E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/
Vol. 37, No.1. (2024) Spring, 28-39
https://doi.org/10.22051/jab.2023.42860.1543

Paper Type: Original Article

Isolation, Cloning and Expression of T7 RNA Polymerase from T7 Bacteriophage in *E. coli*

Leyla Davarvash[1], Maghsoud Pazhouhandeh[*1], Mohammad Ahmadabadi[1]

[1]Department of Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran;(Associate Professor: Corresponding author: pazhouhandeh@gmail.com).*

Citation:

Davarvash, L., Pazhouhandeh, M. & Ahmadabadi, M. (2024). Isolation, cloning and expression of T7 RNA polymerase from T7 bacteriophage in *E. coli*. *The quarterly scientific journal of applied biology, Volume* 37 (Issue No. 1), PP. 28-39

Received: 2023.01.28 Accepted: 2023.11.26

Abstract

Introduction: T7 RNA polymerase from T7 bacteriophage has suitable features for using in recombinant protein expression or transcription systems. This enzyme does not require additional factors to identify its promoter, operates very specific and only express the genes under T7 promoter. The features of T7 expression system make it important in biotechnology. Therefore, due to the increasing importance of this enzyme, its mass production at low cost is greatly important.

Methods: In this research, T7 phage was applied and PCR reaction was performed using T7 RNAPol-specific primers containing the cutting sites for restriction enzymes. After the electrophoresis of PCR product, T7 RNAPol gene and pGEX2TK plasmid were digested by *BamHI* and *EcoRI* enzymes and after being purified, the ligation was performed between them. The recombinant pGEX-T7RNAPol plasmid was transformed into the *E. coli*, by electroporation. Bacterial positive colonies containing the recombinant plasmid were selected using PCR.

Results: After confirming the obtained plasmids by PCR and digestion, they were sequenced and the sequence analysis confirmed the exact T7 RNA polymerase gene according to NCBI accession sequence. This recombinant plasmid was transformed into Rosetta strain of *E. coli* in order to express. Its positive colonies were selected and liquid culture was carried out. T7 RNAPol protein expression in bacteria was done by inducing with IPTG and after extraction, it was confirmed by SDS-PAGE.

Conclusion: This research is a prerequisite for T7 RNA Polymerase commercial and mass production that will be start after the optimization of its expression and purification methods.

Keywords: Expression System, T7 RNA Polymerase, T7 Bacteriophage, Transcription, Recombinant Proteins

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۷، شماره ۱، پیاپی ۷۹، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۳۹-۲۸
https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2023.42860.1543

نوع مقاله: پژوهشی

جداسازی، همسانه سازی و بیان ژن RNA پلی مراز باکتریوفاژ T7 در باکتری *E. coli*

لیلا داوروش[۱]، مقصود پژوهنده [۲*]، محمد احمدآبادی[۳]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
[۱]دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
(*نویسنده مسئول: *pazhouhandeh@gmail.com*)
[۱]دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۰۹/۰۵ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۱/۱۱/۱۸

چکیده

مقدمه: آنزیم RNA پلیمراز باکتریوفاژ T7، در رونویسی و بیان پروتئین های نوترکیب استفاده می شود. این آنزیم به فاکتور دیگری برای شناسایی پیشبر نیاز نداشته، بسیار اختصاصی عمل می کند و فقط ژن های تحت کنترل پیشبر T7 را بیان می نماید. این ویژگی ها موجب شده است که تولید آنزیم T7 RNA پلیمراز در بیوتکنولوژی بسیار پر اهمیت باشد.

روش‌ها: در این تحقیق، برای تولید انبوه و کم هزینه این آنزیم، سویه باکتریوفاژ T7 به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی که حاوی سایت برشی برای آنزیم های *BamHI* و *EcoRI* بود انجام گرفت. پس از الکتروفورز محصول PCR، ژن تکثیر شده T7 RNA پلیمیراز و پلاسمید pGEX2TK توسط این آنزیم ها برش داده شدند و پس از خالص سازی، واکنش لیگاسیون بین آن ها صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب pGEX-T7RNAPol با الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* منتقل شد. گزینش باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب به کمک PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: پس از تایید پلاسمید حاصل، با برش آنزیمی و همچنین با PCR، توالی یابی آن انجام و درستی آن مطابق توالی ثبت شده در NCBI تایید شد. پلاسمید نوترکیب به منظور بیان پروتئین مورد نظر به باکتری *E. coli* سویه Rosetta منتقل شد. کلنی حاوی پلاسمید انتخاب و کشت شد. بیان پروتئین با القای IPTG در باکتری صورت گرفت و پس از استخراج به کمک SDS-PAGE تایید شد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق پیش نیاز تولید تجاری و انبوه آنزیم T7 RNA پلیمراز است که پس از بهینه سازی بیان و خالص سازی پروتئین، تولید تجاری و بومی آن انجام خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم T7 RNA پلیمراز، باکتریوفاژ T7، پروتئین نوترکیب، رونویسی، سیستم بیانی

مقدمه

علم بیوتکنولوژی ابزاری مهم برای انتقال ژن به منظور تولید پروتئین در سایر موجودات است. جداسازی یک ژن مهم مربوط به یک سلول یوکاریوتی یا پروکاریوتی و انتقال آن درون یک وکتور به منظور تکثیر یا بیان را همسانه سازی ژن می نامند. باکتری *Escherichia coli* یکی از اولین و متداول ترین میزبان های مورد استفاده برای تولید پروتئین های نوترکیب است. از جمله ویژگی-های این باکتری، توانایی تکثیر سریع، بیان سریع و کشت آسان است. علاوه براین، در تولید مقدار بالای پروتئین نوترکیب و پذیرش ژن های بیگانه، قدرت بالایی دارد [1]، [2]. تولید پروتئین های بزرگ اغلب در سلول های یوکاریوتی انجام می گیرد، در مقابل، تولید پروتئین های کوچکتر در سلول های پروکاریوتی مقرون به صرفه تر است. بیان پروتئین های کوچک در باکتری *E. coli* بسیار آسان بوده و از نظر اقتصادی کم هزینه تر است.

باکتریوفاژ T7 از خانواده ویروسی *Podoviridae* است که باکتری های گرم منفی مثل باکتری *E. coli* را مورد حمله قرار می دهد. این نوع ویروس ها که به اصطلاح فاژ نیز نامیده می شوند، تنها می توانند بطور اختصاصی سلول های باکتری خاص را مورد حمله قرار دهند. باکتریوفاژ T7 به عنوان یک ویروس مدل در مطالعات زیست شناسی و ژنتیک مولکولی به کار گرفته شده است. فاژها اساسا در ژنوم خود امکاناتی دارند تا بتوانند ژن های خود را در باکتری میزبان بیان نمایند و نیازهای خود را برآورده ساخته و تکثیر یابند. از این میان پیشبر یا پروموتور T7 با توالی ۲۳ نوکلئوتیدی در این فاژ شناسایی شده که قابلیت بیان در باکتری *E. coli* را دارد و در مهندسی ژنتیک هم به وفور مورد استفاده قرار می گیرد. آنزیم T7 RNA پلیمراز (T7 RNAPol) برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ از این باکتریوفاژ جداسازی شد [3]، [4]. این پروتئین از زمان کشف، به عنوان یک ابزار مهم برای بیان پروتئین نوترکیب در حال استفاده است [5]. ساختار اولیه این آنزیم در سال ۱۹۸۰ تعیین گردید [6] و بررسی ساختار کریستالی این آنزیم بوسیله اشعه ایکس مدل پیچیده ای را نشان داد که شباهت قابل توجهی بین دمین های این آنزیم و تعدادی دیگر از آنزیم های RNA پلیمراز و DNA پلیمراز از جمله DNA پلیمراز I باکتری *E. coli* و آنزیم Reverse Transcriptase نشان می داد [7]. آنزیم T7 RNA پلیمراز علاوه بر دمین پلیمریزاسیون، دارای دمین انتهای آمینی (N-terminal) است که در اتصال اختصاصی این آنزیم به توالی پروموتر (T7) و باز کردن DNA دو رشته ای نقش دارد [8]، [9]. با وجود شباهت بالا میان پیشبر T7 و T3، آنزیم T7 RNAPol تنها به پیشبر خود متصل می شود [10]. همچنین سرعت رونویسی آنزیم T7 RNAPol نسبت به RNAPol باکتریایی حدود هشت برابر بیشتر است [11]. خاتمه رونویسی توسط این آنزیم به سیگنال های ویژه ای نیاز دارد. این امر باعث شده است که آنزیم T7 RNAPol قادر به رونویسی از هر DNA ای نباشد و فقط رونویسی را در T7 DNA و ژن هایی که دارای پیشبر T7 است، خاتمه دهد و با توجه به اختصاصی عمل کردن آنزیم T7 RNA پلیمراز، این آنزیم نمی تواند ژنوم سلول های جانوری را رونویسی کند [12]. توالی پیشبر T7 عبارت است از:

5'-TAATACGACTCACTATAG

و توالی خاتمه دهنده رونویسی هم برای T7 RNA پلیمراز شامل توالی زیر است:

5'-ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCT AAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3'

اندازه آنزیم T7 RNAPol، ۹۸ کیلودالتون بوده و برای انجام عمل رونویسی، نیاز به پروتئین های کمکی و فاکتورهای رونویسی ندارد [13]. تمامی این ویژگی ها باعث شده است که استفاده از سیستم های بیانی بر پایه آنزیم T7 RNAPol از جایگاه مهمی در علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک برخوردار باشد. با وجود اینکه ایراد ها و نواقصی برای این سیستم بیانی مطرح شده است، استفاده از سیستم های بیانی پیشرفته تر هیچ کدام به طور کامل جایگزین سیستم بیانی مبتنی بر T7 RNAPol نشده است و محققان سعی در برطرف کردن ایراد های این سیستم بیانی دارند [2].

امروزه از آنزیم T7RNA پلیمراز استفاده های گسترده ای می شود. در انواع سیستم های بیان شونده از آنزیم T7RNA پلیمراز، پیشبر و خاتمه دهنده آن استفاده می شود. برای هرگونه سنتز RNA کافی است ژن مورد نظر در یک پلاسمید مقابل پیشبر T7 قرار داده شود و سپس این پلاسمید به همراه بافر و rNTP و آنزیم T7 RNA پلیمراز به مقدار فراوان RNA ژن مورد نظر را در مدت یک ساعت

در ۳۷ درجه سانتیگراد تولید خواهد کرد. این روش جدید و مستقیم برای سنتز RNA روش ابروین (Eberwine) نامیده می شود که بر مبنای رونویسی در شرایط آزمایشگاهی به کمک پیشبر T7 و T7 RNA پلیمراز است. اساس بسیاری از کیت های سنتز RNA استفاده از این روش و آنزیم T7 RNA پلیمراز است. RNAهای سنتز شده توسط آنزیم T7 RNA پلیمراز در مطالعه ساختار و عملکرد RNA در شرایط آزمایشگاهی، در آزمایشات هیبریداسیون از جمله نورترن و ساترن بلات به عنوان پروپ، ریزآرایه، RNA مداخله گر (RNAi)، آزمایشات آنتی سنس و تلقیح و آلوده سازی برای ویروس های RNAدار استفاده می شوند [14]، [15]، [16]. جداسازی و خالص سازی این آنزیم از سلول های باکتری آلوده به باکتریوفاژ امکان پذیر نیست. زیرا بلافاصله بعد از ایجاد عفونت، مقدار کمی از این آنزیم تولید شده و لیز سلول باکتری انجام می شود. بنابراین با همسانه سازی ژن این آنزیم در یک پلاسمید مناسب و انتقال آن به داخل سلول میزبان می توان مقدار بالایی از این آنزیم را تولید نمود [17]. با توجه به اهمیت آنزیم T7 RNAPol در بیوتکنولوژی، در این تحقیق به جداسازی ژن T7 RNAPol از باکتریوفاژ T7 و طراحی و ساخت وکتور بیانی مناسب برای بیان آن اقدام شد. این تحقیق در حقیقت پیش-زمینه ایجاد خط تولید تجاری آنزیم T7 RNAPol است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ژن T7 RNA Polymerase از DNA باکتریوفاژ T7 جداسازی و داخل یک پلاسمید بیان در باکتری همسانه سازی شد تا مقدمات تولید تجاری آن فراهم شود. برای این کار، DNA باکتریوفاژ T7 (سیگما M-69390) جهت کلون کردن ژن T7 RNA پلی مراز (GenBank: M38308.1) به طول ۲۸۷۷ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفت.

آغازگرهای الیگو دئوکسی نوکلئوتیدی (پرایمرها)

آغازگرهای به کار برده شده برای انجام PCR به منظور کلون کردن ژن T7 RNA پلی مراز باکتریوفاژ T7 از طریق نرم افزار (APE) A plasmid Editor طراحی و ساخته شد (Eurogentec). توالی آغازگر (*BamHI*) Forward به صورت 5'- aaGGATCCatgaacacgattaacatcgcta- 3' و توالی آغازگر (*EcoRI*) Reverse به صورت 5'- aaGAATTCttacgcgaacgcgaagtccga- 3' بود. سایت های برشی تعبیه شده بر روی این آغازگرها با زیرخط مشخص شده است. آغازگرهای مورد استفاده برای توالی یابی دقیق ابتدا و انتهای ژن داخل پلاسمید که به دوطرف محل ورود روی پلاسمید می چسبند عبارتند از:

pGEX F: CAATGTGCCTGGATGCGTTC و pGEXR: AGCTGCATGTGTCAGAGGTT

پلاسمید

در مطالعه حاضر، ژن T7RNA پلیمراز، به پلاسمید pGEX2TK منتقل شد. این پلاسمید حاوی پروموتور lac و tac است. بیان ژن LacZ و GST به کمک این پلاسمید امکان پذیر است. این پلاسمید ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین را جهت گزینش در باکتری *E. coli* دارد. به کمک این پلاسمید می توان پروتئین های بیان شده در شرایط آزمایشگاهی را از طریق اتصال به پروتئین GST روی ستون سفارز خالص سازی کرد [18].

نژاد باکتری

در این پروژه از باکتری *E. coli* نژاد های Top10 و Rosetta به ترتیب برای انجام همسانه¬سازی و بیان پروتئین T7 RNA پلی مراز استفاده شد.

تکثیر با PCR و همسانه سازی پلاسمید نوترکیب

تکثیر قطعه DNA به کمک آغازگرهای اختصاصی در دستگاه ترموسایکلر بیوراد انجام شد. مواد واکنش PCR (در حجم ۲۰ میکرولیتر) شامل: یک میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها

با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱۰۰-۳۰۰ نانوگرم از DNA الگو به همراه بافر PCR و آنزیم Mag Taq DNA polymerase و آب مقطر استریل بود. پس از تست دماهای مختلف چسبیدن آغازگرها در چرخه های PCR به کمک گرادینت PCR، تکثیر موفق ژن T7 RNA پلیمراز در دمای چسبیدن آغازگرها ۶۰ درجه سانتی گراد برای جفت آغازگرهای اختصاصی این ژن، با ۳۵ چرخه از روی DNA باکتریوفاژ T7 صورت گرفت. پس از خالص سازی محصول PCR، محلول تخلیص شده به همراه پلاسمید pGEX2TK با استفاده از آنزیمهای *BamHI* و *EcoRI* (Fermentas-Anza) در حجم ۱۰۰ میکرولیتر برش یافته و قطعات موردنظر در روی ژل آگارز LMP جداسازی و دوباره خالص¬سازی شدند. در نهایت ژن T7 RNA پلیمراز در پلاسمید pGEX2TK با کمک آنزیم T4 DNA Ligase قرار گرفت. محصول لیگاسیون با الکتروپوراسیون ۲/۵ کیلو ولت به مدت ۵ هزارم ثانیه داخل سلول های شایسته باکتری *E. coli* نژاد Top10 قرار گرفت و روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میلیگرم در لیتر) انتخاب کلنی ها صورت پذیرفت. ۱۲ کلنی با انجام colony PCR انتخاب شد و کشت مایع صورت گرفت تا پلاسمید آنها استخراج گردد. استخراج پلاسمید با روش miniprep انجام و پلاسمیدها دوباره با PCR تایید شدند و پس از انجام تیمار Rnase پلاسمیدهای نوترکیب pGEX-T7RNAPol برای توالی یابی (دانشگاه Lille فرانسه) ارسال شدند.

بیان و استخراج پروتئین

پس از تایید توالی پلاسمیدهای نوترکیب pGEX-T7RNAPol ، یکی از این پلاسمیدها به روش الکتروپوراسیون با ۲/۵ کیلو ولت به مدت ۵ هزارم ثانیه به سویه بیانی Rosetta انتقال داده شد و پس از ظهور کلنی ها روی محیط حاوی آمپی سیلین، یک کلنی در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین، به مدت یک شب و در دمای ۳۷°C کشت شد. محیط اصلی LB مایع حاوی آمپی سیلین، به حجم ۵۰۰ میلی لیتر با ۱ میلی لیتر از پیش کشت تلقیح شد و پس از رسیدن تراکم کشت به OD_{600}= ۰/۰-۶/۸ القا با IPTG به غلظت نهایی ۱ میلی مولار انجام شد. پس از گذشت ۶ ساعت از القاء، کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. محیط کشت حذف و سلول ها داخل بافر استخراج پروتئین سوسپانسیون شدند. عملیات سونیکاسیون التراسونیک (Bandelin) بر روی محلول موجود صورت گرفت. با تنظیم ۴۰ درصد نیرو برای دستگاه، در طی سیکل های زمانی ۱۵ ثانیه ای و تعداد ۱۰ ضربه یا پالس صوتی وارد شد تا سلول های باکتری شکسته شوند. جهت جلوگیری از تخریب گرمایی، تمامی مراحل سونیکاسیون بر روی یخ انجام گرفت. استخراج پروتئین پس از سونیکاسیون با برداشت فاز بالایی بعد از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴°C انجام شد. همزمان و در موازات، کشت، و به عنوان کنترل منفی، القا و سونیکاسیون روی نمونه باکتری حاوی پلاسمید خالی فاقد ژن نیز صورت گرفت. پروتئین حاصل با استون ۱۰۰ درصد و نگهداری به مدت ۲ ساعت در۷۰°C- با سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰ rpmرسوب یافته و بعد از شستشو با استون ۸۰ درصد در نهایت داخل ۳۰ میکرولیتر بافر PAGE محلول شد. قبل از انجام الکتروفورز پروتئین، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C حرارت داده شده و آماده برای بارگذاری روی ژل شدند.

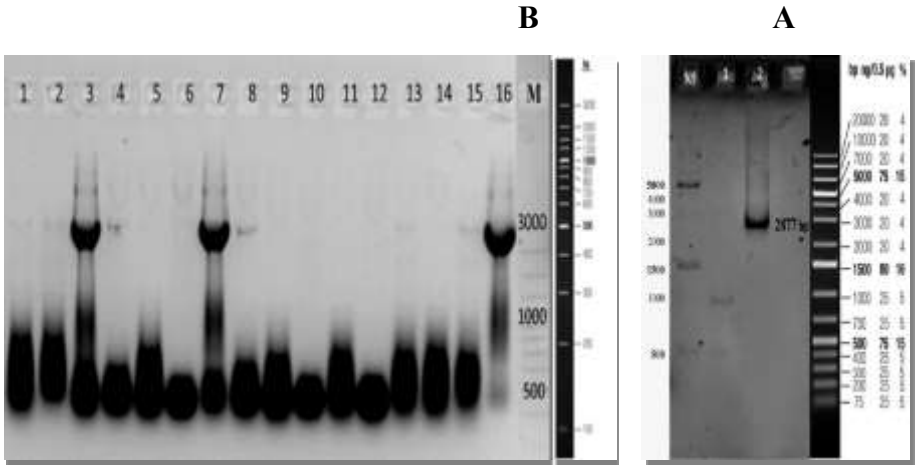
الکتروفورز پروتئین در ژل آکریل آمید

سیستم SDS PAGE استفاده شده در این پروژه ناپیوسته، یک بخش Stacking که پروتئین ها در آن متمرکز و متراکم می شوند و یک بخش Resolution که پروتئین ها در آن بر اساس وزن مولکولی خود جدا می شوند، بود. ابتدا ژل پایین ۹ درصد تهیه و در قالب شیشه ای ریخته شد و سپس ژل بالا ۵ درصد نیز آماده و ریخته شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از نمونه ها درون چاهک ها ریخته شد. پس از برقراری جریان الکتریکی با تنظیم آمپر دستگاه روی ۳۰ mA- ۲۰ و ولتاژ روی ۱۴۰، با رسیدن رنگ نشانگر (برموفنل بلو) به انتهای ژل بالا که حدود ۱ ساعت طول کشید، این تنظیمات برای ژل پایین به صورت تنظیم آمپر دستگاه روی ۵۰ mA- ۳۰ و ولتاژ روی ۱۰۰ ولت تغییر کرد. بعد از گذشت حدود ۴ ساعت، با رسیدن رنگ به انتهای ژل پایین، با قطع جریان، ژل از قالب های شیشه ای جدا و با محلول کوماسی بلو رنگ آمیزی و سپس با اسید استیک ۱۰ درصد رنگبری شد.

نتایج و بحث

همسانه سازی ژن T7 RNA پلیمراز در پلاسمید pGEX2TK

ابتدا با استفاده از توالی ثبت شده ژن T7 RNA پلیمراز، آغازگرهای اختصاصی آن طراحی و با کمک PCR پس از بهینه سازی شرایط دمایی، از روی DNA فاژ تکثیر شد. در **شکل A ۱**، تصویر الکتروفورز محصول PCR نشان داده شده است. محصول PCR خالص سازی شده به همراه پلاسمید pGEX2TK با آنزیم های برشی *BamHI* و *EcoRI* برش داده شدند. پس از تایید صحت برش ها، به منظور کلون کردن ژن T7 RNA پلی مراز، مقدار یک میکرولیتر از پلاسمید و چهار میکرولیتر از ژن برای واکنش لیگاسیون مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش لیگاسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد، به ازاء هر بار ترانسفورماسیون *E. coli* به روش الکتروپوراسیون، یک میکرولیتر از محصول واکنش لیگاسیون استفاده شد. نتیجه نشان دهنده رشد تعدادی کلنی بر روی محیط گزینشی بود. هیچ کلنی در کنترل منفی رشد نکرد، اما کلنی های زیادی در کنترل مثبت رشد کرده بودند که این نتایج، صحت انتقال را به باکتری های مستعد تأیید کرد. در مرحله بعد برای تایید نوترکیب بودن پلاسمید در کلنی های رشد کرده در محیط، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن T7 RNA پلیمراز و شرایط مشابه اولیه، بر روی ۱۶ عدد از این کلنی های رشد یافته، انجام شد. با بارگذاری محصول PCR، باند به اندازه ۲۸۷۷ جفت باز، نوترکیب بودن پلاسمید در برخی کلنی های انتخاب شده را تایید کرد (**شکل B ۱**).

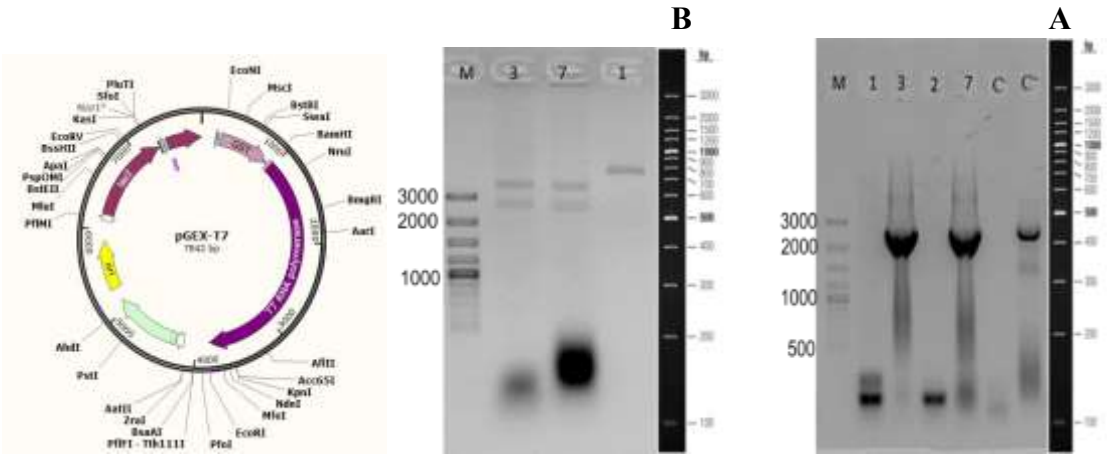


شکل ۱- A) تصویر الکتروفورز محصول PCR، تکثیر ژن T7 RNA پلی مراز با آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن T7 RNAPol روی ژل آگارز ۱ درصد. باند ۲۸۷۷ جفت بازی با اندازه مورد انتظار برای ژن T7 RNAPol مطابقت داشت. M: مارکر ، ۱و۲: محصول PCR. B) تصویر الکتروفورز محصول PCR روی کلنی ها با آغازگرهای اختصاصی ژن T7 RNAپلی مراز، شماره ۱۶: کنترل مثبت (PCR اولیه)

Figure 1- A) Electrophoresis image of PCR product, amplification of T7 RNA polymerase gene with specific primers related to T7 RNAPol gene on 1percent agarose gel. The 2877 bp band corresponded to the expected size for the T7 RNAPol gene. M: Marker, 1 and 2: PCR product.) Electrophoresis image of PCR product on colonies with specific primers of T7 RNA polymerase gene, number 16: Positive control (initial PCR)

تایید همسانه سازی ژن T7 RNA پلیمراز در پلاسمید pGEX2TK با روش های PCR و برش آنزیمی

برای تایید پلاسمید نوترکیب حاوی ژن T7 RNA پلی مراز در کلنی های رشد یافته روی محیط گزینشی آمپی سیلین، استخراج پلاسمید از آنها کلنی های شماره ۱ و ۲ و ۳ و ۷ مشخص شده در **شکل ۱** انجام شد. در مرحله بعد با انجام واکنش PCR با آغازگرهای ژن T7 RNA پلی مراز روی این پلاسمیدهای استخراج شده، درستی پلاسمید نوترکیب بررسی شد (**شکل A ۲**). همچنین، پلاسمیدهای نوترکیب، توسط آنزیم های برشی *BamHI* و *EcoRI* برش داده شدند. بر اساس نقشه فیزیکی قابل پیش بینی برای پلاسمید نوترکیب انتظار می رفت که دو قطعه با اندازه های ۲۸۷۷ و ۴۹۶۹ جفت باز ایجاد شوند. با توجه به تشکیل دو قطعه پیش بینی شده از برش آنزیمی، پلاسمید نوترکیب حاصل تایید گردید (**شکل B ۲**). **شکل C ۲**، تصویر نهایی تهیه شده پلاسمید نوترکیب با استفاده از نرم افزار LazerGene را نشان می دهد.



شکل ۲- A) تصویر الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن T7 RNA پلی مراز روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های مثبت شماره ۳ و ۷، شماره ۱ و۲: PCR روی پلاسمید های خالی، -C: کنترل منفی بدون DNA، +C: کنترل مثبت (PCR ژن T7 RNAPol)، M: مارکر SM0321 ThermoSientific. B) برش آنزیمی پلاسمید نوترکیبpGEX-T7RNAPol، ۱: پلاسمید نوترکیب برش نیافته، ۳و۷: برش با آنزیم های برشی *BamHI* و *EcoRI* و خروج قطعه ژن T7 RNAPol به اندازهbp ۲۸۷۷، M: مارکر. C) درج قطعه T7 RNAپلی مراز درون وکتور pGEX2TK طی واکنش همسانه سازی تهیه شده با نرم افزار LazerGene

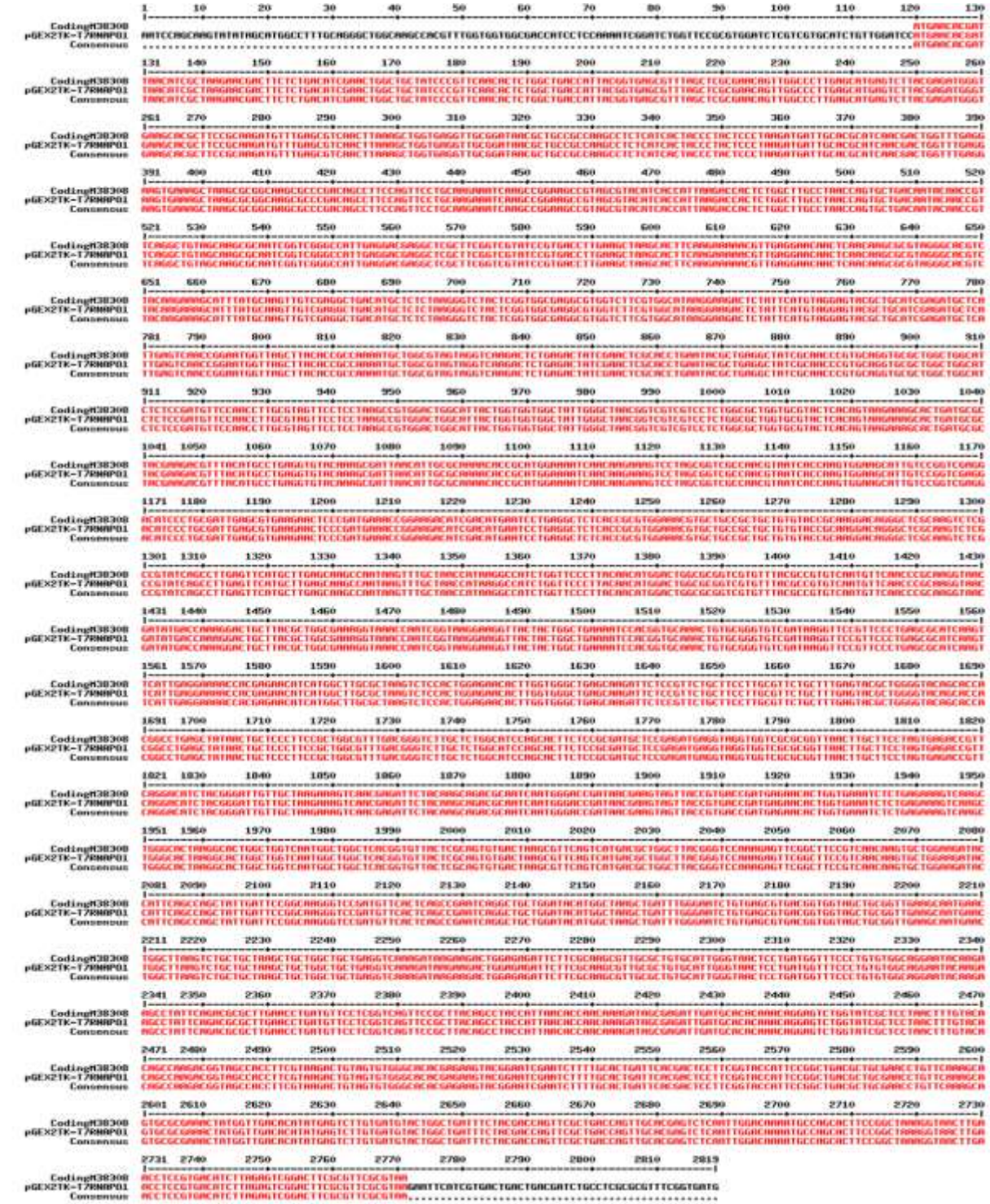
Figure 2- A) Electrophoresis image of PCR product with specific primers of T7 RNA polymerase gene on plasmids extracted from positive colonies No. 3 and 7, No. 1 and 2: PCR on non-recombinant plasmids, C-: Negative control (without DNA), C+: positive control (PCR of T7 RNAPol gene), M: marker SM0321 ThermoSientific. B) Enzymatic digestion of recombinant plasmid pGEX-T7RNAPol, 1: recombinant plasmid without digestion. No. 3 and 7: digestion with BamHI and EcoRI enzymes and removal of T7 RNAPol gene fragment of 2877 bp, M: marker C) Insertion of T7 RNA polymerase gene into pGEX2TK vector by cloning. Image prepared with LazerGene software

نتایج توالی یابی

برای بررسی درست بودن توالی ژن کلون شده داخل پلاسمید، نمونه پلاسمید نوترکیب pGEX-T7RNAPol تایید شده (شماره ۳ و ۷) پس از انجام تیمار RNase برای تعیین توالی به دانشگاه Lille فرانسه ارسال گردید. توالی‌های ثبت شده در NCBI برای ژن T7 RNAPol با شماره دستیابی M38308 با نتایج حاصل از توالی یابی، با استفاده از دو نرم‌افزار آنلاین BLAST و Multalin مقایسه گردید. نتیجه حاصل از توالی یابی پلاسمیدهای ۳ و ۷ صحت و تطابق کامل توالی را با نمونه ثبت شده در NCBI برای ژن T7 RNAPol نشان داد. به کمک آغازگرهایی که به دو طرف محل ورود ژن در پلاسمید می چسبند توالی یابی های تکمیلی برای ابتدا و انتهای ژن انجام شد و درست بودن توالی ژن و پیوستگی درست توالی پلاسمید با ژن که لازمه بیان درست اسیدآمینه های ژن بصورت فیوژن با GST در این پلاسمید است ثابت گردید (**شکل ۳**). توالی های سایت های برشی آنزیم ها بلافاصله قبل و بعد از ژن به درستی مشاهده می شوند.

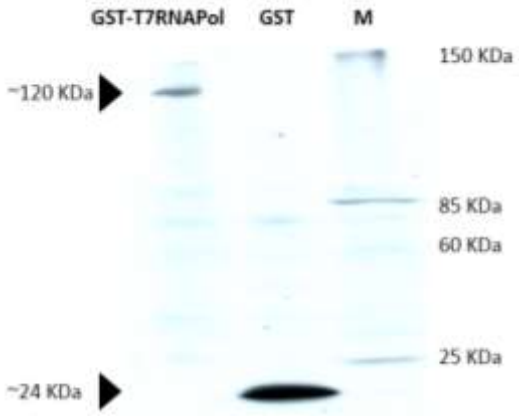
بیان پروتئین نوترکیب pGEX-T7RNAPol در باکتری

پس از تایید پلاسمیدهای نو ترکیب، یکی از پلاسمیدهای نوترکیب در موازات پلاسمید خالی pGEX2TK به باکتری های مستعد سویه بیانی Rosetta از *E.coli* به روش الکتروپوراسیون منتقل شد و در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کشت داده شدند. پس از انتخاب کلنی های مثبت و تایید مجدد با PCR به منظور استخراج پروتئین از سلول مورد نظر، پیش کشت مایع و سپس کشت اصلی صورت گرفت و پس از پایان یافتن زمان القا با IPTG محیط کشت حذف و بعد از سونیکاسیون پروتئین باکتری ها استخراج و با استون رسوب داده شد. در نهایت به رسوب ته تیوب ۳۰ میکرولیتر بافر PAGE افزوده شد. نتیجه الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با کماسی بلو نشان داد که ژن T7 RNA پلی مراز در این پلاسمید و در این سویه باکتری بخوبی بیان شده است. چون این پروتئین در این پلاسمید pGEX2TK بصورت فیوژن با GST تولید می شود لذا وزن مولکولی آن (۹۷ کیلو دالتون) به اندازه حدود ۲۴ کیلودالتون بیشتر شده و در محدوده ۱۲۰ کیلودالتون دیده میشود (**شکل ۴**).



شکل ۳- زیرهم چینی توالی ادغام شده حاصل از توالی یابی های متعدد روی پلاسمید نوترکیب ایجاد شده pGEX2TK-T7RNAPol و توالی منتشرشده ژن با شماره دسترسی M38308

Figure 3- The alignment of combined sequences resulting from multiple sequencing on the recombinant plasmid pGEX2TK-T7RNAPol and the published gene sequence with accession number M38308



شکل ۴- تصویر الکتروفورز پروتئین روی ژل آکریل آمید ۹ درصد. باند مربوط به پروتئین T7 RNAPol به وزن مولکولی ۱۲۰ کیلودالتون برای پلاسمید حاوی ژن T7 RNA Pol فیوژن با GST با تعداد اسیدآمینه ۸۸۴+۲۲۰ در چاهک چپ قابل مشاهده است. چاهک وسط: باند پروتئینی به وزن مولکولی تقریبا ۲۴ کیلودالتون برای پلاسمید خالی pGEX2TK که فقط GST با حدود ۲۲۰ اسیدآمینه دارد. (M: مارکر آزمایشگاهی پروتئین)

Figure 4- Image of protein electrophoresis on 9 percent acrylamide gel. The T7 RNAPol protein band with a molecular weight of 120 kDa is visible for the plasmid containing the T7 RNAPol fusion gene with GST with 884+ 220 amino acids in left and negative control in the middle is a protein band with a molecular weight of approximately 24 kDa for the empty pGEX2TK plasmid which contains only GST with 220 amino acids. (M: Lab Pr. Marker)

T7 RNA پلیمراز، سنتز RNA را در حضور DNA الگو انجام می دهد. شناسایی اختصاصی پروموتور، ساختار ساده آنزیم، فعالیت مستقیم بدون نیاز به کوفاکتورها و دامنه میزبانی گسترده آن، میزان استفاده از این آنزیم را افزایش داده است. تمام این ویژگی ها باعث شده که این پلیمراز به عنوان یک ابزار مهمی برای تحقیقات مختلف باشد و بررسی های فیزیکی و شیمیایی روی عملکرد رونویسی و RNA را آسانتر سازد. در یک تحقیق، همسانه سازی و انتقال ژن آنزیم T7 RNA پلیمراز به هسته سلول های یوکاریوتی و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت. آغازگرهای مناسب از روی توالی ژن T7 RNA پلیمراز به همراه توالی های مناسب برای آنزیم های برشی، طراحی و ژن T7 RNA پلیمراز مورد نظر پس از جداسازی در وکتور بیانی pCAMBIA1304 همسانه سازی و سپس، وکتور نوترکیب به کمک سویه LB4404 آگروباکتریوم به گیاهان توتون منتقل شد. حضور و بیان ژن T7 RNA پلیمراز در گیاهان تراریخته با روش های PCR و RT-PCR تأیید شد [19]. همچنین گزارشی مبنی بر استفاده از سیستم آنزیم T7 RNA پلیمراز برای تولید و بیان آنتی بیوتیک هایی مانند Streptomycin وجود دارد. این سیستم در تولید آنتی بیوتیک های مهم بسیار حائز اهمیت است [20].

در یک گزارش، برای افزایش میزان بازده تولید RNA سنتزی، از شرایط ویژه رونویسی، مانند بافر رونویسی با عملکرد بالا، استفاده شده است. این شرایط ویژه از تولید محصولاتی که باعث مهار آنزیم T7 RNA پلیمراز می شود، جلوگیری کرده و در نتیجه باعث افزایش کیفیت RNA سنتزی شد [17]. از سیستم بیانی T7 RNAPol، در بیان و تولید پروتئین های نوترکیب در مخمرها و سلول های جانوری نیز استفاده می شود [21]. در یک تحقیق، بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت سیستم بیانی T7 RNAPol در پروتوپلاست توتون مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که انتقال T7-pol به سیتوپلاسم سلول می تواند در بیان بیش از حد (over-express) RNA های مورد نظر در سیتوسل سلول نقش داشته باشد [22].

سیستم بیانی باکتریوفاژ T7 دارای یکی از برجسته ترین سیستم های رونویسی مورد استفاده در بیوتکنولوژی است. اما سیستم خاتمه دهنده رونویسی در T7 در حالت طبیعی ضعیف است. در یک تحقیق، توالی هایی را طراحی و مهندسی کردند که فعالیت ساختار سنجاق سر ترمیناتور تقویت شود و در نتیجه سیستم خاتمه دهنده رونویسی عملکرد بالاتری داشته باشد. از این سیستم همچنین، برای تقویت سیستم رونویسی باکتری *E. coli* هم استفاده شد[23].

RNA پلیمراز باکتریوفاژ T7، از زمان کشف به عنوان یک مدل برای درک سنتز RNA و همچنین یک ابزار مهم برای بیان پروتئین ها، شناخته می شود. درک سازوکارهای اساسی تنظیم T7 RNAPol برای طراحی فاکتورهای رونویسی مبتنی بر T7، که می توانند در طراحی سیستم های بیان ژنی استفاده شوند، بسیار اهمیت دارد. در یک تحقیق، برای کشف مکانیزم های تنظیم بیان ژن توسط T7 RNAPol یک روش سریع و مقرون به صرفه برای شناسایی عواملی را که بر روی فعالیت های رونویسی تاثیر می گذارند معرفی کردند. در این تحقیق از یک سیستم به نام سیستم تنظیم تتراسایکیلین (tet: Tetracycline regulatory system) استفاده شد. در سیستم tet، زمانیکه پروتئین مهارکننده تتراسایکیلین (tetR) به توالی اپراتور (tetO) متصل می شد، فعالیت رونویسی کاهش می یافت. از سیستم tet برای طراحی سیستم های بیان ژنی استفاده می شود [24].

پروتئین های غشایی حدود ۵۰ درصد از اهداف کشف دارو را نشان می دهد. بیان و تولید بیش از حد پروتئین های غشایی در ژنومیک ساختاری و بیوتکنولوژی بسیار اهمیت دارد. با وجود سیستم های بیانی یوکاریوتی، باکتری ها ابزاری مقرون به صرفه و قدرتمند برای تولید پروتئین هستند. سیستم بیانی مبتنی بر T7 RNAPol یک سیستم بیانی موفق و کارآمد است که به تولید مقدار بالایی از پروتئین ها کمک می کند. برای ایجاد این سیستم بیانی، ژن T7 RNAPol تحت کنترل پروموتر Lac UV5 داخل ژنوم باکتریوفاژ Lambda طراحی و سپس تحت پروموتر T7 در پلاسمید بیانی همسانه سازی می شود. با اضافه شدن IPTG، آنزیم T7 RNAPol به میزان بالایی تولید شده و ژن هدف را رونویسی میکند [25].

در یک تحقیق، یک مکانیسم تنظیمی جدید برای سیستم بیان T7 را گزارش دادند. در این تحقیق از دو میزبان باکتریایی به نام C44(DE3) و C45(DE3) جهش یافته استفاده شد. در این میزبان ها تحت شرایط القایی، میزان mRNA مورد نظر ده برابر کمتر از سویه والدینی بود و همین امر منجر به تجمع کندتر پروتئین هدف می شد. در نتیجه تجمع پروتئین هدف در این میزبان ها به تاخیر افتاده و کنترل مقدار پروتئین هدف آسانتر گردید. بر پایه این سیستم، اتصال پروتئین فلورسنت دار (GFP) به پروتئین های غشایی تولید شده، بررسی کیفیت و بازدهی آن ها را آسان تر می کند. این میزبان های جهش یافته، مکمل دیگر میزبان های T7 موجود هستند و قابلیت انعطاف پذیری سیستم بیان T7 را افزایش می دهد [26].

در سیستم بیانی T7 RNAPol تحت پروموتر LacUV5، آنزیم T7 RNAPol به میزان بالایی تولید شده و همین امر موجب مرگ سلولی می شود. یکی دیگر از سیستم بیانی، قرارگیری T7 RNAPol در کروموزوم باکتری است که حتی در برخی دیگر از موجودات نیز استفاده شده است. در این سیستم، نیازی به تولید بیش از اندازه آنزیم نیست و تنها یک نسخه از آنزیم T7 RNAPol کافیست تا مقدار مورد نظر پروتئین هدف بیان و تولید شود. اما ارزیابی کارایی و عملکرد و بیان پروتئین در این سیستم بسیار وقت گیر و پرهزینه است [27]. در نتیجه امروزه، استفاده از سیستم بیانی پلاسمید محور (PDT7: plasmid-driven T7RNAP) جایگاه بسیار مهمی در علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک دارد. اساس سیستم بیانی PDT7 بر پایه پلاسمید است و دستکاری ژنتیکی روی پلاسمید ساده تر است. همین امر موجب شده است که سیستم PDT7 نسبت به بیان از روی کروموزوم کاربردی تر باشد. یکی از کاربردهای مهم سیستم بیانی PDT7، تولید بیوسنسورهای سلولی است [28].

در سال ۲۰۲۱ در یک تحقیق، از سیستم بیانی T7 RNAPol برای تولید آنزیم گلوکز دهیدروژناز (GDH) در میزبان باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) استفاده شد. سویه مهندسی شده باکتری *E. coli* در این تحقیق، براحتی با سرکوب لیز خودکار سلولی، تولید پروتئین های نوترکیب را افزایش داد و یک روش کارآمد را به علم بیوتکنولوژی صنعتی معرفی کرد [29].

نتیجه‌گیری

آنزیم T7 RNA پلیمراز یکی از مهم ترین و پرکاربردترین آنزیم های مورد استفاده در محیط های آزمایشگاهی است. این آنزیم در سنتز RNA برای تولید پروب در نودرن بلات، کیت های سنتز RNA ، تولید guideRNA برای استفاده در سیستم CRISPR و همچنین آلوده سازی ویروس های RNA دار که داخل پلاسمید به صورت DNA نگهداری و تکثیر می شوند، استفاده می شود [30]. به طور معمول تولید این آنزیم نوترکیب به سیستم های میکروبی وابسته است. همچنین کیت های تجاری این آنزیم گران قیمت و وارداتی است. برای فروش این آنزیم به همراه بافر آن، شرکت هایی مثل تاکارا برای ۲۰ واکنش سنتز RNA قیمت ۲۰۸ یورو، شرکت بیوسرچ لب برای ۵۰ هزار یونیت آنزیم قیمت ۱۴۴ یورو و شرکت NebBioLab برای ۵۰ واکنش سنتز RNA قیمت ۳۵۰ یورو پیشنهاد می کنند. بنابراین با توجه به اهمیت روزافزون این آنزیم در پژوهش های بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، تولید انبوه و کم هزینه آن در داخل کشور از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این تحقیق بر روی جداسازی و همسانه سازی ژن T7 RNA پلی مراز به منظور تولید آنزیم، تلاش شد. در مرحله اول ابتدا با استفاده از توالی ژن T7 RNA پلی مراز با کد دسترسی M38308 دو آغازگر رو به جلو و رو به عقب برای دو انتهای توالی ژن طراحی شد. با استفاده از تکنیک PCR توالی ژن T7 RNA پلی مراز از باکتریوفاژ T7 جداسازی شد. پس از برش دو انتهای قطعه ژن با آنزیم های برشی، پلاسمید pGEX2TK نیز دقیقا با همان آنزیم های برشی برش داده شد تا انتهاهای ایجاد شده توسط آنزیم T4 DNA Ligase آماده اتصال شوند. محصول لیگاسیون به روش الکتروپوراسیون به سلول¬های مستعد منتقل شد و پس از استخراج از کلونی ها و تایید آن به کمک روش PCR و برش آنزیمی و توالی یابی، ناقل ایجاد شده pGEX-T7RNAPol نام گذاری شد. در ادامه با انتقال پلاسمید حاصل به سویه بیانی باکتری و با کاربرد IPTG توانستیم توسط روش SDS PAGE باند پروتئینی ۱۲۰ کیلودالتون مربوط به فیوژن این پروتئین با GST را مشاهده کنیم. این تحقیق پیش زمینه و تحقیق زیربنایی برای ایجاد خط تولید این آنزیم در ایران است که برای اولین بار جهت استقلال در تولید و سهولت در دسترسی و پایین آوردن قیمت آن برای استفاده در تمام آزمایشگاه های بیوتکنولوژی و ژنومیک انسانی، جانوری، گیاهی و میکرو ارگانیسم ها انجام می شود.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می کنند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر تبعیت کرده و از سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده اند. نویسندگان اظهار می کنند که هیچگونه تعارض منافع بین آنها وجود ندارد و اصالت محتوای مقاله تایید می شود.

سپاسگزاری

از حمایت های مادی و معنوی معاونت پژوهشی و گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تشکر و قدردانی می شود.

منابع

[1] Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, *72*, 211-212.

[2] Overton, TW. (2014). Recombinant protein production in bacterial host. *Drug Discow*, *19* (5), 590-601.

[3] Chamberlin, M., Mcgrath, J., Waskell, L. (1970). New RNA polymerase from Escherichia coli infected with bacteriophage T7. *Nature*, *228*, 227-228.

[4] Chamberlin, M., Ring, J. (1973). Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase I. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *248*, 2235-2244.

[5] Tabor, S. (2001). Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, *Chapter 16*, Unit16.2.

[6] Moffatt, BA., Dunn, JJ., Studier, FW. (1984). Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Journal of molecular biology*, *173*, 265-269.

[7] Cheetham, GM., Jeruzalmi, D., Steitz, TA. (1999). Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase–promoter complex. *Nature*, *399*, 80-81.

[8] Sousa, R., Chung, YJ., Rose, JP., Wang, BC. (1993). Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature, 364*, 593-594.

[9] Sousa, RJ., Mukherjee, S. (2003). T7 RNA polymerase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology, 73*, 1-14.

[10] Jorgensen, ED., Durbin, RK., Risman, SS., McAllister, W. (1991). Specific contacts between the bacteriophage T3, T7, and SP6 RNA polymerases and their promoters. *Journal of Biological Chemistry, 266*, 645-651.

[11] Miroux, B., Walker, J.E. (1996). Overproduction of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology, 260* (3), 289-298.

[12] Song, H., Kang, C. (2001). Sequence-specific termination by T7 RNA polymerase requires formation of paused conformation prior to the point of RNA release. *Genes to Cells, 6*, 291-301.

[13] Tunitskaya, V., Kochetkov, S. (2002). Structural–functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase. *Biochemistry, 67*, 1124-1135.

[14] Pamela, R., Duschl, J., Klaus, R. (2004). Optimized RNA ampliffication using T7-RNA-polymerase based in vitro transcription. *Anal Biochem, 334*, 164-174.

[15] Novak, PK., Lee, JS., Mikaelyan, A., Patel, V., and Thorgeirsson SS. (2004). Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *BioTechniques, 37*, 580-588.

[16] Russell, S., Meadows, LA., and Roslin, RR. (2008). Microarray Technology in Practice. 464-465.

[17] Nilsen, TW., Rio, DC., Ares, M. (2013). High-yield synthesis of RNA using T7 RNA polymerase and plasmid DNA or oligonucleotide templates. *Cold Spring Harbor Protocos, 11*, pdb.prot078535.

[18] Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., et al. (2006). F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *PNAS, 103* (6), 1994-1999.

[19] Nalbandi, K., Mirzaie, A., Khodaei, L., Khodakaramian, G. (2017). Cloning and Transformation of Bacteriophage T7 RNA Polymerase in Tobacco. *Genetic Engineering and Biosafety Journal, 5*, 67-75.

[20] Wei, J., Tian, J., Pan, G., Xie, J., Bao, J., Zhou, Z. (2017). Development and application of a T7 RNA polymerase-dependent expression system for antibiotic production improvement in Streptomyces. *Biotechnology letters, 39*, 857-864.

[21] Cheng, H., Dufu, k., Lee, C., Dias, A. (2006). Human mRNA export machinary in recruited of the 5´ end of mRNA. *Cell, 127*, 1389-1400.

[22] Sheen, H., & White, KA. (2018). Expression of T7-based constructs in tobacco cells. *Biochemical and biophysical research communications, 499* (2), 196-201.

[23] Calvopina-Chavez, D. G., Gardner, M. A., & Griffitts, J. S. (2022). Engineering efficient termination of bacteriophage T7 RNA polymerase transcription. *G3: Genes, Genomes, Genetics, 12* (6), jkac070.

[24] McManus, J. B., Emanuel, P. A., Murray, R. M., & Lux, M. W. (2019). A method for cost-effective and rapid characterization of engineered T7-based transcription factors by cell-free protein synthesis reveals insights into the regulation of T7 RNA polymerase-driven expression. *Arch Biochem Biophys, 674*,108045.

[25] Lundstrom, K. (2007). *Structural genomics and drug discovery. Cell, 11*, 224–238.

[26] Angius, F., Ilioaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., Abou-Hamdan, A., Uzan, M., Zito, F., & Miroux, B. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Nature Scientific Reports, 8*, 8572.

[27] Wang, W., Li, Y., Wang, Y., Shi, C., Li, C., Li, Q., Linhardt, RJ. (2018). Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnol Adv. 36* (8), 2129-2137.

[28] Tan, SI., & Ng, IS. (2020). New Insight into Plasmid-Driven T7 RNA Polymerase in Escherichia coli and Use as a Genetic Amplifier for a Biosensor. *ACS synthetic biology, 9* (3), 613-622.

[29] Sun, XM., Zhang, ZX., Wang, LR., Wang, JG., Liang, Y., Yang, HF., Tao, RS., Jiang, Y., Yang, JJ., & Yang, S. (2021). Downregulation of T7 RNA polymerase transcription enhances pET-based recombinant protein production in Escherichia coli BL21 (DE3) by suppressing autolysis. *Biotechnology and bioengineering, 118* (1):, 153-163.

[30] Zhang, G., Yang, J., Qin, F., Xu, C., Wang, J., Lei, C., Hu, J., & Sun, X. (2019). A Reverse Genetics System for Cypovirus Based on a Bacmid Expressing T7 RNA Polymerase. *Viruses, 11* (4), 314-315.