طراحی، ساخت و تأیید مولکولی سازهٔ جفتی بیان‌کنندهٔ ژن *MaSp1* و بیان گذرای آن در الیاف پنبه

مریم بهنام[۱]، سیدجواد داورپناه[۲*] و رامین کریمیان[۲]

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳/ چاپ: ۱۳۹۵/۹/۳۰

[۱]گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم‌کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران شرق، ایران
[۲]مرکز تحقیقات زیست‌فناوری‌کاربردی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران
[*]مسئول مکاتبات: davarpanah@bmsu.ac.ir

چکیده. پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) از محصولات مهم زراعی دنیا است و افزایش کیفیت الیاف آن از اهمیت فراوانی در صنایع نساجی برخوردار است. رشته‌های تار عنکبوت محکم‌ترین و کشسان‌ترین الیاف شناخته شده در طبیعت است. بدین جهت سازه‌ای طراحی گردید تا با بیان ویژه پروتئین تار عنکبوت در الیاف پنبه منجر به افزایش کیفیت آن جهت ریسندگی شود. پس از سنتز سازهٔ موردنظر که ترکیبی از پروموتر ویژهٔ بیان در فیبر پنبه RD22-like1، توالی کوزاک مانند در گیاهان و توالی مصنوعی براساس ژن (*MaSp1*) *Lh* Major ampullate Spidroin1 بود، پلاسمید مورد نظر توسط دو آنزیم EcoRI و NheI برش دوگانه داده شد و پس از استخراج قطعهٔ موردنظر بین جایگاه‌های برش EcoRI و NheI دروکتور باینری pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. پس از تراریختی *E.coli* DH5 α توسط این پلاسمید و استخراج آن، پلاسمید جدید pCSP نام‌گذاری شد. با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط پرایمر اختصاصی ژن مورد نظر و ژن مقاومت به هیگرومایسین و همچنین برش آنزیمی دوگانه صحت واکنش اتصال به تأیید رسید. پس از تراریختی *Agrobacterium tumefaciens LBA4404* توسط pCSP، صحت تراریختی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تأیید گردید. سپس تخمک پنبه رقم ورامین توسط آن تراریخته شد و با اثبات بیان ژن *MaSp1* در تخمک و الیاف پنبه در محیط در شیشه مشخص‌شد پروموتر GaRDL1 که متعلق به گونهٔ دیگری از پنبه است به‌خوبی توان کنترل بیان ژن مورد نظر در الیاف پنبه را دارد و توالی ژن سنتزی بدون بهینه‌سازی کدون در الیاف پنبه قابل بیان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی. اسپایدروین، تخمک، تراریختی، برش دوگانه، پروموتر

Designing and cloning a *MaSp1*-based synthetic gene in binary vector for transient expression in cotton fiber

Maryam Behnam[1], Seyed Javad Davarpanah[2*] & Ramin Karimian[2]

Received 08.11.2015/ Accepted 12.06.2016/ Published 20.12.2016

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Payam Nour University, Tehran, Iran
[2]Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[*]Correspondent author: davarpanah@bmsu.ac.ir

Abstract. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is an important crop in the world and increasing its fiber quality is very crucial for textile industries. Spider silk is the strongest and most elastic fiber ever known in the nature. Cotton is one of the main crops in the world and increasing its fiber quality is very important for textile industries. In this regard, a synthetic construct has been designed to offer spider silk quality to cotton fibers by fiber-specific expression of Major ampullate spidroin1 (*MaSp1*) gene under control of core sequence of GaRD22-like1 promoter. The synthetic construct was double digested by the EcoRI and NheI and sub-cloned in pCAMBIA1304 binary vector. *E.coli* DH5α was transformed using new plasmid namely pCSP. Ligation and intact backbone of plasmid was conformed using *MaSp1* and hygromycin re-sistance genes specific primers and finally with EcoRI/NheI double digestion. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 was transformed with pCSP to transform cotton ovules of Varamin cultivar. The expression of MaSp1 in cotton ovules and fibers showed that this synthetic sequence had been successfully expressed under control of GaRDL1 core promoter and this construct without codon optimization could be used for cotton transformation and its fiber quality manipulation.

Keywords. spidroin, ovule, transformation, double digestion, promoter

مقدمه

پنبه *Gossypium hirsutum* L. از مهم‌ترین محصولات زراعی فیبری در جهان است (Memon *et al.*, 2010). رشته‌های پنبه نه‌تنها ازلحاظ اقتصادی اهمیت دارند بلکه یک مدل تجربی خوب برای بررسی طویل‌شدن یاخته‌های گیاهی و بیوسنتز دیوارهٔ یاخته

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]

ای هستند و ازآنجاکه فیبر بیش‌از ۹۰٪ ارزش پنبه را فراهم می‌کند، کیفیت فیبر و توسعهٔ ژنتیکی بازده فیبر، هدف مهمی در بیوتکنولوژی فیبر می‌باشند (Kim *et al.*, 2002). کرک‌های گیاه پنبه بیشترین فیبرهای مورد استفاده در طبیعت هستند (Wang *et al.*, 2004). بخش عمدهٔ کرک‌های گیاهی چندیاخته‌ای هستند اما پنبه کرک‌های تک‌یاخته‌ای که دارای اهمیت اقتصادی هستند را تولید می‌کند. بهبود فیبرهای پنبه به‌عنوان وسیله‌ای برای اندازه‌گیری بیوسنتز سلولز در طول اصلاح دیوارهٔ ثانویه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Arpat *et al.*, 2004). پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی، پژوهشگران را قادر به تراریختی ژنتیکی گونه‌های زیادی از گیاهان کرده‌است (Umbeck *et al.*, 1987) و گیاهان گوناگونی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید محصولات تراریختهٔ مختلف و به‌عنوان سیستم ارزان و مؤثر برای تولید پروتئین‌های رشته‌ای چون کلاژن، الاستین و پروتئین تار عنکبوت استفاده شده‌اند (Gutiérrez *et al.*, 2013; Foo & Kaplan, 2002; Scheller *et al.*, 2001). در این راستا توسعهٔ سریع فناوری تراریختی پنبه نه‌تنها روش ارزشمندی برای انتقال ژن‌های مفید به پنبه برای توسعهٔ اهداف آگرونومیک مهم را فراهم می‌آورد، بلکه کمک شایانی در بررسی عمل و تنظیم ژنی می‌کند (Keshamma *et al.*, 2008).

پروتئین‌های تار عنکبوت به‌عنوان یک مادهٔ خام برای تولید فیبرها و تراشه‌ها و در تکنولوژی پزشکی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در صنایع نساجی قابلیت انعطاف و وزن کم پارچه‌ها بااستفاده از این پروتئین حاصل می‌شود (Scheller *et al.*, 2001). تار عنکبوت یک مدل عالی از پروتئین‌های فیبری زیستی است که ساختار سلسله مراتبی دارد و با پیوندهای ضعیف هیدروژنی در مرکز در تنظیم رفتار رشته در پاسخ به تغییرات طولی تار عنکبوت نقش دارد (Tarakanova & Buehler, 2012)، همچنین حاوی پروتئین‌های بسیار متفاوت است که دارای تنها سه موتیف می‌باشند که به‌صورت مشابه بارها تکرار می‌شوند و توسط غده‌های فلاژلیفرم ترشح می‌شوند که موجب شکل‌گیری یک جزء عمده از رشته‌های الاستیکی از مارپیچ‌های شبکهٔ عنکبوتی می‌شود (Vollrath & Knight, 2001). تار عنکبوت حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای‌آمینه آلانین و گلایسین است (Schel-ler *et al.*, 2001). بزرگ‌ترین موتیف‌های پروتئینی رشتهٔ تار عنکبوت (Gly-Pro - Gly - Gly- x)n است که می‌توانند موجب شکل‌گیری مارپیچی شود که در تعداد زیادی از صفحات بتا به‌صورت انتها به انتها منظم شده‌اند (Vollrath & Knight, 2001). پروتئین آمپولی بزرگ (MaSp1) یادآور خشت‌های کوپلیمری است که از کشش پلی آلانین و دیگر (GGx) ها با (GPGxx) ها (x به صورت تیپیک شامل پرولین، تریپتوفان یا لوسین می‌باشد) تشکیل شده‌است که با دو بخش بسیار حفظ شدهٔ غیرتکراری C و N ترمینال احاطه می‌شود (Motriuk-Smith *et al.*, 2005; Rising *et al.*, 2006).

تاکنون ژن اسپایدروین درگیاهانی چون انواع توتون و سیب زمینی بیان شده است و کیفیت و کمیت بیان پروتئین تار عنکبوت و خواص آن مورد بررسی قرار گرفته‌است (Hauptmann *et al.*, 2013; Menassa *et al.*, 2004; Piruzian *et al.*, 2003; Scheller *et al.*, 2001) . تولید الیاف پنبه با کیفیت بهتر جهت ریسندگی بااستفاده از خواص تار عنکبوت می‌تواند طرحی راه‌گشا در صنایع نساجی باشد. انتظار می‌رود الیاف، خواص تار عنکبوت ازجمله کشسانی و تحمل تنش کششی را داشته باشند، در این‌صورت می‌توان به‌راحتی الیاف پنبه تراریخت را در ریسندگی و صنایع وابسته به‌کار برد. برخی پروتئین‌های فیبر منحصر به‌فردند و به‌طور مشابه در توسعهٔ ویژگی‌های پنبه نقش دارند. شروع فیبر-شدن نیازمند ترجمه است و بنابراین فاکتورهای ترجمه در آغاز فیبری‌شدن نقش مهمی دارند (John & Crow, 1992). دو عامل ترجمه در پنبه به نام‌های GaMYB2/fiber factor (F/F1) و GHHOX3 قادر به فعال‌نمودن پروموتر ویژه RD22-like1 (RDL1) می باشند (Wang *et al.* 2004). جهت بهبود کیفیت و انتقال صفات مؤثر رشتهٔ تار عنکبوت به گیاه پنبه، بعد از سنتز پروتئین موردنظر از توالی MaSp1 که مسؤول کشسانی و مقاومت تنشی بالای رشته‌های تار عنکبوت بیوه سیاه *Latrodectus hesperus* می‌باشد، پروموتر RDL1 که بیان ویژه در الیاف را در گونه*Gossypium arboreum* در یاخته‌های فیبر در حال نمو هدایت می‌کند (Wang *et al.*, 2004) به ابتدای ژن مورد نظر افزوده شد. تا آنجا که می‌دانیم برای نخستین‌بار است که این توالی سنتزی جهت تراریختی پنبه مورد استفاده قرار گرفته‌است و تنها در یک مورد پروتئین تارکرم ابریشم جهت تغییر کیفیت الیاف، در

الیاف پنبه بیان ویژه شده‌است (Li *et al.*, 2009). براین‌اساس در این پژوهش سازه‌ای طراحی شد تا با بیان فیبر-ویژه اسپایدروین در الیاف پنبه بتواند کیفیت الیاف پنبه را بهبود بخشد.

مواد و روش‌ها

طراحی مجموعه ژنی و سنتز آن

سازه‌ای به طول ۷۲۲ نوکلئوتید طراحی شد که دارای بخش‌هایی به این شرح می‌باشد: جایگاه برش EcoRI در ابتدای '۵، پروموتر ویژهٔ بیان در فیبر پنبه *Ga*RDL1 که پروموتر هسته‌ای آن به طول ۳۰۲ نوکلئوتید جهت کنترل بیان فیبر ویژهٔ پروتئین تار عنکبوت برگزیده‌شد (Wang *et al.*, 2004)، جایگاه برش HindIII، توالی حفاظت‌شدهٔ کوزاک‌مانند در گیاهان، توالی برگزیده از ژن کدکنندهٔ پروتئین MaSp1 *Lh* به طول ۳۹۰ نوکلئوتید که براساس توالی کامل ژن *Lh masp1* طراحی شد (Ayoub *et al.*, 2007)، جایگاه برشNheI و جایگاه برش NcoI در انتهای '۳ (شکل ۱). توالی سازهٔ طراحی شده در بانک ژن NCBI به شمارهٔ دسترسی KP026918 ذخیره شد و سنتز و همسانه‌سازی آن در وکتور pUC57 توسط شرکت ShineGene Molecular Biotech,Inc. کشور چین انجام شد.

پرایمرهای اختصاصی قطعه ژنی MaSp1 و ژن مقاومت به هیگرومایسین به کمک نرم افزار Oligo7، BioEdit 7.0.5.3 و سایت NCBI طراحی شد و سپس توسط شرکت سیناکلون، ایران سنتز شد.

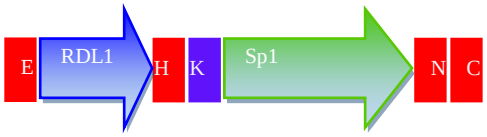
ساخت سازهٔ بیانی با بازهمسانه‌سازی مجموعهٔ ژنی از وکتور pUC57 به وکتور جفتی pCAMBIA1304

پس از تراریختی *E.coli* DH5α توسط پلاسمید حاوی سازهٔ سنتزی به‌وسیلهٔ دستگاه الکتروپوراتور Bio-Rad, Gene Pulser Xcell™ modular electroporation systems, گزینش کلنی‌های تراریخت برروی محیط جامد Lysogeny Broth (LB) حاوی ۵۰ mgL^{-1} کانامایسین انجام گرفت. پس از کشت تک‌کلنی در طول شب در ۳ میلی‌لیتر محیط مایع LB حاوی ۵۰ mgL^{-1} کانامایسین، استخراج پلاسمید به‌روش لیز قلیایی انجام گرفت (Maniatis *et al.*, 1984). برای انجام فرآیند همسانه سازی ابتدا پلاسمید استخراج‌شده با دو آنزیم NheI و EcoRI برش داده‌شد. برای این کار پلاسمید تخلیص‌شدهٔ pUC57-MaSp1+ با OD=۳/۵ به ۴۱ میکرولیترآب مقطر دوبار تقطیر اضافه گردید. آنزیم‌های EcoRI و NheI هر کدام ۱ میکرولیتر نیز به ویال اضافه شده، حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر درنظر گرفته شد. سپس به‌مدت ۵ ساعت در ۳۷°C انکوبه گردید. سپس محصول هضم دوگانهٔ آنزیمی در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X ران شد (۵۰ ولت، ۱ ساعت). پس از اتمام فرآیند الکتروفورز و جداسازی قطعهٔ برش خورده شده به اندازهٔ ۷۱۵bp از ژل، توسط کیت خالص‌سازی ژل (Bioneer) تخلیص شد. جهت تهیهٔ وکتور خطی برای اتصال قطعهٔ تخلیص‌شده Sp1، وکتور pCAMBIA 1304 با OD=۳ توسط آنزیم‌های EcoRI و NheI برش داده‌شد. به میزان ۹-۱۰$ngµl^{-1}$ از پلاسمید pCAMBIA 1304 اضافه شد و آنزیم‌های EcoRI و NheI هرکدام ۱ میکرولیتر به ویال با حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر اضافه‌گردید و سپس به‌مدت ۵ ساعت در ۳۷°C نگهداری شد. محصول برش در ژل آگارز الکتروفورز ۰/۸٪ ران شد. پس از انجام فرآیند الکتروفورز قطعهٔ ۶۳۷۹ bp از ژل برش داده شد و خالص‌سازی گردید.

فرایند واکنش اتصال

پس از برش و تخلیص قطعات موردنظر، فرآیناتصال وکتور خطی شده pCAMBIA1304 و سازهٔ دارای Sp1 به‌شرح زیر انجام شد. نسبت وکتور خطی شدهٔ ۶۳۷۹ bp به قطعهٔ ۷۱۵ bp Sp1، ۸/۹ بود. پس از تخلیص دو قطعهٔ موردنظر از ژل برای اتجام فرآیند چسباندن، غلظت دو قطعهٔ تخلیص‌شده با دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) تعیین شد. غلظت وکتور خطی شده، ۲$ngµl^{-1}$ بود. برای فرآیند اتصال میزان ۳۰ ng مورد نیاز بود که باتوجه به غلظت ذکرشده ۱۵ میکرولیتر از این وکتور خطی‌شده برای انجام فرآیند اتصال موردنیاز بود. غلظت قطعهٔ تخلیص شده Sp1، با دستگاه نانو دراپ ۵ $ngµl^{-1}$ تعیین شد. با توجه به نسبت وکتور به اینزرت که برابر با ۸/۹ بود، حجم مورد نیاز Sp1 ۰/۷ میکرولیتر محاسبه گردید. مقادیر محاسبه شده به ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر اضافه‌شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۵°C انکوبه شد. سپس آنزیم T4 لیگاز به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر و بافر اتصال ۱۰x به ویال حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی محلول واکنش افزوده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۲°C نگه‌داری شد. برای انجام فرآیند نهایی، واکنش اتصال یک‌شب در دمای ۹°C-

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



شکل ۱- ساختار سازهٔ سنتزی دارای ژن مصنوعی اسپایدروین. (**E:** جایگاه برش EcoRI در ابتدای '۵، **RDL1:** پروموتر ویژه بیان در فیبر پنبه *Ga*RDL1، **H:** جایگاه برش HindIII، **K:** توالی حفاظت شده کوزاک-مانند در گیاهان، **Sp1:** توالی برگزیده از ژن کدکنندهٔ پروتئین MaSp1 *Lh*،**N:** جایگاه برش NheI، **C:** جایگاه برش NcoI در انتهای '۳).

Fig. 1. Structure of synthetic construct containing spidroin sequence. (**E:** EcoRI restriction site, **RDL1:** fiber- specific core promoter of *Ga*RDL1, **H:** HindIII restriction site, **K:** conserved kozak–like sequence in plants, **Sp1:** selected sequence of *Lh MaSp1* gene, **N:** NheI restriction site, **C:** NcoI restriction site).

قرار داده شد.

تراریختی باکتری *E.coli* با محصول واکنش اتصال به‌روش تکانهٔ گرمایی

محصول واکنش اتصال در باکتری *E.coli* سویهٔ DH5α تراریخت شد. پس از تهیهٔ یاختهٔ پذیرا از باکتری ذکرشده ۱۰۰میکرولیتر از یاختهٔ پذیرا در ویال ۱/۵ میلی‌لیتر روی یخ قرار داده شد. میزان ۸۰ نانوگرم از محصول فرایند اتصال به یاختهٔ پذیرا اضافه شد و ۱۰ دقیقه روی یخ نگه‌داشته شد. سپس به‌سرعت ویال به‌مدت ۹۰ ثانیه به دمای ۴۲°C انتقال داده و سریعاً به‌مدت ۵ دقیقه به روی یخ منتقل گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به ویال اضافه شده و به‌مدت دوساعت در ۳۷°C با ۱۵۰ rpm اینکوبه شد. پس‌از دو ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط سانتریفیوژ شده بر روی محیط LB جامد حاوی کاناماسین $20 mgL^{-1}$ کشت داده و در طی شب در دمای ۳۷°C اینکوبه شد. سپس از کلنی‌های رشد-کرده کشت مایع در محیط LB مایع دارای کاناماسین $50 mgL^{-1}$ رشد داده شد.

تأیید مولکولی کلنی‌های نوترکیب

برای تأیید صحت فرآیند واکنش اتصال، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر که برای قطعهٔ ۴۰۰ جفت بازی MaSp1 سنتزی طراحی شده‌بود، انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) ۵ دقیقه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته سازی اولیه) و ۳۲ چرخه با برنامهٔ ۳۰ ثانیه ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای اتصال)، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای بسط بهینهٔ آنزیم پلیمراز) و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد (بسط نهایی) انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر، بافر واکنش x ۱۰ ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۰/۷۵میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی سنتزی با توالی spF:5'-ctatccatgggaggtg-caggtcaa-3' و spR:5'- atatgctagcggctgctgctgctg-3' هرکدام ۱۰ pmol از کشت مایع کلنی‌های تراریخت‌شده با محصول واکنش اتصال به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر و در آخر آنزیم پلیمراز PrimeTaq (GeNetBio)به‌میزان ۰/۲۵ میکرولیتر به ویال اضافه گردید. همچنین برای تأیید صحت انجام واکنش اتصال و انتقال کل T-DNA وکتور واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط پرایمرهای اختصاصی برای ژن مقاومت به هیگرومایسین HygF- ctcggagggcgaagaatctc و HygR-catatacgcccggagtcg-tg صورت گرفت. ۵ دقیقه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه) و ۳۰ چرخه با برنامهٔ ۳۰ ثانیه ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای اتصال)، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای بسط بهینهٔ آنزیم پلیمراز) و در-نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد (بسط نهایی) انجام شد. حجم و میزان مواد واکنش مطابق واکنش بالا با پرایمرهای اختصاصی ژن مقاومت به هیگرومایسین صورت‌گرفت. پس از انجام فرآیند PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۰/۸٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد.

هضم آنزیمی پلاسمید pCSP

پس‌از استخراج پلاسمید جدید، pCSP نام‌گذاری شد. جهت تأیید نهایی انجام واکنش اتصال، پلاسمید خالص هضم آنزیمی شد. ۴ نانوگرم از پلاسمید pCSP با ۱ میکرولیتر از آنزیم‌های NheI و EcoRI و ۲ میکرولیتر از Green 10x buffer fast (Thermo Scientific) و ۶ میکرولیتر آب‌مقطر استریل مخلوط شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت نگه‌داری شد

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]

و محصول هضم آنزیمی در ژل آگارز ۰/۸٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ران شد.

تراریختی آگروباکتریوم توسط پلاسمید pCSP

صدمیکرولیتر یاختهٔ پذیرای *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط ۱ میکروگرم پلاسمید pCSP به‌روش تکانهٔ گرمایی تراریخته شد. پس از رشد کلنی‌ها برروی محیط جامد YEP دارای $50 mgL^{-1}$ کانامایسین پس از دو روز در دمای $28^{\circ}C$ تک کلنی‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط مایع YEP دارای $50 mgL^{-1}$ کانامایسین، دمای $28^{\circ}C$، ۱۹۰ دور در دقیقه در طی شب اینکوبه شد. جهت تأیید تراریختی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق شرایطی که پیشتر گفته‌شد انجام گرفت.

تراریختی تخمک

بذر پنبه زراعی رقم ورامین که از ایستگاه تحقیقات پنبه ورامین خریداری شده بود با استفاده از اسیدسولفوریک غلیظ دلینته شد و پس از شست‌وشوی فراوان با آب در مخلوطی از کوکوپیت و پیت‌ماس در گلدان در گل‌خانهٔ تحقیقاتی مرکز بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله کشت شد تا گیاهان پنبه به مرحلهٔ گل‌دهی برسند. یک روز پس از گل‌دهی (1DPA) گل‌ها جدا شدند و تخمدان‌ها پس از استریل‌شدن در اتانول و عبور از روی شعله، از محل برچه‌ها شکافته شدند و تخمک‌ها جدا شده، در محیط نمک‌های پایه موراشیگ-اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962)، ساکاروز $6 gL^{-1}$، گلوکز $14 gL^{-1}$، نفتالن استیک‌اسید (NAA) ۵ میکرومولار، اسیدژیبرلیک (GA_3) ۰/۵میکرومولار، ۰/۴٪آگار به‌مدت ۵ روز در تاریکی و $30^{\circ}C$ کشت شدند. همچنین تخمک‌ها ۹ روز پس از گل‌دهی (9DPA) مستقیماً برای تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند.

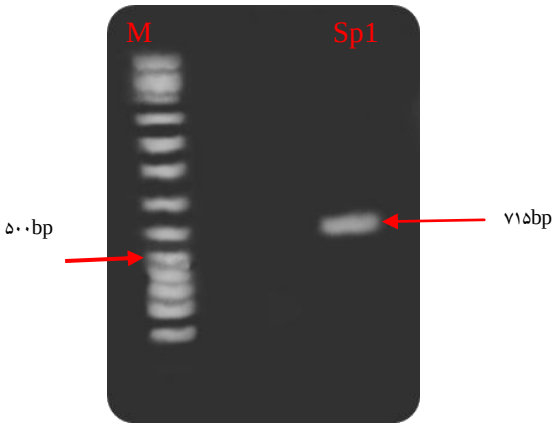
جهت تراریختی ابتدا باکتری *Agrobacteriu tumefaciens* LBA4404 دارای پلاسمید pCSP یا pCAMBIA 1304 و در طول شب در محیط مایع YEP دارای $50 mgL^{-1}$ کانامایسین کشت شدند تا به OD_{600}=۱ برسد و پس از سانتریفوژ در محیط اینفیلتراسیون معلق‌شد تا OD_{600}=۰/۳ بدهد. محیط اینفیلتراسیون حاوی نمک‌های پایه موراشیگ-اسکوگ، ویتامین‌های محیط موراشیگ-اسکوگ، ساکاروز $5 gL^{-1}$، گلوکز $1/8 gL^{-1}$، استوسیرینگون ۱۰۰ میکرومولار، IGEPAL® ۰/۰۰۱٪ می‌باشد. تخمک‌ها در محیط اینفیلتراسیون تحت خلاء ۲۰۰ mmHg به‌مدت ۱۰ دقیقه تراریخته شدند. پس از تراریختی تخمک‌ها در محیط‌کشت قبلی دارای $70 mgL^{-1}$ سفوتاکسیم و بدون آگار کشت شدند.

جهت تأیید صحت روش تراریختی پس‌از یک‌هفته بااستفاده از لامپ فرابنفش بیان گذرای ژن *gfp* در فیبر و تخمک مورد بررسی قرار گرفت. یک‌ماه پس‌از کشت در شرایط مایع، تخمک‌ها و فیبرها بااستفاده از نیتروژن مایع و هاون آسیاب شدند و RNA آن بااستفاده از روش لیتیم‌کلراید استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با الکتروفورز در بافر ۰/۵X TBE و نانودراپ تعیین شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (-DNA Technology) ساخته‌شد و بااستفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *masp1* سنتزی PCR با استفاده از ۲/۵ 10x PCR buffer میکرولیتر، dNTP mixture ۲ میکرولیتر، DMSO ۱ میکرولیتر، هر پرایمر هر کدام ۱۰ pmol، cDNA ۲ میکرولیتر، Taq DNA polymerase ۰/۵ میکرولیتر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و طبق شرایطی که پیشتر گفته شد انجام گرفت.

نتایج و بحث

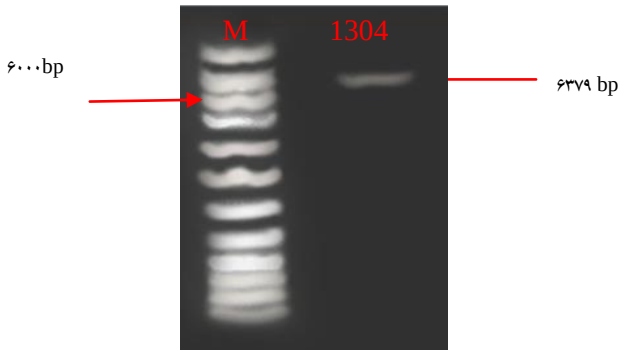
سازهٔ سنتزشده ترکیبی از هستهٔ پروموتر GaRDL-1 به طول ۳۰۲ bp است که بیان فیبر ویژه RDL-1 را ۳-۱۲ روز پس از گرده افشانی در شرایط در زیوه تحت کنترل خود دارد (Wang *et al.*, 2004) و همچنین توالی سنتزی براساس ژن *MaSp1* به طول ۳۹۰ bp که در ساختار تار عنکبوت نقشی اساسی دارد (Ayoub *et al.*, 2007) که در دو انتها توسط جایگاه برش آنزیم‌های EcoRI و NheI احاطه شده است (شکل ۱). از برش آنزیمی دوگانه این سازه و خالص‌سازی آن قطعه‌ای حدود ۷۱۵bp به‌دست‌آمد (شکل ۲). پس از برش وکتور pCAMBIA1304 توسط این دو آنزیم قطعهٔ به‌دست آمده به طول ۶۳۷۹bp که شامل سازهٔ اصلی وکتور دارای بخش T-DNA و ژن مقاومت به کانامایسین توسط باکتری حامل بود (شکل ۳) توسط فرایند اتصال به سازه مورد نظر متصل شد. ازآنجاکه سازهٔ وکتور جدید با نام pCSP دارای هر دو ژن اسپایدروین و ژن مقاومت به هیگرومایسین بود کلنی‌های تراریختهٔ *E.coli* توسط pCSP که توانسته‌بودند در محیط حاوی کانامایسین رشد کنند توسط پرایمرهای اختصاصی این دو ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی آنها صورت‌گرفت و براساس نتایج

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



شکل ۲- قطعهٔ ۷۱۵bp *MaSp1* جداشده از پلاسمید pUC57 توسط برش آنزیمی دوتایی EcoRI/NheI (**M:** DNA ladder, BioBiz ۱ kb، **Sp1:** قطعهٔ ۷۱۵ bp *MaSp1*).

Fig. 2. 715bp sized *MaSp1* fragment cut from double digested pUC57 plasmid with EcoRI/NheI. (**M:** 1 kb DNA ladder, BioBiz, **Sp1:** 715bp sized *MaSp1* fragment).



شکل ۳- قطعهٔ ۶۳۷۹ bp برش دادهشده از وکتور pCAMBIA 1304 توسط برش آنزیمی دوتایی EcoRI/NheI.

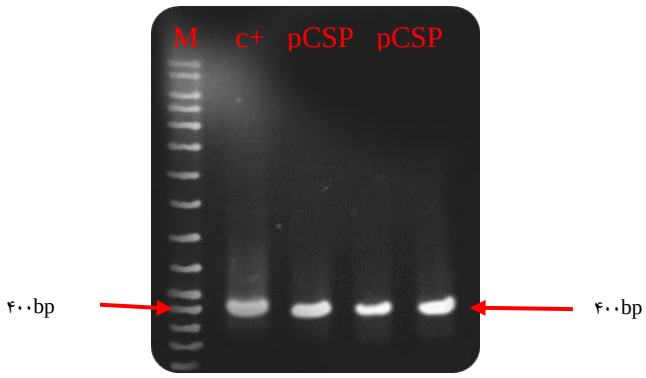
Fig. 3. 6379bp backbone of pCAMBIA1304 double digested with EcoRI/NheI.

واکنش زنجیرهای پلیمراز تأیید شد که ژن موردنظر در وکتور جدید pCSP وجود دارد (شکل ۴). ازطرفی محصول واکنش زنجیرهای پلیمراز با پرایمر ژن مقاومت به هیگرومایسین تأییدکرد که بخش پایهای سازهٔ جدید سالم متصل شدهاست و گزینش گیاهان تراریخته در مراحل بعدی برپایهٔ مقاومت به هیگرومایسین قابلاعتماد میباشد (شکل ۵). بنابراین انتظار میرود pCSP پلاسمیدی کارا جهت تراریختی گیاه و بیان فیبر ویژه پروتئین تارعنکبوت در الیاف گیاهی به ویژه الیاف پنبه باشد.

جهت اطمینان بیشتر از درستی جایگاه اتصال سازهٔ موردنظر پلاسمید pCSP مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که باندهای مشاهده شده در اندازههای مورد نظر ۷۱۵ bp و ۶۳۷۹ bp درستی فرایند اتصال و اطمینان از قرارگیری سازهٔ موردنظر در جایگاه دلخواه را مورد تأیید قرار می دهد (شکل ۶).

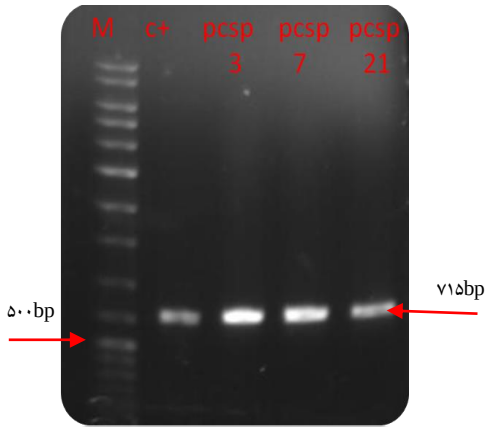
ازآنجا که باکتری *E.coli* توانایی تراریختی گیاه را ندارد باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط pCSP تراریخته شد و جهت اطمینان از تراریختی باکتریهای گزینش شده بر روی آنتی بیوتیک کانامایسین، واکنش زنجیرهای پلیمراز توسط پرایمر اختصاصی ژن *MaSp1* انجام شد که نتایج بهدست آمده تأیید میکند این باکتری حامل پلاسمید pCSP جهت انتقال ژن موردنظر به بافت گیاه می باشد (شکل ۷). در-مجموع باتوجه به نتایج بالا میتوان گفت اکنون تراریختی گیاه به صوت گذرا و دائمی توسط پلاسمید pCSP امکان پذیر می باشد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



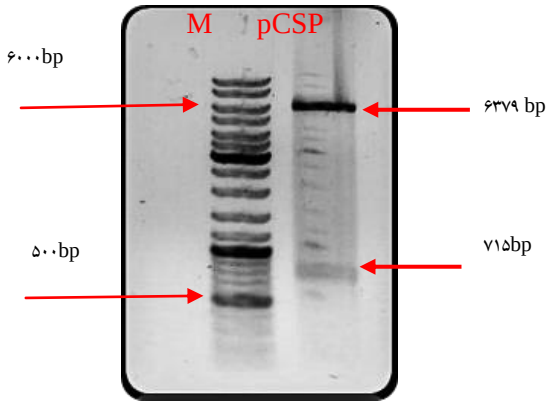
شکل ٤- تأیید فرایند اتصال توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی ژن سنتزی *MaSp1*. (**M:** ۱kb DNA ladder، **c$^+$:** کنترل مثبت، **pCSP:** کلنی‌های *E.coli* رشدکرده روی محیط گزینش).

Fig. 4. Conformation of ligation using PCR with *MaSp*1 specific primers. (**M:** 1kb DNA ladder, **c$^+$**: positive control, **pCSP:** selected *E.coli* colony on selection medium).



شکل ٥- تأیید فرایند اتصال توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی ژن مقاومت به هیگرومایسین. (**M:** ۱kb DNA ladder، **c$^+$:** کنترل مثبت، **pCSP:** کلنی‌های *E.coli* رشدکرده روی محیط گزینش).

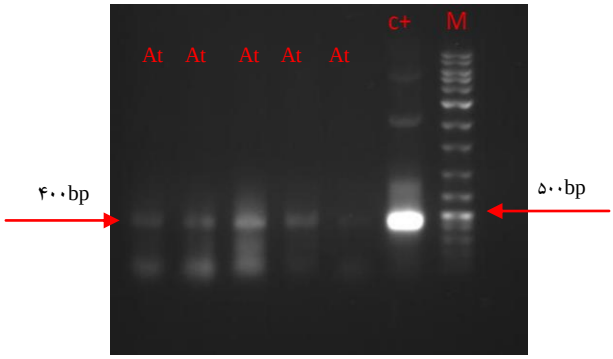
Fig. 5. Conformation of ligation using PCR with specific primers of hygromycin resistance gene. (**M:** 1kb DNA ladder, **c$^+$**: positive control, **pCSP:** selected *E.coli* colony on selection medium).



شکل ٦- تأیید فرایند اتصال توسط برش آنزیمی دوتایی پلاسمید pCSP استخراج شده از باکتری *E.coli* تراریخته توسط EcoR/NheI. (**M:** DNA ۱kb ladder، **pCSP:** پلاسمید استخراج شده از *E.coli*).

Fig. 6. Conformation of ligation using enzymatic double digestion with EcoRI/NheI. (**M:** 1kb DNA ladder, **pCSP**: isolated plasmid from transformed *E.coli* culture).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



شکل ۷- تأیید تراریختی *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 با pCSP توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی ژن سنتزی *MaSp1*.
(**M:** ۱kb DNA ladder، **c$^+$:** کنترل مثبت، **At:** کلنی‌های *Agrobacterium tumefaciens* رشدکرده روی محیط گزینش).

Fig. 7. Conformation of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformation using PCR with *MaSp*1 specific primers. (**M:** 1kb DNA ladder, **c$^+$:** positive control, **At:** selected *Agrobacterium tumefaciens* colony on selection medium).

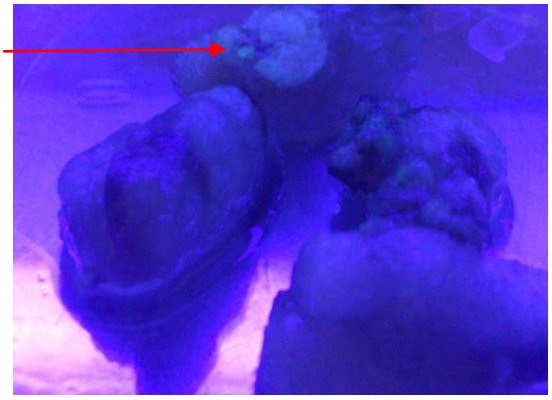
جهت اطمینان از کارایی هر سازه‌ای بهتر است قبل از ورود به فرایند تراریختی دائمی گیاه و تأیید آن، بیان گذرای آن ژن و سازه مورد بررسی قرارگیرد. جهت بهینه‌سازی و اطمینان از کارایی روش برگزیده جهت تراریختی تخمک و فیبر پنبه ابتدا تراریختی توسط آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pCAMBIA1304 دارای ژن *gfp*گرفت. پس از یک‌هفته بیان *GFP* با لامپ فرابنفش دست‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. فلئورسانس مربوط به *GFP* در نواحی مختلف از تخمک به‌ویژه در فیبرهای تازه رشدکرده مشاهده‌شد (شکل ۸). بنابراین با استفاده از این روش، تراریختی تخمک و بیان ژن در الیاف و تخمک امکان‌پذیر می باشد. برداشت تخمک‌های تراریخته توسط پلاسمید pCSP (شکل ۹) و استخراج RNA (شکل ۱۰) و سپس انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط cDNA و پرایمر اختصاصی ژن اسپایدروین نشان داد که تراریختی تخمک و الیاف پنبه با موفقیت انجام گرفته‌است و ژن مورد نظر *MaSp1* تحت‌کنترل پروموتر GaRDL-1 در الیاف پنبه زراعی رقم ورامین به‌خوبی بیان شده است (شکل ۱۱).

تاکنون تلاش‌هایی جهت بیان فیبر-ویژه ژن‌هایی خاص تحت-کنترل پروموترهای فیبر-ویژه به‌منظور بررسی زیست‌شناسی/ فیزیولوژی و یا بهبود کیفیت الیاف انجام گرفته است. بدین‌منظور بیان پروتئین اکستانسین هویچ تحت‌کنترل پروموتر E6 (John & Crow, 1992)، ژن *GUS* تحت‌کنترل پروموتر سلولزسنتاز A4 پنبه، CaMV 35 (Kim *et al.*, 2002)، اکتین پنبه تحت‌کنترل پروموتر GhACT1 (Li *et al.*, 2005)، *GUS* و *GFP* تحت کنترل پروموتر *Gh*SCFP (Hou *et al.*, 2008) مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش پروتئین اسپایدروین *MaSp1* به‌صورت فیبر-ویژه در تخمک و الیاف پنبه رقم ورامین به‌صورت گذرا بیان شد. تا آنجا که می دانیم برای نخستین بار است که بیان اسپایدروین در الیاف پنبه صورت‌می‌گیرد. امیداست در تراریختی دائم پنبه شاهد بهبود ویژگی‌های الیاف پنبه باشیم چرا که در بیان فیبر-ویژه فیبروین ابریشم تحت‌کنترل پروموتر GAE6-3A در الیاف پنبه زراعی مشاهده شد طول و استحکام الیاف افزایش یافته است و همچنین در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره مشخص شد ساختار سطحی فیبر رسیده به‌طرز قابل‌توجهی دچار واپیچش شده‌است و تعداد تاب‌خوردگی رشته‌ها افزایش یافته است. در نتیجه مشخص شد بیان فیبروین باعث بهبود کیفیت الیاف شده است (Li *et al.*, 2009). براین‌اساس انتظار می‌رود در تراریختی الیاف پنبه با اسپایدروین نیز بهبود ویژگی‌های آن مشاهده شود که لازم است در گام بعدی با تراریختی دائم پنبه زراعی توسط پلاسمید pCSP مورد تأیید قرار گیرد.

نتیجه گیری

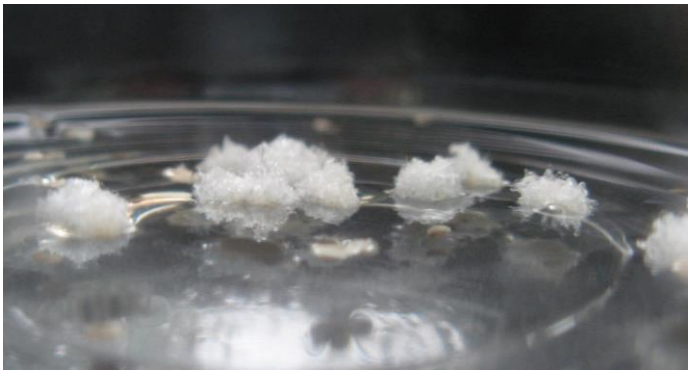
سازه دارای ژن سنتزی *MaSp1* و پروموتر مخصوص فیبر پنبه GaRDL-1 در جایگاه برش آنزیم‌های EcoRI و NheI وکتور pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد و صحت پلاسمید جدید توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیم دوگانه مورد تأیید قرارگرفت. پس از تراریختی باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 توسط این پلاسمید و تأیید آن، تخمک

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



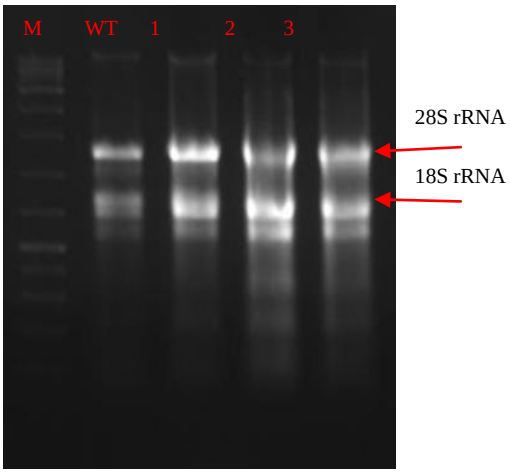
شکل ۸- فلورسانس GFP تحت پرتو فرابنفش در تخمک‌های ۹DPA تراریخته توسط pCAMBIA1304، ۷ روز پس از تراریختی.

Fig. 8. The GFP fluorescence of 9DPA ovules transformed with pCAMBIA1304, 7 days after transformation.



شکل ۹ - تولید فیبر از تخمک‌های تراریخته برروی محیط‌کشت MS،ساکارز gL^{-1} ۶ و گلوکز gL^{-1} ۱۴، NAA5mM، $GA_3$0.5mM و mgL^{-1}۷۰ سفوتاکسیم.

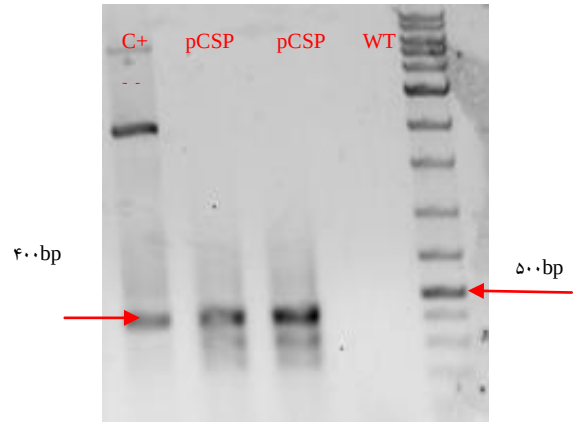
Fig. 9. Fiber growth of transformed ovules on MS medium containing sucrose 6gL^{-1}, Glucose 14 gL^{-1}, NAA 5mM, GA3 0.5 mM, cefotaxime 70 mgL^{-1}.



شکل ۱۰- کیفیت RNA استخراج‌شده از الیاف و تخمک‌های رشدکرده در محیط مایع (**WT:** تخمک تراریخته‌نشده، **1-3:** تخمک تراریخته‌شده).

Fig. 10. The RNA quality of developed fibers and ovules on liquid medium. (**WT:** Wild Type ovule, **1-3:** Transformed ovule).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]



شکل ۱۱- بیان گذرای ژن *MaSp1* سنتزی در الیاف و تخمک پنبه (**M:** DNA ladder، **C^+:** کنترل مثبت پلاسمید، **pCSP:** نمونهٔ تراریخت‌شده با پلاسمید pCSP، WT: نمونهٔ تراریخت‌نشده).

Fig. 11. Transient expression of *MaSp1* in cotton fibers and ovules. (**M:** DNA ladder, **C^+:** positive control plasmid, **pCSP:** pCSP transformed samples, **WT:** non-transformed samples).

و الیاف پنبه توسط آگروباکتریوم حامل پلاسمید بیانی تراریخته شد نتایج نشان‌داد ژن سنتزی *MaSp1* تحت‌کنترل پروموتر مخصوص فیبر پنبه GaRDL-1 به‌خوبی بیان می‌شود. بنابراین بخش برگزیدهٔ هسته پروموتر GaRDL-1 که متعلق به گونهٔ دیگر پنبه *Gossypium arboreum* است به‌خوبی توان کنترل بیان ژن موردنظر در الیاف و تخمک پنبه را دارد و توالی ژن سنتزی بدون بهینه‌سازی کدون در الیاف پنبه قابل بیان می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله در قالب بخشی از طرح پژوهشی امکان‌سنجی تولید پروتئین MaSp1 تار عنکبوت در کرک‌های دانه (الیاف پنبه) در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله انجام شده‌است.

REFERENCES

Arpat, A., Waugh, M., Sullivan, J.P., Gonzales, M., Frisch, D., Main, D., Wood, T., Leslie, A., Wing R., and Wilkins, T. 2004. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. – Plant Mol. Biol. 54: 911-929.

Ayoub, N.A., Garb, J.E., Tinghitella, R.M., Collin, M.A. and Hayashi, C.Y. 2007. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. – PLoS One. 6:e514

Foo, C.W.P. and Kaplan, D.L. 2002. Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. – Adv. Drug Deliver. Rev. 54: 1131-1143.

Gutiérrez, S.P., Saberianfar, R., Kohalmi, S.E. and Menassa, R. 2013. Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. – BMC Biotechnol. 13: 40-48.

Hauptmann, V., Weichert, N., Menzel, M., Knoch, D., Paege, N., Scheller, J., Spohn, U., Conrad, U. and Gils, M. 2013. Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. –Transgenic Res. 22: 369-377.

Hou, L., Liu, H., Li, J.B., Yang, X., Xiao, Y.H., Luo, M., Song, S.Q., Yang, G.W. and Pet, Y. 2008. SCFP, a novel fiber-specific promoter in cotton. – Chinese Sci. Bull. 52: 2639-2645.

Kim, H.J., Williams, M.Y. and Triplett, B.A. 2002. A novel expression assay system for fiber-specific promoters in developing cotton fibers. – Plant Mol. Biol. Rep. 20:7-18.

Li, X.B., Fan, X.P., Wang, X.L., Cai, L. and Yang, W.C. 2005. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. – Plant Cell. 17: 859-875.

Li, F., Wu, S., Lü, F., Chen, T., Ju, M., Wang, H., Jiang, Y., Zhang, J., Guo, W. and Zhang, T. 2009. Modified fiber qualities of the transgenic cotton expressing a silkworm fibroin gene. – Chinese Sci. Bull. 54: 1210-1216.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th Ed. Cold Spring Harbor, N.Y. – Cold Spring Harbor Laboratory.

Memon, S., Mari, S.N., Mari, A.K. and Gaddi, N.H. 2010. Induction of callus through anther and ovule culture in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). – World Appl. Sci. 8: 76-79.

Menassa, R., Zhu, H., Karatzas, C.N., Lazaris, A., Richman, A. and Brandle, J. 2004. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. – Plant Biotech. J. 2: 431-438.

Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C.Y. and Lewis R.V. 2005. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. – Biomacromol. 6: 3152-3159.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures. – Physiol. Plantarum 15: 473-497.

Piruzian, E.S., Bogush, V.G., Sidoruk, K.V., Goldenkova, I.V., Musiïchuk, K.A. and Debabov, V.G. 2003. Construction of the synthetic genes for protein analogs of spider silk carcass spidroin 1 and their expression in to-bacco plants. – Mol. Biol. 37: 654-662.

Rising, A., Hjälm, G., Engström, W. and Johansson, J. 2006. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriform spider silk proteins. – Biomacromol. **7**: 3120-3124.

Scheller, J., Gührs, K.H., Grosse, F. and Conrad, U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. – Nat. Biotechnol. 19: 573-577.

Taliercio, E.W. and Boykin D. 2007. Analysis of gene expression in cotton fiber initials. – BMC Plant Biol. **7**: 22-26.

Tarakanova, A. and Buehler, M.J. 2012. A materiomics approach to spider silk: protein molecules to webs. – Jom. 64: 214-225.

Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. and Swain, W. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. – Nat. Biotechnol. 5: 263-266.

Vollrath, F. and Knight, D.P. 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. – Nature 410: 541-548.

Wang, S., Wang, J.W., Yu, N., Li, C.H., Luo, B., Gou, J.Y., Wang, L.J. and Chen, X.Y. 2004. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. – Plant Cell 16: 2323-2334.

*****

How to cite this article:

Behnam, M., Seyed Javad Davarpanah, S.J. and Karimian, R. 2016. Designing and cloning a *MaSp1*-based synthetic gene in binary vector for transient expression in cotton fiber. – Nova Biol. Rep. 3: 238-248.

بهنام، م.، داورپناه، س.ج. و کریمیان، ر. ۱۳۹۵. طراحی، ساخت و تأیید مولکولی سازهٔ جفتی بیان‌کنندهٔ ژن *MaSp1* و بیان گذرای آن در الیاف پنبه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۴۸-۲۳۸.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.7.5]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.238]