

Identification, isolation and sequence analysis of a β -Conglycinin seed specific promoter

الهام صیوری رباط^۱، علی اکبر حبشی^{۲*}، محمود سلوکی^۱، مطهره محسن پور^۲ و عباسعلی امام جمعه^۱
Elham Saboori Robat¹, Ali Akbar Habashi^{*2}, Mahmood Solouki¹, Motahharez Moshenpour² and Abbasali Emamjomeh¹

۱- دانشگاه زابل، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی کشاورزی

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Department of Gene Transformation, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: habashia@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۵)

چکیده

پیشبرها یکی از عناصر کلیدی مهندسی ژنتیک برای بیان هدفمند ژن‌ها محسوب می‌شوند. به طوریکه انواع مختلفی از پیشبرها با توجه به نوع بافت و یا میزان بیان می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از پروتئین‌های ذخیره‌ای مهم در بذرهای سویا پروتئین β -کانگلايسينين است که طی توسعه بذر ساخته می‌شود. سنتز پروتئین‌های ذخیره‌ای در ابتدا در سطوح رونویسی کنترل می‌شود و بیان اختصاصی آن‌ها در بذر، تحت کنترل نواحی پیشبری ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌باشد. به علت مختص بذر بودن پروتئین β -کانگلايسينين انتظار می‌رود که پیشبر ژن آن نیز مختص بذر باشد در این تحقیق جداسازی پیشبر مختص بذر β -کانگلايسينين از گیاه سویا رقم بومی "کتول" صورت گرفت. پس از همسانه سازی پیشبر در ناقل pTZ57R/T و تعیین توالی آن، نواحی حفاظت شده مهم در این پیشبر از قبیل جعبه TATA، جعبه CAAT و سایر موتیف‌های مختص بذر مانند عناصر تکراری SKn-1، عناصر تکراری RY، جعبه G، شناسایی شدند. سپس پیشبر β -کانگلايسينين به همراه سیگنال پتید مورد نظر و ژن دلتازین، برای مطالعات بعدی در ناقل گیاهی pBI121 همسانه سازی شد.

واژه‌های کلیدی

پیشبر،
 β -کانگلايسينين
سویا
موتیف
سیگنال پتید

مقدمه

مطالعات پیشبرها که در حد وسیعی تنظیم بیان ژن را در سطح رونویسی بر عهده دارند، برای درک چگونگی تنظیم بیان ژن و به عنوان ابزاری برای بیوتکنولوژی گیاهی و مهندسی ژنتیک ضروری می‌باشند (Truksa et al., 2003). پیشبرها بسته به نوع فعالیت آنها به سه دسته تقسیم می‌شوند (Dyanan and Tjian 1985): دسته اول پیشبرهای دائمی (Constitutive) هستند که عناصر آنها توسط فعال کننده‌ها و یا عوامل رونویسی، جهت شروع رونویسی تشخیص داده می‌شوند. دسته دوم شامل پیشبرهای تحریک شونده (Inducible) هستند و توسط یک یا چند محرک مانند هورمون‌ها، مواد شیمیایی و شرایط محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده فعال می‌شوند. دسته سوم پیشبرهایی هستند که در بافت‌های خاص و مراحل رشدی خاص در گیاه فعال می‌شوند. تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های بذری در گونه‌های گیاهی متنوع شناسایی شدند و پیشبر مربوط به آنها منجر به شناسایی عناصر Cis-acting و Trans-acting در گیر در بیان ژن شده است. پیشبرهای مختص دانه در مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخته به منظور افزایش تولید ترکیبات دارویی یا صنعتی و همچنین برای افزایش کیفیت تغذیه ای دانه استفاده می‌شود. با مطالعات مولکولی تا کنون چندین پیشبر مختص بذر شناسایی شده است، از جمله پیشبر آلفا گلوبولین (α -globulin) در پنبه (Sunilkumar et al., 2002)، پیشبرهای گاما زئین (gamma-zein) در ذرت (Marzábal et al., 1998)، پیشبر گلوتنین (glutenin) در گندم (Lamacchia et al., 2001)، پیشبر بتا فازولین در کلزا (β -phaseolin) (Sohrabi et al., 2015)، پیشبر β -کانگلاسیسینین (β -conglycinin) در سویا (Chen et al., 1989) و پیشبر (α -Kaf) در سورگوم (Ahmad et al., 2012). رایج ترین پیشبرهای مورد استفاده در مهندسی ژنتیک برای صفات مختلف، پیشبرهای دائمی مانند ویروس موزایک کلم ($CaMV35S$) (Odell et al., 1985) و پیشبر یوبی کوئیتین (ubiquitin) ذرت

(Christensen et al., 1992) می‌باشد. با این حال، استفاده از پیشبرهای دائمی هزینه‌های بالای متابولیسمی و اثرات نامطلوب پلئوتروپی را به دنبال داشته است. از این رو در مهندسی ژنتیک استفاده از پیشبرهای القایی و اختصاصی بافت، برای هدف‌گیری ژن مطلوب در بافت‌های مورد نظر یا تحت شرایط اختصاصی یک جزء ضروری محسوب می‌شود که نه تنها اینکه مانع از هزینه‌های متابولیسمی بالا برای گیاه میزبان می‌شود بلکه تا حدودی نگرانی‌های ایمنی زیستی را برطرف می‌کند (Kasuga et al., 1999, Hsieh et al., 2002).

سویا به منظور تولید و بهره برداری اقتصادی از روغن و پروتئین کشت می‌شود. این گیاه همانند سایر گیاهان خانواده نخود حاوی مقادیر کم اسیدهای آمینه گوگرددار (متیونین و سیستئین) است. گلاسیسینین (S 11) و β -کانگلاسیسینین (S 7) با اختصاص ۷۰ درصد پروتئین‌های ذخیره‌ای کل، دو رده اصلی پروتئین‌های سیتوسولی دانه سویا به شمار می‌روند (Birt et al., 2004). پروتئین β -کانگلاسیسینین از سه زیر واحد α ، α' ، β تشکیل شده است که زیر واحد β آن داری مقادیر بسیار کم اسیدهای آمینه گوگرددار (کمتر از یک درصد) است و افزایش این پروتئین می‌تواند افزایش کیفیت تغذیه‌ای سویا را به دنبال داشته باشد. بنابراین استفاده از پیشبرهای مختص دانه با منشاء لگوم‌ها در توسعه تکنولوژی تولید لگوم‌های تراریخته به منظور بهبود کیفیت پروتئین دانه مفید می‌باشد.

β -کانگلاسیسینین زیر واحد آلفا یک پیشبر مختص بذر می‌باشد که طی توسعه بذر در کوتیلدون‌ها محور لپه بیان می‌شود که در بذرهای ترنسژنیک در مراحل مختلف توسعه دانه بیان آن تعیین شده است (Nishizawa et al., 2003). اطلاعات تنظیمی برای بیان اختصاصی بافت در پیشبر β -کانگلاسیسینین تقریباً در ۲۵۰ جفت بازی ناحیه فرادست نقطه شروع رونویسی قرار دارد. همواره تکنیک‌های مولکولی در جهت بهبود خصوصیات تغذیه‌ای سویا کاربرد داشته است یکی از روش‌های مورد استفاده

۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) در ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن ۹۵ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ۵۸ درجه و یک دقیقه و ۳۰ ثانیه دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. قطعه تکثیر شده به طول ۹۶۱ جفت بار خالص سازی شده و واکنش اتصال، مخلوط حاصل به سلول‌های مستعد، با استفاده از روش شوک حرارتی تراریزش شد (An 1987). کلونی‌های نوترکیب *E. coli* سویه XLI-Blue حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین رشد کرده و پس از انتخاب کلونی‌های حاوی ژن مورد نظر، به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی، قطعه مربوط به ژن β -کانگلاسیسینین توسط دو آنزیم *HindIII* و *SacI* هضم و خالص سازی گردید. پلاسمید نوترکیب pTZ-Pcong برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. آنالیز توالی پیشبر β -کانگلاسیسینین با استفاده از پایگاه داده‌ای PlantPAN (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/>) انجام شد.

ساخت ناقل بیانی

در این تحقیق به منظور ساخت ناقل بیانی اختصاصی بذر، ناقل بیانی pBI121 حاوی ژن دلتا زئین تحت کنترل پیشبر β -کانگلاسیسینین و ترمیناتور نوپالین سنتاز ساخته شد. توالی ژن دلتا زئین از بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی AF461049 گرفته شد. استخراج DNA از گیاه ذرت رقم KE72012 استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن دلتا زئین (F2, R2) انجام شد (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) در ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن

در جهت افزایش محتوی اسیدهای آمینه سولفوردار مانند متیونین در بذر سویا انتقال و بیان ژن‌های حاوی متیونین بالا از جمله دلتا زئین می‌باشد (Kim et al., 2004). در این پژوهش پیشبر β -کانگلاسیسینین از سویا رقم ایرانی "کتول" جداسازی شده و در نهایت به همراه ژن دلتا زئین برای مطالعات بعدی در ناقل گیاهی pBI121 همسانه سازی شد. این جداسازی برای اولین بار از ارقام بومی ایران صورت گرفته و امید بر این است در غنی سازی بذر به منظور بهبود خصوصیات تغذیه‌ای سویا جهت مصرف خوراک دام و طیور مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، باکتری و ناقل‌های مورد استفاده

در این تحقیق گونه سویا زراعی، رقم "کتول" و گونه ذرت رقم "KE72012" برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. باکتری‌های مورد استفاده *E. coli* سویه XLI-Blue و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 به عنوان میزبان برای پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمیدهای pTZ57R/T با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین و ناقل گیاهی pBI121 حامل نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین استفاده شد. آنزیم‌های به کار رفته در این تحقیق از شرکت Roche تهیه شد.

همسانه‌سازی و آنالیز توالی پیشبر β -کانگلاسیسینین

توالی مربوط به ژن β -کانگلاسیسینین از بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی GU723691 گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای β -کانگلاسیسینین (F1, R1) انجام شد (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، ۱۵ نانوگرم DNA،

شدند و به عنوان الگو برای اتصال آنها و ساخت قطعه هیبرید ژن دلتا زئین/پیشبر در SOEing PCR با استفاده از آغازگرهای F3 و R3، مورد استفاده قرار گرفتند و قطعه مربوطه موسوم به Cong-CZ تکثیر گردید (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم High fidelity PCR، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۳/۲ میکرولیتر MgCl₂ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) می باشد (برنامه دمایی طبق جدول ۲).

۹۵ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ۶۰ درجه و یک دقیقه دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از اطمینان از اینکه پرایمرهای طراحی شده قادر به تکثیر پیشبر مورد نظر می باشند واکنش PCR ذکر شده با آنزیم دارای خاصیت تصحیح کنندگی (High fidelity PCR) انجام شد. باند حاصل از تکثیر با آغازگرهای R1، F1 و نیز باند حاصل از تکثیر با آغازگرهای R2، F2، از روی ژل آگارز جدا و خالص سازی گردید. محصول خالص شده این دو قطعه با هم به نسبت مولی مساوی مخلوط

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد مطالعه در پژوهش

Table 1. Primer sequences used in this study

sequence توالی	نام آغازگر primer
5' <i>Hind</i> III site ATTATATCAAAATGGCAAAAAC-3'	F1: conGly-P-F
5' <i>Sac</i> I site TGAGACAGAAACTGATGCCAGG-3'	R1: conGly-TP-R
5'- <i>Hind</i> III site ACGCATATTCCAGGGCACTTG-3'	F2: Zein-F
5'- <i>Sac</i> I site TATCTAAAATGCAGCACCAACAAAG-3'	R2: Zein-R
5' <i>Hind</i> III site TGGAATATGCGTTGGACAGAAACTGATGCCAGG-3'	F3: Fusion-R
5'- <i>Sac</i> I site AGTTTCTGTCTCACGCATATTCCAGGGCACTTG-3'	R3: Fusin-F

جدول ۲- برنامه چرخه های استفاده شده برای SoEing PCR

Table 2. Cycles used in SoEing PCR

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱	۲ دقیقه	۹۴
۱۰	۳۰ ثانیه	۹۴
	۱ دقیقه	۵۰
	۲ دقیقه	۷۲
۱۵	۳۰ ثانیه	۹۴
	۳۰ ثانیه	۵۵
	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲
۱	۱۵ دقیقه	۷۲

چندین عنصر اساسی پیشبرها مانند جعبه CAAT (۹) تکرار) و جعبه TATA (TATAAA) در محدوده ۸۴- تا ۹۰- می‌باشد (جدول ۳). سایر موتیف‌های مختص بذر مانند موتیف (GTCAT) Skn-1 که از اجزای تنظیمی مورد نیاز برای بیان در آندوسپرم می‌باشد در محدوده ۸۷- تا ۹۲- و ۶۷۰- تا ۶۰۵- شناسایی شد. جعبه G (CACGTA) در محدوده ۲۵۸- تا ۲۶۴- تشخیص داده شد. عنصر جعبه W (TGACG) که در بیان القاء شده در اثر زخم شناسایی شده، در محدوده ۱۱۶- تا ۱۲۱- قرار دارد. و به طور مشابه، موتیف (CATGCA) RY در محدوده ۲۷۰- تا ۲۷۶- در توالی پیشبر بتا کانگلاسینین شناسایی شد. این مشاهدات نشان داد که حضور چند کپی از موتیف‌های مختص بذر در پیشبر β -کانگلاسینین ممکن است مسئول عمل اختصاصی آن باشد.

قطعه Cong-CZ ابتدا در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی اولیه شد. پس از تایید صحت ناقل نو ترکیب حاصل (pTZ-Cong-CZ)، هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *HindIII* و *SacI* انجام شد و قطعه Cong-CZ در جایگاه متناظر با ناقل دوگانه pBI121 پس از حذف پیشبر CaMv35S و ژن GUS همسانه سازی شد. کلونی‌های نو ترکیب pBI121-Cong-CZ حاصل از تراریزش مخلوط اتصال روی محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم برلیتر کانامایسین رشد کرده و کلونی‌های حاوی قطعه مورد نظر، به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *HindIII* و *SacI* انتخاب شدند. پلاسمید نو ترکیب حاصل (pBI121-Cong-CZ) در *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA 4404 همسانه سازی شد. کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های (Sambrook *et al.*, 1989) گردید.

نتایج و بحث

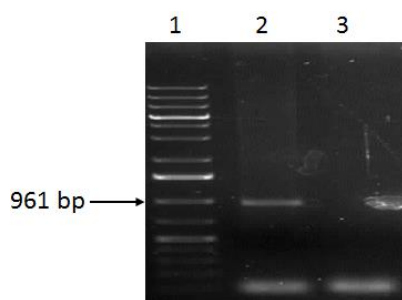
تعیین صحت جداسازی پیشبر β -کانگلاسینین

قطعه پیشبر β -کانگلاسینین با اندزه ۹۶۱ جفت باز توسط آغازگرهای F1,R1 شناسایی شد (شکل ۱). محدوده‌ای که برای طراحی پیشبر در نظر گرفته شد از نوکلئوتید ۱۵۹۸ تا ۲۴۹۴ بود که ناحیه ۲۴۹۴ تا ۲۵۵۹ به عنوان سیگنال پپتید در نظر گرفته شد (۲۱ اسید آمینه). پیشبر داخل پلاسمید pTZ57R/T همسانه سازی شد.

کلونی‌های مثبت با کلنی PCR تایید شده و ظهور باند ۹۶۱ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* حضور پیشبر در پلاسمید pTZ را به اثبات رساند.

نتایج مربوط به بررسی پیشبر β -کانگلاسینین

پس از دریافت توالی‌یابی، بررسی توالی حاصل در بانک اطلاعاتی PLANTPAN نشان داد که این قطعه ۹۶۴ جفت باز دارد که شامل نقطه آغاز رونویسی (ATG) و



شکل ۱- شناسایی پیشبر β -کانگلاسینین در سویا. ۱: نشانگر اندازه‌وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas)، ۲: پیشبر β -کانگلاسینین، ۳: واکنش PCR بدون استفاده از DNA الگو.

Fig 1: Identification of β -Conglycinin seed specific promoter in soybean

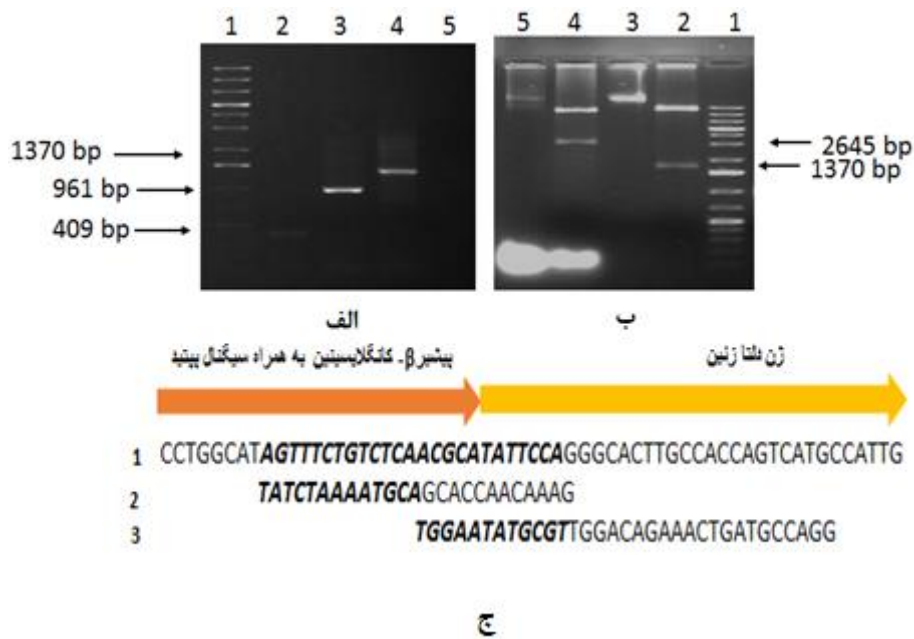
جدول ۳- اجزای موجود بر روی توالی همسانه سازی شده پیشبر مختص بذر β -کانگلايسينينTable 3. Sequence analysis of β -Conglycinin seed specific promoter

نوع موتيف	نام موتيف	توالی موتيف	موقعیت موتيف	رفرنس
موتيف های اساسی	جعبه TATA	TATAAA	-۸۴ تا -۹۰	(Forde <i>et al.</i> , 1985)
	جعبه CAAT	CAAT	-۲۰۵ تا -۲۰۹	(Forde <i>et al.</i> , 1985)
	Skn-1	GTCAT	-۸۷ تا -۹۲	(Blackwell <i>et al.</i> , 1994)
	جعبه E	ACCCATCAAG	-۲۰۱ تا -۲۱۱	(Kawagoe and Murai 1992, Stålberg <i>et al.</i> , 1996)
موتيف های مختص بذر	جعبه W	TGACG	-۱۱۶ تا -۱۲۱	(Eulgem <i>et al.</i> , 2004, Nishiuchi <i>et al.</i> , 2004)
	محل اتصال فاکتور رونویسی SEF4	GCATTTTATCA	-۷۹ تا -۹۰	(Allen <i>et al.</i> , 1989)
	Alpha 4, محل اتصال فاکتور رونویسی SEF1	AACCCAAACCCA	-۱۶۵ تا -۲۰۴	(Allen <i>et al.</i> , 1989)
	موتيف RY	CATGCA	-۲۷۰ تا -۲۷۶	(Bobb <i>et al.</i> , 1995)
	عنصر تنظیمی دخیل در بیان اختصاصی بذر	AAAGAA	-۱۳ تا -۱۹	(Bobb <i>et al.</i> , 1995)
	موتيف ABRE	TACGTG	-۲۷۰ تا -۲۷۶	(Ogawa <i>et al.</i> , 2003)
	محل اتصال فاکتور رونویسی MYB	TAAC TG	-۵۱۰ تا -۵۱۶	(Ogawa <i>et al.</i> , 2003)
	موتيف ARE	TGGTTT	-۲۶۶ تا -۲۷۲	(Ogawa <i>et al.</i> , 2003)
	عنصر LAMP	CCAAAACCA	-۲۶۶ تا -۲۷۵	(Argüello-Astorga and Herrera-Estrella 1998)
	سایر موتيف ها	موتيف TCT	TCTTAC	-۲۰۴ تا -۲۰۹
	جعبه G	CACGTA	-۲۵۳ تا -۲۵۹	(Milisavljević <i>et al.</i> 2004)

نتایج مربوط به ساخت ناقل دوگانه بیانی گیاهی مختص بذر

به منظور ساخت ناقل بیانی اختصاصی بذر، قطعه ژن دلتا زئین با اندازه ۴۰۹ جفت باز در ذرت شناسایی شد (شکل ۲). پایگاه داده ای SMART وجود یک سیگنال پپتیدی (۲۱ اسید آمینه) در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۲ تا ۸۵ از توالی ژن مذکور را مشخص کرد و با توجه به اینکه پیشبر β -کانگلايسينين با در نظر گرفتن سیگنال پپتید جداسازی شده بود، بنابراین طراحی آغازگر برای ژن دلتا زئین بدون در نظر گرفتن ناحیه سیگنال پپتید در نظر گرفته شد. قطعه ژن دلتا زئین پس از خالص سازی از ژل به همراه قطعه ۹۶۱ جفت بازی پیشبر β -کانگلايسينين با آغازگرهای F3,R3 به هم متصل شد در شکل ۲ توالی محل اتصال دو قطعه هیبرید پیشبر β -کانگلايسينين/ژن دلتا زئین با

توالی آغازگرهای طراحی شده نشان داده شده است. در برنامه SoEing PCR، طول آغازگر برگشتی ۳۴ باز می باشد، که ۱۲ باز انتهای ۵' این آغازگر مکمل ابتدای ۵' ژن زئین بعد از حذف سیگنال پپتید می باشد. علاوه بر آن برای ژن دلتا زئین آغازگری به طول ۳۴ باز طراحی شد به طوریکه ۱۳ باز آن، همپوشان با انتهای ۳' سیگنال پپتید پیشبر ژن β -کانگلايسينين بود. بدین ترتیب انتظار بر این بود که بعد از تکثیر اولیه و بدست آوردن دو محصول PCR پیشبر β -کانگلايسينين و ژن دلتا زئین به صورت جداگانه دو قطعه تکثیر شده شامل ۲۵ باز همپوشان باشد. در نهایت حضور قطعه ۱۳۷۰ جفت بازی (Cong-CZ) صحت آنرا تایید کرد (شکل ۲).



شکل ۲- الف) محصول PCR: ۱: نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1 kb ladder شرکت Fermentas): ۲: ژن دلتا زئین در ذرت، ۳: پیشبر β -کانگلایسینین، ۴: اتصال پیشبر β -کانگلایسینین به همراه سیگنال پپتید و ژن دلتا زئین ۵: واکنش PCR بدون استفاده از DNA الگو. **ب)** ۱: نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1 kb ladder شرکت Fermentas): ۲: هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* برای تایید پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ)، ۳: پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ) هضم نشده، ۴: ناقل گیاهی pBI121 هضم شده با آنزیم‌های *HindIII* و *SacI*: ۵: ناقل دوگانه pBI121 هضم نشده. **ج):** محل اتصال دو توالی پیشبر β -کانگلایسینین به همراه سیگنال پپتید و ژن دلتا زئین. ۱: محل اتصال دو قطعه هیبرید پیشبر β -کانگلایسینین/ژن دلتا زئین. ۲: توالی آغازگر ریورس برای ژن دلتا زئین. ۳: توالی آغازگر برگشتی برای SoEing PCR. توالی‌های ایتالیک مناطق همپوشان می‌باشد.

Fig 2. Confirmation of isolation and junction of β -conglycinin promoter containing signal peptide and zein gene fragments using SOEing PCR and construction of recombinant plasmid pBI121-cong-CZ.

بحث

در این مطالعه پیشبر مختص بذر β -کانگلایسینین از گونه گیاهی سویا رقم ایرانی کنترل جداسازی شد و آنالیز توالی آن نشان داد که این توالی شامل چندین موتیف پیشبر اختصاصی بذر می‌باشد. در توالی پیشبر β -کانگلایسینین دو تکرار از موتیف Skn-1 شناسایی شد که این موتیف همراه با فاکتورهای رونویسی افزایش دهنده پروتئین ذخیره‌ای (SPA) برای کنترل بیان اختصاصی آندوسپرم ضروری می‌باشد. موتیف Skn-1 در پیشبر ژن‌های بسیاری از غلات شناسایی شده است (Washida et al., 1999, Fauteux and Strömvik 2009, Gu et al.,

حذف کاست ژنی *GUS* به همراه *CaMV35S* از ناقل گیاهی PBI121 در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* با ظهور قطعه ۲۶۴۵ جفت بازی تایید شد. سپس قطعه ۱۳۷۰ جفت بازی از ژل خالص سازی شده و در پلاسمید نوترکیب (PBI121 (-*GUS*)) تحت ترمیناتور نوپالین سنتتاز قرار گرفت. کلونی‌های مثبت با کلنی PCR تایید شده و ظهور باند ۱۳۷۰ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* حضور کاست پیشبر β -کانگلایسینین به همراه ژن دلتا زئین در پلاسمید PBI121 را به اثبات رساند (شکل ۲).

سایین و همکاران (۲۰۰۷) حدود ۶۶۰ جفت باز از توالی پیشبر β -کانگلاسینین را جداسازی کردند که نتایج آنالیز توالی پیشبر β -کانگلاسینین چندین موتیف مختص بذر مانند موتیف‌های تکراری RY، موتیف‌های AGCCA، موتیف‌های TACACAT، موتیف‌های ACGT و باکس E را نشان داد (Caiyin, et al. 2007). در تحقیق حاضر حدود ۹۶۰ جفت باز از پیشبر β -کانگلاسینین که از گیاه سویا رقم بومی "کتول" جداسازی شده که موتیف‌های مختص بذر بیشتری مانند Skn-1 و باکس G شناسایی شد که این می‌تواند در کارایی عملکرد این پیشبر برای اهداف مهندسی ژنتیک موثر باشد. ناقل دوگانه بیانی گیاهی ساخته شده در این پژوهش چندین مزیت را شامل می‌شود از جمله، با توجه به اینکه استفاده از پیشبرهای دائمی هزینه‌های متابولیکی بالا و اثرات نامطلوب پلئوتروپی را برای گیاه به دنبال داشته است استفاده از پیشبر مختص بذر β -کانگلاسینین در جهت تولید لگوم‌های تراریخته می‌تواند مفید واقع شود. با توجه به اینکه سویا از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین و سیستئین فقیر می‌باشد و هر ساله هزینه زیادی صرف اسیدهای آمینه سنتتیک برای مصرف کنجاله سویا در خوراک دام و طیور می‌شود، ژن دلتا ژئین استفاده شده در این ناقل می‌تواند در جهت افزایش بیان اسیدآمینه متیونین بذر مفید واقع شود.

موتیف RY برای کنترل بیان ژن در طی جنین زایی و بلوغ بذر ضروری می‌باشد. آنالیز توالی پیشبر β -کانگلاسینین حضور دو کپی از این موتیف را نشان داد که در آرآیدوپسیس تالیانا یک کپی (Fauteux et al., 2008) و در گیاه کلزا سه کپی (Sohrabi et al., 2015) از این موتیف مشاهده شده است. دو تکرار از موتیف G-box در توالی پیشبر β -کانگلاسینین وجود دارد که برای بیان ژن در استرس‌های مختلف مانند نور و اسیدآبسیزیک ضروری می‌باشد. اغلب گزارشات نشان دادند که اسیدآبسیزیک یک فاکتور مهم در تنظیم بیان ژن در طی بلوغ بذر می‌باشد (Ng et al., 2004, Ross and Shen 2006). همچنین پیشبر استخراج شده از β -کانگلاسینین شامل دو کپی از موتیف TACGTG می‌باشد که هسته توالی عنصر ABRE پاسخ به اسیدآبسیزیک می‌باشد. چهار تکرار از موتیف TGCA در پیشبر β -کانگلاسینین یافت شد که در اتصال پروتئین‌های متصل شونده به DNA هسته‌ای نقش دارند (Vincentz et al., 1997, Wu et al., 2000). موتیف‌های درگیر در پاسخ به نور مانند باکس G، عنصر LAMP و موتیف TCT در توالی پیشبر β -کانگلاسینین شناسایی شد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که نور یک فاکتور مهم در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر می‌باشد (Tang et al., 2003, Hacham et al., 2013).

منابع

- Allen, R. D., F. Bernier, P. A. Lessard and R. N. Beachy. 1989. "Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer." *The Plant Cell* 1(6): 623-631.
- An, G. 1987. "[17] Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis." *Methods in Enzymology* 153: 292-305.
- Argüello-Astorga, G. and L. Herrera-Estrella. 1998. "Evolution of light-regulated plant promoters." *Annual Review of Plant Biology* 49(1): 525-555.
- Birt, D. F., S. Hendrich, D. L. Alekel and M. Anthony. 2004. "Soybean and the prevention of chronic human disease." *Soybeans: Improvement, Production, and Uses(soybeansimprove)*: 1047-1117.
- Blackwell, T. K., B. Bowerman, J. R. Priess and H. Weintraub. 1994. "Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements." *SCIENCE-*

- NEW YORK THEN WASHINGTON 266: 621-621.
- Bobb, A. J., H. G. Eiben and M. M. Bustos. 1995.** "PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters." *The Plant Journal* 8(3): 331-343.
- Caiyin, Q., Li, M., Wei, D., Cai, Y., & Xing, L. 2007.** Isolation and sequencing analysis on the seed-specific promoter from soybean. *Frontiers of Agriculture in China*, 1(1), 17-23.
- Chen, Z. L., S. Naito, I. Nakamura and R. N. Beachy. 1989.** "Regulated expression of genes encoding soybean β -conglycinins in transgenic plants." *Developmental Genetics* 10(2): 112-122.
- Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail. 1992.** "Maize polyubiquitin genes : structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation." *Plant Molecular Biology* 18(4): 675-689.
- Dynan, W. S. and R. Tjian. 1985.** "Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins." *Nature* 316(6031): 774-778.
- Eulgem, T., V. J. Weigman, H.-S. Chang, J. M. McDowell, E. B. Holub, J. Glazebrook, T. Zhu and J. L. Dangl. 2004.** "Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance." *Plant Physiology* 135(2): 1129-1144.
- Fauteux, F., M. Blanchette and M. V. Strömvik. 2008.** "Seeder: discriminative seeding DNA motif discovery." *Bioinformatics* 24(20): 2303-2307.
- Fauteux, F. and M. V. Strömvik. 2009.** "Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae." *BMC plant biology* 9(1): 126.
- Forde, B., A. Heyworth, J. Pywell and M. Kreis. 1985.** "Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize." *Nucleic Acids Research* 13(20): 7327-7339.
- Gu, Y. Q., H. Wanjugi, D. Coleman-Derr, X. Kong and O. D. Anderson. 2010.** Conserved globulin gene across eight grass genomes identify fundamental units of the loci encoding seed storage proteins." *Functional & Integrative Genomics* 10(1): 111-122.
- Hacham, Y., I. Matityahu and R. Amir. 2013.** "Light and sucrose up-regulate the expression level of Arabidopsis cystathionine γ -synthase, the key enzyme of methionine biosynthesis pathway." *Amino Acids* 45(5): 1179-1190.
- Hsieh, T.-H., J.-t. Lee, Y.-y. Charng and M.-T. Chan. 2002.** "Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress." *Plant Physiology* 130(2): 618-626.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1999.** "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor." *Nature biotechnology* 17(3): 287-291.
- Kawagoe, Y. and N. Murai. 1992.** "Four distinct nuclear proteins recognize in vitro the proximal promoter of the bean seed storage protein β -phaseolin gene conferring spatial and temporal control." *The Plant Journal* 2(6): 927-936.
- Kim, Won-Seok, and Hari B. Krishnan. 2004.** "Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells." *Plant Biotechnology Journal* 2.3 : 199-210.
- Lamacchia, C., P. R. Shewry, N. Di Fonzo, J. L. Forsyth, N. Harris, P. A. Lazzeri, J. A. Napier, N. G. Halford and P. Barcelo. 2001.** "Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed." *Journal of Experimental Botany* 52(355): 243-250.
- Marzábal, P., P. K. Busk, M. D. Ludevid and M. Torrent. 1998.** "The bifactorial endosperm box of γ -zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZMcis-acting elements." *The Plant Journal* 16(1): 41-52.
- Milislavljević, M., M. Konstantinović, J. Brkljačić and V. Maksimović. 2004.**

- "Cloning and computer analysis of the promoter region of the legumin-like storage protein gene from buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench." *Arch. Biol. Sci* 56: 1-7.
- Ng, D. W., M. B. Chandrasekharan and T. C. Hall. 2004.** "The 5' UTR negatively regulates quantitative and spatial expression from the ABI3 promoter." *Plant Molecular Biology* 54(1): 25-38.
- Nishiuchi, T., H. Shinshi and K. Suzuki. 2004.** "Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves POSSIBLE INVOLVEMENT OF NtWRKYs AND AUTOREPRESSION." *Journal of Biological Chemistry* 279(53): 55355-55361.
- Nishizawa, Keito, et al. 2003.** "AC-terminal sequence of soybean β -conglycinin α' subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells." *The Plant Journal* 34.5 (2003): 647-659.
- 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- 812.
- Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya and S. Yamaguchi. 2003.** "Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination." *The Plant Cell* 15(7): 1591-1604.
- Ross, C. and Q. J. Shen. 2006.** "Computational prediction and experimental verification of HVA1-like abscisic acid responsive promoters in rice (*Oryza sativa*)." *Plant Molecular Biology* 62(1-2): 233-246.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York. *Molecular Cloning* (Vol. 2, pp. 14-9).
- Sohrabi, M., A. Zebarjadi, A. Najaphy and D. Kahrizi. 2015.** "Isolation and sequence analysis of napin seed specific promoter from Iranian Rapeseed (*Brassica napus* L.)." *Gene* 563(2): 160-164.
- Stålberg, K., M. Ellerstöm, I. Ezcurra, S. Ablov and L. Rask. 1996.** "Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds." *Planta* 99 (4): 519-515
- Sunilkumar, G., J. P. Connell, C. Smith, A. S. Reddy and K. S. Rathore. 2002.** "Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco." *Transgenic Research* 11(4): 347-359.
- Tang L., S. Bhat and M. E. Petracek. 2003.** "Light control of nuclear gene mRNA abundance and translation in tobacco." *Plant Physiology* 133(4): 1979-1990.
- Truksa, M., S. L. MacKenzie and X. Qiu. 2003.** "Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter." *Plant Physiology and Biochemistry* 41(2): 141-147.
- Vincentz, M., A. Leite, G. Neshich, G. Vriend, C. Mattar, L. Barros, D. Weinberg, E. De Almeida, M. P. De Carvalho and F. Aragao. 1997.** "ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein." *Plant Molecular Biology* 34(6): 879-889.
- Washida, H., C.-Y. Wu, A. Suzuki, U. Yamanouchi, T. Akihama, K. Harada and F. Takaiwa. 1999.** "Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1." *Plant Molecular Biology* 40(1): 1-12.
- Wu, C. Y., H. Washida, Y. Onodera, K. Harada and F. Takaiwa. 2000.** Quantitative nature of the prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression." *The Plant Journal* 23(3): 415-421.