مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۹۶-۱۸۷

شناسایی، جداسازی و بررسی توالی پیشبراختصاصی بذر β-کانگلایسینین

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

الهام صبوری رباط[۱]، علی اکبر حبشی[۲*]، محمود سلوکی[۱]، مطهره محسن پور[۲] و عباسعلی امام جمعه[۱]

Elham Saboori Robat[1], Ali Akbar Habashi*[2], Mahmood Solouki[1], Motahhareh Moshenpour[2] and Abbasali Emamjomeh[1]

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 Transformtion, 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- کانگلایسینین 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-کانگلایسینین انتظار می‌رود که پیشبر ژن آن نیز مختص بذر باشد در این تحقیق جداسازی پیشبر مختص بذر β-کانگلایسینین 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-کانگلایسینین به همراه سیگنال پپتید مورد نظر و ژن دلتازئین، برای مطالعات بعدی در ناقل گیاهی pBI121 همسانه سازی شد.

واژه‌های کلیدی

پیشبر،
β-کانگلایسینین
سویا
موتیف
سیگنال پپتید

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

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 (Dynan 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 شیمیای 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 فازئولین در کلزا (β-phaseolin) (Sohrabi *et al*., 2015)، پیشبر β-کانگلایسینین(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 موزاییک کلم (*CaMV*35S) (Odell *et al*., 1985) و پیشبر یوبی‌کوئیتن (ubiquitin) ذرت (Christensen *et al*., 1992) می‌باشد. با این حال، استفاده از پیشبرهای دائمی هزینه‌های بالای متابولیکی و اثرات نامطلوب پلیوتروپی را به دنبال داشته است. از این‌رو 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 متابولیکی 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. گلایسینین (11 S) و β-کانگلایسینین (7 S) با اختصاص ۷۰ درصد پروتئین‌های ذخیره‌ای کل، دو رده اصلی پروتئین‌های سیتوسولی دانه سویا به شمار می‌روند (Birt *et al*., 2004). پروتئین β-کانگلایسینین از سه زیر واحد β, α, α‘ تشکیل شده است که زیرواحد 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-کانگلایسینین 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-کانگلایسینین تقریبا 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 روش های مورد استفاده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

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-کانگلایسینین 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 ناقل های 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 پلاسیمدهای 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-کانگلایسینین

توالی مربوط به ژن β-کانگلایسینین از بانک اطلاعاتیNCBI با شماره دسترسی GU723691 گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای β-کانگلایسینین (F1, R1) انجام شد (جدول ۱). ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی‌مول)، 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 سانتی‌گراد 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 XL1-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-کانگلایسینین توسط دو آنزیم *Hind*III و *Sac*I هضم و خالص سازی گردید. پلاسمید نوترکیب pTZ-Pcong برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. آنالیز توالی پیشبر β-کانگلایسینین 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-کانگلایسینین و ترمیناتور نوپالین ستتاز 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 پلیمراز 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* پلیمراز، 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

۹۵ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ٦٠ 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 F1، R1 و نیز باند حاصل از تکثیر با آغازگرهای F2، R2، از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. محصول خالص شدهٔ این دو قطعه با هم به نسبت مولی مساوی مخلوط 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، ٦٠ نانوگرم آغازگر، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۳/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) می‌باشد (برنامه دمایی طبق جدول ۲).

جدول ۱- نام و توالی آغازگر های مورد مطالعه در پژوهش

Table 1. Primer sequences used in this study

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

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	۹٤
۱۰	۳۰ ثانیه	۹٤
	۱ دقیقه	۵۰
	۲ دقیقه	۷۲
۱۵	۳۰ ثانیه	۹٤
	۳۰ ثانیه	۵۵
	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲
۱	۱۵ دقیقه	۷۲

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

قطعه Cong-CZ ابتدا در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی اولیه شد. پس از تایید صحت ناقل نوترکیب حاصل (pTZ-Cong-CZ)، هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Sac*I 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 نوترکیب 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 *Hind*III و *Sac*I انتخاب شدند. پلاسمید نوترکیب حاصل (pBI121-Cong-CZ) در *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA 4404 همسانه سازی شد. کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های (Sambrook *et al.*, 1989) گردید.

نتایج وبحث

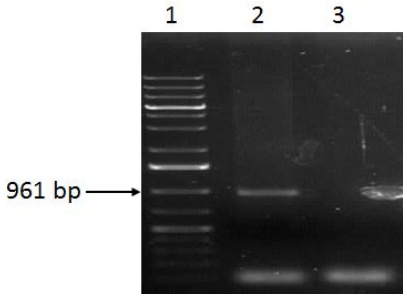
تعیین صحت جداسازی پیشبر β-کانگلایسینین

قطعه پیشبر β-کانگلایسینین با اندزه ۹٦۱ جفت باز توسط آغازگرهای F1,R1 شناسایی شد (شکل ۱). محدوده‌ای که برای طراحی پیشبر در نظر گرفته شد از نوکلئوتید ۱۵۹۸تا ۲٤۹٤ بود که ناحیه ۲٤۹٤ 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 ۹٦۱جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I حضور پیشبر در پلاسمید pTZ را به اثبات رساند.

نتایج مربوط به بررسی پیشبر β-کانگلایسینین

پس از دریافت توالی‌یابی، بررسی توالی حاصل در بانک اطلاعاتی PLANTPAN نشان داد که این قطعه ۹٦٤ جفت باز دارد که شامل نقطه آغاز رونویسی (ATG) و چندین عنصر اساسی پیشبرها مانند جعبه CAAT (۹ تکرار) و جعبه TATA (TATAAA) در محدوده ۸٤- تا ۹۰- می‌باشد (جدول ۳). سایر موتیف‌های مختص بذر مانند موتیف Skn-1(GTCAT) که از اجزای تنظیمی مورد نیاز برای بیان در آندوسپرم می‌باشد در محدوده ۸۷- تا ۹۲- و ٦۷۰- تا ٦۰۵- شناسایی شد. جعبه G (CACGTA) در محدوه ۲۵۸- تا ۲٦٤- تشخیص داده شد. عنصر جعبه W (TGACG) که در بیان القاء شده در اثر زخم شناسایی شده، در محدوده ۱۱٦- تا ۱۲۱- قرار دارد. و به طور مشابه، موتیف RY(CATGCA) در محدوده ۲۷۰- تا ۲۷٦- در توالی پیشبر بتا کانگلایسینین شناسایی شد. این مشاهدات نشان داد که حضور چند کپی از موتیف‌های مختص بذر در پیشبر β-کانگلایسینین ممکن است مسئول عمل اختصاصی آن باشد.



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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

جدول ۳- اجزای موجود بر روی توالی همسانه سازی شده پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین

Table 3. Sequence analysis of β-Conglycinin seed specific promoter

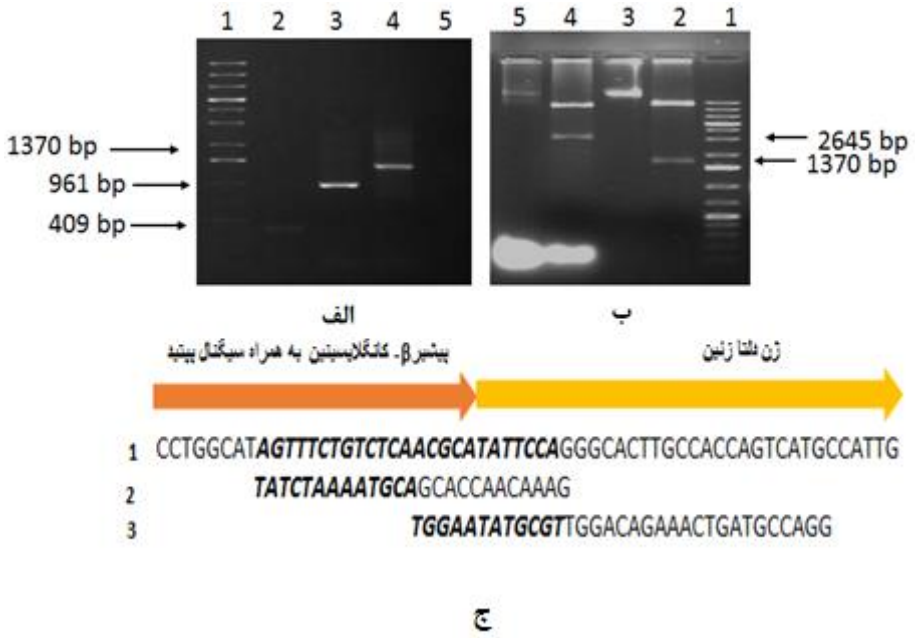
نوع موتیف	نام موتیف	توالی موتیف	موقعیت موتیف	رفرنس
موتیف های اساسی	جعبه TATA	TATAAA	۸٤- تا ۹۰-	(Forde *et al*., 1985)
	جعبه CAAT	CAAT	۲۰۵- تا ۲۰۹	(Forde *et al*., 1985)
	Skn-1	GTCAT	۸۷- تا ۹۲-	(Blackwell *et al*., 1994)
	جعبه E	ACCCATCAAG	۲۰۱- تا ۲۱۱-	(Kawagoe and Murai 1992, Stålberg *et al*., 1996)
	جعبه W	TGACG	۱۱٦- تا ۱۲۱-	(Eulgem *et al*., 2004, Nishiuchi *et al*., 2004)
موتیف های مختص بذر	محل اتصال فاکتور رونویسی SEF4	GCATTTTTATCA	۷۹- تا ۹۰-	(Allen *et al*., 1989)
	Alpha 4، محل اتصال فاکتور رونویسی SEF1	AACCCAAACCCA	۱٦۵- تا ۲۰٤-	(Allen *et al*., 1989)
	موتیف RY	CATGCA	۲۷۰- تا ۲۷٦-	(Bobb *et al*., 1995)
	عنصر تنظیمی دخیل در بیان اختصاصی بذر	AAAGAA	۱۳- تا ۱۹-	(Bobb *et al*., 1995)
	موتیف ABRE	TACGTG	۲۷۰- تا ۲۷٦-	(Ogawa *et al*., 2003)
	محل اتصال فاکتور رونویسی MYB	TAACTG	۵۱۰- تا ۵۱٦-	(Ogawa *et al*., 2003)
	موتیف ARE	TGGTTT	۲٦٦- تا ۲۷۲-	(Ogawa *et al*., 2003)
	عنصرLAMP	CCAAAACCA	۲٦٦- تا ۲۷۵-	(Argüello-Astorga and Herrera-Estrella 1998)
سایر موتیف ها	موتیف TCT	TCTTAC	۲۰٤- تا ۲۰۹-	(Argüello-Astorga and Herrera-Estrella 1998)
	جعبه G	CACGTA	۲۵۳- تا ۲۵۹-	(Milisavljević *et al*. 2004)

نتایج مربوط به ساخت ناقل دوگانه بیانی گیاهی مختص بذر

به منظور ساخت ناقل بیانی اختصاصی بذر، قطعه ژن دلتا زئین با اندازه ٤۰۹ 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- کانگلایسینین 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 ۹٦۱ جفت بازی پیشبر β- کانگلایسینین با آغازگرهای F3,R3 به هم متصل شد در شکل ۲ توالی محل اتصال دو قطعه هیبرید پیشبر β- کانگلایسینین/ ژن دلتا زئین با توالی آغازگرهای طراحی شده نشان داده شده است. در برنامه SoEing PCR، طول آغازگر برگشتی ۳٤ باز می‌باشد، که ۱۲ باز انتهای '۵ این آغازگر مکمل ابتدای '۵ ژن زئین بعد از حذف سیگنال پپتید می‌باشد. علاوه بر آن برای ژن دلتا زئین آغازگری به طول ۳٤ باز طراحی شد به طوریکه ۱۳ باز آن، همپوشان با انتهای '۳ سیگنال پپتید پیشبر ژن β- کانگلایسینین بود. بدین ترتیب انتظار بر این بود که بعد از تکثیر اولیه و بدست آوردن دو محصول PCR پیشبر β- کانگلایسینین 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]



شکل ۲- الف) محصول PCR: ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ۲: ژن دلتا زئین در ذرت، ۳: پیشبر β- کانگلایسینین، ٤: اتصال پیشبر β- کانگلایسینین به همرا سیگنال پپتید و ژن دلتا زئین ٥: واکنش PCR بدون استفاده از DNA الگو.

ب) ۱: نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA (1kb ladder شرکت Fermentas) ۲: هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I برای تایید پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ)، ۳: پلاسمید نوترکیب (pBI121-Cong-CZ) هضم نشده، ٤: ناقل گیاهی pBI121 هضم شده با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I ٥: 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.

حذف کاست ژنی *GUS* به همراه *CaMV*35S از ناقل گیاهی PBI121 در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم های *Hind*III و *Sac*I با ظهور قطعه ۲٦٤٥ جفت بازی تایید شد. سپس قطعه ۱۳۷۰جفت بازی از ژل خالص سازی شده ودر پلاسمید نوترکیب PBI121 (-*GUS*) تحت ترمیناتور نوپالین سنتتاز قرار گرفت. کلونی های مثبت با کلنی PCR تایید شده و ظهور باند ۱۳۷۰ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I حضور کاست پیشبر β- کانگلایسینین به همراه ژن دلتا زئین در پلاسمید PBI121 را به اثبات رساند (شکل ۲).

بحث

در این مطالعه پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین از گونه گیاهی سویا رقم ایرانی کتول 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*.,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

2010). موتیف RY برای کنترل بیان ژن در طی جنین زایی و بلوغ بذر ضروری می‌باشد. آنالیز توالی پیشبر β- کانگلایسینین حضور دو کپی از این موتیف را نشان داد که در آرابیدوپسیس 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- کانگلایسینین وجود دارد که برای بیان ژن در استرس های مختلف مانند نور و اسیدآبسزیک ضروری می‌باشد. اغلب گزارشات نشان دادند که اسید آبسزیک 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- کانگلایسینین شامل دو کپی از موتیف TACGTG می‌باشد که هسته توالی عنصر ABRE پاسخ به اسیدآبسزیک می‌باشد. چهار تکرار از موتیف TGCA در پیشبر β- کانگلایسینین 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- کانگلایسینین شناسایی شد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که نور یک فاکتور مهم در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین-های ذخیره‌ای بذر می‌باشد (Tang *et al.*, 2003, Hacham *et al.*, 2013).

سایین و همکاران (۲۰۰۷) حدود ٦٦٠ جفت باز از توالی پیشبر β- کانگلایسینین را جداسازی کردند که نتایج آنالیز توالی پیشبر β- کانگلایسینین 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 ۹٦۰ جفت باز از پیشبر β- کانگلایسینین 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 پلیوتروپی را برای گیاه به دنبال داشته است استفاده از پیشبر مختص بذر β- کانگلایسینین در جهت تولید لگوم‌های تراریخته می‌تواند مفید واقع شود. با توجه به اینکه سویا از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین و سیستئین فقر می‌باشد و هر ساله هزینه زیادی صرف اسیدهای آمینه سنتتیک برای مصرف کنجاله سویا در خوراک دام و طیور می‌شود، ژن دلتا زئین استفاده شده در این ناقل می‌تواند در جهت افزایش بیان اسیدآمینه متیونین بذر مفید واقع شود.

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-

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

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.

Milisavljević, M., M. Konstantinović, J. Brkljačić and V. Maksimović. 2004.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]

"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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.14.1]