دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

همسانه‌سازی و بررسی بیان موقت پیشبر *pat1* گیاه سیب‌زمینی با استفاده از سیستم اگروباکتریوم

ن. احمدی[۱]، ح. رهنما[۲] و س. ک. کاظمی‌تبار[۳]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۲

چکیده

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی مهندسی ژنتیک برای هدفمندی بیان ژن‌ها محسوب می‌شوند. به منظور بیان اختصاصی ژن در غده‌های سیب‌زمینی عمومی‌ترین پیشبر مورد استفاده پیشبر *Patatin* است. پاتاتین گروهی از گلیکوپروتئین‌ها هستند که به وسیله یک خانواده چندژنی رمزسازی می‌شوند. این پروتئین‌ها بیش از ۴۰٪ پروتئین‌های محلول در غده سیب‌زمینی را به خود اختصاص می‌دهند. پیشبرهای کلاس I به طور عمده مسئول بیان پاتاتین‌های غده بوده و بنابراین الگوی بیان اختصاصی برای غده داشته و در بخش بافت پارانشیمی آن به مقدار زیاد وجود دارند. هدف از این تحقیق همسانه‌سازی پیشبر اختصاصی غده سیب‌زمینی (پاتاتین کلاس I (*pat1*)) و بررسی بیان اختصاصی آن می‌باشد. پس از استخراج DNA ژنومی از گیاه سیب‌زمینی، پیشبر *Pat1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی همسانه‌سازی شد. قطعه مورد نظر با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Hind*III جدا و خالص‌سازی شده و جایگزین پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه *pBI121* گردید. پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل گردید. با استفاده از روش اگروباکتریوم بیان اختصاصی ژن *gus* در بافت‌های گیاه سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در مقایسه با پیشبر *CaMV35S*، پیشبر *PatI* نیز با کارایی بالایی باعث بیان ژن *gus* در غده‌ها می‌شود.

واژه های کلیدی: اگروباکتریوم، بیان موقت، پیشبر *patatin*، همسانه‌سازی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

مقدمه

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی در بیان هدفمند ژن‌ها در مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. این عناصر که بلافاصله در بالادست ژن‌ها قرار دارند، توالی‌های کوتاه نوکلئوتیدی هستند که بوسیله آنزیم RNA پلیمراز بعنوان نقطه شروع رونویسی DNA شناسایی و به آن متصل می‌شوند. بطور کلی پیشبرها براساس فعالیتشان به چند دسته طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) پیشبرهای ساختاری[1]: پیشبرهایی که فعالیت آنها وابسته به محیط یا مرحله نموی نبوده و ژن‌های تحت کنترل آنها معمولا در همه بافت‌ها بیان می‌شوند. پیشبر *CaMV35S* ویروس موزائیک گل کلم نمونه‌ای از این پیشبرها می‌باشد که بطور گسترده برای دستیابی به سطوح بالایی از بیان ژن‌ها بکار می‌روند (۱۲ و ۲۸). ۲) پیشبرهای ویژه بافتی[2]: این پیشبرها بیان ژن را در بافت یا مرحله خاص نموی کنترل می‌کنند. این پیشبرها برای هدف‌گیری تولید مواد نوترکیب در اندام‌ها یا بافت‌های معین مثل دانه‌ها یا میوه‌ها بسیار کارآمد هستند. پیشبرهای مختلفی برای هدف قرار دادن بیان بیومولکول‌های بیگانه در اندام‌های ویژه گیاه بکار رفته‌اند. پیشبر پاتاتین ویژه غده سیب‌زمینی برای بیان هدفمند مولکول‌هایی (۱۸) مانند CTB[3]، LTB[4]، HBsAg[5]، دکسترن[6]، موتان یا الترنانسوکراز[7] در غده‌های سیب‌زمینی استفاده شده‌اند (۱۴، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۵، ۳۲ و ۳۷). میوه‌ها هم از جمله بافت‌هایی هستند که برای بیان آنتی‌ژن‌ها و سایر مواد نوترکیب مورد هدف هستند، که به پردازش کمتری نیاز دارند. پیشبر *E8* ویژه میوه گوجه‌فرنگی برای بیان آنتی‌ژنهای مختلف در میوه استفاده می‌شود (۵، ۱۹، ۳۱ و ۳۶). برخی ازپیشبرها مانند ارکلین[8] بیان ژن را فقط در دانه‌ها محدود می‌کنند (۲۴). پیشبرهای ویژه کلروپلاست هم برای بیان پروتئین خارجی در کلروپلاست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این جمله می توان به پیشبر RNA ریبوزومی 16S (*Prrn*) یا پیشبر ژن *psbA* اشاره نمود که معمولا برای تراریختی کلروپلاست بکار می‌رود. پیشبر ژن *rbcS* (ویژه برگ) همچنین برای تولید واکسن زیرواحد آبله، اندوگلوکاناز[9] E1 یا اکسیلاناز[10] در برگ‌های گیاه استفاده شده است (۴، ۱۰ و ۱۶). واکاسا و همکاران (۴۰) سیستم پیشبری ویژه کالوس را برای تولید مولکول‌های خارجی در گیاهان تراریخته توصیف کردند. ۳) پیشبرهای القاپذیر[11]: این پیشبرها در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) پیشبرهای تنظیمی شیمیایی که توسط ترکیبات شیمیایی مثل الکل، تتراسایکلین، استروئیدها و غیره تنظیم می‌شوند و ۲) پیشبر تنظیمی فیزیکی که فعالیت‌شان بستگی به عوامل محیطی مانند خشکی، تنش نمکی، دما، نور و غیره دارند. اما سیستم القاپذیر شیمیایی، القاپذیری و ویژگی

1- Constitutive promoters
2- Tissue-specific promoters
3- Cholera toxin B
4- Heat labile enterotoxin B
5- Hepatitis B surface antigen
6- Dextran
7- Alternansucrase
8- Arcelin
9- E1-endoglucanas
10- Xylanase
11- Inducible promoters

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

بالاتری را برای بیان ژن ایجاد می‌کند. حتی خاموشی در غیاب القاکننده‌ها وجود دارد. پیشبرهای القاپذیر شیمیایی در ترکیب با عوامل رونویسی حساس شیمیایی بیان تراژن را برای اندام خاص، بافت و یا هر نوع سلول محدود می‌کند (۴۲). در سیستم کنترلی که از پیشبر القاپذیر استفاده می‌کنند، عامل القاکننده باید خصوصیاتی مثل اختصاصی بودن بالا برای پیشبر، واکنش سریع به القاء، غیرسمی بودن برای گیاه و کاربرد آسان داشته و نباید در گیاه حضور دایم داشته باشد.۴) پیشبرهای مصنوعی[1]: مجموعه‌ای از عناصر حداقل شامل جعبه *TATA* (ضروری برای RNA پلیمراز II) در جایگاه شروع رونویسی و توالی حفظ شده *CCAAT* برای پیشبر یوکاریوت فعال مورد نیاز است. پیشبرهای مصنوعی بوسیله ترکیبی از عناصر سیس ساخته شده‌اند که شامل تقویت کننده‌ها، فعال کننده‌ها و بازدانده‌ها بالادست قسمت مرکز پیشبر می‌باشند (۱۱ و ۳۴).

غده‌های سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) ساقه زیرزمینی هستند که تحت تمایز مورفولوژیکی با انبساط شعاعی ایجاد می‌شوند (۲). تحت شرایط مزرعه‌ای القای فرآیند تمایز با شرایط محیطی مثل دوره نوری، دما و منبع نیتروژنی کنترل می‌شود (۷). فرآیند مورفولوژیکی غده‌سازی با تغییرات بیوشیمیایی متفاوتی همراه است، مهمترین آن تجمع نشاسته است. شناخته شده‌ترین ژن ویژه غده، پاتاتین است. پاتاتین خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌ها (۴۰ کیلودالتونی) است که علاوه بر اینکه بعنوان پروتئین ذخیره‌ای شناخته می شود، فعالیت لیپید آسیل هیدرولازی و ترانسفرازی هم دارند (۱ و ۱۵). بیش از ۴۰٪ از کل پروتئین‌های محلول در غده سیب‌زمینی پاتاتین می‌باشد (۲۹). این پروتئین‌ها در واکوئل ذخیره شده‌اند و گلیکوزیله می‌باشد (۳۸). در ارقام غده‌ساز *S. tuberosum* پاتاتین بوسیله یک خانواده چند ژنی با ۱۸-۱۰ عضو در هر ژنوم هاپلوئید رمزگذاری می‌شود. ناحیه رمزکننده پروتئین و ناحیه پیشبر بالای موقعیت ۸۷- در همه ژن‌ها همولوژی بالایی دارند (۲۷ و ۳۹). این ژن‌ها براساس عدم حضور (کلاس I) و حضور (کلاس II) قطعه bp ۲۲ وارد شده در 5´UTR به دو کلاس I و II تقسیم می‌شوند. در حالی‌که این دو کلاس از ژن‌های بسیار حفاظت شده هستند در بخش توالی مجاور '۵ بسیار متفاوت می‌باشند (۲۷ و ۳۰). ژن‌های کلاس I عمدتاً در غده بیان می‌شوند (۲۹) و با سیگنال‌های متابولیکی تنظیم می‌شوند (۱۸، ۲۹ و ۴۱). در اوایل مرحله نمو غده در بافت‌های آوندی و در مراحل انتهای نمو، هم در پارانشیم و هم در بافت آوندی بیان بالایی دارند (۱۸ و ۲۶). این کلاس ویژه غده سیب‌زمینی است ولی در برگ‌ها بوسیله سوکروز القا می‌شوند. در حالیکه در ریشه و سلول‌های اپیدرمی بساک سیب‌زمینی پاتاتین کلاس II وجود دارد (۲۳ و ۲۶). بر خلاف کلاس I ، کلاس II با سوکروز القا نمی‌شود. کلاس II فقط به بافت آبکش وابسته

1- Artificial promoters

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

بوده و فعالیت ویژه در ساقه و دمبرگ دارد و بیان کلاس II در نوک ریشه مشاهد شده است. در آنالیز فیزیکی و ژنتیکی نقشه نشان داده شد که ژن پاتاتین نزدیک به انتهای بازوی بلند کروموزوم VIII هم در سیب‌زمینی و هم در گوجه‌فرنگی وجود دارد (۹). در این جایگاه این ژن‌ها تقریباً ۱۰ تا ۱۵ نسخه در سیب‌زمینی و تقریباً ۳ نسخه در گوجه‌فرنگی دارند. جایگاه پاتاتین روی کروموزوم VIII در گوجه فقط حاوی ژن‌های کلاس II است ولی در سیب‌زمینی کلاس I می‌باشد جالب توجه است که توالی همولوگ DNA پیشبر پاتاتین کلاس I در وسط کروموزوم III هم در ژنوم سیب‌زمینی و هم ژنوم گوجه فرنگی وجود دارد (۸).

هدف از این تحقیق همسانه‌سازی پیشبر اختصاصی غده سیب‌زمینی، پاتاتین کلاس I (*pat1*) و بررسی بیان اختصاصی آن با استفاده از سیستم اگروباکتریوم می‌باشد.

مواد و روشها

جداسازی پیشبر *Pat1*

در این تحقیق از گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم مارفونا متعلق به خانواده *Solanaceae* استفاده گردید. بذور غده‌ای این گیاه پس از شستشو در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت گردید. برگ‌های جوان گیاه در مرحله ۱۰-۸ برگی برای استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۶) مورد استفاده قرار گرفت. از DNA استخراج شده بعنوان الگو جهت جداسازی پیشبر *Pat1* بوسیله واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. از دمای $94\ ^{\circ}C$ برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه استفاده گردید. ۳۵ چرخه برای PCR بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای $94\ ^{\circ}C$، اتصال یک دقیقه در دمای $60\ ^{\circ}C$ و بسط یک دقیقه در دمای $72\ ^{\circ}C$، در پایان ۴ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در $72\ ^{\circ}C$ در نظر گرفته شد. توالی آغازگر پیشرو 5´-cggaagcttgagtctagaaatcataatgtt-3´ و توالی آغازگر برگشتی 5´- cgcggatccttttgttggtgctttgagcatataac-3 بود. این آغازگرها براساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI با شماره A08215.1 و با استفاده از نرم افزار Oligo طراحی گردید.

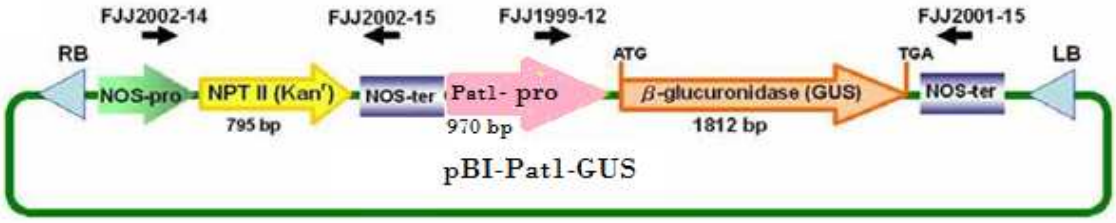
همسانه‌سازی پیشبر *Pat1*

به منظور تکثیر و همسانه‌سازی پیشبر *Pat1* در ناقل دوگانه نهایی *pBI121*، ابتدا محصول PCR مستقیماً در ناقل T/A (ناقل pTZ57R/T) (InsTAclone^{TM} PCR Cloning Kit#K1214, Fermentas) کلون گردید. انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت. سلول‌های تراریخت حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در محیط LB مایع و محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و جهت استخراج پلاسمید به روش Miniprep مورد استفاده قرار گرفتند (۳۵). پس از تائید حضور ژن در سازه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

همسانه‌سازی با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III، پیشبر مورد نظر از روی ژل آگارز جدا شده و با استفاده از کیت خالص‌سازی *DNA* (Roch Co.) تخلیص گردید. به منظور تایید صحت توالی قطعه مربوط به پیشبر، پلاسمیدهای نوترکیب پس از استخراج برای توالی‌یابی قطعه ورودی، به شرکت Millegene فرستاده شدند. از پرایمرهای عمومی M13 برای توالی‌یابی استفاده گردید. نتیجه توالی‌یابی در برنامه Blast نوکلئوتیدی مورد جستجو قرار گرفت. شکل ۴ قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.

به منظور کلون کردن پیشبر*Pat1* در پلاسمید *pBI121*، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید *pBI121* خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت خالص‌سازی *DNA* جهت انجام واکنش اتصال آماده گردید. در مرحله بعد، پیشبر *Pat1* جدا شده با روش فوق توسط آنزیم *T4 DNA* لیگاز به پلاسمید *pBI121* خطی شده الحاق شد. تراریختی سلول‌های *E.coli* با استفاده از پلاسمید نوترکیب به روش فیزیکی- شیمیایی انجام گردید (۳۵). کلون‌های تراریخت باکتریایی در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب گردیدند. جهت تایید الحاق پیشبر در پلاسمید *pBI121* آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *pat1* و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III انجام گردید. پس از تایید نهایی، سازه نوترکیب حاصل که *pBI-Pat1-GUS* نامگذاری شد (شکل ۱)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefacience* انجام گرفت.



شکل ۱- سازه نوترکیب *pBI-Pat1-GUS*

سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد[1] تراریخت گردیدند (۳۵) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین

1- Freeze-Thaw

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

(۷۵ mg/l) در دمای ۲۸ C° به مدت ۲ تا ۳ روز کلنی‌ها ظاهر شدند. تایید تراریختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *pat1* انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید *pBI121* به عنوان کنترل در تراریختی استفاده شد.

بررسی بیان موقت ژن *gus* در گیاهان سیب‌زمینی

به‌منظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه *pBI-Pat1-GUS* در گیاهان و بررسی بیان ژن باکتریایی *gus* (که آنزیم بتاگلوکورونیداز را رمزسازی می‌کند) تحت پیشبرهای *pat1* و *CaMV35S* در غده سیب‌زمینی، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا گردید. بدین منظور ابتدا اگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب *pBI-Pat1-GUS* یا *pBI121* در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین به صورت شبانه در دمای ۲۸ C° روی شیکر کشت شدند. صبح روز بعد ۲ میلی‌لیتر از این کشت به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین افزوده شد و مجددا در همان شرایط رشد ذکر شده قرار گرفت. پس از رسیدن OD_{600} به حدود ۰/۵، نمونه‌های برش یافته غده سیب‌زمینی به سوسپانسیون باکتری اضافه شد و در دسیکاتور تحت خلاء به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. با حذف سریع سیستم خلا، ورود باکتری به داخل غده‌ها تسهیل گردید. نمونه‌ها به پتری‌های حاوی کاغذ صافی منتقل شدند و به مدت ۳ روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت آزمایش هیستوشیمیایی ژن *gus* با استفاده از X-Gluc امکان سنجش بیان ژن را به طور اختصاصی در سلول و بافت غده فراهم آورد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc برای ۳۶-۸ ساعت در دمای ۳۷ C° قرار داده گرفته و سپس در الکل ۷۰٪ شستشو گردیدند (۱۷).

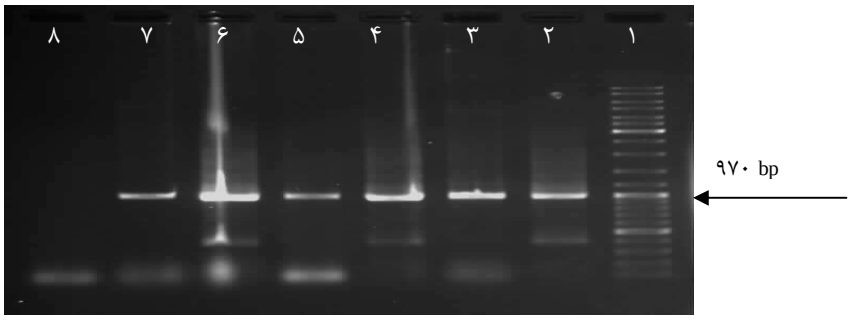
نتایج و بحث

بیان موقت ژن یک روش سریع، قابل انعطاف و تکرار پذیر برای بررسی سطح بیان ژن است. در گیاهان می‌توان از سویه‌های نوترکیب اگروباکتریوم برای بیان موقت ژن‌هایی که در ناحیه *T-DNA* پلاسمید باکتریایی وارد شده‌اند استفاده کرد. سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دایمی مزایای فراوانی برای ارزیابی بیان ژن‌ها دارد. از جمله این مزایا می‌توان به عدم نیاز به باززایی گیاه از سلول‌های تراریخته و کاهش زمان رسیدن به نتیجه بیان ژن اشاره نمود. از طرف دیگر استفاده از سیستم بیان موقت ابزاری سریع و کارا برای بررسی فعالیت پیشبرها در گیاهان است.

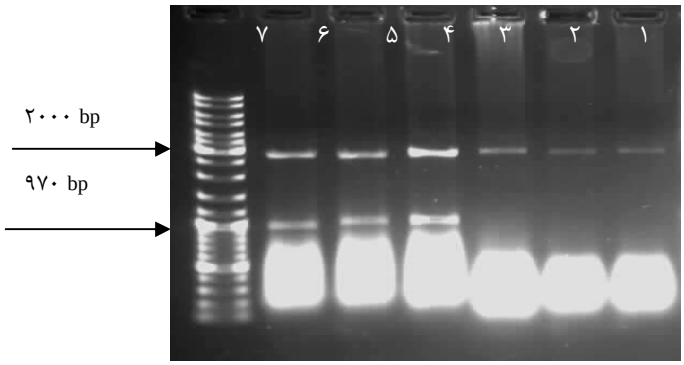
در این تحقیق قطعه ۹۷۰ جفت بازی پیشبر *Pat1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با روش PCR از ژنوم سیب‌زمینی کلون گردید (شکل ۲). الحاق پیشبر در پلاسمید T/A با استفاده از PCR ثابت شد. همچنین با استفاده از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و*Hin*dIII و خروج قطعات DNA با اندازه ۹۷۰ جفت‌بازی، همسانه‌سازی پیشبر مورد تائید قرار گرفت (شکل ۳). تعیین توالی و مقایسه پیشبر همسانه‌سازی با توالی موجود در NCBI نشان داد که پیشبر جدا شده تطابق ۹۹ درصدی با توالی‌های مورد نظر دارد (شکل ۴).



شکل ۲- PCR پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل pTZ57R/T و پیشبر *Pat1* به منظور بررسی ورود پیشبر *Pat1* و مشاهده باند bp ۹۷۰، ۱) خط کش مولکولی 1Kbp، ۷-۲) محصول PCR حاوی پیشبر *pat1* و مشاهده طول باند bp ۹۷۰، ۸) واکنش PCR آب.



شکل ۳- هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل *pTZ57R/T* و پیشبر *Pat1* به منظور بررسی ورود پیشبر با *Hind*III و *Bam*HI و مشاهده باند bp ۹۷۰، ۱، ۲ و ۳) قطعه هضم نشده ۴، ۵ و ۶) هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III و مشاهده طول باند bp ۹۷۰، ۷) خط کش مولکولی 1Kbp.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

gb|GU168944.1| *Solanum tuberosum* class I patatin gene, promoter region and partial cds
Length=1060
Score = 1742 bits (943), Expect = 0.0
Identities = 957/966 (99%), Gaps = 3/966 (0%)
Strand=Plus/Plus

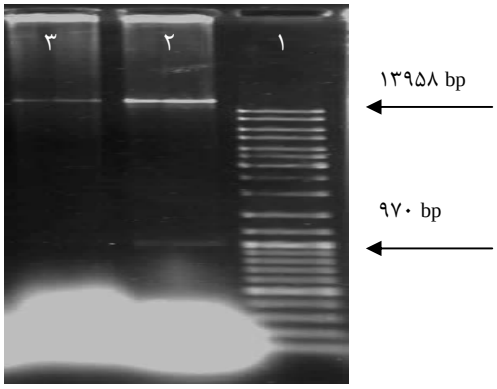
```
Query  56    AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGTAAAATAAACCTCAAAAAAGACGTTCAGT  115
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGTAAAATAAACCTCAAAAAAGACGTTCAGT  60
Query  116   CCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAGAAAACCTCCCCTCAACAAG  175
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    CCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAGAAAACCTCCCCTCAACAAG  120
Query  176   GACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATTTATTATATAATACT  235
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   GACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATTTATTATATAATACT  180
Query  236   AATAAAGAATAGAAAAAGGAAAGGTAAACATCATTAGATCGTCTTTGTATATTTTTAGTG  295
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   AATAAAGAATAGAAAAAGGAAAGGTAAACATCATTAGATCGTCTTTGTATATTTTTAGTG  240
Query  296   ACACACGTTTAGTGACAACTGATTGACGAAATCTTTTTCGTCACACAAAATTTTTAGTGA  355
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   ACACACGTTTAGTGACAACTGATTGACGAAATCTTTTTCGTCACACAAAATTTTTAGTGA  300
Query  356   CGAAACATGATTTATAGATGATGAAATTATTTGTTCCTCATAATCTAATTTGTTGTAGTG  415
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   CGAAACATGATTTATAGATGATGAAATTATTTGTTCCTCATAATCTAATTTGTTGTAGTG  360
Query  416   ATCATTACTCCTTTGTTTGTTTTATTTGTCATGTTAGTCCATTaaaaaaaaaTATCTCTC  475
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   ATCATTACTCCTTTGTTTGTTTTATTTGTCATGTTAGTCCATTAAAAAAAAATATCTCTC  420
Query  476   TTCTTATGTACGTGAATGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAATAGAAA  535
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   TTCTTATGTACGTGAATGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAATAGAAA  480
Query  536   AAGGAAAGTGAGTGAGGTTCGAGGGAGAGAATCTGTTTAATATCAGAGTCGATCATGTGT  595
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   AAGGAAAGTGAGTGAGGTTCGAGGGAGAGAATCTGTTTAATATCAGAGTCGATCATGTGT  540
Query  596   CAATTTTATCGATATGACCCTAACTTCAACTGAGTTTAACCAATTCCGATAAGGCGAGAA  655
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   CAATTTTATCGATATGACCCTAACTTCAACTGAGTTTAACCAATTCCGATAAGGCGAGAA  600
Query  656   ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAAATCTCATGTAGTGTGGGGTAAACCTCAGTAAGGAC  715
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAAATCTCATGTAGTGTGGGGTAAACCTCAGTAAGGAC  660
Query  716   GTTGAGTCCATAGAGGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAGAAAACCTCCCC  775
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   GTTGAGTCCATAGAGGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAGAAAACCTCCCC  720
Query  776   TCAAGANN-ACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACatatatatattat  834
             ||||||   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   TCAAGAAGGACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATATTAT  780
Query  835   ataatactaataaataataGaaaaaanGAAAGGTAAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG  894
             |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   ATAATACTAATAAATAATAGAAAAAAGGAAAGGTAAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG  840

Query  895   CAAACTGAGTGAGATAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACTTTTATTGGNN-TGTC  953
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||   ||||
Sbjct  841   CAAACTGAGTGAGATAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACTTTTATTGGTTATGTC  900
Query  954   AAANTCAAAATAAAATTTCTCA-CTTGTTTACGTGCCTATATATACCATGCTTGTTATAT  1012
             ||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   AAACTCAAAATAAAATTTCTCAACTTGTTTACGTGCCTATATATACCATGCTTGTTATAT  960
Query  1013  GCTCAA  1018
             ||||||
Sbjct  961   GCTCAA  966
```

شکل ۴- قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده *Pat1*، توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه *Pat1* است و توالی دوم مربوط به توالی شماره دسترسی A08215.1 است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

جایگزینی پیشبر *Pat1* با پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه *pBI121* و ساخت سازه نوترکیب *pBI-PatI-GUS* (شکل ۱) با استفاده از آزمون‌های مختلف (این آزمون‌ها شامل: PCR با پرایمر اختصاصی پیشبر *Pat1*، هضم آنزیمی و اگروواینفیلتریشن می‌باشد.) مورد تائید قرار گرفت. نتایج PCR سازه نوترکیب جدید نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۹۷۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *pat1* و همچنین هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و*Hin*dIII حضور پیشبر *Pat1* را در بالادست ژن *gus* در سازه نوترکیب *pBI-PatI-GUS* به اثبات رساند (شکل ۵).

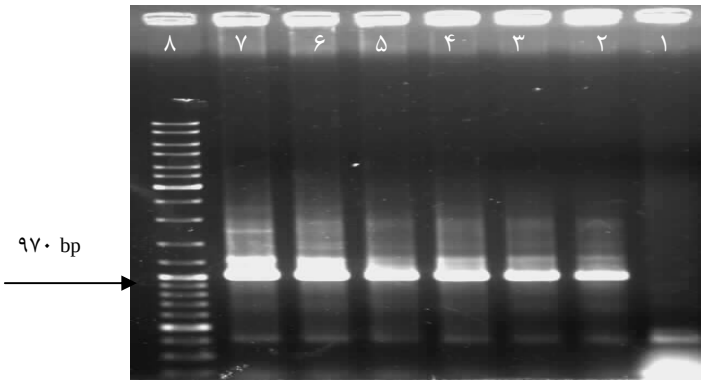


شکل ۵- الکتروفورز هضم آنزیمی *pBI-Pat-GUS* استخراج شده از *E.coli*، ۱) خط‌کش مولکولی 1Kbp، ۲ و ۳) هضم آنزیمی با *Bam*H1 و *Hind*III و مشاهده طول باند ۹۷۰ bp.

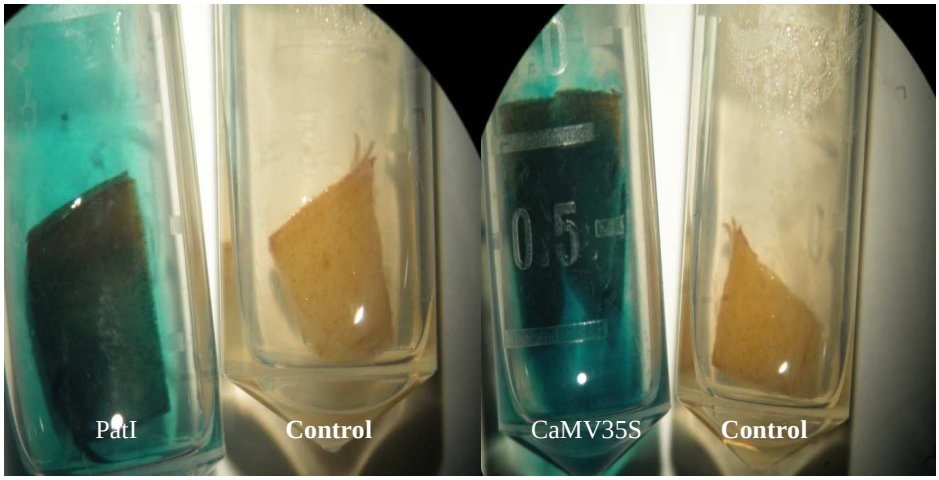
تراریختی سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری اگروباکتریوم تومفسینس با سازه نوترکیب *pBI-PatI-GUS* با استفاده از روش فیزیکی- شیمیایی انجام گردید. کلنی‌های باکتریایی حاوی سازه نوترکیب با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر *Pat1* تائید شدند. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که مطابق انتظار قطعه ۹۷۰ جفت بازی تکثیر یافته است (شکل ۶).

نتایج حاصل از آزمایش بیان موقت پیشبر در غده سیب‌زمینی در محلول رنگ آمیزی X-Gluc نشان داد که پیشبر *Pat1* همانند پیشبر *CaMV35S* باعث بیان ژن *gus* در غده‌های سیب زمینی شده است. این امر ضمن اینکه کارایی و فعالیت پیشبر *Pat1* را نشان می‌دهد حاکی از موفقیت روش اگروواینفیلتریشن برای غده‌های سیب‌زمینی می‌باشد. رنگ آبی بافت‌ها نشان داد که پیشبرها باعث بیان ژن *gus* شده‌اند. عدم رنگ آمیزی غده‌های کنترل تاییدی بر صحت بیان ژن و عدم تاثیر پذیری نتایج از عوامل محیطی و جانبی می‌باشد (شکل ۷).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]



شکل ۶- الکتروفورز محصول واکنش PCR برای *A. tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی سازه نوترکیب *pBI-Pat1-GUS*
۱) واکنش PCR آب، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷) PCR پلاسمید نوترکیب *pBI-Pat1-GUS* و مشاهده طول باند ۹۷۰ bp، ۸) خط‌کش مولکولی 1Kbp.



شکل ۷- بیان موقت ژن *gus* با استفاده از اگروباکتریوم برای پیشبرهای *Pat1* و *CaMV35S* و اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب (کنترل).

بلوندی و همکاران (۳) پشبر ژن کلاس I پاتاتین را به ژن بتا گلوکورنیداز (*gus*) متصل و به سیب‌زمینی منتقل کردند و نشان دادند که فعالیت این آنزیم با سطح *mRNA* وابسته است ولی با تعداد کپی ژن مورد نظر مرتبط نیست. روچاسوسا و همکاران (۳۳) با استفاده از سازه *PatI-GUS* در بررسی‌های هیستوشیمیایی بیان ژن نشان دادند که این *gus* بیشتر در پارانشیم بافت غده سیب‌زمینی فعال است و در برگ‌ها هم تحت شرایطی (مانند غلظت بالای ساکارز) بیان می‌شود. ونزلر و همکاران (۴۱) این سازه را به گیاه منتقل کردند و نشان دادند ژن *gus*

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

تحت کنترل پیشبر *PatI* در غده و ساقه‌های خزنده دارای غده درحال توسعه بیان می‌شود ولی در برگ‌ها، ساقه‌ها، ریشه‌ها و در ساقه خزنده قبل از غده‌سازی بیان نمی‌شوند. هاشمی و همکاران (۱۳) با استفاده از سیستم اگروباکتریوم بیان موقت ژن هورمون رشد انسانی (*hGH*) را در برگ‌های توتون، سیب زمینی و کاهو با موفقیت بررسی کردند. در مطالعه حاضر، برای بررسی بیان موقت ژن *gus* تحت کنترل پیشبرهای *PatI* و *CaMV35S* از سیستم اگروباکتریوم برای غده‌های سیب‌زمینی استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که در مقایسه با پیشبر *CaMV35S*، پیشبر *PatI* نیز با همان قدرت باعث بیان ژن *gus* در غده‌ها می‌شود. بنابراین در این تحقیق، همسانه‌سازی و فعال بودن پیشبر *PatI* از گیاه سیب‌زمینی با موفقیت انجام شده و از این پیشبر می‌توان برای بیان اختصاصی بافتی ژن‌های خارجی در سیب زمینی بهره گرفت.

منابع

1. Andrews, D.L., B. Beames, M.D. Summers and W.D. Park. 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. Biochem. J., 252: 199-206.
2. Artschwager, E.F. 1924. Studies on the potato tuber. J. Agri. Res., 27: 809-35.
3. Blundy, K.S., M.A.C. Blundy, D. Carter, F. Wilson, W.D. Park and M.M. Burrell. 1991. The expression of class I patatin gene fusion in transgenic potato varies with both gene and cultivar. Plant Mol. Biol., 16: 153-160.
4. Dai, Z., B.S. Hooker, D.B. Anderson and S.R. Thomas. 2000. Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression, optimization and tissue targeting. Mol Breed. 6: 277-85.
5. Deikman, J., R. Kline and R.L. Fischer. 1992. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Physiol., 100: 2013-7.
6. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreprationn: version II. Plant. Mol Biol. Rep., 1: 19-21.
7. Ewing, E.E. 1985. Cuttings as simplified models of the potato plant. In Li, P.H. (ed.), Potato Physiology. Academic Press, New York. pp: 153 -207.
8. Fu, H., J. Du, J. Song, J. Jiang and W.D. Park. 2001. Potato and tomato *Forever Young* genes contain class-I patatin promoter-like sequences. Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 231-241.
9. Ganal, M., M.W. Bonierbale, M.S. Roeder, W.D. Park and S.D. Tanksley. 1991. Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. Mol. Gen. Genet., 225: 501-509.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

10. Golovkin, M., S. Spitsin, V. Andrianov, Y. Smirnov, Y. Xiao, N. Pogrebnyak, K. Markley, R. Brodzik, Y. Gleba, S.N. Issacs and H. Koprowski. 2007. Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. Proc Natl. Acad. Sci., USA. 104: 6864-9.
11. Gurr, S.J. and P.J. Rushton. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it Trends Biotechnol., 23: 283-90.
12. Gutierrez-Ortega, A., C. Sandoval-Montes, T.J. de Olivera-Flores, L. Santos-Argumedo and M.A. Gomez-Lim. 2005. Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. Transgenic Res., 14: 877-85.
13. Hashemi Sohi, H., E. Jourabchi and M. Khodabandeh. 2005. Transient expression of human growth hormone in potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) leaves by agroinfiltration. Iranian journal of Biotechnology. 3: 109-113.
14. He, D.M., K.X. Qian, G.F. Shen, Y.N. Li, Z.F. Zhang, Z.L. Su and H.B. Shao. 2007. Stable expression of foot andmouth disease virus protein VP1 fused with cholera toxin B subunit in the potato (*Solanum tuberosum*). Colloids Surf B Biointerfaces. 55: 159-63.
15. Hofgen, R. and L. Willmitzer. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucl Acids Res., 16: 9877.
16. Hyunjong, B., D.S. Lee and I.D. Hwang. 2006. Targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. J. Exp. Bot., 57: 161-9.
17. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J., 6: 3901-3907.
18. Jefferson, R.A. Goldsbrough and M. Bevan. 1990. Transcriptional regulation of a patatin-I gene in potato. Plant Mol. Biol., 14: 995-1006.
19. Jiang, X. L., Z.M. He, Z.Q. Peng, Y. Qi, Q. Chen and S.Y. Yu. 2007. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. Transgenic Res., 16: 169-75.
20. Joung, Y.H., J.W. Youm, J.H. Jeon, B.C. Lee, C.J. Ryu, H.J. Hong, H.C. Kim, H. Joung and H.S. Kim. 2004. Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. Plant Cell Rep., 22: 925-30.
21. Kok-Jacon, G.A, J.P. Vincken, L.C. Suurs and R.G. Visser. 2005a. Mutan produced in potato amyloplasts adheres to starch granules. Plant Biotechnol J., 3: 341-51.
22. Kok-Jacon, G.A., J.P. Vincken, L.C. Suurs, D. Wang, S. Liu and R.G. Visser. 2005b. Production of dextran in transgenic potato plants. Transgenic Res., 14: 385-95.
23. Köster-Töpfer, M., W.B. Frommer, M. Rocha-Sosa, S. Rosahl, J. Schell and L. Willmitzer. 1989. A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. Mol. Gen. Genet., 219: 390-396.
24. Lau, O.S. and S.S.M. Sun. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. Biotechnol Adv, doi:10.1016/j.biotechadv. 2009. 05.005.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

25. Lauterslager, T.G., D.E. Florack, T.J. Van der Wal, J.W. Molthoff, J.P. Langeveld, D. Bosch, W.J. Boersma and L.A. Hilgers. 2001. Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. Vaccine. 19: 2749-55.
26. Liu, X.J., M. Rocha-Sosa, S. Hummel, Willmitzer and W.B. Frommer. 1991. A detail study of the regulation and evolution of the two classes of patatin genes in *Solanum tuberosum* L. Plant Mol. Biol., 17: 1139-1154.
27. Mignery, G.A., C.S. Pikaard and W.D. Park. 1988. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. Gene 62: 27-44.
28. Odell, J. T., F. Nagy and N.H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature. 313: 810-2.
29. Pavia, E., R.M. Listerand and W.D. Park. 1983. Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. Plant Physol., 71: 616-618.
30. Pikaard, C.S., J.S. Brusca, D.J. Hannapel and W.D. Park. 1987. The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots. Nucl. Acids Res., 15: 1979-1994 .
31. Ramirez, Y.J., E. Tasciotti, A. Gutierrez-Ortega, A.J. Donayre Torres, M.T. Olivera Flores, M. Giacca and M.A.G. Lim. 2007. Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. Clin. Vaccine Immunol. 14: 685-92.
32. Richter, L.J., Y. Thanavala, C.J. Arntzen and H.S. Mason. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nat. Biotechnol., 18: 1167-71.
33. Rocha-Sosa, M., U. Sonnewald, W. Frommer, M. Stratmann, J. Schell and L. Willmitzer. 1989. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. EMBO J., 8: 23-29.
34. Rushton, P.J., A. Reinstadler, V. Lipka, B. Lippok and I.E. Somssich. 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. Plant Cell. 14: 749-62.
35. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
36. Sandhu, J.S., S.F. Krasnyanski, L.L. Domier, S.S. Korban, M.D. Osadjan and D.E. Buetow. 2000. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. Transgenic Res., 9: 127-35.
37. 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., 69: 1158-64.
38. Sonnewald, U., D. Studer, M. Rocha-Sosa and L. Willmitzer. 1989. Immunochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Planta 178: 176-183.
39. Twell, I.D. and G. Ooms. 1988. Structural diversity of the patatin gene family in potato cv. Desiree. Mol. Gen. Genet., 212: 325-336.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

40. Wakasa, Y., K. Ozawa and F. Takaiwa. 2009. Higher-level accumulation of foreign gene products in transgenic rice seeds by the callus-specific selection system. J. Biosci. Bioeng., 107: 78-83.
41. Wenzler, H.C., G.A. Mignery, L.M. Fishe and W.D. Park. 1989. Analysis of a chimeric class I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: high level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stemexplants. Plant Mol. Biol., 12: 41-50.
42. Zuo, J. and N.H. Chua. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. Curr. Opin. Biotechnol., 11:146-51.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

Cloning of the Potato Pat1 Promoter and Survey the Transient Expression Using Agro-Infiltration System

N. Ahmadi[1], H. Rahnama[2] and S.K. Kazemitabar[3]

1 and 3- Former M.Sc. Student and Associate Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Assistant Professor of Agricultural Biotechnology Institute of Iran

Abstract

To achieve the high level of gene expression, promoters are key elements. Patatin promoter has been used as a specific gene expression in potato tubers. Patatin is a group of glycol protein in potato tuber which is code by a multiple family genes. This protein makes up more than 40% of soluble proteins of potato tubers. Class I Promoters mainly responsible for tuber-specific expression pattern of proteins and located high amount in tuber parenchyma tissues. The purpose of the present study is the cloning and expression assay of tuber specific promoter, patatin class I (pat1). Total DNA of the potato tissue samples was extracted and the *pat1* promoter was amplified using specific primers and *pfu* polymerase by polymerase chain reaction (PCR). The fragment was isolated by two restriction enzymes (*Bam*HI, *Hin*dIII) and was replaced with CaMV35S promoter in pBI121 vector. The recombinant plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefacien*s LBA4404 strain using freez-thaw method. The specific expression of *gus* gene in potato tissue was evaluated using agro-infiltration method. The results of the this experiment confirmed the specific expression of the gene.

Keywords: Agro-infiltration, Cloning, Pat1, Transient expression

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]