده شد. مقادیر Ct مربوط به هر یک از رخدادها با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) (با توجه به یکسان بودن کارایی آغازگرهای مورد استفاده) طبق معادله‌ی زیر کمی شد. در نهایت میانگین ۳ تکرار به‌عنوان بیان ژن *CTB-EX4* استاندارد شده با بیان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمونLSD در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نمودارهای مناسب جهت تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار Microsoft Excel 2019 رسم گردید.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{Transgene}\ (Ct\ EX4 - Ct\ Actin) - \text{Control}\ (Ct\ EX4 - Ct\ Actin))}$$

به‌منظور تعیین کارایی آغازگرها (Efficiency) از رسم نمودار کارایی برای ژن‌های *CTB-EX4* و *Actin1* استفاده شد. نمودار کارایی با استفاده ترسیم مقادیر Ct در برابر سری رقت‌های ٤ گانه cDNA (1x=10 ng/ul، $\left(\frac{1}{10}\right)$x، $\left(\frac{1}{100}\right)$x، $\left(\frac{1}{1000}\right)$x) ترسیم شد (Pfaffl *et al.*, 2001; Tellmann, 2006). واکنش Real time PCR برای هر آغازگر در رقت و هر رقت در ۳ تکرار انجام شد. مقادیر Ct حاصل برای رسم خط همبستگی بین مقادیر Ct و رقت cDNA به‌منظور تعیین کارایی آغازگرها مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت میزان شیب خط و R^2 حاصل از خط همبستگی بین Ctها محاسبه گردید و کارایی هر آغازگر با استفاده از معادله $PCRefficiency = 10^{(-1/slope)}$ بدست آمد.

تعیین تعداد نسخه انتقال یافته با استفاده از واکنش Real time PCR: جهت تعیین تعداد نسخه به روش مطلق ابتدا برای هر دو ژن *CTB-EX4* و *Actin1* منحنی استاندارد حاصل از سری رقت مربوط به محصول PCR در ٤ رقت 1x، $\left(\frac{1}{10}\right)$x، $\left(\frac{1}{100}\right)$x، $\left(\frac{1}{1000}\right)$x تهیه شد. بر اساس غلظت نمونه 1x و با توجه به وزن مولکولی قطعه تکثیر شده با استفاده از نرم‌افزار تحت وب NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/) تعداد نسخه ابتدایی در آغاز واکنش Real time PCR محاسبه شد. با استفاده از Ctهای بدست آمده برای هر رقت، نمودار Ct در برابر تعداد نسخه رسم شد و خط همبستگی بین نقاط برای هر آغازگر به‌صورت مجزا رسم گردید. پس از محاسبه R^2 و معادله خط، از معادله بدست آمده برای تعیین تعداد رونوشت به ازای Ct در هر رخداد استفاده شد. برای تعیین تعداد نسخه در هر رخداد واکنش Real time PCR از DNA هر رخداد انجام شد. با در نظر گرفتن نسبت بین تعداد رونوشت *CTB-EX4* نسبت به تعداد رونوشت *Actin1* تعداد نسخه‌های منتقل شده محاسبه شد. با توجه به این نکته که آغازگرهای ژن *Actin1* قادر به تکثیر ۸ مکان روی ژنوم دیپلوئید کاهو بودند تعداد نسخه نهایی بدست آمده با تقسیم بر عدد ۸ به ازای یک ژنوم کاهو استاندارد شد.

در روش کمیت‌سنجی نسبی با استفاده از واکنش Real time PCR از نمونه‌های DNA هر رخداد و با استفاده از معادله $2^{-\Delta Ct}$، تعداد نسخه‌های انتقال یافته ژن *CTB-EX4* نسبت به ژن *Actin1* محاسبه گردید. از روی تعداد نسخه‌های مورد انتظار برای ژن کنترل داخلی *Actin*، تعداد نسخه‌های ژن مورد مطالعه‌ی *CTB-EX4* تعیین گردید. با توجه به این نکته که آغازگرهای ژن *Actin1*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

قادر به تکثیر ۸ مکان روی ژنوم دیپلوئید کاهو بودند، عدد بدست آمده از معادله $2^{-\Delta Ct}$ با ضرب در عدد ۸ استاندارد شد.

بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح پروتئین: استخراج پروتئین از بافت گیاهی با روش Tris-HCL استفاده شد (DelMar Contreras *et al.*, 2019). با استفاده از ازت مایع ۰/۱ گرم نمونه برگی تازه در هاون به‌صورت کامل پودر شد. ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج به پودر گیاهی حاصل اضافه شد. مخلوط حاصل به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر انتقال داده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. در مرحله بعد، میکروتیوب‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۵۰۰ rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها فاز رویی به میکروتیوب ۱/۵ انتقال داده شد. برای انجام آزمون SDS-PAGE ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه پروتئین مورد نظر با مقدار ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری 5x به صورت کامل همگن شد سپس به‌مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در داخل بن‌ماری ۹٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از بارگذاری، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با شدت جریان ٦۰ آمپر و سپس ۱ الی ۲ ساعت با شدت جریان ٤۵ آمپر الکتروفورز شدند. پس از شستشو ژل با آب مقطر، مقداری از محلول ثبوت TCA به آن اضافه و روی شیکر با دور بسیار آرام به‌مدت زمان ۱ ساعت قرار گرفت. در مرحله بعدی ژل با آب مقطر شستشو داده شد و محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو G-250 به آن اضافه شده و به‌مدت یک شبانه‌روز روی شیکر با دور بسیار آرام قرارگرفت. بعد از گذشت یک شبانه‌روز ژل با آب مقطر شستشو داده شد. از آزمون ELISA برای بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح پروتئین استفاده شد (Gao and Wu 2022). ابتدا غلظت برابری از پروتئین کل گیاهان شاهد و تراریخت برابر با ۱۰ میکروگرم همراه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول پوشش‌دهنده (۰/۰۱ گرم سدیم‌آزید، ۰/۰۷۹ گرم سدیم‌کربنات، ۰/۱٤٦ گرم سدیم‌بی‌کربنات در حجم ۵۰ میلی‌لیتر بافر 1x Phosphate (PBS) buffered saline (pH: ۹/٦)). و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد سپس به چاهک‌های الایزا منتقل و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد چاهک‌ها ۳ بار توسط بافر PBS-T و ۳ بار توسط بافر PBS شستشو داده شدند و ۲۰۰ میکرولیتر محلول سرم گاوی BSA ۱٪ یا بافر مسدودکننده به هر چاهک اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد هر چاهک توسط بافرهای PBS و PBS-T شسته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر پادتن اختصاصی *CTB-EX4* اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو دادن با بافرهای PBS-T و PBS، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر پادتن کنژوگه اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. بعد از ۳ بار شستشو با بافرهای PBS-T و PBS، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB به هر کدام از چاهک‌ها اضافه و برای انجام واکنش رنگی به محیط تاریکی انتقال داده شد. پس از ٤۵ دقیقه و تغییر رنگ چاهک‌ها به رنگ آبی، با افزودن اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار واکنش متوقف شد و رنگ آبی چاهک‌ها به زرد تغییر کرد. در انتها توسط دستگاه ELISA reader، ELx808 شرکت Bio Tek Instruments میزان جذب در طول موج ٤۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (شکل ۵). برای انجام وسترن‌بلات با استفاده از کیت ECL ابتدا آزمون SDS-PAGE انجام گرفت سپس پروتئین‌ها توسط دستگاه Trans-®SD semi-Dry Electrophoretic Transfer cell شرکت Bio-Rad به یک غشا نیتروسلولزی با منافذ ٤۵µm انتقال داده شدند. غشا و ژل در ابتدا به‌مدت ۲۰ دقیقه درون بافر انتقال قرار گرفتند. با استفاده از ولتاژ ۱۰۰ V در مدت زمان ٦۰ دقیقه، پروتئین‌ها از ژل به غشا نیتروسلولزی انتقال داده شدند سپس غشا نیتروسلولزی به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول شیر خشک بدون چربی ۵٪ قرار گرفت. غشا توسط محلول PBS-T سه مرتبه شستشو داده شد. پادتن اولیه با غلظت ۱:۲۰۰۰۰ به غشا اضافه گردید و در دمای محیط به‌مدت ۳ ساعت روی شیکر با دور آرام قرار گرفت. در مرحله بعد سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه، غشا با محلول PBS-T شستشو داده شد. پادتن ثانویه با غلظت ۱:۲۰۰۰ به غشا اضافه شد و در دمای محیط به‌مدت ۹۰ دقیقه به آرامی شیک شد و سه مرتبه با محلول PBS-T شستشو داده شد. سوبسترای ECL طبق دستورالعمل کیت زیست فناوران در محیط تاریک تهیه گردید. غشا نیتروسلولزی در اتاق تاریک در داخل کیسه نایلونی و بعد درون کاست عکاسی حاوی فیلم عکاسی قرار گرفت، بعد از گذشت ۵ دقیقه با قرار دادن نور روی بلات، فیلم

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

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

رادیولوژی X-ray از ۱ ثانیه تا چند دقیقه با توجه به شدت نور، روی بلات قرار داده شد. سپس فیلم بعد از گذشت ۵ دقیقه با آب مقطر، در محلول ثبوت قرار داده شد و سپس با آب شستشو داده شد. به منظور **بررسی** *in silico* توالی CTB-EX4 و بررسی وجود پروتئین مشابه با توالی CTB-EX4 در کاهو غیرتراریخت از Blast در پایگاه داده NCBI استفاده شد. برای این منظور توالی نوکلئوتیدی ژن *CTB-EX4* در بخش tblastn جای‌گذاری شد و پس از به‌دست آمدن توالی آمینواسیدی مورد نظر، اقدام به Blast پروتئین CTB-EX4 در توالی پروتئینی گیاه کاهو شد.

نتایج و بحث

باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده

دو هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ کاهو، اولین کالوس‌های حاصل از انتقال ژن توسط آگروباکتریوم ظاهر شدند و ریزنمونه‌هایی که ژن مورد نظر و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین را دریافت نکرده بودند، از بین رفتند (شکل ۲-a). طی پنج مرحله تلقیح ۷۷۵ ریزنمونه تلقیح شد و در نهایت۲۰/۲۵٪ از ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌زایی کردند و ۱۰/۰٦ ٪ نیز وارد مرحله ساقه‌زایی شدند (جدول ۱). دو تا سه هفته پس از ظهور کالوس‌ها، اولین گیاهچه‌ها در محیط باززایی شروع به رشد کردند (شکل ۲-b). پس از رشد کافی ریشه مربوط به گیاهچه‌های درون شیشه، گیاهچه‌ها از محیط کشت خارج و به گلدان‌های درپوش‌دار حاوی نسبت برابر کوکوپیت و پیرلایت منتقل شدند (شکل ۲-c). پس از ایجاد سوراخ‌هایی روی درپوش در طول چند روز و سازگاری با محیط خارج از شیشه درپوش‌ها برداشته شد (شکل ۲-d)، سپس گیاهان به گلدان‌های حاوی خاک رس و ماسه و کود دامی در گلخانه انتقال داده شدند (شکل ۲-e). گیاهان باززا شده برای تایید تراریختی با آزمون PCR و همچنین آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *CTB-EX4* مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). پس از طی مراحل رشدی گیاهان تایید شده به بذر نشستند (شکل ۲-f) و بذور حاصل جمع‌آوری شدند (شکل ۲-d).

جدول ۱- تعداد ریزنمونه ها و درصد کالوس زایی و ساقه زایی

Table 1. The number of explants and the percentage of callus and stem formation

مراحل تلقیح Inoculation steps	تعداد ریزنمونه No of explants	کالوس‌زایی callus formation	ساقه‌زایی Stem formation
مرحله ۱ Step 1	125	16	2
مرحله ۲ Step 2	150	39	15
مرحله ۳ Step 3	220	37	23
مرحله ٤ Step 4	130	35	25
مرحله ۵ Step 5	150	30	13
مجموع Total	775	157	78
درصد Percnet	100	20.25	10.06

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

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

شکل ۲- باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده، تهیه‌ی بذرهای تراریخت و تولید گیاهان تراریخته‌ی نسل اول و دوم. a) ظهور اولین گیاهچه‌ها از کالوس‌های رشد کرده. b) ریشه‌زایی نمونه‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی. c) انتقال ریزنمونه‌ها پس از رشد کافی به محیط درون شیشه حاوی کوکوپیت و پیرلیت. d) سازگاری گیاهچه‌های تراریخت درون شیشه‌ای با محیط بیرون. e) انتقال گیاهچه رشد کرده به شرایط گلدان حاوی خاک، کود دامی، کوکوپیت و پیرلیت. f) مراحل گل‌دهی و به بذر نشستن. g) جمع آوری بذور از گیاهان تراریخته‌ی نسل اول. h) کشت بذرهای تراریخت و غیرتراریخت در محیط کشت MS حاوی کانامایسین جهت انجام تست جوانه‌زنی. i) گیاهچه‌های حساس به کانامایسین (1)، گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین (2). j) ترتیب مراحل رشدی گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم.

Fig2. Regeneration of inoculated explants and preparation of transgenic seeds and production of first and second generation transgenic plants.a) Emergence of the first seedlings from the grown callus. b) Rooting of samples in rooting medium. c) Transplanting the explants after sufficient growth to the in-glass medium containing cocopeat and pearlite. d) Adaptation of transgenic seedlings in glass with the outside environment. e) Transferring the grown seedlings to pot conditions containing soil, animal manure, cocopeat and perlite. f) Flowering and seeding stages. g) Collecting seeds from first generation transgenic plants. h) Cultivation of transgenic and non-transgenic seeds in MS culture medium containing kanamycin for germination test. i) Kanamycin-sensitive seedlings (1), kanamycin-resistant seedlings (2). j) The sequence of growth stages of second generation transgenic lettuce plants.

تولید گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل T_1

گیاهان کاهوی حاصل از بذرهای تراریخته، همانند گیاهان غیرتراریخت الگوی رشد طبیعی داشتند و هم‌زمان به گل نشستند. در نهایت از نمونه‌ها بذر تهیه شد و برای سایر آزمایش‌های این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).

تایید حضور ژن *CTB-EX4* در گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم با PCR

جهت **تایید حضور ژن *CTB-EX4* در گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم با PCR** با آغازگرهای اختصاصی ژن *CTB-EX4* قطعه‌ای به طول ٥٤٣ جفت باز از ژن تکثیر شد. از ۱۰ گیاه نسل دوم حاصل از بذرهای تراریخت نسل اول، ٦ گیاه در آزمون PCR تایید شدند که نشان دهنده‌ی انتقال ژن *CTB-EX4* بود (شکل ۳). از ٦ رخداد نسل T_1 که در آزمایش مرحله PCR تایید شده بودند، برای بررسی بیان ژن *CTB-EX4* استفاده گردید

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

(شکل ۳). بر اساس نتایج حاصل از ژل الکتروفورز، اندازه نوار تکثیر شده ژن *CTB-EX4* ۵٤۳ جفت باز و ژن مرجع *Actin1* اندازه‌ی ۲۰۰ جفت باز را نمایش دادند. این آزمون در سه تکرار انجام گرفت (شکل ۳). **داده‌های حاصل از RT-PCR** نشان داد که همه‌ی رخدادهای تایید شده در آزمون PCR در سطح mRNA دارای بیان بودند و تفاوت در میزان بیان بین رخدادهای مورد مطالعه بود. بیشترین میزان بیان نیمه‌کمی در رخداد ۱۰٦ و کم‌ترین میزان بیان در رخداد ۱۰۱ مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج حاصل از Real time PCR حاکی از بیان ژن *CTB-EX4* در گیاهان کاهوی تراریخته در سطح mRNA برای رخدادهای مورد بررسی بود. نتایج نشان داد بیشترین میزان بیان مربوط به رخداد ۱۰۵ و کمترین مقدار بیان متعلق به رخدادهای ۱۰٦ و ۱۰۸ بود. بیان کمی ژن *CTB-EX4* در رخداد ۱۰۵ تقریبا ۳ برابر ۱۲۱ و ٦ برابر رخدادهای ۱۰۱ و ۱۰٤ بود (شکل ٤).

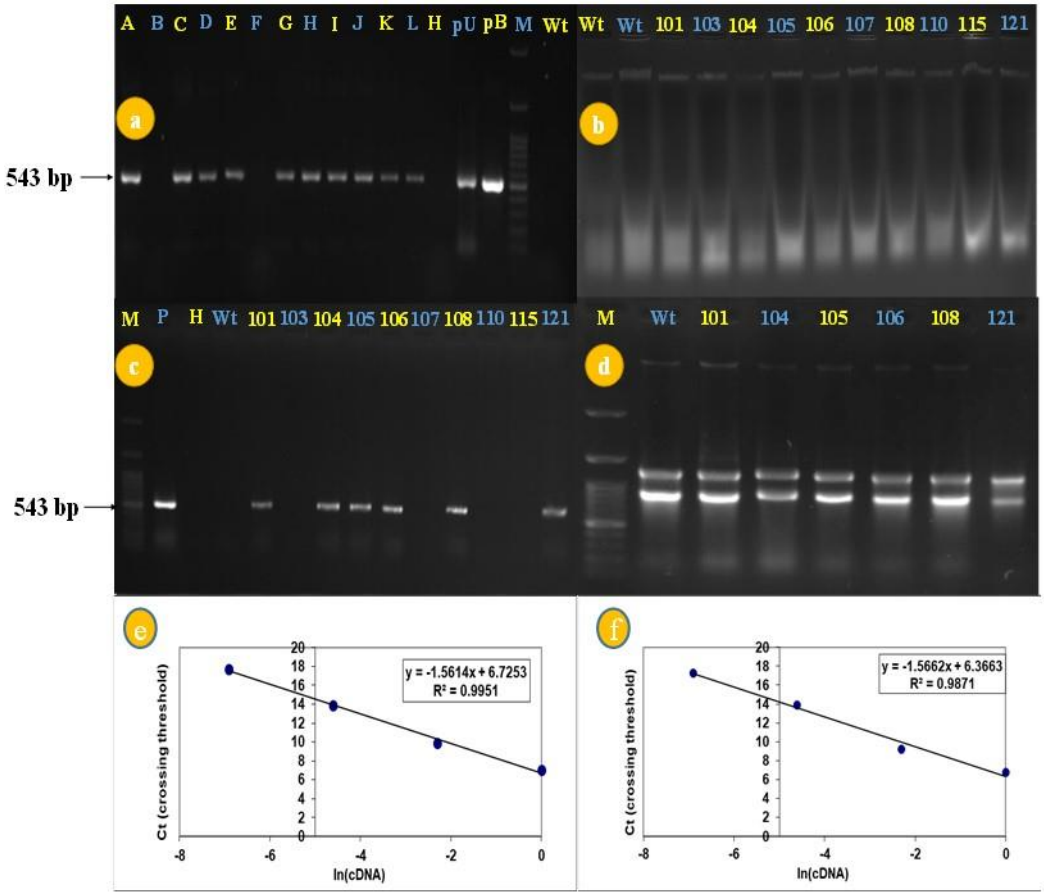
با انجام واکنش Real time PCR و استفاده از سری رقت از نمونه‌ی استاندارد تعداد نسخه برای ژن *CTB-EX4* در هر رخداد محاسبه شد. منحنی استاندارد برای سری رقت نمونه‌های استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 و معادله همبستگی بین نقاط برای هر دو ژن *CTB-EX4* و *Actin1* رسم گردید (شکل ۳-e و ۳-f). نتیجه بلاست توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن *Actin1* بر علیه ژنوم کاهو حاکی از تکثیر ۸ لوکوس بود، با توجه به این موضوع تعداد نسخه‌های بدست آمده برای ژن *Actin1* با تقسیم بر عدد ۸ برای ژنوم دیپلوئید نرمال شد. در نهایت با تقسیم تعداد نسخه ژن *CTB-EX4* بر تعداد نسخه *Actin1*، تعداد نسخه درج شده ژن *CTB-EX4* به ازای ژنوم دیپلوئید کاهو بصورت تقریبی محاسبه شد. برای رخداد ۱۰۱، ۷ نسخه، رخداد ۱۰٤ و ۱۰۵، ۱ نسخه، رخداد ۱۰٦، ٤ نسخه، رخداد ۱۰۸، ۵ نسخه و رخداد ۱۲۱، ۲ نسخه محاسبه شد. تعداد نسخه‌ی انتقال یافته از طریق آگروباکتریوم به عوامل مختلفی از قبیل نوع سویه آگروباکتریوم و ساختار ژنتیکی گیاه میزبان و همچنین نوع پلاسمید بستگی دارد. اگرچه معمولا تعداد نسخه‌های انتقال یافته توسط آگروباکتریوم کم و معمولا ۱ یا ۲ نسخه است اما مثال‌هایی از انتقال تعداد نسخه‌های بیشتر در گیاهان مختلف از جمله کاهو وجود دارد.

در **روش کمیت سنجی نسبی** بررسی تعداد نسخه درج شده در ژنوم و مقدار تکثیر توسط آغازگرهای ژن *CTB-EX4* نسبت به آغازگرهای ژن *Actin1* با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (با توجه به یکسان بودن کارایی تکثیر هر دو آغازگر) استاندارد شد و تعداد نسخه درج شده محاسبه شد. با توجه به این که آغازگرهای طراحی شده برای ژن *Actin1* قادر به تکثیر ٤ لوکوس روی ژنوم هاپلوئید بود، برای محاسبه تعداد نسخه انتقال یافته در ژنوم دیپلوئید عدد نهایی در ۸ ضرب شد. در نهایت برای رخداد ۱۰۱، ٦ نسخه، رخداد ۱۰٤ و ۱۰۵، ۱ نسخه، رخداد ۱۰٦، ۳ نسخه، رخداد ۱۰۸، ٤ نسخه و رخداد ۱۲۱، ۲ نسخه محاسبه شد. رخدادهای ۱۰۱، ۱۰٦ و ۱۰۸ دارای بیشتر از ۳ نسخه از ژن مورد مطالعه بودند. این تعداد نسخه‌ها احتمال دارد به سبب ادغام این ژن در چندین جایگاه مختلف بوده باشد.

در **آزمون SDS-PAGE** پروتئین‌ها در داخل ژل عمودی توسط الکتروفورز از هم تفکیک شدند و بر حسب وزن مولکولی از هم جدا شدند. در نهایت با بررسی وجود یا عدم وجود قطعه‌ی پروتئینی هدف در محدوده ۱۷ کیلودالتون در رخدادهای تراریخت در مقایسه با شاهد، به وجود یا عدم وجود قطعه پروتئین هدف پی‌برده شد. در این آزمون، قطعه‌ی ۱۷ کیلو دالتونی موجود در گیاهان تراریخت، در گیاه غیرتراریخت مشاهده نشد (شکل ۵).

نتایج بدست آمده از بیان پروتئین CTB-EX4 در گیاه کاهو به روش ELISA حاکی از آن بود که تمامی گیاهان کاهوی تراریخت شده دارای توانایی تولید پروتئین CTB-EX4 بودند. رخداد ۱۰۵ دارای بیشترین میزان بیان پروتئین و رخداد ۱۲۱ کمترین میزان بیان پروتئین را نشان داد. بیان رخداد ۱۰۵ تقریبا برابر با رخداد ۱۰۸ بود. بیان پروتئین در رخداد ۱۰۵ تقریبا ۱/۳ برابر رخداد ۱۰٤، ۱/٦ برابر رخداد ۱۰٦ و ۱/۷ برابر رخداد ۱۰۱ بود. نتایج به‌صورت میزان جذب در طول موج ٤۵۰ نانومتر بیان شده است (شکل ٤)

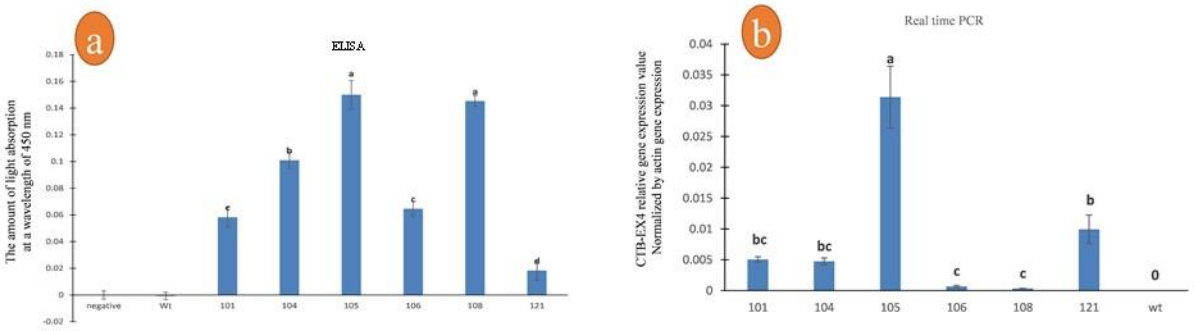
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]



شکل ۳- بررسی‌های مولکولی روی گیاهان مورد بررسی a) گزینش گیاهچه‌های تراریخته‌ی نسل اول حاصل از نمونه‌های باززا شده توسط آغازگرهای اختصاصی *CTB-EX4*، چاهک‌های A، C، D، E، G، H، I، J، K و L: نمونه‌های تراریخته‌ی تایید شده‌ی نسل اول، چاهک‌های B و F: نمونه‌های غیرتراریخت، چاهک H: کنترل منفی (استفاده از آب به عنوان DNAی الگو)، چاهک‌های pB و pU: حاوی قطعه مورد نظر به عنوان کنترل مثبت، M: نشانگر مولکولی bp ۳۰۰۰-۱۰۰، چاهک Wt: نمونه‌ی شاهد (گیاه غیرتراریخت). b) الکتروفورز DNA ژنومی استخراجی از گیاهان تراریخته و شاهد، چاهک‌های ۱۰۱، ۱۰۳، ۱۰٤، ۱۰۵، ۱۰٦، ۱۰۷، ۱۰۸، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۱: DNAی استخراجی از گیاهان تراریخته و چاهک‌های Wt: DNAی استخراجی از گیاهان شاهد غیرتراریخت. c) بررسی گیاهان کاهوی تراریخته نسل دوم در سطح DNA و تایید حضور قطعه ٥٤۳ جفت باز ژن *CTB-EX4* توسط آزمون PCR، پلاسمید (C+): شامل ژن مورد نظر به‌عنوان کنترل مثبت و تعداد ٦ رخداد ۱۰۱، ۱۰٤، ۱۰۵، ۱۰٦، ۱۰۸، ۱۲۱ از کل گیاهان تراریخت نسل دوم: حاوی ژن مورد مطالعه *CTB-EX4* با قطعه مورد انتظار ٥٤۳ جفت باز، چاهک C-: نمونه غیرتراریخت شاهد، چاهک H: نمونه کنترل منفی (استفاده از آب به عنوان DNA الگو)، نمونه‌های ۱۰۳، ۱۰۷، ۱۱۰ و ۱۱۵: نمونه‌های غیرتراریخت. d) استخراج RNA از برگ‌های گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم، چاهک‌های ÷۱۰۱، ۱۰٤، ۱۰۵، ۱۰٦، ۱۰۸ و ۱۲۱: نمونه‌های تراریخت، Wt نمونه غیرتراریخت شاهد. e) منحنی استاندارد برای آغازگرهای ژن *CTB-Ex4* در ٤ رقت و ۳ تکرار برای هر رقت. Ct در برابر غلظت cDNA f) منحنی استاندارد برای آغازگرهای ژن *Actin 1* در ٥ رقت و ۳ تکرار برای هر رقت. Ct در برابر غلظت cDNA

Fig3. Molecular analyses on the plants under study. a) Selection of first-generation transgenic seedlings from samples regenerated by specific primers *CTB-EX4*, wells A, C, D, E, G, H, I, J, K, and L: confirmed first-generation transgenic samples, wells B and F: Non-transgenic samples, H well: negative control (using water as template DNA), pB and pU wells: containing desired fragment as positive control, M: molecular marker 100-3000 bp, Wt well: non-transgenic control sample. b) Genomic DNA electrophoresis extracted from transgenic and control plants, wells 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 115 and 121: DNA extracted from transgenic plants and Wt wells: DNA extracted from non-transgenic control plants. c) Examining the second generation transgenic lettuce plants at the DNA level and confirming the presence of a 543 bp fragment of the *CTB-EX4* gene by PCR test, plasmid (C+): including the desired gene as a positive control and the number of 6 lines 101, 104, 105, 106, 108 , 121 of all transgenic plants of the second generation: containing the studied gene CTB-EX4 with the expected fragment of 543 bp, well C-: control non-transgenic sample, well H: negative control sample (using water as template DNA), 103 samples, 107, 110 and 115: non-transgenic sample. e) Standard curve for *CTB-Ex4* gene primers at 4 dilutions and 3 replicates for each dilution. Ct versus cDNA concentration f) Standard curve for *Actin1* gene primers in 5 dilutions and 3 replicates for each dilution. Ct versus cDNA concentration

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]



شکل٤- نمودار مقایسه میانگین بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح RNA و پروتئین. a) نمودار ELISA برای پروتئین‌های استخراجی گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاه شاهد. b) نمودار مقایسه میانگین بیان کمی نسبی ژن *CTB-EX4* نرمال شده با مقدار بیان ژن *Actin1*

Fig4. Comparison chart of the average of *CTB-EX4* gene expression in RNA and protein levels. a) ELISA plot for extracted proteins of transgenic plants compared to the control plant. b) Comparison graph of the average relative quantitative expression of the *CTB-EX4* gene normalized with the expression value of the *Actin* gene.

رخداد ۱۰۵ دارای بیشترین مقدار بیان در سطوح پروتئین و mRNA در مقایسه با سایر رخدادهای تراریخت شده بود. با توجه به این نکته که نتایج بررسی تعداد نسخه انتقال یافته حاکی از وجود تنها ۱ نسخه منتقل شده ژن *CTB-EX4* درژنوم رخداد ۱۰۵ بود. به‌نظر می‌رسد این نسخه در ناحیه مناسبی از ژنوم قرار گرفته است. همچنین رخداد ۱۰۱ با بیشترین تعداد نسخه انتقال یافته دارای کمترین مقدار بیان در سطوح mRNA و پروتئین بود که به‌نظر می‌رسد تعداد بالای ژن انتقال یافته باعث اثر بازخورد منفی روی بیان ژن مورد نظر باشد. از طرفی قرار گرفتن نسخه منتقل شده در مناطق غیرترجمه شونده نیز می تواند عامل دیگری در کم بودن بیان در یک رخداد تراریخت باشد. از طرفی رخداد ۱۰۸ با ۵ نسخه پس از رخداد ۱۰۱ دارای کمترین مقدار بیان در سطح mRNA بود با این حال در سطح پروتئین دارای بیشترین مقدار بیان پس از رخداد 105 بود. این نکته نشان دهنده این واقعیت است که مقدار بیان در سطح mRNA نمی‌تواند برآورد صحیحی از مقدار بیان در سطح پروتئین باشد زیرا ممکن است کل mRNA تولید شده به دلایلی مانند خاموشی ژن پس از رونویسی به پروتئین تبدیل نشوند.

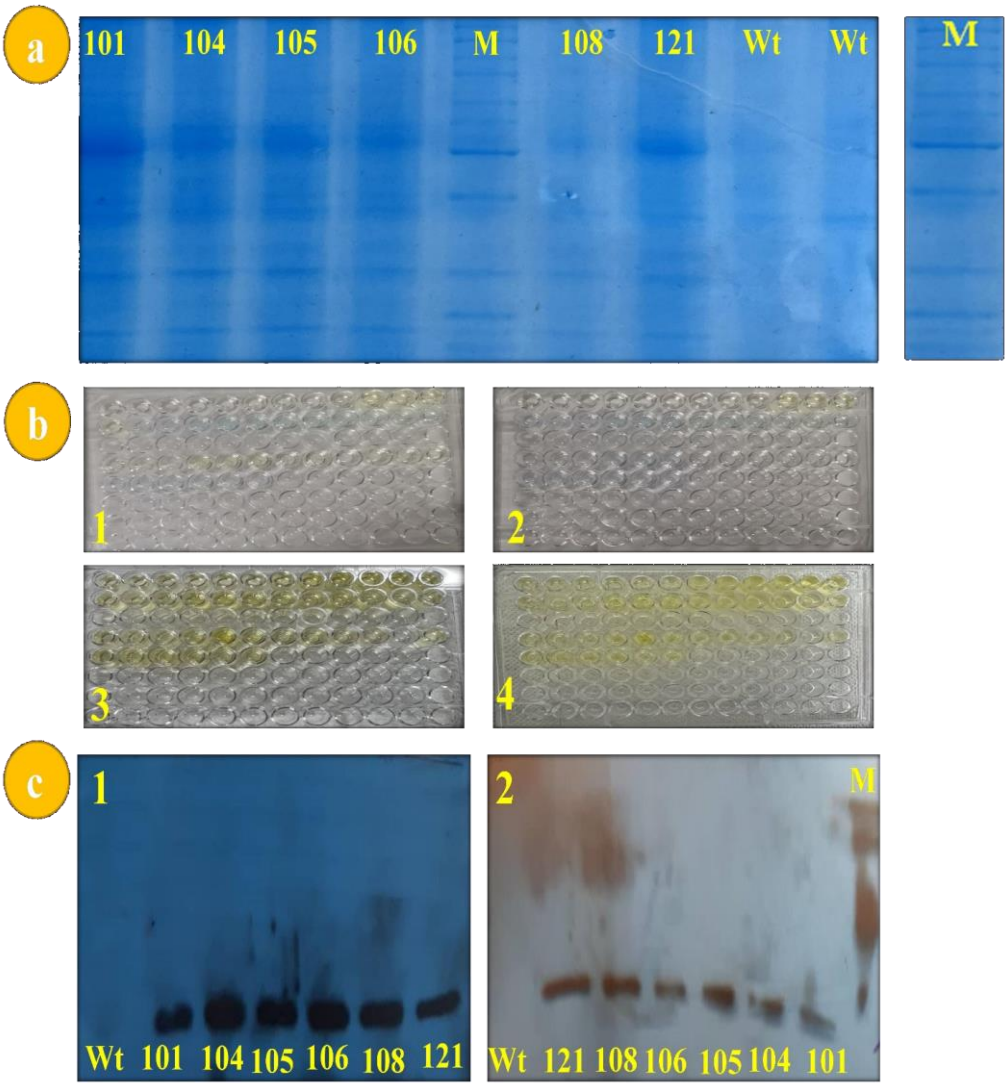
با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی CTB-EX4 در شرایط احیا، بوسیله‌ی دستگاه بلاتینگ، بعد از انتقال به غشا نیتروسلولزی اقدام به شناسایی پروتئین شد. در این آزمایش از سوبسترای به نسبت حساس ECL استفاده شد. در اتاق تاریک عکاسی با استفاده از X-ray باندهای پروتئین مورد رویت قرار گرفتند (شکل ۵). همچنین باندهای پروتئین CTB-EX4 روی کاغذنیتروسلولزی با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی در محدوه ۱۷ کیلو دالتون ظاهر گشتند (شکل ۵).

با توجه به نتایج حاصل از Blast p، مشاهده شد که پروتئینی مشابه پروتئین CTB-EX4 در گیاه کاهو وجود ندارد که توسط آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین CTB-EX4 شناسایی شود. بنابراین می‌توان گفت پروتئین مشاهده شده در گیاهان تراریخت همان پروتئین CTB-EX4 در این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه‌ای اکسندین-٤ متصل شده به CTB با روش بمباران ذره‌ای به کلروپلاست کاهو انتقال داده شد. ژن *CTB-EX4* بیان شده در کلروپلاست، سطح گلوکز خون را در موش کاهش داد و ترشح انسولین را در سلول‌های بتا TC-6 تحریک کرد. در این مطالعه کوون و همکاران (۲۰۱۳) به‌طور موفقیت‌آمیزی ژن *CTB-EX4* را درون ناقل انتقالی کلروپلاست قرار دادند. سپس انتقال ژن *CTB-EX4* توسط PCR و سادرن بلات تایید شد (Kwon *et al.*, 2013).

در پژوهشی دیگر، ژن *EX4* را با پروتئین ترانسفرین انسانی ترکیب کردند و سازه *EX4-Tf* را ایجاد کردند. پروتئین فیوژن *EX4-Tf* با ناقل pBI101.1-Ex-4-Tf توسط *A. tumefaciens* به برگ گیاه تنباکو انتقال داده شد. سپس انتقال *EX4-Tf* با روش PCR تأیید شد (Choi *et al.*, 2014).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]



شکل ٥- آنالیزهای انجام گرفته در سطح پروتئین. a) SDS-PAGE حاصل از پروتئین‌های استخراجی در گیاهان تراریخت و شاهد، چاهک‌های ١٠١، ١٠٤، ١٠٥، ١٠٦، ١٠٨ و ١٢١: گیاهان تراریخته، چاهک‌های Wt: گیاهان شاهد غیرتراریخت، چاهک M: نشانگر پروتئینی. b) تغییر رنگ چاهک‌های ELISA به ترتیب مراحل، انتقال پروتئین‌های استخراجی همراه با محلول پوشش‌دهنده به چاهک‌ها (1)، اضافه کردن بافر مسدود کننده و انکوبه کردن (2)، افزودن اسید سولفوریک ٢/٥ مولار (3-4). c) آزمون وسترن‌بلات، چاهک‌های ١٠١، ١٠٤، ١٠٥، ١٠٦، ١٠٨ و ١٢١: گیاهان تراریخته، چاهک‌های Wt: گیاهان شاهد غیرتراریخت، در شرایط احیا توسط آنتی‌بادی اختصاصی CTB-EX4 با روش کیت ECL (1). ظاهر شدن باندهای پروتئین CTB-EX4 روی کاغذ نیتروسلولزی (2).

Fig5. Analyzes performed at the protein level. a) SDS-PAGE of extracted proteins in transgenic and control plants, wells 101, 104, 105, 106, 108 and 121: transgenic plants, Wt wells: non-transgenic control plants, well M: protein marker. b) Changing the color of the ELISA wells in the order of the steps, transferring the extracted proteins together with the coating solution to the wells (1), adding blocking buffer and incubating (2), adding 2.5 M sulfuric acid (3-4). c) Western blot test, wells 101, 104, 105, 106, 108 and 121: transgenic plants, Wt wells: non-transgenic control plants, under conditions of recovery by specific antibody CTB-EX4 by ECL kit method (1). Appearance of CTB-EX4 protein bands on nitrocellulose paper (2).

در این تحقیق، برای اثبات حضور ژن *CTB-EX4* از گیاهان تراریخت DNA استخراج شد و با آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر واکنش PCR انجام گرفت. ژن *CTB-EX4* در تعدادی از رخدادهای نسل T_1 تراریخت تکثیر نشد که می‌توان گفت به‌دلیل عدم وجود ژن یا ممانعت کننده در DNA باشد. در این تحقیق، ٦ نوع بذر متفاوت نسل اول (T_1) در دسترس بود. از هر نوع بذر نسل اول (T_0) تعداد ٤ عدد بذر انتخاب و در نهایت، تعداد ٢٤ بذر متفاوت از بذرهای نسل اول گیاهان کاهوی تراریخته‌ی حاوی ژن *CTB-EX4* در گلدان‌های حاوی خاک رس و نسبت مناسب مواد مغذی کشت گردید. تعداد ١٠ گیاهچه نسل

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

اول (T_1) به‌طور کامل روییده شدند و همانند گیاهچه‌های شاهد رشد کردند و به مرحله گلدهی رسیدند و به بذر نشستند و از رخدادهای تایید شده که حاوی ژن مورد نظر بودند بذر تهیه شد.

نتایج تعیین تعداد نسخه به روش مطلق و تعیین تعداد نسخه به روش نسبی در مقایسه با ژن کنترل داخلی *Actin1* نشان داد که رخداد ۱۰۱ دارای بیشترین نسخه درج شده به مقدار ٦ نسخه و رخدادهای ۱۰٤ و ۱۰۵ داراری کم‌ترین نسخه درج شده به مقدار ۱ نسخه بودند. همچنین رخدادهای ۱۲۱، ۱۰٦ و ۱۰۸ به‌ترتیب دارای ۲، ۳ و ٤ نسخه بودند. نتایج تعیین تعداد نسخه‌های درج شده در ژنوم گیاهان کاهوی تراریخته در هر دو روش مطلق و نسبی تفاوت بسیار اندک با هم داشتند و تقریبا مشابه هم بودند. تفاوت در نتایج حاصل از تعیین تعداد نسخه‌ی ژن منتقل شده در رخدادهای مختلف گیاهی در نسل دوم گیاهان کاهوی تراریخته می‌تواند دلایل متفاوتی از جمله تفرق ژن *CTB-EX4* در طی ایجاد نسل دوم باشد. همچنین کراسینگ‌اور نیز می‌تواند باعث شکستگی و تفرق ژن‌ها گردد. گیاهان تراریخته تولید شده با استفاده آگروباکتریوم از لحاظ سطح بیان ژن‌های انتقال متفاوت هستند طوری که میزان این تفاوت بین ۱۰ تا ۵۰ برابر در بین افراد ترانسفورم شده در همان آزمایش تغییر می‌کند (Hobbs *et al.*, 1990). دلایل متنوعی برای این تفاوت بیان پیشنهاد می‌شود که هیچ کدام به‌طور کامل این پدیده را توضیح نمی‌دهد. تعداد کپی از T-DNA انتقالی یکی از مهمترین عوامل مطالعه شده می‌باشدکه همبستگی مثبت بین تعداد نسخه انتقالی و افزایش بیان وجود ندارد. حتی نشانه‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد نسخه‌های منفرد منجر به بیان بالاتر می‌شوند. علاوه بر تعداد کپی ترانسژن موقعیت ژن وارد شده درژنوم نیز روی بیان آن بسیار موثر است.

برخی از رخدادهای مورد مطالعه مانند رخدادهای ۱۰٤ و ۱۰۵ هر کدام دارای یک نسخه از ژن *CTB-EX4* را در ژنوم خود داشتند که حاکی از ادغام شدن ژن مورد مطالعه فقط در یک جایگاه در یک دست از کروموزوم‌های کاهو می‌باشد. می‌توان امیدوار بود که با تولید گیاهان هموزیگوت، بیان نسبتا پایداری را از ژن *CTB-EX4* در نسل‌های بعد شاهد باشیم.

رخداد ۱۲۱ دارای ۲ نسخه برآورد شده برای ژن *CTB-EX4* بود. به‌صورت قطع به یقین نمی‌توان در مورد چگونگی ادغام ژن در ژنوم گیاه نظری را ارائه کرد، اما احتمال دارد که ژن مد نظر وارد یک جایگاه شده ولی در ۲ کروموزوم همولوگ تکرار گردیده است.

نتایج بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در رخدادهای تراریخت مورد بررسی با استفاده از روش PCR نیمه‌کمی حاکی از بیان ژن مورد نظر در همه رخدادهای مورد بررسی بود به‌طوری که بیشترین میزان بیان مربوط به رخداد ۱۰۵ بود که تقریبا ۳۰ برابر بیشتر از رخداد ۱۰۱ با کمترین مقدار بیان بود (شکل ٤). بیان کمی ژن *CTB-EX4* در رخداد ۱۰۵ تقریبا ۳ برابر رخداد ۱۲۱ و تقریبا ٦ برابر رخدادهای ۱۰۱ و ۱۰٤ مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد تعداد بالای نسخه درج شده در رخداد ۱۰۱ باعث اثر بازخورد منفی و کاهش بیان در این رخداد شده باشد همچنین عواملی مانند خاموشی ژن و اثرات مکانی می‌توانند باعث عدم رونویسی در سطح RNA شوند. همچنین دلیل انتقال تصادفی ژن به‌وسیله آگروباکتریوم ممکن است ژن در ناحیه‌ی هتروکروماتین قرار بگیرد و یا اینکه ژن مورد نظر به‌صورت ناقص و شکسته به گیاه انتقال یابد و در نهایت بیان نگردد.

در آزمون‌های ELISA و وسترن‌بلات نیز بیان پروتئین CTB-EX4 مورد تایید قرار گرفت. به‌طوری که همه‌ی رخدادهای تراریخت شده قادر به تولید پروتئین مورد نظر بودند و فقط مقدار آن در رخدادهای مختلف با هم متفاوت بود. زیر واحد Bسم وبا خاصیت سمی ندارد و مسئول انتصال سم به گیرنده های سم موجود در غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان است. در آزمون ELISA نتایج بیانگر آن بود که رخداد ۱۰۵ بیشترین مقدار بیان پروتئین CTB-EX4 را نشان داد و رخداد ۱۲۱ کمترین بیان را به خود اختصاص داد و بیان رخداد ۱۰۵ تقریبا برابر با رخداد ۱۰۸ بود، همچنین بیان پروتئین در رخداد ۱۰۵ تقریبا ۱/۳ برابر رخداد ۱۰٤، ۱/٦ برابر رخداد ۱۰٦ و ۱/۷ برابر رخداد ۱۰۱ بود.

در گزارش‌های ارائه شده، اندازه‌ی پروتئین CTB-EX4 در محدوده‌ی ۱۷ کیلو دالتون تعریف شده است. در آزمون SDS-PAGE باند مورد نظر به‌صورت دقیق در این محدوده رویت شد

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

در صورتی که قطعه‌ی پروتئینی مورد نظر در گیاهان شاهد غیرتراریخت مشاهده نشد. همچنین باند پروتئین مورد نظر در آزمون وسترن‌بلات بر روی کاغذ نیتروسلولزی در این محدوده مشاهده گردید. با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی در سوبسترای کیت ECL در اتاق تاریک عکاسی باندهای اختصاصی پروتئین CTB-EX4 رویت گردیدند. عواملی از جمله تعداد نسخه‌های منتقل شده و جایگاه قرار گرفتن آنان در ژنوم، توالی‌های استفاده شده در وکتور و خاموشی RNA در میزان تولید پروتئین نقش دارند.

نتیجه گیری کلی

نتایج بررسی انتقال ژن *CTB-EX4* به گیاه کاهو با استفاده از PCR و همچنین بررسی های ریل تایم PCR برای تعیین تعداد نسخه ترانسژن وارد شده حاکی از انتقال ژن *CTB-EX4* توسط آگروباکتریوم وبیان ژن مورد نظر در سطح RNA و پروتئین موفقیت آمیز بود. رخداد ۱۰۵ با ۱ نسخه درج شده دارای بیشترین بیان هم درسطح RNA و هم در سطح پروتئین بود که می‌تواند حاکی از درج ژن در ناحیه یوکروماتینی باشد. رخداد ۱۰۱ با بیشترین تعداد نسخه درج شده داری کمترین مقدار بیان در سطوح RNA و پروتئین بود. به‌نظر می‌رسد انتقال تعداد نسخه های بالا از یک ژن می‌تواند دارای اثر بازخورد منفی روی بیان ژن مورد نظر و در نتیجه کاهش بیان آن باشد همچنین درج در محل نامناسب و انتقال ناقص یا T-DNA rearrangement نیز می‌تواند از سایر عوامل دخیل در بیان نشدن ژن خارجی درج شده باشد. گیاه کاهو به‌دلیل زیست‌توده بالا و مصرف بدون فرآوری می‌تواند برای استفاده به عنوان واکسن خوراکی گزینه مناسبی باشد. بیان پپتید CTB-EX4 در گیاه کاهو تراریخت حاکی از توانایی آن برای تولید پروتئین‌های خارجی است با اینحال بررسی تاثیر این پپتید نیازمند آزمایش‌هایی روی حیوانات آزمایشگاهی است.

سپاسگزاری

لازم است از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بابت تامین اعتبار طرح با کد 95849683 و امکانات لازم برای انجام کار سپاسگزاری شود. از آقای دکتر حسین هنری بابت تهیه آنتی بادی CTB-EX4 کمال تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن از خانم شهیدی کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان بابت کمک در اجرا، قدردانی می‌شود. این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد.

منابع

Akter, S., Afrin, S., Kim, J., Kang, J., Razzak, M. A., Berggren, P. O., & Hwang, I. (2022). Production of active Exendin-4 in *Nicotiana benthamiana* and its application in treatment of type-2 diabetics. Frontiers in plant science, 13, 1062658. doi.org/10.3389/fpls.2022.1062658.

Banerjee, S., Salunkhe, S. S., Apte-Deshpande, A. D., Mandi, N. S., Mandal, G., & Padmanabhan, S. (2009). Over-expression of proteins using a modified pBAD24 vector in *E. coli* expression system. Biotechnology letters, 31, 1031-1036. doi.org/10.1007/s10529-009-9976-6.

Choi, J., Diao, H., Feng, Z. C., Lau, A., Wang, R., Jevnikar, A. M., & Ma, S. (2014). A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. Plant biotechnology journal, 12(4), 425-435. doi.org/10.1111/pbi.12149.

Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in plant science, 6(5), 219-226. doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7.

Del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. Bioresource Technology, 280, 459-477. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040.

Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., De Capdeville, G., & Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from Flammulina sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to Sclerotinia sclerotiorum. Plant Pathology, 55(2), 187-193. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01342.x

Gao, S., & Wu, J. (2022). Detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) infection in plants using DAS-ELISA and dot-ELISA. Plant Virology: Methods and Protocols, 253-261. doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6_24.

Hobbs, S. L., Kpodar, P., & DeLong, C. M. (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. Plant molecular biology, 15, 851-864. doi:10.1007/bf00039425

He, X., Yang, J., Ji, M., Chen, Y., Chen, Y., Li, H., & Wang, H. (2022). A potential delivery system based on cholera toxin: A macromolecule carrier with multiple activities. Journal of

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

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]

Controlled Release, 343, 551-563. doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.050.

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in plant science, 7(5), 193-195. doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3.

King, M. R., Anderson, N. J., Deciu, M., Guernsey, L. S., Cundiff, M., Hajizadeh, S., & Jolivalt, C. G. (2020). Insulin deficiency, but not resistance, exaggerates cognitive deficits in transgenic mice expressing human amyloid and tau proteins. Reversal by Exendin-4 treatment. Journal of neuroscience research, 98(11), 2357-2369. doi.org/10.1002/jnr.24706.

Koh, R. B. L., Barbosa, C. F. C., Aquino, V. M., & Galvez, L. C. (2021). Extraction of high molecular weight DNA suitable for next-generation sequencing from the fiber crop abaca. Industrial Crops and Products, 161, 113194. doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113194.

Kokei, S., & Bahramnejad, B. (2020). Transient Expression of CTB-Exendin Fused Genes in *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens.* Journal of Agricultural Science and Technology, 22(6), 1603-1612. doi.org/20.1001.1.16807073.2020.22.6.1.7.

Kolb, H., & Burkart, V. (2019). Chaperones may cause the focus of diabetes autoimmunity on distinct (pro) insulin peptides. Journal of Autoimmunity, 105, 102304. doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102304.

Kumar, R., Angelini, S., & Hemminki, K. (2003). Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. Oncogene, 22(58), 9217-9224. doi.org/10.1038/sj.onc.1206909.

Kwon, K. C., Nityanandam, R., New, J. S., & Daniell, H. (2013). Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC 6 cells. Plant biotechnology journal, 11(1), 77-86. doi.org/10.1111/pbi.12008.

Kwon, K. C., Sherman, A., Chang, W. J., Kamesh, A., Biswas, M., Herzog, R. W., & Daniell, H. (2018). Expression and assembly of largest foreign protein in chloroplasts: oral delivery of human FVIII made in lettuce chloroplasts robustly suppresses inhibitor formation in haemophilia A mice. Plant biotechnology journal, 16(6), 1148-1160. doi.org/10.1111/pbi.12859.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25(4), 402-408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

McCabe, M. S., Garratt, L. C., Schepers, F., Jordi, W. J., Stoopen, G. M., Davelaar, E., ... & Davey, M. R. (2001). Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. Plant Physiology, 127(2), 505-516. doi.org/10.1104/pp.010244.

Zandinava, N., Bahramnejad, B., & Salehi, H. (2024). Specific expression of exendin-4 gene fused to cholera B toxin subunit (CTB) in carrot root (*Daucus carota* L.) under regulation of MLL promoter. Agricultural Biotechnology Journal, 16(1), 87-114. doi: 10.22103/jab.2023.21290.1473

Patil, S. T., Kadam, U. S., Mane, M. S., Mahale, D. M., & Dhekale, J. S. (2020). Hydroponic growth media (substrate): a review. International Research Journal of Pure and Applied Chemistry, 21(23), 106-113. doi.org/10.9734/IRJPAC/2020/v21i2330307.

Pepe, M., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). Machine learning-mediated development and optimization of disinfection protocol and scarification method for improved in vitro germination of cannabis seeds. Plants, 10(11), 2397. doi.org/10.3390/plants10112397

Pérez-Martínez, L., Öztürk, M., Butter, F., & Luke, B. (2020). Npl3 stabilizes R-loops at telomeres to prevent accelerated replicative senescence. EMBO reports, 21(3), e49087. doi.org/10.15252/embr.201949087.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic acids research, 29(9), e45-e45. doi.org/10.1093/nar/29.9.e45.

Riva, V., Patania, G., Riva, F., Vergani, L., Crotti, E., & Mapelli, F. (2022). Acinetobacter baylyi strain BD413 can acquire an antibiotic resistance gene by natural transformation on lettuce phylloplane and enter the endosphere. Antibiotics, 11(9), 1231. doi.org/10.3390/antibiotics11091231.

Rukavtsova, E. B., Abramikhina, T. V., Shulga, N. Y., Bykov, V. A., & Bur'yanov, Y. I. (2007). Tissue specific expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic plant cells and tissue culture. Russian Journal of Plant Physiology, 54, 770-775. doi.org/10.1134/S1021443707060088.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1), pdb-prot3932. doi:10.1101/pdb.prot3932.

Sharma, S., Gautam, N., Thakur, A. K., & Srivastava, D. K. (2023). Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) harboring chitinase gene expressed resistance against a devastating fungus, Sclerotinia sclerotiorum. Vegetos, 36(4), 1265-1274. doi.org/10.1007/s42535-022-00519-8.

Tellmann, G., & Geulen, O. (2006). LightCycler® 480 Real-Time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. BIOCHEMICA-MANNHEIM-, 4, 16.

Torres, A. C., Cantliffe, D. J., Laughner, B., Bienick, M., Nagata, R., Ashraf, M., & Ferl, R. J. (1993). Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34, 279-285. doi.org/10.1007/BF00029717.

Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2002). Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. Plant cell, tissue and organ culture, 68, 103-104. doi.org/10.1023/A:1012966218478.

Yang, G., Cao, B., Yang, Y., Geng, Y., Lin, H., Jiang, J., ... & Li, J. (2020). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of JY09 in healthy Chinese subjects: A titrating, dose-escalating study. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 58(11), 608. doi.org/10.5414/cp203730.

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

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.168]