



بررسی استفاده از ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV) برای بیان
پروتئین‌های نوترکیب در گیاه *Nicotiana benthamiana*

Investigation of Use of Tobacco Rattles Virus (TRV) to
Express the Recombinant Proteins in *Nicotiana
benthamiana*

فائزه نقاده^۱، فاطمه ذاکر تولایی^{۲*}، سید علی حسینی تفرشی^{۳*}

Faezeh Naghadeh¹, Fatemeh Zaker-Tavallaie^{2*}, Seyyed-Ali Hosseini-Tafreshi³

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی،
دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد، ایران ۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه
کاشان. ایران

1. MSc. student, 2. Associate Professor, Dept. of Plant Production and Genetics
Engineering, Shirvan Agriculture Faculty, University of Bojnord, Iran.
3. Associate Professor, Dept. of Biotechnology, collage of chemistry, University of
Kashan. Kashan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *

f.zaker@ub.ac.ir and sahosseini@kashanu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۹/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۹ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۳۰)

Received: 2025/12/13 | Accepted: 2026/01/19 | Published: 2026/1/20

Abstract

The objective of this study was the investigation of efficiency of Tobacco rattle virus to express recombinant proteins in *N. benthamiana*. In the first step we produced a shorter version of the main vector. After addition of promotor and coding sequence for GFP protein to both vectors, they were introduced into two strains of *Agrobacterium* including LBA4404 and GV3101 and were inoculated leaves of 4 to 6 weeks tobacco by them. At different times after inoculation, inoculated plants were photographed to determine the expression of GFP protein under UV irradiation. The parameters of the effect of type and size of vector, bacterial type and time effect on the percentage of green fluorescent areas resulting from the expression of GFP protein were investigated. In 6-week-old plants that were injected with GPSpTRV2 (shortened) using LBA4404 strain was observed the maximum amount of green leaf area GFP, which is approximately 1.6 times the area of the green section was treated with the vector GPpTRV2 (not shortened) on the twentieth day after injection. In the 4-week-old plants fed with LBA4404 strain, the maximum number of green areas in GPSpTRV2-containing plants was obtained on the 15th day, which is 1.4 times the maximum green area in GPpTRV2-containing plants in the same day. In 6-week-old plants, average area of green parts in the plants injected with both LBA4404 and GV3101 strains was approximately equal. Also, the level of plant leaf greens, which could indicate the expression of GFP, was time dependent and fluctuated in the days after inoculation.

Key words: Transient expression, recombinant protein, Tobacco, Reporter gene, Tobacco Rattle virus (TRV)

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Naghadeh F, Zaker Tavallaie F, Hosseini Tafreshi S A. (2026). Investigation of use of tobacco rattles virus (TRV) to express the recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 199-216. Doi: [10.61882/gebsj.14.2.5](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.2.5)

URL: <http://gebsj.ir/article-1-540-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

این پژوهش با هدف بررسی کارایی ویروس جغجغه ای تنباکو برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاه تنباکو انجام شد. ابتدا یک نسخه کوتاهتر از ناقل اصلی تولید شد. پس از افزودن پیشبر و توالی کد کننده پروتئین GFP به هر دو ناقل، آنها به دو سویه LBA4404 و GV3101 از اگروباکتریوم وارد شده و سپس به برگ گیاهان ۴ یا ۶ هفته‌ای تنباکو تلقیح شدند. در زمان‌های مختلف پس از تلقیح، بیان پروتئین GFP تحت تابش UV در گیاهان تلقیح شده بررسی شد. پارامترهای نوع و اندازه ناقل، نوع باکتری و اثر زمان روی درصد سطح سبز برگ ناشی از بیان پروتئین GFP بررسی شد. در گیاهان ۶ هفته‌ای دارای ناقل GPSpTRV2 (کوتاه شده) با سویه LBA4404 بیشترین میزان مساحت بخش‌های سبز GFP برگ مشاهده شد که این میزان ۱/۶ برابر مساحت بخش سبز در تیمار با ناقل GpPTRV2 (کوتاه نشده) در روز بیستم پس از تزریق بود. در گیاهان ۴ هفته‌ای با سویه LBA4404، حداکثر میزان مساحت بخش‌های سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2، روز پانزدهم بدست آمد که ۱/۴ برابر مساحت بخش‌های سبز در تیمارهای دارای ناقل GpPTRV2 در این روز بود. در گیاهان ۶ هفته‌ای، میزان متوسط مساحت بخش‌های سبز در گیاهانی که با هر دو سویه LBA4404 و GV3101 تزریق شده بودند تقریباً برابر بود. نتایج نشان داد که میزان بیان GFP وابسته به زمان بوده و در روزهای پس از تلقیح دچار نوسان می‌شود. نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌تواند راه را برای استفاده از این ویروس به عنوان وکتور بیانی پروتئین‌های نوترکیب هموار سازد.

واژه‌های کلیدی: بیان موقت، پروتئین نوترکیب، تنباکو، ژن گزارشگر، ویروس جغجغه‌ای تنباکو (TRV).

مقدمه

Introduction

در سال‌های اخیر، گیاهان به‌ویژه تنباکو *Nicotiana benthamiana* به‌عنوان سامانه‌های زیستی کارآمد برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی و صنعتی مطرح شده‌اند، زیرا امکان کشت در مقیاس بالا، ایمنی زیستی مناسب و هزینه تولید نسبتاً پایین را فراهم می‌کنند. گیاه *N. benthamiana* به‌طور خاص به دلیل حساسیت بالا به عفونت ویروسی، کارایی بالای تراریختی موقت و در دسترس بودن ابزارهای ژنتیکی متنوع، به یکی از پلتفرم‌های اصلی کشاورزی مولکولی تبدیل شده است (Rybicki, 2019; Peyret & Lomonossoff, 2015). ویروس جغجغه‌ای تنباکو (Tobacco rattle virus; TRV) یک عضو از گروه Tobravirus و خانواده Virgaviridae و میله‌ای شکل می‌باشد. این ویروس، دارای یک ژنوم دو بخشی RNA با دامنه میزبانی نسبتاً وسیع است که می‌تواند به‌صورت سیستمیک در *N. benthamiana* گسترش یابد و همین ویژگی آن را برای انتقال کارایی کاست‌های بیانی نوترکیب مناسب می‌سازد (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). ناقل TRV به عنوان یک ابزار قدرتمند برای خاموش‌سازی ژن به روش القایی توسط ویروس (VIGS: Virus Induced Gene Silencing) می‌باشد و نسبت به دیگر ناقل‌ها در ایجاد علائم خاموش‌سازی موفق تر بوده است (Tian et al., 2013). این ویروس همچنین برای بیان موقت ژن‌های خارجی و تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌کار گرفته شده است (Burch-Smith et al., 2004; Liu et al., 2002). طیف میزبانی، میزان آلوده‌کنندگی، نحوه و میزان حرکت یک ناقل در گیاه از عوامل کلیدی در ارزیابی آن به شمار می‌رود. ناقلین ساخته شده بر اساس TRV از این نظر دارای مزیت‌های قابل ملاحظه‌ای هستند. این ناقل‌ها به طور وسیع در انجام خاموش‌سازی در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی مانند: آرابیدوبسیس، گوجه‌فرنگی، فلفل دلمه‌ای و خشخاش استفاده شده‌اند (Wang et al., 2006; Liu et al., 2002; Hileman et al., 2005; Chung et al., 2004). بیان پایدار ژن با تولید گیاهان تراریخته امکان‌پذیر است و در آن ورود ژن هدف به ژنوم هسته یا پلاستیدهای گیاه میزبان انجام می‌شود که کاری دشوار و زمان‌بر بوده و امکان خاموشی یا حذف تراژن از ژنوم نیز وجود دارد. یکی از راه‌های جایگزین، استفاده از روش

بیان موقت است. بیان موقت روشی ارزشمند در زیست فناوری گیاهی است که برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می باشد. در این روش، هدف تولید لاین تراریخته پایدار نیست، بلکه ناقل های ژن (مانند ناقل های ویروسی) استفاده می شود که بتوانند ژن پروتئین مورد نظر را تنها در سیتوزول بیان نمایند (Pogue et al., 2010). استفاده از سامانه های TRV مبتنی بر *N. benthamiana* این امکان را فراهم می کند که پروتئین های نو ترکیب در کل گیاه و در مدت زمان کوتاه، بدون نیاز به ایجاد لاین های تراریخت پایدار تولید شوند؛ به ویژه برای غربالگری سریع سازه های ژنی، تولید آنتی بادی های مونوکلونال و پروتئین های واکسن کاندید اهمیت دارد (Tian et al., 2014; Pogue et al., 2010). تلاش های اخیر برای مهندسی ژنوم TRV و بهینه سازی پاسخ میزبان نشان داده است که می توان پایداری درج ژن خارجی، بیان هم زمان چند پروتئین و نیز بازده تولید پروتئین نو ترکیب را در این سامانه به طور چشمگیری بهبود داد (Zhang et al., 2022).

هدف از این پژوهش ساخت و اصلاح ناقل ویروسی نو ترکیب TRV با اضافه کردن ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP: Green Flurescent Protein) به آن، بررسی کارایی ناقل ویروسی TRV و بیان پروتئین GFP در برگ های گیاه تنباکو بود. همچنین در این تحقیق دو نوع ناقل TRV با اندازه متفاوت ساخته شده و باهم مقایسه شده است. همچنین در این تحقیق استفاده از سویه های مختلف آگروباکتریوم برای سنجش کارایی استفاده از آن ها در حمل ناقلین TRV برای بیان پروتئین و رصد مقدماتی زمان با بیشترین بیان بررسی شد.

مواد و روش ها

Materials and Methods

فرآیند کوتاه سازی ناقل (TRV2) YL156 و ساخت ناقل نو ترکیب SpTRV2: در این بخش از پژوهش، کوتاه سازی ناقل TRV2 (با نام اصلی YL156) به منظور افزایش کارایی انتقال در میزبان گیاهی انجام شد. ناقل YL156 دارای طول ۹۶۶۳ نوکلئوتید است که توالی آن از NCBI دریافت شد. با استفاده از نرم افزار Genome Compiler، طراحی به گونه ای انجام شد که یک قطعه ۲۴۱۵ نوکلئوتیدی از ناقل خارج شده و با یک قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی جایگزین شود. در نهایت طول ناقل کوتاه شده به ۹۳۵۷ نوکلئوتید رسید. مشخصات آغازگر رفت با نام FPst2 و دمای اتصال ۷۰ درجه سانتی گراد و آغازگر برگشت با نام RPsht2 و دمای اتصال ۶۹ درجه سانتی گراد با استفاده از نرم افزارهای PrimerQuest و OligoAnalyzer ارزیابی شد. جایگاه های برش آنزیمی HindIII (برای آغازگر رفت) و EcoRI (برای آغازگر برگشت) به توالی ها اضافه شد. برای تکثیر قطعه مورد نظر از روی ناقل pTRV2، از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. در واکنش PCR از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* استفاده شد که دارای خاصیت اصلاح کنندگی (Proofreading) است تا از بروز خطا در توالی یابی جلوگیری شود. مخلوط واکنش شامل بافر Pfu، dNTP mix، MgCl₂، آغازگرها و DNA الگو بود. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه)، ۳۰ چرخه اصلی (واسرشت سازی: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛ اتصال: ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ طول شدن: ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه) و یک مرحله طول شدن نهایی (۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه) بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با Green Viewer، باند ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی مشاهده شد.

تخلیص و آماده سازی قطعات: قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی از روی ژل جدا و با استفاده از کیت Vivantis (GF-1) خالص سازی شد. جهت تهیه سلول های مستعد باکتری *E. coli*، سویه DH5a این باکتری در محیط LB کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم نوری (OD₆₀₀) مطلوب (۰/۴ تا ۰/۶)، با استفاده از محلول CaCl₂ سرد (۰/۱ مولار) تیمار شد تا دیواره سلولی برای پذیرش DNA نفوذ پذیر شود. سلول ها در نهایت در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره شدند. هر دو پلاسمید اصلی (pTRV2) و قطعه PCR خالص شده (۲۱۰۹ نوکلئوتیدی) با استفاده از دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* (شرکت Takara) تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند تا انتهای چسبنده برای اتصال ایجاد شود. واکنش در بافر

(10X) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سپس برای توقف واکنش، نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از الکتروپورز محصولات هضم، باند بزرگتر ناقل pTRV2 (به طول ۷۲۴۸ نوکلئوتید) و قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی از ژل بریده و دوباره با کیت GF-1 خالص‌سازی شدند.

واکنش اتصال (Ligation): برای اتصال قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی به بدنه اصلی ناقل هضم شده، از آنزیم *T4 DNA Ligase* استفاده شد. پس از بررسی دستیابی به بهترین بازده اتصال، سه نسبت مولی مختلف از قطعه به ناقل (۱:۱، ۱:۱ و ۱:۱۰)، مقادیر مورد نیاز با استفاده از فرمول محاسبه شد. جهت انجام اتصال، ابتدا مخلوط واکنش (بدون آنزیم) به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد حرارت دید و سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت (برای باز شدن ساختارهای ثانویه). پس از افزودن آنزیم لیگاز، نمونه‌ها به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ترانسفورماسیون و غربالگری و استخراج پلاسمید نو ترکیب: محصول واکنش اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E.coli* (DH5a) منتقل شد. باکتری‌ها روی محیط LB جامد دارای ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین کشت داده شدند. تنها باکتری‌های دارای پلاسمید (مقاوم به کانامایسین) قادر به رشد بودند. جهت انجام غربالگری ابتدا از کلونی‌های رشد کرده به عنوان الگو برای PCR با همان آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. مشاهده باند مورد نظر روی ژل، حضور پلاسمید نو ترکیب را تایید کرد. پلاسمید از کلونی‌های مثبت استخراج شد و دوباره با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* هضم شد تا صحت اندازه قطعات تایید شود. پس از تایید نهایی کلونی‌ها، باکتری‌های منتخب در محیط مایع LB کشت داده شدند. پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت HiYield Plasmid Mini Kit (شرکت RBC) استخراج شد. این ناقل جدید و کوتاه‌شده، SpTRV2 نام‌گذاری شد و آماده استفاده برای مراحل بعدی پژوهش شد.

ساخت ناقل‌های نو ترکیب PpTRV2 و PSpTRV2 دارای پیشبر *Pebv*: هدف این مرحله از پژوهش، اتصال ژن پیشبر *Pebv* به دو ناقل *pTRV2* (نسخه اصلی) و *SpTRV2* (نسخه کوتاه‌شده در مرحله قبل) بود. این پیشبر از پلاسمید *Pcap2_GFP* گرفته شده بود که از دانشگاه آره‌اوس دانمارک تهیه شد. ابتدا جهت جداسازی و تکثیر پیشبر *Pebv*، با استفاده از نرم‌افزار *Genome Compiler*، آغازگرهای لازم طراحی شد. ناقل *pTRV2* و *SpTRV2* به عنوان بدنه اصلی (Backbone) و توالی پیشبر *Pebv* به عنوان قطعه الحاقی در نظر گرفته شدند. جهت برش آنزیمی، جایگاه‌های برش دو آنزیم *EcoRI* و *XbaI* انتخاب شدند. آغازگرهای طراحی شده با نرم‌افزارهای *PrimerQuest* و *OligoAnalyzer* ارزیابی شدند. مشخصات آغازگرها به صورت آغازگر رفت (FPEV) با طول ۳۲ نوکلئوتید و دمای ذوب ۷۰ درجه سانتی‌گراد و آغازگر برگشت (RPEV) با طول ۳۵ نوکلئوتید و دمای ذوب ۶۸ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی پیشبر با استفاده از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* انجام شد. ترکیبات واکنش شامل بافر *Pfu*، مخلوط dNTP، کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، آغازگرهای رفت و برگشت و DNA الگو (*Pcap-fp*) بود. برنامه دمایی به صورت زیر تنظیم شد: واسرشت‌سازی اولیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، چرخه‌های اصلی (۴۰ تکرار)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. طولی شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروپورز شد و پس از تایید حضور باند ۱۸۲ نوکلئوتیدی، کل محصول با استفاده از کیت *Vivantis (GF-I)* از روی ژل تخلیص شد. صحت خالص‌سازی با الکتروپورز مجدد ۵ میکرولیتر از نمونه تایید شد. قطعه ۱۸۲ جفت بازی مربوط به پیشبر *Pebv* از روی ژل آگارز با استفاده از اسکالپل جدا و سپس با کیت GF-1 شرکت *Vivantis* خالص‌سازی شد. صحت خالص‌سازی با الکتروپورز مجدد تأیید شد. غلظت قطعه خالص‌شده و همچنین ناقل‌های برش‌خورده *pTRV2* و *SpTRV2* با مقایسه شدت باندهای مربوطه در مقابل سایز مارکر DNA/*EcoRI*+*HindIII* تعیین شد. بر اساس این غلظت‌ها، واکنش الحاق با نسبت‌های مولی ۱:۱ و ۲:۱ (ناقل به قطعه الحاقی) انجام و سازه‌های نو ترکیب به باکتری منتقل شدند. کلونی‌های رشد یافته روی محیط کشت دارای کانامایسین شماره‌گذاری شده و با استفاده از PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه الحاقی تأیید شد.

پس از تایید الحاق پیشبر *Pebv* به هر دو ناقل با استفاده از الکتروفورز، ناقل‌های نهایی حاصل از این فرآیند، به ترتیب به نام‌های PpTRV2 و PSpTRV2 نام‌گذاری شدند.

همسانه‌سازی ژن GFP و ساخت ناقل‌های نهایی PpTRV2 و GPSpTRV2: در این قسمت پژوهش، هدف انتقال ژن گزارشگر *GFP* (پروتئین فلورسنت سبز) به درون دو ناقل نو ترکیب ساخته شده در مراحل قبل، یعنی PpTRV2 (ناقل بومی دارای پیشبر) و PSpTRV2 (ناقل کوتاه‌شده دارای پیشبر) است. منبع تامین‌کننده ژن *GFP* در این آزمایش، پلاسمید *Pcap2_GFP* بود. با استفاده از نرم‌افزار *Genome Compiler*، شبیه‌سازی برش دو ناقل *PpTRV2* و *PSpTRV2* توسط آنزیم‌های *XbaI* و *KpnI* (محصول شرکت Takara) انجام شد. سپس قطعه الحاقی که همان ژن *GFP* بود، در نرم‌افزار انتخاب شد. جهت تکثیر اختصاصی ناحیه *GFP*، آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شدند. مشخصات آغازگرهای نهایی به شرح زیر است: آغازگر رفت (FPEGV)، با طول ۳۲ نوکلئوتید، دمای ذوب ۶۷ درجه سانتی‌گراد و ۴۳ درصد GC و آغازگر برگشت (RPEGV)، با طول ۳۳ نوکلئوتید، دمای ذوب ۷۱ درجه سانتی‌گراد و ۵۱ درصد GC. برای تکثیر قطعه ۷۰۶ نوکلئوتیدی ژن *GFP*، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* استفاده شد. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل موارد زیر بود: بافر PFU 10X به میزان ۲/۵ میکرولیتر، مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) ۱ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) ۱ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) ۱ میکرولیتر، آنزیم *Pfu DNA Polymerase* (۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر، DNA الگو (GFP-pCap2) ۱ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۷/۳ میکرولیتر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD) با برنامه زمان‌بندی واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، چرخه‌های اصلی (۳۵ تکرار) شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و طویل‌شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه اجرا شد. پس از اتمام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر صحیح قطعه ۷۰۶ نوکلئوتیدی *GFP*، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی و مشاهده باند مورد نظر با دستگاه ژل داک، باقیمانده محصول PCR نیز الکتروفورز شد. سپس باند مربوط به ژن *GFP* با اسکالپل استریل از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت ویوانتیس (GF-1) خالص‌سازی شد. جهت تایید نهایی کیفیت خالص‌سازی، دوباره ۵ میکرولیتر از محصول خالص‌شده روی ژل برده شد و پس از تایید حضور باند ۷۰۶ نوکلئوتیدی، نمونه‌ها در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در این مرحله، برای ایجاد انتهای چسبنده جهت اتصال، هر سه جزء پلاسمید *PpTRV2*، پلاسمید *PSpTRV2* و قطعه خالص‌شده *GFP* با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *KpnI* تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. ترکیبات واکنش‌های هضم برای پلاسمیدهای PpTRV2 و PSpTRV2 شامل ۱ میکروگرم پلاسمید، ۲ میکرولیتر از هر آنزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) و برای قطعه *GFP*، ۱ میکروگرم قطعه خالص‌شده، ۲ میکرولیتر از هر آنزیم، ۵ میکرولیتر بافر و ۲۱ میکرولیتر آب مقطر (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر) بود. پس از انجام واکنش هضم، کل محتویات تیوب‌ها با بافر بارگذاری مخلوط شده و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. باند پلاسمیدهای برش‌خورده (خطی شده) و باند *GFP* هضم شده با اسکالپل جدا شدند. استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت GF-1 (ویوانتیس) انجام شد. صحت خالص‌سازی با الکتروفورز ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها تایید شد. و محصولات در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام واکنش اتصال، ابتدا غلظت دقیق محصولات خالص‌سازی شده (ناقل‌ها و قطعه *GFP*) با استفاده از لدر وزنی روی ژل تخمین زده شد. سپس با استفاده از معادله زیر، مقدار مورد نیاز از قطعه *GFP* برای اتصال به مقدار ثابت ۲۵ نانوگرم از هر ناقل محاسبه شد.

$$ng\ of\ insert = \frac{ng\ of\ vector \times kb\ size\ of\ insert}{kb\ size\ of\ vector} \times \frac{insert}{vector}$$

مقدار اندازه ژنوم‌ها برای محاسبه‌ها به شرح زیر در نظر گرفته شد. ناقل *PpTRV2* حدود ۹/۸ کیلوباز (kb)، ناقل *PSpTRV2* حدود ۹/۵ کیلوباز (kb)، و قطعه *GFP* حدود ۰/۷ کیلوباز (kb). برای دستیابی به حداکثر کارایی اتصال، سه نسبت مولی مختلف از "قطعه به ناقل" شامل نسبت ۳:۱، نسبت ۱:۱، نسبت ۱۰:۱ بررسی شد. برای انجام واکنش اتصال، از آنزیم *T4 DNA Ligase* استفاده شد. مراحل انجام واکنش به شرح زیر بود. مخلوط واکنش (بدون آنزیم لیگاز) به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. آنزیم *T4 DNA Ligase* به تیوب‌ها اضافه شد. واکنش به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر نگهداری شد. ناقل‌های نهایی حاصل از این فرآیند دارای ژن *GFP*، به ترتیب *GpPpTRV2* و *GPSpTRV2* نام‌گذاری شدند.

انتقال به باکتری، غربالگری کلونی‌ها و تایید نهایی: ناقل‌های نوترکیب حاصل از واکنش اتصال، به باکتری‌های مستعد *E. coli* سویه DH5a منتقل شدند. جهت انجام این کار ۵ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ۱۵۰ میکرولیتر سلول مستعد اضافه شد. باکتری‌های تیمار شده روی محیط کشت LB جامد دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ µg/ml) کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری دارای ناقل بسته (بدون برش) به عنوان کنترل مثبت و باکتری مستعد بدون DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ظاهر شدن کلونی‌ها روی محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک، کلونی‌های مشکوک به داشتن پلاسمید نوترکیب شماره‌گذاری شدند. برای تایید حضور قطعه *GFP* از دو روش استفاده شد. در روش اول، PCR کلونی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی FPEGV با توالی 5'CTAGTCTAGAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAC3' به عنوان آغازگر رفت و آغازگر RPEGV با توالی 3'CGCGGTACCTTATTTGTAGAGGCTCATCCATGCC 5' به عنوان آغازگر برگشت انجام شد. واکنش PCR روی بخش کوچکی از کلونی باکتری با برنامه دمایی مشابه روش تکثیر این قطعه در مراحل قبلی، انجام شد. مشاهده باند ۷۰۶ نوکلئوتیدی روی ژل آگارز، کلونی‌های مثبت را مشخص کرد. روش دوم هضم آنزیمی تاییدی بود. در این روش پلاسمید از کلونی‌های مثبت استخراج شد و دوباره توسط آنزیم‌های *XbaI* و *KpnI* برش داده شد. مشاهده قطعات با اندازه مورد انتظار روی ژل، صحت ساختار ناقل‌های *GpPpTRV2* و *GPSpTRV2* را تایید نهایی کرد. در مرحله نهایی، از کلونی‌های تایید شده برای کشت مایع استفاده شد. کلونی‌ها به محیط کشت مایع LB دارای کانامایسین منتقل شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور رشد داده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت HiYield™ Plasmid Mini Kit شرکت RBC انجام شد. ناقل‌های نهایی دارای پیشبر و ژن *GFP* با نام‌های *GpPpTRV2* و *GPSpTRV2* نام‌گذاری شده و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

انتقال ناقل‌های *GpPpTRV2* و *GPSpTRV2* به اگر وباکتریوم: در این پژوهش، از دو سویه باکتری *Agrobacterium tumefaciens* شامل GV3101 و LBA4404 استفاده شد. جهت تهیه سلول مستعد، باکتری‌ها ابتدا در محیط کشت مایع LB دارای آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت داده شدند تا جذب نوری (OD₆₀₀) آن‌ها به ۰/۵ تا ۱ برسد. سپس باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و پس از شستشو، در محلول سرد کلرید کلسیم (CaCl₂) با غلظت ۲۰ میلی‌مولار به صورت سوسپانسیون درآمدند. برای انتقال ناقل‌های نوترکیب به اگر وباکتریوم، از روش ذوب و انجماد استفاده شد. پلاسمیدها به سلول‌های مستعد یخ‌زده اضافه شده و سپس تحت شوک حرارتی قرار گرفتند. سپس، محیط LB مایع به باکتری‌ها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند. سپس باکتری‌ها روی محیط کشت جامد دارای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین کشت داده شدند تا کلونی‌های ترانسفورم شده طی ۴۸ ساعت ظاهر شوند. برای اطمینان از ورود صحیح ناقل‌های نوترکیب به باکتری، از روش PCR کلونی استفاده شد. از آغازگرهای اختصاصی برای تایید حضور ناقل‌های pTRV1 (باند مورد انتظار ۹۳۸ جفت‌باز) و pTRV2 (باند مورد انتظار ۱۳۴ جفت‌باز) استفاده شد.

کشت و آماده‌سازی گیاه توتون یا تنباکو (*N. benthamiana*): بذرهای تنباکو در سینی‌های پلی‌استایرن دارای پیت‌ماس در اتاق کشت با شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کاشته شدند. روی سینی‌ها تا

زمان جوانه زنی با سلفون پوشانده شد. پس از رشد، گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگتر منتقل و با کود NPK تغذیه شدند. دو گروه شامل گیاهان ۴ تا ۵ هفته‌ای و گیاهان ۶ تا ۷ هفته‌ای برای تزریق آماده شدند.

تزریق اگروباکتریوم دارای ژن گزارشگر به گیاه: برای آماده‌سازی اگروباکتریوم‌ها جهت تزریق به برگ، از روش اصلاح‌شده و لاسکوئز (Velasquez *et al.*, 2009) استفاده شد. کلونی‌های تایید شده در محیط LB کشت شبانه داده شدند. سپس به محیط کشت القا دارای آنتی بیوتیک‌های کانامایسین ($50 \mu\text{g/ml}$)، ریفامپیسین ($100 \mu\text{g/ml}$) و استوسرینگون (200 mg/lit) منتقل شدند تا ژن‌های بیماری‌زایی باکتری فعال شوند. پس از رشد ۲۰ تا ۲۴ ساعته، باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و رسوب آن‌ها با بافر دارای MES و MgCl_2 شستشو داده شد. در نهایت، رسوب باکتری در بافر تلقیح حل شد و جذب نوری (OD_{600}) تمام نمونه‌ها روی عدد 0.3 تنظیم شد. بعد از آن، سوسپانسیون‌های باکتریایی دارای ناقل‌های نو ترکیب (pTRV2) با سوسپانسیون دارای ناقل کمکی (pTRV1) به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. در مجموع ۷ تیمار (T1 تا T7) طراحی شد. تیمار T1 (شاهد) دارای بافر تلقیح بدون باکتری، تیمارهای T2 و T3 (کنترل منفی) ناقل‌های خالی بدون ژن GFP در دو سویه GV3101 و LBA4404 و تیمارهای T4 تا T7 (تیمارهای اصلی) ناقل‌های نو ترکیب دارای GFP (نسخه بومی و کوتاه شده) در هر دو سویه باکتری بودند. مخلوط باکتریایی با استفاده از سرنگ بدون سوزن به سطح زیرین برگ گیاهان تنباکو تزریق شد. برای جلوگیری از آلودگی، پس از هر تیمار سرنگ و دستکش‌ها تعویض می‌شدند.

عکس‌برداری و تجزیه و تحلیل آماری: پس از تزریق، گیاهان به اتاق کشت بازگردانده شدند. برای بررسی بیان ژن GFP، از برگ گیاهان در روزهای ۹، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ پس از تزریق با دستگاه UV عکس‌برداری شد. مساحت بخش‌های سبز (نشان‌دهنده بیان GFP) با استفاده از نرم‌افزار Image J محاسبه شد. تحلیل‌های آماری و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزارهای SPSS (نسخه ۱۹)، Excel و GraphPad Prism 6 انجام شد.

نتایج و بحث

Results and Discussion

کوتاه‌سازی ناقل (TRV2) YL156 و ساخت ناقل نو ترکیب SpTRV2

در این پژوهش، استراتژی مولکولی به این صورت بود که یک قطعه ۲۴۱۵ نوکلئوتیدی از ناقل اصلی pTRV2 حذف شده و با یک قطعه کوتاه‌تر به طول ۲۱۰۹ نوکلئوتید جایگزین شود. این جابجایی با استفاده از برش آنزیمی توسط دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* میسر شد. در نتیجه این تغییرات، ناقل اصلی که ۹۶۶۳ جفت‌باز طول داشت، حدود ۳۰۰ جفت‌باز کوتاه‌تر شد و به اندازه نهایی ۹۳۵۷ جفت‌باز رسید. این ناقل جدید SpTRV2 نام‌گذاری شد (شکل ۱).

تخلیص و آماده‌سازی قطعات و اتصال قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی به بدنه اصلی ناقل

برای تولید قطعه جایگزین، از واکنش PCR با شرایط بهینه و آنزیم *Pfu* DNA Polymerase (به دلیل دقت بالا) و ناقل pTRV2 به عنوان الگو استفاده شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز (شکل A۲) نشان داد که آغازگرهای اختصاصی توانسته‌اند قطعه مورد نظر را با موفقیت تکثیر کنند. مشاهده باندهای با طول دقیق ۲۱۰۹ نوکلئوتید و شدت مناسب، حاکی از کارآمدی واکنش و بهینه بودن شرایط بود. پس از تایید PCR، قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی با اسکالپل از روی ژل جدا شده و با استفاده از کیت شرکت ویوانتیس (GF-1) خالص‌سازی شد. برای اطمینان از خلوص و سلامت قطعه، محصول خالص‌شده دوباره الکتروفورز شد (شکل B۲).

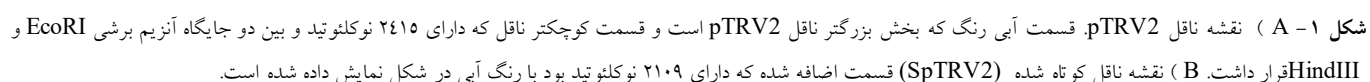


Figure 1 consists of five panels (A-E) showing gel electrophoresis results. Panel A shows a single band at 2000 bp for sample 2. Panel B shows bands at 2500 bp and 2300 bp for sample 2. Panel C shows bands at 5148 bp, 2027 bp, 947 bp, and 564 bp for sample 1. Panel D shows bands at 5148 bp, 2027 bp, 947 bp, and 564 bp for sample 1. Panel E shows bands at 5148 bp, 2027 bp, and 564 bp for sample 1.

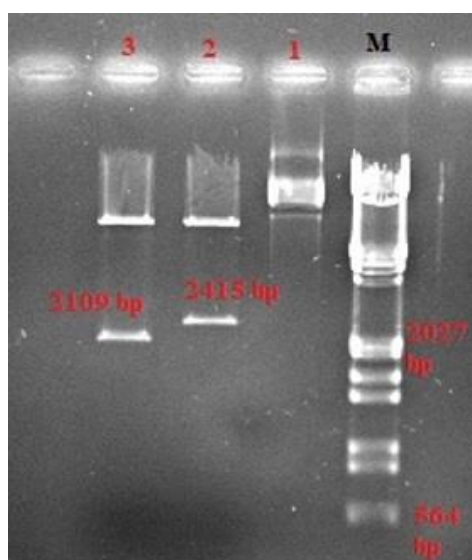
Fig 2. A) Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lanes 2 and 3 band 2,109-nucleotide fragment derived from the pTRV2 vector. **B)** Agarose gel electrophoresis of gel-purified PCR products. Lanes 1 and 2 show the purified 2,109-nucleotide fragment. **C)** Restriction enzyme digestion analysis of the pTRV2 vector and the 2,109-nucleotide insert. Lanes 1 and 2 demonstrate the cleavage of pTRV2 into two fragments (a larger and a smaller segment) while lanes 4 and 5 display the restriction digest of the 2,109-nucleotide insert. **D)** Gel extraction of the larger pTRV2 fragment and the 2,109-nucleotide insert. The upper band in lanes 1 and 2 and the bands in lanes 4 and 5 corresponding to the digested 2,109-nucleotide insert. **E)** Verification of the sizes of the purified fragments using a DNA sizing kit: lane 1 contains the purified larger fragment of pTRV2, and lane 2 contains the purified 2,109-nucleotide insert.

نتایج نشان داد که قطعه در جایگاه صحیح قرار گرفته و کیفیت مناسبی برای مراحل بعدی دارد. در مرحله بعد، هم ناقل اصلی pTRV2 و هم قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی تحت هضم آنزیمی با *EcoRI* و *HindIII* قرار گرفتند. هضم ناقل pTRV2 منجر به تولید دو قطعه شد، یک قطعه بزرگتر (اسکلت ناقل) و یک قطعه کوچکتر (بخش حذف شونده ۲۴۱۵ نوکلئوتیدی). قطعه بزرگتر ناقل با طول ۷۲۴۸ نوکلئوتید روی ژل شناسایی شد (شکل C۲) و با دقت برش داده شد (شکل D۲) تا برای اتصال به قطعه جدید آماده شود. قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی هضم شده نیز به طور جداگانه از روی ژل خالص سازی شد. در نهایت، صحت خالص سازی هر دو بخش (ناقل بزرگ و قطعه ورودی) با الکتروفورز مجدد تایید شد (شکل E۲).

پیش از انجام واکنش اتصال، غلظت ناقل خطی شده و قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی با مقایسه شدت باند آن‌ها نسبت به مارکر وزنی (Lambda DNA Marker) روی ژل تخمین زده شد و با استفاده از معادله ۱، مقادیر مورد نیاز برای واکنش اتصال محاسبه شد. واکنش الحاق در نسبت‌های مولی مختلف (مانند ۲:۱ و ۱:۱) انجام گرفت.

ترانسفورماسیون و غربالگری و استخراج پلاسمید نو ترکیب

محصولات واکنش اتصال به باکتری منتقل شده و باکتری‌ها کشت داده شدند. کلونی‌ها روی محیط کشت دارای آنتی بیوتیک کانامایسین ظاهر شدند. برای شناسایی کلونی‌هایی دارای ناقل نو ترکیب (SpTRV2)، از روش PCR کلونی استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تعدادی از کلونی‌ها غربالگری شدند. مشاهده باند مورد نظر روی ژل الکتروفورز حضور قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی را در ناقل تایید کرد. جهت تایید نهایی، پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های نو ترکیب (SpTRV2) و پلاسمید اصلی (pTRV2) به طور هم‌زمان با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* هضم شده و روی ژل آگارز مقایسه شدند (شکل ۳). در چاهک مربوط به ناقل اصلی (pTRV2)، پس از هضم دو باند مشاهده شد، باند بالایی (اسکلت ناقل) و باند پایینی قطعه جدا شده ۲۴۱۵ نوکلئوتیدی بود (شکل ۳). در چاهک مربوط به ناقل نو ترکیب (SpTRV2)، نیز دو باند مشاهده شد، باند بالایی (اسکلت ناقل) و باند پایینی قطعه جایگزین شده ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی بود (شکل ۳). تفاوت اندازه در باند پایینی (کوچکتر بودن باند در SpTRV2 نسبت به pTRV2)، موفقیت آمیز بودن عملیات جایگزینی و ساخت ناقل کوتاه شده را به اثبات رساند.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش هضم آنزیمی ناقل‌های pTRV2 و SpTRV2 با دو آنزیم برشی *EcoRI* و *HindIII*. در چاهک ۱ ناقل بسته pTRV2، چاهک ۲ ناقل برش خورده pTRV2 و در چاهک ۳ ناقل برش خورده SpTRV2 نمایش داده شده است.

Fig 3. Agarose gel electrophoresis of restriction digests of the pTRV2 and SpTRV2 vectors using the restriction enzymes *EcoRI* and *HindIII*. Lane 1 contains undigested (supercoiled) pTRV2 plasmid; lane 2 shows *EcoRI/HindIII*-digested pTRV2; and lane 3 displays *EcoRI/HindIII*-digested SpTRV2.

ساخت ناقل‌های نو ترکیب PpTRV2 و PSpTRV2 دارای پیشبر Pebv

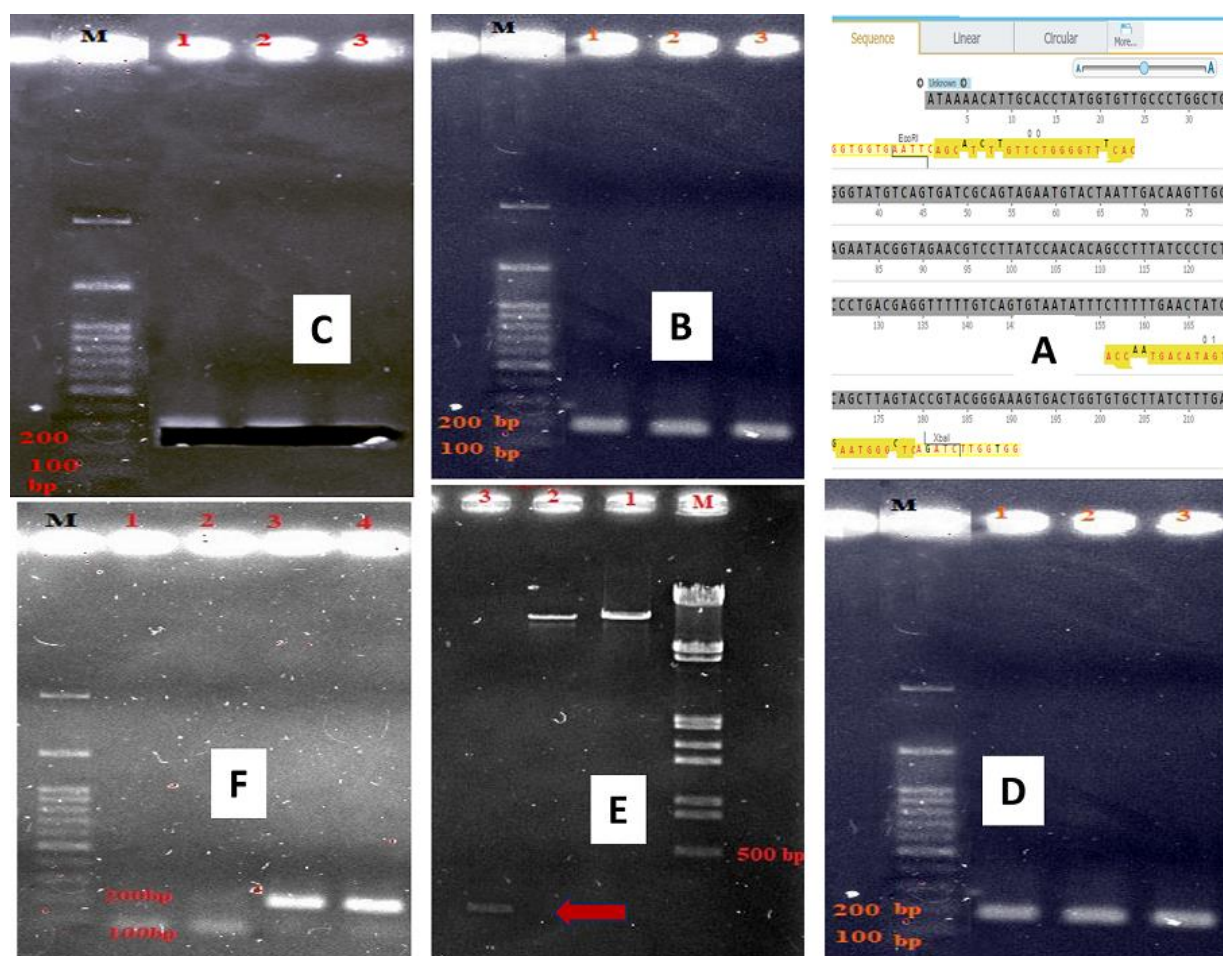
جهت جداسازی پیشبر *Pebv*، آغازگرهای لازم با استفاده از نرم افزار Genome Compiler طراحی شده (شکل A۴) و مشخصات آنها با کمک نرم افزار OligoAnalyzer بررسی شد. در طراحی آغازگرهای این بخش دو سایت برشی آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* به ترتیب به سمت ۵' آغازگرهای رفت و برگشت اضافه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پلاسمید *Pcap2-GFP* به عنوان الگو و آنزیم *Pfu DNA Polymerase* انجام شد و منجر به تکثیر قطعه‌ی ۱۸۲ نوکلئوتیدی شد (شکل B۴). شکل C۴ جداکردن قطعه را نشان می‌دهد (شکل C۴). الکتروفورز مجدد قطعه جداسازی شده از ژل یا همان پیشبر *Pebv*، خلوص و کیفیت بالای قطعه بازیابی شده را نشان داد (شکل D۴). پس از تکثیر این قسمت الحاقی توسط PCR و برش آن با دو آنزیم *EcoRI* و *XbaI* این قسمت به ناقل‌های اصلی متصل شد. پس از تعیین غلظت قطعه خالص‌سازی شده و ناقل‌های خطی TRV2 و SpTRV2 با استفاده از مارکر وزنی، واکنش اتصال انجام شد. قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی به ناقل‌های برش خورده الحاق شد تا ناقل‌های نو ترکیب PpTRV2 (نسخه کامل) و PSpTRV2 (نسخه کوتاه شده) ایجاد شوند (شکل E۴). پس از ترانسفورماسیون و رشد باکتری‌ها روی محیط کشت انتخابی دارای کانامایسین، غربالگری کلونی‌ها با روش PCR کلونی انجام شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR کلونی، حضور قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی را در کلونی‌های منتخب تایید کرد که نشان‌دهنده ساخت موفقیت‌آمیز هر دو ناقل نو ترکیب بود (شکل F۴). برای انجام الحاق پیشبر به این دو ناقل از نسبت‌های ۲:۱ و ۱:۱ (ناقل: قطعه الحاقی) استفاده شد. ناقل pTRV2 اصلی دارای قطعه پیشبر با نام PpTRV2 و ناقل pTRV2 کوتاه شده دارای قطعه پیشبر با نام PSpTRV2 نامگذاری شدند. ناقلین نو ترکیب به باکتری منتقل شده و باکتری‌ها کشت شدند. کلون‌هایی از هر دو نسبت روی پلیت دارای کانامایسین مشاهده شد. حضور پلاسمیدهای نو ترکیب دارای پیشبر الحاقی در کلونی‌ها با استفاده از تکنیک غربالگری توسط PCR و الکتروفورز محصولات تایید شد (شکل F۴).

همسانه‌سازی ژن GFP و ساخت ناقل‌های نهایی GPpTRV2 و GPSpTRV2

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* منجر به تکثیر اختصاصی قطعه ۷۰۶ نوکلئوتیدی ژن *GFP* از منبع *Pcap2-GFP* شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز، حضور تک‌باند ۷۰۶ نوکلئوتیدی را در موقعیت صحیح تایید کرد (شکل A۵). پس از تایید اولیه، قطعه مورد نظر از ژل آگارز جداسازی (شکل B۵) و با استفاده از کیت (GF-1) شرکت ویوانتیس خالص‌سازی شد. الکتروفورز مجدد محصول خالص‌سازی شده، خلوص بالا و عدم شکستگی DNA را نشان داد (شکل C۵). برای ساخت ناقل‌های نهایی، غلظت قطعه *GFP* خالص‌شده و ناقل‌های خطی (PpTRV2) و (PSpTRV2) با استفاده از مارکر وزنی تعیین شد (شکل D۵). سپس واکنش اتصال با نسبت‌های مولی بهینه‌سازی شده انجام شد که منجر به تولید ناقل‌های GPpTRV2 (با اندازه ۱۰۵۵۱ جفت‌باز) و GPSpTRV2 (با اندازه ۱۰۲۴۵ جفت‌باز) شد. پس از انتقال به باکتری *E. coli* و رشد روی محیط انتخابی، غربالگری کلونی‌ها با روش PCR انجام و حضور قطعه *GFP* را در ناقل‌های نو ترکیب تایید شد (شکل E۵). سپس این ناقل‌ها به سویه‌های GV3101 و LBA4404 (اگر باکتریوم منتقل شدند و صحت حضور آن‌ها دوباره با PCR تایید شد (شکل F۵)).

بررسی میزان سطح سبز برگ ناشی از بیان GFP

برای سنجش میزان نسبی بیان پروتئین *GFP* از اندازه‌گیری هاله سبز رنگ ایجاد شده روی برگ‌های گیاهان تنباکو استفاده شد. همانطور که در شکل‌های A۶ تا D۶ مشاهده می‌شود. گیاهان شاهد و تنباکوهایی که ناقل خالی pTRV2 را دریافت کرده بودند هیچ گونه علامت یا نشانه سبز شدن را تحت تابش uv نشان ندادند. در عوض گیاهان دارای ناقل‌های دارای پیشبر *Pebv* و ژن *GFP* در جاتی از حالت نقطه‌ای تا گسترش یافته سبزی را که می‌تواند به عنوان معیاری از میزان بیان *GFP* بوده و با آن ارتباط مستقیم داشته باشد، نشان دادند (شکل‌های A۶ تا D۶).



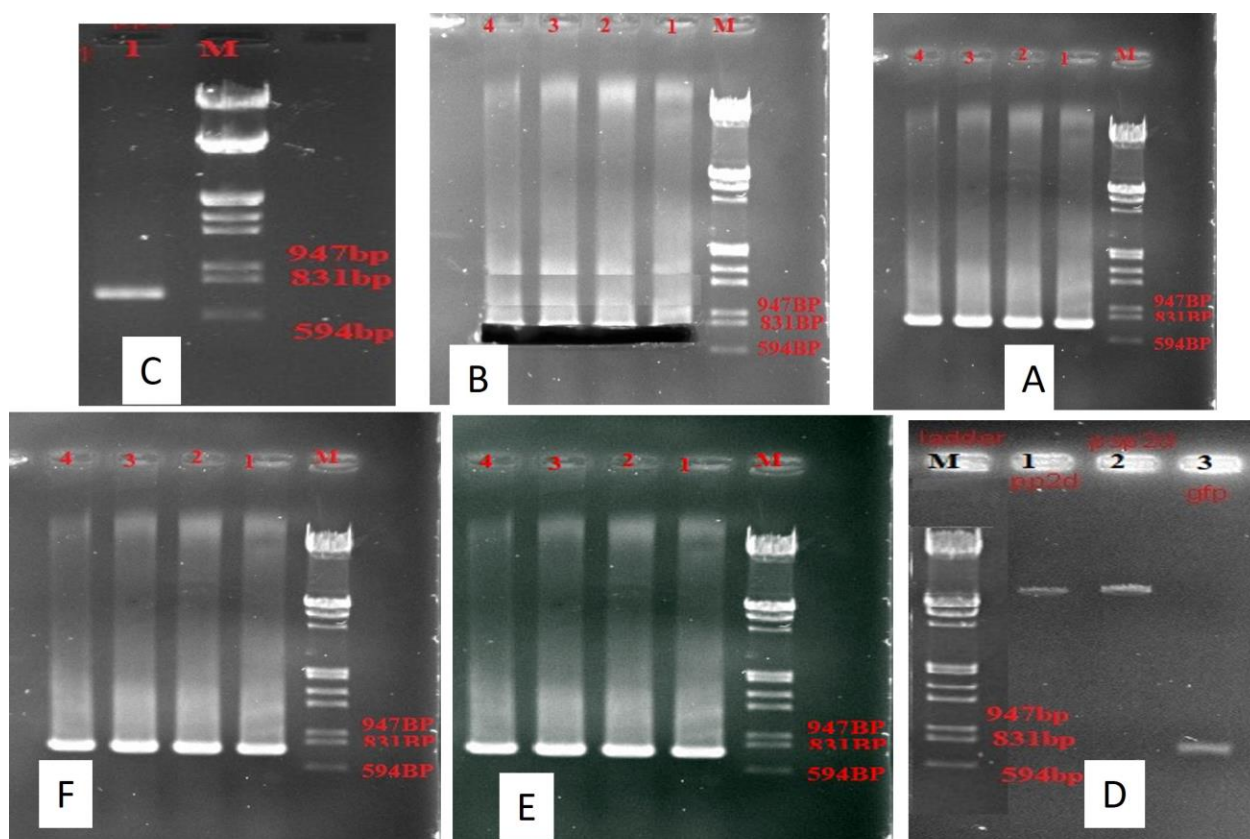
شکل ۴- نتایج مربوط به تأیید ساختاری ناقل های pTRV2 و SpTRV2 و قطعه پیشبر. (A) طراحی آغازگرهای اختصاصی پیشبر *Pebv* در نرم افزار Genome Compiler. (B) الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه ۱۸۲ جفت بازی از پیشبر *Pcap2-Gfp* (چاهک های ۱-۳)، (C) جداسازی قطعه ۱۸۲ جفت بازی از ژل آگارز (چاهک های ۱-۳)؛ (D) تأیید نهایی قطعه خالص شده پیشبر با استفاده از کیت GF-1؛ چاهک ۱: قطعه خالص شده. (E) تعیین غلظت نسبی ناقل های برش خورده pTRV2 (چاهک ۱)، SpTRV2 (چاهک ۲) و قطعه ۱۸۲ جفت بازی پیشبر *Pebv* (چاهک ۳)؛ (F) تأیید حضور پلاسمیدهای نو ترکیب دارای پیشبر *Pebv*. چاهک ۱ و ۲ بدون قطعه الحاقی و چاهک ۳ و ۴ دارای باند ۱۸۲ جفت بازی می باشد. سائز مارکر مربوط به شکل های B، C و D، DNA (100 bp Plus, Vivantis)، و سائز مارکر مربوط به شکل E (Lambda DNA/EcoRI+HindIII.) می باشد. سائز مارکر مربوط به شکل F هم VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis) می باشد.

Fig 4. Results of structural verification of pTRV2 and SpTRV2 vectors and promoter fragment. A) Design of promoter-specific primers for *Pebv* using Genome Compiler software. B) Agarose gel electrophoresis of PCR products amplifying a 182-bp fragment of the *Pcap2-Gfp* promoter (lanes 1-3). C) Purification of the 182-bp promoter fragment from agarose gel (lanes 1-3). D) Final verification of the purified *Pebv* promoter fragment using the GF-1 PCR Purification Kit; lane 1: purified fragment. E) Relative quantification of digested plasmid vectors: pTRV2 (lane 1), SpTRV2 (lane 2), and the 182-bp *Pebv* promoter fragment (lane 3). F) Confirmation of recombinant plasmids containing the *Pebv* promoter insert. Lanes 1 and 2 represent colonies without the insert, whereas lanes 3 and 4 show the expected 182-bp amplicon. DNA ladder markers: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis) was used for panels B, C, and D; Lambda DNA digested with *EcoRI* + *HindIII* was used for panel E; and VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis) was used for panel F.

اثر نوع و اندازه ناقل روی درصد سطح سبز برگ ناشی از بیان پروتئین GFP

همان طور که در شکل های AV تا DV مشاهده می شود، در میان تیمارهایی که در روزهای مختلف بافر یا ناقل خالی pTRV2 دریافت کرده بودند، هیچ اختلاف معنی داری در میزان فلورسانس سبز ناشی از پروتئین GFP مشاهده نشد. این یافته نشان دهنده آن است که بیان پروتئین GFP در این تیمارها رخ نداده است. در مقابل، در تیمارهایی که ناقل های دارای ژن *GFP* را دریافت کرده بودند، درجاتی از فلورسانس سبز مشاهده شد که احتمالاً نشان دهنده بیان این پروتئین است. در گیاهان ۶ هفته ای که با سویه LBA4404 تلقیح شده بودند، بیشترین مساحت فلورسانس سبز GFP در تیمارهای دارای ناقل اصلاح شده (GPSpTRV2) در روز آخر ارزیابی به دست آمد. این مقدار حدود ۱/۶ برابر بیشینه

مساحت فلورسانس مشاهده شده در تیمارهای دارای ناقل GPpTRV2 در همان روز بود. همچنین، میانگین مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2 حدود ۱/۵ برابر میانگین مربوط به تیمارهای GPpTRV2 گزارش شد (شکل AV). در گیاهان ۶ هفته ای تلقیح شده با سویه GV3101، بیشترین مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2 در روز دوازدهم پس از تلقیح مشاهده شد که حدود ۱/۰۷ برابر بیشینه مساحت فلورسانس ثبت شده در تیمارهای GPpTRV2 در روز پانزدهم بود (شکل BV). در گیاهان ۴ هفته ای تلقیح شده با سویه LBA4404، حداکثر مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPSpTRV2 نیز در روز پانزدهم ثبت شد که حدود ۱/۴ برابر حداکثر مساحت مشاهده شده در تیمارهای GPpTRV2 در همان روز بود (شکل CV).



شکل ۵ - مراحل ساخت و تأیید سازه های بیانی دارای ژن *gfp* در ناقل های PpTRV2 و PSpTRV2 (A) الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR قطعه ۷۰۶ جفت بازی *gfp* از سازه *Pcap2-gfp*. چاهک های ۱ تا ۴ مربوط به باند *gfp* است. (B) جداسازی قطعه ۷۰۶ جفت بازی *gfp* از ژل آگارز (چاهک های ۱ تا ۴). (C) تأیید هویت باند خالص شده *gfp* پس از برش از ژل و استخراج با کیت. (D) تعیین غلظت نهایی ناقل های PpTRV2، PSpTRV2 و قطعه *gfp* پس از خالص سازی (چاهک ۱، ناقل PpTRV2؛ چاهک ۲، ناقل PSpTRV2؛ چاهک ۳، قطعه *gfp*). (E) غربالگری کلونی های مثبت در *E. coli* با استفاده از PCR (چاهک های ۱ و ۲ کلونی های دارای سازه GPpTRV2 و چاهک های ۳ و ۴ کلونی های دارای سازه GPSpTRV2). (F) تأیید حضور قطعه *gfp* در سازه های نو ترکیب داخل *A. tumefaciens* با استفاده از PCR، چاهک ۱، GPpTRV2 در سویه GV3101؛ چاهک ۲، GPpTRV2 در سویه LBA4404؛ چاهک ۳، GPSpTRV2 در سویه GV3101؛ چاهک ۴، GPSpTRV2 در سویه LBA4404. در تمام موارد، M نشان دهنده سایز مارکر Lambda DNA /EcoRI+HindIII است.

Fig 5. Construction and molecular validation of expression constructs harboring the *gfp* gene in the PpTRV2 and PSpTRV2 vectors. (A) Agarose gel electrophoresis of the PCR-amplified 706-bp *gfp* fragment from the *Pcap2-gfp* plasmid. Lanes 1–4 show a band at the expected size corresponding to *gfp*. (B) Gel extraction of the 706-bp *gfp* fragment (lanes 1–4). (C) Verification of the identity of the purified *gfp* fragment following gel excision and extraction using the PCR Purification Kit. (D) Quantification of purified DNA components: lane 1, PpTRV2 vector; lane 2, PSpTRV2 vector; lane 3, *gfp* insert. (E) Colony PCR screening of *E. coli* transformants: lanes 1 and 2 colonies containing the GPpTRV2 construct; lanes 3 and 4 colonies containing the GPSpTRV2 construct. (F) Confirmation of *gfp* integration into recombinant constructs within *A. tumefaciens* strains by colony PCR: lane 1, GPpTRV2 in GV3101; lane 2, GPpTRV2 in LBA4404; lane 3, GPSpTRV2 in GV3101; lane 4, GPSpTRV2 in LBA4404. In all panels, M denotes the Lambda DNA/EcoRI + HindIII DNA size marker.



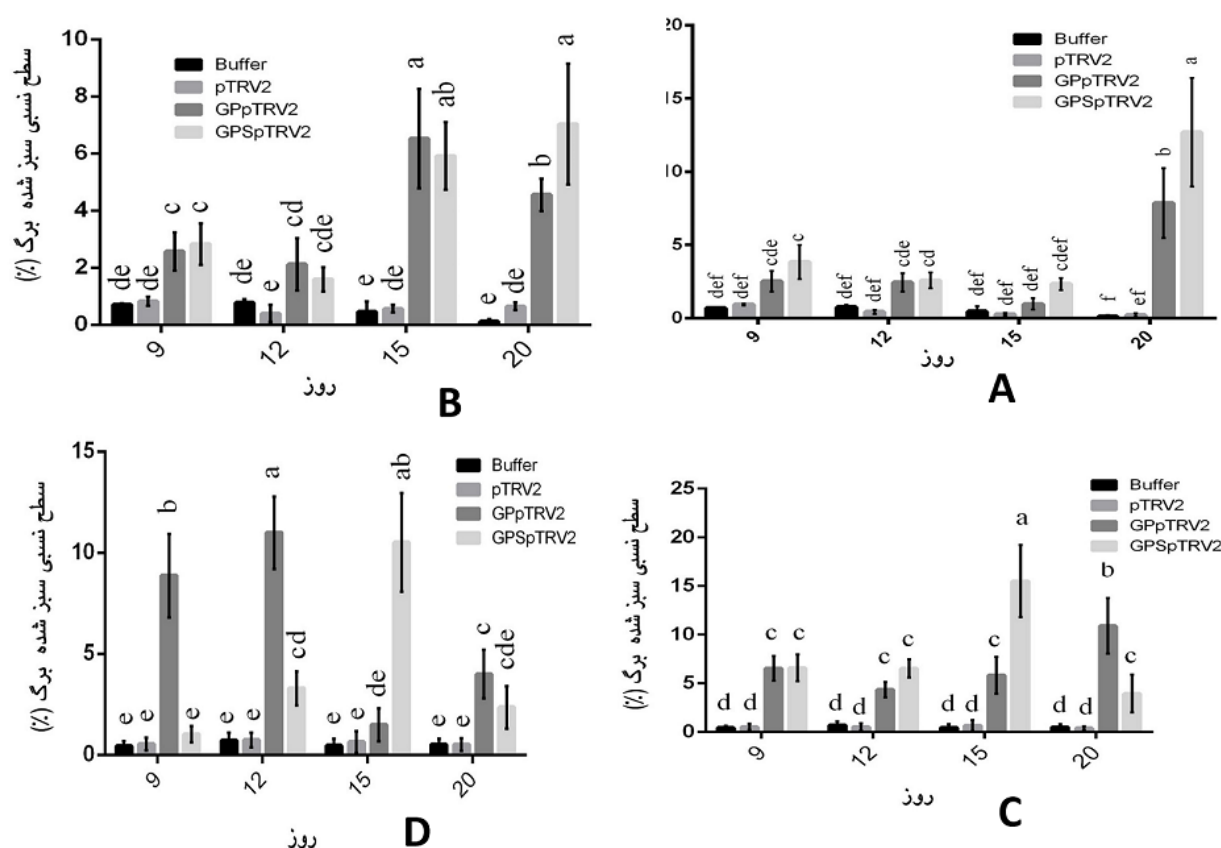
شکل ۶- تصویربرداری فلورسانس سبز (GFP) تحت نور فرابنفش (UV) از برگ‌های گیاهان تنباکو دارای ژن گزارشگر *gfp* پس از ترانسفورماسیون با سویه‌های مختلف *A. tumefaciens*. (A) گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ (B) گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101؛ (C) گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ (D) گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101. فلورسانس سبز نشان‌دهنده بیان موفق ژن *gfp* در بافت‌های گیاهی است.

Fig 6. Green fluorescent protein (GFP) fluorescence imaging under ultraviolet (UV) light in leaves of *Nicotiana tabacum* plants transformed with different *A. tumefaciens* strains carrying the *gfp* reporter gene. (A) Six-week-old plants inoculated with strain LBA4404; (B) Six-week-old plants inoculated with strain GV3101; (C) Four-week-old plants inoculated with strain LBA4404; (D) Four-week-old plants inoculated with strain GV3101.

در گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101، بیشینه مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GpTRV2 در روز دوازدهم به‌دست آمد که به‌طور تقریبی معادل ۱/۰۴ برابر حداکثر مساحت فلورسانس در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم بود. از سوی دیگر، میانگین کلی مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GpTRV2 حدود ۱/۴۵ برابر میانگین مربوط به تیمارهای GPSpTRV2 بود (شکل DV). در گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101، بیشترین مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2 در روز دوازدهم پس از تلقیح مشاهده شد که حدود ۱/۰۷ برابر بیشینه مساحت فلورسانس ثبت‌شده در تیمارهای GpTRV2 در روز پانزدهم بود (شکل BV). در گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404، حداکثر مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPSpTRV2 نیز در روز پانزدهم ثبت شد که حدود ۱/۴ برابر حداکثر مساحت مشاهده‌شده در تیمارهای GpTRV2 در همان روز بود (شکل CV). در گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101، بیشینه مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GpTRV2 در روز دوازدهم به‌دست آمد که به‌طور تقریبی معادل ۱/۰۴ برابر حداکثر مساحت فلورسانس در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم بود. از سوی دیگر، میانگین کلی مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GpTRV2 حدود ۱/۴۵ برابر میانگین مربوط به تیمارهای GPSpTRV2 بود (شکل DV).

اثر نوع سویه باکتری بر میزان فلورسانس سبز

نتایج حاصل از تحلیل آماری نشان داد که در گیاهان ۶ هفته‌ای، میانگین مساحت فلورسانس سبز در گیاهان تلقیح شده با سویه LBA4404 حدود ۱/۰۶ برابر میانگین مساحت فلورسانس در گیاهان تلقیح شده با سویه GV3101 بود. همچنین، بیشینه مساحت فلورسانس در گیاهان تلقیح شده با LBA4404 دارای ناقل GPpTRV2، حدود ۱/۸ برابر بیشینه مساحت مشاهده شده در گیاهان تلقیح شده با GV3101 دارای همان ناقل بود (شکل‌های AV و BV). در گیاهان ۴ هفته‌ای نیز میانگین مساحت فلورسانس سبز در گیاهان تلقیح شده با سویه LBA4404 حدود ۱/۴۱ برابر میانگین مربوط به گیاهان تلقیح شده با سویه GV3101 بود. علاوه بر این، بیشینه مساحت فلورسانس در گیاهان تیمار شده با LBA4404 دارای ناقل GPpTRV2، حدود ۱/۴۱ برابر بیشینه مساحت معادل در گیاهان تلقیح شده با GV3101 دارای ناقل GPpTRV2 گزارش شد (شکل‌های CV و DV).



شکل ۷- میانگین درصد سطح سبز شده برگ به عنوان شاخصی از بیان پروتئین GFP در گیاهان تنباکو پس از تلقیح با ناقل‌های مختلف TRV. (A) گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح شده با سویه LBA4404؛ (B) گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح شده با سویه GV3101؛ (C) گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح شده با سویه LBA4404؛ (D) گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح شده با سویه GV3101. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۰/۰۱ (بر اساس آزمون توکی) هستند.

Fig 7. Mean percentage of leaf area exhibiting green fluorescence as a quantitative indicator of GFP protein expression in *Nicotiana tabacum* plants following infiltration with different TRV-based vectors. (A) Six-week-old plants infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404; (B) Six-week-old plants infiltrated with strain GV3101; (C) Four-week-old plants infiltrated with strain LBA4404; (D) Four-week-old plants infiltrated with strain GV3101. The same letter is not significantly different at the $p < 0.01$ level according to Tukey's HSD post-hoc test.

اثر زمان بر میزان فلورسانس سبز

بر اساس شکل‌های AV و BV، سطح فلورسانس سبز که به‌عنوان شاخصی از بیان پروتئین GFP در نظر گرفته می‌شود وابسته به زمان پس از تلقیح بود و در طول دوره آزمایش دچار نوساناتی شد. در گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با ناقل GpPpTRV2 و سویه LBA4404، کمینه و بیشینه مساحت فلورسانس سبز به‌ترتیب در روزهای دوازدهم و بیستم پس از تلقیح مشاهده شد. در گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با ناقل GPSpTRV2 و همان سویه، سطح فلورسانس در روزهای نهم و دوازدهم افزایش یافت و در روز پانزدهم به حداکثر خود رسید؛ سپس در روز بیستم کاهش پیدا کرد. در گیاهان ۴ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101، بیشترین مساحت فلورسانس در تیمارهای GpPpTRV2 در روز دوازدهم و در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم ثبت شد. در گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با GV3101، بیشینه فلورسانس در روز پانزدهم در تیمار GpPpTRV2 و سپس در روز بیستم در تیمار GPSpTRV2 مشاهده شد (شکل‌های CV و DV). بیان پروتئین GFP وابسته به زمان بود. در اکثر تیمارها، سطح بیان از روز نهم آغاز شده، در روزهای دوازدهم تا پانزدهم به اوج خود رسید و در روز بیستم کاهش یافت. استفاده از سیستم‌های بیان موقت مبتنی بر ویروس‌های گیاهی به‌عنوان یکی از استراتژی‌های کلیدی در زیست‌تولید مدرن، امکان تولید سریع، ایمن و مقیاس‌پذیر پروتئین‌های نوترکیب از جمله واکسن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌های صنعتی را فراهم کرده است. در این میان، ویروس جغجغه‌ای تنباکو به‌دلیل دامنه میزبانی گسترده، توانایی انتقال سیستمی سریع، القای حداقلی علائم بیماری و سازگاری عالی با *N. benthamiana* به‌عنوان یک سکوی استاندارد در زیست‌فناوری گیاهی و به‌عنوان یک نامزد ایده‌آل برای مهندسی ژنتیک مطرح شده است (Senthil-Kumar & Mysore, 2014). در این پژوهش، با طراحی دو نسخه نوترکیب از TRV2 یکی بومی (GpPpTRV2) و دیگری کوتاه‌شده (GPSpTRV2) و الحاق پیشبر *Pebv* و ژن گزارشگر *gfp*، نشان داده شد که TRV می‌تواند به‌عنوان یک سکوی رقابتی برای بیان پروتئین‌های خارجی بهینه‌سازی شود. در سال ۲۰۲۲ در پژوهشی یک پلتفرم مبتنی بر TRV به نام TRVe معرفی شد که با استراتژی جایگزینی ژن مهندسی شده و توانایی بیان سیستمیک و پایدار دو پروتئین خارجی بدون فیوژن را در گیاه *N. benthamiana* فراهم می‌کند و پایداری ژنتیکی درج‌های ژنی تا حدود ۹۰۰ اسید آمینه را حفظ می‌نماید. همچنین، این سیستم برای تحویل همزمان پروتئین Cas12a و crRNA جهت ویرایش ژنوم گیاهی با موفقیت به‌کار گرفته شده است که کاربرد آن را در ژنومیک عملکردی و تولید همزمان چندین پروتئین نوترکیب گسترش می‌دهد (Guo et al., 2022).

یکی از یافته‌های این مطالعه، بهبود قابل توجه بیان پروتئین با کاهش ۳۰۰ جفت‌بازی ژنوم TRV2 بود. این تغییر، نه تنها منجر به کاهش اندازه کلی ناقل از ۹۶۶۳ به ۹۳۵۷ جفت‌باز شد، بلکه سرعت انتشار سیستمی و پایداری RNA ویروسی را نیز افزایش داد. داده‌های کمی نشان داد که ناقل کوتاه‌شده (GPSpTRV2) در گیاهان ۶ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404 آگروباکتریوم در روز بیستم، ۱/۶ برابر، سطح فلورسانس GFP را نسبت به نسخه بومی (GpPpTRV2) القا کرد. این یافته با مدلی همخوانی دارد که بیان پروتئین در سیستم‌های ویروسی با کاهش بار ژنتیکی بهبود می‌یابد. این فرضیه در پژوهش‌های قبلی در سیستم‌های مبتنی بر TMV و PVX نیز تأیید شده و مشخص شده است که کوتاه‌سازی ژنوم TMV منجر به دو تا سه برابر شدن بیان پروتئین شده است (Marillonnet et al., 2005).

پیشبر *Pebv* مورد استفاده در این پژوهش، متعلق به ویروس Pepper vein banding virus (PeVbV) است. این پیشبر به دلیل فعالیت بسیار قوی در بافت‌های برگ و توانایی القای بیان ژن با سطوح بالا شناخته می‌شود (Park et al., 2009). استفاده از چنین پیشبرهای ویروسی در ترکیب با سیستم‌های بیان موقت (مانند وکتورهای مبتنی بر TRV)، کارایی تولید پروتئین‌های نوترکیب را در گیاهان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Peyret & Lomonossoff, 2023).

وجود این پیشبر در سازه‌های GpPpTRV2 و GPSpTRV2، امکان بیان بالای ژن *gfp* را بدون نیاز به القای تقسیم سلولی فراهم کرد، ویژگی که برای تولید پروتئین‌های پایدار در گیاهان بالغ بسیار حیاتی است. عدم مشاهده فلورسانس در گیاهان شاهد یا تلقیح‌شده با ناقل خالی، نشان دهنده خصوصیت القایی پیشبر *Pebv* است. در مطالعه‌ای علی و همکاران (۲۰۱۵)، نیز یک سامانه کارآمد برای ویرایش ژنوم گیاه *Nicotiana*

benthamiana با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و با واسطه یک وکتور مشتق شده از ویروس جغجغه ای توتون (TRV) توسعه داده شد. در این پژوهش، RNA راهنما (gRNA) تحت کنترل پیشبر ویروسی *Pebv*، موفق به القای شکست های دو رشته ای هدفمند در ژن های گیاه شدند (Ali et al., 2015). در مقاله مروری در مورد طراحی ناقل های ویروسی گیاهی برای تولید پروتئین های نوترکیب، بیان شده است که مهندسی ناحیه پیشبر و بهینه سازی توالی های غیرکدکننده در TRV می تواند کارایی بیان پروتئین های هدف را افزایش داده و این ویروس را به گزینه ای مناسب برای بیان موقت در گونه های مختلف گیاهی تبدیل کند (Abrahamian et al., 2020).

مطالعات اخیر نشان داده اند که پیشبرهای ویروسی مانند *CaMV 35S* یا *P19-enhanced promoters*، می توانند با تعامل با فاکتورهای رونویسی گیاهی (مانند TFIID و WRKY) بیان ژن را به طور اختصاصی در بافت های میزبان افزایش دهند (Peyret & Lomonossoff, 2023). با این حال، پیشبر *Pebv* این مزیت را دارد که در مقایسه با *CaMV 35S*، القای التهابی کمتری دارد و بنابراین، احتمال القای پاسخ های دفاعی گیاهی را کاهش می دهد. عاملی که می تواند بر پایداری بیان پروتئین تأثیر مستقیم داشته باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که سویه LBA4404 در گیاهان ۴ هفته ای به طور معنی داری (۱/۴۱ برابر) بیان بالاتری نسبت به GV3101 دارند. سویه LBA4404 فاقد ژن *virG* القاکننده پاسخ های التهابی است. این ویژگی ممکن است منجر به القای ضعیف تر پاسخ های ایمنی در گیاه شود (Hellens et al., 2000). از سوی دیگر، GV3101 به دلیل دارا بودن پروتئین P19 به عنوان یک سرکوب کننده قوی RNA silencing در برخی سیستم ها عملکرد بهتری دارد (Voinnet et al., 1999). با این حال، در سکوی TRV که خود دارای عناصر سرکوب کننده RNAi است (مانند پروتئین K16)، افزودن P19 ممکن است منجر به بار تنظیمی اضافی شود و در نتیجه، عملکرد GV3101 کاهش یابد. این موضوع تأکید می کند که انتخاب سویه اگروباکتریوم باید بر اساس سازگاری سیستمی با ناقل ویروسی و گونه میزبان باشد، نه بر اساس عملکرد عمومی آن در سایر سکوها. در پژوهشی بیان موقت ژن گزارشگر لوسیفراز با استفاده از دو سویه اگروباکتریوم LBA4404 و GV3501 بررسی شد و نشان داده شد که برهم کنش میان ژنوتیپ میزبان، ویژگی های سویه باکتریایی و سیگنال های درون سلولی هدف گیری پروتئین، نقشی تعیین کننده در موفقیت فرآیند بیان موقت ایفا می کند (Mirakhorli et al., 2014).

یکی از یافته های دیگر این پژوهش، نقش تعیین کننده سن گیاه در دینامیک بیان پروتئین بود. در گیاهان ۴ هفته ای، اوج بیان در روزهای ۱۲-۱۵ رخ داد، در حالی که در گیاهان ۶ هفته ای، این اوج به روز ۲۰ کشیده شد. تفاوت در سطح بیان احتمالاً ناشی از تغییرات فیزیولوژیکی گیاه است. گیاهان جوان تر (معمولاً ۴ تا ۶ هفته ای) به دلیل نرخ تقسیم سلولی بالاتر و نفوذپذیری بیشتر بافت، معمولاً پاسخ های سریع تر و سطوح بیان بالاتری در سیستم های موقت نشان می دهند. در مقابل، در گیاهان مسن تر، فعال سازی سریع تر مکانیسم های دفاعی میزبان مانند خاموشی RNA می تواند منجر به کاهش تدریجی تجمع ویروس و پایداری کمتر بیان شود (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). این یافته ها بر ضرورت هماهنگی دقیق بین سن گیاه، زمان تلقیح و زمان برداشت تأکید می کنند، ویژگی ای که در طراحی فرآیندهای صنعتی تولید پروتئین در گیاهان حیاتی است. برای بهترین نتیجه در آگرواینفیلتراسیون موقت، بهتر است از گیاهان *N. benthamiana* با سن ۴ تا ۶ هفته استفاده شود. گیاهان کمتر از ۳ هفته بافت های بسیار نرم و حساسی دارند که ممکن است در حین تزریق آسیب ببینند و هنوز به بلوغ کافی برای بیان بالای پروتئین نرسیده اند. در گیاهان بیش از ۶ هفته هم دیواره سلولی ضخیم تر می شود و نفوذپذیری آگروباکتریوم کاهش می یابد. همچنین مکانیسم های دفاعی گیاه (Silencing) در گیاهان مسن تر فعال تر هستند که می تواند بیان ژن خارجی را سرکوب کند (Sparkes et al., 2006).

با توجه به کارایی بهبود یافته GPSpTRV2، این سکو می تواند در آینده برای تولید واکسن های گیاهی استفاده شود. به عنوان مثال، TRV اخیراً برای بیان آنتی ژن های SARS-CoV-2 (مانند پروتئین اسپایک) در *N. benthamiana* استفاده شده و پاسخ های ایمنی قوی در مدل های حیوانی القا کرده است (Phoolcharoen et al., 2023). سرعت تولید (کمتر از ۳ هفته)، عدم نیاز به تصفیه پیچیده و امکان تزریق مستقیم از مزیت های کلیدی این رویکرد است.

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان پیشنهاداتی به شرح زیر برای مطالعات مرتبط در آینده داد. جایگزینی با پیشبرهای القا شونده مثلاً استفاده از پیشبرهای نور یا حرارت القایی می‌تواند کنترل زمان‌بندی شده‌تری بر بیان فراهم کند. بهینه‌سازی شرایط محیطی از جمله کاهش دما پس از تلقیح به ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد می‌تواند با کاهش سرعت تخریب پروتئین و افزایش پایداری RNA و کاهش تنش‌های گیاهی، راندمان بیان موقت افزایش می‌دهد (Matsuda *et al.*, 2012). استفاده در تولید پروتئین‌های درمانی از جمله آزمایش این سکو با ژن‌هایی مانند cytokines یا آنزیم‌های درمانی نیز می‌تواند ارزش کاربردی آن را نشان دهد. بنابراین این پژوهش نه تنها یک نسخه بهینه‌شده از TRV را معرفی می‌کند، بلکه پایه‌های علمی لازم برای تبدیل شدن آن به یک سکوی رقابتی در زیست‌تولید گیاهی را فراهم می‌آورد.

References

منابع

- Abrahamian, P., Hammond, R. W., & Hammond, J. (2020). Plant virus-derived vectors: Applications in agricultural and medical biotechnology. *Annual Review of Virology*, 7(1), 513–535. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-010720-054958>
- Ali, Z., Abul-Faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., & Mahfouz, M. M. (2015). Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*, 8(8), 1288–1291. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.02.011>.
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39(5), 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02158.x>.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y. C., Chung, E. J., Oh, S. K., Lee, S., Park, J. M., Joung, Y. H., & Choi, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Molecules and Cells*, 17(2), 377–380. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)13054-8](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)13054-8).
- Hellens, R. P., Mullineaux, P. M., & Klee, H. J. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01740-4)
- Hileman, L. C., Drea, S., Martino, G., Litt, A., & Irish, V. F. (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant Journal*, 44(2), 334–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02520.x>
- Guo, G., Li, M.-J., Lai, J.-L., Du, Z.-Y., & Liao, Q.-S. (2022). Development of tobacco rattle virus-based platform for dual heterologous gene expression and CRISPR/Cas reagent delivery. *Plant Science*, 325, 111491. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111491>
- Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31(6), 777–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2002.01394.x>
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R. *et al.* (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23, 718–723. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>
- Matsuda, R., Tahara, A., Matoba, N., & Fujiwara, K. (2012). Virus vector-mediated rapid protein production in *Nicotiana benthamiana*: Effects of temperature and photosynthetic photon flux density on hemagglutinin accumulation. *Environmental Control in Biology*, 50(4), 375–381. <https://doi.org/10.2525/ecb.50.375>
- Mirakhorli N, Heydari Reyhani A, Shiran B, Hooshmand S. (2014). Optimization of transient expression by *Agrobacterium* in almond. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 3 (1) :9-18. <https://doi.org/20.1001.1.25885073.1393.3.1.1.2>
- Park, M. R., Kim, K. H., & Park, Q. T. (2009). The Pepper vein banding virus promoter drives strong gene expression in transgenic plants. *Molecules and Cells*, 27(5), 589–595. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0078-2>
- Peyret, H., & Lomonossoff, G. P. (2015). When plant virology met *Agrobacterium*: The rise of the deconstructed viral vectors. *Plant Biotechnology Journal*, 13(8), 1121–1135. <https://doi.org/10.1111/pbi.12412>
- Peyret, H., & Lomonossoff, G. P. (2023). Plant virus-derived expression systems: from basic science to commercial applications. *Annual Review of Virology*, 10, 145–168. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-022122-103531>
- Phoolcharoen, W., Lai, H., & Mason, H. S. (2023). Plant-made SARS-CoV-2 vaccines: current status and future directions. *Vaccines*, 11(2), 389. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020389>
- Pogue, G. P., Vojdani, F., Palmer, K. E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., & Mett, V. (2010). Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody

- product using plant-based transient expression systems. *Biotechnology Journal*, 5(11), 1210–1220. <https://doi.org/10.1002/biot.201000127>
- Rybicki, E. P. (2019). Plant molecular farming of virus-like particle vaccines. *current opinion in biotechnology*, 61, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.008>
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science*, 16(12), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.006>
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2014). Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols*, 9(7), 1549–1562. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.104>
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, 1(4), 2019–2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>
- Tian, J., Pei, H., Zhang, S., Chen, J., Chen, W., Yang, R., Meng, Y., You, J., Gao, J., & Ma, N. (2014). TRV–GFP: A modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 311–322. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert381>
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 14147–14152. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14147>