پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۸ شمارهٔ۲، نیمهٔ دوم ۱۳۹۶، صفحهٔ ۱۹۱-۱۸۱

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 181-191
DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.50075

بررسی بیوانفورماتیکی و جداسازی پروموتر بتافازئولین از لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)

ادریس چوپانی[۱]، خدیجه باقری[۲*] و بهرام ملکی زنجانی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۲- استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۳- دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۴

چکیده

جهت اجتناب از مضرات پروموترهای عمومی، شناسایی و جداسازی پروموترهای قوی و اختصاصی بافت امری بسیار مهم و ضروری در مهندسی ژنتیک است. یکی از پروموترهای اختصاصی و قوی بذری، پروموتر بتافازئولین لوبیا می‌باشد که بیان حدود ۵۰درصد پروتئین‌های بذر لوبیا را کنترل می‌کند. استفاده از این پروموتر برای بهینه‌کردن تولید پروتئین‌های بذری در لوبیا و گیاهان دیگر و همچنین تولید پروتئین‌های نوترکیب مفید خواهد بود. آنالیز بیوانفورماتیکی پروموترها برای پیشگویی در مورد قدرت و ضعف آن‌ها، جداسازی صحیح و همچنین سنتز پروموترهای مصنوعی کمک خواهد کرد. ابتدا به‌وسیله نرم‌افزارهای آنالیز پروموتر توالی‌های پروموتری بتافازئولین گیاه لوبیا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که بیش از ۲۰فاکتور سیس از جمله مهم‌ترین آن‌ها G-box، E-box، فاکتور ACGTSEED2،RY، جعبه لگومین، جعبه اندوسپرم و...در توالی پروموتر بتافازئولین وجود دارد که در بیان بالا و اختصاصیت آن نقش دارند. با توجه به نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی پرایمرهای اختصاصی این پروموتر طراحی شد و با استفاده از آن‌ها توالی پروموتر موردنظر از DNA ژنومی لوبیا تکثیر و با توجه به اندازه قطعه تکثیرشده، صحت آن مورد تأیید قرار گرفت. در مرحله بعدی توالی پروموتر موردنظر در ناقل pTZ57R/T کلون شد و با استفاده از واکنش‌های PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. از آنجایی‌که هدف از این تحقیق جداسازی پروموتر اختصاصی بذر بتافازئولین از لوبیا و استفاده از آن در تهیهٔ سازه‌های ژنی می‌باشد، لذا قطعهٔ موردنظر در ناقل بیانی گیاهی pBI121 ساب کلون شد و نتایج آن با هضم آنزیمی و PCR تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: پروموتر اختصاصی، پروموتر بذری، آنالیز بیوانفورماتیکی

مقدمه

پروموترهای عمومی مثل CaMV 35S که معمولاً در مهندسی ژنتیک گیاهی به‌طور وسیع استفاده می‌شوند، به‌طور پیوسته ژن‌های پایین‌دست خود را در تمام دوره زندگی گیاه و در همهٔ بافت بیان می‌کنند که اگر ترانس ژن موردنظر در زمان و بافت نادرستی از گیاه بیان شود، احتمالاً نتایج غیرقابل‌انتظاری در رشدونمو گیاه حاصل می‌شود (Murn & Rask, 1995). اما پروموترهای اختصاصی بافت، بیان ژن را در بافت یا مرحله نموی خاصی کنترل می‌کند و برای تجمع محصول تراریخته در اندام‌های معین مانند بذور و میوه‌ها و حذف هرگونه اثر منفی روی رشد گیاه و افزایش عملکرد اقتصادی خیلی مفیدند (Haghand *et al*., 2009). لذا شناسایی پروموترهای قوی و درعین‌حال اختصاصی یک امر بسیار مهم در مهندسی ژنتیک امروزی است. یکی از پروموترهای اختصاصی و قوی بذری، بتافازئولین می‌باشد (Van der geest & Hall., 1997).

فازئولین اسم گروهی از پلی‌پپتیدها است که گلیکوپروتئین‌های اصلی ذخیره‌ایی دربذرهای لوبیا هستند (*P. vulgaris* L.) و در حدود ۵۰درصد از پروتئین‌های بذرهای رسیدهٔ لوبیا را تشکیل می‌دهد. ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها تحت کنترل پروموتر فازئولین هستند و بیان بالای ژن‌های تحت کنترل نشان می‌دهد که پروموترهای قوی دارند (Ma & Bliss, 1978). مطالعاتی که بروی لوبیا و توتون تراریخت انجام‌گرفته نشان داده که پروموتر بتافازئولین

* **نویسنده مسئول**: زنجان، کیلومتر۶ جادهٔ تبریز، دانشگاه زنجان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۷۱۷، همراه: ۰۹۱۲۷۴۲۲۹۸۸
bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

تنظیم‌کننده خیلی قوی و اختصاصی بذر است، لذا در بافت‌های رویشی بیان نمی‌شود (Hall *et al*,. 1999).

بیان اختصاصی ترانس ژن‌ها در بذر گیاهان کاربرد زیادی دارد که شامل بهبود کیفیت غذایی دانه (Keeler *et al*., 1997; Shintani & DellaPenna, 1998; Goto *et al*., 1999; Ye *et al*., 2000)، کیفیت دانه‌های آسیاب‌شده (Barro *et al*., 1997) و تولید ترکیبات صنعتی و دارویی (Cahoon & Shanklin, 2000) می‌باشد.

De Jaeger *et al*, (2002) با بکارگیری پروموتر بتافازئولین باعث افزایش بیان ScFv دردانه‌های تراریخته آرابیدوپسیس شد و آن‌ها مشاهده کردند زمانی که ScFv تحت کنترل پروموتر عمومی 35S می‌باشد، تنها حدود یک درصد از کل پروتئین‌های بذری در بذر آرابیدوپسیس بیان می‌شود، اما زمانی که پروموتر اختصاصی بتافازئولین جایگزین شد، باعث افزایش میزان بیان ScFv به ۳۶/۵درصد از کل پروتئین‌های بذری شد.

Van ooyen *et al*, (2006) لیست آنزیم‌ها و پروتئین‌های نوترکیب مهم که تحت پتنت ایالات‌متحده آمریکا هستند را منتشر کردند. اکثر این پروتئین‌ها در بذور گیاهان تراریخته بیان می‌شدند. در این لیست به آنزیم لیپواوکسیژناز(LOX-3) نیز اشاره‌شده که این آنزیم تحت پروموتر قوی بتافازئولین قرار دارد و بیان بالایی را در بذور ترا ریخته آرابیدوپسیس نشان داده بود.

Van Droogenbroeck *et al*, (2007) از این پروموتر برای بیان و تجمع زنجیره Scfc-fv آنتی‌بادی دردانه‌های تراریخت آرابیدوپسیس استفاده کردند و میزان بیان ۱۴درصد از کل پروتئین محلول را گزارش کردند.

نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز پروموتر بتافازئولین با استفاده از منابع مختلف نشان داد که فاکتور ACGTSEED2 که به طور منحصربه‌فرد در پروموتر بتافازئولین وجود دارد، نقش عمده‌ای را در بیان اختصاصی این ژن دردانه‌های لوبیا دارد (Thomas, 1993). این فاکتور در نزدیکی نقطهٔ شروع رونویسی قرار دارد و محل اتصال پروتئین تنظیمی MAT1(ROM1) است که نقش این پروتئین تنظیم منفی است. این پروتئین در صورت اتصال به پروتئین تنظیمی PvALF تبدیل به یک تنظیم‌کننده مثبت و فعال‌کننده بیان ژن بتافازئولین خواهد شد. با اتصال پروتئین تنظیمی ROM1 به توالی ACGTSEED2 از بیان ژن بتافازئولین در سلول‌های غیرذخیره‌ای اپیدرمی و پروکامبیوم ممانعت به‌عمل می‌آید، بنابراین این فاکتور در اختصاصی‌بودن مکانی بیان ژن بتافازئولین مؤثر است (Chern *et al*., 1996).

با توجه به مزیت‌های گفته‌شده برای پروموترهای اختصاصی بذر، در این پژوهش بررسی ناحیهٔ پروموتری ژن بتافازئولین و جداسازی این پروموتر از گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و کلونینگ آن در وکتور گیاهی pBI121 و آماده سازی بخش پروموتری یک سازه ژنی مدنظر بوده است که می تواند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در بذر گیاه لوبیا مورداستفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از نمونه گیاهی لوبیا (*P. vulgaris*) رقم صیاد استفاده شد و *Xl-blue* سویه‌ای از باکتری *E. coli* است که از شرکت سیناژن تهیه و در تمام مراحل کار از این سویه برای تکثیر و نگهداری پلاسمیدهای اولیه و پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد. پلاسمید pTZ57R/T به‌عنوان ناقل اولیه از شرکت فرمنتاز تهیه شد و از آن برای همسانه‌سازی قطعهٔ موردنظر بهره گرفته شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و بخش α ژن بتاگالاکتوزیداز (lacZ) به‌عنوان نشانگرهای انتخابی می‌باشد. از پلاسمید دوگانه pBI121 به‌عنوان ناقل بیانی گیاهی استفاده گردید. توالی کامل پلاسمید pBI121 به طول ۱۴۷۵۸bp و شماره بازیابی AF485783 در بانک اطلاعاتی NCBI موجود می‌باشد.

پس از انتخاب ژن بتافازئولین از گیاه لوبیا توالی کامل CDS با شماره بازیابی j01263 از بانک‌اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/) استخراج گردید. سپس ۱۴۷۰جفت باز از بالادست کدون شروع (AUG) با شماره دسترسی j01263 به‌عنوان پروموتر بتافازئولین در نظر گرفته شد. به‌منظور آنالیز پروموتر از سایت PlantPAN (http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/) استفاده شد. سپس فاکتورهای رونویسی موجود در پروموترها استخراج و کارکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این سایت علاوه‌بَر مشخص کردن فاکتور های رونویسی موجود در پروموتر، توانایی تشخیص نواحی تکراری و CpNpGIslands و همچنین سایت‌های مورد هدف miRNA ها را دارد. همچنین با استفاده ازسایت http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/ht ml) Plant CARE) موتیف‌های موجود در این پروموتر در سایر گونه‌های گیاهی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس برای جداسازی ناحیهٔ پروموتری موردنظر با استفاده از اطلاعات موجود در NCBIپرایمرهای اختصاصی رفت با توالی 5′-TAA**AAGCTT**GAATTCATTGTACTCCCAG-3′ و برگشت با توالی 5′-GGG**TCTAGA**GAAAGAAGTGAGTGATATTAG

AGGT-3′ با کمک نرم‌افزار gene runner, primer 3 و vector NT طراحی شد. قابل ذکر است که در پرایمر رفت جایگاه برش آنزیم *HindIII* و در پرایمر برگشت جایگاه برش آنزیم *XbaI* متناسب با جایگاه‌های برشی موجود در وکتور pBI121 اضافه شد.

در مرحلهٔ بعد بذرهای استریل لوبیا در محیط MS کشت داده شد که پس از دو هفته برگ‌های آن ظاهر شدند. برگ‌های ظاهرشده فریز و تا زمان استخراج DNA در ۸۰- نگهداری شدند. DNA ژنومی لوبیا به روش CTAB استخراج شد. برای تکثیر قطعهٔ موردنظر واکنش PCR با مواد و غلظت‌ها مطابق با جدول ۱ و برنامه مطابق با جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱- مواد موردنیاز برای تهیه ۲۵ µl محلول واکنش PCR

Table 1. Materials required to prepare 25 µl of PCR reaction Solution

نام ماده Material	غلظت در واکنش Concentration in the reaction
PCR buffer	1X
dNTP	0.2 mM
MgCl2	1.5 mM
Taq DNA Polymerase	1U
Genomic DNA	1µL
Forward primer	10 pM
Reverse primer	10 pM
H2O (D.W)	Up to volume
Total volume	L µ25

جدول ۲- چرخه‌های دمایی مراحل مختلف PCR

Table 2. PCR thermal cycle stages

چرخه Cycle	واکنش Reaction	دما Temperature	زمان Time
1	Initial denaturation	94ºC	4′
2(30 X)	denaturation	94ºC	40″
	Annealing	60.4ºC	40″
	Extension	72ºC	1′:20″
3	Final Extension	72ºC	10′
4	Finalhold	4ºC	-

در مرحلهٔ بعد استخراج محصول PCR از ژل با استفاده از کیت شرکت کیاژن انجام گردید. برای اتصال قطعهٔ موردنظر در پلاسمید pTZ57R/T واکنش اتصال طبق دستورالعمل کیت T/A کلونینگ شرکت فرمنتاز ابتدا برای مدت ۲تا۳ ساعت در دمای اتاق و سپس به‌مدت یک‌شب در دمای c ۴º انجام شد و عمل تراریختی با تهیهٔ سلول‌های مستعد از باکتری *E. coli* سویه *XL1-Blue* انجام شد. سپس استخراج پلاسمید از باکتری‌های تراریخته صورت پذیرفت و وجود قطعهٔ موردنظر با استفاده از PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. به‌منظور اطمینان از مراحل کار و مقایسهٔ توالی مورد نظر، قطعهٔ به‌دست‌آمده برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید و توالی به‌دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI مقایسه شد. در مرحلهٔ بعدی برای ساب‌کلونینگ این پروموتر در وکتور گیاهی pBI121 ابتدا پروموتر عمومی ۳۵s با اندازهٔ ۸۳۵ bp با آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XbaI* از این وکتور جدا شد و نیز قطعه پروموتر بتافازئولین با طول ۱۴۷۰ bp از وکتور pTZ57R/T جداسازی و در وکتور بیانی pBI121 ساب‌کلون گردید و صحت کلونینگ با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *Hind III* توسط واکنش هضم آنزیمی و همچنین واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده تأیید گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از سایت plant pan (شکل ۱) موقعیت موتیف‌های موجود در توالی موردنظر را نشان داد که از جمله آن‌ها می‌توان به موتیف‌های زیر که نقش‌های آن‌ها در پژوهش‌های قبلی نیز تأیید شده است اشاره کرد.

وجود سه جعبه TATA به‌عنوان هستهٔ پروموتر نشان دهنده قوی‌بودن پروموتر و توان بالای آن دربیان ژن‌ها می‌باشد. علاوه‌بَر این طبق گزارش Li *et al*, (1998) ساختار دورانی نوکلئوزم‌ها که در ناحیه حاوی جعبه TATA در پروموتر بتافازئولین تشکیل می‌شود باعث جلوگیری از بیان ژن‌های تحت کنترل در بافت برگ می‌شود، در حالی‌که در بافت بذری این ساختار باز می‌شود و اجازه شروع نسخه‌برداری را می‌دهد. موتیف RY که به جعبه لگومین هم معروف است، در پروموترهای بذری لگوم‌ها حالت حفاظت‌شده دارد و در پروموتر فازوئولین به تعداد پنج نسخه وجود دارد. حذف این موتیف منجر به کاهش شدید در بیان ژن تحت کنترل شده و تنها ۱۱٫۶درصد فعالیت پروموتر باقی می‌ماند. برای فعالیت بهینه پروموتر وجود این موتیف ضروری است و در بیان بالای ژن تحت کنترل نقش دارد (Baumlein *et al*., 1992).

شکل ۱- توالی پروموتر اختصاصی بتافازئولین

شماره‌ها موتیف‌های موجود در پروموتر را نشان می‌دهد. موتیف‌های مشابه که در پروموتور تکرار شده‌اند، دارای اعداد مشابه می‌باشند.

Fig. 1. Beta phaseolin specific promoter sequence

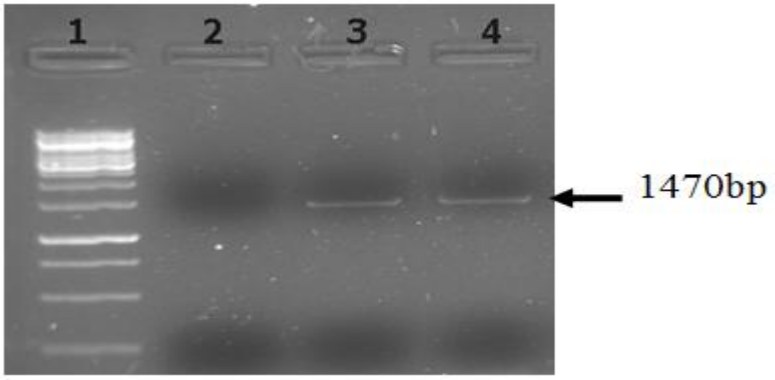
Numbers show motifs in the promoter, similar motifs in the promoter have the same numbers:
1. TATA box; 2. G-box; 3. OPAQUE 2; 4. endosperm box; 5. E-SITE; 6. Vicilin box; 7. CCAAAT box; 8. B box; 9. RY box or endosperm box; 10. ACGTSEED2 box; 11. OSE2ROOTNODULE box

توالی G-box یکی از مهم‌ترین فاکتورهای سیس محسوب می‌شود. این فاکتور عامل پاسخ‌دهنده به آبسیزیک اسید است. با حذف G-box، فعالیت پروموتر به ۲,۶درصد کاهش پیدا می‌کند. سایت E نقش کمکی و سینرژیک با G-box دارد. موتاسیون در این سایت موجب کاهش فعالیت پروموتر بتافازئولین تا ۱۲,۶درصد می‌شود (Chandrasekharan *et al*., 2003).

جعبه اندوسپرم به تعداد پنج عدد موجب بیان پروتئین فازوئولین در اندوسپرم بذر می‌شود. این جعبه در پروموتر ژن‌های اختصاصی اندوسپرم حالت حفاظت‌شده دارد. موتیف opaque-2 که محل اتصال فاکتور نسخه‌برداری opaque -2 است، به تعداد پنج عدد در پروموتر بتافازئولین وجود دارد. ازآنجایی‌که بیان این فاکتور در گیاه ذرت محدود به آندوسپرم بذر می‌باشد (Van der Geest & Hall, 1997)، بنابراین وجود این موتیف به احتمال زیاد در بیان ژن‌ها در آندوسپرم نقش دارد.

جعبه Vicilin با توالی CCAAAT در پروموترهای بذری زیادی وجود دارد. این جعبه به‌عنوان یک فاکتور عمومی برای فعال‌سازی رونویسی در یوکاریوت‌ها عمل می‌کند، اما گفته شده است که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اختصاصی بافت نیز نقش دارد و در پروموتر بتافازئولین وجود این جعبه موجب می‌شود که بیان ژن تحت کنترل در جنین بذر بالا و یکنواخت باشد (Chandrasekharan *et al*., 2003).

جعبه B با توالی مرکزی و مهم A/TCNAACAC در پروموتر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر حالت حفاظت‌شده دارد و در بیان اختصاصی ژن تحت کنترل در بذر نقش دارد و یک فاکتور سیس پاسخ‌دهنده به آبسیزیک‌اسید است. این جعبه محل اتصال پروتئین‌های گیاهی Myb است (Ezcurra *et al*., 1999).



شکل ۲- تکثیر پروموتر بتافازئولین با استفاده از واکنش PCR در دمای اتصال ۶۰/۴ درجه

۱) نشانگر1kb؛ ۲) کنترل منفی؛ ۳ و ۴) قطعهٔ تکثیریافته در دو تکرار

Fig. 2. Beta phaseolin promoter amplified using PCR reaction in 60.4 ° C annealing tempreture

1. 1 kb DNA Marker; 2. Negative control; 3&4. Amplicon in the two repeat

فاکتورهای OSE[1] که در پروموترهای گیاهان لگوم مثل لوبیا، سویا، یونجه و غیره وجود دارد، فاکتورهای مرتبط با همزیستی این گیاهان با باکتری ریزوبیوم است (Fehlberg *et al*., 2005).

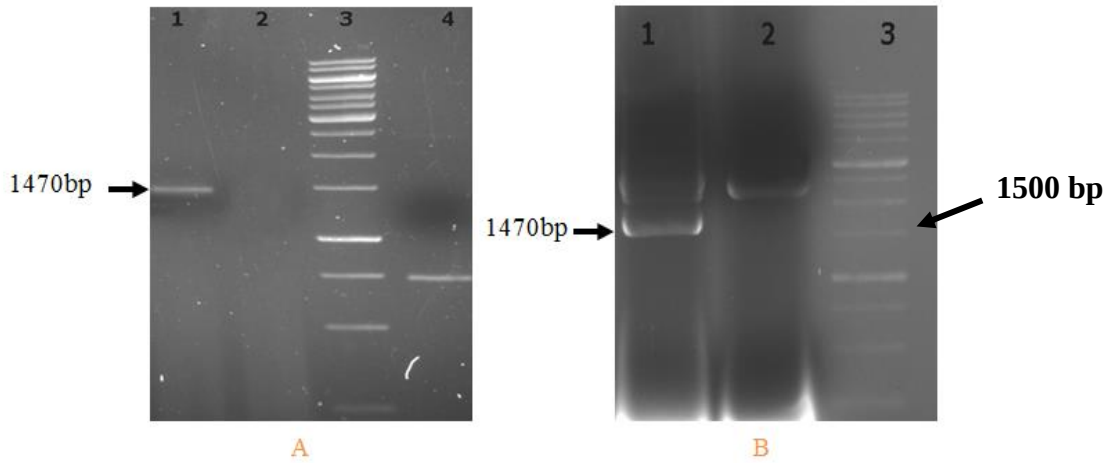
نتایج حاصل از آنالیز این توالی‌ها در گونه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار تحت وب plant care نشان از وجود ۲۶عدد موتیف داد که بیشتر موتیف‌ها در گونه‌های مختلف دارای نقشی مهم در بیان بالا و همچنین بیان اختصاصی در بذر می‌باشد و همچنین موتیف‌هایی با نقش‌های مختلفی از جمله پاسخ به آبسزیک‌اسید، پاسخ به نور کم، پاسخ به دمای کم، در پروموتر ژن‌های فازئولین وجود دارند. همچنین وجود چهار موتیف در موقعیت‌های ۲۸۳، ۴۳۳، ۴۸۲ و ۱۴۳۹ که نقش آن‌ها هنوز ناشناخته است، برای تحقیقات بعدی حائز اهمیت می‌باشد.

با توجه به نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی وجود فاکتورهای مهم و تعیین‌کننده در بیان اختصاصی و رونویسی بالا توسط پروموتر بتافازئولین مشخص شدند. با آنالیز بیوانفورماتیکی می توان در مورد قوی و یا ضعیف‌بودن پروموترها و همچنین اختصاصیت آن‌ها قبل از جداسازی، اطلاعات خوبی به‌دست آورد. از کاربردهای مهم دیگر آنالیز بیوانفورماتیکی پروموترها شناسایی فاکتورها و موتیف‌های تعیین‌کننده، استفاده از آن‌ها در جداسازی صحیح و سنتز پروموترهای مصنوعی است.

[1] Organ specific elements (OSE)

برای بهینه‌سازی واکنش PCR، دماهای اتصال با استفاده از گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۵درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند و بهترین نتایج در مرحله اتصال در دمای ۶۰/۴ به دست آمد. محصول PCR، قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار ۱۴۷۰bp بود (شکل ۲). قطعهٔ مدنظر پس از استخراج از ژل در واکنش اتصال استفاده شد و نتیجه آن پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T بود که واکنش PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *XbaI* و *Hind III* صحت کلونینگ را نشان داد (شکل ۳).

بعد از استخراج پروموتر بتافازئولین از وکتور pTZ57R/T در وکتور بیانی pBI121 ساب‌کلون شد و به‌منظور تأیید نهایی وجود پروموتر بتافازئولین در وکتور pBI121 واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی و پلاسمید pBI121 به‌عنوان الگو انجام شد و همان‌طورکه انتظار می‌رفت باند در اندازهٔ ۱۴۷۰ bp مشاهده شد (شکل ۴). همچنین هضم آنزیمی به‌مدت یک‌شب توسط آنزیم‌های *Hind III* و *Xba*I انجام شد و خارج‌شدن قطعهٔ ۱۴۷۰ bp صحت کلونینگ را تأیید کرد (شکل ۵).



شکل ۳- نتایج حاصل از واکنش PCR (A) و هضم آنزیمی (B) با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *Hind III* روی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T

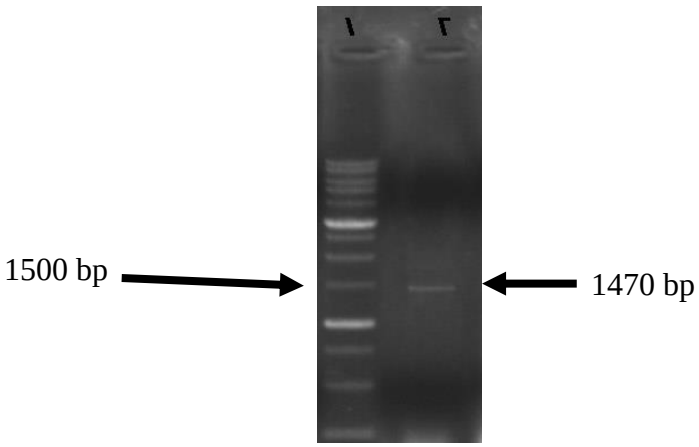
A) ۱- قطعهٔ تکثیریافته؛ ۲- کنترل منفی؛ ۳- نشانگر kb 1؛ ۴- کنترل مثبت؛

B) ۱- پلاسمید بعد از هضم که قطعهٔ مورد نظر از آن خارج شده؛ ۲-پلاسمید قبل از هضم؛ ۳- نشانگر1kb

Fig. 3. results of the PCR reaction (A) and digestion (B) using *Hind III* and *XbaI* ensymes on the pTZ57R / T recombinant plasmid:

A) 1. Amplicons; 2. Negative control; 3. 1 kb DNA Marker; 4. Positive control;

B) 1. Plasmid without insert after digestion; 2. Plasmid before digestion; 3-1 kb DNA Marker

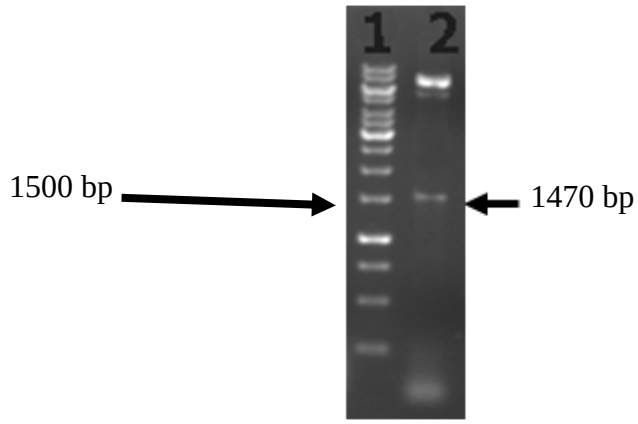


شکل ۴ - محصول کلونی PCR بروی پلاسمید PbI121 با پرایمرهای اختصاصی

۱) نشانگر kb 1؛ ۲) کلونی PCR

Fig. 4. Colony product PCR with specific primers on the PbI121 plasmid

1. 1 kb DNA Marker ; 2. PCR cloning



شکل ۵- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBI121 باآنزیم‌های *HindIII* و *Xba*I

۱) نشانگر kb 1؛ ۲) پلاسمید نوترکیب بعد از هضم

Fig. 5. Digestion of recombinant pBI 121 plasmid by*HindIII* and *XbaI* enzymes

1. 1 kb DNA Marker; 2. recombinant pBI 121 plasmid after digestion

نتایج حاصل از توالی‌یابی تشابه ۹۹درصدی را با توالی موجود در NCBI نشان داد و این نتایج نشان داد که توالی پروموتر موردنظر در رقم صیاد لوبیا به‌عنوان یک پروموتر قوی می‌تواند به‌عنوان بخش مهمی از یک سازهٔ ژنی در تراریخت‌کردن گیاهان مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که ۲۹۵bp از پروموتر بتافازئولین کاملاً مرتبط با بیان اختصاصی بذر است این قسمت شامل سه بخش: ۱- توالی bp ۶۸ (۲۲۷- تا ۲۹۵-) که با عنوان توالی افزایش‌دهنده بذری (SSE)[1] شناخته می‌شود، ۲- بخش میانی (۱۰۹- تا ۲۲۷-) و ۳- پروموتر پایه (۱۰۹- تا ۲۰+) (Van der Geest & Hall, 1997).

وجود توالی SSE و بخش میانی به‌طور همزمان در کنار پروموتر پایه باعث اثرات افزایشی در بیان ژن می‌شود. بنابراین در جداسازی پروموتر بتافازئولین باید به این نکته توجه داشت که بخش‌های مهم و تعیین‌کننده پروموتر جداسازی شود.

در نتایج مطالعات گزارش شده است که حتی اگر پروموتر به‌صورت کامل یعنی ۱۴۷۰bp هم جدا نشود و فقط bp ۲۹۵ آن جدا شود، بیان ژن تحت کنترل به‌صورت اختصاصی در بذر انجام می‌شود (Van der Geest & Hall, 1997) که با توجه به تراکم بالای فاکتورهای تنظیمی در این ناحیه، این نتیجه قابل‌انتظار است. اما در گزارش دیگری آمده است که توالی‌های بالادست پروموتر (از ۵۰۰bp- تا ۱۴۵۸bp-) حاوی توالی‌هایMAR [2] است که موجب افزایش بیان در ژن‌های تحت کنترل می‌شود (Van der Geest & Hall., 1997).

همچنین Bustos *et al*, (1991) نیز گزارش کرده‌اند که یک دومین با اثر کنترلی مثبت در محدوده ۳۹۱- تا ۴۶۸- وجود دارد که موجب بیان ژن در هیپوکوتیل بذر می‌شود. فلذا، در این تحقیق جداسازی پروموتر به‌صورت کامل انجام گرفت. اما نکته قابل‌توصیه این است که در صورت وجود محدودیت در اندازه پروموتر و در صورت سنتز پروموتر مصنوعی می‌توان ۲۹۵bp از توالی پروموتر بتافازئولین را جداسازی کرد و از آن استفاده کرد.

با توجه به‌این‌که تهیه سازه‌های ژنی مناسب یکی از مهم‌ترین قسمت پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان محسوب می‌شود، فلذا انتخاب پروموتر مناسب برای این سازه‌ها اهمیت به‌سزایی دارد و هدف اصلی این پژوهش آماده‌سازی قسمت مهم یک سازهٔ ژنی یعنی پروموتر است که در مراحل بعدی آن را به گیاه انتقال داد و پروتئین‌ها و آنزیم‌های کاربردی را به‌صورت اختصاصی و در میزان بالایی در بذور تولید کرد.

[1] Seed Specific Enhancer

[2] Matrix attachment region

منابع

1. Baumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inz, D., and Wobus, U.1992. Cis- analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential fortissue-specific expression of a legumin gene. Plant Journal 2: 233-239.
2. Bustos, M.M., Begum, D., Kalkan, F.A., Battraw, M.J., and Hall, T.C. 1991. Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. The EMBO Journal 10(6): 1469-1479.
3. Cahoon, E.B., and Shanklin, J. 2000. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(22): 12350-12355.
4. Chandrasekharan, M.B., Bishop, K.J., and Hall, T.C. 2003. Module-specific regulation of the β-phaseolin promoter during embryogenesis. The Plant Journal 33(5): 853-866.
5. Chern, M.S., Eiben, H.G., and Bustos, M.M. 1996. The developmentally regulated bZIP factor ROM1 modulates transcription from lectin and storage protein genes in bean embryos. The Plant Journal 10(1): 135-148.
6. De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., and Angenon, G. 2002. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. Nature Biotechnology 20(12): 1265-1268.
7. Ezcurra, I., Ellerström, M., Wycliffe, P., Stålberg, K., and Rask, L. 1999. Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. Plant Molecular Biology 40(4): 699-709.
8. Fehlberg, V., Vieweg, M.F., Dohmann, E.M., Hohnjec, N., Pühler, A., Perlick, A.M., and Küster, H. 2005. The promoter of the leghaemoglobin gene VfLb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. Journal of Experimental Botany 56(413): 799-806.
9. Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., and Takaiwa, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nature Biotechnology 17(3): 282-286.
10. Hall, T.C., Chandrasekharan, M.B., and Li, G. 1999. Phaseolin: its past, properties, regulation and future. In: Seed Proteins Springer Netherlands P. 209-240.
11. Kawagoe, Y., Campell, B.R., and Murai, N. 1994. Synergism between CACGTG (G-box) and CACCTG c/s-elements is required for activation of the bean seed storage protein ß-phaseolin gene. The Plant Journal 5(6): 885-890.
12. Keeler, S.J., Maloney, C.L., Webber, P.Y., Patterson, C., Hirata, L.T., Falco, S.C., and Rice, J.A. 1997. Expression of de novo high-lysine α-helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology 34(1): 15-29.
13. Li, G., Chandler, S.P., Wolffe, A.P., and Hall, T.C. 1998. Architectural specificity in chromatin structure at the TATA box in vivo: nucleosome displacement upon β-phaseolin gene activation. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(8): 4772-4777.
14. Ma, Y., and Bliss, F.A. 1978. Seed proteins of common bean. Crop Science 18(3): 431-437.
15. Muren, E., and Rask, L. 1995. Processing in vitro of pronapin, the 2S storage-protein precursor of Brassica nupus produced in a baculovirus expression system. European Journal of Biochemistry 227: 316-321.
16. Shintani, D., and DellaPenna, D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science 282(5396): 2098-2100.
17. Thomas, T.L. 1993. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. The Plant Cell 5(10): 1401-1410.
18. Van der Geest, A.H., and Hall, T.C. 1997. A 68 bp element of the β-phaseolin promoter functions as a seed-specific enhancer. Plant Molecular Biology 32(4): 579-588.
19. van der Geest, A.H., and Hall, T.C. 1997. The β-phaseolin 5′ matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. Plant Molecular Biology 33(3): 553-557.
20. Van Droogenbroeck, B., Cao, J., Stadlmann, J., Altmann, F., Colanesi, S., Hillmer, S., and De Jaeger, G. 2007. Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(4): 1430-1435.

21. Van Ooyen, A.J.J., Rietveld, K., Quax, W.J., Pen, J., Hoekema, A., Sijmons, P.C., and Verwoerd, T.C. 2006. Production of Enzymes in Seeds and their use.U.S. Patent No. 7,033,627. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
22. Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., and Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin a (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287(5451): 303-305.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 181-191

Bioinformatics analysis and isolation of beta-phaseolin promoter from beans *(Phaseolus vulgaris)*

Choupani[1], E., Bagheri[2*], Kh. & Maleki[3], B.

1. MSc. of Agriculture Biotechnology, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Islamic Republic of Iran
2. Ph.D. Assistant Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Facultuy of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Islamic Republic of Iran
3. Ph.D. Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Facultuy of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Islamic Republic of Iran

Received: 27 September 2015
Accepted: 24 May 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.50075

Introduction

Constitutive promoters such as CaMV 35S, which is usually widely used in the plant genetic engineering express downstream genes in the all stages of plant life and in all tissues and if a transgene expressed at incorrect tissue and time perhaps unexpected results would be seen in plant growth. To avoid disadvantages of constitutive promoter function identification and isolation of tissue-specific and strong promoters is very important in genetic engineering. Beta phaseolin is one of the strong seed-specific promoters that controls the expression of about 50% bean seed proteins. Extensive studies in bean (*Phaseolus vulgaris*) and transgenic tobacco have revealed that the promoter for the beta-phaseolin storage protein gene (phas) is stringently regulated. Expression is very high during embryogenesis and microsporogenesis but is absent in vegetative tissues. The utilization of this promoter to optimize the production of seed proteins in bean sand other recombinant proteins in other plants would be will be useful. According to the above-mentioned advantages about seed specific promoter, this study has been conducted to identify and isolate the beta phaseolin gene promoter from bean (*phaseolus vulgaris*) and clone it in pBI121 plants vector.

Materials & Methods

Bioinformatic analysis help the prediction of promoter intensity, proper separation and synthesis of artificial promoter. According to bioinformatic analysis, specific primers using gene runner, vector NT and primre 3 softwares were designed and by using these primers, promoter sequence was amplified from bean genomic DNA, Due to the size of amplified fragment, its authenticity was confirmed**.** In the next step, the desired sequence ligated into the cloning vector pTZ57R /T and by using PCR and digestion reactions was confirmed. The aim of this study was to isolate beta phaseolin of bean and its use in the preparation of gene constructs. For this reason, we subcloned fragment in plant expression vector (pBI121) and cloning was confirmed by colony PCR and digestion.

Results & Discussion

The results showed more than 20 factors cis such as ACGTSEED2, opaque-2,E-box, legumin box, endosperm box and etc are in beta phaseolin promoter that play a role in the high expression and specificity. ACGTSEED2 factor that is unique in the phaseolin promoter has major role in the expression of specific

***Corresponding Author:** bagheri.khadijeh@znu.ac.ir, Tel.: 02433052717, Mobile: 09127422988

genes in the seeds of beans. G-box sequence is one of important cis factors. This factor is of responding to abscisic acid, promoter activity is reduced to 2.6% by removing the G-box. Functional E-site may be necessary to complement the G-box-mediated promoter activation, hence acting as a coupling element. The vicilin core sequence (GCCACCTCA) was initially described as a part of a large vicilin boxThe vicilin box (henceforth, this term refers only to the core sequence) is found in the promoters for many seed storage proteins. There is also three TATA box is activated as the promoter core and Plays an important role in being a strong promoter and high expression. Previous studies and portions of the current study confirm that 295 bp from beta phaseolin promoter is relevant seed-specific expression that consists of three parts; 1- Sequence 68 bp (227 to -295) that known as Seed Specific Enhancer (SSE) 2- The middle part (109 to -127) 3- base promoter (+20 to -109). SSE, base promoter and the middle part simultaneously causes increase in gene expression. OSE (Organ specific elements) factors are in the legumes promoters like beans, soybeans, alfalfa, etc, and related to the symbiosis of these plants with the Rhizobium bacteria. Therefore, in this study isolated completely sequence of the beta phaseolin promoter were shown. But it is advisable that if there are restrictions on the size of the promoter and the promoter artificial synthesis can be separated 295 bp of the beta phaseolin promoter sequence.

Conclusion

The promoters are important part of gene constructs and necessary for production of recombinant proteins in genetically modified plants beta phaseolin promoter is a strong and seed-specific promoter, so it has ability for the production of recombinant proteins and building gene constructs.

Key words: Bioinformatic analysis, Seed promoter, Specific promoter