ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۴۷۰-۴۶۳

بیان و تخلیص آنزیم Cas9 در باکتری *E. coli*

Expression and purification of Cas9 enzyme in *E. coli*

علی امامی پور[۱]، هومن رضایی نیک[۲]، علیرضا سیفی[۳*]

۱-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Emamipour A[1], Rezai Nik H[2], Seifi A[3*]

1-MSc in Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- MSc in Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arseifi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴ - تاریخ پذیرش۱۴۰۱/۰۱/۲۸)

چکیده

ویرایش ژنوم مبتنی بر فناوری CRISPR/Cas9 (کریسپر) به عنوان ابزار قدرتمندی برای اصلاح گیاهان زراعی به‌سرعت در حال گسترش است. یکی از مزایای این فناوری امکان دستورزی ژن‌های هدف بدون درج DNA خارجی در گیاه است. برای این منظور نیاز است که آنزیم Cas9 و RNA راهنما بصورت کمپلکس پروتئین-RNA (RNP) به سلول گیاهی منتقل شوند. از اینرو تولید Cas9 در آزمایشگاه مقدمه آزمایشات کریسپر مبتنی بر RNP است. هدف این پروژه بیان و تخلیص آنزیم Cas9 در باکتری *E. coli* بود. در این پژوهش ژن Cas9 در ناقل بیانی pBADM30 کلون و به باکتری *E. coli* سویه‌ی CodonPlus منتقل شد. نتایج حاصل از کلونی PCR و هضم دوگانه‌ی آنزیمی وجود ژن Cas9 در ناقل pBADM30 را تایید نمود. در مرحله بعد بیان Cas9 با اعمال ۰/۲ درصد L-Arabinose القا شد و سپس آنزیم Cas9 با استفاده از ستون میل ترکیبی نیکل از کل پروتئین محلول تخلیص شد. الکتروفورز SDS-PAGE حضور پروتئین Cas9 با وزن ملکولی حدود 180 kDa در پروتئین کل و پروتئین تخلیص شده را نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که پس از سنجش فعالیت کاتالیکی آنزیم Cas9 تخلیص شده می‌توان از این آنزیم به همراه RNA راهنما برای سرهم‌بندی کمپلکس RNP و انتقال آن به گیاه با روش پروتوپلاست یا الکتروپوریشن، برای ویرایش ژنوم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

پروتوپلاست
ریبونوکلئوپروتئین
کریسپر
ویرایش ژنوم
RNP

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

اثبات اینکه شکست‌های دو رشته‌ای هدفمند در DNA میزان ویرایش ژن را تا ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌دهد، یک پیشرفت اساسی در زمینه‌ی ویرایش ژنوم بود (Choulika et al. 1995). شکست های دورشته ای در سلول های یوکاریوتی با استفاده از دومسیر اصلی ترمیم می‌شوند: سیستم نوترکیبی غیرهمسان (NHEJ[1]) و سیستم تعمیر DNA مبتنی بر نوترکیبی همسان (HDR[2]) (Puchta et al., 1996). در حالی‌که NHEJ ممکن است منجر به ترمیم ناقص و در نتیجه طیف وسیعی از جهش‌های مختلف شود، فرآیند HDR می‌تواند ویرایش دقیق ژن را با استفاده از الگوهای DNA که حاوی توالی مورد نظر است میسر کند. در دو دهه‌ی گذشته چندین فناوری که قادر به ایجاد شکست های دو رشته‌ای هدفمند در DNA هستند توسعه یافته‌اند، از جمله نوکلئازهای انگشت روی، مگانوکلئازها، نوکلئازهای موثر فعال کننده‌ی رونویسی (TALENs) و پروتئین‌های مرتبط با سیستم CRISPR-Cas (کریسپر) (Puchta and Fauser 2014). فناوری کریسپر به دلیل سادگی، کارایی و تطبیق پذیری بالا، به سرعت به فناوری انتخابی برای اکثر برنامه‌های کاربردی ویرایش ژنوم تبدیل شده است (Doudna and Charpentier 2014). در سال‌های گذشته آنزیم Cas9 جداشده از باکتری *Streptococcus pyogenes* با موفقیت برای اصلاح ژنوم در گونه‌های مختلف گیاهی استفاده شده‌است (Kumar and Jain 2015). در اکثر این آزمایش‌ها RNA راهنما و توالی Cas9 با استفاده از اگروباکتریوم یا بمباران ذره‌ای به سلول گیاهی وارد داده شده‌اند. در هر دو مورد، DNA واردشده اغلب در ژنوم گیاه ادغام شده و منجر به عوارض جانبی مختلفی مانند اختلال در ژن، موزاییکی شدن فنوتیپ گیاه، و برش خارج از هدف می‌شود (Kanchiswamy 2016). برای کاهش این اثرات منفی، ابتدا Cas9 به گیاه هدف منتقل می‌شود و سپس RNA های هدف بطور جداگانه به این گیاه تراریخته حاوی Cas9 وارد می‌شود (Svitashev et al. 2016)، که روشی موفقیت آمیز ولی زمان‌بر است. روش استفاده از کمپلکس نوکلئاز Cas9 و sgRNA که به روش RNP[3] معروف است، روش امیدبخشی است که با سرعت بیشتر همراه با کاهش پاسخ‌های ایمنی سلول میزبان و بدون نیاز به درج DNA خارجی در ژنوم میزبان امکان ویرایش ژنوم را فراهم می‌آورد (DeWitt et al., 2017). ویرایش ژنوم در سلول‌های انسانی کشت شده و با استفاده از انتقال RNPs به وسیله‌ی الکتروپوریشن انجام شده است (Liang et al., 2015). با این حال در گیاهان وجود دیواره‌ی سلولی، استفاده از الکتروپوریشن را سخت و تقریبا غیرممکن کرده است. انتقال RNP به پروتوپلاست‌های گیاهی روش دیگری است که در چندین گونه گیاهی با موفقیت برای ویرایش ژنوم به کار گرفته شده است (Lin et al., 2022; Zhang et al., 2022). امروزه از باکتری اشرشیا کلای، به دلیل سرعت بالا و هزینه پایین تولید، برای تولید آنزیم‌های نوترکیب استفاده می‌شود (Demain and Vaishnav, 2009). علاوه بر این بسته به خواص پروتئین موردنظر، سویه‌های مختلف اشرشیا کلای تولید شده است که باعث شده بتوانیم به چالش هایی که ممکن است در طول تولید برخی پروتئین‌های نوترکیب وجود داشته‌باشد غلبه کنیم (Tripathi 2016). برای مثال با توجه به تفاوت ترجیح کدونی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، در غالب موارد بیان پروتئین یوکاریوتی در باکتری با راندمان پایین انجام می‌شود. یکی از مهمترین سویه‌هایی که برای بیان ژن های یوکاریوتی در باکتری استفاده می‌شود سویه‌ی BL21-CodonPlus (DE3) می‌باشد .اولین قدم برای انجام آزمایشات CRISPR مبتنی بر RNP تولید کمپلکس RNP است. هدف از این پژوهش بیان و تخلیص آنزیم Cas9 در باکتری است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو سویه Top10 و BL21(DE3) CodonPlus باکتری اشرشیا کلای جهت همسانه‌سازی و بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید. آغازگرهای مناسب جهت تکثیر ژن Cas9

[1] Non-homologous end joining
[2] Homology directed repair
[3] Ribonucleoprotein

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

ازشرکت سیناکلون تهیه گردید (جدول ۱). آنزیم های برشی *EcoR*I (شماره‌ی کاتالوگ ER0271 ساخت شرکت Thermo Fisher) و *Hind*III (شماره‌ی کاتالوگ ER0501 ساخت شرکت Thermo Fisher) و آنزیم *T4* لیگاز از شرکت Thermo Fisher Scientific تهیه شد.

برای تکثیر ژن Cas9 از پلاسمید pCas9-TPC (Lin et al., 2022; Zhang et al., 2022)، به عنوان الگو استفاده شد. برای این منظور از پرایمرهای Cas9F و Cas9-R (جدول ۱) برای PCR با پروفایل دمایی تاچ داون بصورت ۹۸ درجه سانتیگراد ۱۰ سیکل، ۶۰ درجه سانتیگراد، ۵ سیکل، ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ سیکل، سپس ۹۸ درجه سانتیگراد ۳۰ سیکل، ۵۵ درجه سانتیگراد ۳۰ سیکل ،۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ سیکل و هر سیکل ۱۰ ثانیه، و در نهایت دو دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به عنوان بسط نهایی در دستگاه ترموسایکلر Biometra استفاده شد. ترکیب واکنش PCR یک واکنش ۵۰ میکرولیتری شامل بافر واکنش (1x)، dNTPs (200µM)، پرایمرهای رفت و برگشت (0.5µM)، پلاسمید pCas9-TPC (50ng) و آنزیم *Q5* (0.2U) بود. به منظور کاهش خطای تکثیر، آنزیم *Q5* شرکت NEB به عنوان پلی مراز در این مرحله مورد استفاده قرار گرفت. سپس واکنش هضم آنزیمی دوگانه روی محصول PCR توسط دو آنزیم *EcoR*I و *Hind*III به مدت ۱۲ ساعت انجام شد و محصول هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد، تهیه شده با استفاده ار بافر TAE الکتروفورز شد. جهت آشکارسازی باندها از ترکیب فلئور سنت Green Viewer (ساخت شرکت پارس طوس زیست فناور) با غلظت ۰/۰۱ درصد در ژل آگارز استفاده شد. ژل مورد نظر به مدت ۶۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰ ولت بر سانتی متر (۸۰ ولت) الکتروفورز شد. بعد از مشاهده‌ی باند مورد نظر، با استفاده از پنس و اسکالپل استریل باند از روی ژل جدا شده و با استفاده از کیت تخلیص ژل (شرکت دنازیست) تخلیص و بازیافت شد. ناقل بیانی pBADM30 نیز تحت واکنش هضم آنزیمی دوگانه با دو آنزیم *EcoR*I و *Hind*III به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت و محصول هضم آنزیمی و قطعه تخلیص شده از روی ژل در مرحله‌ی قبل تحت واکنش لیگاسیون توسط آنزیم *T4* Ligase قرار گرفتند.

جدول شماره ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن Cas9

توالی آغازگرها **Primers sequence**	آغازگرها **Primers** (5′→3′)
CCGGAATTCAATGGATAAGAAGTACTC	Forward (Cas9_F) رفت
CGCAAGCTTTCAAACCTTCCTCTTCTT	Reverse (Cas9_R) برگشت
CCTTGGTGATCTCGGTGTTCAG	Reverse (Cas9_R1) برگشت

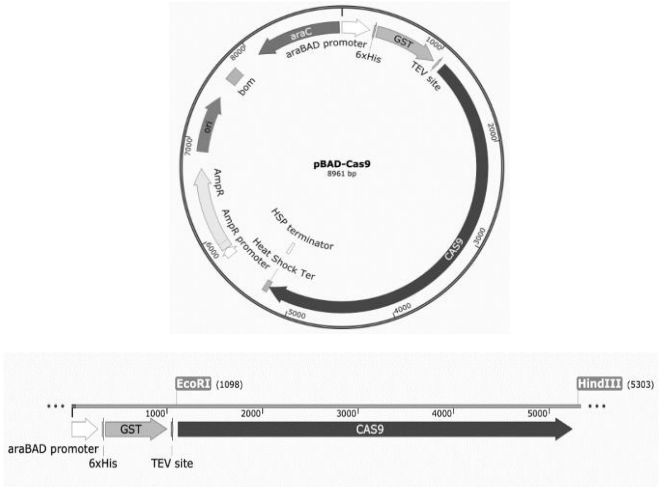
مرحله‌ی قبل تحت واکنش لیگاسیون توسط آنزیم *T4* Ligase قرار گرفتند. محصول لیگاسیون به باکتری مستعد اشرشیا کلی Top10 که به روش اینو (Sambrook and Russell 2006)، تهیه شده بود به روش شوک حرارتی انتقال داده شد. به طور خلاصه مقدار ۲/۵ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ۵۰ میکرولیتر باکتری مستعد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس شوک گرمایی به مدت ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه باکتری داده شد و باکتری ها مجددا به مدت ۲ دقیقه روی یخ گذاشته شدند و مقدار ۹۵۰ میکرولیتر LB مایع حاوی عصاره مخمر (۵ g/l)، NaCl (۱۰ g/l) و peptone (۱۰g/l) روی آن ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری روی محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ µg/ml انتی بیوتیک آمپی سیلین پخش شد و پلیت به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. کلونی‌های تایید شده با کلونی PCR در ۳ میلی لیتر LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت شد و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پلاسمید به روش سیلیکا (Grimm and Voß-Neudecker 2003) استخراج شد و پس از تایید صحت پلاسمید با انجام هضم آنزیمی، این پلاسمید به باکتری CodonPlus به روش شوک حرارتی انتقال داده شد و روی پلیت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

LB جامد حاوی ۱۰۰ µm/ml آمپی سیلین، ۳۴ µg/ml کلروامفنیکل و ۷۵ µg/ml اسپکتینومایسین پخش شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. یک کلونی باکتری به ۱۰ میلی لیتر LB حاوی ۱۰۰ µm/ml آمپی سیلین، ۳۴ µg/ml کلروامفنیکل و ۷۵ µg/ml اسپکتینومایسین تلقیح شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و دور rpm ۲۵۰ انکوبه شد. پس از آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کشت شبانه در پنج فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر LB حاوی انتی بیوتیک تلقیح شد و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۲۵۰ انکوبه شد تا غلظت محیط کشت به OD_{600} حدود ۰/۵ برسد. بعد از رسیدن باکتری ها به OD مورد نظر چهار غلظت متفاوت L-Arabinose به غلظت های۰/۲، ۰/۰۲، ۰/۰۰۲ و۰/۰۰۰۲ درصد و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چهار فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر کشت باکتری اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۲۵۰ انکوبه شد تا پروتئین مورد نظر القا شود و پس از آن استخراج پروتئین انجام شد (Invitrogen 2010). پروتئین استخراج شده پس از غلظت سنجی توسط دستگاه نانودراپ شرکت Thermo Fisher Scientific روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد و ژل با روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد(Spector, 1978). برای القا در سه دمای متفاوت سه فالکون حاوی ۳۰ میلی لیتر LB حاوی انتی بیوتیک تلقیح شد و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۲۵۰ انکوبه شد تا به OD_{600}~0.5 برسد. بعد از رسیدن باکتری ها به OD مورد نظر، باکتری ها با L-Arabinose با غلظت ۰/۲ درصد القا و برای مدت ۱۶ ساعت در سه دمای مختلف ۱۸، ۳۰ و ۳۷ درجه ساتیگراد قرار گرفتند. بعد از القای پروتئین مورد نظر، باکتری به تیوب ۵۰ میلی منتقل شد و با دور rpm ۳۵۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری با ۲ میلی لیتر بافر لیزکننده (سدیم فسفات mM ۵۰، کلسیم کلراید mM ۳۰۰ و ایمیدازول mM ۱۰، pH ۸) مخلوط شد و به آن لیزوزیم mg/ml ۱ اضافه شد و سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. سپس سلول ها با استفاده از دستگاه سونیکاتور با ۸ سیکل ۳۰ ثانیه ای و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز لیز شدند. پس از آن سلول ها با دور g ۱۲۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و فاز رویی به تیوب تمیزی منتقل شد. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی و ماتریکس Ni – NTA agarose(شماره کاتالوگ: P6611 محصول شرکت سیگما مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

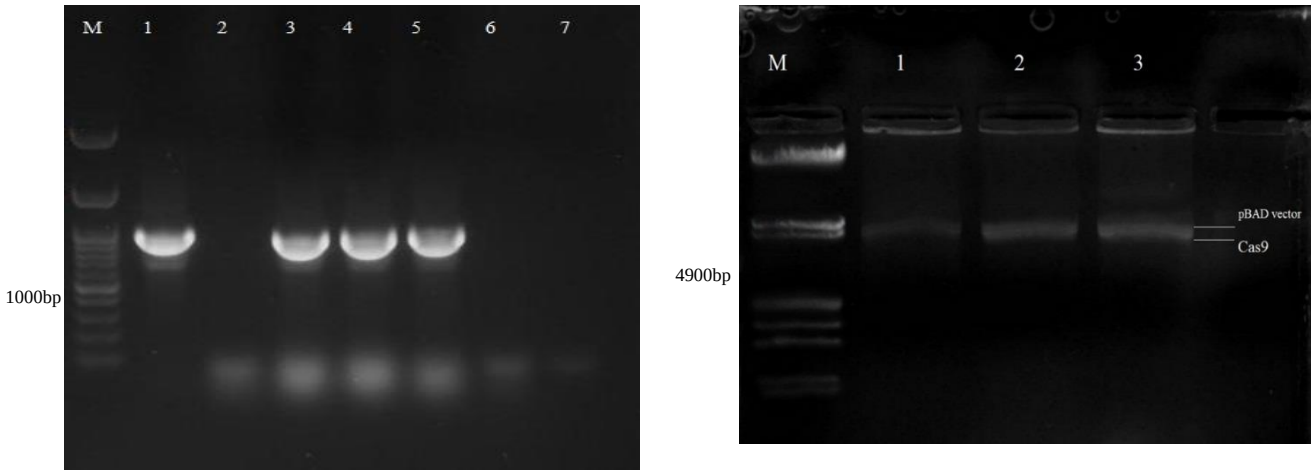
نتایج و بحث

پس از همسانه سازی ژن Cas9، لازم بود که حضور ژن Cas9 در ناقل pBAD تایید گردد. به همین دلیل سازه‌ی ژنی هدف به سلول مستعد باکتری *E. coli* سویه Top10 منتقل شد و کلونی های رشد یافته روی محیط انتخابی با استفاده از آزمون کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای Cas9-F و Cas9-R1 (جدول ۱) بررسی شدند. حضور قطعه ی ۱۰۰۰ جفت بازی مربوط به ژن هدف در ۳ کلونی از ۵ کلونی مشاهده شد (شکل A۲). علاوه بر انجام آزمون کلونی PCR به منظور تایید بیشتر حضور ژن هدف در ناقل pBAD از کلونی‌های مثبت استخراج پلاسمید انجام شد. عمل هضم آنزیمی دوگانه روی پلاسمیدهای استخراجی انجام شد و بعد از عمل هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hind*III دو قطعه‌ی ۴۱۰۰ و ۴۸۰۰ جفت بازی مربوط به سازه‌ی ژنی آزاد شدند. (شکل B۲). پس از تایید همسانه سازی شده است (شکل ۱).

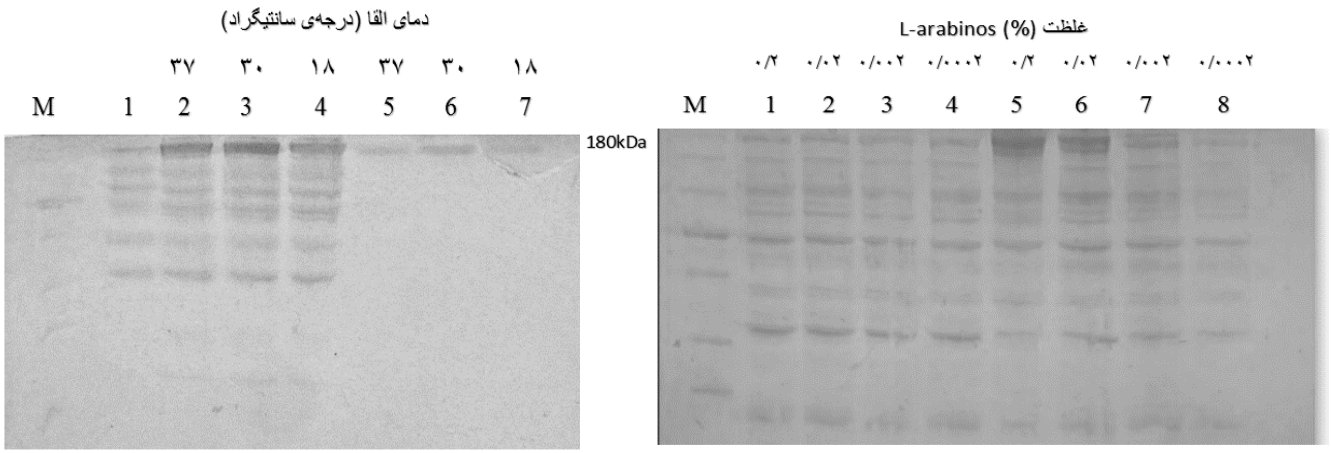


شکل ۱- نمایی شماتیک از ناقل pBADM30 حاوی ژن Cas9 بین دو جایگاه برشی *Eco*RI و *Hind*III درج شده است

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ۲-A: آنالیز کلونی PCR جهت تایید حضور ژن هدف در ناقل pBAD. M: مارکر اندازه (شماره کاتالوگ: SM0191 ساخت شرکت Thermo Fisher)، ۱: کنترل مثبت (ژن Cas9 از ناقل pCAS9) ۲ تا ۶: کلونی ها ، ۷:کنترل منفی (آب). B: آنالیز هضم آنزیمی جهت تایید حضور ژن هدف درناقل pBAD: M: مارکر اندازه (شماره کاتالوگ: SM0191 ساخت شرکت Thermo Fisher)، چاهک های ۱تا۳: کلونی های مثبت.



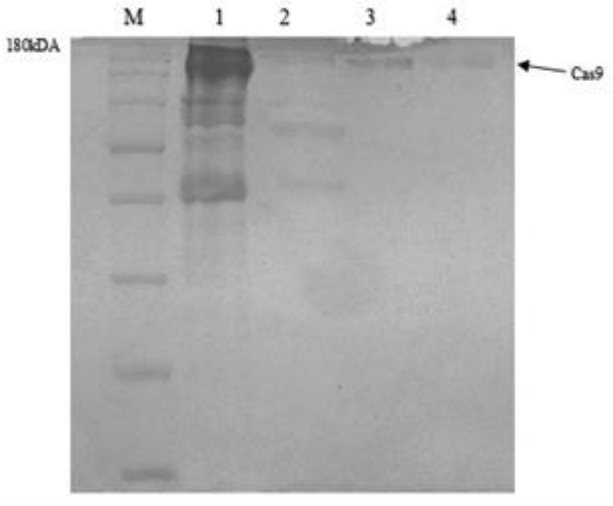
شکل ۳- A: نتایج استخراج پروتئین نوترکیب بر روی SDS-PAGE. M: مارکر اندازه (شماره کاتالوگ: SL7012، شرکت سازنده: سیناکلون)، چاهک های ۱ تا ۴ ناقل pBAD بدون ژن Cas9 و چاهک های ۵ تا ۸ ناقل pBAD حاوی ژن Cas9. B: نتایج استخراج پروتئین و تخلیص آن در دماهای مختلف القاء ژن به مدت ۱۶ ساعت بر روی SDS-PAGE: M: مارکر اندازه، چاهک۲: پروتئین کل بدون ژن Cas9، چاهک های ۳ تا ۵به ترتیب پروتئین کل القا شده در دماهای ۱۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد و چاهک های ۶ تا ۸ به ترتیب پروتئین تخلیص شده در دماهای ۱۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیکراد

در ناقل PBADM30 در حضور L-Arabinose رونویسی و بیان قطعه مورد نظرکه بعد از پروموتر araBAD قرار گرفته آغاز می شود. این در حالی است که در نبود L-Arabinose سطوح بسیار پایینی از رونویسی ایجاد می‌شود. با تغییر غلظت L-Arabinose سطح بیان پروتئین تغییر می‌کند، استخراج پروتئین پس از ۴ ساعت القا توسط القاگر شیمیایی L-arabinose انجام شد. نمونه ها جهت انالیز روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند (شکل A۳)، پس از بررسی نتایج باند حدود ۱۸۰ کیلو دالتون Cas9 GST روی ژل مشاهده شد، از آنجا که پروتئین GST همراه پروتئین هدف بیان شده است و این پروتئین دارای وزن ملکولی ۲۶ کیلودالتون می‌باشد(Hayashi and Kojima, 2008) و وزن ملکولی Cas9 ۱۵۸ کیلو دالتون است(Jinek et al., 2014) ، ما

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

باند حدود ۱۸۰ کیلو دالتون را مشاهده کردیم (شکل B۳). برای تعیین بهترین دما برای القاء پروتئین نوترکیب نیز (چاهک های ۳ تا ۵ شکل) در دماهای مختلف بیان شد، و از آنجا که غلظت پروتئین بارگذاری‌شده در چاهک‌ها برابر است و باند پروتئین مورد نظر پررنگ تر می‌توان نتیجه ژل میل ترکیبی نیکل یک محلول کروماتوگرافی میل ترکیبی ساکن فلزی یا IMAC است، که برای تخلیص پروتئین هایی با دنباله پلی هیستیدین یا His-tag استفاده می‌شود. IMAC بر پایه‌ی تعامل بین یون های فلزی Ni^{2+} در ماتریکس بی‌حرکت با زنجیره های جانبی اسید آمینه‌ی هیستیدین بر قرار می‌شود می‌باشد، بنابراین پروتئین مورد نظر ما که حاوی His-tag در سمت N- terminal در ماتریس ستون حفظ می‌شود و پس از آن با بافر های تنظیم pH و ایمیدازول پیوند بین هیستیدین و ماتریکس از بین رفته و پروتئین مورد نظر از ستون شسته می‌شود، همانطور که ژل نشان می‌دهد یک باند حدود ۱۸۰ کیلو دالتون در فرکشن بافر شستشو با ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول مشخص شده که مربوط به پروتئین هدف ما است (شکل ۴).

در این پژوهش به طرح کلی بیان و تولید Cas9 نوترکیب پرداختیم. این پروتکل چهارچوبی را برای مطالعات بیشتر در مورد تخلیص و روش RNP در آینده را تسهیل خواهد کرد. در این پژوهش نشان داده شد که Cas9 نوترکیب گیاهی با باکتری CodonPlus بیان شد چون این باکتری حاوی یک پلاسمید است که ژن های کد کننده tRNA های کمیاب روی آن قرار دارند، که نسبت به بقیه ی سویه ها تمام کدون های یوکاربوتی را پوشش داده و همچنین میزان بیان بیشتری نسبت به مابقی سویه ها دارد، این سویه باکتری دارای tRNA های *leuW*، *ileY*، *argU* و همچنین *proL* است و مناسب برای بیان پروتئین ارگانسیم هایی می‌باشد که حاوی ژنوم غنی از AT و CG هستند. با اینکه در این پژوهش ما از برچسب His-tag برای تخلیص استفاده کردیم، اما دلیل اصلی استفاده ازGST این است که در بسیاری از موارد این پروتئین، پروتئین نوترکیب را از پروتئولیز درون سلولی محافظت کرده و آن را در بخش محلول به عنوان منومر یا همودایمر تثبیت می‌کند (Parker et al., 1990)، و باعث بیان سطح بسیار بالایی از پروتئین هدف می شود. پژوهش ما نشان داد که بهترین غلظت القاگر L-arabinose غلظت ۰/۲ درصد می‌باشد و بهترین دما برای القای آنزیم Cas9 دمای ۳۰ درجه سانتیگراد پس از ۱۶ ساعت بود (جدول۲).



شکل ۴- تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نمونه های حاصل از تخلیص پروتئین Cas9 به دست آمده طی خالص سازی ستون نیکل. مارکر پروتئینی (M)، پروتئین کل(۱)، بافر wash (۲)، بافر شستشو حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول تکرار اول حاوی پروتئین نوترکیب با غلظت بالاتر (۳)، بافر شستشو حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول تکرار دوم حاوی پروتئین نوترکیب با غلظت کمتر(۴)

جدول ۲- اندازه گیری غلظت پروتئین ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher)

غلظت Cas9 ($\mu g.ml^{-1}$)	دمای القا (درجه سانتیگراد)
۱۲۱	۱۸
۲۴۵	۳۰
۱۳۳	۳۷

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت که پس از سنجش فعالیت کاتالیکی آنزیم Cas9 می توان از این آنزیم به همراه RNA راهنما جهت ساخت کمپلکس RNP برای ویرایش ژنوم در گیاهان، از طریق انتقال RNP به پروتوپلاست استفاده کرد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

تشکر و قدردانی

از پروفسور Puchta Holger (دانشگاه کارلسروه آلمان) جهت ارسال پلاسمید TPC-pCas9 ،و از آقای دکتر جواد نجفی (دانشگاه کپنهاگ دانمارک)جهت ارسال پلاسمید pBADM30 و باکتری CodonPlus قدردانی می‌گردد

منابع

Choulika A, Perrin A, Dujon B, and Nicolas J.-F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of Saccharomyces cerevisiae. Molecular And Cellular Biology 15: 1968-1973.

Demain A.L, and Vaishnav P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances *27*: 297-306.

DeWitt M.A., Corn J.E., and Carroll D. (2017). Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. Methods *121*, 9-15.

Doudna J.A ,.and Charpentier E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science *346*.

Grimm S, and Voß-Neudecker F (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. In *E coli* Plasmid Vectors (Springer), pp. 83-87.

Hayashi K., and Kojima C (2008). pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. Protein Expression And Purification *62*: 120-127.

Invitrogen (2010). pBAD/His A, B, and CPBAD/Myc-His A, B, and C.

Jinek M, Jiang F, Taylor D.W, Sternberg, S.H, Kaya E., Ma, E, Anders C, Hauer M, Zhou, K and Lin S (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science *343*, 1247997.

Kanchiswamy C.N. (2016). DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. Plant Cell Reports *35*:1469-1474.

Kumar V, and Jain M. (2015). The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. Journal of Experimental Botany *66*: 47-57.

Choulika A, Perrin A, Dujon B, and Nicolas J.-F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of Saccharomyces cerevisiae. Molecular And Cellular Biology 15: 1968-1973.

Demain A.L, and Vaishnav P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances *27*: 297-306.

DeWitt M.A, Corn J.E, and Carroll D. (2017). Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. Methods 121: 9-15.

Doudna J.A ,.and Charpentier E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science *346*.

Grimm S, and Voß-Neudecker F. (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. In *E coli* Plasmid Vectors (Springer), pp. 83-87.

Hayashi K., and Kojima C. (2008). pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. Protein Expression And Purification 62: 120-127.

Invitrogen (2010). pBAD/His A, B, and C PBAD/Myc-His A, B, and C.

Jinek M, Jiang F, Taylor D.W, Sternberg S.H, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K., and Lin, S. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science 343: 1247997.

Kanchiswamy C.N. (2016). DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. Plant Cell Reports 35: 1469-1474.

Kumar V, and Jain M. (2015). The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. Journal of ؟Experimental Botany *66*: 47-57.

Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, Carte J, Chen W, Roark N, and Ranganathan S. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. Journal of Biotechnology 208: 44-53.

Lin C.-S, Hsu C.-T, Yuan Y.-H ,.Zheng P.-X., Wu, F.-H, Cheng Q.-W, Wu, Y.-L., Wu, T.-L., Lin, S., and Yue, J.-J. (2022). DNA-free CRISPR-Cas9 gene editing of wild tetraploid tomato Solanum peruvianum using protoplast regeneration. Plant Physiology 188: 1917-1930.

Parker M.W, Bello M.L, and Federici G. (1990). Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. Journal of Molecular Biology 213: 221-222.

Puchta H, Dujon B, and Hohn B. (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences 93: 5055-5060.

Puchta, H., and Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants:

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

prospects for a bright future. The Plant Journal *78*, 727-741.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*:"ultra-competent" cells. Csh Protoc *2006*, 10.1101.

Spector, T. (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for≤ 0.5 to 50 μg of protein. Analytical Biochemistry *86*, 142-146.

Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K., and Cigan, A.M. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Communications *7*, 1-7

Tripathi, N.K. (2016). Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. ChemBioEng Reviews *3*: 116-133.

Zhang, Y., Cheng, Y., Fang, H., Roberts, N., Zhang, L., Vakulskas, C.A., Niedz, R.P., Culver, J.N., and Qi, Y. (2022). Highly Efficient Genome Editing in Plant Protoplasts by Ribonucleoprotein Delivery of CRISPR-Cas12a Nucleases. Frontiers In Genome Editing *4*.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]