دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

شناسایی، جداسازی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پیشبر اختصاصی غده گیاهان

راحله قنبری محب سراج[1] و مسعود توحیدفر[2]

۱- دانشجوی دکترا، رشته بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- عضو هیئت علمی، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، (نویسنده مسوول: Gtohidfar@yahoo.com)
تاریخ ارسال: ۹۸/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۲۲
صفحه: ۱ تا ۱۰

چکیده

بررسی حاضر با هدف شناسایی پیشبر مناسب برای اندام غده گیاهی در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. بدین‌منظور ابتدا توالی‌های مربوط به پیشبر گیاهان غده‌ای مختلف در سایت NCBI جستجو شد. توالی‌ها همردیف شدند و آغازگرهای هدف از نقاط محافظت‌شده طراحی شدند. تجزیه و تحلیل نتایج PCR، حضور پیشبر موردنظر را در گیاهان سیب‌زمینی شیرین و تارو تایید کرد. در ادامه، به‌منظور تایید بیشتر، تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی شامل تعیین عناصر سیس، فاکتورهای رونویسی و عملکرد آن‌ها، فاکتورهای رونویسی با بیان بالا و پایین صورت گرفت. در نهایت پیشبر پیش‌بینی‌شده با پیشبر کلاس یک پاتاتین از لحاظ عناصر سیس و عملکرد مقایسه شد. نتایج تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد پیشبر موردنظر دارای عناصر سیس عمومی و اختصاصی می‌باشد. عناصر سیس عمومی در اغلب پیشبرها وجود دارد و در فعال‌سازی و تنظیم پیشبر، فرآیندهای سلولی، فرآیندهای نموی و تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند. عناصر سیس اختصاصی غده، در بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای و نشاسته فعال می‌باشد. مقایسه بین پیشبر مورد مطالعه و پیشبر اختصاصی غده پاتاتین، تاییدی بر فعالیت پیشبر مورد مطالعه در غده بود. پیشبر غده، در آینده می‌تواند برای بیان پروتئین‌های مختلف در غده گیاهان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پاتاتین، تارو، سیب‌زمینی‌شیرین، عناصر سیس، فاکتورهای رونویسی

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گیاهان می‌توانند گزینه مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب عملکردی با طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های ساختاری باشند. بسیاری از پروتئین‌های دارویی پستانداران در گیاهان سنتز می‌شوند (۲۲). این پروتئین‌ها در برگ‌ها، میوه‌ها، ریشه‌ها، غده‌ها و بذرهای گیاهی تولید شده و بخش‌های مختلف زیرسلولی مانند سیتوپلاسم، شبکه آندوپلاسمی یا فضای آپوپلاستی را هدف قرار می‌دهند (۵). غده به‌عنوان اندام ذخیره‌سازی می‌تواند برای تجمع مقدار زیادی پروتئین استفاده شود (۳). به‌منظور رسیدن به این هدف، شناسایی و جداسازی پیشبرهای اختصاصی قوی و جدید ضروری می‌باشد. پیشبرها می‌توانند براساس فعالیت خود به پیشبرهای عمومی، پیشبرهای اختصاصی بافت، پیشبرهای القایی و پیشبرهای مصنوعی تقسیم‌بندی شوند (۴۰). پیشبرهای عمومی مثل CaMV 35S که به‌طور معمول در مهندسی ژنتیک گیاهی به‌طور وسیع استفاده می‌شوند. اگر تراژن مورد نظر در زمان و بافت نادرستی از گیاه بیان شود، احتمال دارد نتایج غیرقابل انتظاری در رشد و نمو گیاه حاصل شود (۲۸). این نه‌تنها باعث هدرروی انرژی گیاه میزبان می‌شود، بلکه می‌تواند برای آنها مضر نیز باشد. در مقابل، پیشبرهای اختصاصی، بیان ژن در بافت یا مرحله نموی خاصی را کنترل کرده و تغییرات در تراریخته حاصل از این پیشبرها تنها در بافت خاصی تظاهر می‌یابند. پیشبرهای اختصاصی برای تجمع محصول تراریخته در اندام‌های معین مانند بذور و غده‌ها و افزایش عملکرد اقتصادی مفیدند و اثر منفی روی سایر قسمت‌های گیاه ندارند (۲).

بنابراین برای دستیابی به بیان کارآمد تراژن در زمان یا بافت گیاهی خاص، استفاده از پیشبرهای اختصاصی بافت ترجیح داده می‌شوند (۳۸). اغلب پیشبرهای اختصاصی غده در سیب‌زمینی توسط مسیرهای نموی و متابولیکی کنترل‌شده (۲۷) و با توجه به محدودیت موجود، در طیف وسیعی قابل استفاده نمی‌باشند. از این‌رو، برای افزایش سطح بیان پروتئین‌های نوترکیب در غده گیاه، شناسایی پیشبرهای جدید اختصاصی غده ضروری است.

جستجو برای این پیشبرها روی ژن‌های دخیل در رسوب نشاسته و ذخیره‌سازی گلیکوپروتئین‌ها تمرکز دارد. چندین پیشبر شامل، اسپورامین[1]، GBSS و بتاآمیلاز[2] به‌عنوان پیشبرهای ویژه اندام ذخیره‌ای یا غده، در کاساوا و هویج گزارش شده‌اند. این پیشبرها اغلب حاوی عناصر مختلف پاسخ به قند مانند موتیف TGGACGG موجود در پیشبرهای اسپورامین و بتاآمیلاز هستند (۲۳). تنظیم ژن‌ها در حال حاضر با استفاده از مهندسی فاکتورهای رونویسی به‌طور خاص برای اتصال عناصر تنظیمی سیس درون پیشبرها، امکان‌پذیر است (۳۲) و تنظیم ژن‌های اختصاصی اندام ذخیره‌ای یا غده روش خوبی برای تولید محصولات با صفات زراعی بالاتر و محتوای غذایی بهتر خواهد بود. باتوجه به اهمیت فراوان غده در مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌ویژه پروتئین‌های دارویی، در این تحقیق به شناسایی و جداسازی پیشبر اختصاصی غده پرداخته شده و هدف از این بررسی شناسایی و جداسازی پیشبر غده جهت استفاده در مهندسی ژنتیک و ذخیره‌سازی پروتئین نوترکیب موردنظر با مقادیر بالا در غده‌های گیاهی است.

1- Sporamine
2- Beta-Amylase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]
[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

مواد و روش‌ها

به‌منظور یافتن پیشبر غده مناسب، ابتدا گیاهان غده‌ای مختلف شناسایی و توالی پیشبر آن‌ها از سایت NCBI دریافت و ذخیره شد. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده بلاست شده و تمامی توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار T-Coffee هم‌ردیف شدند (شکل ۱). از نقاط محافظت‌شده با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo و Vector NTI طراحی آغازگرها صورت گرفت (جدول ۱). جهت تایید وجود این پیشبر، دو گیاه غده‌ای شامل سیب‌زمینی‌شیرین و تارو انتخاب و استخراج DNA از غده آن‌ها به روش CTAB انجام شد (۸).

تجزیه و تحلیل PCR

نواحی هدف با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده و طی واکنش PCR با برنامه دمایی یک چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی دو رشته، ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط رشته جدید هر کدام به‌مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هفت دقیقه تکثیر شد. سپس محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بررسی و بعد از خالص سازی، توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

جهت پیش‌بینی پیشبر از نرم‌افزار Softberry با حدآستانه نمره 0.02 LDF برای موقعیت پیشبر و ۰/۰۴ برای موقعیت تقویت‌کننده و جهت جستجوی سایت‌های تنظیمی عامل سیس از نرم‌افزار PlantCARE استفاده شد. به‌منظور تعیین برخی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی و مکان‌های اتصال آن‌ها در این پیشبر و همچنین فاکتورهای رونویسی با بیشترین و کمترین بیان، از نرم‌افزار Genomatix استفاده شد. جهت مقایسه بیان فاکتورهای رونویسی از نمره Z استفاده شد. نمره‌های Z بالای ۲ به‌عنوان بیش‌بیان و نمره‌های Z کمتر از ۲- به‌عنوان کم‌بیان در نظر گرفته شد. در نهایت، عناصر سیس و عملکرد آن‌ها در پیشبر کلاس یک پاتاتین با استفاده از نرم‌افزار Plant CARE و PLACE شناسایی و با پیشبر مورد مطالعه مقایسه شد.

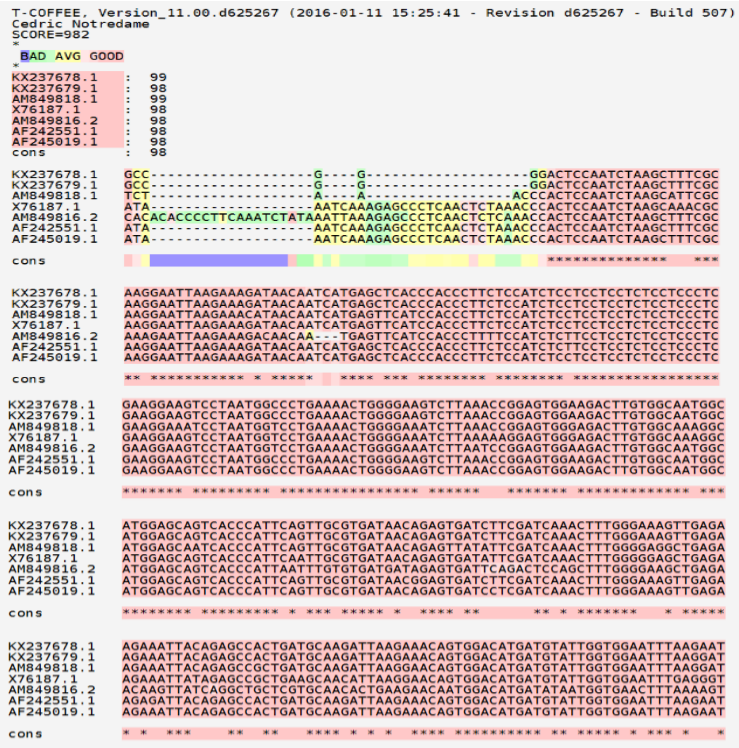
جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای پیشبر هدف

Table 1. Designed primers for the target promoter

Sequence (5' → 3')	Name	Base No.	TM
GGAGAGACTTCGAGACTC	F	۱۸	۵۶
AGGGTGGATGAACTCATGAT	R	۲۰	۵۶

مقایسه پیشبر مورد مطالعه با پیشبر اختصاصی غده

عناصر سیس مهم پیشبر اختصاصی غده (پیشبر کلاس یک پاتاتین) و همچنین عملکرد آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار PLACE شناسایی و سپس عناصر سیس پیشبر مورد مطالعه با پیشبر پاتاتین اختصاصی غده مقایسه شد.



شکل ۱- همردیف سازی توالی‌های حاصل از بلاست با استفاده از نرم‌افزار T-Coffee

Figure 1. Alignment of blast sequences using T-Coffee software

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]

[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

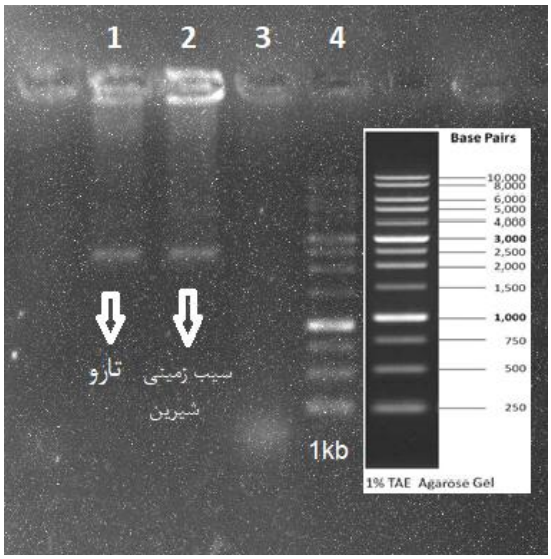
نتایج و بحث

طراحی آغازگر و تجزیه و تحلیل نتایج PCR

نتایج آزمون T-coffee جهت مشخص‌کردن مناطق محافظت‌شده در شکل ۱ آورده شده است. طبق شکل مناطق صورتی‌رنگ به‌عنوان مناطق محافظت‌شده در نظر گرفته شده و در نهایت پرایمرها براساس این مناطق طراحی شده‌اند.

نتایج حاصل از پرایمر-بلاست در سایت NCBI منجر به شناسایی توالی با بیشترین شباهت شد. طول توالی دریافت‌شده از سایت حدود ۲۳۰۹ جفت‌باز بوده که ۱۹۳۰ جفت‌باز آن متعلق به پیشبر و ۳۷۹ جفت‌باز آن متعلق به ژن پیش‌ساز دیوسکورین سه بود.

تکثیر پیشبر با استفاده از آغازگرها و توسط PCR صورت گرفت، محصول PCR باندی با طول حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز در دو گیاه تارو و سیب‌زمینی‌شیرین بود. اندازه باند حاصل از دو گیاه با اندازه توالی موردانتظار (۱۹۳۰ جفت‌باز) مطابقت داشت. چاهک شماره یک و دو به‌ترتیب متعلق به محصول PCR تارو و سیب زمینی شیرین بوده، چاهک شماره سه کنترل منفی می‌باشد که در آن DNA استفاده نشده است و هدف تشخیص وجود آلودگی بوده و در نهایت چاهک شماره چهار مربوط به DNA Ladder می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر الکتروفورز PCR با آغازگرهای طراحی‌شده
Figure 2. PCR electrophoresis image with designed primers

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

تجزیه و تحلیل Softberry روی توالی مربوط به پیشبر مورد مطالعه نشان داد که یک پیشبر در ناحیه ۱۸۸۵ و جعبه TATA در ناحیه ۱۸۵۲ و یک تقویت‌کننده در ناحیه ۱۲۰۹ است که تاییدی بر پیشبر بودن توالی حاصل است.

نرم‌افزار PlantCARE تعداد ۲۵ ناحیه تنظیمی سیس در توالی موردنظر شناسایی کرد، برخی از مهم‌ترین نواحی سیس به‌همراه موقعیت، نمره ماتریس، توالی و عملکرد آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

پیشبر مورد مطالعه دارای عناصر سیس متعددی است که نقش اساسی در غده گیاه ایفا می‌کنند، یکی از مهم‌ترین عناصر سیس موجود در این پیشبر مربوط به تولید نشاسته است، باتوجه به‌اینکه ترکیب غالب غده نشاسته است بنابراین این عنصر سیس جزو عناصر اختصاصی و مختص به غده است. از عناصر دیگر موجود در غده شامل عناصر القای تحمل شرایط بی‌هوازی (آنوکسی) و القای مقاومت به تنش است که منجر به افزایش تحمل غده در شرایط بی‌هوازی و تنش در خاک می‌شود زیرا با توجه به اینکه غده‌ها انرژی و مواد مغذی برای رشد دوباره در طول فصل رشد بعدی را فراهم می‌کنند لذا برای زنده‌ماندن در زمستان‌های طولانی یا ماه‌های خشک نیاز به تحمل شرایط محیطی و خاک را دارند (۷). این پیشبر همچنین دارای عنصر 5UTR Py-rich stretch است که منجر به افزایش سطح رونویسی و تجمع نشاسته می‌شود که در زمان تشکیل غده منجر به پرشدن سریع غده خواهد شد (۲۱) و عنصر بیان مریستم نیز در جوانه‌زنی دوباره غده نقش دارد (جدول ۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]
[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

جدول ۲- شناسایی عناصر سیس پیشبر با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE
Table 2. Identification of promoter cis elements using the PlantCARE software

ناحیه سیس	موقعیت	نمره ماتریس	توالی	عملکرد
5UTR Py-rich stretch	۱۶۹۳	۱۳	TTTCTCTCTCTCTC	افزایش سطح رونویسی
ARE	۸۹۸ ۱۱۷۹	۶	TGGTTT	ضروری برای القای بی‌هوازی
MBS	۵۲۵	۶	CAACTG	مکان اتصال MYB و دخیل در القای خشکی
Skn-1_motif	۱۶۸۹	۵	GTCAT	مورد نیاز برای تولید نشاسته
CAT-box	۳۴۴	۶	GCCACT	مربوط به بیان مریستم
GC-motif	۱۱۱	۶	CCCCCG	عنصر شبه تقویت‌کننده دخیل در القای آنوکسی
GCN4_motif	۳۴۱	۷	CAAGCCA	دخیل در تولید نشاسته

تجزیه و تحلیل توالی با استفاده از نرم‌افزار PLACE نیز نشان داد که این پیشبر دارای ژن ذخیره‌سازی است که در ذخیره‌سازی نشاسته و پرشدن غده نقش دارد، همچنین این پیشبر در افزایش بیان ژن و مقاومت به بی‌آبی هم موثر است (جدول ۳).

جدول ۳- شناسایی عملکردهای مهم عناصر سیس پیشبر هدف با استفاده از نرم‌افزار PLACE
Table 3. Identification of the important functions of target promoter cis elements using the PLACE software

اسم ناحیه	موقعیت	توالی سیگنال	عملکرد
EBOXBNNAPA	۲۷۸ ۳۸۳	CANNTG	ژن پروتئین ذخیره‌ای
QELEMENTZMZM13	۳۳۸	AGGTCA	افزایش بیان ژن
MYBCORE	۱۰۴۶	CNGTTR	تنظیم ژن‌های واکنش به تنش آبی
SSEEDPROTBANAPA۲	۱۱۸۸	CAAACAC	ژن ذخیره سازی
CTRMCAMV35S	۱۶۸۵	TCTCTCTCT	افزایش بیان ژن

برخی از مکان‌های اتصال فاکتورهای رونویسی با اهمیت در غده و فاکتورهای رونویسی مربوط به آن در جدول ۴ و ۵ ذکر شده است. میزان Core similarity در این تجزیه و تحلیل یک می‌باشد که در آن بیشترین میزان بازهای حفاظت‌شده در توالی وجود دارد و میزان Matrix similarity آن ۰/۹۵ در نظر گرفته شد. تطابق کامل ماتریس نمره یک می‌باشد که در آن هر جایگاه توالی با حفاظت‌شده‌ترین نوکلئوتید در آن جایگاه در ماتریس مطابقت دارد. پیشبر مورد مطالعه دارای فاکتورهای رونویسی GmNAC است که در واکنش مرگ برنامه‌ریزی سلول نقش دارند و مانع از فساد غده‌های آسیب‌دیده در خاک می‌شوند (۱۱).

جدول ۴- تعیین فاکتورهای رونویسی مربوط به هر دمین در پیشبر مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Genomatix
Table 4. Determination of transcription factors related to each domain in desired promoter using Genomatix software

خانواده ماتریس	آگاهی خانواده	موقعیت	توالی	فاکتورهای رونویسی	درصد تطابق پیشبر
CNAC	فاکتورهای NAC تنظیم کلسیم	۴۰۱ ۱۳۱۱	atttGCTTggccattggtcca taagGCTTcatgccttcctaa	CBNAC , NTL9	۶۰/۱ درصد
SALT	عناصر پاسخ به شوری و خشکی	۴۶۹	caaaagtGGTGgcat	ALFIN1	۳۶/۹ درصد
HMGF	فاکتورهای گروه تحرک بالا	۶۸۰ ۶۹۴ ۶۹۷ ۸۴۲ ۸۵۴ ۸۶۲ ۸۹۶ ۱۳۳۸ ۱۳۴۷ ۱۵۴۷	gtctTATTtttacct tcttTATTattttaa ttatTATTttaattt tttTATTtactttt tttTATTtttttat tttTATTtttttaa ggttTATTtttattg atctTATTtttttta tttTATTttgtgga ttccTATTtctattg	HMG-I/Y, HMGI/Y AT-1SNBP, NAT2, SB16A, SB16B PNF-1, PRF-1	۴۹/۵ درصد
PCDR	دخیل در واکنش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول	۱۰۸۵ ۱۰۸۷ ۱۰۸۹	TGTGtgt TGTGtgt TGTGttt	GmNAC30, GmNAC81	۶۳/۲ درصد

تعدادی از فاکتورهای رونویسی با اهمیت دارای نمره Z بالاتر از دو و پایین‌تر از منفی دو در جدول پنج نشان داده شده است. نمره Z نشان می‌دهد بیان ژن مورد نظر چه مقدار و در چه جهتی از میانگین توزیع خود انحراف دارد. با توجه به جدول در دمین‌های AT-hook، NAC، MYB و DOF-C2C2 بیشترین میزان فاکتورهای رونویسی قرار گرفته و در دمین‌های LOB، MYB و AP2 کمترین میزان فاکتورهای رونویسی قرار گرفته است. فاکتورهای گروه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]
[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

تحرک بالا در افزایش بیان ژن ذخیره‌سازی در غده نقش دارند، در پیشبر مورد مطالعه فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله HMG و SB16 به دمین AT-hook متصل شده و باعث افزایش رونویسی و همانندسازی ژن موردنظر می‌شوند (۳۷، ۹، ۳۰). پروتئین‌های مختلف NAC در پیشبر مورد مطالعه به دمین NAC متصل‌شده و تشکیل مریستم، ریشه و شاخه جانبی را القا می‌کند، این دمین تشکیل گیاه جدید از غده‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد (۱۰). فاکتورهای رونویسی خانواده P$CCAF از جمله RVE1 با اتصال به دمین MYB باعث تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در غده می‌شوند (۲۴، ۴، ۱). فاکتورهای رونویسی گروه P$DOFF با اتصال به دمین DOF تشکیل غده را القا می‌کنند (۱۶).

جدول ۵- شناسایی فاکتورهای رونویسی با بیان بالا و پایین در پیشبر هدف با استفاده از نرم‌افزار Genomatix

Table 5. Identification of transcription factors with high and low expression in target promoter using Genomatix software

خانواده TF	فاکتورهای رونویسی	دمین اتصال	Z-score (ژنوم)	Z-score (پیشبرها)
P$HMGF	HMG-I/Y, HMGI/Y, AT-1SNBP, NAT2, SB16A, SB16B, PNF-1, PRF-1	فاکتورهای گروه تحرک بالا، دمین AT-hook	۴/۰۳	۲/۷۳
P$NACD	ANAC087, AT1G19040, CUC1, NAC016, NAC017, NAC020, NAC028, NAC038, NAC045, NAC050, NAC053, NAC057, NAC058, NAC096, NAC103, NAC13, NAC2, NAC78	دمین NAC	۳/۶۵	۴/۴۵
P$CCAF	AT3G10113, AT4G01280, AT5G52660, CCA1, EPR1, LCL1, LHY, RVE1, RVE8	دمین MYB	۳/۳۷	۲/۶۲
P$DOFF	AT1G29160, AT1G47655, AT1G64620, AT1G69570, AT2G28810, AT2G34140, AT3G52440, AT5G02460, AT5G65590, AT5G66940, ATDOF4.2, CDF1, CDF3, DAG1, DAG2, DOF1, DOF2, DOF2.4, DOF4.4, DOF4.5, DOF4.7, DOF6, HCA2, OBP1, OBP2, OBP3, OBP4, GmDof11, GmDof4, BPBF, NTBBF1.2, NtBBF1, DOF3, RPBF, BPBF, WPBF, pbf1	دمین انگشت روی DOF-C2C2	۱/۹۹	۲/۰۷
P$LBDF	, ASL9, LBD13, LBD16, LBD18, LBD19, LBD2, LBD23, LBD4, AS2 LBD41, LOB	دمین LOB	-۱/۴۷	-۲/۰۱
P$MYBL	MIXTA, AS1, AS2, DUO1, MYB0, MYB101, GaMYB, MYB118, FIF1, MYB119, MYB23, MYB30, TT2, MYB31, MYB33, MYB52, MYB56, MYB65, MYB66, MYB70, MYB73, MYB77, MYB81, MYB96, MYB98, MYBR1, GhMYB109, GaMYB, NtMYBAS1, MYB.PH3	دمین MYB	-۲/۲۷	-۲/۵۸
P$GCCF	ABR1, AT1G28160, AT2G33710, AT4G18450, ERF1, AT5G07310, CRF10, AT5G65130, DREB2C, DRNL, EBP, ERF-1, ERF1, ERF10, ERF11, ERF15, ERF2, ERF3, ERF4, ERF5, ERF6, ERF7, ERF71, ERF8, ERF9, ESE1, ESE3, ESR1, ORA47, ORA59, RAP2.10, RAP2.11, RAP2.12, RAP2.6, RRTF1, tny, ERFLP1, ORCA1, ORCA2, ORCA3, CarERF116, ERF3, GhEREB2, GhEREB3, JcERF, ERN1, ERN2, ERN3, EREBP-1, EREBP-2, EREBP-3, EREBP-4, JERF3, NTERF5, NtCEF1, OPBP1, TSI1, OsEBP-89, SodERF3, JERF1, LOC543910, LOC544041, TSRF1, LOC544042, SlCRF1, TSI-1, EREBP1, TiERF1, TaERF1	دمین AP2	-۲/۴۱	-۳/۱۹

مقایسه پیشبر هدف با پیشبر کلاس یک پاتاتین

تجزیه و تحلیل توالی پیشبر اختصاصی غده (کلاس یک پاتاتین) با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE با توالی مورد مطالعه نشان داد این پیشبر همانند پیشبر مورد مطالعه در پاسخ به آبسیزیک‌اسید، متیل‌جاسمونات، اکسین و القای خشکی، آنوکسی و تولید نشاسته نقش دارد (جدول ۶). علاوه‌بر این، پیشبر مورد مطالعه در افزایش سطح رونویسی و بیان مریستم نیز نقش دارد که عنصر سیس مربوط به آن در پیشبر پاتاتین هم وجود دارد.

جدول ۶- شناسایی عناصر سیس پیشبر پاتاتین با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE

Table 6. Identification of patatin cis elements using PlantCARE software

ناحیه سیس	موقعیت	نمره ماتریس	توالی	عملکرد
ABRE	۹۳۰ ،۴۲۹	۵	ACGTG	دخیل در پاسخ به آبسیزیک‌اسید
CGTCA-motif	۲۷۸	۵	CGTCA	دخیل در پاسخ به متیل‌جاسمونات
MBS	۵۶۶ ،۲۵۵	۶	CAACTG	مکان اتصال MYB و دخیل در القای خشکی
TGA-element	۸۲۴	۶	AACGAC	عنصر پاسخ به اکسین
TGACG-motif	۲۹۷ ،۲۶۳	۵	TGACG	عنصر تنظیمی عامل سیس دخیل در پاسخ به متیل‌جاسمونات
GC-motif	۱۱۱	۶	CCCCCG	عنصر شبه تقویت‌کننده دخیل در القای آنوکسی
GCN4_motif	۳۴۱	۷	CAAGCCA	دخیل در تولید نشاسته

در ادامه تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار PLACE (جدول ۷) نشان داد پیشبر مورد مطالعه شامل عناصر سیس مربوط به ژن پروتئین ذخیره‌ای، پاسخ به کم‌آبی و شرایط بی‌هوازی، تولید نشاسته، ژن سنتز گلوتامین و پاسخ به ساکارز می‌باشد که این عناصر مختص به پیشبر غده می‌باشند (۱۷). با توجه به جدول ۳، پیشبر مورد مطالعه علاوه‌بر عملکردهای اشاره‌شده، نقش اساسی در افزایش بیان ژن دارد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]
[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

جدول ۷- شناسایی عملکردهای مهم عناصر سیس پیشبر پاتاتین با استفاده از نرم‌افزار PLACE
Table 7. Identification of the important functions of patatin cis elements using PLACE software

اسم ناحیه	موقعیت	توالی سیگنال	عملکرد
RYREPEATBNNAPA	۲۳	CATGCA	پاسخ به ABA
EBOXBNNAPA	۱۲۴	CANNTG	ژن سنتزکننده پروتئین ذخیره‌ای
MYCCONSENSUSAT	۱۲۴	CANNTG	ژن پاسخ به کم آبی
ANAERO3CONSENSUS	۱۵۳	TCATCAC	ژن‌های بی‌هوازی
SURE2STPAT21	۱۷۷	AATACTAAT	عنصر پاسخ به ساکارز
TATABOX5	۳۳۱	TTATTT	ژن سنتز گلوتامین
ACGTOSGLUB1	۴۳۴	GTACGTG	تولید نشاسته
CURECORECR	۴۳۴	GTAC	دخیل در پاسخ به اکسیژن
BBOXSITE1STPAT	۷۵۱	GCTAAACAAT	بیان ژن اختصاصی غده

پیشبر پاتاتین دارای عناصر پروتئین ذخیره‌ای، پاسخ به ساکارز، سنتز گلوتامین و تولید نشاسته است که تمامی این عناصر در پرشدن غده نقش دارند، همچنین دارای عناصر پاسخ به ABA، پاسخ به کم آبی، پاسخ به کمبود اکسیژن است که در تحمل غده به شرایط تنش نقش دارد (۲)، که در مقایسه با پیشبر مورد مطالعه مشخص شد که همه این عناصر در این پیشبر نیز وجود دارند (جدول ۷).

اساس مولکولی نمو و اندام‌زایی در همه موجودات چند سلولی به‌ویژه گیاهان بیان افتراقی ژن می‌باشد. بیان ژن به‌طور عمده در سطح رونویسی کنترل می‌شود و نقش اصلی در این تنظیم متعلق به منطقه تنظیم ژن یعنی پروموتر است. در همین ارتباط بررسی ویژگی‌های عملکردی و ساختاری پروموترهای ژن یکی از نقاط داغ بیولوژی فعلی است. علاوه‌بر این، درک عملکرد پروموتر برای بعضی کارهای عملی مثل ایجاد گیاهان تراریخته سودمند است. پروموترهای اختصاصی بافت می‌تواند برای بیان کارآمد ترانس ژن‌ها در زمان‌های خاص یا در بافت‌های گیاهی خاص جهت تولید گیاهان تراریخت جدید بکار رود (۱۵). این گیاهان با اهداف مختلفی تولید می‌شوند که یکی از آن‌ها تولید واکسن خوراکی می‌باشد، این واکسن‌ها از طریق معرفی ژن مطلوب انتخابی به گیاهان تولید و سپس این گیاهان تغییریافته، تولید پروتئین‌های کدشده را القا می‌کنند. به‌منظور افزایش مقدار تولید این پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از پروموترهای گیاهی قوی جهت افزایش سطح بیان آنتی‌ژن انجام می‌شود. قدرت پروموتر یک پیش‌نیاز برای ساخت موفق پروموترهای سنتزی است (۱۴)، که خود تحت تاثیر متغیرهای متعددی از جمله فاکتورهای عامل ترانس، ترکیب عناصر سیس، افزایش‌دهنده‌ها، توالی‌های فاصله، توالی‌های جانبی و اثرات مکانی قرار دارد. مطالعات نشان می‌دهد که طول و ترکیب بازی توالی‌های جانبی می‌تواند ویژگی‌های پروموتر را تعیین کند (۴۱،۲۶). خصوصیات پروموتر، عامل تعیین‌کننده حیاتی بیان ژن و بنابراین عملکرد است. پروموترهای طبیعی با الگو و سطح بیان ایده‌آل برای کاربردهای ویژه بیوتکنولوژی تراریخت اغلب به‌دلیل محدودیت‌های پروموترهای طبیعی شناسایی‌شده یا خاموشی ژن برمبنای هومولوژی (HBGS) در دسترس نیستند. توسعه پروموترهای سنتزی متشکل از عناصر سیس مشخص، دارای پتانسیل قابل توجهی برای بیان مکانی-زمانی مناسب ژن است که قدرت و دوام مناسب را می‌تواند فراهم کند. پروموتر غده یک پروموتر اختصاصی است که در زمان تشکیل غده فعال می‌شود. برای افزایش سطح بیان پروتئین‌های نوترکیب در غده سیب‌زمینی، شناسایی پیشبرهای جدید اختصاصی غده ضروری است.

در این پژوهش، به‌منظور یافتن پیشبر غده مناسب، پیشبر گیاهان غده‌ای مختلف شناسایی، مقایسه و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد پیشبر غده شناسایی‌شده در این مطالعه دارای دمین‌های متعددی است که فاکتورهای رونویسی مختلفی به آن‌ها متصل و منجر به افزایش یا کاهش بیان ژن‌های مربوطه می‌شوند. برخی از ویژگی‌های این پیشبر شامل ذخیره‌سازی نشاسته و پروتئین‌ها، تحمل شرایط نامساعد محیطی مانند تنش‌ها و آنوکسی، کاهش پوسیدگی غده در خاک، جوانه‌زنی سریع در زمان کاشت، پاسخ به هورمون‌های مختلف محرک رشد می‌باشد. انتخاب پیشبری با کارایی بالا و همچنین بیان هدفمند در بافت‌ها می‌تواند در کارایی تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های گیاهی بسیار موثر باشد (۳۵،۱۳). استراتژی پروموتر سنتزی به‌طور گسترده‌ای برای تنظیم دقیق بیان ژن در مهندسی ژنتیک به‌کار می‌رود. پروموترهای اختصاصی بافت و پروموترهای القایی زیادی وجود دارد که پیش از این بررسی شده و مزایای آن‌ها در مهندسی محصولات نشان داده شده است (۴۰،۳۹). روش نوسازی اجازه ساخت پروموترهای سنتزی با عناصر تنظیمی سیس ویژه، به‌صورت جداگانه را می‌دهد (۲۵). عناصر معرفی‌شده از پروموترهای مختلف را می‌توان در یک پروموتر سنتزی با حفظ عملکرد مربوطه به‌طور همزمان ترکیب کرد (۳۳). ها و همکاران (۱۵) به‌منظور استخراج یک پروموتر با بیان قوی در غده‌های سیب‌زمینی، ناحیه پروموتر ژن لاکاز را از سیب‌زمینی جدا کردند و فعالیت آن را در گیاهان تراریخته مانند سیب‌زمینی، تنباکو و گوجه مورد بررسی قرار دادند. توانایی پروموتر لاکاز برای القای گزارشگر بتا-گلوکورونیداز (GUS) در لاین‌های سیب‌زمینی تراریخت مستقل بررسی و با پروموتر ساختاری CaMV35S مقایسه شد. پروموتر لاکاز بیان ویژه غده را در سیب‌زمینی تراریخت بدون درنظرگرفتن مرحله رشد القا کرد. این پروموتر به‌میزان ضعیفی به تنش شوری، تنش مانیتول و زخم‌های مکانیکی پاسخ داد اما به

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]
[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

تنش سرما پاسخی نداد. در تنباکوی تراریخت، بیان ضعیف GUS حاصل از پروموتر لاکاز در کل گیاه تشخیص داده شد در حالیکه در گوجه‌فرنگی تراریخت بیان GUS فقط در ریشه‌ها و بذرها تشخیص داده شد. در مطالعه‌ای دیگر کیم و همکاران (۱۸) پتانسیل پروموتر ژن ADP-گلوکز پیروفسفریلاز (ibAGP1) و پپتید ترانزیت (TP) آن را به‌عنوان یک سیستم بیان برای تولید انبوه پروتئین‌های خارجی در سیب‌زمینی مورد بررسی قرار دادند. پروموتر ibAGP1 و توالی TP آن به‌همراه GUS به‌عنوان ژن گزارشگر به سیب‌زمینی ترانسفورم شد و فعالیت GUS متعاقبا در گیاهان سیب‌زمینی تراریخت آنالیز شد. نتایج آن‌ها نشان داد در بافت‌های غده، فعالیت GUS در گیاهان تراریخت حاوی تنها پروموتر ibAGP1 در مقایسه با گیاهان تراریخت حاوی فقط پروموتر CaMV35S به‌میزان ۱۵/۶ برابر افزایش یافته است. فعالیت GUS در گیاهان تراریخت با اضافه‌کردن TP سیب‌زمینی شیرین به وکتور نوترکیب، با بافت‌های غده در مقایسه با CaMV35S افزایش ۲۶ برابری نشان داد. بنابراین آن‌ها پروموتر ibAGP1 و TP آن را به‌عنوان یک سیستم بیان ژن خارجی قوی برای تولید مولکولی در گیاهان سیب‌زمینی معرفی کردند. همچنین افقی و همکاران (۳۱) ژن کلسی‌تونین انسانی را در غده سیب‌زمینی با استفاده از پروموترهای اختصاصی بافت و پروموتر عمومی CaMV35S بیان کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که کلسی‌تونین می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی در سیب‌زمینی‌های تراریخت رونویسی شود. نتایج آزمون ایمنی نشان داد که بیان ویژه بافت در سیب‌زمینی منجر به افزایش پنج برابری تجمع کلسی‌تونین نسبت به بیان ساختاری در همه بافت‌های گیاهی شد.

پیشبر پاتاتین برای بیان هدفمند ژن سنتز اکسین و ژن ترابرنده سوکروز برای القای تولید غده در گیاهان سیب‌زمینی به‌کار گرفته شده است (۳۶،۱۹). همچنین از این پیشبر برای تولید کارتنوئید، سرم آلبومین انسانی، تولید آنتی‌ژن HBsAg و تولید واکسن اسهال در غده‌های سیب‌زمینی استفاده شده است (۲۰،۶،۱۲،۳۴). پاتاتین یکی از پروتئین‌های مهم ذخیره‌ای در غده‌های سیب‌زمینی است. پیشبر پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذرها و اندام‌های تولیدمثلی رویشی (مانند غده‌ها) گیاهان پیشبرهای قدرتمندی هستند که باعث سنتز فراوان پروتئین مربوط در آن بافت یا اندام خاص می‌شوند (۲۹،۳۴). آنالیز بیوانفورماتیکی پیشبر پاتاتین در این بررسی نشان داد که این پیشبر در پاسخ به آبسیزیک‌اسید، متیل‌جاسمونات، اکسین و القای مقاومت به خشکی، آنوکسی و تولید نشاسته، افزایش سطح رونویسی و بیان مریستم نقش دارد. اما ویژگی بارز پیشبر مورد مطالعه نسبت به پیشبر پاتاتین، وجود چندین دمین افزایش بیان ژن و فاکتورهای گروه تحرک بالا بود که نقش اساسی در رونویسی بالای ژن موردنظر دارند، این ویژگی بارز در پیشبر غده‌ای پاتاتین وجود نداشت که می‌تواند برتری این پیشبر را نشان دهد. باتوجه به ویژگی‌های شناخته‌شده مختلف در پیشبر شناسایی‌شده، می‌توان از آن جهت رسیدن به اهداف معین در تولید غده استفاده نمود که از آن جمله می‌توان تولید غده تراریخت به‌منظور اهداف دارویی و واکسن و همچنین باتوجه به اینکه سیب‌زمینی غذای اصلی بسیاری از مردم است جهت تامین پروتئین‌های ضروری بدن از آن استفاده کرده و پروتئین نوترکیب موردنظر را با مقادیر فراوان تولید نمود.

منابع

1. Agarwal, M., Y. Hao, A. Kapoor, C.H. Dong, H. Fujii, X. Zheng and J.K. Zhu. 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. Journal of Biological Chemistry, 281: 37636-37645.
2. Aghapour, M., A. Haghnazari and B. Baghban Kohnerouz. 2011. Cloning of patatin gene specific promoter in potato tubers. Master's Thesis, Zanjan University, Department of Agronomy and Plant Breeding, 65.
3. Artsaenko, O., B. Kettig, U. Fiedler, U. Conrad and K. Düring. 1998. Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. Molecular Breeding, 4: 313-319.
4. Cheng, H., S. Song, L. Xiao, H.M. So, Z. Cheng, D. Xie and J. Peng. 2009. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in Arabidopsis. PLoS Genetics, 5: 440-451.
5. Conrad, U. and U. Fiedler. 1998. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production of physiological functions and pathogen activity. Plant Molecular Biology, 38: 101-109.
6. Diretto, G., S. Al-Babili, R. Tavazza, V. Papacchioli, P. Beyer and G. Giuliano. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. PLoS ONE, 2(4): e350.
7. Dominy, N.J., E.R. Vogel, J.D. Yeakel, P. Constantino and P.W. Lucas. 2008. Mechanical properties of plant underground storage organs and implications for dietary models of early hominins. Evolutionary Biology, 35: 159-175.
8. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
9. Dragan, A.I., R. Carrillo, T.I. Gerasimova and P.L. Privalov. 2008. Assembling the human IFN-beta enhanceosome in solution. Journal. Journal of Molecular Biology, 384: 335-348.
10. Duval, M., T.F. Hsieh, S.Y. Kim and T.L. Thomas. 2002. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. Plant Molecular Biology, 50(2): 237-248.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]

[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

11. Faria, J.A.Q.A., P.A.B. Reis, M.T.B. Reis, G.L. Rosado, G.L. Pinheiro, G.C. Mendes and E.P.B. Fontes. 2011. The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. BMC Plant Biology, 11(129): 1471-2229.
12. Farran, I., J.J. Sanchez-Serrano, J.F. Medina, J. Prieto and A.M. Mingo-Castel. 2002. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. Transgenic Res, 11(4): 337-346.
13. Fischer, R., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou and R.M. Twyman. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. Curr Opin Plant Biol, 7(2): 152-8.
14. Gerdes, C.A., M.G. Castro and P.R. Lowenstein. 2000. Strong promoters are the key to highlyefficient, noninflammatory and noncytotoxic adenoviral-mediated transgenedelivery into the brain in vivo. Mol Therapy, 2: 330-338.
15. Ha, J., K. Moon, M. Kim, S. Park, K. Hahn, J. Jeon and H. Kim. 2015. The laccase promoter of potato confers strong tuber-specific expression in transgenic plants. Plant Cell Tiss Organ Cult, 120: 57-68.
16. Hannapel, D.J., P. Sharma, T. Lin and A.K. Banerjee. 2017. The Multiple Signals That Control Tuber Formation. Plant Physiol, 174(2): 845-856.
17. Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. Plant Science, 217-218:109-119.
18. Kim, T., Y. Goo, C. Lee, B. Lee, J. Bae and S. Lee. 2009. The sweet potato ADP-glucose pyrophosphorylase gene (ibAGP1) promoter confers high-level expression of the GUS reporter gene in the potato tuber. Comptes rendus biologies, 332(10): 876-85.
19. Kolachevskaya, O.O., V.V. Alekseeva, L.I. Sergeeva, E.B. Rukavtsova, I.A. Getman, D. Vreugdenhil, Y.I. Buryanov and G.A. Romanov. 2015. Expression of auxin synthesis gene tms1 under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization in vitro. J. Integr Plant Biol, 57(9): 734-44.
20. Lauterslager, T.G.M., D.E.A. Florack, T.J. van der Wal, J.W. Molthoff, J.P. Langeveld, D. Bosch, W.J. Boersma and L.A. Hilgers. 2001. Oral immunization of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. Vaccine, 19(17-19): 2749-55.
21. Liu, L., X. Zhang, F. Chen, A. Adam Elzamzami Mahi, X. Wu, Q. Chen and Y.F. Fu. 2017. Analysis of promoter activity reveals that GmFTL2 expression differs from that of the known flowering locus T genes in soybean. The Crop Journal, 5(5): 438-448.
22. Ma, J.K., PM. Drake and P. Christou. 2003. The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. Nature Reviews Genetics, 4:794-805.
23. Maeo, K., T. Tomiya, K. Hayashi, M. Akaike, A. Morikami, S. Ishiguro and K. Nakamura. 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. Plant Molecular Biology, 46:627-637.
24. Mandaokar, A. and J. Browse. 2009. MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. Plant Physiology, 149:851-862.
25. Mehrotra, R., G. Gupta, R. Sethi, P. Bhalothia, N. Kumar and S. Mehrotra. 2011. Designer promoter: an artwork of cis engineering. Plant Mol Biol, 75:527e536.
26. Mehrotra, R. and S. Mehrotra. 2010. Promoter activation by ACGT in response to salicylic and abscisic acids is differentially regulated by the spacing between two copies of the motif. J. Plant Physiol, 167:1214-1218.
27. Molnar, A., A. Lovas, Z. Banfalvi, L. Lakatos, Z. Polgar and S. Horvath. 2001. Tissue-specific signal(s) activate the promoter of a metallocarboxypeptidase inhibitor gene family in potato tuber and berry. Plant Mol Biol, 46: 301-311.
28. Murén, E., B. Ek and L. Rask. 1995. Processing of the 2S storage protein pronapin in Brassica napus and in transformed tobacco. Eur. J. Biochem, 15: 227(1-2): 316-21.
29. Naumkina, E.M., Y.P. Bolyakina and G.A. Romanov. 2007. Organ-Specificity and Inducibility of Patatin Class I Promoter from Potato in Transgenic Arabidopsis Plants. Russ J Plant Physiol, 54(3): 350-359.
30. Norseen, J., A. Thomae, V. Sridharan, A. Aiyar and A. Schepers. 2008. RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. Journal EMBO, 27: 3024-3035.
31. Ofoghi, H., F. Yavari and F. Nazarain. 2012. Tissue specific expression of human calcitonin gene in potato tubers by an organ specific promoter. Iranian Journal of Biotechnology, 10(2): 79-86.
32. Petolino, J.F. and J.P. Davies. 2013. Designed transcriptional regulators for trait development. Plant Science, 201/202:128-136.
33. Sawant, S.V., P.K. Singh, S.K. Gupta, R. Madanala and R. Tuli. 1999. Conserved nucleotide sequence in highly expressed genes in plants. J Genet, 78: 1e8.
34. Shulga, N.Y., E.B. Rukavtsova, M.A. Krymsky, V.N. Borisova, V.A. Melnikov, V.A. Bykov and Y.I. Buryanov. 2004. Expression and Characterization of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Potato Plants. Biochem, (Moscow), 69(10): 1158-1164.
35. Stoger, E., J.K.C. Ma, R. Fischer and P. Christou. 2005. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Curr Opin Biotechnol, 16(2): 167-73.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]

[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

36. Sun, A., Y. Dai, X. Zhang, C. Li, K. Meng, H. Xu, X. Wei, G. Xiao, P.B. Ouwerkerk, M. Wang and Z. Zhu. 2011. A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes OsSUT5Z and OsSUT2M. J. Integr Plant Biol, 53(7): 586-595.
37. Thomae, A.W., D. Pich, J. Brocher, M.P. Spindler and C. Berens. 2008. Interaction between HMGA1a and the origin recognition complex creates site-specific replication origins. Proc Natl Acad Sci. USA, 105: 1692-1697.
38. Tu, C.H., W.P. Liu, L.L. Huang, Y.Q. Mo and D.Z. Yang. 2009. Cloning and transcriptional activity of a novel ovarian-specific promoter from rat retrovirus-like elements. Arch Biochem Biophys, 485: 24-29.
39. Xu, L., R. Ye, Y. Zheng, Z. Wang, P. Zhou, Y. Lin and D. Li. 2010. Isolation of the endosperm-specific LPAAT gene promoter from coconut (*Cocos nucifera* L.) and its functional analysis in transgenic rice plants. Plant Cell Rep., 29: 1061-1068.
40. Yoshida, K. and A. Shinmyo. 2000. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. Journal Biosci Bioeng, 90(4):353-62.
41. Yu, Y., W. Xu, J. Wang, L. Wang, W. Yao, Y. Xu, J. Ding and Y. Wang. 2013. A core functional region of the RFP1 promoter from Chinese wild grapevine is activated by powdery mildew pathogen and heat stress. Planta, 237: 293-303.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]

[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]

Identification, Isolation and Bioinformatic Analysis of Specific Tuber Promoter in Plants

Rahele Ghanbari Moheb Seraj[1] and Masoud Tohidfar[2]

1- Ph.D. Student Department of Plant Biotechnology and Molecular Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University
2- Faculty Member, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid University (Corresponding author: Gtohidfar@yahoo.com)
Received: July 31, 2019 Accepted: November 13, 2019

Abstract

In this study, in order to find the suitable tuber promoter, an experiment was conducted in Shahid Beheshti University in 2018. For this purpose, promoter sequences of different tuberous plants were searched at NCBI. Sequences were multiple-aligned and the target primers designed from conserved regions. PCR analysis confirmed the presence of the desired promoter in plants of sweet potato and taro. In order to further confirmation, bioinformatic analysis including identification of cis elements, transcription factors, their function, transcription factors with high and low expression were performed. Finally, the identified promoter was compared with patatin class 1 promoter in terms of cis elements and function. Results of bioinformatic analysis indicated that the promoter has specific and general cis elements. General cis elements that are present in most promoters and are involved in activation and regulation of promoters, cellular processes, developmental processes and tolerance to biological and non-biological stresses. Special cis elements of tuber are active in expression of storage protein and starch. Comparison between studied promoter and specific tuber promoter of patatin confirms activity of the studied promoter in the tuber. A tuber promoter can be used to express various proteins in tuber plants in the future.

Keywords: Cis Elements, Patatin, Sweet Potato, Taro, Transcription Factor

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1398.11.32.19.1]

[DOI: 10.29252/jcb.11.32.1]