



انتقال و بیان ژن اکسندین-۴ متصل به زیر واحد B سم وبا (CTB) در گیاه کاهو

Transfer and expression of exendin-4 fused to cholera toxin B subunit (CTB) in lettuce

ابراهیم مرادی^۱، محمد ناجی^۲، بهمن بهرامنژاد^{۳*}، هیمن صالحی^۴Ebrahim Moradi¹, Mohammad Naji², Bahman Bahramnejad^{3*}, Hemn Salehi⁴

۱، ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه کردستان

۳- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه کردستان

1,2. MSc. students in Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan

3. Associate Professor, Department of Plant production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

4. Ph.D. student of Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: bbahramnejad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۷)

Received: 2023/07/2 | Accepted: 2023/08/29 | Published: 2024/03/14

چکیده

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium tumefaciens

اکسندین-۴،

انتقال ژن،

بیان ژن،

ناقل دوتایی pBI121،

پروتئین نو ترکیب

اکسندین-۴ (EX4) یک پروتئین شبیه به پپتید شبه گلوکان (GLP-1) است و دارای نیمه عمر و تأثیر بیشتر در القای ترشح انسولین است. اتصال EX4 به زیر واحد غیرسمی وبا (CTB) موجب افزایش کارایی آن از طریق جذب در سیستم گوارشی می‌شود. در این تحقیق، با استفاده از ناقل pBI121 قطعه CTB-EX4 توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه کاهو وارد شد. نتایج نشان داد ۲۵٪ از ریزنمونه‌های تلقیح شده با موفقیت تراریخت و باززا شدند (نسل T₀). برای ایجاد گیاهان نسل دوم (T₂) بذرهای T₁ کشت گردید که ۴۲٪ از بذرهای کشت شده به بذر نشستند. گیاهان T₁ با استفاده از PCR آزمون بررسی شد. بیان ژن CTB-EX4 در سطح mRNA با استفاده از RT-PCR و Real time PCR و در سطح پروتئین با آزمون‌های ELISA و Western Blot مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تعداد نسخه‌های انتقال یافته به گیاهان T₁ با استفاده از دستگاه Real time PCR با استفاده از روش مطلق و منحنی استاندارد و همچنین روش نسبی، نسبت به ژن کنترل داخلی *Actin1* برآورد شد. نتایج حاکی از تراریختی ۶۰٪ گیاهان نسل دوم (T₁) و بیان ژن CTB-EX4 در سطح mRNA و پروتئین بود. نتایج نشان داد که پروسه انتقال ژن CTB-EX4 به گیاه کاهو با موفقیت آمیز انجام شد و گیاه کاهو قادر به بیان ژن مورد نظر در سطوح mRNA و پروتئین بود. با در نظر گرفتن پروسه‌های بعدی از جمله تخلیص و ارزیابی فعالیت بیولوژیکی پروتئین تولید شده، از گیاهان می‌توان به عنوان یک بیوراکتور مناسب جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب بهره برد.

Moradi E, Naji M, Bahramnejad B, Salehi H. Transfer and expression of exendin-4 fused to cholera toxin B subunit (CTB) in lettuce. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2): 168-183. Doi: [10.61186/gebsj.12.2.168](https://doi.org/10.61186/gebsj.12.2.168)

URL: <http://gebsj.ir/article-1-464-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Exendin-4 (EX4) is a protein similar to glucan-like peptide (GLP-1) and has a longer half-life and greater effect in inducing insulin secretion. The fusion of EX4 to the non-toxic cholera subunit (CTB) increases its efficiency through absorption in the digestive system. In this study, *CTB-EX4* gene was introduced into lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* using vector pBI121. The results showed that 20.25% of the inoculated explants were successfully transformed and regenerated (T_0 generation). To create T_2 plants, seeds of T_1 were cultivated, and 42% of the cultivated seeds germinated. T_1 plants were analyzed using PCR test. The mRNA expression of the *CTB-EX4* gene was examined through RT-PCR and Real-time PCR, while the protein expression was assessed using ELISA and Western Blot tests. The number of transferred copies to T_1 plants was determined using Real-time PCR. This estimation was performed using both the absolute method and the standard curve, as well as the relative method, with *Actin* gene as a reference gene. The results showed that 60% of the T_1 plants were transgenic and the *CTB-EX4* gene was expressed at the mRNA and protein levels. The results showed that the process of transferring the *CTB-EX4* gene to the lettuce plant was successful and the lettuce plant was able to express the desired gene at the RNA and protein levels. Considering the subsequent processes, including the purification and evaluation of the biological activity of the produced protein, plants can be used as a suitable bioreactor for the production of recombinant proteins.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, Exendin-4, gene expression, Gene transfer, pBI121 binary vector, Recombinant protein.

مقدمه

در چندین دهه اخیر با ظهور انواع روش‌های انتقال ژن، پروتئین‌های مختلف با خواص دارویی بالا به صورت موفقیت‌آمیزی به گیاهان انتقال یافته‌اند (Kumar et al., 2003). گیاهان به دلایلی مانند یوکاریوتی بودن، دارا بودن سیستم ویرایشی پس از ترجمه، هزینه‌های پایین نگهداری، نبود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان، کشت و تولید در مقیاس بالا می‌توانند به عنوان جایگزینی برای انواع سیستم‌های باکتریایی، جانوری و مخمر در نظر گرفته شوند (Rukavtsova et al., 2007). با توجه به افزایش نیاز به پروتئین‌های نوترکیب، در اختیار داشتن سیستمی که با استفاده از آن بتوان پروتئین‌های نوترکیب را با بازدهی بالا، هزینه پایین، و حجم کنترل شده تولید کرد، ارزش و اهمیت فراوانی دارد (Daniell et al., 2001).

گیاه کاهو برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌های خوراکی گیاهی کاملاً مناسب به نظر می‌رسد. کاهو توانایی مطلوبی را برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور از جهت نوع مصرف و حجم بالا زیست توده دارا می‌باشد (Kwon et al., 2018).

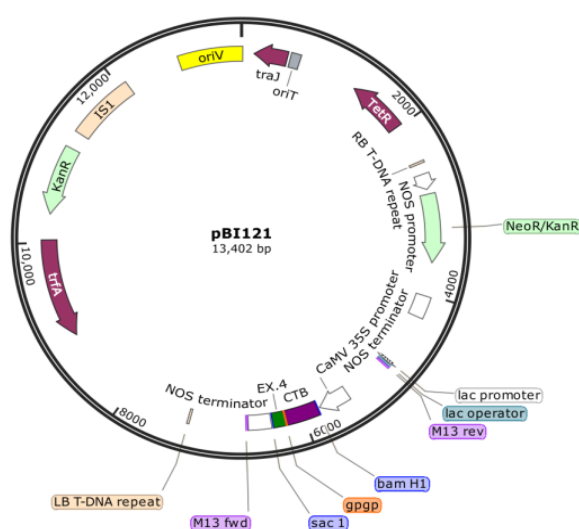
گزارش‌هایی شامل انتقال ژن گزارشگر *gus* (Torres et al., 1993)، ژن اگزالات دکربوکسیلاز (Dias et al., 2006)، ژن *ipt* (McCabe et al., 2001)، ژن کیتیناز برنج (*chi*) (Sharma et al., 2022) و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیک (*ARG*) (Riva et al., 2022)، در گیاه کاهو موجود است.

انسولین انسانی از اولین هورمون‌هایی بود که به دلیل اهمیت بالا مورد توجه و تحقیق قرار گرفت (Banerjee et al., 2009). یکی از عمده دلایل بیماری دیابت کمبود تولید انسولین در بدن است (Kolb and Burkart 2019). اکسندین-۴ یک پروتئین شبیه به پپتید شبه‌گلوکان (GLP-1) است که دارای نیمه‌عمر طولانی می‌باشد و مقدار گلوکز را در مسیر وابسته به گلوکز تنظیم و حساسیت به مقدار ترشح انسولین را بیشتر می‌کند (King et al., 2020). در انسان تزریق زیرپوستی ۱۰ میکروگرم از اکسندین-۴ دارای اثرات بیولوژیکی به مدت ۵ تا ۷ ساعت می‌باشد. آنزیم دی‌پپتیدیل‌پپتیداز-۶ نمی‌تواند اکسندین-۴ را تخریب کند به این دلیل که اکسندین-۴ نیمه‌عمر بالاتری نسبت به GLP-1 دارد، در نتیجه می‌توان با استفاده از تزریق روزانه به بیماران دیابتی نوع ۲

mRNA و پروتئین با توجه به تفرق صفات رخ داده در نسل دوم روی رخدادهایی (Lines) که حضور ژن خارجی مورد نظر در آنان تایید شد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ناقل pBI121 حاوی ژن CTB-EX4 مربوط به تحقیق Kokei and Bahramnejad (2020) (شکل ۱) با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به هسته گیاه کاهو انتقال داده شد. پس از انتقال ژن و بازایی گیاهان تراریخت شده از بذرهای بدست آمده از این گیاهان برای کشت گیاهان نسل T₁ و بررسی تراریختی آن‌ها استفاده شد.



شکل ۱- نقشه ناقل نوترکیب pBI121-CTB-EX4 مورد استفاده در این تحقیق

Fig 1. The Map of the recombinant vector pBI121-CTB-EX4 used in this study

ضد عفونی و کشت بذرها: در این تحقیق از گیاه کاهو، رقم کاهوی برگ‌ی ایرانی (*lettuce, Lactuca sativa var. longifolia*) استفاده شد. ابتدا سطح بذرها با آب جاری شستشو داده شد. سپس بذرها به مدت ۱۵ ثانیه در الکل ۷۵٪ و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، قرار داده شدند. بعد از هر مرحله، بذرها در آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شدند. بذرها در شیشه‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط MS کشت داده

از اکسندین-۴ به‌عنوان دارو استفاده کرد (Yang et al., 2020). با اتصال اکسندین-۴ به زیر واحد B سم وبا (CTB) می‌توان کارایی پروتئین اکسندین-۴ را افزایش داد. عمدتاً از CTB به‌عنوان حامل عصبی پروتئین‌های نو ترکیب استفاده می‌شود، زیرا از طریق اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده باعث افزایش جذب پپتید متصل شده می‌شود و در صورت اتصال آنتی‌ژن به این زیر واحد می‌تواند پاسخ‌های ایمنی با شدت‌های بالاتری ایجاد کند (He et al., 2022).

در مطالعه‌ای اکسندین-۴ متصل شده به CTB با روش بمباران ذره‌ای به کلروپلاست کاهو انتقال داده شد. نتایج نشان داد که ژن CTB-EX4 بیان شده در کلروپلاست، سطح گلوکز خون را در موش کاهش داد و ترشح انسولین را در سلول‌های بتا TC-6 تحریک کرد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که بیان ژن مذکور بیش از ۱۴/۳٪ از پروتئین کل برگ بود (Kwon et al., 2013).

در تحقیقی دیگر نشان داده شد که پروتئین‌های نو ترکیب حاوی اکسندین-۴ را می‌توان در سطوح بالا در گیاه تنباکو (*Nicotiana benthamiana*) تولید و به‌راحتی توسط دانه‌های سلولز میکروکریستالی (MCC) یا رزین Ni²⁺-NTA خالص کرد. علاوه بر این، اکسندین-۴ فعال بدون هیچ گونه باقیمانده اضافی را می‌توان از پروتئین‌های نو ترکیب با برش پروتئولیتیک با استفاده از آنزوکیناز تولید کرد (Akter et al., 2022). در تحقیقی اکسندین-۴ به‌عنوان پروتئین متصل شده به CTB در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) به صورت موقت بیان شد و بیان ژن مذکور با استفاده از RT-PCR و ELISA تایید شد (Kokei and Bahramnejad 2020). در مطالعه‌ای ژن CTB-EX4 تحت تنظیم راه‌انداز اختصاصی ریشه غده‌ای MLL با استفاده از آگروباکتریوم به گیاه هویج انتقال داده شد. نتایج حاکی از بیان ژن CTB-EX4 به‌طور اختصاصی در ریشه گیاه هویج در سطوح mRNA و پروتئین بودند (Zandinava et al., 2024).

در پژوهش‌پیش‌رو، انتقال و بیان ژن اکسندین-۴ متصل به زیر واحد B سم وبا (CTB) در گیاه کاهو مورد بررسی قرار گرفت و مطالعات مولکولی روی نسل دوم گیاهان کاهوی تراریخته‌ی حاوی ژن CTB-EX4 انجام شد. بررسی‌ها در سطح DNA،

باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۱۰۰ mg/ml)، ریفامپیسین (۵۰ mg/ml) و جنتامایسین (۳۰ mg/ml) افزوده شد و تا زمانی که جذب نوری باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ ($OD_{600}=0.5$) رسید در انکوباتور لرزاننده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm نگهداری شد. پس از این مرحله باکتری‌ها در سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm رسوب داده شدند. رسوب باقی‌مانده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط MS حاوی $MgSO_4$ ۱۰ میلی‌مولار و استوسیرینگون ۱۵۰ میکرومولار به خوبی حل شد و پیش از تلقیح ریزنمونه‌های گیاه کاهو به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.

تلقیح کاهو با آگروباکتریوم حاوی سازه هدف: ریزنمونه‌های تهیه شده از برگ گیاه کاهو، به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار داده شد. پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ با آگروباکتریوم، جهت هم‌کشتی در پتری‌دیش حاوی MS عاری از آنتی‌بیوتیک به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند، سپس ریزنمونه‌ها با ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم به مدت ۱۵ دقیقه و پس از آن دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها بعد از آبیگری روی کاغذ صافی به محیط کشت MS حاوی کانامایسین (۲۵ mg/ml) و سفوتاکسیم (۵۰۰ mg/ml) انتقال داده شدند (شکل ۲).

تایید تراریختی در گیاهان کاهوی نسل اول: استخراج DNA از برگ‌های گیاه کاهو به روش CTAB (بافر استخراج حاوی CTAB ۲٪ وزن به حجم، EDTA ۲۰ میلی‌مولار، Tris-HCl pH=8 ۰/۱ مولار، NaCl ۱/۴ مولار، به علاوه ۱٪ بتا مرکاپتواتانول (قبل از استفاده بافر اضافه شود) انجام گرفت (Koh et al., 2021). کمیت و کیفیت DNA و RNAهای استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۱/۲٪ و اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) با استفاده از Mastermix شرکت WizbioSolutions (Cat No. W1401) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در حجم ۲۰ میکرولیتر با شرایط دمایی ۱ چرخه واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه ۶۰ درجه

شد و تا رشد اولین برگچه‌ها به مدت هفت روز در اتاقک رشد با متوسط دمای ۲۴ درجه سانتیگراد (24 ± 2) و رطوبت نسبی ۴۰-۳۰ درصد با نسبت طول روز و شب ۱۶ به ۸ ساعت نگهداری شدند.

محیط کشت‌های باززایی و ریشه‌زایی: در این مطالعه از محیط کشت عمومی باکتری (LB) (Sambrook and Luria-Bertani) (Russell 2006)، محیط کشت گیاهی (MS) (Murashige and Skoog medium) (Witte et al., 2002)، محیط کشت باززایی مستقیم که حاوی تمامی مواد موجود در محیط کشت MS به علاوه ۳ میلی‌گرم بر لیتر کیتین، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر آلفا-نفتالین استیک‌اسید (α -NAA) و ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز بود و محیط کشت ریشه‌زایی که علاوه بر مواد محیط کشت MS شامل ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتیریک اسید و ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز بود، استفاده شد.

به‌منظور باززایی و غربالگری ریزنمونه‌هایی که ناقل حاوی ژن مورد نظر همراه با ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین را دریافت کرده بودند، ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین انتقال یافتند. همچنین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها در محیط باززایی مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در کشت‌های اولیه و مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در واکنش‌های بعدی سفوتاکسیم اضافه شد. در واکنش‌های بعدی روند کاهشی سفوتاکسیم ادامه پیدا کرد و مقدار آن به صفر رسید.

آماده‌سازی آگروباکتریوم برای انتقال ژن: در این تحقیق از باکتری *A. tumefaciens* سویه GV3101 حاوی پلاسمید نو ترکیب pBI121-CTB-EX4 (Kokei and Bahramnejad 2020) و نیز آگروباکتریوم سویه C58 حاوی پلاسمید pKF2F S7 دارای ژن‌های *GFP_GUS* (Karimi et al., 2002) استفاده شد. دو روز قبل از تلقیح ریزنمونه‌ها، یک پرگنه از باکتری *A. tumefaciens* در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۱۰۰ mg/ml)، ریفامپیسین (۵۰ mg/ml) و جنتامایسین (۳۰ mg/ml)، به مدت ۳۶ ساعت درون انکوباتور لرزاننده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm نگهداری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون رشد یافته

برای این منظور ابتدا در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری، ۶ میکرولیتر از RNA کل با غلظت نهایی ۵ µg، به همراه ۱ میکرولیتر از آغازگر معکوس Oligo dT با غلظت ۵۰ میکرومولار، تهیه شد و برای حجم نهائی ۱۳/۴ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR یا thermal cycler قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به آن‌ها محلولی با حجم ۶/۵ میکرولیتر حاوی ۴ میکرولیتر بافر 5X first strand، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RNasin (40U/ul) و ۱ میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس (M-MLV) اضافه شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها به آرامی، میکروتیوب‌ها دوباره در دستگاه PCR قرار داده شدند تا در دو چرخه با دماهای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واکنش رونوشت‌برداری معکوس از RNA و تبدیل آن به DNA مکمل یا cDNA انجام شود.

برای انجام آزمون RT-PCR، میزان بیان نیمه کمی قطعه *CTB-EX4* با ژن مرجع *Actin1* (توالی آغازگر مستقیم ۳'-TGATTGGAATGGAAGCTGCTG و توالی آغازگر معکوس ۵'-CAGTGATTTCCTTGCTCATCCG) مقایسه شد. RT-PCR با استفاده از cDNAهای تولیدی به عنوان الگو و آغازگرهای ژن مرجع *F-Actin* و *R-Actin* و اختصاصی *F-CTB-EX4* و *R-CTB-EX4* و طبق نسبت‌های به کار رفته و چرخه‌های دمایی همانند آزمون PCR در ۳۱ چرخه انجام گرفت. آغازگر ژن *CTB-EX4* و آغازگر ژن مرجع *Actin* در طی واکنش RT-PCR به صورت هم‌زمان مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس بیان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET و رعایت حداقل تکرار زیستی (سه تکرار) بیان ژن هدف کمی‌سازی شد. نتایج بیان ژن توسط نرم‌افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین مورد بررسی قرار گرفت.

گیاهان تراریخته‌ی درون شیشه نسل اول تایید شده در آزمون PCR، با محیط سازگار شدند و به محیط گلخانه منتقل شدند (شکل ۲ a-g). از بذره‌ای به دست آمده از گیاهان کاهوی

سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر قطعه ۵۴۳ جفت بازی *CTB-EX4*، با توالی آغازگر مستقیم ۳'-TGTGCAGAATACCACAACACAC و توالی آغازگر معکوس ۳'-TCAAGAAGGAGGAGGAGCAG-۵' هر کدام در حجم ۰/۵ میکرولیتر (غلظت اولیه ۵ µM و غلظت نهایی ۰/۵ µM)، DNA الگو به غلظت ۱۰ نانوگرم، Master Mix در حجم ۵ میکرولیتر و آب برای حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد.

استخراج RNA کل از برگ‌های گیاهان کاهوی نسل دوم به روش پیرز مارتینز و همکاران و با اندکی تغییر انجام شد (Pérez-Martínez et al., 2020). حدود ۰/۱ الی ۰/۲ گرم از نمونه برگ تازه با استفاده از ازلت مایع در هاون به صورت کامل پودر شد و ۲ میلی‌لیتر از بافر استخراج به هاون‌ها اضافه گردید. در مرحله بعدی ۱ میلی‌لیتر از محلول فنل-کلروفرم - ایزوآمیل‌الکل به نسبت حجمی ۱:۲:۴ به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشتن روشنار و انتقال به میکروتیوب جدید به هر نمونه هم حجم آن محلول کلروفرم - ایزوآمیل‌الکل به نسبت حجمی ۱:۲:۴ اضافه شد. در مرحله بعد فاز روایی شفاف برداشته شد و ۰/۱ حجم آن محلول لیتیم کلراید ۸ مولار اضافه و پس از یک شب تیمار در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب تشکیل شده با اتانول ۷۰٪ شسته شد و سپس برای خشک شدن زیر هود قرار گرفت. در نهایت رسوب حاصل در ۳۰ میکرولیتر آب استریل تیمار شده با DEPC حل شد. جهت حذف DNA ژنومی، به ۱۰ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر آنزیم DNase I و هم حجم آن بافر آنزیم اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای غیرفعال کردن آنزیم DNase I، ۱ میکرولیتر ETDA ۵۰ میلی‌مولار به هر نمونه اضافه شد و در نهایت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. به منظور تولید cDNA از RNAهای تیمار شده با آنزیم DNase I از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Cat No: YT4500) با استفاده از آغازگر معکوس Oligo dT استفاده شد.

Real time واکنش (Pfaffl et al., 2001; Tellmann, 2006). PCR برای هر آغازگر در رقت و هر رقت در ۳ تکرار انجام شد. مقادیر Ct حاصل برای رسم خط همبستگی بین مقادیر Ct و رقت cDNA به منظور تعیین کارایی آغازگرها مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت میزان شیب خط و R^2 حاصل از خط همبستگی بین Ct ها محاسبه گردید و کارایی هر آغازگر با استفاده از معادله $PCR\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})}$ بدست آمد.

تعیین تعداد نسخه انتقال یافته با استفاده از واکنش Real time PCR: جهت تعیین تعداد نسخه به روش مطلق ابتدا برای هر دو ژن *CTB-EX4* و *Actin1* منحنی استاندارد حاصل از سری رقت مربوط به محصول PCR در ۴ رقت $1x$ ، $(\frac{1}{10})x$ ، $(\frac{1}{100})x$ ، $(\frac{1}{1000})x$ تهیه شد. بر اساس غلظت نمونه $1x$ و با توجه به وزن مولکولی قطعه تکثیر شده با استفاده از نرم افزار تحت وب NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/>) تعداد نسخه ابتدایی در آغاز واکنش Real time PCR محاسبه شد. با استفاده از Ct های بدست آمده برای هر رقت، نمودار Ct در برابر تعداد نسخه رسم شد و خط همبستگی بین نقاط برای هر آغازگر به صورت مجزا رسم گردید. پس از محاسبه R^2 و معادله خط، از معادله بدست آمده برای تعیین تعداد رونوشت به ازای Ct در هر رخداد استفاده شد. برای تعیین تعداد نسخه در هر رخداد واکنش Real time PCR از DNA هر رخداد انجام شد. با در نظر گرفتن نسبت بین تعداد رونوشت *CTB-EX4* نسبت به تعداد رونوشت *Actin1* تعداد نسخه های منتقل شده محاسبه شد. با توجه به این نکته که آغازگرهای ژن *Actin1* قادر به تکثیر ۸ مکان روی ژنوم دیپلوئید کاهو بودند تعداد نسخه نهایی بدست آمده با تقسیم بر عدد ۸ به ازای یک ژنوم کاهو استاندارد شد.

در روش کمیّت سنجی نسبی با استفاده از واکنش Real time PCR از نمونه های DNA هر رخداد و با استفاده از معادله $2^{-\Delta Ct}$ ، تعداد نسخه های انتقال یافته ژن *CTB-EX4* نسبت به ژن *Actin1* محاسبه گردید. از روی تعداد نسخه های مورد انتظار برای ژن کنترل داخلی *Actin*، تعداد نسخه های ژن مورد مطالعه *CTB-EX4* تعیین گردید. با توجه به این نکته که آغازگرهای ژن *Actin1*

تراریخته نسل اول حاوی ژن *CTB-EX4* برای کشت گیاهان کاهوی تراریخته ی نسل دوم استفاده شد.

تولید گیاهان کاهوی تراریخته ی نسل دوم حاوی ژن *CTB-EX4*: بذره های نسل T_0 تراریخته همراه با بذر نمونه غیرتراریخت (شاهد) در ابتدا در محیط کشت MS حاوی کانامایسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کشت و پس از جوانه زنی، تعداد گیاهچه های حساس و مقاوم شمارش شدند (شکل ۲-ih). پس از ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ (۳۰ دقیقه)، آب دو بار تقطیر (۱ ساعت) (Pepe et al., 2021)، بذور روی خاک مغذی شامل نسبت برابر خاک رس، ماسه، کود دامی، کوکوپیت و پیرلیت در گلدان کشت گردیدند (Patil et al., 2020).

بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح mRNA: جهت بررسی کمی بیان ژن *CTB-EX4* از دستگاه Real time PCR ساخت شرکت Applied Biosystems، آغازگرهای مستقیم 3'-CAATTAGTATGGCAAATGG 5' و معکوس 3'-TCAAGAAGGAGGAGGAGCAC 5' ژن *CTB-EX4* و ژن کنترل داخلی *Actin1* در غلظت ۵ پیکومول و master mix SYBER green شرکت AMPLIQON حاوی رنگ ROX طبق دستورالعمل (Cat. No.: A325402) استفاده شد. مقادیر Ct مربوط به هر یک از رخدادها با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) (با توجه به یکسان بودن کارایی آغازگرهای مورد استفاده) طبق معادله ی زیر کمی شد. در نهایت میانگین ۳ تکرار به عنوان بیان ژن *CTB-EX4* استاندارد شده با بیان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. نمودارهای مناسب جهت تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار Microsoft Excel 2019 رسم گردید.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta(Transgene (Ct EX4 - Ct Actin) - Control (Ct EX4 - Ct Actin))}$$

به منظور تعیین کارایی آغازگرها (Efficiency) از رسم نمودار کارایی برای ژن های *CTB-EX4* و *Actin1* استفاده شد. نمودار کارایی با استفاده ترسیم مقادیر Ct در برابر سری رقت های ۴ گانه $1x=10 \text{ ng/ul}$ ، $(\frac{1}{10})x$ ، $(\frac{1}{100})x$ ، $(\frac{1}{1000})x$ ترسیم شد

قادر به تکثیر ۸ مکان روی ژنوم دیپلوئید کاهو بودند، عدد بدست آمده از معادله $2^{-\Delta Ct}$ با ضرب در عدد ۸ استاندارد شد.

بررسی بیان ژن CTB-EX4 در سطح پروتئین: استخراج پروتئین از بافت گیاهی با روش Tris-HCL استفاده شد (DelMar, 2019). با استفاده از ازت مایع ۰/۱ گرم نمونه برگگی تازه در هاون به صورت کامل پودر شد. ۱ میلی لیتر بافر استخراج به پودر گیاهی حاصل اضافه شد. مخلوط حاصل به میکروتیوب ۲ میلی لیتر انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. در مرحله بعد، میکروتیوب ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها فاز رویی به میکروتیوب ۱/۵ انتقال داده شد. برای انجام آزمون SDS-PAGE ۲۰ میکرو لیتر از هر نمونه پروتئین مورد نظر با مقدار ۲ میکرو لیتر از بافر بارگذاری 5x به صورت کامل همگن شد سپس به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در داخل بن ماری ۹۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از بارگذاری، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با شدت جریان ۶۰ آمپر و سپس ۱ الی ۲ ساعت با شدت جریان ۴۵ آمپر الکتروفورز شدند. پس از شستشو ژل با آب مقطر، مقداری از محلول ثبوت TCA به آن اضافه و روی شیکر با دور بسیار آرام به مدت زمان ۱ ساعت قرار گرفت. در مرحله بعدی ژل با آب مقطر شستشو داده شد و محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو G-250 به آن اضافه شده و به مدت یک شبانه روز روی شیکر با دور بسیار آرام قرار گرفت. بعد از گذشت یک شبانه روز ژل با آب مقطر شستشو داده شد. از آزمون ELISA برای بررسی بیان ژن CTB-EX4 در سطح پروتئین استفاده شد (Gao and Wu 2022). ابتدا غلظت برابری از پروتئین کل گیاهان شاهد و تراریخت برابر با ۱۰ میکرو گرم همراه با ۲۰۰ میکرو لیتر محلول پوشش دهنده (۰/۰۱ گرم سدیم آزید، ۰/۰۷۹ گرم سدیم کربنات، ۰/۱۴۶ گرم سدیم بی کربنات در حجم ۵۰ میلی لیتر بافر 1x Phosphate buffered saline (pH: ۹/۶)). و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد سپس به چاهک های الیزا منتقل و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد چاهک ها ۳ بار توسط بافر PBS-T و ۳ بار توسط بافر PBS شستشو داده شدند و ۲۰۰ میکرو لیتر محلول سرم گاوی BSA ۱٪ یا بافر مسدودکننده به هر چاهک اضافه شد. نمونه ها

به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد هر چاهک توسط بافرهای PBS و PBS-T شسته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر پادتن اختصاصی CTB-EX4 اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو دادن با بافرهای PBS-T و PBS، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر پادتن کنژوگه اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. بعد از ۳ بار شستشو با بافرهای PBS-T و PBS، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترای TMB به هر کدام از چاهک ها اضافه و برای انجام واکنش رنگی به محیط تاریکی انتقال داده شد. پس از ۴۵ دقیقه و تغییر رنگ چاهک ها به رنگ آبی، با افزودن اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار واکنش متوقف شد و رنگ آبی چاهک ها به زرد تغییر کرد. در انتها توسط دستگاه ELISA reader، شرکت Bio Tek Instruments میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید (شکل ۵). برای انجام وسترن بلات با استفاده از کیت ECL ابتدا آزمون SDS-PAGE انجام گرفت سپس پروتئین ها توسط دستگاه Trans-SD semi-Dry Electrophoretic Transfer cell شرکت Bio-Rad به یک غشا نیتروسلولوزی با منافذ $45\mu m$ انتقال داده شدند. غشا و ژل در ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه درون بافر انتقال قرار گرفتند. با استفاده از ولتاژ ۷ V در مدت زمان ۶۰ دقیقه، پروتئین ها از ژل به غشا نیتروسلولوزی انتقال داده شدند سپس غشا نیتروسلولوزی به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول شیر خشک بدون چربی ۵٪ قرار گرفت. غشا توسط محلول PBS-T سه مرتبه شستشو داده شد. پادتن اولیه با غلظت ۱:۲۰۰۰۰ به غشا اضافه گردید و در دمای محیط به مدت ۳ ساعت روی شیکر با دور آرام قرار گرفت. در مرحله بعد سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه، غشا با محلول PBS-T شستشو داده شد. پادتن ثانویه با غلظت ۱:۲۰۰۰ به غشا اضافه شد و در دمای محیط به مدت ۹۰ دقیقه به آرامی شیک شد و سه مرتبه با محلول PBS-T شستشو داده شد. سوبسترای ECL طبق دستورالعمل کیت زیست فناوری در محیط تاریک تهیه گردید. غشا نیتروسلولوزی در اتاق تاریک در داخل کیسه نایلونی و بعد درون کاست عکاسی حاوی فیلم عکاسی قرار گرفت، بعد از گذشت ۵ دقیقه با قرار دادن نور روی بلات، فیلم

رادیولوژی X-ray از ۱ ثانیه تا چند دقیقه با توجه به شدت نور، روی بلات قرار داده شد. سپس فیلم بعد از گذشت ۵ دقیقه با آب مقطر، در محلول ثبوت قرار داده شد و سپس با آب شستشو داده شد. به منظور بررسی *in silico* توالی CTB-EX4 و بررسی وجود پروتئین مشابه با توالی CTB-EX4 در کاهو غیرتراریخت از Blast در پایگاه داده NCBI استفاده شد. برای این منظور توالی نوکلئوتیدی ژن CTB-EX4 در بخش tblastn جای گذاری شد و پس از به دست آمدن توالی آمینواسیدی مورد نظر، اقدام به Blast پروتئین CTB-EX4 در توالی پروتئینی گیاه کاهو شد.

نتایج و بحث

باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده

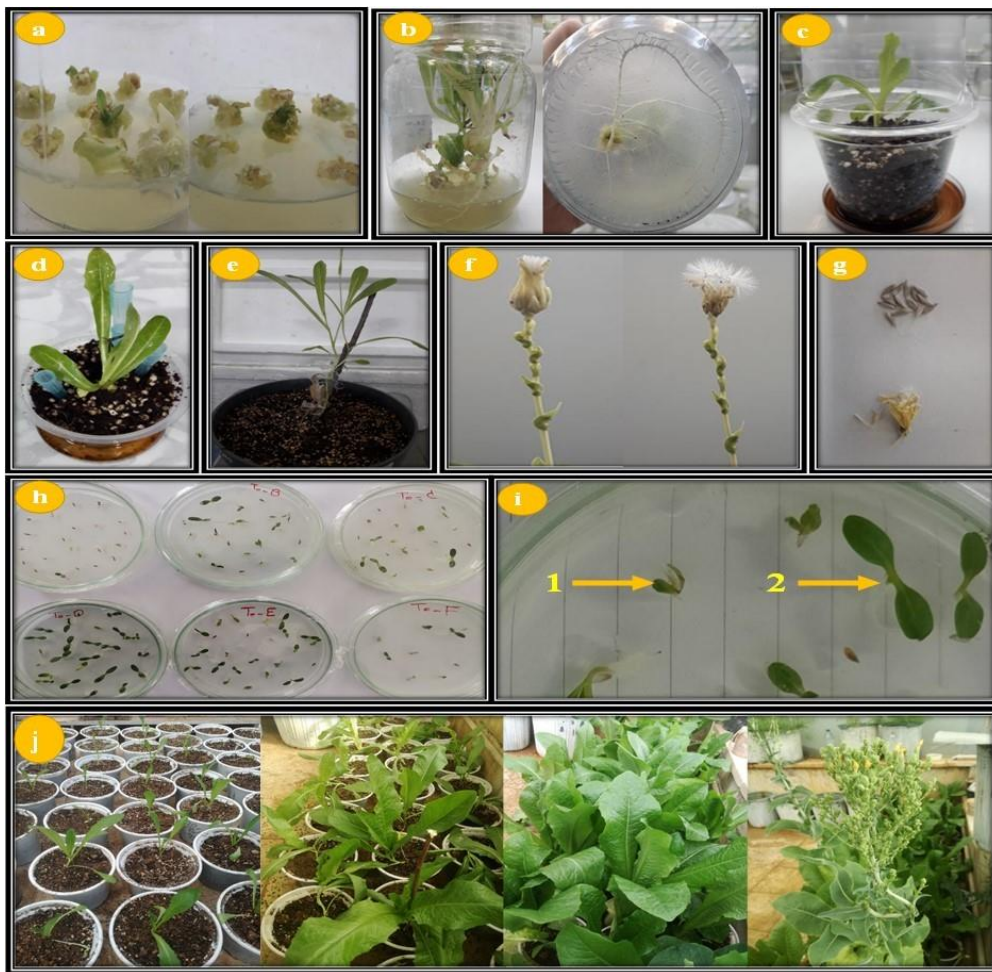
دو هفته پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگ کاهو، اولین کالوس‌های حاصل از انتقال ژن توسط آگروباکتریوم ظاهر شدند و ریزنمونه‌هایی که ژن مورد نظر و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک

کانامایسین را دریافت نکرده بودند، از بین رفتند (شکل ۲-۲a). طی پنج مرحله تلقیح ۷۷۵ ریزنمونه تلقیح شد و در نهایت ۲۰/۲۵٪ از ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌زایی کردند و ۱۰/۰۶٪ نیز وارد مرحله ساقه‌زایی شدند (جدول ۱). دو تا سه هفته پس از ظهور کالوس‌ها، اولین گیاهچه‌ها در محیط باززایی شروع به رشد کردند (شکل ۲-۲b). پس از رشد کافی ریشه مربوط به گیاهچه‌های درون شیشه، گیاهچه‌ها از محیط کشت خارج و به گلدان‌های درپوش‌دار حاوی نسبت برابر کوکوپیت و پیرلایت منتقل شدند (شکل ۲-۲c). پس از ایجاد سوراخ‌هایی روی درپوش در طول چند روز و سازگاری با محیط خارج از شیشه درپوش‌ها برداشته شد (شکل ۲-۲d)، سپس گیاهان به گلدان‌های حاوی خاک رس و ماسه و کود دامی در گلخانه انتقال داده شدند (شکل ۲-۲e). گیاهان باززا شده برای تایید تراریختی با آزمون PCR و همچنین آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CTB-EX4 مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). پس از طی مراحل رشدی گیاهان تایید شده به بذر نشستند (شکل ۲-۲f) و بذور حاصل جمع‌آوری شدند (شکل ۲-۲d).

جدول ۱- تعداد ریزنمونه‌ها و درصد کالوس‌زایی و ساقه‌زایی

Table 1. The number of explants and the percentage of callus and stem formation

ساقه‌زایی	کالوس‌زایی	تعداد ریزنمونه	مراحل تلقیح
Stem formation	callus formation	No of explants	Inoculation steps
2	16	125	مرحله ۱ Step 1
15	39	150	مرحله ۲ Step 2
23	37	220	مرحله ۳ Step 3
25	35	130	مرحله ۴ Step 4
13	30	150	مرحله ۵ Step 5
78	157	775	مجموع Total
10.06	20.25	100	درصد Percnet



شکل ۲- باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده، تهیهی بذره‌های تراریخت و تولید گیاهان تراریخته‌ی نسل اول و دوم. (a) ظهور اولین گیاهچه‌ها از کالوس‌های رشد کرده. (b) ریشه‌زایی نمونه‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی. (c) انتقال ریزنمونه‌ها پس از رشد کافی به محیط درون شیشه حاوی کوکوپیت و پیرلیت. (d) سازگاری گیاهچه‌های تراریخت درون شیشه‌ای با محیط بیرون. (e) انتقال گیاهچه رشد کرده به شرایط گلدان حاوی خاک، کود دامی، کوکوپیت و پیرلیت. (f) مراحل گل‌دهی و به‌بذر نشستن. (g) جمع‌آوری بذور از گیاهان تراریخته‌ی نسل اول. (h) کشت بذره‌های تراریخت و غیرتراریخت در محیط کشت MS حاوی کانامایسین جهت انجام تست جوانه‌زنی. (i) گیاهچه‌های حساس به کانامایسین (1)، گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین (2). (j) ترتیب مراحل رشدی گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم.

Fig2. Regeneration of inoculated explants and preparation of transgenic seeds and production of first and second generation transgenic plants. a) Emergence of the first seedlings from the grown callus. b) Rooting of samples in rooting medium. c) Transplanting the explants after sufficient growth to the in-glass medium containing cocopeat and perlite. d) Adaptation of transgenic seedlings in glass with the outside environment. e) Transferring the grown seedlings to pot conditions containing soil, animal manure, cocopeat and perlite. f) Flowering and seeding stages. g) Collecting seeds from first generation transgenic plants. h) Cultivation of transgenic and non-transgenic seeds in MS culture medium containing kanamycin for germination test. i) Kanamycin-sensitive seedlings (1), kanamycin-resistant seedlings (2). j) The sequence of growth stages of second generation transgenic lettuce plants.

تولید گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل T₁

گیاهان کاهوی حاصل از بذره‌های تراریخته، همانند گیاهان غیرتراریخت الگوی رشد طبیعی داشتند و هم‌زمان به گل نشستند. در نهایت از نمونه‌ها بذر تهیه شد و برای سایر آزمایش‌های این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).

جهت تایید حضور ژن CTB-EX4 در گیاهان کاهوی

تراریخته‌ی نسل دوم با PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن CTB-EX4 قطعه‌ای به طول ۵۴۳ جفت باز از ژن تکثیر شد. از ۱۰ گیاه نسل دوم حاصل از بذره‌های تراریخت نسل اول، ۶ گیاه در آزمون PCR تایید شدند که نشان دهنده‌ی انتقال ژن CTB-EX4 بود (شکل ۳). از ۶ رخداد نسل T₁ که در آزمایش مرحله PCR تایید شده بودند، برای بررسی بیان ژن CTB-EX4 استفاده گردید

نسخه است اما مثال‌هایی از انتقال تعداد نسخه‌های بیشتر در گیاهان مختلف از جمله کاهو وجود دارد.

در روش کمیت سنجی نسبی بررسی تعداد نسخه درج شده در ژنوم و مقدار تکثیر توسط آغازگرهای ژن *CTB-EX4* نسبت به آغازگرهای ژن *Actin1* با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (با توجه به یکسان بودن کارایی تکثیر هر دو آغازگر) استاندارد شد و تعداد نسخه درج شده محاسبه شد. با توجه به این که آغازگرهای طراحی شده برای ژن *Actin1* قادر به تکثیر ۴ لوکوس روی ژنوم هاپلوئید بود، برای محاسبه تعداد نسخه انتقال یافته در ژنوم دیپلوئید عدد نهایی در ۸ ضرب شد. در نهایت برای رخداد ۱۰۱، ۶ نسخه، رخداد ۱۰۴ و ۱۰۵، ۱ نسخه، رخداد ۱۰۶، ۳ نسخه، رخداد ۱۰۸، ۴ نسخه و رخداد ۱۲۱، ۲ نسخه محاسبه شد. رخدادهای ۱۰۱، ۱۰۶ و ۱۰۸ دارای بیشتر از ۳ نسخه از ژن مورد مطالعه بودند. این تعداد نسخه‌ها احتمال دارد به سبب ادغام این ژن در چندین جایگاه مختلف بوده باشد.

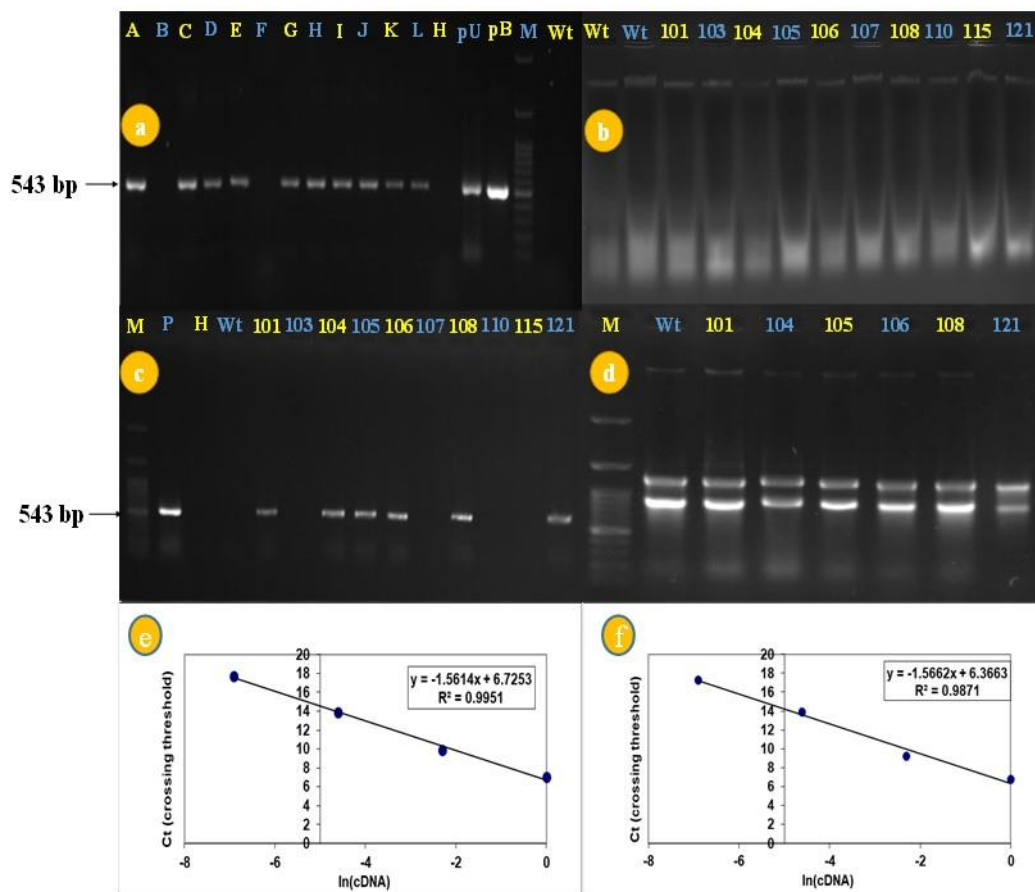
در آزمون **SDS-PAGE** پروتئین‌ها در داخل ژل عمودی توسط الکتروفورز از هم تفکیک شدند و بر حسب وزن مولکولی از هم جدا شدند. در نهایت با بررسی وجود یا عدم وجود قطعی پروتئینی هدف در محدوده ۱۷ کیلودالتون در رخدادهای تراریخت در مقایسه با شاهد، به وجود یا عدم وجود قطعه پروتئین هدف پی‌برده شد. در این آزمون، قطعی ۱۷ کیلو دالتونی موجود در گیاهان تراریخت، در گیاه غیرتراریخت مشاهده نشد (شکل ۵).

نتایج بدست آمده از بیان پروتئین *CTB-EX4* در گیاه کاهو به روش *ELISA* حاکی از آن بود که تمامی گیاهان کاهوی تراریخت شده دارای توانایی تولید پروتئین *CTB-EX4* بودند. رخداد ۱۰۵ دارای بیشترین میزان بیان پروتئین و رخداد ۱۲۱ کمترین میزان بیان پروتئین را نشان داد. بیان رخداد ۱۰۵ تقریباً برابر با رخداد ۱۰۸ بود. بیان پروتئین در رخداد ۱۰۵ تقریباً ۱/۳ برابر رخداد ۱۰۴، ۱/۶ برابر رخداد ۱۰۶ و ۱/۷ برابر رخداد ۱۰۱ بود. نتایج به صورت میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیان شده است (شکل ۴).

(شکل ۳). بر اساس نتایج حاصل از ژل الکتروفورز، اندازه نواری تکثیر شده ژن *CTB-EX4* ۵۴۳ جفت باز و ژن مرجع *Actin1* اندازه‌ی ۲۰۰ جفت باز را نمایش دادند. این آزمون در سه تکرار انجام گرفت (شکل ۳). داده‌های حاصل از **RT-PCR** نشان داد که همه‌ی رخدادهای تایید شده در آزمون PCR در سطح mRNA دارای بیان بودند و تفاوت در میزان بیان بین رخدادهای مورد مطالعه بود. بیشترین میزان بیان نیمه‌کمی در رخداد ۱۰۶ و کم‌ترین میزان بیان در رخداد ۱۰۱ مشاهده شد (شکل ۳).

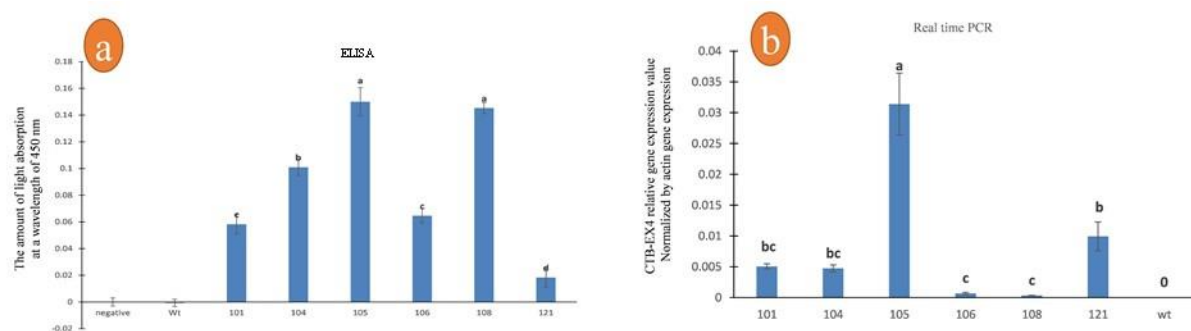
نتایج حاصل از *Real time PCR* حاکی از بیان ژن *CTB-EX4* در گیاهان کاهوی تراریخته در سطح mRNA برای رخدادهای مورد بررسی بود. نتایج نشان داد بیشترین میزان بیان مربوط به رخداد ۱۰۵ و کمترین مقدار بیان متعلق به رخدادهای ۱۰۶ و ۱۰۸ بود. بیان کمی ژن *CTB-EX4* در رخداد ۱۰۵ تقریباً ۳ برابر ۱۲۱ و ۶ برابر رخدادهای ۱۰۱ و ۱۰۴ بود (شکل ۴).

با انجام واکنش *Real time PCR* و استفاده از سری رقت از نمونه‌ی استاندارد تعداد نسخه برای ژن *CTB-EX4* در هر رخداد محاسبه شد. منحنی استاندارد برای سری رقت نمونه‌های استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 و معادله همبستگی بین نقاط برای هر دو ژن *CTB-EX4* و *Actin1* رسم گردید (شکل ۳-۳ و ۳-۴). نتیجه بلاست توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن *Actin1* بر علیه ژنوم کاهو حاکی از تکثیر ۸ لوکوس بود، با توجه به این موضوع تعداد نسخه‌های بدست آمده برای ژن *Actin1* با تقسیم بر عدد ۸ برای ژنوم دیپلوئید نرمال شد. در نهایت با تقسیم تعداد نسخه ژن *CTB-EX4* بر تعداد نسخه *Actin1*، تعداد نسخه درج شده ژن *CTB-EX4* به ازای ژنوم دیپلوئید کاهو بصورت تقریبی محاسبه شد. برای رخداد ۱۰۱، ۷ نسخه، رخداد ۱۰۴ و ۱۰۵، ۱ نسخه، رخداد ۱۰۶، ۴ نسخه، رخداد ۱۰۸، ۵ نسخه و رخداد ۱۲۱، ۲ نسخه محاسبه شد. تعداد نسخه‌ی انتقال یافته از طریق آگروباکتریوم به عوامل مختلفی از قبیل نوع سوبه آگروباکتریوم و ساختار ژنتیکی گیاه میزبان و همچنین نوع پلاسمید بستگی دارد. اگرچه معمولاً تعداد نسخه‌های انتقال یافته توسط آگروباکتریوم کم و معمولاً ۱ یا ۲



شکل ۳- بررسی‌های مولکولی روی گیاهان مورد بررسی (a) گزینش گیاهچه‌های تراریخته‌ی نسل اول حاصل از نمونه‌های بازا شده توسط آغازگرهای اختصاصی *CTB-EX4*، چاهک‌های A, C, D, E, G, H, I, J و K: L: نمونه‌های تراریخته‌ی تایید شده‌ی نسل اول، چاهک‌های B و F: نمونه‌های غیرتراریخت، چاهک H: کنترل منفی (استفاده از آب به عنوان DNA الگو)، چاهک‌های pB و pU: حاوی قطعه مورد نظر به عنوان کنترل مثبت، M: نشانگر مولکولی ۳۰۰-۱۰۰ bp، چاهک Wt: نمونه‌ی شاهد (گیاه غیرتراریخت). (b) الکتروفورز DNA ژنومی استخراجی از گیاهان تراریخته و شاهد، چاهک‌های ۱۰۱، ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۷، ۱۰۸، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۱: DNA استخراجی از گیاهان تراریخته و چاهک‌های Wt: DNA استخراجی از گیاهان شاهد غیرتراریخت. (c) بررسی گیاهان کاهوی تراریخته نسل دوم در سطح DNA و تایید حضور قطعه ۵۴۳ جفت باز ژن *CTB-EX4* توسط آزمون PCR، پلاسمید (C+): شامل ژن مورد نظر به عنوان کنترل مثبت و تعداد ۶ رخداد ۱۰۱، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۸، ۱۲۱ از کل گیاهان تراریخت نسل دوم: حاوی ژن مورد مطالعه *CTB-EX4* با قطعه مورد انتظار ۵۴۳ جفت باز، چاهک C-: نمونه غیرتراریخت شاهد، چاهک H: نمونه کنترل منفی (استفاده از آب به عنوان DNA الگو)، نمونه‌های ۱۰۳، ۱۰۷، ۱۱۰ و ۱۱۵: نمونه‌های غیرتراریخت. (d) استخراج RNA از برگ‌های گیاهان کاهوی تراریخته‌ی نسل دوم، چاهک‌های ۱۰۱، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۸ و ۱۲۱: نمونه‌های تراریخت، Wt: نمونه غیرتراریخت شاهد. (e) منحنی استاندارد برای آغازگرهای ژن *CTB-Ex4* در ۴ رقت و ۳ تکرار برای هر رقت. Ct در برابر غلظت cDNA (f) منحنی استاندارد برای آغازگرهای ژن *Actin 1* در ۵ رقت و ۳ تکرار برای هر رقت. Ct در برابر غلظت cDNA

Fig3. Molecular analyses on the plants under study. a) Selection of first-generation transgenic seedlings from samples regenerated by specific primers *CTB-EX4*, wells A, C, D, E, G, H, I, J, K, and L: confirmed first-generation transgenic samples, wells B and F: Non-transgenic samples, H well: negative control (using water as template DNA), pB and pU wells: containing desired fragment as positive control, M: molecular marker 100-3000 bp, Wt well: non-transgenic control sample. b) Genomic DNA electrophoresis extracted from transgenic and control plants, wells 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 115 and 121: DNA extracted from transgenic plants and Wt wells: DNA extracted from non-transgenic control plants. c) Examining the second generation transgenic lettuce plants at the DNA level and confirming the presence of a 543 bp fragment of the *CTB-EX4* gene by PCR test, plasmid (C+): including the desired gene as a positive control and the number of 6 lines 101, 104, 105, 106, 108, 121 of all transgenic plants of the second generation: containing the studied gene *CTB-EX4* with the expected fragment of 543 bp, well C-: control non-transgenic sample, well H: negative control sample (using water as template DNA), 103 samples, 107, 110 and 115: non-transgenic sample. e) Standard curve for *CTB-Ex4* gene primers at 4 dilutions and 3 replicates for each dilution. Ct versus cDNA concentration f) Standard curve for *Actin1* gene primers in 5 dilutions and 3 replicates for each dilution. Ct versus cDNA concentration



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در سطح RNA و پروتئین. (a) نمودار ELISA برای پروتئین‌های استخراجی گیاهان تراریخته در مقایسه با

گیاه شاهد. (b) نمودار مقایسه میانگین بیان کمی نسبی ژن *CTB-EX4* نرمال شده با مقدار بیان ژن *Actin1*

Fig4. Comparison chart of the average of *CTB-EX4* gene expression in RNA and protein levels. a) ELISA plot for extracted proteins of transgenic plants compared to the control plant. b) Comparison graph of the average relative quantitative expression of the *CTB-EX4* gene normalized with the expression value of the *Actin* gene.

X-ray باندهای پروتئین مورد رویت قرار گرفتند (شکل ۵). همچنین باندهای پروتئین *CTB-EX4* روی کاغذنیتروسلولزی با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی در محدوده ۱۷ کیلو دالتون ظاهر گشتند (شکل ۵).

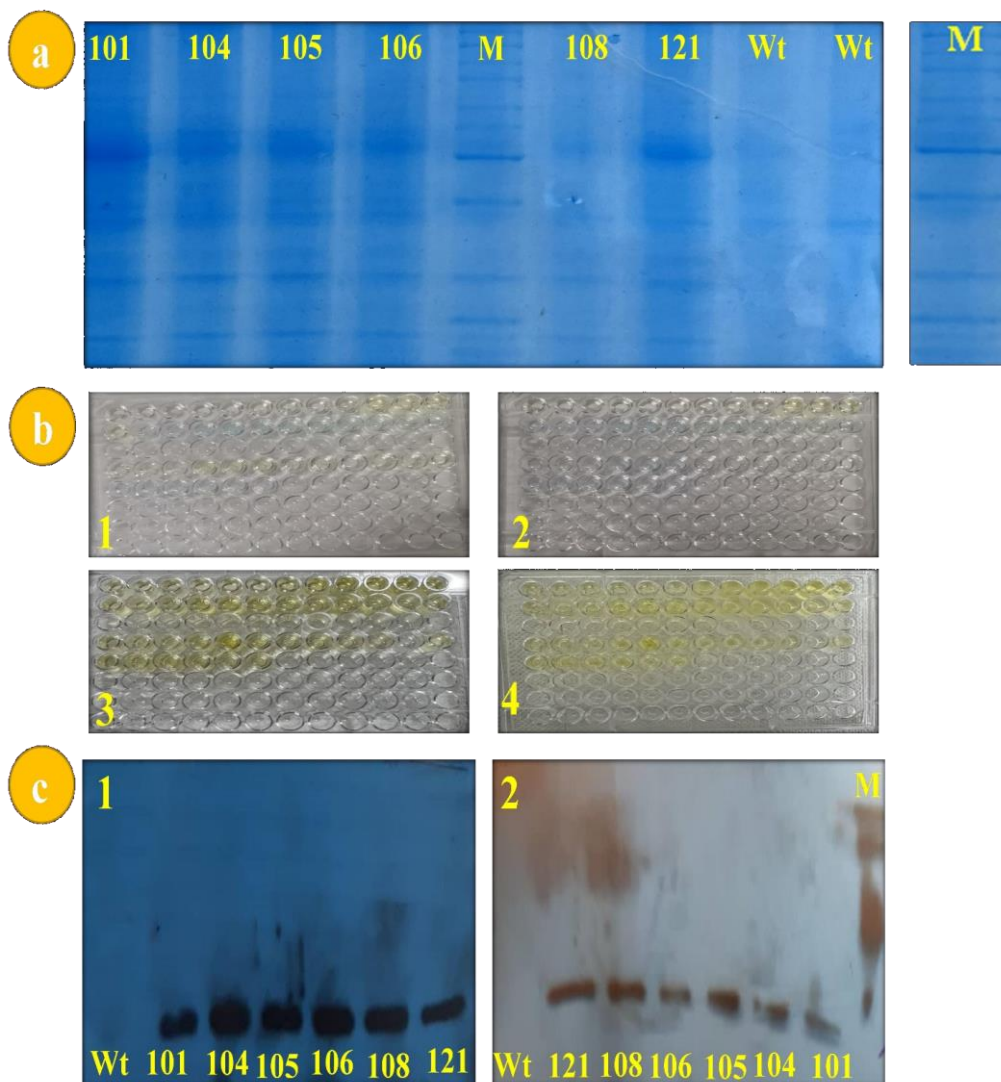
با توجه به نتایج حاصل از Blast p، مشاهده شد که پروتئینی مشابه پروتئین *CTB-EX4* در گیاه کاهو وجود ندارد که توسط آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین *CTB-EX4* شناسایی شود. بنابراین می‌توان گفت پروتئین مشاهده شده در گیاهان تراریخت همان پروتئین *CTB-EX4* در این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه‌ای اکسندین-۴ متصل شده به *CTB* با روش بمباران ذره‌ای به کلروپلاست کاهو انتقال داده شد. ژن *CTB-EX4* بیان شده در کلروپلاست، سطح گلوکز خون را در موش کاهش داد و ترشح انسولین را در سلول‌های بتا TC-6 تحریک کرد. در این مطالعه کون و همکاران (۲۰۱۳) به‌طور موفقیت‌آمیزی ژن *CTB-EX4* را درون ناقل انتقالی کلروپلاست قرار دادند. سپس انتقال ژن *CTB-EX4* توسط PCR و سادرن بلات تایید شد (Kwon et al., 2013).

در پژوهشی دیگر، ژن *EX4* را با پروتئین ترانسفرین انسانی ترکیب کردند و سازه *EX4-Tf* را ایجاد کردند. پروتئین فیوژن *EX4-Tf* با ناقل pBI101.1-Ex-4-Tf توسط *A. tumefaciens* به برگ گیاه تنباکو انتقال داده شد. سپس انتقال *EX4-Tf* با روش PCR تأیید شد (Choi et al., 2014).

رخداد ۱۰۵ دارای بیشترین مقدار بیان در سطوح پروتئین و mRNA در مقایسه با سایر رخدادهای تراریخت شده بود. با توجه به این نکته که نتایج بررسی تعداد نسخه انتقال یافته حاکی از وجود تنها ۱ نسخه منتقل شده ژن *CTB-EX4* در ژنوم رخداد ۱۰۵ بود. به‌نظر می‌رسد این نسخه در ناحیه مناسبی از ژنوم قرار گرفته است. همچنین رخداد ۱۰۱ با بیشترین تعداد نسخه انتقال یافته دارای کمترین مقدار بیان در سطوح mRNA و پروتئین بود که به‌نظر می‌رسد تعداد بالای ژن انتقال یافته باعث اثر بازخورد منفی روی بیان ژن مورد نظر باشد. از طرفی قرار گرفتن نسخه منتقل شده در مناطق غیرترجمه شونده نیز می‌تواند عامل دیگری در کم بودن بیان در یک رخداد تراریخت باشد. از طرفی رخداد ۱۰۸ با ۵ نسخه پس از رخداد ۱۰۱ دارای کمترین مقدار بیان در سطح mRNA بود با این حال در سطح پروتئین دارای بیشترین مقدار بیان پس از رخداد 105 بود. این نکته نشان دهنده این واقعیت است که مقدار بیان در سطح mRNA نمی‌تواند برآورد صحیحی از مقدار بیان در سطح پروتئین باشد زیرا ممکن است کل mRNA تولید شده به دلایلی مانند خاموشی ژن پس از رونویسی به پروتئین تبدیل نشوند.

با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی *CTB-EX4* در شرایط احیا، بوسیله‌ی دستگاه بلاتینگ، بعد از انتقال به غشا نیتروسلولزی اقدام به شناسایی پروتئین شد. در این آزمایش از سوبسترای به نسبت حساس ECL استفاده شد. در اتاق تاریک عکاسی با استفاده از



شکل ۵- آنالیزهای انجام گرفته در سطح پروتئین. (a) SDS-PAGE حاصل از پروتئین‌های استخراجی در گیاهان تراریخت و شاهد، چاهک‌های ۱۰۱، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۸ و ۱۲۱: گیاهان تراریخته، چاهک‌های Wt: گیاهان شاهد غیرتراریخت، چاهک M: نشانگر پروتئینی. (b) تغییر رنگ چاهک‌های ELISA به ترتیب مراحل، انتقال پروتئین‌های استخراجی همراه با محلول پوشش‌دهنده به چاهک‌ها (1)، اضافه کردن بافر مسدود کننده و انکوبه کردن (2)، افزودن اسید سولفوریک ۲/۵ مولار (3-4). (c) آزمون وسترن‌بلات، چاهک‌های ۱۰۱، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۸ و ۱۲۱: گیاهان تراریخته، چاهک‌های Wt: گیاهان شاهد غیرتراریخت، در شرایط احیا توسط آنتی‌بادی اختصاصی CTB-EX4 با روش کیت ECL (1). ظاهر شدن باندهای پروتئین CTB-EX4 روی کاغذ نیتروسولوزی (2).

Fig5. Analyzes performed at the protein level. a) SDS-PAGE of extracted proteins in transgenic and control plants, wells 101, 104, 105, 106, 108 and 121: transgenic plants, Wt wells: non-transgenic control plants, well M: protein marker. b) Changing the color of the ELISA wells in the order of the steps, transferring the extracted proteins together with the coating solution to the wells (1), adding blocking buffer and incubating (2), adding 2.5 M sulfuric acid (3-4). c) Western blot test, wells 101, 104, 105, 106, 108 and 121: transgenic plants, Wt wells: non-transgenic control plants, under conditions of recovery by specific antibody CTB-EX4 by ECL kit method (1). Appearance of CTB-EX4 protein bands on nitrocellulose paper (2).

تحقیق، ۶ نوع بذور متفاوت نسل اول (T_1) در دسترس بود. از هر نوع بذور نسل اول (T_0) تعداد ۴ عدد بذور انتخاب و در نهایت، تعداد ۲۴ بذور متفاوت از بذرهای نسل اول گیاهان کاهوی تراریخته‌ی حاوی ژن CTB-EX4 در گلدان‌های حاوی خاک رس و نسبت مناسب مواد مغذی کشت گردید. تعداد ۱۰ گیاهچه نسل

در این تحقیق، برای اثبات حضور ژن CTB-EX4 از گیاهان تراریخت DNA استخراج شد و با آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر واکنش PCR انجام گرفت. ژن CTB-EX4 در تعدادی از رخدادهای نسل T_1 تراریخت تکثیر نشد که می‌توان گفت به دلیل عدم وجود ژن یا ممانعت کننده در DNA باشد. در این

رخداد ۱۲۱ دارای ۲ نسخه برآورد شده برای ژن *CTB-EX4* بود. به صورت قطع به یقین نمی توان در مورد چگونگی ادغام ژن در ژنوم گیاه نظری را ارائه کرد، اما احتمال دارد که ژن مد نظر وارد یک جایگاه شده ولی در ۲ کروموزوم همولوگ تکرار گردیده است.

نتایج بررسی بیان ژن *CTB-EX4* در رخدادهای تراریخت مورد بررسی با استفاده از روش PCR نیمه کمی حاکی از بیان ژن مورد نظر در همه رخدادهای مورد بررسی بود به طوری که بیشترین میزان بیان مربوط به رخداد ۱۰۵ بود که تقریباً ۳۰ برابر بیشتر از رخداد ۱۰۱ با کمترین مقدار بیان بود (شکل ۴). بیان کمی ژن *CTB-EX4* در رخداد ۱۰۵ تقریباً ۳ برابر رخداد ۱۲۱ و تقریباً ۶ برابر رخدادهای ۱۰۱ و ۱۰۴ مشاهده شد. به نظر می رسد تعداد بالای نسخه درج شده در رخداد ۱۰۱ باعث اثر بازخورد منفی و کاهش بیان در این رخداد شده باشد همچنین عواملی مانند خاموشی ژن و اثرات مکانی می توانند باعث عدم رونویسی در سطح RNA شوند. همچنین دلیل انتقال تصادفی ژن به وسیله آگروباکتریوم ممکن است ژن در ناحیه ی هتروکروماتین قرار بگیرد و یا اینکه ژن مورد نظر به صورت ناقص و شکسته به گیاه انتقال یابد و در نهایت بیان نگردد.

در آزمون های ELISA و وسترن بلات نیز بیان پروتئین *CTB-EX4* مورد تایید قرار گرفت. به طوری که همه ی رخدادهای تراریخت شده قادر به تولید پروتئین مورد نظر بودند و فقط مقدار آن در رخدادهای مختلف با هم متفاوت بود. زیر واحد B سم وبا خاصیت سمی ندارد و مسئول اتصال سم به گیرنده های سم موجود در غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان است. در آزمون ELISA نتایج بیانگر آن بود که رخداد ۱۰۵ بیشترین مقدار بیان پروتئین *CTB-EX4* را نشان داد و رخداد ۱۲۱ کمترین بیان را به خود اختصاص داد و بیان رخداد ۱۰۵ تقریباً برابر با رخداد ۱۰۸ بود، همچنین بیان پروتئین در رخداد ۱۰۵ تقریباً ۱/۳ برابر رخداد ۱۰۴، ۱/۶ برابر رخداد ۱۰۶ و ۱/۷ برابر رخداد ۱۰۱ بود.

در گزارش های ارائه شده، اندازه ی پروتئین *CTB-EX4* در محدوده ی ۱۷ کیلو دالتون تعریف شده است. در آزمون SDS-PAGE باند مورد نظر به صورت دقیق در این محدوده رویت شد

اول (T_1) به طور کامل روییده شدند و همانند گیاهچه های شاهد رشد کردند و به مرحله گلدهی رسیدند و به بذر نشستند و از رخدادهای تایید شده که حاوی ژن مورد نظر بودند بذر تهیه شد.

نتایج تعیین تعداد نسخه به روش مطلق و تعیین تعداد نسخه به روش نسبی در مقایسه با ژن کنترل داخلی *Actin1* نشان داد که رخداد ۱۰۱ دارای بیشترین نسخه درج شده به مقدار ۶ نسخه و رخدادهای ۱۰۴ و ۱۰۵ دارای کمترین نسخه درج شده به مقدار ۱ نسخه بودند. همچنین رخدادهای ۱۲۱، ۱۰۶ و ۱۰۸ به ترتیب دارای ۲، ۳ و ۴ نسخه بودند. نتایج تعیین تعداد نسخه های درج شده در ژنوم گیاهان کاهوی تراریخته در هر دو روش مطلق و نسبی تفاوت بسیار اندک با هم داشتند و تقریباً مشابه هم بودند. تفاوت در نتایج حاصل از تعیین تعداد نسخه ی ژن منتقل شده در رخدادهای مختلف گیاهی در نسل دوم گیاهان کاهوی تراریخته می تواند دلایل متفاوتی از جمله تفرق ژن *CTB-EX4* در طی ایجاد نسل دوم باشد. همچنین کراسینگ اور نیز می تواند باعث شکستگی و تفرق ژن ها گردد. گیاهان تراریخته تولید شده با استفاده آگروباکتریوم از لحاظ سطح بیان ژن های انتقال متفاوت هستند طوری که میزان این تفاوت بین ۱۰ تا ۵۰ برابر در بین افراد ترانسفورم شده در همان آزمایش تغییر می کند (Hobbs et al., 1990). دلایل متنوعی برای این تفاوت بیان پیشنهاد می شود که هیچ کدام به طور کامل این پدیده را توضیح نمی دهد. تعداد کپی از T-DNA انتقالی یکی از مهمترین عوامل مطالعه شده می باشد که همبستگی مثبت بین تعداد نسخه انتقالی و افزایش بیان وجود ندارد. حتی نشانه هایی وجود دارد که نشان می دهد نسخه های منفرد منجر به بیان بالاتر می شوند. علاوه بر تعداد کپی ترانسژن موقعیت ژن وارد شده در ژنوم نیز روی بیان آن بسیار موثر است.

برخی از رخدادهای مورد مطالعه مانند رخدادهای ۱۰۴ و ۱۰۵ هر کدام دارای یک نسخه از ژن *CTB-EX4* را در ژنوم خود داشتند که حاکی از ادغام شدن ژن مورد مطالعه فقط در یک جایگاه در یک دست از کروموزوم های کاهو می باشد. می توان امیدوار بود که با تولید گیاهان هموزیگوت، بیان نسبتاً پایداری را از ژن *CTB-EX4* در نسل های بعد شاهد باشیم.

های بالا از یک ژن می‌تواند دارای اثر بازخورد منفی روی بیان ژن مورد نظر و در نتیجه کاهش بیان آن باشد همچنین درج در محل نامناسب و انتقال ناقص یا T-DNA rearrangement نیز می‌تواند از سایر عوامل دخیل در بیان نشدن ژن خارجی درج شده باشد. گیاه کاهو به دلیل زیست‌توده بالا و مصرف بدون فرآوری می‌تواند برای استفاده به عنوان واکسن خوراکی گزینه مناسبی باشد. بیان پپتید CTB-EX4 در گیاه کاهو تراریخت حاکی از توانایی آن برای تولید پروتئین‌های خارجی است با اینحال بررسی تاثیر این پپتید نیازمند آزمایش‌هایی روی حیوانات آزمایشگاهی است.

سپاسگزاری

لازم است از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بابت تامین اعتبار طرح با کد 95849683 و امکانات لازم برای انجام کار سپاسگزاری شود. از آقای دکتر حسین هنری بابت تهیه آنتی بادی CTB-EX4 کمال تشکر و قدردانی می‌شود. در ضمن از خانم شهیدی کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان بابت کمک در اجرا، قدردانی می‌شود. این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد.

منابع

- Akter, S., Afrin, S., Kim, J., Kang, J., Razzak, M. A., Berggren, P. O., & Hwang, I. (2022). Production of active Exendin-4 in *Nicotiana benthamiana* and its application in treatment of type-2 diabetics. *Frontiers in plant science*, 13, 1062658. doi.org/10.3389/fpls.2022.1062658.
- Banerjee, S., Salunkhe, S. S., Apte-Deshpande, A. D., Mandi, N. S., Mandal, G., & Padmanabhan, S. (2009). Over-expression of proteins using a modified pBAD24 vector in *E. coli* expression system. *Biotechnology letters*, 31, 1031-1036. doi.org/10.1007/s10529-009-9976-6.
- Choi, J., Diao, H., Feng, Z. C., Lau, A., Wang, R., Jevnikar, A. M., & Ma, S. (2014). A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. *Plant biotechnology journal*, 12(4), 425-435. doi.org/10.1111/pbi.12149.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science*, 6(5), 219-226. doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7.
- Del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein

در صورتی که قطعه‌ی پروتئینی مورد نظر در گیاهان شاهد غیرتراریخت مشاهده نشد. همچنین باند پروتئین مورد نظر در آزمون وسترن‌بلات بر روی کاغذ نیتروسلولزی در این محدوده مشاهده گردید. با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی در سوبسترای کیت ECL در اتاق تاریک عکاسی باندهای اختصاصی پروتئین CTB-EX4 رویت گردیدند. عواملی از جمله تعداد نسخه‌های منتقل شده و جایگاه قرار گرفتن آنان در ژنوم، توالی‌های استفاده شده در وکتور و خاموشی RNA در میزان تولید پروتئین نقش دارند.

نتیجه گیری کلی

نتایج بررسی انتقال ژن CTB-EX4 به گیاه کاهو با استفاده از PCR و همچنین بررسی های ریل تایم PCR برای تعیین تعداد نسخه ترانسژن وارد شده حاکی از انتقال ژن CTB-EX4 توسط آگروباکتریوم و بیان ژن مورد نظر در سطح RNA و پروتئین موفقیت آمیز بود. رخداد ۱۰۵ با ۱ نسخه درج شده دارای بیشترین بیان هم در سطح RNA و هم در سطح پروتئین بود که می‌تواند حاکی از درج ژن در ناحیه یوکروماتینی باشد. رخداد ۱۰۱ با بیشترین تعداد نسخه درج شده داری کمترین مقدار بیان در سطوح RNA و پروتئین بود. به نظر می‌رسد انتقال تعداد نسخه

extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459-477. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040.

Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., De Capdeville, G., & Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 55(2), 187-193. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01342.x

Gao, S., & Wu, J. (2022). Detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) infection in plants using DAS-ELISA and dot-ELISA. *Plant Virology: Methods and Protocols*, 253-261. doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6_24.

Hobbs, S. L., Kpodar, P., & DeLong, C. M. (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant molecular biology*, 15, 851-864. doi:10.1007/bf00039425

He, X., Yang, J., Ji, M., Chen, Y., Chen, Y., Li, H., & Wang, H. (2022). A potential delivery system based on cholera toxin: A macromolecule carrier with multiple activities. *Journal of*

- Controlled Release, 343, 551-563. doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.050.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in plant science, 7(5), 193-195. doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3.
- King, M. R., Anderson, N. J., Deciu, M., Guernsey, L. S., Cundiff, M., Hajizadeh, S., & Jolival, C. G. (2020). Insulin deficiency, but not resistance, exaggerates cognitive deficits in transgenic mice expressing human amyloid and tau proteins. Reversal by Exendin-4 treatment. Journal of neuroscience research, 98(11), 2357-2369. doi.org/10.1002/jnr.24706.
- Koh, R. B. L., Barbosa, C. F. C., Aquino, V. M., & Galvez, L. C. (2021). Extraction of high molecular weight DNA suitable for next-generation sequencing from the fiber crop abaca. Industrial Crops and Products, 161, 113194. doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113194.
- Kokei, S., & Bahramnejad, B. (2020). Transient Expression of CTB-Exendin Fused Genes in *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Agricultural Science and Technology, 22(6), 1603-1612. doi.org/20.1001.1.16807073.2020.22.6.1.7.
- Kolb, H., & Burkart, V. (2019). Chaperones may cause the focus of diabetes autoimmunity on distinct (pro) insulin peptides. Journal of Autoimmunity, 105, 102304. doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102304.
- Kumar, R., Angelini, S., & Hemminki, K. (2003). Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. Oncogene, 22(58), 9217-9224. doi.org/10.1038/sj.onc.1206909.
- Kwon, K. C., Nityanandam, R., New, J. S., & Daniell, H. (2013). Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC 6 cells. Plant biotechnology journal, 11(1), 77-86. doi.org/10.1111/pbi.12008.
- Kwon, K. C., Sherman, A., Chang, W. J., Kamesh, A., Biswas, M., Herzog, R. W., & Daniell, H. (2018). Expression and assembly of largest foreign protein in chloroplasts: oral delivery of human FVIII made in lettuce chloroplasts robustly suppresses inhibitor formation in haemophilia A mice. Plant biotechnology journal, 16(6), 1148-1160. doi.org/10.1111/pbi.12859.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. methods, 25(4), 402-408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.
- McCabe, M. S., Garratt, L. C., Schepers, F., Jordi, W. J., Stoop, G. M., Davelaar, E., ... & Davey, M. R. (2001). Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. Plant Physiology, 127(2), 505-516. doi.org/10.1104/pp.010244.
- Zandinava, N., Bahramnejad, B., & Salehi, H. (2024). Specific expression of exendin-4 gene fused to cholera B toxin subunit (CTB) in carrot root (*Daucus carota* L.) under regulation of MLL promoter. Agricultural Biotechnology Journal, 16(1), 87-114. doi: 10.22103/jab.2023.21290.1473
- Patil, S. T., Kadam, U. S., Mane, M. S., Mahale, D. M., & Dhekale, J. S. (2020). Hydroponic growth media (substrate): a review. International Research Journal of Pure and Applied Chemistry, 21(23), 106-113. doi.org/10.9734/IRJPAC/2020/v21i2330307.
- Pepe, M., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). Machine learning-mediated development and optimization of disinfection protocol and scarification method for improved in vitro germination of cannabis seeds. Plants, 10(11), 2397. doi.org/10.3390/plants10112397
- Pérez-Martínez, L., Öztürk, M., Butter, F., & Luke, B. (2020). Npl3 stabilizes R-loops at telomeres to prevent accelerated replicative senescence. EMBO reports, 21(3), e49087. doi.org/10.15252/embr.201949087.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29(9), e45-e45. doi.org/10.1093/nar/29.9.e45.
- Riva, V., Patania, G., Riva, F., Vergani, L., Crotti, E., & Mapelli, F. (2022). Acinetobacter baylyi strain BD413 can acquire an antibiotic resistance gene by natural transformation on lettuce phylloplane and enter the endosphere. Antibiotics, 11(9), 1231. doi.org/10.3390/antibiotics11091231.
- Rukavtsova, E. B., Abramikhina, T. V., Shulga, N. Y., Bykov, V. A., & Bur'yanov, Y. I. (2007). Tissue specific expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic plant cells and tissue culture. Russian Journal of Plant Physiology, 54, 770-775. doi.org/10.1134/S1021443707060088.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. Cold Spring Harbor Protocols, 2006(1), pdb-prot3932. doi:10.1101/pdb.prot3932.
- Sharma, S., Gautam, N., Thakur, A. K., & Srivastava, D. K. (2023). Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) harboring chitinase gene expressed resistance against a devastating fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. Vegetos, 36(4), 1265-1274. doi.org/10.1007/s42535-022-00519-8.
- Tellmann, G., & Geulen, O. (2006). LightCycler® 480 Real-Time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. BIOCHEMICA-MANNHEIM-, 4, 16.
- Torres, A. C., Cantliffe, D. J., Laughner, B., Bienick, M., Nagata, R., Ashraf, M., & Ferl, R. J. (1993). Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34, 279-285. doi.org/10.1007/BF00029717.
- Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2002). Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. Plant cell, tissue and organ culture, 68, 103-104. doi.org/10.1023/A:1012966218478.
- Yang, G., Cao, B., Yang, Y., Geng, Y., Lin, H., Jiang, J., ... & Li, J. (2020). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of JY09 in healthy Chinese subjects: A titrating, dose-escalating study. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 58(11), 608. doi.org/10.5414/cp203730.