



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

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 چندزی 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 *BamHI* و *HindIII* جدا و خالص‌سازی شده و جایگزین پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه *pBII21* منتقل گردید. پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سوبه 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

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 زن 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 ریبوزومی *Prrn* (۱۶S) یا پیشبر زن *psbA* اشاره نمود که معمولاً برای ترازیختی کلروپلاست بکار می‌رود. پیشبر زن *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). واکاسا و همکاران (۴۰) سیستم پیشبری ویژه کالوس را برای تولید مولکول‌های خارجی در گیاهان ترازیخته توصیف کردند. (۳) پیشبرهای القاپذیر^{۱۱}: این پیشبرها در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) پیشبرهای تنظیمی شیمیایی که توسط ترکیبات شیمیایی مثل الكل، تتراسایکلین، استروئیدها و غیره تنظیم می‌شوند و ۲) پیشبر تنظیمی فیزیکی که فعالیتشان بستگی به عوامل محیطی مانند خشکی، تنفس نمکی، دما، نور و غیره دارند. اما سیستم القاپذیر شیمیایی، القاپذیری و ویژگی

مقدمه

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی در بیان هدفمند زن‌ها در مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. این عناصر که بلاعده در بالادست زن‌ها 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 زن‌های 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 زن‌ها بکار می‌رond (۱۲ و ۲۸). ۲) پیشبرهای ویژه بافتی^۲: این پیشبرها بیان زن 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 *HBsAg*^۳، *CTB*^۴، *LTB*^۵، دکستران^۶، موتان یا الترنسوکراز^۷ در غده‌های سیب‌زمینی استفاده

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

گلیکوپروتئین‌ها (۴۰ کیلو Daltonی) است که علاوه بر اینکه بعنوان پروتئین ذخیره‌ای شناخته می‌شود، فعالیت لیپید آسیل هیدرولازی و ترانسفرازی هم دارند (۱۵ و ۱۶). 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 هاپلوبیت رمزگذاری می‌شود. ناحیه رمزکننده پروتئین و ناحیه پیشبر بالای موقعیت ۸۷-۸۷ 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 ۵ 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، ۱۹ و ۴۱). در اوایل مرحله نمو غده در بافت‌های آوندی و در مراحل انتهایی 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

بالاتری را برای بیان ژن ایجاد می‌کند. حتی خاموشی در غیاب الفاکننده‌ها 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 الفاکننده 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 دائم داشته باشد (۴). پیشبرهای مصنوعی^۱: TATA (ضروری برای RNA پلیمراز II) در جایگاه CCAAT شروع رونویسی و توالی حفظ شده برای پیشبر یوکاریوت فعل 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

جهت جداسازی پیشبر *Pat1* بوسیله واکنش زنجیری پلیمراز (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 ۵'-cggaagctttagtttagaaatcataatgtt-3' پیشرو ۵'- آغازگر برگشتی ۳'- cgcggatccctttgttggtgcttgaggcatataac- 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 (pTZ57R/T) (ناقل T/A) PCR مستقیماً در ناقل (Fermentas InsTAcloneTM PCR Cloning Kit#K1214،) 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 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 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 اگرواینفیلتریشن می‌باشد.

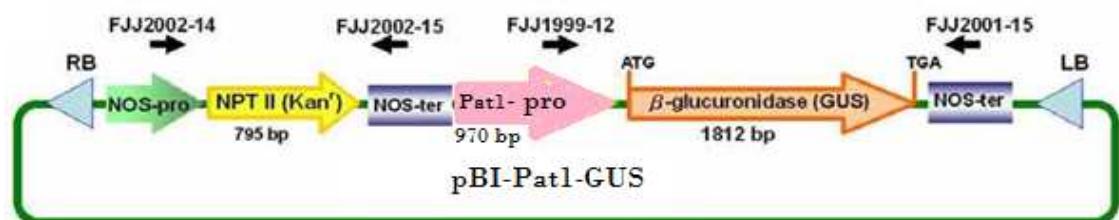
مواد و روشها

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 ژنومی به روش دلپورتا (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 الحق شد. تاریختی سلول‌های *E.coli* با استفاده از پلاسمید نوترکیب به روش فیزیکی-شیمیایی انجام گردید^(۳۵). کلون‌های تاریخت باکتریایی در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب گردیدند. جهت تایید الحق 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 نوترکیب حاصل که *pBI-Pat1-GUS* نامگذاری شد (شکل ۱)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* انجام گرفت.

همسانه‌سازی 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.) DNA 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 *BamHI* و *HindIII* پیشبر *pBI121* خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت



شکل ۱- سازه نوترکیب *pBI-Pat1-GUS*

تاریخت گردیدند^(۳۵) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین^۱
1- Freeze-Thaw

سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens*

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 ۸-۳۶ ساعت در دمای 37°C قرار داده گرفته و سپس در الکل 70% 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 دائمی مزایای فراوانی برای ارزیابی بیان ژن‌ها دارد. از جمله این مزایا می‌توان به عدم نیاز به باززنایی گیاه از سلول‌های تاریخته 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). الحق پیشبر در پلاسمید T/A با استفاده از PCR ثابت شد. همچنین با استفاده از

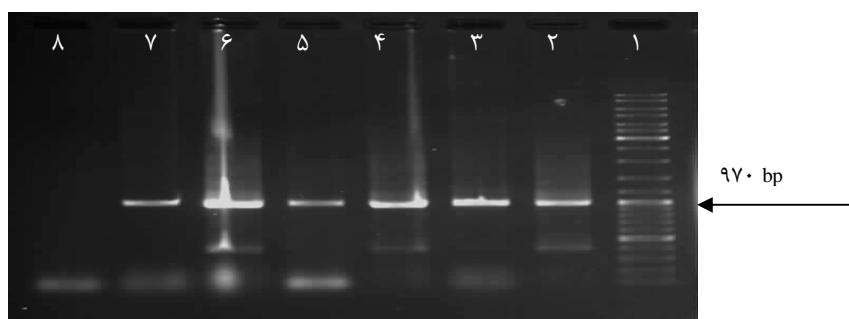
(75 mg/l) در دمای 28°C به مدت ۲ تا ۳ روز گلنی‌ها ظاهر شدند. تایید تاریختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *pat1* انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید *pBI121* به عنوان کنترل در تاریختی استفاده شد.

بررسی بیان موقت ژن *gus* در گیاهان سیب‌زمینی

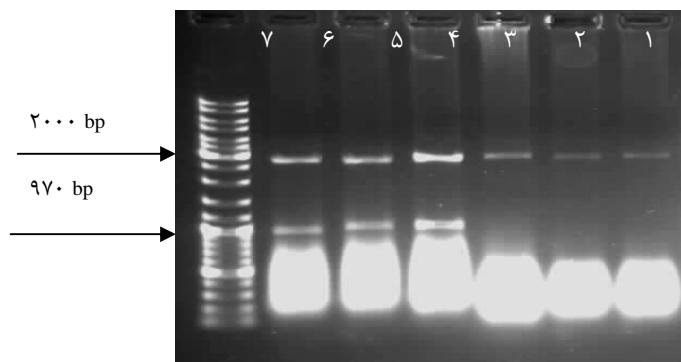
بهمنظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه *pBI-Pat1-GUS* در گیاهان و بررسی بیان ژن باکتریایی *gus* (که آنزیم بتاگلوكورونیداز را رمزسازی می‌کند) تحت پیشبرهای *pat1* و *CaMV35S* در غده سیب‌زمینی، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا گردید. بدین منظور ابتدا اگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب *pBI121* یا *pBI-Pat1-GUS* محیط LB مایع حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و 75 میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین به صورت شبانه در دمای 28°C روی شیکر کشت شدند. صبح روز بعد 2 میلی‌لیتر از این کشت به 50 میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و 75 میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین افزوده شد و مجددا در همان شرایط رشد ذکر شده قرار گرفت. پس از رسیدن OD_{600} به حدود $0.5/0$ ، 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 خلاء و رود باکتری به داخل غدها تسهیل گردید. نمونه‌ها

(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 نوترکیب 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 *Pat1* به منظور بررسی ورود پیشبر *Pat1* و مشاهده باند ۹۷۰ bp (۱-۷) خط کش مولکولی ۱Kbp (۸) محصول PCR حاوی پیشبر *pat1* 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 *Pat1* به منظور بررسی ورود پیشبر با *BamHI* و *HindIII* و مشاهده باند ۹۷۰ bp (۱، ۲، ۳ و ۷) 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%)

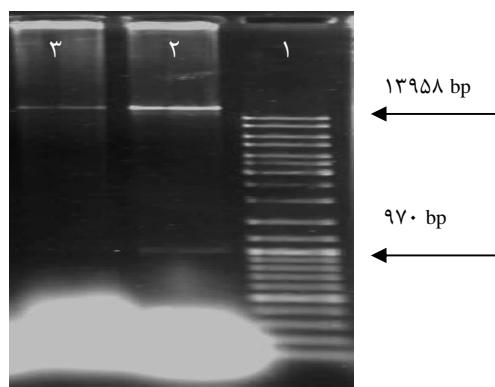
Strand=Plus/Plus

Query 56	AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGAAAATAACCTCAAAAAGACGTTCACT	115
Sbjct 1	AATGTTGAATCTAGAAAAATCTCATGCAGTGAAAATAACCTCAAAAAGACGTTCACT	60
Query 116	CCATAGAGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAGAAAACCTCCCTCAACAAG	175
Sbjct 61	CCATAGAGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAGAAAACCTCCCTCAACAAG	120
Query 176	GACATTGCGGTGCTAAACAATTCAAGTCTCATCACACATATAATTATATAAATACT	235
Sbjct 121	GACATTGCGGTGCTAAACAATTCAAGTCTCATCACACATATAATTATATAAATACT	180
Query 236	AATAAAGAATAGAAAAGGAAAGTAAACATCATTAGATCGTCTTGTATATTTTAGTG	295
Sbjct 181	AATAAAGAATAGAAAAGGAAAGTAAACATCATTAGATCGTCTTGTATATTTTAGTG	240
Query 296	ACACACGTTAGTGACAACGTGATTGACGAAATCTTTCTGCACACAAAATTTTAGTG	355
Sbjct 241	ACACACGTTAGTGACAACGTGATTGACGAAATCTTTCTGCACACAAAATTTTAGTG	300
Query 356	CGAACACATGATTATAGATGATAAATTATTGTTCCCTCATTAATCTAATTGTTGTTAGTG	415
Sbjct 301	CGAACACATGATTATAGATGATAAATTATTGTTCCCTCATTAATCTAATTGTTGTTAGTG	360
Query 416	ATCATTACTCCTTGTGTTTATTGTCATGTTAGTCATGTTAGTCATTaaaaaaaATATCTCTC	475
Sbjct 361	ATCATTACTCCTTGTGTTTATTGTCATGTTAGTCATGTTAGTCATTaaaaaaaATATCTCTC	420
Query 476	TTCTTATGTACCTGAATGGTTGAAACGGATCTATTATATAACTAATAAAAGAATAGAAA	535
Sbjct 421	TTCTTATGTACCTGAATGGTTGAAACGGATCTATTATATAACTAATAAAAGAATAGAAA	480
Query 536	AAGGAAAGTGAAGTGAGGTTGAGGGAGAGAATCTGTTAATATCAGAGTCGATCATGTT	595
Sbjct 481	AAGGAAAGTGAAGTGAGGTTGAGGGAGAGAATCTGTTAATATCAGAGTCGATCATGTT	540
Query 596	CAATTATCGATATGACCTAACTCAACTGAGTTAACCAATTCCGATAAGGCGAGAA	655
Sbjct 541	CAATTATCGATATGACCTAACTCAACTGAGTTAACCAATTCCGATAAGGCGAGAA	600
Query 656	ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAATCTCATGTTAGTGAGGTTAACCTCAGTAAGGAC	715
Sbjct 601	ATATCATAGTATTGAGTCTAGAAAATCTCATGTTAGTGAGGTTAACCTCAGTAAGGAC	660
Query 716	GTTGAGTCCATAGAGGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAGAAAACCTCCCC	775
Sbjct 661	GTTGAGTCCATAGAGGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAGAAAACCTCCCC	720
Query 776	TCAAGANN-ACATTGCGGTGCTAAACAATTCAAGTCTCATCACACatataatatattat	834
Sbjct 721	TCAAGAAGGACATTGCGGTGCTAAACAATTCAAGTCTCATCACACATATAATTATATT	780
Query 835	ataataactaataaaataataaaaaanGAAAGTAAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG	894
Sbjct 781	ATAATACTAATAATAATAGAAAAGGAAAGTAAACATCACTAACGACAGTTGCGGTG	840
Query 895	CAAACGTGAGTGAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACCTTATTGGNN-TGTC	953
Sbjct 841	CAAACGTGAGTGAATAAACATCACTAATAGACATCACTAACCTTATTGGTTATGTC	900
Query 954	AAANTCAAAATAAAATTCTCA-CTTGTGTTACGTGCCTATATACCATGCTTGTATAT	1012
Sbjct 901	AAACTCAAAATAAAATTCTCAACTGTTACGTGCCTATATACCATGCTTGTATAT	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.

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

جايكزيني پيشبر *Pat1* با پيشبر دائمي *CaMV35S* سازه نوترکيب *pBI-Pat1-GUS* (شکل ۱) با استفاده از آزمون‌های مختلف (اين آزمون‌ها شامل: PCR با پرايمر اختصاصي پيشبر *Pat1* هضم آنزيمی و اگرواينفيليتريشن می‌باشد). مورد تائيد قرار گرفت. نتایج PCR سازه نوترکيب

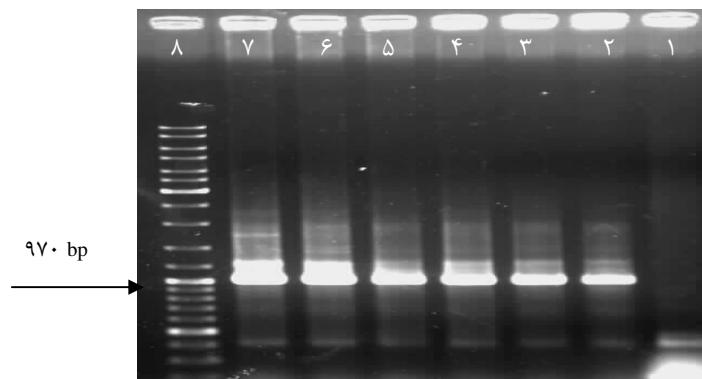


شکل ۵- الکتروفورز هضم آنزیمی *pBI-Pat-GUS* استخراج شده از *E.coli*، ۱) خط کش مولکولی ۱Kbp و ۲ و ۳ هضم آنزیمی با *BamH1* و *HindIII* مشاهده طول باند ۹۷۰ bp

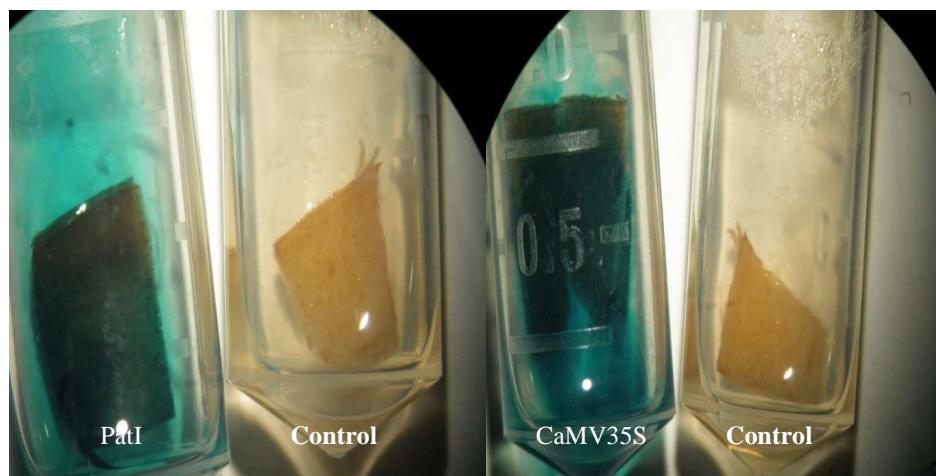
X-Gluc نشان داد که پيشبر *Pat1* همانند پيشبر *CaMV35S* باعث بيان ژن *gus* در غده‌های سیب زمینی شده است. این امر ضمن اینکه کارایی و فعالیت پيشبر *Pat1* را نشان می‌دهد حاکی از موفقیت روش اگرواينفيليتريشن برای غده‌های سیب زمینی می‌باشد. رنگ آبی بافت‌ها نشان داد که پيشبرها باعث بيان ژن *gus* شده‌اند. عدم رنگ آميزی غده‌های کنترل تاییدی بر صحت بيان ژن و عدم تاثیر پذیری نتایج از عوامل محیطی و جانبی می‌باشد (شکل ۷).

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

نتایج حاصل از آزمایش بيان موقت پيشبر در غده سیب زمینی در محلول رنگ آميزی



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



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

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. وزنلر و همکاران (۴۱) این سازه را به گیاه منتقل کردند و نشان دادند ژن *gus*

بلوندی و همکاران (۳۳) 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*, *PatI*, پیشبر *CaMV35S* با همان قدرت باعث بیان ژن *gus* در غده‌ها 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

- 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.
- Artschwager, E.F. 1924. Studies on the potato tuber. *J. Agri. Res.*, 27: 809-35.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant. Mol Biol. Rep.*, 1: 19-21.
- 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.
- 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.
- 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.

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 and mouth 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 Physiol., 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 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.

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