

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

ن. احمدی^۱، ح. رهنما^۲ و س. ک. کاظمی تبار^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 پاراننشیمی 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 *BamHI* و *HindIII* 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 اگرواینفیلتریشن بیان اختصاصی ژن *gus* در بافت‌های گیاه سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در مقایسه با پیشبر *CaMV35S*، پیشبر *Pat1* نیز با کارایی بالایی باعث بیان ژن *gus* در غده‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اگرواینفیلتریشن، بیان موقت، پیشبر *patatin* همسانه‌سازی

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^۱: پیشبرهایی که فعالیت آنها وابسته به محیط یا مرحله نموی نبوده و ژن‌های تحت کنترل آنها معمولاً 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^۲: 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^۳، LTB^۴، HBsAg^۵، دکستران^۶، موتان یا الترانسوکراز^۷ 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 از پیشبرها مانند ارکلین^۸ 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 می‌توان به پیشبر RNA ریروزومی *Prm* 16S یا پیشبر ژن *psbA* اشاره نمود که معمولاً برای تراریختی کلروپلاست بکار می‌رود. پیشبر ژن *rbcS* (ویژه برگ) همچنین برای تولید واکسن زیرواحد آبله، اندوگلوکاناز^۹ E1 یا اکسیلاناز^{۱۰} در برگ‌های گیاه استفاده شده است (۴، ۱۰ و ۱۶). واکسا و همکاران (۴۰) سیستم پیشبری ویژه کالوس را برای تولید مولکول‌های خارجی در گیاهان تراریخته توصیف کردند. (۳) پیشبرهای القاپذیر^{۱۱}: 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
4- Heat labile enterotoxin B
7- Alternansucrase
10- Xylanase

2- Tissue-specific promoters
5- Hepatitis B surface antigen
8- Arcelin
11- Inducible promoters

3- Cholera toxin B
6- Dextran
9- E1-endoglucanas

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 خصوصیتی 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^۱: 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 بازدنده‌ها 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 می‌شود، 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 واکنش ذخیره شده‌اند و گلیکوزیله می‌باشند (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 ۲۲ bp وارد شده در 5' UTR به دو کلاس I و II تقسیم می‌شوند. در حالی که 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 انتهایی نمو، هم در پارانسیم 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

جهت جداسازی پیشبر *Pat1* بوسیله واکنش زنجیری پلیمرز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. از دمای 94°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°C ، اتصال یک دقیقه در دمای 60°C و بسط یک دقیقه در دمای 72°C ، در پایان ۴ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در 72°C در نظر گرفته شد. توالی آغازگر پیشرو 5'-cggaagcttgagtctagaatcataatgtt-3' و توالی آغزگر برگشتی 3'-cgcgatccttttggtgctttgagcatataac-5' 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) (InsTAcloneTM 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 نو ترکیب 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 تأیید حضور ژن در سازه

بوده و فعالیت ویژه در ساقه و دمبرگ دارد و بیان کلاس II در نوک ریشه مشاهده 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 گوجه‌فرنگی 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 اگرواینفیلتریشن می‌باشد.

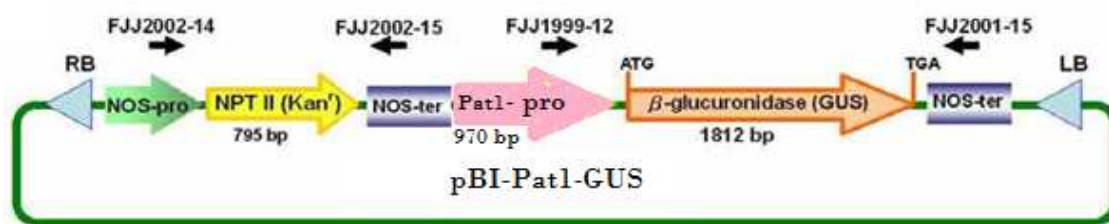
مواد و روشها

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 ۸-۱۰ برگی برای استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۶) مورد استفاده قرار گرفت. از DNA استخراج شده بعنوان الگو

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 نو ترکیب 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 *BamHI* و *HindIII* انجام گردید. پس از تایید نهایی، سازه نو ترکیب حاصل که *pBI-Pat1-GUS* نامگذاری شد (شکل ۱)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* انجام گرفت.

همسازسازی با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII* 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 نو ترکیب 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 *BamHI* و *HindIII* پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید *pBI121* خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت



شکل ۱- سازه نو ترکیب *pBI-Pat1-GUS*

تراریخت گردیدند (۳۵) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین

سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد^۱

1- Freeze-Thaw

(۷۵ mg/l) در دمای 28°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

به منظور 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 نو ترکیب *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 28°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 مجدداً 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 37°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 نو ترکیب اگروباکتریوم برای بیان موقت ژن‌هایی که در ناحیه *T-DNA* پلاسمید باکتریایی وارد شده‌اند استفاده کرد. سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دائمی 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.

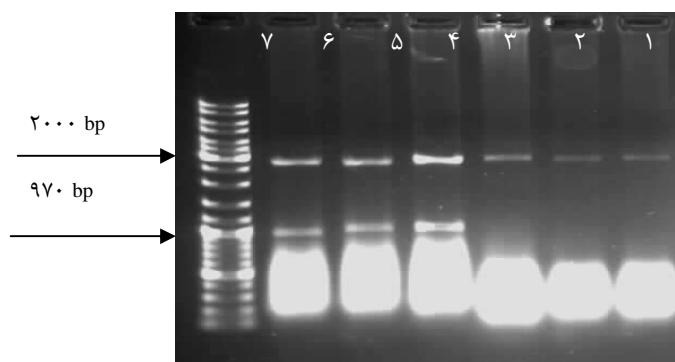
در این تحقیق قطعه ۹۷۰ جفت بازی پیشبر *Pat1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با روش PCR از ژنوم سیب‌زمینی کلون گردید (شکل ۲). الحاق پیشبر در پلاسمید T/A با استفاده از PCR ثابت شد. همچنین با استفاده از

(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).

واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *HindIII* و خروج قطعات DNA با اندازه ۹۷۰ جفت‌بازی، همسانه‌سازی پیشبر مورد تائید قرار گرفت



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



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

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%)

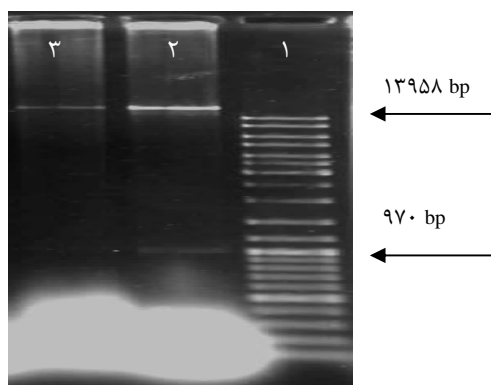
Strand=Plus/Plus

| | | | |
|-------|------|--|------|
| Query | 56 | AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGTAAAATAAACCTCAAAAAAGACGTTTCAGT | 115 |
| Sbjct | 1 | AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGTAAAATAAACCTCAAAAAAGACGTTTCAGT | 60 |
| Query | 116 | CCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAAGAAAACCTCCCCTCAACAAG | 175 |
| Sbjct | 61 | CCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAAGAAAACCTCCCCTCAACAAG | 120 |
| Query | 176 | GACATTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATTTATATATAAATACT | 235 |
| Sbjct | 121 | GACATTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATTTATATATAAATACT | 180 |
| Query | 236 | AATAAAGAAATAGAAAAAGGAAAGGTAACATCATTAGATCGTCTTTGTATATTTTAGTG | 295 |
| Sbjct | 181 | AATAAAGAAATAGAAAAAGGAAAGGTAACATCATTAGATCGTCTTTGTATATTTTAGTG | 240 |
| Query | 296 | ACACACGTTTAGTGACAACTGATTGACGAAATCTTTTCGTCACACAAAATTTTAGTGA | 355 |
| Sbjct | 241 | ACACACGTTTAGTGACAACTGATTGACGAAATCTTTTCGTCACACAAAATTTTAGTGA | 300 |
| Query | 356 | CGAAACATGATTTATAGATGATGAAATATTTGTTCCCTCATAATCTAATTTGTTGTAGTG | 415 |
| Sbjct | 301 | CGAAACATGATTTATAGATGATGAAATATTTGTTCCCTCATAATCTAATTTGTTGTAGTG | 360 |
| Query | 416 | ATCATTACTCCTTTGTTTGTATTTATTGTGTCATGTTAGTCCATTAaaaaaaaaTATCTCTC | 475 |
| Sbjct | 361 | ATCATTACTCCTTTGTTTGTATTTATTGTGTCATGTTAGTCCATTAaaaaaaaaTATCTCTC | 420 |
| Query | 476 | TTCTTATGTACGTGAATGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAAATAGAAA | 535 |
| Sbjct | 421 | TTCTTATGTACGTGAATGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAAATAGAAA | 480 |
| Query | 536 | AAGGAAAGTGAGTGAGGTTTCGAGGGAGAGAATCTGTTTAATATCAGAGTCGATCATGTGT | 595 |
| Sbjct | 481 | AAGGAAAGTGAGTGAGGTTTCGAGGGAGAGAATCTGTTTAATATCAGAGTCGATCATGTGT | 540 |
| Query | 596 | CAATTTTATCGATATGACCCCTAACTTCAACTGAGTTTAACCAATTCGGATAAGGCGAGAA | 655 |
| Sbjct | 541 | CAATTTTATCGATATGACCCCTAACTTCAACTGAGTTTAACCAATTCGGATAAGGCGAGAA | 600 |
| Query | 656 | ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAAATCTCATGTAGTGTGGGGTAAACCTCAGTAAGGAC | 715 |
| Sbjct | 601 | ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAAATCTCATGTAGTGTGGGGTAAACCTCAGTAAGGAC | 660 |
| Query | 716 | GTTGAGTCCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAAGAAAACCTCCCC | 775 |
| Sbjct | 661 | GTTGAGTCCATAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAAGAAAACCTCCCC | 720 |
| Query | 776 | TCAAGANN-ACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACAtatatattat | 834 |
| Sbjct | 721 | TCAAGAAGGACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACATATATATATTAT | 780 |
| Query | 835 | ataataactaataaataaGaaaaaanGAAAGGTAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG | 894 |
| Sbjct | 781 | ATAATACTAATAAATAATAGAAAAAGGAAAGGTAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG | 840 |
| Query | 895 | CAAACCTGAGTGAGATAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACTTTTATTGGNN-TGTC | 953 |
| Sbjct | 841 | CAAACCTGAGTGAGATAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACTTTTATTGGTTATGTC | 900 |
| Query | 954 | AAANTCAAATAAAAATTTCTCA-CTTGTTTACGTGCCTATATATACCATGCTTGTATAT | 1012 |
| Sbjct | 901 | AAACTCAAATAAAAATTTCTCAACTTGTGTTTACGTGCCTATATATACCATGCTTGTATAT | 960 |
| Query | 1013 | GCTCAA 1018 | |
| Sbjct | 961 | GCTCAA 966 | |

شکل ۴- قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی 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.

جایگزینی پیشبر *Pat1* با پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه *pBI121* و ساخت سازه نو ترکیب *pBI-PatI-GUS* (شکل ۱) با استفاده از آزمون‌های مختلف (این آزمون‌ها شامل: PCR با پرایمر اختصاصی پیشبر *Pat1*، هضم آنزیمی و اگرواینفیلتریشن می‌باشد). مورد تأیید قرار گرفت. نتایج PCR سازه نو ترکیب

جدید نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۹۷۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *pat1* و همچنین هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های برشی *HindIII* و *BamHI* حضور پیشبر *Pat1* را در بالادست ژن *gus* در سازه نو ترکیب *pBI-PatI-GUS* به اثبات رساند (شکل ۵).

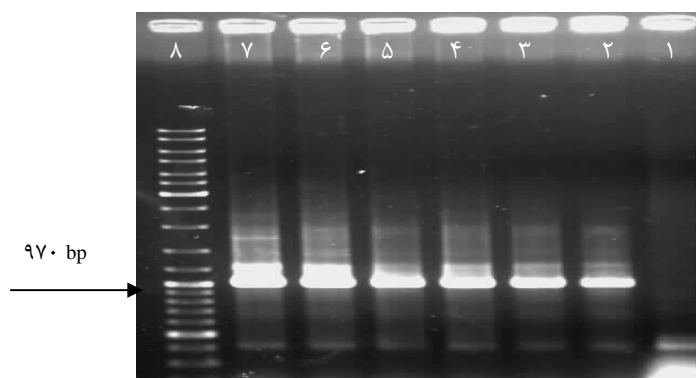


شکل ۵- الکتروفورز هضم آنزیمی *pBI-Pat-GUS* استخراج شده از *E. coli*، (۱) خط‌کش مولکولی 1Kbp، ۲ و ۳) هضم آنزیمی با *HindIII* و *BamHI* و مشاهده طول باند ۹۷۰ bp.

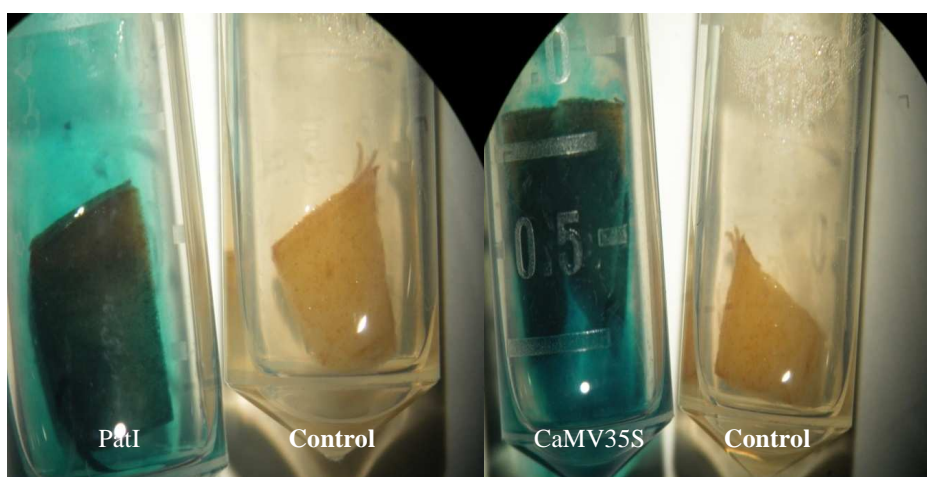
تراریختی سلول‌های مستعد سویه باکتری LBA4404 اگروباکتریوم تومفسینس با سازه نو ترکیب *pBI-PatI-GUS* با استفاده از روش فیزیکی- شیمیایی انجام گردید. کلنی‌های باکتریایی حاوی سازه نو ترکیب با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر *Pat1* تأیید شدند. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که مطابق انتظار قطعه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

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 اگرواینفیلتریشن 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).

نتایج حاصل از آزمایش بیان موقت پیشبر در غده سیب‌زمینی در محلول رنگ آمیزی



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



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

PatI-GUS در بررسی‌های هیستوشیمیایی بیان ژن نشان دادند که این *gus* بیشتر در پارانسیم بافت غده سیبزمینی فعال است و در برگ‌ها هم تحت شرایطی (مانند غلظت بالای ساکارز) بیان می‌شود. ونزلا و همکاران (۴۱) این سازه را به گیاه منتقل کردند و نشان دادند ژن *gus*

بلوندی و همکاران (۳) پیشبر 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 کمی ژن مورد نظر مرتبط نیست. روچاسوسا و همکاران (۳۳) با استفاده از سازه

سیستم اگرواینفیلتریشن 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.

تحت کنترل پیشبر *PatI* در غده و ساقه‌های خزنده دارای غده در حال 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 اگرواینفیلتریشن 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

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 miniprep: 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. Ganai, 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.

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.

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.

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 stem explants. *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.

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

N. Ahmadi¹, H. Rahnama² and S.K. Kazemitabar³

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, *Hind*III) and was replaced with CaMV35S promoter in pBI121 vector. The recombinant plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* 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