


## **Designing and constructing recombinant expression cassettes for production and secretion of recombinant proteins in the hairy root**

**Shaghayegh Afraz** 

PhD Student of plant biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: s.afraz.69@gmail.com

**Atena Mozafari** 

PhD Student of plant biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: amozafari@nigeb.ac.ir

**Ali Hatf Salmanian** 

\*Corresponding author. Professor, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: salman@nigeb.ac.ir

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

The use of plant expression systems to produce recombinant proteins have advantages such as different methods for transformation and culture, occurrence of appropriate post-translational modifications and no risk of contamination with animal and microbial pathogens. However, low productivity in these expression systems have always been a major challenge. Secretion-based expression systems, such as Hairy Root Cultures (HRCs), is a convenient way to continuously produce active ingredients without the need for plant tissue degradation, which will facilitate the purification process and significantly reduce related costs. This study aimed to designing and constructing vectors carrying NtREL1 root specific promoter in combination with patatin, pectin methyl esterase and calreticulin signal peptides at the same time in order to increase the specific expression of recombinant proteins in hairy root culture and their subsequent secretion into hydroponic medium.

#### **Materials and methods**

The nucleotide sequence of NtREL1 root specific promoter, patatin, pectin methyl esterase and calreticulin signal peptides were retrieved from NCBI database. To identify cis acting regulatory elements involved in specific expression, the NtREL1 sequence was investigated by PLACE and

PLANT CARE softwares. Bioinformatics studies were performed to design pBI121 expression vector with NtREL1 promoter in combination with signal peptides and appropriate restriction sites. After receiving the synthetic fragments in pUC57 vector, the fragments were digested by restriction endonuclease and sub cloned in pBI121 expression vector.

## Results

Examination of the NtREL1 promoter showed that this promoter is rich in AT nucleotides. These sequences can improve the recognition process by transcription systems and increase gene expression due to their ease of conversion from double-stranded to single-stranded form. The accuracy of NtREL1 promoter sub cloning upstream of patatin, pectin methyl esterase and calreticulin signal peptides in pBI121 expression vector were confirmed using colony PCR, digestion reactions and sequencing.

## Conclusions

Since pBI121-based expression vectors are more efficient than other expression vectors and widely used in genetic transformation and expression of recombinant proteins in plants, this recombinant vectors can be applied effectively for recombinant protein production and its secretion in expression systems like hairy root culture.

**Keywords:** expression vector, Root specific promoter, Signal peptide.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Afraz S, Mozafari A, Salmanian AH (2022) Designing and constructing recombinant expression cassettes for production and secretion of recombinant proteins in the hairy root. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 1-20.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 1-20.

DOI: 10.22103/jab.2022.18504.1354

Received: February 8, 2022.

Received in revised form: March 7, 2022.

Accepted: March 8, 2022.

Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian  
Biotechnology Society.

© the authors

## طراحی و ساخت سازه‌های بیانی نوترکیب به منظور تولید و ترشح پروتئین‌های نوترکیب در

### ریشه‌های موئین

#### شقایق افراز

دانشجوی دکتری، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. رایانامه: s.afraz.69@gmail.com

#### آتنا مظفری

دانشجوی دکتری، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. رایانامه: amozafari@nigeb.ac.ir

#### علی هاتف سلمانیان

\*نویسنده مسئول: استاد، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. رایانامه: salman@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

### چکیده

**هدف:** استفاده از سیستم‌های بیانی گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارای مزایایی از جمله وجود روش‌های متفاوت تراریختی و کشت، وقوع تغییرات مناسب پس از ترجمه و عدم خطر آلودگی با عوامل بیماری‌زای حیوانی و میکروبی می‌باشد. با این حال میزان کم تولید محصول در این سیستم‌های بیانی، همواره به عنوان چالشی عمده مطرح است. سیستم‌های بیانی مبتنی بر ترشح در کشت ریشه‌های موئین، می‌توانند راه کار مناسبی برای تولید پیوسته مواد موثره بدون نیاز به تخریب بافت گیاهی باشند و به نوبه خود، موجب سهولت فرآیند خالص سازی و کاهش قابل توجه هزینه‌های مربوط به آن شوند. این پژوهش با هدف طراحی و ساخت سازه‌هایی با تلفیق همزمان پیشبر اختصاصی ریشه NtREL1 با سه ترادف نشانه پاتاتین، پکتین متیل استراز و کالرتیکولین برای افزایش بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در کشت ریشه‌های موئین و در ادامه ترشح آنها به درون محیط کشت مایع به انجام رسید.

**مواد و روش‌ها:** توالی نوکلئوتیدی پیشبر اختصاصی ریشه‌ای NtREL1 و پپتیدهای نشانه پاتاتین، پکتین متیل استراز و کالرتیکولین از پایگاه داده NCBI دریافت گردید. توالی این پیشبر به منظور شناسایی عناصر تنظیمی Cis دخیل در بیان اختصاصی ریشه‌ای توسط نرم افزارهای PLACE و PLANT CARE مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور طراحی سازه‌های بیانی pBI121 واجد توالی نوکلئوتیدی پیشبر در ترکیب با پپتیدهای نشانه به انجام رسید و جایگاه‌های برشی مناسب در دو سر قطعات مورد نظر طراحی گردید. پس از دریافت قطعات سنتزی در ناقل pUC57، قطعات با واکنش هضم آنزیمی جداسازی شده و در سازه بیانی pBI121 همسانه‌سازی شدند.

**نتایج:** بررسی پیشبر NtREL1 نشان داد این پیشبر، غنی از نوکلئوتیدهای AT است. این توالی‌ها به دلیل سهولت در تبدیل از شکل دو رشته‌ای به تک رشته‌ای، موجب بهبود فرآیند شناسایی توسط سیستم‌های رونویسی و افزایش بیان ژن‌ها می‌شوند. صحت هم‌سانه‌سازی پیشبر NtREL1 در ترکیب با سه پپتید نشانه پاتاتین، پکتین متیل استراز و کالرتیکولین در سازه بیانی pBI121 با استفاده از واکنش کلونی پی‌سی‌آر، هضم آنزیمی و توالی‌یابی قطعات هم‌سانه‌سازی شده در سازه بیانی pBI121 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تأیید شد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که ناقل‌های بیانی مبتنی بر pBI121 نسبت به سایر ناقل‌های بیانی، کارایی بالایی داشته و به طور گسترده در پروژه‌های تراریزش ژنتیکی و بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، ناقل‌های نوترکیب ساخته شده در این پژوهش می‌توانند به نحوی موثر برای تولید و ترشح پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی، مانند کشت ریشه‌های موئین مورد استفاده قرار گیرند.

**کلیدواژه‌ها:** سازه بیانی، پیشبر اختصاصی ریشه، پپتید نشانه

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** افراز شقایق، مظفری آتنا، سلمانیان علی هاتف (۱۴۰۱) طراحی و ساخت سازه‌های بیانی نوترکیب به منظور تولید و ترشح پروتئین‌های نوترکیب در ریشه‌های موئین. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۱-۲۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant  
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian  
Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب مبتنی بر گیاهان تراریخت و یا کشت بافت آنها در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌توانند به عنوان سیستم‌هایی کارآمد برای ساخت پروتئین‌های با ارزش دارویی، آنتی‌بادی‌های نوترکیب و واکنش‌ها مورد استفاده قرار گیرند

(Häkkinen et al. 2014). این سیستم‌های بیانی دارای مزایای متعددی از جمله سهولت تراریختی، کشت و تکثیر توده زیستی بالا و هزینه نسبتاً کم تولید می‌باشند (Mozafari et al. 2015; Schillberg et al. 2019; Varasteh-Shams et al. 2020). با این حال، به دلیل پایین بودن میزان تولید و بالا بودن هزینه‌های استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب تولیدی از گیاهان تراریخت، تاکنون مطالعات متعددی به منظور افزایش میزان تولید در سیستم‌های بیانی گیاهی صورت گرفته است. یکی از راه کارهای مورد توجه محققین در سال‌های اخیر، استفاده از سیستم‌های مبتنی بر ترشح، مثل کشت ریشه‌های مؤین برای تولید مواد موثره است که امکان تولید پیوسته این مواد را بدون نیاز به تخریب بافت گیاهی فراهم می‌آورد (Kim et al. 2011). از مزایای این سیستم‌های بیانی می‌توان به قابلیت رشد و تکثیر سریع در محیط‌های کشت فاقد هورمون‌های گیاهی، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی بالا و قابلیت ترشح پیوسته محصولات به درون محیط کشت اشاره نمود (Pham et al. 2012). مورد اخیر، می‌تواند موجب سهولت خالص‌سازی مواد ترشحي و کاهش قابل توجه هزینه‌های مربوط به آن شود (Ñopo et al. 2012). اگرچه گزارشات متعددی در خصوص روش‌های بهینه‌سازی بیان پروتئین‌ها در سیستم‌های بیانی گیاهی مبتنی بر ترشح موجود است، اما در بسیاری موارد دستیابی به سطوح بیانی مناسب جهت تجاری‌سازی محصولات با موفقیت چندان همراه نبوده است (Drake et al. 2009). از راه کارهایی که می‌تواند به نحو موثری منجر به افزایش میزان بیان در سیستم‌های بیانی ترشحي شود، استفاده از پیشبرهای اختصاصی بافت ریشه است (Zhang et al. 2016) که با محدود نمودن نسبی بیان به بافت ریشه، می‌تواند موجب حفظ انرژی گیاه و تمرکز در تولید بافتی شود (Carneiro and Carneiro 2011). علاوه بر این، کاربرد موفقیت آمیز پپتیدهای نشانه اختصاصی شبکه اندوپلاسمی در هدایت هدفمند پروتئین‌های تولید شده به سمت مسیرهای ترشحي در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Aleinein et al. 2015; Gurusamy et al. 2017; Huet et al. 2014; Ñopo et al. 2012; Pham et al. 2012).

در این مطالعه، طراحی و ساخت سازه‌های بیانی با استفاده هم‌زمان از پیشبر اختصاصی ریشه‌ای و پپتیدهای نشانه شبکه اندوپلاسمی انجام شد. پیشبر دائمی و اختصاصی NtREL1 با طول ۱۵۲۹ جفت باز در گیاه تنباکو و در بالادست ژن کدکننده پروتئین‌های شبه اکستنسین<sup>۱</sup> واقع شده است که دارای بیان بالایی در بافت ریشه هستند (Zhang et al. 2016). این پیشبر، به دلیل دارا بودن عناصر تنظیمی سیس<sup>۲</sup> بر روی خود، دارای عملکرد اختصاصی در بافت ریشه بوده و می‌تواند ضمن قرارگیری در بالادست ژن هدف، سطوح بالایی از بیان اختصاصی را در این بافت موجب شود. علاوه بر این، پپتیدهای نشانه پاتاتین از پروتئین ذخیره‌ای سیب‌زمینی (Ñopo et al. 2012)، پکتین متیل استراز از آرابیدوپسیس (Huet et al. 2014) و کالرتیکولین از *Nicotiana plumbaginifolia* (Aleinein et al. 2015; Gurusamy et al. 2017; Pham et al. 2012) در ترکیب با پیشبر NtREL1، با هدف بهینه‌سازی ترشح پروتئین‌های نوترکیب تولید شده به درون محیط کشت مایع، مورد استفاده قرار

<sup>1</sup> Extensin-like protein

<sup>2</sup> Cis acting elements

گرفتند. کارایی پیشبر NtREL1 و هریک از سه پپتید نشانه ذکر شده در بالا، پیش تر و به طور مجزا در مطالعاتی مورد بررسی قرار گرفته بود و در این پژوهش، به منظور افزایش سطوح بیان اختصاصی ریشه‌ای و ترشح هدفمند پروتئین‌های تولید شده در بافت ریشه به درون محیط کشت، این عناصر به صورت هم‌زمان و در ترکیب با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفتند. سازه‌های بیانی مورد اشاره پس از انجام مطالعات بیوانفورماتیکی، ضمن در نظر گرفتن جایگاه‌های برشی مناسب، طراحی و ساخته شدند. پس از انجام همسانه‌سازی و جایگزینی بخش پیشبر و ترادف‌های نشانه با پیشبر عمومی CaMV35S در بالادست ژن *gus*، صحت همسانه‌سازی این سازه‌های بیانی با روش کلونی پی‌سی‌آر، بررسی الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. این سازه‌های بیانی می‌توانند در پژوهش‌های مرتبط با تولید پروتئین نوترکیب در سیستم ترش‌حی ریشه‌های موئن به منظور کاهش هزینه‌های استخراج و خالص‌سازی مورد استفاده قرار گیرند.

## مواد و روش‌ها

**بازیابی توالی پیشبر و پپتیدهای نشانه منتخب:** توالی پیشبر اختصاصی ریشه‌ای NtREL1 به طول ۱۵۲۹ جفت باز از توالی ژنوم تنباکو (شماره دسترسی GCA\_000715135.1) و توالی پپتیدهای نشانه کالرتیکولین به طول ۸۱ نوکلئوتید (CAA95999.1)، پاتاتین به طول ۷۲ نوکلئوتید (CAA25592.1) و پکتین متیل استراز به طول ۷۸ نوکلئوتید (Q84WM7.1) از پایگاه داده NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج گردیدند. به منظور شناسایی عناصر تنظیمی سپس دخیل در بیان اختصاصی، توالی پیشبر با استفاده از نرم‌افزارهای PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/place>) و PLANT CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) مورد بررسی قرار گرفت. اتصال دو بخش پیشبر و پپتیدهای نشانه به نحوی صورت گرفت که این قطعات در قالب یک بخش تنظیمی واحد، جایگزین پیشبر عمومی CaMV35S در بالادست ژن گزارشگر *gus* در سازه بیانی pBI121 شوند.

**طراحی سازه‌های بیانی نوترکیب:** جایگاه آنزیم‌های برشی مورد نیاز برای همسانه‌سازی، در ابتدا و انتهای توالی پپتیدهای نشانه و پیشبر طراحی شدند. برای انتخاب آنزیم‌های برشی که جایگاه شناسایی آنها در ناقل بیانی pBI121 وجود نداشت از نرم‌افزار NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) استفاده شد. به دلیل اهمیت حضور جایگاه تنظیمی ۶ نوکلئوتیدی کزاک (Kozak, 1989) G/ACCACC در بالادست ژن مورد نظر، جایگاه برشی *KpnI* (GGTACC) در بالادست توالی پپتیدهای نشانه قرار داده شد تا از این طریق، قسمتی از ترادف کزاک (زیر آن خط کشیده شده است) نیز در این بخش ایجاد شود. جایگاه‌های برشی در ابتدا و انتهای پیشبر NtREL1 و پپتید نشانه کالرتیکولین به گونه‌ای قرار گرفت که امکان همسانه‌سازی پیشبر NtREL1 در سازه pBI121 و در بالادست ژن *gus*، به تنهایی یا به همراه پپتید نشانه کالرتیکولین به انجام رسد. برای همسانه‌سازی پیشبر NtREL1، جایگاه برشی *HindIII* (AAGCTT) در ابتدا و جایگاه برشی *XbaI* (TCTAGA) در

در انتهای آن قرار گرفت. برای همسانه‌سازی پیشبر به همراه پپتید نشانه کالرتیکولین، جایگاه برشی *Cfr9I* (CCCGGG) در انتهای پپتید نشانه کالرتیکولین قرار داده شد. به منظور همسانه‌سازی پپتیدهای نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز، به دلیل کوتاه بودن این توالی‌ها و دشواری همسانه‌سازی، از روش دیگری استفاده شد. در این روش، قطعه ابتدایی ژن *gus* به همراه پپتیدهای نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز به نحوی طراحی شد که جایگاه برشی *XbaI* در بالادست ژن کد کننده هر دو پپتید نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز، قرار گیرد تا بتوان آنها را جهت سنجش عملکرد، متعاقباً در پایین دست پیشبر NtREL1 در سازه بیانی نو ترکیب واجد این پیشبر، همسانه‌سازی نمود. از جایگاه برشی *SnaBI* که در داخل ژن گزارشگر *gus* نیز موجود بود، استفاده شد تا قطعه ژنی طراحی شده مشتمل بر این دو پپتید نشانه به همراه بخشی از ژن *gus* باشد. قطعات طراحی شده از نظر بیوانفورماتیکی با استفاده از نرم افزار آنلاین EXPASY translate (<https://web.expasy.org/translate/>) مورد بررسی قرار گرفتند تا در نهایت به صورت نظری از موفقیت آمیز بودن امکان بیان پروتئین نو ترکیب پس از قرارگیری پیشبر و پپتید نشانه در بالادست آن اطمینان حاصل شود. همچنین به منظور مشخص نمودن محل دقیق برش و برداشته شدن پپتیدهای نشانه و تعداد آمینواسیدهای احتمالی که پس از برش آنزیمی به ابتدای پروتئین نو ترکیب تولید شده، افزوده میگردد، از نرم افزار SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) استفاده شد. پس از طراحی، این توالی‌ها توسط شرکت بیوماتیک کانادا (<https://www.biomatik.com>) ساخته شدند. برای تأیید همسانه‌سازی قطعات ژنی ساخته شده در سازه بیانی pBI121، آغازگرهای اختصاصی متناظر هر یک از قطعات ژنی طراحی و ساخته شد. ویژگی‌ها و ساختارهای ثانویه احتمالی آغازگرهای طراحی شده با کمک نرم‌افزار Oligo 7 بررسی و سپس توسط شرکت سیناکلون ساخته شدند. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی (بخش‌های مشخص شده، محل برش آنزیمی است)

**Table 1. The sequences of forward and reverse specific primers (Restriction sites were highlighted)**

نام آغازگر	توالی آغازگر	جایگاه آنزیمی
Primer name	Primer sequence	Restriction site
NtREL F	5' GC <b>AAGCTI</b> GAATATCTTCAGTATATTCGTTGTG 3'	<i>HindIII</i>
NtREL R	5' GC <b>TCTAGA</b> TATAGCTAGCTAATACCCACC 3'	<i>XbaI</i>
Calret F	5' GC <b>GGTACC</b> ATGGCTACTCAACGAAGGGCA 3'	<i>KpnI</i>
Calret R	5' GC <b>CCCGGG</b> TAAGCGGAGACGACAG 3'	<i>Cfr9I</i>
Pape F	5' GCCACAATTTCTACGCATG 3'	
Pape R	5' GCCGTTTTTCGTCGGTAATCAC 3'	

**همساز سازی قطعات طراحی شده در سازه بیانی pBI121: ترادف‌های نوکلئوتیدی طراحی شده شامل پیشبر NtREL1 و ژن کد کننده پپتید نشانه کالرتیکولین (NtCal) و ژن‌های کد کننده دو پپتید نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز به همراه بخشی از ژن *gus* (Pa-gus و Pe-gus) پس از ساخت، روی پلاسمید pUC57 در حالت لیوفیلیزه دریافت گردیدند و تراریختی سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد (Sambrook and Russell 2001). باکتری‌های *E. coli* رشد کرده بر روی محیط واجد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$ ) با استفاده از روش کلونی پی‌سی‌آر بررسی شدند تا از حضور پلاسمید نوترکیب در باکتری اطمینان حاصل شود. به منظور همساز سازی پیشبر NtREL1 (بدون پپتید نشانه) و همراه با پپتید نشانه‌ی کالرتیکولین در بالادست ژن *gus* در پلاسمید pBI121، عملیات هضم آنزیمی به ترتیب با آنزیم‌های برشی *HindIII - XbaI* و *HindIII - Cfr9I* (هر یک با غلظت ۱۰ واحد بر میکرولیتر) انجام شد. همچنین سازه بیانی pBI121 واجد ژن گزارشگر *gus*، به منظور خروج پیشبر CaMV35S و جایگزین نمودن بخش‌های مورد نظر با استفاده از همین آنزیم‌ها مورد هضم قرار گرفت. برای ساخت سازه‌های بیانی واجد پیشبر NtREL1 و پپتیدهای نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز، قطعات واجد پپتید نشانه توسط هضم آنزیمی ناقل همساز سازی با دو آنزیم *XbaI* و *SnaBI* (با غلظت ۱۰ واحد بر میکرولیتر) جداسازی و خالص‌سازی شدند. سازه بیانی نوترکیب واجد پیشبر NtREL1 (بدون پپتید نشانه) نیز پس از تأیید صحت ساخت، مجدداً با این دو آنزیم تحت دست‌ورزی قرار گرفت. برای ساخت سازه‌های بیانی نوترکیب، واکنش الحاق با استفاده از قطعات خالص‌سازی شده به انجام رسید. از روش‌های هضم آنزیمی، تکثیر قطعه ژنی با پی‌سی‌آر و توالی‌یابی، برای تأیید سازه‌های نوترکیب استفاده شد. مواد مورد استفاده در واکنش پی‌سی‌آر شامل ۲/۵ میکرولیتر پی‌سی‌آر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر  $\text{MgCl}_2$  با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱ میکرولیتر از نمونه باکتری (رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰) حاوی پلاسمید بود که با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. شرایط واکنش پی‌سی‌آر در جدول ۲ آورده شده است.**

#### جدول ۲. برنامه پی‌سی‌آر با آنزیم Taq پلیمرز

Table 2. PCR program with Taq polymerase enzyme

سیکل cycle	زمان time	دما (°C) temperature	مراحل steps
1	5 دقیقه 5 minutes	94	واسرشت سازی اولیه Primary denaturation
30	30 ثانیه 30 seconds	94	واسرشت سازی Denaturation
	30 ثانیه 30 seconds	مطابق با آغازگرهای استفاده شده Based on used primers	اتصال Annealing
	30 ثانیه 30 seconds	72	گسترش Extension
1	10 دقیقه 10 minutes	72	گسترش نهایی Final extension



محصولات واکنش هضم آنزیمی و پی‌سی‌آر برای انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد برده شدند و ضمن رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار گرفتند. توالی‌یابی با روش سانگر، توسط شرکت سیناکلون به انجام رسید و صحت نتایج حاصل از خوانش توالی در دو جهت رفت و برگشت، با استفاده از نرم‌افزار آنالیز توالی MegAline مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مشترک بودن محل طراحی آغازگرهای رفت و برگشت (این آغازگرها بر روی پلاسمید pBI121 طراحی شدند) از آغازگرهای رفت و برگشت مشترک برای تأیید سازه‌های نو ترکیب واجد دو پپتید نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز استفاده شد (جدول ۱).

## نتایج و بحث

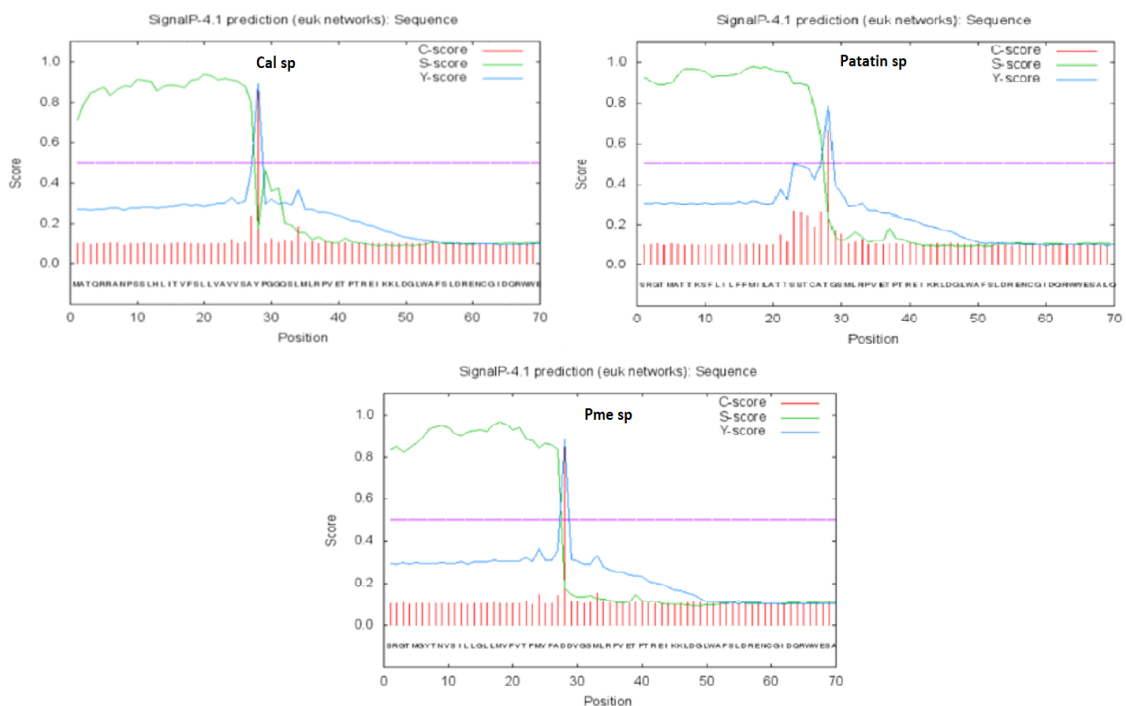
**آنالیز مولکولی توالی پیشبر و محل برش پپتیدهای نشانه:** بررسی توالی پیشبر NtREL1 با استفاده از نرم‌افزارهای آنالیز توالی، نشان داد که این پیشبر غنی از AT، علاوه بر دارا بودن عناصر تنظیمی عمومی همچون جعبه‌های TATA ، GATA و CAAT دارای عناصر تنظیمی Cis از جمله (ATATT) ROOTMOTIFTAPOX1 ، P1BS (GTATATTC)، WUSATAg (GTATATTC) و OSE2ROOTNODULE (CTCTT) می‌باشد که در جریان بیان اختصاصی ریشه‌ای دخیل هستند (Zhang et al. 2016). جعبه TATA مجموعاً با ۵۲ تکرار، پر تکرارترین عنصر تنظیمی عمومی موجود در این پیشبر است. از میان عناصر اختصاصی Cis نیز ROOTMOTIFTAPOX1 با ۹ تکرار، پر تکرارترین عنصر تنظیمی اختصاصی ریشه‌ای می‌باشد. در جدول ۳، نتایج حاصل از این آنالیزها قابل مشاهده است.

### جدول ۳. فراوانی عناصر تنظیمی عمومی و اختصاصی پیشبر NtREL1

Table 2. Frequency of general and specific regulatory elements in NtREL1 promoter

Regulatory element	عنصر تنظیمی	توالی Sequence	Frequency	فراوانی
		TATAA	9	
TATA box		TATAT	9	
		TTAT	23	
		TTTAA	11	
CAAT box		CAAT	9	
GATA box		GATA	9	
OSE2ROOTNODULE		CTCTT	1	
ROOTMOTIFTAPOX1		ATATT	9	
P1BS		GTATATTC	1	
WUSATAg		TTAATGG	1	
Box4		ATTAAT	6	
CCGTCC Motif		CCGTCC	4	
ACT Motif		(Y)ACT	30	
DOFCOREZM		AAAG	6	
CAACA Motif		CAACA	3	

با بررسی توالی آمینواسیدی پپتیدهای نشانه پاتاتین، پکتین متیل استراز و کالرتیکولین در ترکیب با توالی آمینواسیدی پروتئین GUS، به صورت تئوری به یکدیگر متصل شدند. مشخص شد که احتمالاً برش آنزیمی بین آمینواسیدهای ۲۷ و ۲۸ رخ داده و طبق پیش‌بینی‌ها برای هر یک از پروتئین‌های فیوژن، به ترتیب ۳، ۵ و ۷ آمینو اسید به ابتدای پروتئین GUS افزوده می‌گردد (شکل ۱)



شکل ۱. پیش‌بینی محل برش پپتیدهای نشانه پاتاتین (Patatin)، پکتین متیل استراز (Pme) و کالرتیکولین (Cal) با استفاده از نرم‌افزار signalP-4.1. برش آنزیمی بین آمینو اسیدهای ۲۷ و ۲۸ رخ می‌دهد و ضمن برش، به ترتیب ۳، ۵ و ۷ آمینو اسید به ابتدای پروتئین GUS افزوده می‌شود

**Figure 1. Prediction of cleavage sites for Patatin, Pectin Methyl Esterase (Pme) and Calreticuline (Cal) signal Peptides using SignalP-4.1 software. Enzymatic cleavage occurs between amino acids 27th and 28th, which added 3, 5, and 7 amino acids in to the beginning of the GUS protein, respectively**

تصویر شماتیکی از سازه‌های طراحی شده توسط نرم افزار SnapGene در شکل ۲ آمده است.

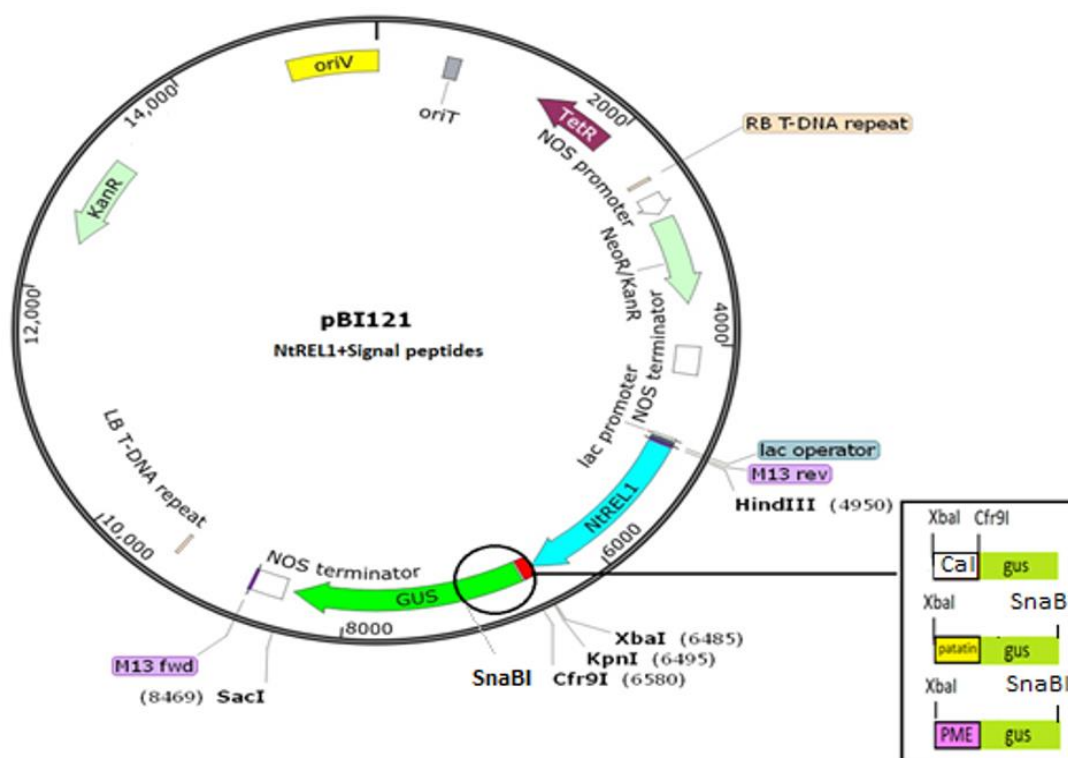
**ساخت سازه‌های بیانی نو ترکیب:** پیشبر NtREL1 (به تنهایی با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز) و همراه با پپتید نشانه

کالرتیکولین (با طول تقریبی ۱۶۰۰ جفت باز) پس از هضم آنزیمی و تخلیص، به ترتیب در جایگاه‌های آنزیمی XbaI – HindIII

و Cfr9I – HindIII سازه بیانی pBI121 همسانه سازی و جایگزین پیشبر عمومی CaMV35S شدند. قطعات واجد پپتید نشانه

پاتاتین و پکتین متیل استراز به همراه بخشی از ژن gus (با طول تقریبی ۵۰۰ جفت باز) نیز در جایگاه‌های آنزیمی XbaI و SnaBI

این ناقل همسانه‌سازی شدند. نتیجه پی‌سی‌آر با آغازگرهای مربوط به هر قطعه (شکل ۳)، واکنش هضم آنزیمی (شکل ۴) و تعیین توالی قطعات همسانه‌سازی شده (با ۱۰۰٪ مشابهت با توالی‌های اصلی) صحت ساخت این سازه‌ها را تأیید کرد.

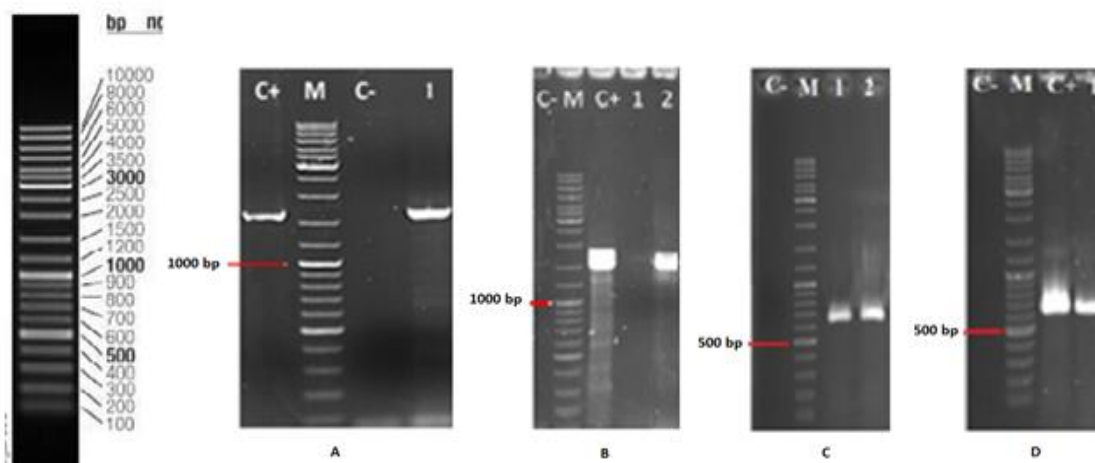


شکل ۲. تصویر شماتیک از سازه‌های طراحی شده. همسانه‌سازی پیشبر NtREL1 (به تنهایی) در ناقل بیانی pBI1121 (با استفاده از دو آنزیم Hind III و XbaI) و در ترکیب با پپتید نشانه کالرتیکولین (با استفاده از دو آنزیم Hind III و Cfr9I) و پپتیدهای نشانه پاتاتین و پکتین متیل استراز به همراه بخشی از ژن gus (با استفاده از دو آنزیم XbaI و SnaBI). پپتیدهای نشانه و آنزیم‌های مورد استفاده برای همسانه‌سازی آنها در پایین دست پیشبر NtREL1 در کادر نمایش داده شده است

**Figure 2. Schematic representation of designed vectors. Sub-cloning of NtREL1 promoter (alone) in the pBI1121 expression vector (using Hind III and XbaI), in combination with the calreticulin signal peptide (using Hind III and Cfr9I), patatin and pectin methyl Esterase signal peptides with a part of gus gene (using SnaBI and XbaI). The signal peptides and enzymes are displayed in the box**

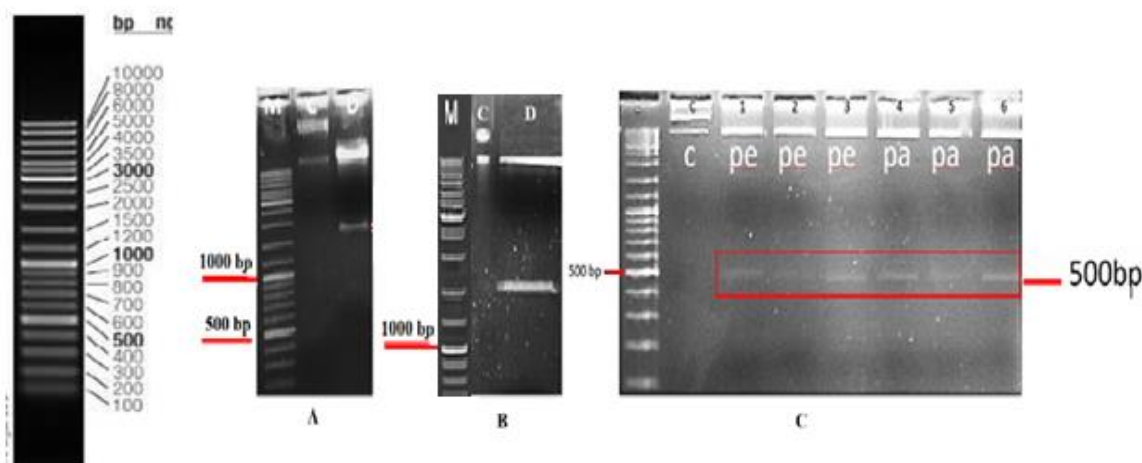
در خصوص ناقل واجد پیشبر NtREL1 و ترادف نشانه کالرتیکولین، با توجه به افزوده شدن یکسری جایگاه‌های برشی به ابتدا و انتهای پیشبر و پپتید نشانه، طول قطعه مورد نظر، ۲۶ جفت باز بیش از اندازه قطعه اصلی بود (یعنی ۱۶۳۶ جفت باز). همچنین در خصوص قطعات پاتاتین و پکتین متیل استراز به همراه بخشی از ژن gus، با توجه به محل اتصال آغازگرهای رفت و برگشت که

از نواحی بالاتر و پایین تر از قطعات مورد نظر به سازه متصل می‌شدند، این مسئله موجب شد تا در واکنش پی‌سی‌آر به جای حضور قطعاتی در محدوده باند ۵۰۰ جفت باز مارکر، قطعاتی در محدوده ۶۵۰ جفت باز مشاهده شود (توضیحات در شکل ۳ قابل مشاهده است).



شکل ۳. الکتروفورز محصول کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. A. تائید همسانه‌سازی قطعه NtREL1-Cal با طول ۱۶۳۶ جفت باز در سازه بیانی pBI121 نمونه ۱. کلونی نو ترکیب واجد قطعه NtREL1-Cal بدون پپتید نشانه با طول ۱۵۲۹ جفت باز. C+. سازه pUC57 واجد قطعه NtREL1-Cal نمونه ۱. کلونی غیر نو ترکیب فاقد قطعه مورد نظر. نمونه ۲. کلونی نو ترکیب واجد قطعه NtREL1-Cal. تائید همسانه‌سازی قطعه *pat-gus* با طول ۴۷۸ جفت باز. نمونه ۱، سازه pUC57 واجد قطعه مورد نظر به عنوان کنترل مثبت. نمونه ۲، کلونی نو ترکیب واجد قطعه ژنی *pat-gus*. D. تائید همسانه‌سازی قطعه *pme-gus* با طول ۴۸۴ جفت باز. C+. سازه pUC57 واجد قطعه مورد نظر، نمونه ۱، کلونی نو ترکیب واجد قطعه ژنی *pme-gus*. نمونه‌های C-. نمونه‌های فاقد DNA M. نشانگر وزن مولکولی ۱kb از شرکت فرمنتاز

Figure 3. Electrophoresis of colony PCR product using specific primers. A. Cloning confirmation of 1636 bp NtREL1-Cal fragment in pBI121 vector. Sample 1. Recombinant colony with NtREL1-Cal fragment. C+. pUC57 vector with NtREL1-Cal fragment. B. Cloning confirmation of NtREL1 fragment without signal peptide with length of 1529 bp. C+. pUC57 vector with NtREL1-Cal fragment. Sample 1. Non-recombinant colony without the desired fragment. Sample 2. Recombinant colony with NtREL1 fragment. C. Confirmation of 478 bp *pat-gus* gene fragment cloning. Sample 1. pUC57 vector possessing the desired fragment as a positive control. Sample 2. recombinant colony with *pat-gus* gene fragment. D. Confirmation of 484 bp *pme-gus* fragment cloning. C+. pUC57 with the desired fragment. Sample 1. recombinant colony with *pme-gus* gene fragment. C-. Samples without DNA (no DNA). M. 1kb DNA Ladder



شکل ۴. واکنش هضم آنزیمی به منظور تأیید سازه‌های بیانی نو ترکیب بر روی ژل آگارز ۱٪. A. تأیید همسانه سازی قطعه NtREL1-Cal در سازه بیانی pBI121 با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *Cfr9I* (طول ۱۶۳۶ جفت باز؛ نمونه C، پلاسمید هضم نشده به عنوان کنترل منفی و نمونه D، پلاسمید مورد بررسی). B. تأیید همسانه سازی قطعه NtREL1 بدون پپتید نشانه (۱۵۲۹ جفت باز) با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *XbaI* (C، پلاسمید هضم نشده. D، نمونه هضم شده). C. تأیید همسانه سازی قطعات پکتین متیل استراز (pe، نمونه‌های ۱ تا ۳) به همراه بخشی از ژن *gus* (۴۸۴ جفت باز) و پاتاتین (pa، نمونه‌های ۴ تا ۶) به همراه بخشی از ژن *gus* (۴۷۸ جفت باز) با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *SnaBI* (C، پلاسمید هضم نشده). M. نشانگر وزن مولکولی ۱ kb

**Figure 4. Enzymatic digestion to confirm recombinant expression constructs on 1% agarose gel. A. cloning confirmation of 1600 bp NtREL1-Cal fragment in pBI121 expression vector using *HindIII* and *Cfr9I* (sample C. undigested plasmid as negative control and sample D. studied plasmid). B. Cloning confirmation of NtREL1 fragment without signal peptide (1529 bp) using *HindIII* and *XbaI* enzymes (C. Undigested plasmid. D. Digested sample). C. Cloning confirmation of pectin methyl esterase (pe, samples 1 to 3) fragment with part of *gus* gene (484 bp) and patatin (pa, samples 4 to 6) with part of *gus* gene (478 bp) using *XbaI* and *SnaBI* (C. Undigested plasmid). M. 1kb DNA Ladder**

از جمله تلاش‌های گسترده‌ی صورت گرفته در دو دهه اخیر به منظور افزایش میزان بیان پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی، می‌توان به استفاده از کشت سلول، بافت‌ها و اندام گیاهی (Yusibov et al. 2011) و نیز اندامک‌هایی نظیر واکوتل‌ها، کلروپلاست و شبکه اندوپلاسمی، با هدف تولید و تجمع طیف وسیعی از پروتئین‌های نو ترکیب اشاره نمود (Ganapathy 2016). از جمله بافت‌های گیاهی که تا کنون به عنوان بافت هدف برای تولید و تجمع پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به برگ، میوه، گل، ریشه و بذر اشاره نمود (Gerasimova et al. 2016). در این میان، ریشه‌های

موثین با دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله سرعت رشد بالا، سهولت جداسازی از محیط کشت و امکان رشد در محیط فاقد هورمون، بافت هدف مناسبی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در محیطی کنترل شده با کارایی مطلوب برای مدت زمان طولانی هستند. سهولت دست‌ورزی و کنترل ترکیبات محیط کشت، می‌تواند ضمن تولید پروتئین‌هایی با غلظت و کیفیت مناسب، هزینه تخلیص محصولات را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. اکثر مطالعات اولیه انجام شده در حوزه تراریختی گیاهان مبتنی بر استفاده از اگروباکتريوم و به کارگیری ناقل بیانی گیاهی pBI121 می‌باشد. محبوبیت این ناقل بیانی قدیمی و کارآمد ممکن است به خاطر استفاده گسترده از آن در پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان و در نتیجه حجم بالای مقالات منتشر شده با استفاده از این ناقل و آشنایی بیشتر و اعتماد محققان به این ناقل باشد. همچنین سادگی ناقل pBI121 و سهولت جایگزینی یک مرحله‌ای ژن مورد نظر با ژن گزارشگر gus در این انتخاب مهم است. علاوه بر آن بیان مناسب ژن منتقل شده تحت کنترل پیشبر قدرتمند و عمومی CaMV 35S که قادر به فعالیت در بافت‌های متنوع و در گیاهان متعددی می‌باشد، از جمله دلایل محبوبیت این ناقل بیانی گیاهی می‌باشد. با این حال زمانی که هدف از تراریخت کردن گیاهان محدود نمودن بیان ژن خارجی به بافت یا اندامی خاص باشد، استفاده از این ناقل در عمل با موفقیت چندانی همراه نخواهد بود. پیشبر CaMV 35S یک پیشبر عمومی بوده که قادر به بیان ژن‌های خارجی در تمامی بافت‌ها و اندام‌های گیاهی می‌باشد. این توانایی از نظر گستردگی بیان ژن‌ها در تمامی بافت‌های گیاه مهم است اما از طرف دیگر، می‌تواند احتمال آلوده شدن مواد تولید شده با ترکیبات گیاهی نظیر رنگدانه‌ها، متابولیت‌ها، آلکالوئیدها و سایر ترکیبات را در پی داشته باشد. به منظور فراهم کردن امکان بیان اختصاصی بافتی پروتئین‌های نو ترکیب، در این پژوهش سازه‌های بیانی به نحوی طراحی شدند که پیشبر اختصاصی ریشه‌ای NtREL1 از گیاه تنباکو جایگزین پیشبر عمومی CaMV 35S در بالادست ژن gus شود. به منظور بیان پروتئین در بافت‌های خاصی از گیاهان، به طور معمول از روش‌های کنترل بیان در سطح رونویسی استفاده می‌شود. یکی از روش‌های متداول مورد استفاده در این رابطه، استفاده از پیشبرهای اختصاصی بافت است (Amani et al. 2011; Mozafari et al. 2015)

به منظور مهندسی دقیق ترادف پیشبر و به کارگیری نوکلئوتیدهای مهم و موثر در افزایش میزان رونوشت‌های ژن مورد نظر، افزایش دقت در شروع رونویسی و برخورداری از یک جایگاه برشی مناسب برای انجام موفقیت آمیز مراحل بعدی همسانه‌سازی، از جایگاه برشی *KpnI* (GGTACC) در بالادست پپتیدهای نشانه استفاده شد. با توجه به ترادف مورد شناسایی این آنزیم، کاربرد این جایگاه برشی می‌تواند اسید نوکلئیک بسیار مهم آدنین (A) را در جایگاه ۳- از محل کدون آغاز در بخش ACC ترادف تنظیمی کزاک (G/ACCACC) در بالادست ژن مورد نظر تامین نموده و موجب تسهیل و افزایش شناسایی دقیق کدون آغازین ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوت شود (Kozak 1991). حضور این ترادف سبب می‌شود که ترجمه از روی mRNA با دقت بالاتری انجام شده و با اعطا نمودن ساختارهای ثانویه خاصی در ابتدای mRNA، منجر به پایداری بیشتر آن شده و میزان بیان را تا ده برابر افزایش دهد (Kozak 1989). انتظار می‌رود که استفاده از این سازه‌های طراحی شده بتواند انجام پروژه‌های انتقال ژن جهت بیان

اختصاصی بافتی و ترشحی شدن پروتئین‌های نو ترکیب در ریشه‌های موئین را تسهیل نماید. ساختار پایه پیشبر NtREL1 غنی از AT (۶۹٪) است. توالی‌های غنی از A و T به دلیل سهولت در تبدیل از شکل دو رشته‌ای به تک رشته‌ای، می‌توانند موجب بهبود فرآیند شناسایی توسط سیستم‌های رونویسی و در نهایت افزایش بیان ژن‌ها شوند (Zhang et al. 2016). بنابراین استفاده از این پیشبر در دست‌ورزی‌های ژنتیکی می‌تواند نقش موثری در افزایش بیان ژن خارجی داشته باشد. مطالعاتی که پیش‌تر بر روی این پیشبر صورت گرفته، نشان داده است که این پیشبر در بالادست ژن کد کننده پروتئین‌های شبه اکستنسین<sup>۳</sup> واقع شده است که دارای بیان بالایی در بافت ریشه تنباکو هستند. بنابراین این پیشبر، به دلیل عملکرد اختصاصی در بافت ریشه، می‌تواند ضمن قرارگیری در بالادست ژن هدف، سطوح بالایی از بیان اختصاصی را در این بافت موجب شود. یک ویژگی منحصر به فرد این پیشبر، امکان فعالیت در ریشه سایر گیاهان (غیر از تنباکو) است (Zhang et al. 2016). به نظر می‌رسد که این مسئله، بتواند امکان استفاده گسترده از این پیشبر با اهداف مهندسی ژنتیک را فراهم کند. پیشبر NtREL1، مشتمل بر عناصر تنظیمی عمومی و اختصاصی (عناصر تنظیمی سیس) است. شناسایی عناصر تنظیمی اختصاصی توسط فاکتورهای اختصاصی رونویسی منجر به محدود شدن بیان به بافت ریشه گیاه می‌گردد (Zhang et al. 2016). توالی تنظیمی عمومی TATA-box با ۵۲ تکرار، پر تکرار ترین عنصر تنظیمی موجود در این پیشبر می‌باشد و حضور آن پیش‌تر در پیشبر ژن بتا فاز تولین (کد کننده یکی از بزرگترین پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر) گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و نیز پیشبر ژن‌های آلفا آمیلاز برنج یا *Oryza sativa*، *legA* نخود فرنگی و *sporamin A* سیب زمینی شیرین به اثبات رسیده است (Grace et al., 2004). این بخش تنظیمی در حقیقت در بیان پایه دخالت داشته و حضور آن برای شروع دقیق فرآیند رونویسی بسیار حائز اهمیت است. از جمله سایر توالی‌های تنظیمی عمومی موجود در این پیشبر می‌توان به جعبه‌های CAAT با ۹ تکرار و GATA با ۶ تکرار اشاره نمود که به ترتیب در پیشبر ژن *legA* نخود فرنگی (Shirsat et al. 1989) و پیشبر عمومی CaMV35S (Benfey and Chua, 1990) یافت می‌شوند. این توالی‌ها توسط فاکتورهای رونویسی<sup>۴</sup> عمومی مورد شناسایی قرار گرفته و به عنوان عناصر راه انداز در شروع رونویسی عمل می‌نمایند. جعبه CAAT علاوه بر حضور در هسته پیشبر<sup>۵</sup> در بخش‌های تنظیمی افزایشنده<sup>۶</sup> نیز مشاهده می‌شود. در خصوص عناصر تنظیمی اختصاصی بافتی، ناحیه‌ی ROOTMOTIFTAPOX1، دارای بیشترین تکرار در توالی این پیشبر می‌باشد. مطالعات پیشین، حضور این ناحیه در پیشبر roid گیاه تنباکو و ژن پراکسیداز گندم را نشان داده و مشخص شده است که حضور آن می‌تواند موجب بروز الگوی بیان اختصاصی و متمایز در بافت ریشه شود (Elmayan and Tepfer 1995; Hertig et al. 1991) عنصر تنظیمی اختصاصی (CTCTT) OSE2ROOTNODULE با ۱ تکرار در موقعیت ۶۰۰- در پیشبر ژن‌های بیان شونده در سلول‌های آلوده گره‌های ریشه<sup>۷</sup>

<sup>۳</sup> Extensin-like protein

<sup>۴</sup> Transcription Factors

<sup>۵</sup> Core promoter

<sup>۶</sup> Enhancer region

<sup>۷</sup> root nodules

(Fehlberg et al. 2005) و پیشبر ژن *leghemoglobin lb3* سویا یافت می‌شود (Stougaard et al. 1990). عنصر تنظیمی اختصاصی (WUSATAg (TTAATGG با ۱ تکرار در موقعیت ۵۸۸- از پیشبر NtREL1، در پیشبر ژن *AGAMOUS* آرابیدوپسیس با بیان اختصاصی در سلول‌های مریستم راسی ریشه (Kamiya et al. 2003) یافت می‌شود. حضور توالی تنظیمی GTATATTC در موقعیت ۱۵۱۸- نیز پیش‌تر در بالادست ژن‌های بیان شونده در شرایط تنش فسفات در چندین گونه گیاهی که دارای بیان بالایی در سلول‌های تریکوبلاست ریشه هستند گزارش شده است (Schunmann et al. 2004). با توجه به حضور عناصر تنظیمی اختصاصی بافتی ریشه‌ای در این پیشبر، پیش‌بینی می‌شود که قرار گرفتن این پیشبر در بالادست ژن هدف بتواند تاثیر بسزایی در رخ دادن بیان اختصاصی و هدفمند ژن در بافت ریشه داشته باشد.

علاوه بر موارد ذکر شده، از آنجایی که بخش عمده هزینه‌های تولید پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی، مربوط به فرآیند خالص سازی است، استفاده از پپتیدهای نشانه اختصاصی شبکه اندوپلاسمی در طراحی این سازه‌های بیانی، می‌تواند نقش موثری در ترشح پروتئین‌های نوترکیب تولید شده به درون محیط کشت هیدروپونیک داشته باشد. ترشح پروتئین یک فرآیند ضروری در تمام سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی است و مکانیسم آن به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. در تمامی سلول‌ها، ساخت پروتئین‌ها از سیتوپلاسم آغاز می‌شود. پروتئین‌هایی که قرار است وارد مسیر ترشحی شوند، غالباً دارای یک توالی راهنما به نام پپتید راهنما در پایانه آمینی خود هستند. این پپتیدها توالی‌های کوتاهی با طول ۱۶ تا ۳۰ آمینواسید هستند و می‌توانند موجب هدایت هدفمند پروتئین‌های ترشحی (از طریق مسیر متداول ترشح پروتئین) از شبکه اندوپلاسمی به سمت دستگاه گلژی شوند. پس از هدایت پروتئین‌ها به مکان‌های خاص خود، پپتیدهای راهنما توسط کمپلکس آنزیمی سیگنال پپتیداز حذف می‌شوند (Peng et al. 2019). این مسئله اثبات شده است که رخ دادن تغییرات پس از ترجمه در نتیجه وجود چاپرون‌ها و سایر آنزیم‌های لازم برای اعمال تاخوردگی صحیح پروتئین در شبکه اندوپلاسمی، موجب تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها، ممانعت از تخریب پروتئین‌ها توسط پروتئازهای فراوان موجود در سیتوسل و در نهایت افزایش محصول پروتئینی می‌شود (Wilkinson and Gilbert 2004). همچنین مطالعات صورت گرفته در خصوص تاثیر وزن مولکولی بر میزان ترشح پروتئین نوترکیب تولید شده در کشت ریشه‌های موئین نشان داده است که ترشح مولکول‌های کوچک با وزن مولکولی ۲۰ تا ۳۰ کیلو دالتون به درون محیط کشت با سهولت بیشتری نسبت به پروتئین‌های با وزن مولکولی بیش از ۴۰ کیلو دالتون انجام می‌گیرد (Gurusamy et al. 2017). پروتئین‌های با وزن مولکولی بالاتر تمایل به ماندن در فضای آپوپلاستی دارند و همین امر ترشح آنها را دشوار می‌کند. استفاده از این سازه‌های بیانی می‌تواند کمک شایان توجهی به فرآیند تولید و تخلیص پروتئین‌های کوچک با ارزش دارویی و صنعتی نماید.

**نتیجه‌گیری:** در این پژوهش سازه‌های بیانی واجد پیشبر اختصاصی ریشه‌ای NtREL1 و پپتیدهای نشانه پاناتین، پکتین متیل استراز و کالرتیکولین ساخته شدند. استفاده از سازه‌های بیانی نوترکیب ساخته شده در این پژوهش در کشت ریشه‌های موئین با هدف تولید و ترشح مداوم پروتئین‌های نوترکیب کوچک و ارزشمند با مصارف صنعتی و دارویی می‌تواند گامی رو به جلو در زمینه



تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی باشد. به دلیل سرعت رشد بالای ریشه‌های موئین، شرایط کنترل شده کشت و امکان دستیابی به پروتئین نوترکیب بدون تخریب گیاه، این روش می‌تواند گزینه بسیار مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ارزشمند در مدت زمانی کوتاه باشد.

**سپاسگزاری:** از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (شماره طرح مصوب ۷۰۱-IV-۸۲۷-۹۶۰) و صندوق حمایت از پژوهشگران (شماره طرح ۹۵۸۴۴۵۲۲) به خاطر حمایت مالی از این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

مظفری آتنا، کاظمی روح‌الله، امانی جعفر و همکاران (۱۳۹۴) ارزیابی گیاه تراریخت کلزای بیان‌کننده پروتئین نوترکیب از زیر واحد B سم‌های STX2 و CTX باکتریهای اشیشیا کلای و ویبریوکلرا. مجله زیست فناوری گیاهان زراعی ۵(۱۱)، ۱۳-۱.

## References

- Aleinein R, Schäfer H, Wink M (2015) Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *RRJBS Phytopathol Gene Disease* 1, 45-55.
- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH (2011) Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric espA, intimin and tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Plant Sci* 180, 620-627.
- Benfey PN, Chua NH (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, 959-966.
- Carneiro NP, Carneiro AA (2011) Maize transformation to obtain plants tolerant to viruses by RNAi technology. *InTech*.
- Drake PM, Barbi T, Sexton A et al. (2009) Development of rhizosecretion as a production system for recombinant proteins from hydroponically cultivated tobacco. *FASEB J* 23, 3581-3589.
- Fehlberg V, Vieweg MF, Dohmann EM et al. (2005) The promoter of the leghaemoglobin gene *vflb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot* 56, 799-806.
- Ganapathy M (2016) Plants as bioreactors-a review. *Adv Tech Biol Med* 4, 2379-1764.1000161.
- Gerasimova S, Smirnova O, Kochetov A, Shumnyi V (2016) Production of recombinant proteins in plant cells. *Russ J Plant Physiol* 63, 26-37.
- Grace ML, Chandrasekharan MB, Hall TC, Crowe AJ (2004) Sequence and spacing of tata box elements are critical for accurate initiation from the  $\beta$ -phaseolin promoter. *J Biol Chem* 279, 8102-8110.

- Gurusamy PD, Schäfer H, Ramamoorthy S, Wink M (2017) Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana Tabacum* L. PLoS One 12, e0182367.
- Häkkinen ST, Raven N, Henquet M et al. (2014) Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. Biotechnol Bioeng 111, 336-346.
- Hertig C, Rebmann G, Bull J et al. (1991) Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Mol Biol 16, 171-174
- Huet Y, Ekouna, JPE, Caron A et al. (2014) Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots. Biotechnol Lett 36, 181-190.
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A et al. (2003) Isolation and characterization of a rice wuschel-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. Plant J 35, 429-441
- Kim NS, Yu HY, Chung ND et al (2011) Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. Protein Expr Purif 76, 121-126.
- Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. J Cell Biol 108, 229-241.
- Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. J Biol Chem 266, 19867-19870.
- Ñopo L, Woffenden BJ, Reed DG et al. (2012) Super promoter: tev, a powerful gene expression system for tobacco hairy roots. Recombinant Gene Expression 501-526.
- Mozafari A, Kazemi R, Amani J et al. (2015) Molecular analysis of transgenic canola plant containing chimeric B subunit of bacterial toxin STX2 and CTX from *Escherichia coli* and *Vibrio cholera*. Crop Biotechnol J 5, 1-13 (in Persian).
- Peng C, Shi C, Cao X et al. (2019) Factors influencing recombinant protein secretion efficiency in Gram-positive bacteria: signal peptide and beyond. Front Bioeng Biotechnol 139.
- Pham NB, Schäfer H, Wink M (2012) Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. Biotechnol J 7, 537-545.
- Schillberg S, Raven N, Spiegel H et al. (2019) Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. Front Plant Sci 10.
- Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D (1989) Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. Mol Gen Genet 215, 326-331.

- Stougaard J, Jørgensen JE, Christensen T et al. (1990) Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc 3 and n23 gene promoters. *Mol Gen Genet* 220, 353-360.
- Varasteh-Shams M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A (2020) The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. *Curr Plant Biol* 24, 100177.
- Wilkinson B, Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1699, 35-44.
- Zhang C, Pan S, Chen H et al (2016) Characterization of NtREL1, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. *Plant Cell Rep* 35, 757-769.

