ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
صفحه ۴۷ - ۳۵

روش غربال‌گری ژنتیکی برای ریزجلبک‌های 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]، روح الله براهیمی‌پور[۲]

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

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

Abbasi-Vineh MA[1], Emadpour M[*1], Barahimipour R[2]

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

ریزجلبک 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 ترشحی 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 ریزجلبک‌های 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 نوترکیب
ژنوم هسته‌ای
T7 RNAپلی‌مراز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

تقاضای روزافزون برای مصرف پروتئین‌های نوترکیب 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 تولیدشده از مزایای متفاوتی برخوردار هستند (León-Bañares et al. 2004; Mayfield and Franklin 2005).

در چند دهه اخیر، ریزجلبک‌ها 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 نوترکیب در آن‌ها ارائه شده است. در این میان، ریزجلبک 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 تراسفورم‌شدن، 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، به‌عنوان یک بیوراکتور مناسب و جدید جهت اهداف پژوهشی و صنعتی معرفی شده است (Mayfield and Franklin 2005; Mayfield et al. 2007; Scranton et al. 2015; Doron et al. 2016). ریزجلبک تک سلولی سبز *C. Reinhardtii* همچنین سابقه‌ای طولانی در استفاده به‌عنوان 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، به‌عنوان یکی از بهترین گونه‌های جلبک جهت ایفای نقش به‌عنوان یک بیوراکتور بالقوه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نیز شناخته می‌شود. در مقایسه با میزبان‌های پروکاریوتی، کلامیدوموناس قابلیت بیان پروتئین‌های نوترکیب 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 ترنسفرم 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 بیان‌شده 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 بیان‌شده 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 کارآیی 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 غیرمتعارف و ساختار کروماتین فوق‌العاده فشرده دلایل خاموش شدن ژن‌های خارجی و بیان ناپایدار این ژن‌ها در ریزجلبک کلامیدوموناس گزارش شده است (Neupert et al. 2009; Scranton et al. 2015). بنابراین، غربال و گزینش کارآمد ریزجلبک‌های تراریخت شده حاوی سازه هسته‌ای نقش کلیدی و بسزایی جهت بهره‌گیری از سیستم‌های بیان ژن هسته‌ای در کلامیدوموناس دارد.

از این‌رو، 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 *YFP*[1] تحت

[1] Yellow Fluorescent Protein; YFP

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

کنترل راه‌انداز آنزیم RNA پلی‌مراز فاژ T7 (از این پس، راه انداز T7) در ژنوم کلروپلاست قرار می‌گیرد. ژن *YFP* قرار گرفته در سازه ذکرشده، در کلروپلاست بیان نمی‌شود. چراکه ژنوم کلامیدوموناس فاقد RNA پلی‌مراز کلروپلاستی رمزشونده در هسته (NEP[1]) است (Smith and Purton 2002). از طرفی، ژن *YFP* تحت کنترل راه‌انداز T7، توسط RNA پلی‌مراز رمزشونده در کلروپلاست (PEP[2]) رونویسی و بیان نمی‌شود (Magee and Kavanagh 2002). لذا در صورتی‌که سلول‌های ترانسپلاستومیک ایجاد شده، با سازه هسته‌ای دربردارنده ژن T7 RNAپلی‌مراز سوپرترنسفرم شوند، پروتئین RNAپلی‌مراز 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 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 *p*RMB152 (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 پلاستیدی از وکتور *p*RMB151 به‌عنوان ناقل حدواسط و انتقالی استفاده شد (داده چاپ نشده). ناقل پایه این وکتور *p*UC19،یک ناقل تجاری است که توالی‌های کناری[3]

[1] Nuclear Encoded RNA Polymerase; NEP
[2] Plastid Encoded RNA Polymerase; PEP
[3] Flank

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

tRNE و توالی *psbH* منطبق بر توالی کلروپلاستی کلامیدوموناس جهت رخ دادن فرایند نوترکیبی همولوگ ژن‌های هدف در آن قرار داده شده بود. این سازه همچنین دارای ژن *aadA* به‌عنوان ژن مقاومت به اسپکتینومایسین برای گزینش لاین‌های تراریخت ریزجلبک است. بعد از تکثیر و خالص‌سازی این قطعات از ژل آگارز، توالی‌های ذکر شده باید به نحوی در فاصله بین توالی‌های کناری قرار می‌گرفت که سازه بیانی کلروپلاستی ایجاد می‌شد. از این‌رو، ناقل حدواسط دریافت‌کننده با آنزیم برشی *Mlu*I به حالت خطی ایجاد شد.

همسانه‌سازی قطعات ژنی سازه کلروپلاستی با استفاده از کیت In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit

به‌منظور همسانه‌سازی سازه کلروپلاستی طبق دستورالعمل کیت In-Fusion، دو قطعه ژنی تهیه‌شده همراه با ناقل دریافت کننده‌ی 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 همسانه‌سازی صحیح سازه کلروپلاستی

در مرحله بعد، محصول حاصل از اتصال و سرهم‌بندی، به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شد تا همسانه‌سازی انجام شود. کلونی‌های حاوی هر سازه روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک Ampicillin (100 µg ml^{-1}) انتخاب شدند. سپس به‌منظور تشخیص کلونی‌های مثبت دارای قطعات مربوط به این سازه، 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 صحیح قطعات ژنی در سازه کلروپلاستی مذکور، واکنش برش[1] با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *Mfe*I و *Xho*I انجام پذیرفت. به‌منظور انجام واکنش برش آنزیمی، از آنزیم‌های برشی محدودگر، با خاصیت برش سریع[2] شرکت Thermo Fisher استفاده شد.

سازه‌ی کلروپلاستی ECC *psaA*

سازه کلروپلاستی ECC *psaA* به‌عنوان سازه کنترل مثبت در این پژوهش استفاده شد. سازه مذکور حاوی ژن *YFP* تحت کنترل راه‌انداز و قسمت ′۵ غیرقابل ترجمه (5′UTR) ژن *psaA* کلامیدوناس بود. در واقع، ژن گزارش‌گر *YFP* تحت کنترل توالی‌های تنظیمی ذکرشده در وکتور pRMB151 (به‌عنوان ناقل حدواسط) همسانه‌سازی شده است. بنابراین در این سازه، ژن گزارش‌گر مذکور همراه با ژن گزینش‌گر *aadA* در فاصله بین توالی‌های کناری *tRNE* و توالی *psbH* منطبق بر توالی کلروپلاستی کلامیدوموناس قرار گرفته است. این سازه در پروژه قبلی توسط اعضای تیم تحقیقاتی ساخته شد (داده‌های 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.

همسانه‌سازی سازه‌ی هسته‌ای

برای ساخت سازه هسته‌ای، ابتدا بهینه‌سازی کدونی توالی ژن *T7*-*RNA*پلی‌مراز برای ژنوم هسته‌ای کلامیدوموناس با استفاده از نرم‌افزار CodonWorkbench صورت گرفت و سپس این توالی بلند سنتز و مورد استفاده قرار گرفت. طراحی همسانه‌سازی 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 oRMB533 و oRMB504 تکثیر شد (PCR شماره ۲#). قطعه دوم با طول ۹۲۶ bp که حاوی توالی راه‌انداز، ناحیه غیرقابل ترجمه ′۵ (5′UTR) و پپتید راهنمای ژن *C.r.psaD* بود، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی oRMB501 و oRMB534 از وکتور *p*RM0-070 (Mehrshahi et al. 2020) تکثیر شد (PCR شماره ۳#). کل محصول PCRها بر روی ژل اگارز ۰/۸ ٪ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده مورد نظر به‌طور جداگانه از ژل جداسازی و طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، تخلیص شدند.

خطی کردن پلاسمید دریافت‌کننده قطعات ژنی مربوط به سازه هسته‌ای

در مرحله بعد توالی سنتزشده همراه با سایر توالی‌های تنظمی مورد نیاز، در وکتور حدواسط هسته‌ای *p*Kpco16 (داده چاپ نشده) همسانه‌سازی شد. ناقل حدواسط مورد نظر داری

[1] Digestion
[2] FastDigest Restriction Enzymes

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

ژن "*aph7* مربوط به مقاومت به هیگرومایسین برای غربال‌گری باکتری‌های تراریخت و همچنین سایت‌های برشی مناسب برای همسانه‌سازی قطعات ژنی بود. جهت ایجاد ناقل حدواسط خطی شده، ناقل ذکرشده با آنزیم‌های برشی *EcoR*I و *Spe*I 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 *Zra*I و *Sfi*I 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 آنلاین Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) با توالی اصلی مطابقت داده شدند.

انتقال سازهای ساخته شده و تایید شده به ژنوم ریزجلبک کلامیدوموناس

بعد از تأیید توالی سازه‌های ایجاد شده، توسط توالی‌یابی، انتقال سازه‌ها به ژنوم انجام شد. به این صورت که انتقال سازه‌های کلروپلاستی (ECC[1] *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 آنتی بیوتیک ادامه یافت تا لاین‌های کاملاً هموپلاسم ایجاد شدند. سپس جهت تأیید اولیه درج سازه‌های کلروپلاستی و تایید 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[2] به روش لکه‌گذاری سادرن[3] استفاده شد.

سنجش سیگنال فلورسنس پروتئین YFP با استفاده 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 فلورسنت به‌عنوان معیاری از میزان بیان پروتئین YFP با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان[4] (CLARIOstar Plus Microplate reader ,BMG LABTECH, Germany) قرائت شد. قرائت سیگنال‌های فلورسانت برای تشخیص YFP با فیلترهای (۵۳۸ nm/ ۴۹۴ nm) excitation/emission انجام گرفت. قرائت محیط TAP به‌عنوان نمونه خالی کنترل[5] انجام شد. بعد از به‌دست آوردن

[1] Expression cassette controlled by T7RNA Polymerase promoter and phage G10 5'UTR
[2] Hybridization
[3] Southern Blotting
[4] Microplate reader
[5] Blank

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 RNAپلی‌مراز استفاده شد. این ژن گزارش‌گر در واقع واریانتی از ژن *GFP* [1] 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 *T7-*ECC *G10* ایجاد شده و به‌عنوان لاین دریافت‌کننده [2] سازه هسته‌ای استفاده شوند. سپس این لاین‌های ترانسپلاستومیک ایجاد شده با سازه هسته‌ای حاوی ژن T7 RNAپلی‌مراز سوپرترنسفرم شدند.

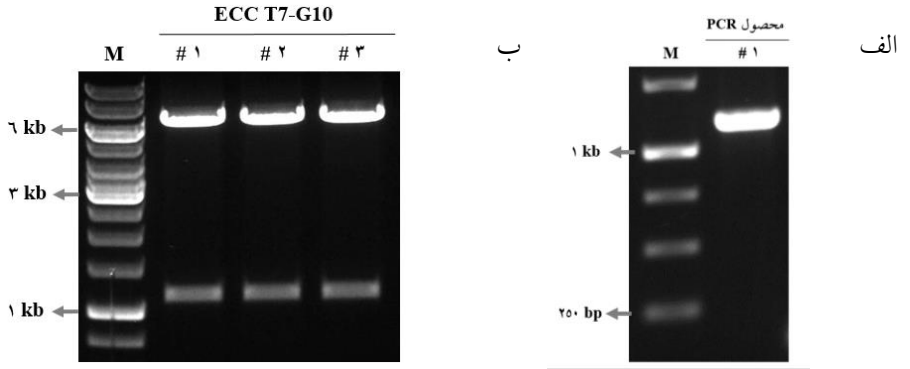
[1] Green Fluorescent Protein
[2] Recipient line

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

تایید همسانه‌سازی سازه‌ی کلروپلاستی ECC T7- G10 و سازه هسته ای حاوی توالی آنزیم *RNA*پلیمراز

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

بعد از انجام واکنش اتصال و سرهم‌بندی قطعات تکثیرشده و سنتزشده 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 ایجادشده در آزمون برش، سازه‌های مذکور به‌طور صحیح همسانه‌سازی شده بودند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی سازه کلروپلاستی نیز نشان‌دهنده همسانه‌سازی صحیح کل سازه موردنظر بود.



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* (۱۱۸٦ bp) و M، 1 kb Ladder Mix می‌باشد. ب- نتایج حاصل از واکنش برش سازه ECC *T7-G10* استخراج شده از سه کلونی مختلف (۳-۱#)، با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *Mfe*I/*Xho*I روی ژل آگارز ۱ ٪. قطعات برشی مورد انتظار و مشاهده شده ٦۲۷۷ bp و ۱۱٤٦ bp بودند. M، 1 kb Ladder Mix می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

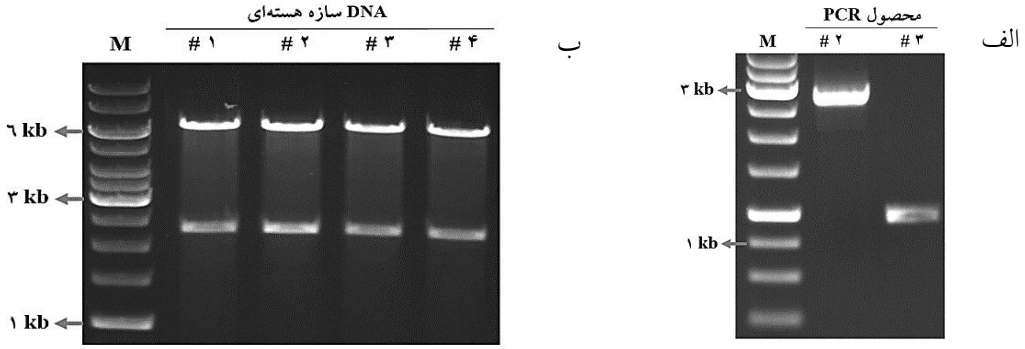
بعد از ساخت و انتقال این سازه به ژنوم کلروپلاست و تایید هموپلاسمی لاین‌ها، قطعات ژنی درج شونده حاوی توالی تنظیمی برای ساخت سازه هسته‌ای (PCR شماره ۲# و ۳#) طبق دستورالعمل کیت استفاده شده از ژل آگارز ۰/۸٪ به طور جداگانه خالص و سپس در همسانه‌سازی استفاده شدند (شکل ۲- الف). بعد از تعیین کمیت، قطعات تکثیرشده 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.

تأیید اولیه حضور سازه‌های کلروپلاستی در پلاستوم با استفاده از PCR

به‌منظور انجام تأییدهای اولیه درج سازه‌های انتقال داده شده در ژنوم کلروپلاست، از آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی DNA استخراج شده از لاین‌های حاوی این سازه‌ها انجام شد. طراحی آغازگرهای شده به این صورت بود که آغازگر مستقیم بر روی ژنوم کلروپلاست و آغازگر معکوس بر روی سازه‌های انتقال داده شده قرار داشتند. نتایج PCR نشان داد که درج سازه‌ها در محل از پیش تعیین شده از ژنوم کلروپلاست با موفقیت انجام شده است (شکل ۳).

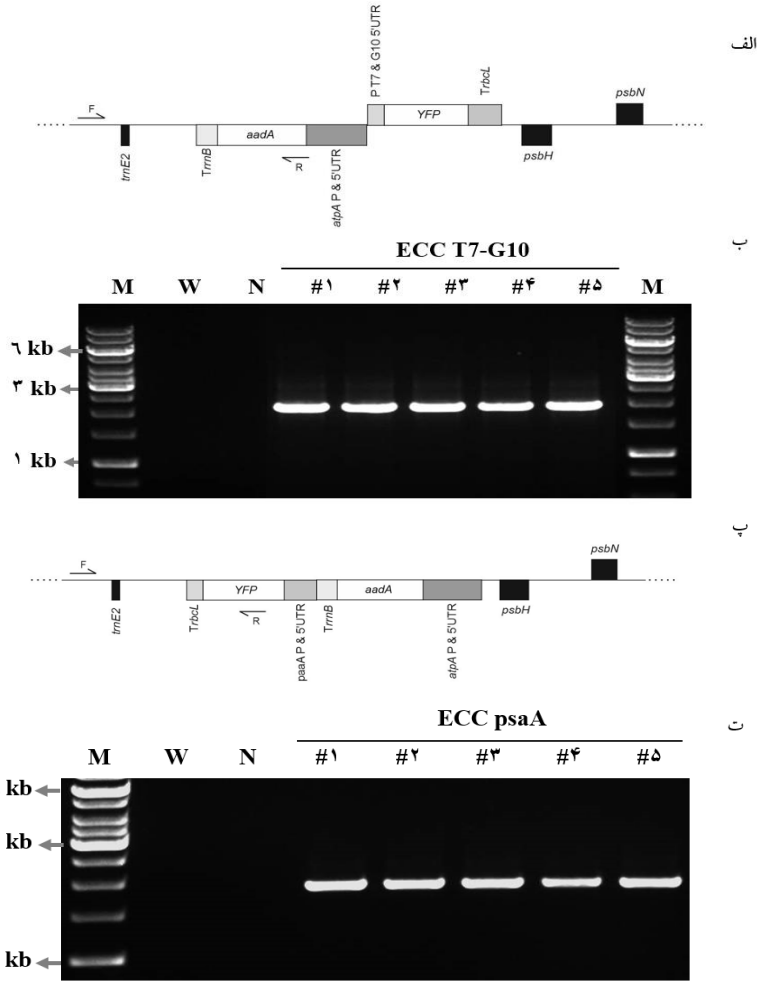
آنالیز سادرن بلات جهت تأیید درج صحیح سازه در پلاستوم کلامیدوموناس و هموپلاسمی لاین‌های ترانسپلاستومیک

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 ٤).



شکل ۲- همسانه‌سازی سازه هسته‌ای حاوی توالی ژن C.r.N.*T7-RNAP*. الف- تکثیر قطعات موردنیاز با استفاده از آنزیم DNA پلی‌مراز Phusion روی ژل آگارز ۰/۸٪. محصول PCR شماره ۲ #، قطعه ژنی حاوی توالی ژن C.r.N.*T7-RNAP* (۲٦۸۸ bp)، محصول PCR شماره ۳ #، قطعه ژنی حاوی توالی راه‌انداز، 5′UTR و پپتید راهنما ژن C.r.*psaD* (۹۲٦ bp) و M، 1 kb Ladder Mix می‌باشد. **ب**- نتایج حاصل از واکنش برش سازه هسته‌ای با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودگر *Zra*I/*Sfi*I روی ژل آگارز ۱ ٪. قطعات برشی مورد انتظار و مشاهده شده ٦/٤ kp و ۲/٤ kp برای سازه ذکر شده بودند. M، 1 kb Ladder Mix می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

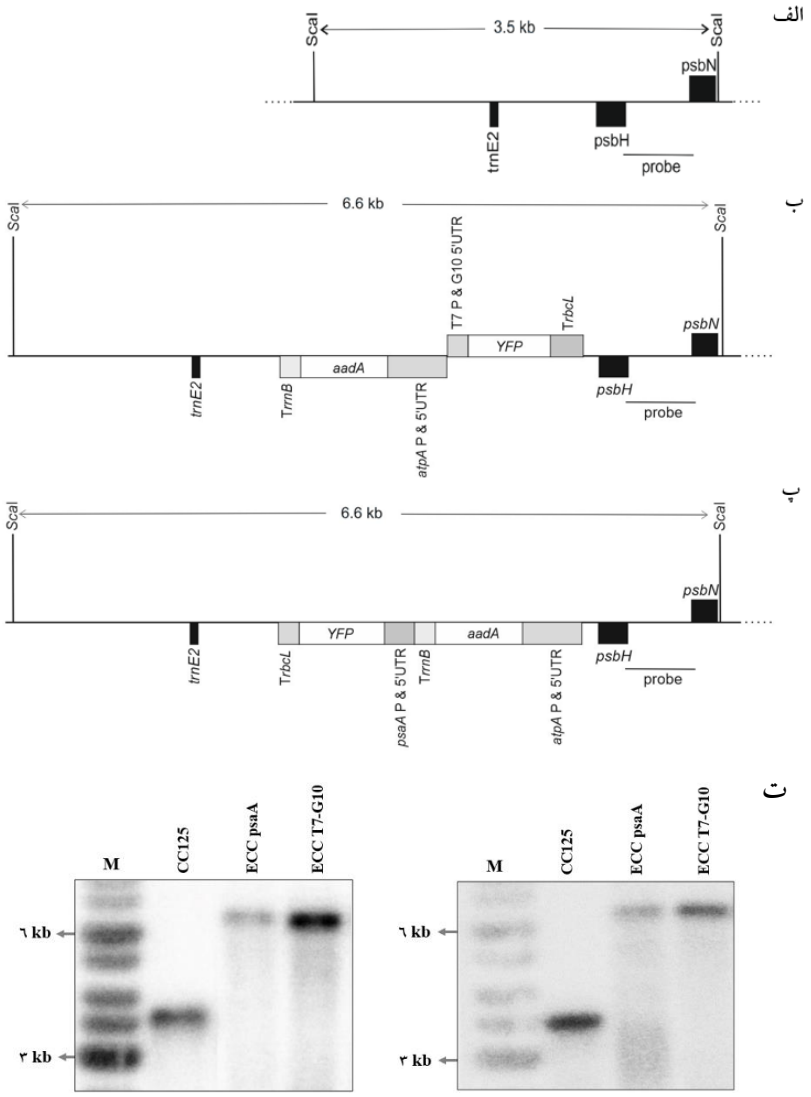


شکل ۳- نتایج اولیه تایید درج صحیح و بررسی هموپلاسمی لاین‌های ترانس‌پلاستومیک حاوی سازه‌های *T7-G10* ECC و *psaA* ECC با استفاده از PCR روی ژل آگارز ۱ ٪. الف و پ) نقشه های فیزیکی بخشی از ژنوم کلروپلاستی لاین‌های ترنسفرم شده به همراه محل آغازگرهای طراحی شده. ب و ت) قطعه تکثیرشونده مورد انتظار kb ۱/۹ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی oRMB558 و oRMB532 برای لاین‌های حاوی سازه *T7-G10* ECC و آغازگرهای اختصاصی oRMB472 و oRMB515 برای لاین‌های حاوی سازه *psaA* ECC 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 چاهک های شماره ۱ تا ۵، لاین‌های ترانس‌پلاستومیک کلامیدوموناس 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 کلامیدوموناس وجود نداشت. چراکه برخلاف درج دقیق سازه‌های کلروپلاستی در ژنوم، درج سازه هسته‌ای در ژنوم هسته به‌صورت 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 تایید 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 به‌صرفه 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 تایید درج ژن در ژنوم، تشخیص لاین‌هایی است که درج سازه هسته‌ای در قسمت فعال رونویسی ژنوم آن‌ها رخ داده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



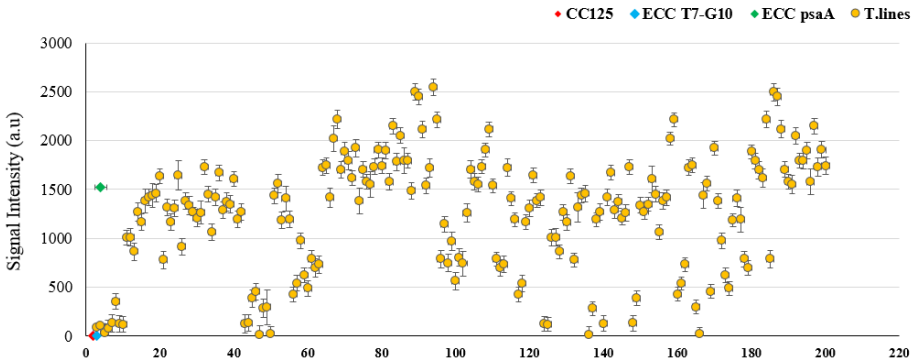
شکل ٤- نتایج آزمون سادرن بلات برای لاین‌های ترانس‌پلاستومیک ایجاد شده در سویه CC-125 کلامیدوموناس. این آزمون جهت بررسی نهایی درج صحیح سازه‌ها در ژنوم و هموپلاسمی لاین‌های ایجاد شده با استفاده از پروب اختصاصی طراحی شده و آنزیم‌های برشی مناسب انجام شد. نقشه های فیزیکی بخشی از ژنوم کلروپلاستی الف) کلامیدوموناس 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 ترانس پلاستومیک ایجادشده 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 ترانس پلاستومیک ایجادشده می‌باشد. دو ژل نمایش داده شده مربوط به دو لاین مستقل بررسی شده حاوی سازه‌ها هستند. نمونه‌های DNA با آنزیم برشی *Sca*I هضم شده و سپس به یک پروب که ژن *PsbH* را شناسایی می‌کند، هیبرید شدند. اندازه قطعات DNA مورد انتظار با اندازه Kb ۳/۵ برای ژنوم سویه CC-125 ترنسفرم نشده و حدود Kb ٦/٦ برای ژنوم لاین‌های ترانسپلاستومیک دارای سازه‌های ECC *T7-G10* و ECC *psaA*، پس از انتقال قطعات از روی ژل آگارز ۱٪ به غشاء مشهود بود.

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

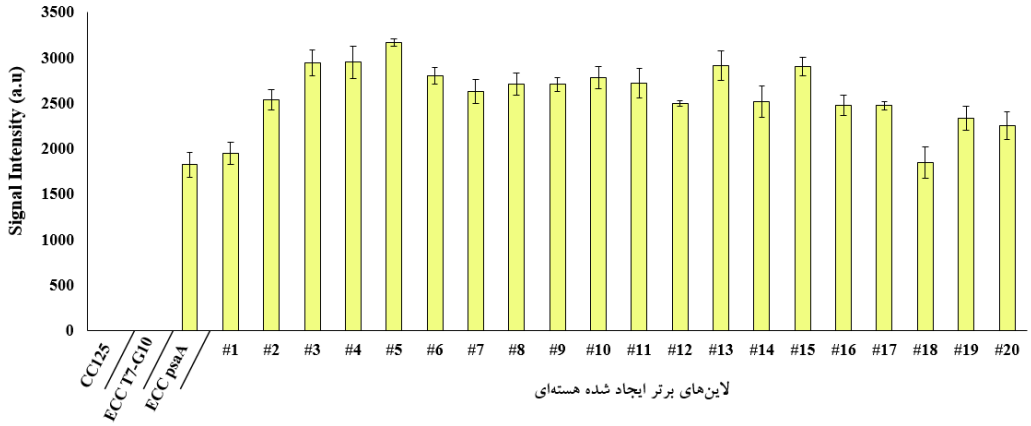
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

راهنما به کلروپلاست انتقال داده می‌شود. در نتیجه رونویسی از ژن *YFP* تحت کنترل راه انداز این RNA پلی‌مراز انجام گرفته و این پروتئین سنتز و سگینال فلورسنت در اثر تجمع آن در کلروپلاست تولید می‌شود. بنابراین از این طریق می‌توان لاین‌های مثبتی که این سازه‌های هسته‌ای را نیز دریافت کرده‌اند غربال و انتخاب نمود.

به‌طور جزئی‌تر، وقتی لاین‌های ترانسپلاستومیک با سازه هسته‌ای سوپرترنسفرم می‌شوند، تعداد زیادی از سلول‌ها سازه مورد نظر را دریافت نمی‌کنند. بنابراین با کشت بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی به‌کار رفته در همسانه‌سازی سازه هسته‌ای، این سلول‌ها قادر به رشد نبوده و از بین می‌روند. بنابراین، ابتدا تک کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین به محیط کشت جدید حاوی این آنتی بیوتیک انتقال داده شد. در واقع سلول‌هایی که سازه هسته‌ای را دریافت ننموده‌اند، قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نبوده و از فرآیند غربال‌گیری حذف شدند. سپس کشت مایع این تک کلونی‌ها در حجم کم (۱ ml) انجام و وقتی منحنی رشد نمونه‌ها دوسوم فاز نمایی را طی کرد، سیگنال فلورسنت YFP در آن‌ها اندازه‌گیری شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، طیف گسترده‌ای از بیان ژن *YFP* و تولید نور فلورسنت در لاین‌های ایجاد شده مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- شدت متفاوت سیگنال فلورسنت ساطع شده در لاین‌های تراپخت ایجادشده حاصل از درج سازه هسته‌ای در قسمت‌های مختلف ژنوم C.reinhardti. سویه نوع وحشی CC-125ترنسفرم نشده به‌عنوان کنترل منفی نمونه‌ها، لاین ترانس پلاستومیک ECC T7-G10 قبل از دریافت سازه هسته‌ای، لاین ترانس پلاستومیک ECC psaA به‌عنوان کنترل مثبت و ۲۰۰ لاین سوپرترنسفرم‌شده (ترانس پلاستومیک و تراریخت هسته‌ای همزمان) رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک. در واقع T. linesT، داده‌های کمی حاصل از اندازه‌گیری میزان سیگنال فلورسنت ساطع شده حاصل از تجمع پروتئین YFP جهت اسکرین لاین‌های سوپرترنسفرم شده را نشان می دهد. در محور افقی، شماره لاین‌ها و در محور عمودی شدت سیگنال ساطع شده، نمایش داده شده است.



شکل ٦- بررسی سیگنال فلورسنت حاصل از تجمع پروتئین YFP در ۲۰ لاین برتر سوپرترنسفرم شده *C. reinharditii* حاوی سازه‌های بیانی کلروپلاستی و هسته‌ای به‌طور همزمان. در محور افقی، شماره لاین‌ها و در محور عمودی میزان سیگنال ساطع شده، نمایش داده شده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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. به‌عبارت 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 به‌علت 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 نشانه ای 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 به‌عنوان 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 ٦). 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، به‌دلیل این اثرات موقعیت مکانی و امکان رخداد بالای پدیده خاموشی ژن برای بیان ژن‌های خارجی، نیاز است که به‌طور میانگین حداقل ۲٤۰ لاین ترانسفرم‌شده 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 این‌رو، 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 درحضور فشار آنتی بیوتیک، نیاز به عدم خاموش شدن ناحیه درج شونده ژن در هسته، جهت بیان ژن انتخابگر دارد که درنتیجه 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 (Cerutti 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 به‌عنوان 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 به‌دلیل 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

بررسی نتایج حاصل از بیان پروتئین YFP در لاین‌های ایجاد شده نشان داد که این روش غربال ژنتیکی به‌خوبی می‌تواند جهت گزینش لاین‌های کلامیدوموناس که حاوی سازه هسته‌ای در قسمت یوکروماتین و فعال‌تر رونویسی هستند، مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه جهت بهینه‌سازی این روش در پروژه حاضر، صرفاً ژن *T7 RNA* پلی‌مراز در هسته بیان شد و به‌واسطه فعالیت آن در کلروپلاست، ژن *YFP* در اندامک فوق بیان گردید، اما این روش قابلیت استفاده برای غربال و گزینش سایر ژن‌های هترولوگ هسته‌ای مورد استفاده را نیز برخوردار است. به این صورت که ژن مربوط به پروتئین نوترکیب (تحت کنترل راه انداز T7) با ژن *T7 RNA* پلی‌مراز در سازه هسته‌ای ادغام و در ژنوم هسته‌ای جایگذاری شود. بدین وسیله بر اساس میزان بیان ژن *RNA پلی‌مراز* و متعاقباً میزان سیگنال فلورسنت ساطع شده، می‌توان لاین‌های تراریختی را گزینش کرد که ژن مربوط به پروتئین نوترکیب 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 می‌باشد. همچنین وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، دانشگاه تربیت مدرس و مؤسسه ماکس-پلانک آلمان به‌عنوان حامیان مالی انجام پروژه حاضر در کشور ایران و آلمان هستند که در اینجا نهایت قدردانی به‌عمل می‌آید.

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, Llavero-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.

Schroda M (2019) Good news for nuclear transgene expression in Chlamydomonas. Cells 8:1534.

Schroda M, Blöcker D, Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]