

روش غربالگری ژنتیکی برای ریز جلبک‌های تراریخت هسته‌ای *Chlamydomonas reinhardtii* با قابلیت بالای بیان ژن‌های خارجی

Genetic screening method for *Chlamydomonas reinhardtii* lines efficiently expressing nuclear transgenes

محمدعلی عباسی وینه^۱، معصومه عمادپور^{۱*}، روح‌الله براهیمی‌پور^۲

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- محقق پسداکتری، مؤسسه ماکس، پلانک فیزیولوژی گیاهی مولکولی، پستدام، آلمان

Abbasi-Vineh MA¹, Emadpour M^{*1}, Barahimipour R²

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Post-doctoral Researcher, Max-Planck Institute of Molecular Plant Physiology,
Potsdam, Germany

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.emadpour@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹)

چکیده

ریز جلبک سبز تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii* به‌عنوان یک بیوراکتور پتانسیل‌دار جهت تولید مولکول‌های صنعتی مانند سوخت‌های زیستی، پروتئین‌های درمانی یا آنزیم‌های صنعتی معرفی می‌شود. بیان پروتئین‌های هترولوگ در ژنوم هسته *C. reinhardtii* در مقایسه با کلروپلاست آن دارای چندین مزیت از جمله امکان بیان پروتئین‌های ترشچی و تخلیص آن‌ها و همچنین اعمال تغییرات پیچیده پس از ترجمه پروتئین‌ها مانند گلیکوزیلاسیون می‌باشد. اما درج تصادفی سازه ژنی در ژنوم و اثرات موقعیتی درج سازه در ژنوم یکی از مهم‌ترین معایب بیان ژن در هسته است. چراکه به‌دلیل درج تصادفی سازه بیانی در مناطق هتروکروماتینی که از لحاظ بیان ژن غیرفعال هستند، سیستم بیان‌کننده ژن خاموش و غیر فعال می‌شود. در این پژوهش، روش ژنتیکی کارآمدی برای غربال‌گیری و گزینش ریز جلبک‌های تراریخت هسته‌ای *C. reinhardtii* طراحی و بهینه‌سازی شد. این روش ژنتیکی بر اساس سیستم بیان‌کننده ژن YFP مبتنی بر فعالیت پروتئین T7 RNA پلی‌مراز طراحی شد. جهت پیاده‌سازی این سیستم به سازه کلروپلاستی حاوی ژن YFP تحت کنترل راه‌انداز T7 و سازه هسته‌ای دربردارنده ژن T7 RNA پلی‌مراز نیاز بود. بعد از همسانه‌سازی سازه‌های بیانی مذکور، ابتدا لاین‌های ترانس‌پلاستومیک هموپلاسم ایجاد شد و سپس این لاین‌ها با سازه هسته‌ای سوپرترنسفرم شدند. به‌واسطه رونوشت‌برداری از این RNA پلی‌مراز رمزشونده در هسته و انتقال پروتئین آن به کلروپلاست، رونویسی از ژن YFP تحت کنترل راه‌انداز T7 درج شده در ژنوم کلروپلاستی انجام گرفت و در نتیجه تحت تابش ماوراء بنفش، طیف وسیعی از سیگنال فلورسنت حاصل از پروتئین YFP از لاین‌های تراریخت ساطع شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که این روش غربال ژنتیکی برای گزینش لاین‌های تراریخت کلامیدوموناس که حاوی سازه هسته‌ای در قسمت یوکروماتین و فعال‌تر رونویسی است، به‌خوبی می‌تواند مورد بهره‌برداری قرار گیرد. در واقع، این روش ژنتیکی نه تنها درج ژن در قسمت‌های یوکروماتینی و فعال رونویسی ژنوم را تأیید کرد، بلکه لاین‌های با قابلیت بیش‌تر جهت بیان ژن خارجی را نیز شناسایی می‌کند. این روش ژنتیکی قابلیت تعمیم به گیاهان عالی که دارای کلروپلاست می‌باشند را نیز داراست.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پروتئین نو ترکیب
ژنوم هسته‌ای
T7 RNA پلی‌مراز

مقدمه

تقاضای روزافزون برای مصرف پروتئین‌های نو ترکیب سبب شده است که پژوهشگران و شرکت‌های زیستی مجاب به استفاده از راکتورهای زیستی جهت تولید پروتئین‌های مذکور شوند. در حال حاضر، چندین سیستم بیان پروتئین‌های هترولوگ برای تولید پروتئین‌های درمانی وجود دارد که هر یک از این سیستم‌ها از نظر سهولت در دستکاری ژنتیکی، هزینه تولید و عملکرد پروتئین تولید شده از مزایای متفاوتی برخوردار هستند (León-Bañares et al. 2004; Mayfield and Franklin 2005).

در چند دهه اخیر، ریز جلبک‌ها از لحاظ تولید پروتئین‌های هترولوگ، جهت دستیابی به اهداف تحقیقاتی و تجاری، مورد توجه محققین و شرکت‌های مرتبط در این زمینه قرار گرفته‌اند و گزارش‌های زیادی از تولید موفقیت‌آمیز پروتئین‌های نو ترکیب در آن‌ها ارائه شده است. در این میان، ریز جلبک سبز تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii* با دارا بودن ویژگی‌هایی از جمله سهولت و هزینه پایین کشت در مقیاس بالا، شناسایی توالی هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندری، قابلیت ترانسفورم شدن، کوتاه بودن مدت زمان رسیدن به مقادیر قابل استفاده پروتئین در لاین‌های تراریخته، فاصله زمانی نسبتاً کوتاه جهت رسیدن به لاین‌های پایدار و تولید در مقیاس بالا، به عنوان یک بیوراکتور مناسب و جدید جهت اهداف پژوهشی و صنعتی معرفی شده است (Mayfield and Franklin 2005; Mayfield et al. 2016; Doron et al. 2015; Scranton et al. 2015; al. 2007). ریز جلبک تک سلولی سبز *C. Reinhardtii* همچنین سابقه‌ای طولانی در استفاده به عنوان موجود زنده مدل داشته است. از این رو، در درک فرایندهای پایه سلول مانند سوخت‌وساز، فتوسنتز، نورگرایی، زیست‌شناسی کلروپلاست، ریتم شبانه‌روزی و چرخه سلولی نقش مهمی را ایفا کرده است (Ramos-Martinez et al. 2017; Salomé and Merchant 2019). علاوه بر این، به عنوان یکی از بهترین گونه‌های جلبک جهت ایفای نقش به عنوان یک بیوراکتور بالقوه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب نیز شناخته می‌شود. در مقایسه با میزبان‌های پروکاریوتی، کلامیدوموناس قابلیت بیان پروتئین‌های نو ترکیب را از طریق کلروپلاست یا هسته دارد و این موضوع آن را به یک میزبان مطلوب تبدیل کرده است. در همین

راستا، ژنوم هسته کلامیدوموناس به آسانی قابل ترانسفرم شدن بوده و راه را برای بیان ژن‌های هترولوگ هموارتر می‌کند (Schroda 2019).

بیان پروتئین‌های هترولوگ در ژنوم هسته از چندین مزیت برخوردار است که می‌توان به مهم‌ترین آن‌ها اشاره نمود. الف) پروتئین‌های بیان شده را می‌توان به مکان‌های مختلف درون سلولی هدایت کرد. ب) با استفاده از پپتیدهای هدف‌گیری مشخص می‌توان پروتئین را به خارج از سلول ترشح و خالص‌سازی پروتئین‌های بیان شده را انجام داد. ج) تغییرات پیچیده پس از ترجمه پروتئین‌ها مانند گلیکوزیلاسیون امکان‌پذیر است (Neupert et al. 2009; Schroda 2019; Zhang et al. 2021).

یکی از مهم‌ترین معایب بیان ژن در هسته کلامیدوموناس، برخلاف سازوکار انتقال ژن در ژنوم کلروپلاست، درج تصادفی سازه ژنی در ژنوم و اثرات موقعیتی درج سازه در ژنوم است. درج تصادفی این امکان را ایجاد می‌کند که سازه در مناطق هتروکروماتینی که از لحاظ بیان ژن غیرفعال هستند نیز درج شود. این رخداد سبب عدم کارایی سیستم بیان کننده ژن می‌شود. این موضوع در کلامیدوموناس اهمیت بیشتری دارد چرا که حتی بیان ژن‌های خارجی با طول رونوشت‌های بلند می‌تواند ناپایدار باشد و با گذشت زمان، بیان ژن متوقف شود. تغییرات اپی ژنتیک غیرمعارف و ساختار کروماتین فوق‌العاده فشرده دلایل خاموش شدن ژن‌های خارجی و بیان ناپایدار این ژن‌ها در ریز جلبک کلامیدوموناس گزارش شده است (Neupert et al. 2009; Scranton et al. 2015). بنابراین، غربال و گزینش کارآمد ریز جلبک‌های تراریخت شده حاوی سازه هسته‌ای نقش کلیدی و بسزایی جهت بهره‌گیری از سیستم‌های بیان ژن هسته‌ای در کلامیدوموناس دارد.

از این رو، هدف از پژوهش حاضر، استفاده و بهینه‌سازی روشی کارآمد برای غربال و گزینش لاین‌های تراریخت هسته‌ای کلامیدوموناس بود. این روش ژنتیکی مبتنی بر بیان و فعالیت آنزیم RNA پلی‌مراز فاژ T7 طراحی شد. در واقع، طراحی این روش به نحوی انجام گرفت که ابتدا ژن گزارشگر ¹YFP تحت

¹ Yellow Fluorescent Protein; YFP

آزمایشگاه‌های Clontech از شرکت Takara استفاده شد. بر اساس مبانی همسانه‌سازی این کیت، ابتدا لازم بود که قطعه یا قطعات مورد نظر جهت همسانه‌سازی با استفاده از آغازگرهای همپوشان (جدول پیوست ۱) تکثیر شوند و سپس داخل وکتور حدواسط خطی شده کلون شوند.

تکثیر و جداسازی قطعات مختلف ژنی سازه کلروپلاستی ECC T7- G10

بر اساس پلاسمیدهای حاوی قطعات ژنی مورد نیاز، طراحی همسانه‌سازی این سازه به نحوی انجام شد که نیاز به تکثیر و جداسازی دو قطعه ژنی بود. این قطعات می‌بایست با استفاده از آغازگرهای همپوشان (۱۶ bp) تکثیر می‌شد که فرایند کلونینگ مبتنی بر دستورالعمل کیت In-Fusion صورت گیرد. ابتدا قطعه ژنی حاوی توالی CDS بهینه‌سازی شده کدونی ژن *YFP* همراه با خاتمه‌دهنده ژن *C.r.rbcL* با استفاده از آغازگرهای oRMB450 و oRMB451 تکثیر شد (PCR شماره ۱). این قطعه ژنی به طول ۱۱۸۶ bp، داخل وکتور pRMB152 (داده چاپ نشده) وجود داشت. توالی راه‌انداز T7 همراه با توالی غیرقابل ترجمه ۵' (5'UTR) ژن *G10* باکتریوفاژ نیز به‌عنوان قطعه دوم، مورد نیاز بود. توالی این قطعه ژنی به صورت دو رشته مکمل یکدیگر همراه با ناحیه همپوشان ابتدا سنتز شد (جدول پیوست ۲: oRMB560 و oRMB561). سپس مقدار برابری از دو توالی مکمل را در یک ویال ۰/۵ ml ریخته و تحت تیمار دمایی ۹۵ °C به مدت ۵ min قرار گرفت. در مرحله بعد با کاهش تدریجی دمای واکنش تا رسیدن به دمای محیط، امکان اتصال این دو رشته به یکدیگر فراهم شد. به این ترتیب، قطعه مورد نظر به این صورت تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

خطی کردن پلاسمید دریافت‌کننده قطعات ژنی مربوط به سازه

کلروپلاستی ECC T7- G10

برای ساخت سازه پلاستییدی از وکتور pRMB151 به‌عنوان ناقل حدواسط و انتقالی استفاده شد (داده چاپ نشده). ناقل پایه این وکتور pUC19، یک ناقل تجاری است که توالی‌های کناری^۳

کنترل راه‌انداز آنزیم RNA پلی‌مراز فاژ T7 (از این پس، راه‌انداز T7) در ژنوم کلروپلاست قرار می‌گیرد. ژن *YFP* قرار گرفته در سازه ذکرشده، در کلروپلاست بیان نمی‌شود. چراکه ژنوم کللامیدوموناس فاقد RNA پلی‌مراز کلروپلاستی رمزشونده در هسته^۱ (NEP) است (Smith and Purton 2002). از طرفی، ژن *YFP* تحت کنترل راه‌انداز T7، توسط RNA پلی‌مراز رمزشونده در کلروپلاست (PEP^۲) رونویسی و بیان نمی‌شود (Kavanagh 2002). لذا در صورتی که سلول‌های ترانسپلاستومیک ایجاد شده، با سازه هسته‌ای دربردارنده ژن RNA T7 پلی‌مراز سوپرترنسفرم شوند، پروتئین RNA پلی‌مراز مذکور با استفاده از پپتید راهنمای کلروپلاستی طراحی شده در سازه، به کلروپلاست انتقال داده می‌شود. در صورت درج سازه هسته‌ای مذکور در قسمت فعال رونویسی ژنوم و در نهایت ترجمه و انتقال این NEP اختصاصی به کلروپلاست، رونویسی از ژن *YFP* تحت کنترل راه‌انداز T7 انجام می‌گیرد و سیگنال فلورسنت حاصل از تجمع پروتئین *YFP*، ساطع خواهد شد. این روش ژنتیکی نه تنها می‌تواند درج ژن در قسمت‌های یوکروماتینی و فعال رونویسی ژنوم را تایید نماید، بلکه این امکان را میسر خواهد کرد که لاین‌های با قابلیت بیش‌تر جهت بیان رونوشت‌های ژن خارجی نیز شناسایی گردند.

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر ریزجلبک

برای انجام این پژوهش، از سویه ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* تیپ وحشی CC-125 (137c mt⁺) استفاده شد. این سویه در محیط کشت جامد و مایع TAP (Tris-Acetate-Phosphate) و شرایط مناسب رشد در pH~7، دمای ۲۳ °C و روشنایی مداوم (با لامپ‌های فلورسنت) کشت و نگهداری شدند (Kropat et al. 2011).

همسانه‌سازی سازه‌ی کلروپلاستی ECC T7- G10

برای کلون کردن قطعات مورد نظر در این پروژه از کیت In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit

^۱ Nuclear Encoded RNA Polymerase; NEP

^۲ Plastid Encoded RNA Polymerase; PEP

^۳ Flank

سازه کلروپلاستی *ECC psaA* به عنوان سازه کنترل مثبت در این پژوهش استفاده شد. سازه مذکور حاوی ژن *YFP* تحت کنترل راه انداز و قسمت ۵' غیرقابل ترجمه (5'UTR) ژن *psaA* کلایدموناس بود. در واقع، ژن گزارش گر *YFP* تحت کنترل توالی های تنظیمی ذکر شده در وکتور pRMB151 (به عنوان ناقل حد واسط) همسانه سازی شده است. بنابراین در این سازه، ژن گزارش گر مذکور همراه با ژن گزینش گر *aadA* در فاصله بین توالی های کناری *tRNE* و توالی *psbH* منطبق بر توالی کلروپلاستی کلایدموناس قرار گرفته است. این سازه در پروژه قبلی توسط اعضای تیم تحقیقاتی ساخته شد (داده های چاپ نشده) و با توجه به بیان بالای ژن خارجی در آن، در این پژوهش نیز به عنوان سازه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

همسانه سازی سازه های هسته ای

برای ساخت سازه هسته ای، ابتدا بهینه سازی کدونی توالی ژن *T7-RNA پلی مراز* برای ژنوم هسته ای کلایدموناس با استفاده از نرم افزار CodonWorkbench صورت گرفت و سپس این توالی بلند سنتز و مورد استفاده قرار گرفت. طراحی همسانه سازی به نحوی صورت گرفت که نیاز به تکثیر دو قطعه ژنی جهت ساخت سازه مذکور بود. ابتدا قطعه ژنی حاوی توالی ژن *C.r.N.T7-RNAP* با طول ۲۶۸۸ bp با استفاده از آغازگرهای اختصاصی oRMB504 و oRMB533 تکثیر شد (PCR شماره #۲). قطعه دوم با طول ۹۲۶ bp که حاوی توالی راه انداز، ناحیه غیرقابل ترجمه ۵' (5'UTR) و پپتید راهنمای ژن *C.r.psaD* بود، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی oRMB501 و oRMB534 از وکتور pRM0-070 (Mehreshahi et al. 2020) تکثیر شد (PCR شماره #۳). کل محصول PCR ها بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده مورد نظر به طور جداگانه از ژل جداسازی و طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، تخلیص شدند.

خطی کردن پلاسمید دریافت کننده قطعات ژنی مربوط به سازه

هسته ای

در مرحله بعد توالی سنتز شده همراه با سایر توالی های تنظیمی مورد نیاز، در وکتور حد واسط هسته ای pKpco16 (داده چاپ نشده) همسانه سازی شد. ناقل حد واسط مورد نظر داری

tRNE و توالی *psbH* منطبق بر توالی کلروپلاستی کلایدموناس جهت رخ دادن فرایند نو ترکیبی همولوگ ژن های هدف در آن قرار داده شده بود. این سازه همچنین دارای ژن *aadA* به عنوان ژن مقاومت به اسپکتینومایسین برای گزینش لاین های تراریخت ریز جلبک است. بعد از تکثیر و خالص سازی این قطعات از ژل آگارز، توالی های ذکر شده باید به نحوی در فاصله بین توالی های کناری قرار می گرفت که سازه بیانی کلروپلاستی ایجاد می شد. از این رو، ناقل حد واسط دریافت کننده با آنزیم برشی *MluI* به حالت خطی ایجاد شد.

همسانه سازی قطعات ژنی سازه کلروپلاستی با استفاده از کیت

In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit

به منظور همسانه سازی سازه کلروپلاستی طبق دستورالعمل کیت In-Fusion، دو قطعه ژنی تهیه شده همراه با ناقل دریافت کننده ی خطی شده، در یک واکنش مورد استفاده قرار گرفتند و مخلوط واکنش به مدت ۱۵ min در دمای ۵۰ °C قرار گرفت.

انجام واکنش برش آنزیمی جهت تایید اولیه همسانه سازی

صحیح سازه کلروپلاستی

در مرحله بعد، محصول حاصل از اتصال و سرهم بندی، به سلول های مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شد تا همسانه سازی انجام شود. کلونی های حاوی هر سازه روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی بیوتیک (100 µg ml⁻¹) Ampicillin انتخاب شدند. سپس به منظور تشخیص کلونی های مثبت دارای قطعات مربوط به این سازه، ابتدا استخراج DNA پلاسمیدی ناقل مورد نظر از تعدادی از سینگل کلونی های باکتری رشد یافته روی محیط کشت انتخاب گر انجام شد. سپس به منظور تأیید همسانه شدن صحیح قطعات ژنی در سازه کلروپلاستی مذکور، واکنش برش^۱ با استفاده از آنزیم های برشی محدودگر *MfeI* و *XhoI* انجام پذیرفت. به منظور انجام واکنش برش آنزیمی، از آنزیم های برشی محدودگر، با خاصیت برش سریع^۲ شرکت Thermo Fisher استفاده شد.

سازه ی کلروپلاستی *ECC psaA*

¹ Digestion

² FastDigest Restriction Enzymes

کلامیدوموناس

بعد از تأیید توالی سازه‌های ایجاد شده، توسط توالی‌یابی، انتقال سازه‌ها به ژنوم انجام شد. به این صورت که انتقال سازه‌های کلروپلاستی (*ECC¹ T7-G10* و *ECC psaA*) به پلاستوم ریزجلبک‌های CC-125 به‌وسیله دستگاه تفنگ ژنی (بیولیستیک) انجام گرفت (Neupert et al. 2012). سازه هسته‌ای نیز به روش الکتروپوریشن به ژنوم هسته کلامیدوموناس انتقال داده شد. پس از دو هفته، گزینش لاین‌های اولیه ریزجلبک مقاوم به اسپکتینومایسین (برای انتقال‌های کلروپلاستی) و هیگرومایسین (برای انتقال‌های هسته‌ای) بر روی محیط TAP جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مذکور انجام شد. گزینش لاین‌های ترانس‌پلاستوم ریزجلبک پس از چند دوره کشت در حضور آنتی‌بیوتیک ادامه یافت تا لاین‌های کاملاً هموپلاسم ایجاد شدند. سپس جهت تأیید اولیه درج سازه‌های کلروپلاستی و تأیید لاین‌های ترانس‌پلاستوم از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی مربوطه استفاده شد. به‌منظور تأیید نهایی و اطمینان از درج ژن‌ها در ژنوم کلروپلاست کلامیدوموناس، از دورگه‌سازی^۲ به روش لکه‌گذاری سادر^۳ استفاده شد.

سنجش سیگنال فلورسنس پروتئین YFP با استفاد از دستگاه

میکروپلیت خوان

ابتدا سلول‌های کلامیدوموناس در محیط TAP مایع رشد داده شدند. در اواخر فاز نمایی رشد، ۱۰۰۰ µl از کشت حاصل، داخل چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه انتقال داده شد. میزان سیگنال فلورسنس به‌عنوان معیاری از میزان بیان پروتئین YFP با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان^۴ (CLARIOstar Plus Microplate reader, BMG LABTECH, Germany) قرائت شد. قرائت سیگنال‌های فلورسانس برای تشخیص YFP با فیلترهای (۵۳۸ nm/ ۴۹۴ nm) excitation/emission انجام گرفت. قرائت محیط TAP به‌عنوان نمونه خالی کنترل^۵ انجام شد. بعد از به‌دست آوردن

ژن *aph7* مربوط به مقاومت به هیگرومایسین برای غربال‌گیری باکتری‌های تراریخت و همچنین سایت‌های برشی مناسب برای همسانه‌سازی قطعات ژنی بود. جهت ایجاد ناقل حدواسط خطی شده، ناقل ذکرشده با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *SpeI* خطی شد. همسانه‌سازی قطعات ژنی سازه هسته‌ای با استفاده از کیت In-

Fusion® Advantage PCR Cloning Kit

به‌منظور همسانه‌سازی سازه هسته‌ای ذکر شده طبق دستورالعمل کیت In-Fusion، ابتدا قطعات تکثیرشده مورد نیاز همراه با ناقل دریافت‌کننده سازه مورد نظر در یک واکنش مجاور هم قرار گرفتند. سپس مخلوط واکنش تهیه شده طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، به مدت ۱۵ min در دمای ۵۰°C قرار گرفت. بعد از انجام واکنش اتصال، محصول واکنش به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شد تا همسانه‌سازی انجام شود. سپس تعدادی از کلونی‌های ظاهرشده بر روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین برای هرکدام از سازه‌ها انتخاب و برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

انجام واکنش برش آنزیمی جهت تأیید اولیه همسانه‌سازی

صحیح سازه هسته‌ای

به‌منظور تشخیص کلونی‌های مثبت دارای قطعات مربوط به این سازه‌ها، ابتدا استخراج DNA پلاسمیدی ناقل مورد نظر از تعدادی از سینگل کلونی‌های باکتری رشدیافته روی محیط کشت انتخاب‌گر انجام شد. سپس به‌منظور تأیید همسانه شدن قطعات ژنی در سازه مذکور، واکنش برش با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *SfiI* و *ZraI* روی سازه هسته‌ای انجام پذیرفت.

آنالیز داده‌های توالی‌یابی سازه‌ها

در مرحله بعد، DNA ناقل‌های ساخته شده همراه با آغازگرهای مناسب جهت توالی‌یابی به شرکت LGC Genomics شهر برلین آلمان ارسال شدند. فایل حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار FinchTV1.4 آنالیز و پیک‌های خوانش هر نوکلئوتید بررسی و سپس با استفاده از نرم‌افزار آنالین Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) با توالی اصلی مطابقت داده شدند.

انتقال سازه‌های ساخته شده و تأیید شده به ژنوم ریزجلبک

¹ Expression cassette controlled by T7RNA Polymerase promoter and phage G10 5'UTR

² Hybridization

³ Southern Blotting

⁴ Microplate reader

⁵ Blank

بنابراین ابتدا به تأیید همسانه‌سازی سازه‌های ذکر شده و انتقال آن‌ها به ژنوم کلامیدوموناس پرداخته می‌شود.

تأیید همسانه‌سازی سازه‌ی کلروپلاستی *ECC T7- G10* و

سازه هسته‌ای حاوی توالی آنزیم RNA پلیمراز

کل محصول PCR شماره #۱ بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شده و قطعه تکثیر شده مورد نظر از ژل جداسازی و طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، تخلیص شد (شکل ۱-الف).

بعد از انجام واکنش اتصال و سرهم‌بندی قطعات تکثیر شده و سنتز شده در ناقل حدواسط، محصول حاصل از اتصال برای سازه مورد نظر به سلول‌های *E. coli* مستعد سویه TOP10F⁺ انتقال داده شد تا همسانه‌سازی و تکثیر صورت پذیرد. سپس تعدادی از کلونی‌های حاوی سازه‌های مذکور که بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ظاهر شدند، انتخاب و بعد از استخراج DNA پلاسمیدی از این تک کلونی‌ها، تأیید همسانه شدن صحیح قطعات مورد نظر با استفاده از آزمون برش آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی اختصاصی انجام و آنالیز آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱-ب). بر اساس قطعات ایجاد شده در آزمون برش، سازه‌های مذکور به‌طور صحیح همسانه‌سازی شده بودند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی سازه کلروپلاستی نیز نشان‌دهنده همسانه‌سازی صحیح کل سازه مورد نظر بود.

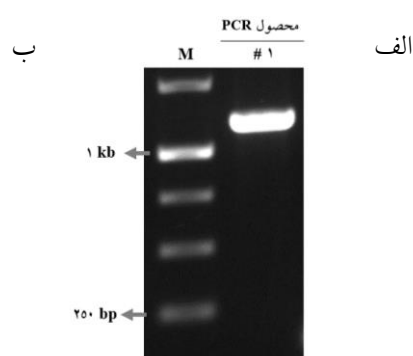
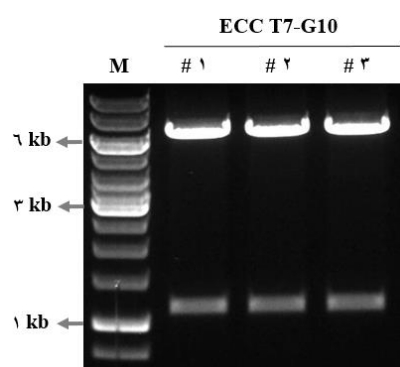
داده‌های مربوط به سیگنال‌های فلورسانس، نیاز بود که این داده‌ها بر اساس تعداد سلول استفاده شده برای هر نمونه، نرمال شوند. از این رو، میزان جذب همین نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ nm به‌دست آمد.

نتایج و بحث

به‌منظور غربال و گزینش لاین‌های تراریخت هسته‌ای دارای پتانسیل بالا جهت رونویسی ژن خارجی، از سیستم بیان‌کننده ژن *YFP* مبتنی بر فعالیت *T7 RNA* پلی‌مراز استفاده شد. این ژن گزارش‌گر در واقع واریانته‌ای از ژن *GFP*^۱ است که توانایی تولید نور فلورسنت را داشته و به طبع آن امکان مشاهده رنگ زرد درخشان حاصل از تولید این پروتئین در زیر تابش ماوراء بنفش فراهم می‌شود (Barahimipour et al. 2015). جهت بهره‌گیری از چنین روش غربال‌گیری ژنتیکی، ابتدا لازم بود که لاین‌های هموپلاسم کلامیدوموناس دربردارنده سازه کلروپلاستی *ECC T7- G10* ایجاد شده و به‌عنوان لاین دریافت‌کننده^۲ سازه هسته‌ای استفاده شوند. سپس این لاین‌های ترانسپلاستومیک ایجاد شده با سازه هسته‌ای حاوی ژن *T7 RNA* پلی‌مراز سوپرترنسفرم شدند.

^۱ Green Fluorescent Protein

^۲ Recipient line



شکل ۱- همسانه‌سازی سازه کلروپلاستی *ECC T7-G10*. الف- تکثیر قطعه اصلی با استفاده از آنزیم DNA پلی‌مراز Phusion روی ژل آگارز ۰/۸٪ PCR شماره #۱، تکثیر قطعه ژنی اصلی حاوی توالی CDS ژن *YFP* همراه با خاتمه‌دهنده ژن *C.r.rbcL* (۱۱۸۶ bp) و M. ب- نتایج حاصل از واکنش برش سازه *ECC T7-G10* استخراج شده از سه کلونی مختلف (#۱-۳)، با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *MfeI/XhoI* روی ژل آگارز ۱٪. قطعات برشی مورد انتظار و مشاهده شده ۶۲۷۷ bp و ۱۱۴۶ bp بودند. M. 1 kb Ladder Mix می‌باشد.

بعد از ساخت و انتقال این سازه به ژنوم کلروپلاست و تایید هموپلاسمی لاین‌ها، قطعات ژنی درج شونده حاوی توالی تنظیمی برای ساخت سازه هسته‌ای (PCR شماره #۲ و #۳) طبق دستورالعمل کیت استفاده شده از ژل آگارز ۰/۸٪ به طور جداگانه خالص و سپس در همسانه‌سازی استفاده شدند (شکل ۲-الف). بعد از تعیین کمیت، قطعات تکثیرشده در فرایند همسانه‌سازی و ساخت سازه موردنظر استفاده شدند. به‌منظور تایید درج صحیح قطعه مورد نظر در ناقل حدواسط و ساخت سازه مذکور، پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت انتخابی با آنزیم‌های محدودگر مناسب برش داده شد و آنالیز قطعات حاصل از برش صورت گرفت (شکل ۲-ب). نتایج آزمون برش و همچنین توالی‌یابی نشان داد که همسانه‌سازی این سازه نیز با موفقیت انجام شده است.

تایید اولیه حضور سازه‌های کلروپلاستی در پلاستوم با استفاده از PCR

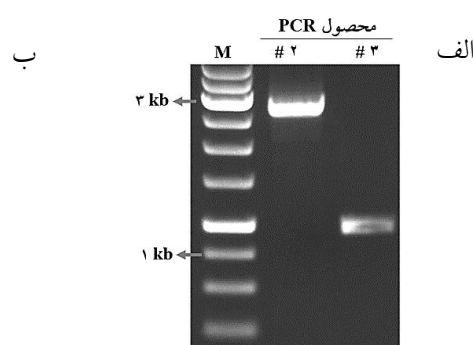
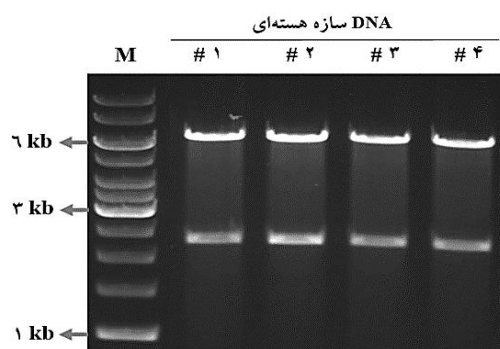
از PCR

به‌منظور انجام تاییدهای اولیه درج سازه‌های انتقال داده شده در ژنوم کلروپلاست، از آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای

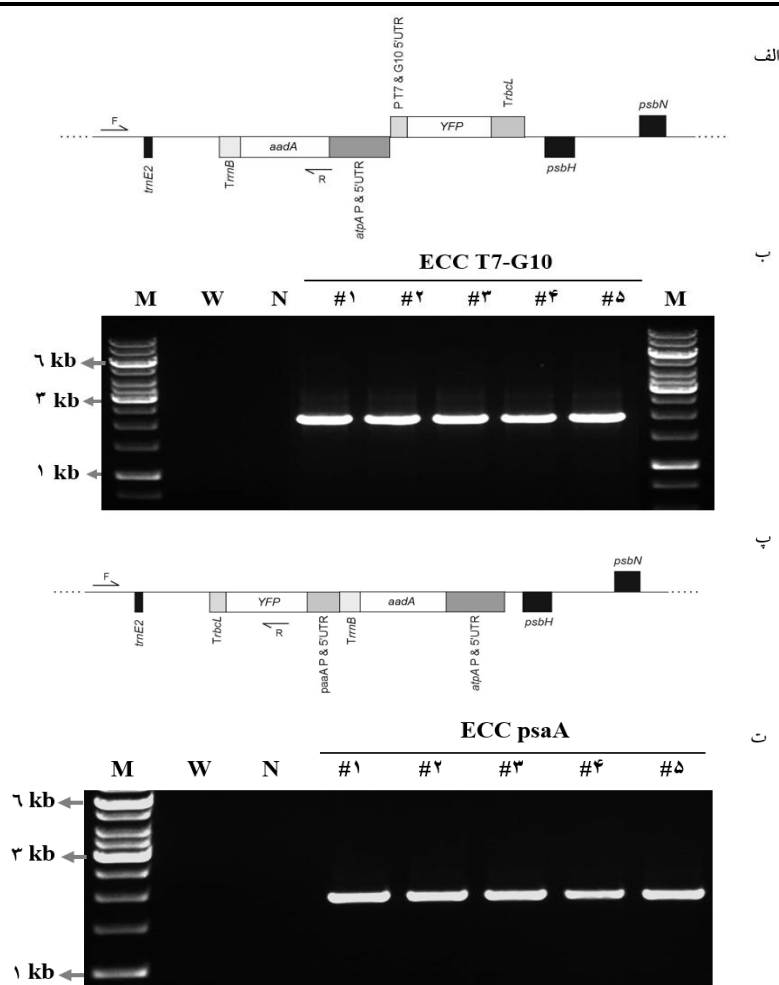
آنالیز سادرن بلات جهت تایید درج صحیح سازه در پلاستوم

کلامیدوموناس و هموپلاسمی لاین‌های ترانسپلاستومیک

تایید تراریخته بودن و درج صحیح کاست در درون ژنوم کلامیدوموناس با استفاده از آنالیز سادرن بلاتینگ (Southern blotting) و پروب اختصاصی صورت گرفت. نتایج حاصل از آزمون سادرن بلات به‌طور واضح نشان‌دهنده درج موفقیت‌آمیز دو سازه کلروپلاستی *ECC T7-G10* و *ECC psaA* در ژنوم کلروپلاست کلامیدوموناس بود. این نتایج همچنین نشان دادند که لاین‌های ترانس‌پلاستومیک به‌طور کامل هموپلاسم بودند (شکل ۴).



شکل ۲- همسانه‌سازی سازه هسته‌ای حاوی توالی ژن *C.r.N.T7-RNAP*. الف- تکثیر قطعات موردنیاز با استفاده از آنزیم پلی‌مراز Phusion روی ژل آگارز ۰/۸٪. محصول PCR شماره #۲، قطعه ژنی حاوی توالی ژن *C.r.N.T7-RNAP* (۲۶۸۸ bp)، محصول PCR شماره #۳، قطعه ژنی حاوی توالی راه‌انداز، 5'UTR و پپتید راهنما ژن *C.r.psaD* (۹۲۶ bp) و 1 kb Ladder Mix می‌باشد. ب- نتایج حاصل از واکنش برش سازه هسته‌ای با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *ZraI/SfiI* روی ژل آگارز ۰/۸٪. قطعات برشی مورد انتظار و مشاهده شده ۶/۴ kb و ۲/۴ kb برای سازه ذکر شده بودند. 1 kb Ladder Mix، M.



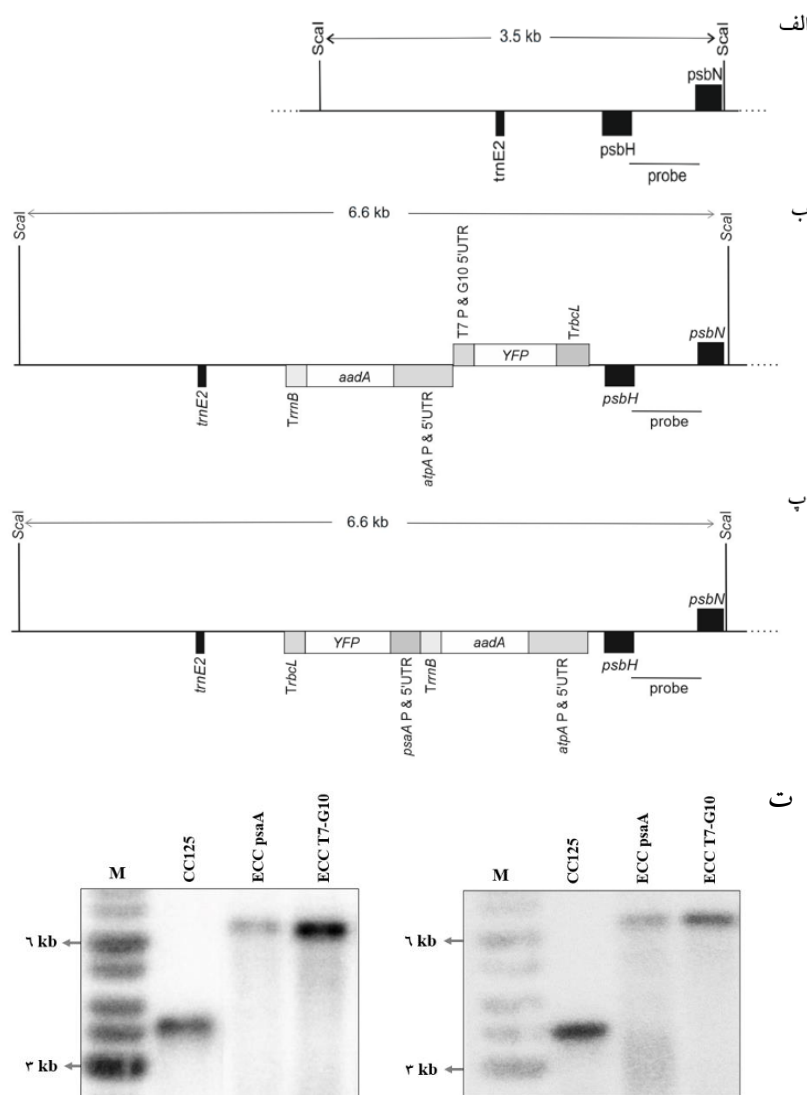
شکل ۳- نتایج اولیه تایید درج صحیح و بررسی هموپلاسمی لاین‌های ترانس‌پلاستومیک حاوی سازه‌های ECC *psaA* و ECC *T7-G10* با استفاده از PCR روی ژل آگارز ۱٪. الف و پ) نقشه‌های فیزیکی بخشی از ژنوم کلروپلاستی لاین‌های ترانسفرم شده به همراه محل آغازگرهای طراحی شده. ب و ت) قطعه تکثیرشونده مورد انتظار ۱/۹ kb با استفاده از آغازگرهای اختصاصی oRMB558 و oRMB532 برای لاین‌های حاوی سازه ECC *T7-G10* و آغازگرهای اختصاصی oRMB472 و oRMB515 برای لاین‌های حاوی سازه ECC *psaA* بر روی ژل مشاهده گردید. W) واکنش بدون نمونه الگو به عنوان کنترل منفی اجزای PCR، N) ژنوم سویه تیپ وحشی به عنوان کنترل منفی نمونه‌های الگو و چاهک‌های شماره ۱ تا ۵، لاین‌های ترانس‌پلاستومیک کلایدوموناس مربوط به هر سازه انتقالی و M، 1 kb Ladder Mix می‌باشد.

تأیید اولیه حضور سازه‌های هسته‌ای در نواحی یوکروماتین با

قابلیت بیان ژن بالا با استفاده از روش ژنتیکی طراحی شده

امکان استفاده از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جهت تایید درج سازه بیانی هسته‌ای در ژنوم هسته کلایدوموناس وجود نداشت. چراکه برخلاف درج دقیق سازه‌های کلروپلاستی در ژنوم، درج سازه هسته‌ای در ژنوم هسته به صورت تصادفی رخ می‌دهد. از طرفی، از آنجا که اثرات مکانی و امکان درج سازه در قسمت‌های یوکروماتینی و هتروکروماتینی ژنوم نیز وجود دارد، بنابراین صرفاً تأیید درج ژنوم در ژنوم هسته با استفاده از آزمون سادرن بلاتینگ کافی نمی‌باشد. به عبارتی

دیگر نیاز است که درج ژن در مناطق یوکروماتینی ژنوم و فعال از نظر رونویسی تأیید شود. از طرفی، باید توجه شود که انجام آزمون سادرن بلات برای گزینش تعداد زیاد لاین‌های تراریخت (تقریباً ۲۰۰ لاین برای هر سازه) عملاً از لحاظ وقت و هزینه، امکان‌پذیر و به صرفه نبود. از این رو، در پژوهش حاضر، روشی ژنتیکی برای گزینش لاین‌های تراریخت استفاده شد که معایب روش‌های غربالگری ذکرشده در بالا را نداشت. در واقع معیار و اساس به‌کارگیری این روش علاوه بر توانایی در بررسی و تأیید درج ژن در ژنوم، تشخیص لاین‌هایی است که درج سازه هسته‌ای در قسمت فعال رونویسی ژنوم آن‌ها رخ داده است.



شکل ۴- نتایج آزمون سادرن بلات برای لاین‌های ترانس‌پلاستومیک ایجاد شده در سویه CC-125 کلامیدوموناس. این آزمون جهت بررسی نهایی درج صحیح سازه‌ها در ژنوم و هموپلاسمی لاین‌های ایجاد شده با استفاده از پروب اختصاصی طراحی شده و آنزیم‌های برشی مناسب انجام شد. نقشه‌های فیزیکی بخشی از ژنوم کلروپلاستی الف) کلامیدوموناس سوپرترنسفرم نشده، ب) لاین‌های سوپرترنسفرم شده با سازه ECC T7-G10 و پ) لاین‌های سوپرترنسفرم شده با سازه ECC *psaA* همراه محل پروب‌های طراحی شده و آنزیم‌های برشی مورد استفاده. محل درج سازه‌های مذکور در ناحیه بین ژن‌های *trnE2* و *psbH* ژنوم کلروپلاست است. ت) نتیجه RFLP از ژنوم *C. reinhardtii*. درج صحیح سازه‌ها و همچنین هموپلاسمی در لاین‌های ترانس‌پلاستومیک ایجاد شده را تایید نمود. چاهک M: 1 Kb DNA ladder؛ چاهک N: ژنوم سویه نوع وحشی CC-125 ترنسفرم نشده و دو چاهک بعدی مربوط به لاین‌های ترانس‌پلاستومیک ایجاد شده می‌باشد. دو ژل نمایش داده شده مربوط به دو لاین مستقل بررسی شده حاوی سازه‌ها هستند. نمونه‌های DNA با آنزیم *ScaI* هضم شده و سپس به یک پروب که ژن *PsbH* را شناسایی می‌کند، هیبرید شدند. اندازه قطعات DNA مورد انتظار با اندازه 3/5 Kb برای ژنوم سویه CC-125 ترنسفرم نشده و حدود 6/6 Kb برای ژنوم لاین‌های ترانس‌پلاستومیک دارای سازه‌های ECC *psaA* و ECC T7-G10. پس از انتقال قطعات از روی ژل آگارز ۱٪ به غشاء مشهود بود.

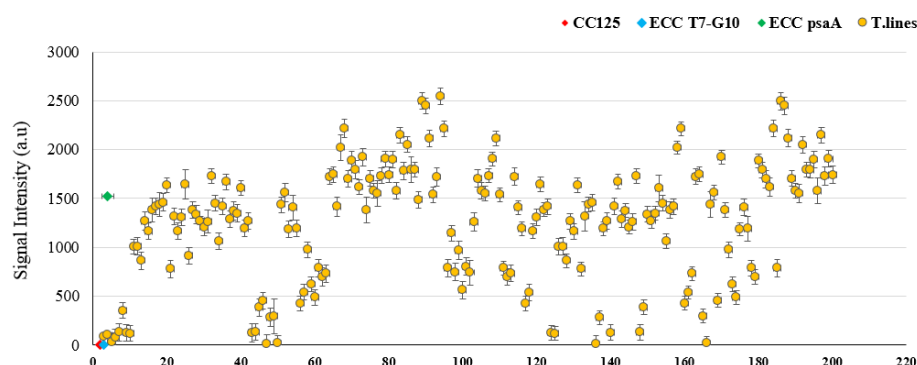
NEP در کلامیدوموناس، رونویسی از سازه مذکور صورت نمی‌گیرد. چنانچه این لاین‌های ترانس‌پلاستومیک، سازه هسته‌ای را نیز دریافت کنند، پروتئین T7-RNA پلی‌مراز به وسیله پپتید

در این روش، ریزجلبک‌های ترانس‌پلاستومیک حاوی ECC T7-G10، قادر به بیان و تولید نور فلورسنت در کلروپلاست نیستند چراکه به دلیل عدم حضور RNA پلی‌مراز کلروپلاستی از نوع

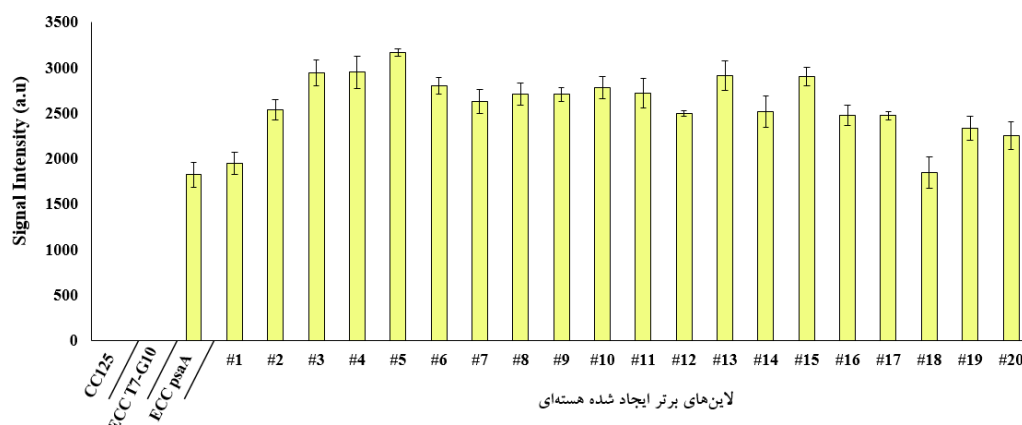
تک کلونی های رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین به محیط کشت جدید حاوی این آنتی بیوتیک انتقال داده شد. در واقع سلول هایی که سازه هسته ای را دریافت نموده اند، قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نبوده و از فرآیند غربال گیری حذف شدند. سپس کشت مایع این تک کلونی ها در حجم کم (۱ ml) انجام و وقتی منحنی رشد نمونه ها دوسوم فاز نمایی را طی کرد، سیگنال فلورسنت YFP در آن ها اندازه گیری شد. همان طور که انتظار می رفت، طیف گسترده ای از بیان ژن YFP و تولید نور فلورسنت در لاین های ایجاد شده مشاهده شد (شکل ۵).

راهنما به کلروپلاست انتقال داده می شود. در نتیجه رونویسی از ژن YFP تحت کنترل راه انداز این RNA پلی مرز انجام گرفته و این پروتئین سنتز و سیگنال فلورسنت در اثر تجمع آن در کلروپلاست تولید می شود. بنابراین از این طریق می توان لاین های مثبتی که این سازه های هسته ای را نیز دریافت کرده اند غربال و انتخاب نمود.

به طور جزئی تر، وقتی لاین های ترانسپلاستومیک با سازه هسته ای سوپرترنسفرم می شوند، تعداد زیادی از سلول ها سازه مورد نظر را دریافت نمی کنند. بنابراین با کشت بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انتخابی به کار رفته در همسانه سازی سازه هسته ای، این سلول ها قادر به رشد نبوده و از بین می روند. بنابراین، ابتدا



شکل ۵- شدت متفاوت سیگنال فلورسنت ساطع شده در لاین های ترایخت ایجاد شده حاصل از درج سازه هسته ای در قسمت های مختلف ژنوم *C.reinhardtii* سویه نوع وحشی CC-125 ترنسفرم نشده به عنوان کنترل منفی نمونه ها، لاین ترانس پلاستومیک ECC T7-G10 قبل از دریافت سازه هسته ای، لاین ترانس پلاستومیک ECC psaA به عنوان کنترل مثبت و ۲۰۰ لاین سوپرترنسفرم شده (ترانس پلاستومیک و ترایخت هسته ای همزمان) رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک. در واقع T. lines داده های کمی حاصل از اندازه گیری میزان سیگنال فلورسنت ساطع شده حاصل از تجمع پروتئین YFP جهت اسکرین لاین های سوپرترنسفرم شده را نشان می دهد. در محور افقی، شماره لاین ها و در محور عمودی شدت سیگنال ساطع شده، نمایش داده شده است.



شکل ۶- بررسی سیگنال فلورسنت حاصل از تجمع پروتئین YFP در ۲۰ لاین برتر سوپرترنسفرم شده *C. reinhardtii* حاوی سازه های بیانی کلروپلاستی و هسته ای به طور همزمان. در محور افقی، شماره لاین ها و در محور عمودی میزان سیگنال ساطع شده، نمایش داده شده است.

نتایج نشان داد که در برخی لاین‌ها شدت سیگنال ساطع شده برابر با کنترل منفی بود که بیانگر عدم دریافت سازه هسته‌ای کامل در این لاین‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر اگرچه این سلول‌ها قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک بودند اما از آن‌جا که سازه را به‌طور کامل دریافت نکرده بودند (احتمالاً فقط بخشی از سازه که حاوی ژن مقاومت است دریافت شده)، از این رو قادر به تولید سیگنال فلورسنت نبودند. بنابراین، با روش غربال‌گری معرفی شده در پژوهش حاضر، این لاین‌ها نیز قابل تمایز و حذف شدن از روند آزمایش بودند. در مورد سلول‌هایی که سازه را به‌طور کامل دریافت کرده بودند، همچنین طیف متنوعی از تولید سیگنال فلورسنت مشاهده شد. این تنوع گسترده در بیان ژن می‌تواند به علت محل درج ژن از لحاظ فعال بودن و غیرفعال بودن رونویسی در آن ناحیه باشد. در این میان، مشاهده لاین‌های با میزان بیان بالای YFP و شدت سیگنال ساطع شده‌ی بیش‌تر از لاین کنترل مثبت (*ECC psaA*)، بیانگر درج سازه هسته‌ای در قسمت یوکروماتینی و فعال‌تر ژنوم جهت رونویسی بود.

از این رو، با اندازه‌گیری میزان سیگنال فلورسنت تولید شده به عنوان نشانه‌ای از تجمع پروتئین نهایی، می‌توان لاین‌هایی را که سازه هسته‌ای در محل فعال رونویسی آن‌ها درج شده است گزینش کرد. البته باید توجه شود که تعداد نسخه درج شده از سازه در ژنوم نیز می‌تواند به عنوان فاکتور دیگر تاثیرگذار بر میزان بیان ژن باشد. هرچند که در این صورت نیز این روش همچنان بهترین لاین‌هایی را که دارای پتانسیل بالای بیان ژن همراه با عدم خاموشی آن هستند گزینش می‌کند.

از بین لاین‌های تولیدکننده سیگنال در پروژه حاضر، ۲۰ لاین با پتانسیل بیان بالاتر انتخاب و مجدداً میزان تولید سیگنال فلورسنت در بین آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶). این نتایج نیز به‌طور واضح، داده‌های شکل قبل را تأیید کردند.

ادغام DNA خارجی در ژنوم هسته‌ای ریزجلبک کلامیدوموناس با فراوانی نسبتاً بالایی از طریق نوترکیبی غیرهمولوگ و در موقعیت‌های تصادفی رخ می‌دهد. با این وجود، به دلیل این اثرات موقعیت مکانی و امکان رخداد بالای پدیده خاموشی ژن برای بیان ژن‌های خارجی، نیاز است که به‌طور میانگین حداقل ۲۴۰

لاین ترانسفرم شده مورد گزینش قرار گیرد تا لاین مورد نظر یافت شود. در مطالعات اخیر، رویکردهای ژنتیکی مختلفی جهت غلبه بر این محدودیت توسعه یافته است (Shahar et al. 2020). برای مثال، به‌طور معمول در سازه‌های بیان دائم هسته‌ای کلامیدوموناس، ژن‌های خارجی مورد نظر جهت بیان در هسته، در کنار ژن انتخابگر قرار می‌گیرند. از این رو، بعد از انتقال و درج سازه‌ها در قسمت فعال رونویسی ژنوم هسته، ژن‌های خارجی می‌توانند همراه با ژن انتخابگر در حضور آنتی‌بیوتیک بیان شوند. در این شرایط، بیان ژن خارجی در حضور فشار آنتی‌بیوتیک، نیاز به عدم خاموش شدن ناحیه درج شونده ژن در هسته، جهت بیان ژن انتخابگر دارد که در نتیجه ژن خارجی همجوار آن نیز بیان می‌شود. این روش به‌طور معمول برای گزینش لاین‌های تراریخت استفاده می‌شود. با این حال، نشان داده شده است که چنانچه فشار انتخاب کاهش یابد، کلامیدوموناس به راحتی می‌تواند سازه بیانی را خاموش کند (Gerutti et al. 1997; Schroda 2019). به عبارتی دیگر، بیان ژن خارجی و استفاده کارآمد از این روش انتخابی، بستگی به فشار انتخاب در محیط کشت و همچنین ژن انتخابی دارد. در این صورت، لاین‌های تراریختی که صرفاً سازه ناقص حاوی ژن انتخابگر را دریافت کرده باشند نیز، علی‌رغم بیان ژن انتخابگر، قادر به بیان ژن خارجی نیستند. موارد ذکر شده می‌تواند به عنوان معایب و محدودیت روش گزینش مذکور باشد که منجر به کارآمدی پایین آن می‌شود. متأسفانه سازوکار خاموش شدن ژن خارجی هسته در کلامیدوموناس تا این حد فعال است (Schroda et al. 2000; Schroda 2019). در روش دیگر، با استفاده از جهش‌زایی اشعه ماوراء بنفش (UV) سویه‌های از کلامیدوموناس ایجاد شد (UVM-4 و UVM-11) که کارایی بالاتری در بیان و تجمع ژن خارجی نشان دادند. این لاین‌ها دارای جهش در ژن *H4Ac* هستند که به دلیل نقش آن در تغییرات کروماتینی، احتمالاً تغییرات اپی‌ژنتیک و سرکوب بیان ژن خارجی در آن‌ها کاهش یافته است. اما از محدودیت این روش نیز می‌توان به این موضوع اشاره نمود که غربال لاین‌های مدنظر و بیان ژن خارجی محدود به استفاده از صرفاً همین لاین‌ها می‌شود (Neupert et al. 2020). حال اینکه، روش استفاده و بهینه شده در پژوهش حاضر، مستقل از موارد ذکر شده است.

لاین های تراریختی را گزینش کرد که ژن مربوط به پروتئین نو ترکیب در آنها در قسمت یوکروماتین و فعال ژنوم هسته درج شده است.

سپاسگزاری

نتایج ارائه شده، بخشی از نتایج پروژه مصوب بنیاد ملی علم ایران (INSF)، در قالب رساله دکتری با کد ۹۹۰۲۷۷۱۱ می باشد. همچنین وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، دانشگاه تربیت مدرس و مؤسسه ماکس-پلانک آلمان به عنوان حامیان مالی انجام پروژه حاضر در کشور ایران و آلمان هستند که در اینجا نهایت قدرانی به عمل می آید.

بررسی نتایج حاصل از بیان پروتئین YFP در لاین های ایجاد شده نشان داد که این روش غربال ژنتیکی به خوبی می تواند جهت گزینش لاین های کلامیدوموناس که حاوی سازه هسته ای در قسمت یوکروماتین و فعال تر رونویسی هستند، مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه جهت بهینه سازی این روش در پروژه حاضر، صرفاً ژن *T7 RNA* پلی مرز در هسته بیان شد و به واسطه فعالیت آن در کلروپلاست، ژن *YFP* در اندامک فوق بیان گردید، اما این روش قابلیت استفاده برای غربال و گزینش سایر ژن های هترو لوگ هسته ای مورد استفاده را نیز برخوردار است. به این صورت که ژن مربوط به پروتئین نو ترکیب (تحت کنترل راه انداز *T7*) با ژن *T7 RNA* پلی مرز در سازه هسته ای ادغام و در ژنوم هسته ای جایگذاری شود. بدین وسیله بر اساس میزان بیان ژن *RNA* پلی مرز و متعاقباً میزان سیگنال فلورسنت ساطع شده، می توان

منابع

- Barahimipour R, Strenkert D, Neupert J, Schroda M, Merchant S S, Bock R (2015) Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 84:704-717.
- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE (1997) Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *The Plant Cell* 9:925-945.
- Doron L, Segal NA, Shapira M (2016) Transgene expression in microalgae-from tools to applications. *Frontiers in Plant Science* 7:505.
- Kropat J, Hong-Hermesdorf A, Casero D, Ent P, Castruita M, Pellegrini M, Merchant S S, Malasarn D (2011) A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 66:770-78.
- León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E (2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. *TRENDS in Biotechnology* 22:45-52.
- Magee AM, Kavanagh TA (2002) Plastid genes transcribed by the nucleus-encoded plastid RNA polymerase show increased transcript accumulation in transgenic plants expressing a chloroplast-localized phage T7 RNA polymerase. *Journal of experimental botany* 53: 2341-2349
- Mayfield SP, Franklin SE (2005) Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. *Vaccine* 23:1828-1832.
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M, Marin-Navarro J (2007) *Chlamydomonas*

- reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current opinion in biotechnology* 18:126-133.
- Mehrshahi P, Nguyen GTD, Gorchs Rovira A, Sayer A, Llaverro-Pasquina M, Lim Huei Sin M, Medcalf EJ, Mendoza-Ochoa GI, Scaife MA, Smith AG (2020) Development of novel riboswitches for synthetic biology in the green alga *Chlamydomonas*. *ACS synthetic biology* 9:1406-1417.
- Neupert J, Gallaher SD, Lu Y, Strenkert D, Segal N a, Barahimipour R, Fitz-Gibbon S T, Schroda M, Merchant S S, Bock R (2020) An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature communications* 11:6269.
- Neupert J, Karcher D, Bock R (2009) Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal* 57:1140-1150.
- Neupert J, Shao N, Lu Y, Bock R (2012) Genetic transformation of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*:35-47.
- Ramos-Martinez EM, Fimognari L, Sakuragi Y (2017) High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant biotechnology journal* 15:1214-1224.
- Salomé PA, Merchant SS (2019) A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *The Plant Cell* 31:1682-1707.
- Schröda M (2019) Good news for nuclear transgene expression in *Chlamydomonas*. *Cells* 8:1534.
- Schröda M, Blöcker D, Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of

transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 21:121-131.

Scranton MA, Ostrand JT, Fields FJ, Mayfield SP (2015) *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal* 82:523-531.

Shahar N, Landman S, Weiner I, Elman T, Dafni E, Feldman Y, Tuller T, Yacoby I (2020) The integration of multiple nuclear-encoded transgenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* results in higher transcription levels. *Frontiers in Plant Science* 10:1784.

Smith AC, Purton S (2002) The transcriptional apparatus of algal plastids. *European Journal of Phycology* 37:301-311.

Zhang M-P, Wang M, Wang C (2021) Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. *Biochimie* 181:1-11.