مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱٤، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱٤۰٤
صفحه ۲۱٦-۱۹۹

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2026
Volume 14, Number 2, Pages: 199-216

http://gebsj.ir/

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

10.61882/gebsj.14.2.5

بررسی استفاده از ویروس جغجغه‌ای توتون (TRV) برای بیان پروتئین‌های نوترکیب درگیاه *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 Naghadeh[1], Fatemeh Zaker-Tavallaie[2]*, Seyyed-Ali Hosseini-Tafreshi[3]

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: *Corresponding Author, Email
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

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

Abstract

The objective of this study was the investigation of efficiency of Tobacco rattle virus to express recombinant proteins in *N. benthamianaa*. 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)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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 درگیاه 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 ٤ یا ٦ 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 ٦ هفته‌ای دارای ناقل GPSpTRV2 (کوتاه شده) با سویه‌ی LBA4404 بیشترین میزان مساحت بخش‌های سبز GFP برگ مشاهده شد که این میزان ١/٦ برابر مساحت بخش سبز در تیمار با ناقل GPpTRV2 (کوتاه نشده) در روز بیستم پس از تزریق بود. در گیاهان ٤ هفته‌ای با سویه LBA4404، حداکثر میزان مساحت بخش‌های سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2، روز پانزدهم بدست آمد که ١/٤ برابر مساحت بخش‌های سبز در تیمارهای دارای ناقل GPpTRV2 در این روز بود. در گیاهان ٦ هفته‌ای، میزان متوسط مساحت بخش‌های سبز در گیاهانی که با هر دو سویه LBA4404و GV3101 تزریق شده بودند تقریبا برابر بود. نتایج نشان داد که میزان بیان GFP وابسته به زمان بوده و در روزهای پس از تلقیح دچار نوسان می شود. نتایج بدست امده از این پژوهش می‌تواند راه را برای استفاده از این ویروس به عنوان وکتور بیانی پروتئین‌های نوترکیب هموار سازد

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

Introduction

مقدمه

در سال‌های اخیر، گیاهان به‌ویژه تنباکو *Nicotiana benthamianaa* 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. benthamianaa*به‌طور خاص به‌دلیل 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. benthamianaa* گسترش یابد و همین ویژگی آن را برای انتقال کارای 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 مزیت های قابل ملاحظه‌ای هستند. این ناقل‌ها به طور وسیع در انجام خاموش سازی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

بیان موقت است. بیان موقت روشی ارزشمند در زیست‌فناوری گیاهی است که برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. در این روش، هدف تولید لاین تراریخته پایدار نیست، بلکه ناقل‌های ژن (مانند ناقل‌های ویروسی) استفاده می‌شود که بتوانند ژن پروتئین مورد نظر را تنها در سیتوزول بیان نمایند (Pogue *et al.*, 2010). استفاده از سامانه‌های TRV مبتنی بر *N. benthamiana* این امکان را فراهم می‌کند که پروتئین‌های نوترکیب در کل گیاه و در مدت زمان کوتاه، بدون نیاز به ایجاد لاین‌های تراریخت پایدار تولید شوند؛ به‌ویژه برای غربالگری سریع سازه‌های ژنی، تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پروتئین‌های واکسن‌کاندید اهمیت دارد (Tian *et al.*, 2014; Pogue *et al.*, 2010). تلاش‌های اخیر برای مهندسی ژنوم TRV و بهینه‌سازی پاسخ میزبان نشان داده است که می‌توان پایداری درج ژن خارجی، بیان هم‌زمان چند پروتئین و نیز بازده تولید پروتئین نوترکیب را در این سامانه به‌طور چشمگیری بهبود داد (Zhang *et al.*, 2022).

هدف از این پژوهش ساخت و اصلاح ناقل ویروسی نوترکیب TRV با اضافه کردن ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP: Green Flurescent Protein) به آن، بررسی کارایی ناقل ویروسی TRV و بیان پروتئین GFP در برگ‌های 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 سویه‌های مختلف آگروباکتریوم برای سنجش کارایی استفاده از آن‌ها در حمل ناقلین TRV برای بیان پروتیئن و رصد مقدماتی زمان با بیشترین بیان بررسی شد.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

فرآیند کوتاه‌سازی ناقل YL156 (TRV2) و ساخت ناقل نوترکیب SpTRV2: در این بخش از پژوهش، کوتاه‌سازی 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 نرم‌افزار Genome Compiler، طراحی به گونه‌ای 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 FPsht2 و دمای اتصال ۷۰ درجه سانتی‌گراد و آغازگر برگشت با نام RPsht2 و دمای اتصال ۶۹ درجه سانتی‌گراد با استفاده از نرم‌افزارهای PrimerQuest و OligoAnalyzer ارزیابی شد. جایگاه‌های برش آنزیمی HindIII (برای آغازگر رفت) و EcoRI (برای آغازگر برگشت) به توالی‌ها اضافه شد. برای تکثیر قطعه مورد نظر از روی ناقل pTRV2، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. در واکنش PCR از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* استفاده شد که دارای خاصیت اصلاح‌کنندگی (Proofreading) است تا از بروز خطا در توالی‌یابی جلوگیری شود. مخلوط واکنش شامل بافر Pfu، dNTP mix، MgCl2، آغازگرها و DNA الگو بود. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه)، ۳۰ چرخه اصلی (واسرشت‌سازی: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛ اتصال: ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ طویل‌شدن: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه) و یک مرحله طویل‌شدن نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه) بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با Green Viewer، باند ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی مشاهده شد.

تخلیص و آماده‌سازی قطعات: قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی از روی ژل جدا و با استفاده از کیت Vivantis (GF-1) خالص‌سازی شد. جهت تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E.coli* ، سویه DH5a این باکتری در محیط LB کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم نوری (OD_{600}) مطلوب (۰/۴ تا ۰/۶)، با استفاده از محلول CaCl2 سرد (۰/۱ مولار) تیمار شد تا دیواره سلولی برای پذیرش DNA نفوذپذیر شود. سلول‌ها در نهایت در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. هر دو پلاسمید اصلی (pTRV2) و قطعه PCR خالص‌شده (۲۱۰۹ نوکلئوتیدی) با استفاده از دو آنزیم *Hind*III و *Eco*RI (شرکت Takara) تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند تا انتهای چسبنده برای اتصال ایجاد شود. واکنش در بافر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

(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 الکتروفورز 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 (۱:۲، ۱:۱ و ۱۰:۱)، مقادیر مورد نیاز با استفاده از فرمول محاسبه شد. جهت انجام اتصال، ابتدا مخلوط واکنش (بدون آنزیم) به مدت ۳ دقیقه در دمای ٦٥ 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 ١٦ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ترانسفورماسیون و غربالگری و استخراج پلاسمید نوترکیب: 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 نوترکیب را تایید کرد. پلاسمید از کلونی‌های مثبت استخراج شد و دوباره با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI هضم شد تا صحت اندازه قطعات تایید شود. پس از تایید نهایی کلونی‌ها، باکتری‌های منتخب در محیط مایع LB کشت داده شدند. پلاسمید نوترکیب 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 نوترکیب 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 *SpTRV2* و *pTRV2* 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 طراحی‌شده 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 ٦٨ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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(MgCl2) ، آغازگرهای رفت و برگشت و DNA الگو (*Pcap-fp*) بود. برنامه دمایی به صورت زیر تنظیم شد: واسرشت‌سازی اولیه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، چرخه‌های اصلی (٤٠ تکرار)، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٦٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. طویل‌شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از تایید حضور باند ۱۸۲ نوکلئوتیدی، کل محصول با استفاده از کیت *Vivantis (GF-1)* از روی ژل تخلیص شد. صحت خالص‌سازی با الکتروفورز 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 الکتروفورز مجدد تأیید شد. غلظت قطعه خالص‌شده و همچنین ناقل‌های برش‌خورده *pTRV2* و *SpTRV2* با مقایسه شدت باندهای مربوطه در مقابل سایز مارکر λ DNA/EcoRI+HindIII تعیین شد. بر اساس این غلظت‌ها، واکنش الحاق با نسبت‌های مولی ۲:۱ و ۱:۱ (ناقل به قطعه الحاقی) انجام و سازه‌های نوترکیب به باکتری منتقل شدند. کلونی‌های رشدیافته روی محیط کشت دارای کانامایسین شماره‌گذاری شده و با استفاده از PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی حضور قطعه الحاقی تأیید شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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

همسانه‌سازی ژن *GFP* و ساخت ناقل‌های نهایی GPpTRV2 و GPSpTRV2 : در این قسمت پژوهش، هدف انتقال ژن گزارشگر *GFP* (پروتئین فلورسنت سبز) به درون دو ناقل نوترکیب 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 *Xba*I و *Kpn*I (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 ٦٧ درجه سانتی‌گراد و ٤٣ درصد GC و آغازگر برگشت (RPEGV)، با طول ۳۳ نوکلئوتید، دمای ذوب ۷۱ درجه سانتی‌گراد و ۵۱ درصد GC. برای تکثیر قطعه ۷۰٦ نوکلئوتیدی ژن *GFP*، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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، MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار) ۱ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) ۱ میکرولیتر، آنزیم *Pfu* DNA Pplymerase (۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر، DNA الگو (GFP-pCap2) ۱ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۷/۳میکرولیتر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD) با برنامه زمان‌بندی واسرشت‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، چرخه‌های اصلی (۳۵ تکرار) شامل واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال آغازگرها در ٦٠ 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 ۷۰٦ 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 ۷۰٦ 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 *Xba*I و *Kpn*I 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.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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 ٦٥ 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 ١٦ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر نگهداری شد. ناقل‌های نهایی حاصل از این فرآیند دارای ژن *GFP*، به ترتیب GPpTRV2 و GPSpTRV2 نام‌گذاری شدند.

انتقال به باکتری، غربالگری کلونی ها 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 ٢٤ 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 5´CGCGGTACCTTATTTGTAGAGGCTCATCCATGCC 3´ 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 ٧٠٦ 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 *Xba*I و *Kpn*I برش داده شد. مشاهده قطعات با اندازه مورد انتظار روی ژل، صحت ساختار ناقل‌های GPpTRV2 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 ١٦ 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 GPpTRV2 و GPSpTRV2 نام‌گذاری شده و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

انتقال ناقل های GPpTRV2 و GPSpTRV2 به اگروباکتریوم: 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 (OD_{600}) آن‌ها به ۰/۵ تا ۱ برسد. سپس باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و پس از شستشو، در محلول سرد کلرید کلسیم ($CaCl_2$) با غلظت ۲۰ میلی‌مولار به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. برای انتقال ناقل‌های نوترکیب به اگروباکتریوم، 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 ٤٨ 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 ١٣٤ جفت‌باز) استفاده شد.

کشت و آماده‌سازی گیاه توتون یا تنباکو (*N. benthamianaa*): بذرهای تنباکو در سینی‌های پلی‌استایرن دارای پیت‌ماس در اتاق کشت با شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کاشته شدند. روی سینی‌ها تا

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

زمان جوانه‌زنی با سلفون پوشانده شد. پس از رشد، گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگتر منتقل و با کود NPK تغذیه شدند. دو گروه شامل گیاهان ٤ تا ٥ هفته‌ای و گیاهان ٦ تا ٧ هفته‌ای برای تزریق آماده شدند.

تزریق اگروباکتریوم دارای ژن گزارشگر به گیاه: برای آماده‌سازی اگروباکتریوم‌ها جهت تزریق به برگ، از روش اصلاح‌شده ولاسکوئز (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 (٥٠µg/ml)، ریفامپیسین (١٠٠ µg/ml) و استوسرینگون (200 mg/lit) منتقل شدند تا ژن‌های بیماری‌زایی باکتری فعال شوند. پس از رشد ٢٠ تا ٢٤ ساعته، باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و رسوب آن‌ها با بافر دارای MES و MgCl2 شستشو داده شد. در نهایت، رسوب باکتری در بافر تلقیح حل شد و جذب نوری (OD_{600}) تمام نمونه‌ها روی عدد ٠/٣ تنظیم شد. بعد از آن، سوسپانسیون‌های باکتریایی دارای ناقل‌های نوترکیب (pTRV2) با سوسپانسیون دارای ناقل کمکی (pTRV1) به نسبت ١:١ مخلوط شدند. در مجموع ٧ 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 LBA4404و GV3101 و تیمارهای T4تا T7 (تیمارهای اصلی) ناقل‌های نوترکیب 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 ٩، ١٢، ١٥ و ٢٠ 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 ١٩)، Excel و GraphPad Prism 6 انجام شد.

نتایج و بحث Results and Discussion

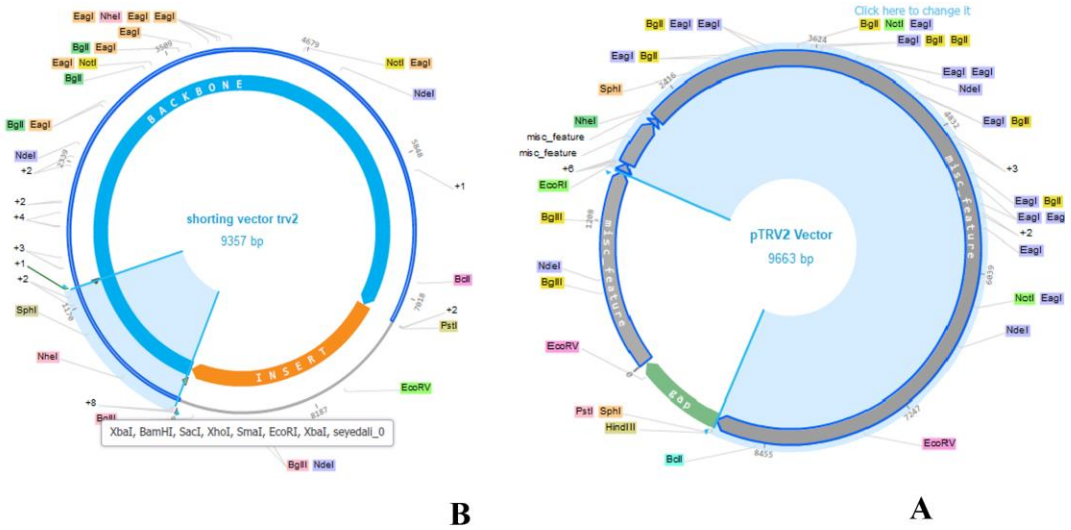
کوتاه‌سازی ناقل YL156 (TRV2) و ساخت ناقل نوترکیب SpTRV2

در این پژوهش، استراتژی مولکولی به این صورت بود که یک قطعه ٢٤١٥ نوکلئوتیدی از ناقل اصلی pTRV2 حذف شده و با یک قطعه کوتاه‌تر به طول ٢١٠٩ نوکلئوتید جایگزین شود. این جابجایی با استفاده از برش آنزیمی توسط دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III میسر شد. در نتیجه این تغییرات، ناقل اصلی که ٩٦٦٣ جفت‌باز طول داشت، حدود ٣٠٠ جفت‌باز کوتاه‌تر شد و به اندازه نهایی ٩٣٥٧ جفت‌باز رسید. این ناقل جدید SpTRV2 نام‌گذاری شد (شکل ١).

تخلیص و آماده‌سازی قطعات و اتصال قطعه ٢١٠٩ نوکلئوتیدی به بدنه اصلی ناقل

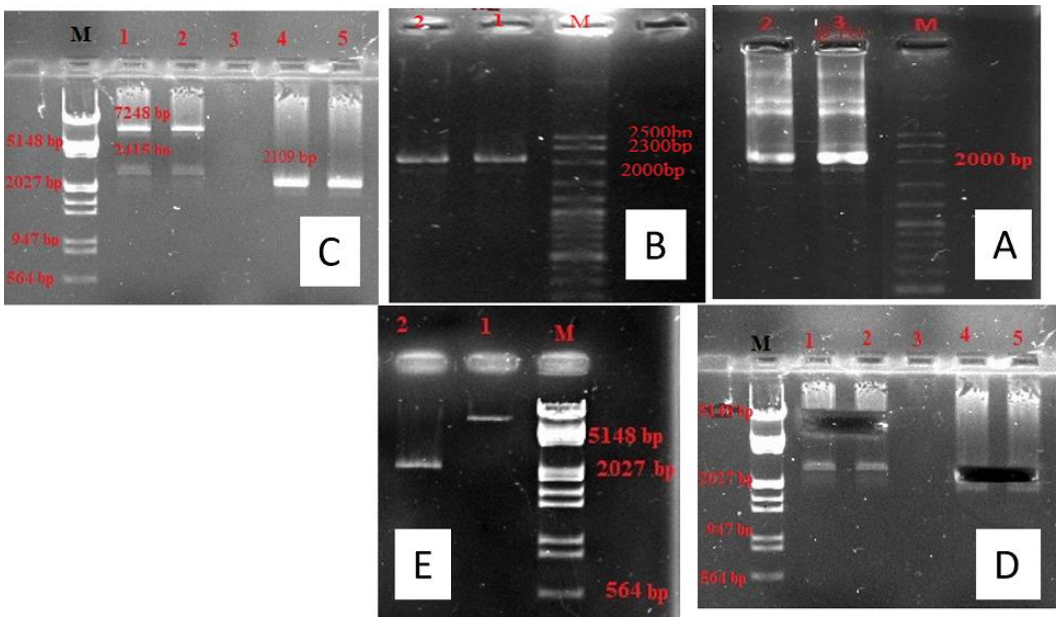
برای تولید قطعه جایگزین، از واکنش PCR با شرایط بهینه و آنزیم *Pfu* DNA Polymerase (به دلیل دقت بالا) و ناقل pTRV2 به عنوان الگو استفاده شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز (شکل A٢) نشان داد که آغازگرهای اختصاصی توانسته‌اند قطعه مورد نظر را با موفقیت تکثیر کنند. مشاهده باندی با طول دقیق ٢١٠٩ نوکلئوتید و شدت مناسب، حاکی از کارآمدی واکنش و بهینه بودن شرایط بود. پس از تایید PCR، قطعه ٢١٠٩ 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 B٢).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]



شکل ۱ – A) نقشه ناقل pTRV2. قسمت آبی رنگ که بخش بزرگتر ناقل pTRV2 است و قسمت کوچکتر ناقل که دارای ۲٤۱۵ نوکلئوتید و بین دو جایگاه آنزیم برشی EcoRI و HindIIIقرار داشت. B) نقشه ناقل کوتاه شده (SpTRV2) قسمت اضافه شده که دارای ۲۱۰۹ نوکلئوتید بود با رنگ آبی در شکل نمایش داده شده است.

Fig 1. A) Schematic representation of the pTRV2 vector. The larger portion of the pTRV2 vector is depicted in blue, while the smaller inserted fragment, consisting of 2,415 nucleotides and flanked by EcoRI and HindIII restriction sites, is also indicated. **B)** Schematic diagram of the shortened vector (SpTRV2). The inserted fragment, comprising 2,109 nucleotides, is highlighted in blue.



شکل ۲ – A) الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR. چاهک شماره ۲ و۳ باند ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی از ناقلpTRV2، **B)** الکتروفورز محصول خالص شده از ژل آگارز از محصول PCR. چاهک ۱ و ۲ دارای قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی خالص شده. **C)** الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pTRV2 و بخش ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی. چاهک ۱ و ۲ نشان دهنده برش ناقل pTRV2 به دو بخش بزرگتر و کوچکتر است و چاهک ٤ و ٥ محصول برش آنزیمی بخش ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی. **D)** جداسازی قسمت بزرگ‌تر پلاسمید pTRV2 و بخش ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی از ژل. چاهک ۱ و ۲ محصول برش هضم آنزیمی ناقل PTRV2 و چاهک ٤ و ٥ محصول هضم آنزیمی قطعه ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی است. **E)** تایید اندازه باندهای خالص شده، در چاهک ۱ باند خالص شده قسمت بزرگتر ناقل pTRV2 و در چاهک ۲ باند خالص شده بخش ۲۱۰۹ نوکلئوتیدی.

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.

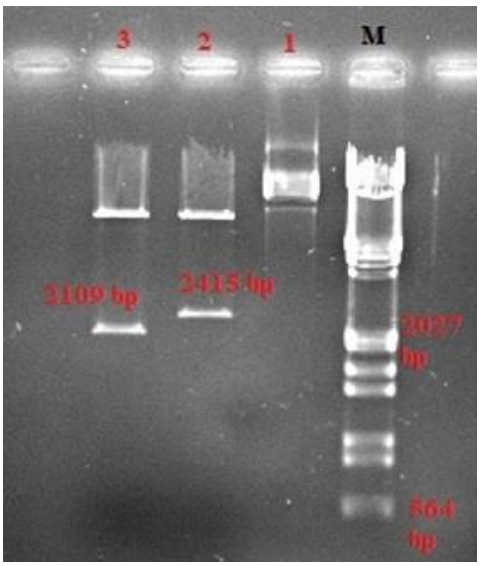
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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 *Eco*RI و *Hind*III قرار گرفتند. هضم ناقل pTRV2 منجر به تولید دو قطعه شد، یک قطعه بزرگتر (اسکلت ناقل) و یک قطعه کوچکتر (بخش حذف شونده ۲٤۱۵ نوکلئوتیدی) . قطعه بزرگتر ناقل با طول ۷۲٤۸ 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 خالص‌سازی شد. در نهایت، صحت خالص‌سازی 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 نوترکیب

محصولات واکنش اتصال به باکتری منتقل شده و باکتری‌ها کشت داده شدند. کلونی‌ها روی محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین ظاهر شدند. برای شناسایی کلونی‌هایی دارای ناقل نوترکیب (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 نوترکیب (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 ۲٤۱۵ نوکلئوتیدی بود (شکل ۳). در چاهک مربوط به ناقل نوترکیب (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)، موفقیت‌آمیز 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

ساخت ناقل‌های نوترکیب PpTRV2 و PSpTRV2 دارای پیشبر Pebv

جهت جداسازی پیشبر *Pebv*، آغازگرهای لازم با استفاده از نرم افزار Genome Compiler طراحی شده (شکل A٤) 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 '٥ آغازگرهای رفت و برگشت اضافه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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 B٤). شکل C٤ جداکردن قطعه را نشان می‌دهد(شکل C٤). الکتروفورز مجدد قطعه جداسازی شده از ژل یا همان پیشبر *Pebv*، خلوص و کیفیت بالای قطعه بازیابی شده را نشان داد (شکل D٤). 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 برش‌خورده الحاق شد تا ناقل‌های نوترکیب PpTRV2 (نسخه کامل) و PSpTRV2 (نسخه کوتاه‌شده) ایجاد شوند (شکل E٤). 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 نوترکیب بود (شکل F٤). 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 نوترکیب به باکتری منتقل شده و باکتری‌ها کشت شدند. کلون‌هایی از هر دو نسبت روی پلیت دارای کانامایسین مشاهده شد. حضور پلاسمیدهای نوترکیب دارای پیشبر الحاقی در کلونی‌ها با استفاده از تکنیک غربالگری توسط PCR و الکتروفورز محصولات تایید شد (شکل F٤).

همسانه‌سازی ژن GFP و ساخت ناقل‌های نهایی GPpTRV2 و GPSpTRV2

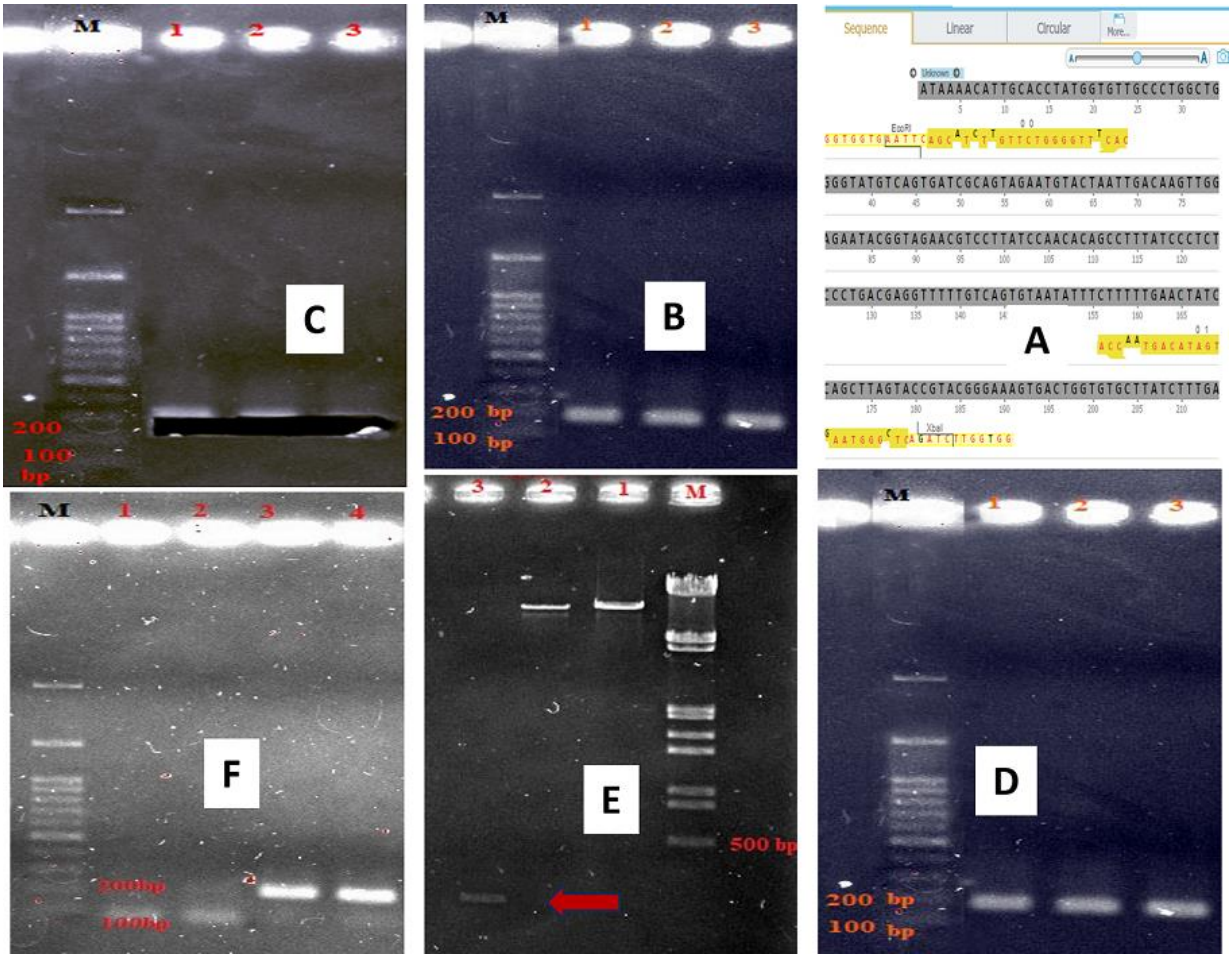
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آنزیم *Pfu DNA Polymerase* منجر به تکثیر اختصاصی قطعه ۷۰٦ نوکلئوتیدی ژن *GFP* از منبع *Pcap2-GFP* شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز، حضور تک‌باند ۷۰٦ نوکلئوتیدی را در موقعیت صحیح تایید کرد (شکل A٥). پس از تایید اولیه، قطعه مورد نظر از ژل آگارز جداسازی (شکل B٥) 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 C٥). برای ساخت ناقل‌های نهایی، غلظت قطعه *GFP* خالص‌شده و ناقل‌های خطی (PpTRV2 و PSpTRV2) با استفاده از مارکر وزنی تعیین شد (شکل D٥). سپس واکنش اتصال با نسبت‌های مولی بهینه‌سازی شده انجام شد که منجر به تولید ناقل‌های GPpTRV2 (با اندازه ۱۰۵۵۱ جفت‌باز) و GPSpTRV2 (با اندازه ۱۰۲٤٥ 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 نوترکیب تایید شد (شکلE٥). سپس این ناقل‌ها به سویه‌های GV3101 و (LBA4404 اگروباکتریوم منتقل شدند و صحت حضور آن‌ها دوباره با PCR تایید شد (شکل F٥).

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 A٦ تا D٦ 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 درجاتی 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 A٦ تا D٦).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]



شکل ٤- نتایج مربوط به تأیید ساختاری ناقل‌های pTRV2 و SpTRV2 و قطعه پیشبر. **A)** طراحی آغازگرهای اختصاصی پیشبر *Pebv* در نرم‌افزارGenome Compile **B)** الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه ۱۸۲ جفت‌بازی از پیشبر *Pcap2-Gfp* (چاهک‌های ۱–۳)، **C)** جداسازی قطعه ۱۸۲ جفت‌بازی از ژل آگارز (چاهک‌های ۱–۳)؛ **D)** تأیید نهایی قطعه خالص‌شده پیشبر با استفاده از کیت GF-1 ؛ چاهک ۱: قطعه خالص‌شده. **E)** تعیین غلظت نسبی ناقل‌های برش‌خورده pTRV2 (چاهک ۱)، SpTRV2 (چاهک ۲) و قطعه ۱۸۲ جفت‌بازی پیشبر *Pebv* (چاهک ۳)؛ **F**) تایید حضور پلاسمیدهای نوترکیب دارای پیشبر *Pebv*. چاهک ۱ و ۲ بدون قطعه الحاقی و چاهک ۳ و ٤ دارای باند ۱۸۲ جفت بازی می باشد. سایز مارکر مربوط به شکل های B، C و D (100 bp Plus, Vivantis) DNA، و سایز مارکر مربوط به شکل E (Lambda DNA/EcoRI+HindIII.) می‌باشد. سایز مارکر مربوط به شکل F هم VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis) می‌باشد.

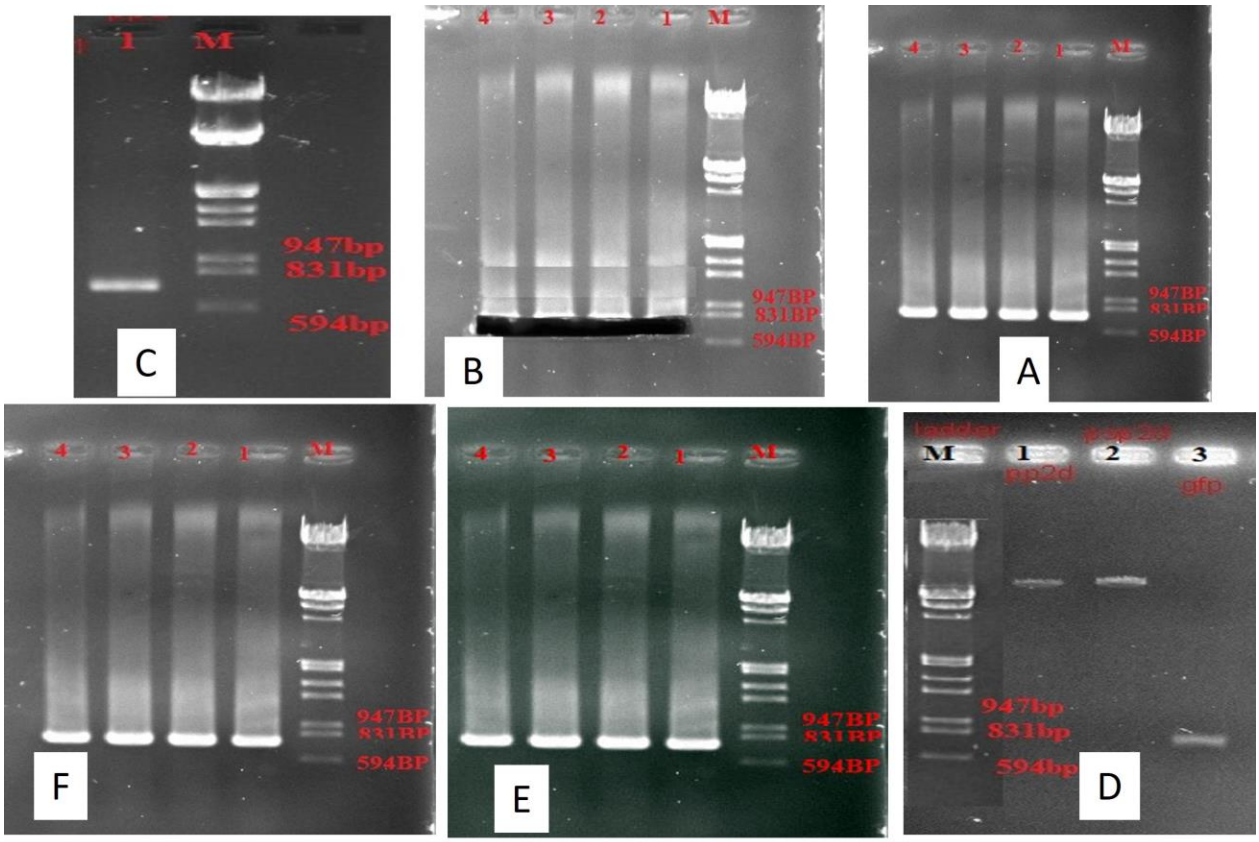
Fig 4. Results of structural verification of pTRV2 and SpTRV2 vectors and promoter fragment. **A)** Design of promoter-specific primers for *Pebv* using Genome Compiler software. **B)** Agarose gel electrophoresis of PCR products amplifying a 182-bp fragment of the *Pcap2-Gfp* promoter (lanes 1–3). **C)** 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

همان‌طور که در شکل های A۷ تا D۷ مشاهده می‌شود، در میان تیمارهایی که در روزهای مختلف بافر یا ناقل خالی pTRV2 دریافت کرده بودند، هیچ اختلاف معنی‌داری در میزان فلورسانس سبز ناشی از پروتئین GFP مشاهده نشد. این یافته نشان‌دهنده آن است که بیان پروتئین GFPدر این تیمارها رخ نداده است. در مقابل، در تیمارهایی که ناقل‌های دارای ژن *GFP* را دریافت کرده بودند، درجاتی از فلورسانس سبز مشاهده شد که احتمالاً نشان‌دهنده بیان این پروتئین است. در گیاهان ٦ هفته‌ای که با سویه LBA4404 تلقیح شده بودند، بیشترین مساحت فلورسانس سبز GFP در تیمارهای دارای ناقل اصلاح‌شده (GPSpTRV2) در روز آخر ارزیابی به‌دست آمد. این مقدار حدود ۱/٦ برابر بیشینه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

مساحت فلورسانس مشاهده‌شده 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 A۷). در گیاهان ٦ 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 GPpTRV2 در روز پانزدهم بود (شکل B۷). در گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404 ، حداکثر مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPSpTRV2 نیز در روز پانزدهم ثبت شد که حدود ۱/٤ برابر حداکثر مساحت مشاهده‌شده در تیمارهای GPpTRV2 در همان روز بود (شکل C۷).

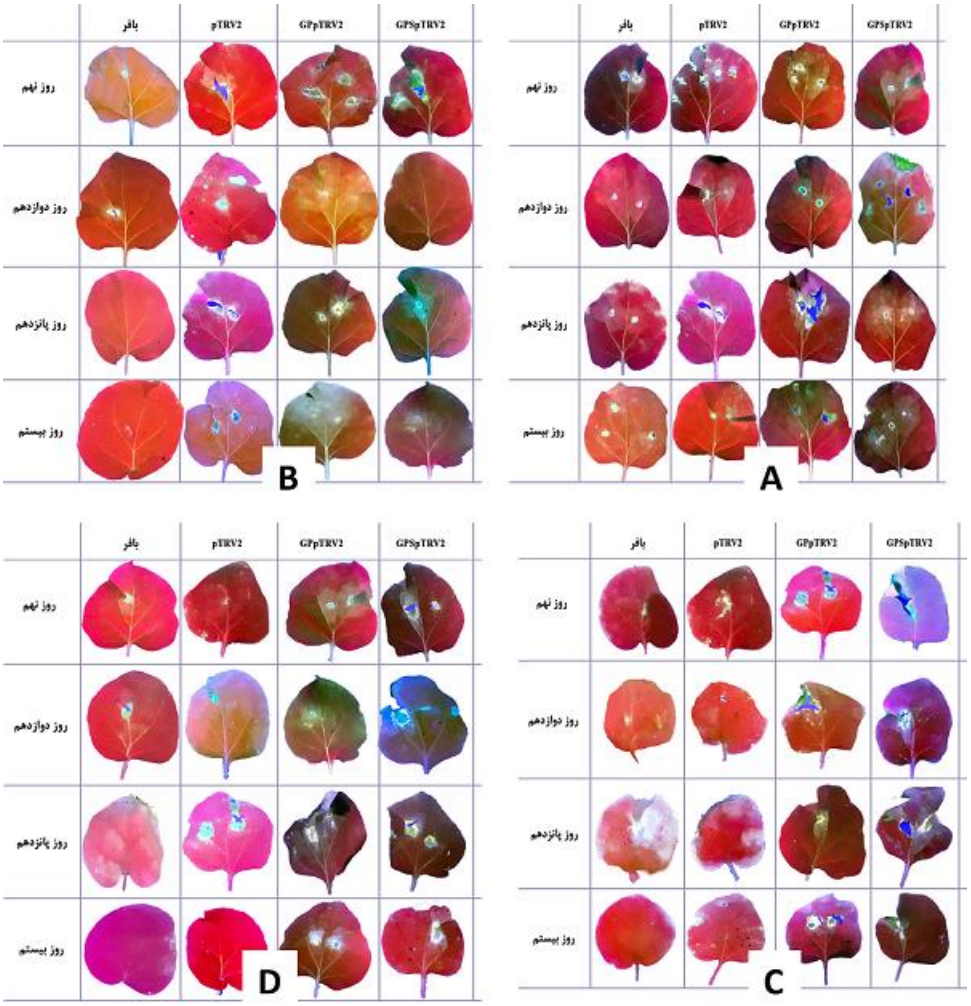


شکل ۵ – مراحل ساخت و تأیید سازه‌های بیانی دارای ژن *gfp* در ناقل‌های PpTRV2 و PSpTRV2. **A**) الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR قطعه ۷۰٦ جفت‌بازی *gfp* از سازه.*gfp*-Pcap2. چاهک‌های ۱ تا ٤ مربوط به باند *gfp* است. **B**) جداسازی قطعه ۷۰٦ جفت‌بازی *gfp* از ژل آگارز (چاهک‌های ۱ تا ٤). C) تأیید هویت باند خالص‌شده *gfp* پس از برش از ژل و استخراج با کیت. **D)** تعیین غلظت نهایی ناقل‌هایPpTRV2 ، PSpTRV2 و قطعه *gfp* پس از خالص‌سازی (چاهک ۱، ناقلPpTRV2؛ چاهک ۲، ناقلPSpTRV2؛ چاهک ۳، قطعه *gfp*). E) غربالگری کلونی‌های مثبت در *E. coli* با استفاده از PCR (چاهک‌های ۱ و ۲ کلونی‌های دارای سازه GPpTRV2 و چاهک‌های ۳ و ٤ کلونی‌های GPSpTRV2 هستند)، F) تأیید حضور قطعه *gfp* در سازه‌های نوترکیب داخل *A. tumefaciens* با استفاده از PCR ، چاهک ۱، GPpTRV2 در سویه GV3101؛ چاهک ۲ GPpTRV2در سویه LBA4404؛ چاهک ۳، GPSpTRV2 در سویه GV3101؛ چاهک ٤، GPSpTRV2 در سویه LBA4404. در تمام موارد، M نشان‌دهنده 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]



شکل ٦- 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 ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ **B**)گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101؛ **C**) گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ **D**) گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با GV3101. فلورسانس سبز نشان‌دهنده بیان موفق ژن gfp در بافت‌های گیاهی است.

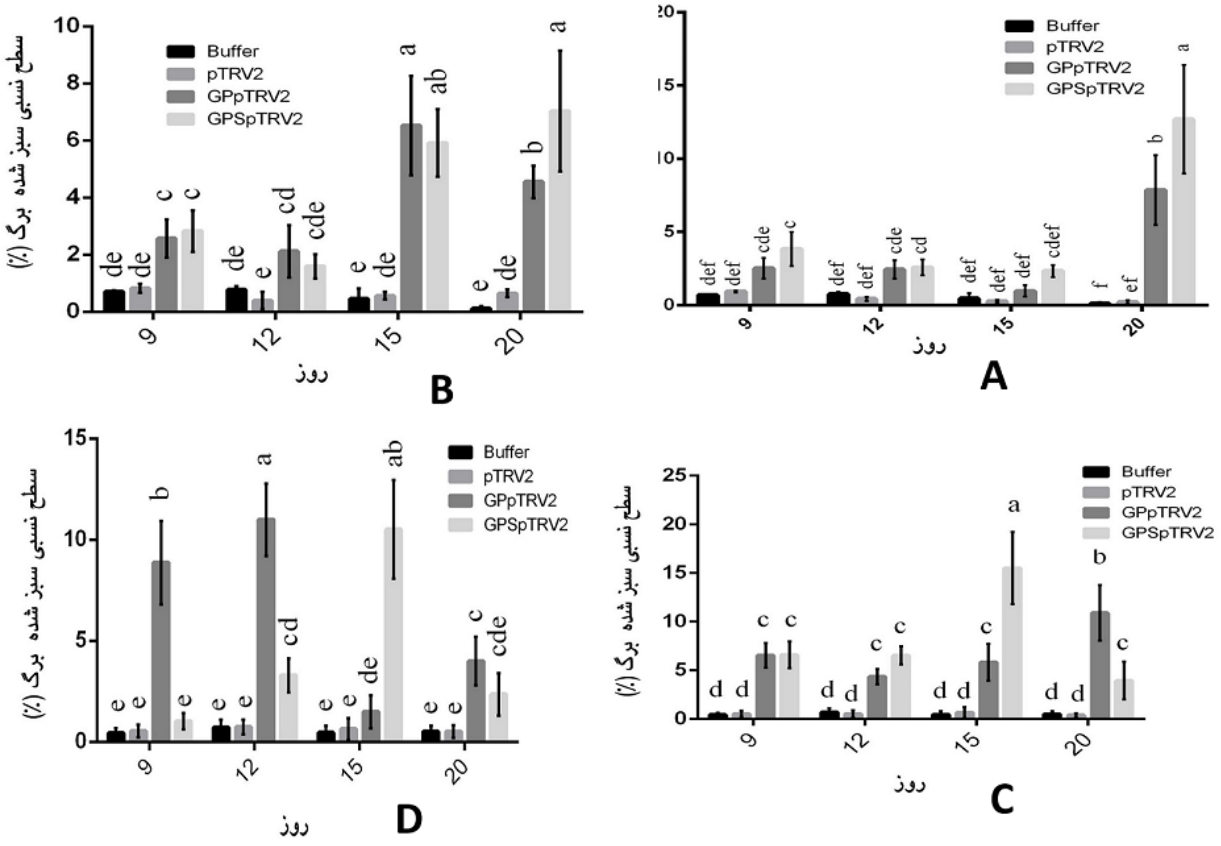
Fig 6. Green fluorescent protein (GFP) fluorescence imaging under ultraviolet (UV) light in leaves of *Nicotiana tabacum* plants transformed with different *A. tumefaciens* strains carrying the *gfp* reporter gene. **(A)** Six-week-old plants inoculated with strain LBA4404; **(B)** Six-week-old plants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

در گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101 ، بیشینه مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPpTRV2 در روز دوازدهم به‌دست آمد که به‌طور تقریبی معادل ١/٠٤ برابر حداکثر مساحت فلورسانس در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم بود. از سوی دیگر، میانگین کلی مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPpTRV2 حدود ١/٤٥ برابر میانگین مربوط به تیمارهای GPSpTRV2 بود (شکل DV). در گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101 ، بیشترین مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای دارای ناقل GPSpTRV2 در روز دوازدهم پس از تلقیح مشاهده شد که حدود ١/٠٧ برابر بیشینه مساحت فلورسانس ثبت‌شده در تیمارهای GPpTRV2 در روز پانزدهم بود (شکل BV). در گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404 ، حداکثر مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPSpTRV2 نیز در روز پانزدهم ثبت شد که حدود ١/٤ برابر حداکثر مساحت مشاهده‌شده در تیمارهای GPpTRV2 در همان روز بود (شکل CV). در گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101 ، بیشینه مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPpTRV2 در روز دوازدهم به‌دست آمد که به‌طور تقریبی معادل ١/٠٤ برابر حداکثر مساحت فلورسانس در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم بود. از سوی دیگر، میانگین کلی مساحت فلورسانس سبز در تیمارهای GPpTRV2 حدود ١/٤٥ برابر میانگین مربوط به تیمارهای GPSpTRV2 بود (شکل DV).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

اثر نوع سویه باکتری بر میزان فلورسانس سبز

نتایج حاصل از تحلیل آماری نشان داد که در گیاهان ٦ هفته‌ای، میانگین مساحت فلورسانس سبز در گیاهان تلقیح‌شده با سویه LBA4404 حدود ١/٠٦ برابر میانگین مساحت فلورسانس در گیاهان تلقیح‌شده با سویه GV3101 بود. همچنین، بیشینه مساحت فلورسانس در گیاهان تلقیح‌شده با LBA4404 دارای ناقل GPSpTRV2 ، حدود ١/٨ برابر بیشینه مساحت مشاهده‌شده در گیاهان تلقیح‌شده با GV3101 دارای همان ناقل بود (شکل‌های A٧ و B٧). در گیاهان ٤ هفته‌ای نیز میانگین مساحت فلورسانس سبز در گیاهان تلقیح‌شده با سویه LBA4404 حدود ١/٤١ برابر میانگین مربوط به گیاهان تلقیح‌شده با سویه GV3101 بود. علاوه بر این، بیشینه مساحت فلورسانس در گیاهان تیمارشده با LBA4404دارای ناقل GPSpTRV2، حدود ١/٤١ برابر بیشینه مساحت معادل در گیاهان تلقیح‌شده با GV3101 دارای ناقل GPpTRV2 گزارش شد (شکل‌های C٧ و D٧).



شکل ٧- میانگین درصد سطح سبزشده برگ به‌عنوان شاخصی از بیان پروتئین GFP در گیاهان تنباکو پس از تلقیح با ناقل‌های مختلف TRV. **A)** گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ **B)** گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101؛ **C)** گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه LBA4404؛ **D)** گیاهان ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ٠/٠١ (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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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 ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با ناقل GPpTRV2و سویه LBA4404، کمینه و بیشینه مساحت فلورسانس سبز به‌ترتیب در روزهای دوازدهم و بیستم پس از تلقیح مشاهده شد. در گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده با ناقل GPSpTRV2و 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 ٤ هفته‌ای تلقیح‌شده با سویه GV3101 ، بیشترین مساحت فلورسانس در تیمارهای GPpTRV2 در روز دوازدهم و در تیمارهای GPSpTRV2 در روز پانزدهم ثبت شد. در گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح‌شده باGV3101، بیشینه فلورسانس در روز پانزدهم در تیمار GPpTRV2 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 (GPpTRV2) 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 ۲۰۲۲در 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 خارجیِ 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 قابل‌توجه بیان پروتئین با کاهش ۳۰۰ جفت‌بازی ژنوم TRV2 بود. این تغییر، نه تنها منجر به کاهش اندازه کلی ناقل از ۹٦٦۳ به ۹۳۵۷ جفت‌باز شد، بلکه سرعت انتشار سیستمی و پایداری RNA ویروسی را نیز افزایش داد. داده‌های کمّی نشان داد که ناقل کوتاه‌شده (GPSpTRV2) در گیاهان ٦ هفته‌ای تلقیح شده با سویه LBA4404 اگروباکتریوم در روز بیستم، ۱/٦ برابر، سطح فلوئورسانس GFP را نسبت به نسخه بومی (GPpTRV2) 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 برگی 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 برTRV)، کارایی تولید پروتئین‌های نوترکیب را در گیاهان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Peyret & Lomonossoff, 2023).

وجود این پیشبر در سازه‌های GPpTRV2 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*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

benthamianaa با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و با واسطه یک وکتور مشتق‌شده از ویروس جغجقه‌ای توتون (TRV) توسعه داده شد. در این پژوهش، RNA راهنما (gRNA) تحت کنترل پیشبر ویروسی *Pebv* ، موفق به القای شکست‌های دو رشته‌ای هدفمند در ژن‌های گیاه شدند (Ali et al., 2015). در مقاله مروری در مورد طراحی ناقل‌های ویروسی گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، بیان شده است که مهندسی ناحیه پیشبر و بهینه‌سازی توالی‌های غیرکدکننده در TRV می‌تواند کارایی بیان پروتئین‌های هدف را افزایش داده و این ویروس را به گزینه‌ای مناسب برای بیان موقت در گونه‌های مختلف گیاهی تبدیل کند (Abrahamian *et al*., 2020).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که پیشبرهای ویروسی مانند *Pebv*، *CaMV 35S* یا *P19-enhanced promoters* ، می‌توانند با تعامل با فاکتورهای رونویسی گیاهی (مانند TFIID و WRKY) بیان ژن را به‌طور اختصاصی در بافت‌های 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 پاسخ‌های دفاعی گیاهی را کاهش می‌دهد. عاملی که می‌تواند بر پایداری بیان پروتئین تأثیر مستقیم داشته باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که سویه LBA4404 در گیاهان ٤ هفته‌ای به‌طور معنی‌داری (١/٤١ برابر) بیان بالاتری نسبت به GV3101 دارند. سویه LBA4404 فاقد ژن *virG* القاکننده پاسخ‌های التهابی است. این ویژگی ممکن است منجر به القای ضعیف‌تر پاسخ‌های ایمنی در گیاه شود (Hellens *et al*., 2000). از سوی دیگر، GV3101 به‌دلیل دارا بودن پروتئین P19 به عنوان یک سرکوب‌کننده قوی RNA silencing در برخی سیستم‌ها عملکرد بهتری دارد (Voinnet *et al*., 1999). با این حال، در سکوی TRV که خود دارای عناصر سرکوب‌کننده RNAi است (مانند پروتئین K١٦)، افزودن P19 ممکن است منجر به بار تنظیمی اضافی شود و در نتیجه، عملکرد GV3101 کاهش یابد. این موضوع تأکید می‌کند که انتخاب سویه اگرباکتریوم 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 آگروباکتریوم LBA4404 و GV3501 بررسی شد و نشان داده شد که برهم‌کنش میان ژنوتیپ میزبان، ویژگی‌های سویه باکتریایی و سیگنال‌های درون‌سلولی هدف‌گیری پروتئین، نقشی تعیین‌کننده در موفقیت فرآیند بیان موقت ایفا می‌کند(Mirakhorli *et al*., 2014).

یکی از یافته‌های دیگر این پژوهش، نقش تعیین‌کننده سن گیاه در دینامیک بیان پروتئین بود. در گیاهان ٤ هفته‌ای، اوج بیان در روزهای ١٢–١٥ رخ داد، در حالی که در گیاهان ٦ هفته‌ای، این اوج به روز ٢٠ کشیده شد. تفاوت در سطح بیان احتمالاً ناشی از تغییرات فیزیولوژیکی گیاه است. گیاهان جوان‌تر (معمولاً ٤ تا ٦ هفته‌ای) به دلیل نرخ تقسیم سلولی بالاتر و نفوذپذیری بیشتر بافت، معمولاً پاسخ‌های سریع‌تر و سطوح بیان بالاتری در سیستم‌های موقت نشان می‌دهند. در مقابل، در گیاهان مسن‌تر، فعال‌سازی سریع‌تر مکانیسم‌های دفاعی میزبان مانند خاموشی RNA می‌تواند منجر به کاهش تدریجی تجمع ویروس و پایداری کمتر بیان شود (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). این یافته‌ها بر ضرورت هماهنگی دقیق بین سن گیاه، زمان تلقیح و زمان برداشت تأکید می‌کنند، ویژگی‌ای که در طراحی فرآیندهای صنعتی تولید پروتئین در گیاهان حیاتی است. برای بهترین نتیجه در آگروانفیلتراسیون موقت، بهتر است از گیاهان *N. benthamiana* با سن ٤ تا ٦ هفته استفاده شود. گیاهان کمتر از ٣ هفته بافت‌های بسیار نرم و حساسی دارند که ممکن است در حین تزریق آسیب ببینند و هنوز به بلوغ کافی برای بیان بالای پروتئین نرسیده‌اند. در گیاهان بیش از ٦ هفته هم دیواره سلولی ضخیم‌تر می‌شود و نفوذپذیری *آگروباکتریوم* کاهش می‌یابد. همچنین مکانیسم‌های دفاعی گیاه (Silencing) در گیاهان مسن‌تر فعال‌تر هستند که می‌تواند بیان ژن خارجی را سرکوب کند (Sparkes et al., 2006).

با توجه به کارایی بهبودیافته GPSpTRV2، این سکو می‌تواند در آینده برای تولید واکسن‌های گیاهی استفاده شود. به‌عنوان مثال، TRV اخیراً برای بیان آنتی‌ژن‌های SARS-CoV-2 (مانند پروتئین اسپایک) در *N. benthamiana* استفاده شده و پاسخ‌های ایمنی قوی در مدل‌های حیوانی القا کرده است (Phoolcharoen *et al*., 2023). سرعت تولید (کمتر از ٣ هفته)، عدم نیاز به تصفیه پیچیده و امکان تزریق مستقیم از مزیت های کلیدی این رویکرد است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان پیشنهاداتی به شرح زیر برای مطالعات مرتبط در آینده داد. جایگزینی با پیشبرهای القاشونده مثلا استفاده از پیشبرهای نور یا حرارت القایی می‌تواند کنترل زمان‌بندی‌شده‌تری 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 *scfv*، 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.

منابع

References

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.1365-313X.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.

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

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.1365-313X.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.1365-313X.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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]

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 benthamianaa. 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.5]