مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۸۵-۷۷)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 77-85

همسانه‌سازی پیشبر *2A11* گیاه گوجه‌فرنگی و بررسی بیان موقت با استفاده از سیستم اگرواینفیلتریشن

ناهید احمدی[۱] و حسن رهنما[۲]*
۱، ۲، بخش تحقیقات کشت‌بافت و انتقال‌ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۵ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۴)

The Cloning of Tomato *2A11* Promoter and Its Efficiency in Transient Expression System

N. AHMADI[1] AND H. RAHNAMA[2*]
1, 2, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
(Received: February 4, 2013 - Accepted: May 25, 2013)

چکیده

بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده و در بافت‌های تمایز یافته قابل اجرا است. پیشبر *2A11* از پیشبرهای ویژه بافت میوه گیاه گوجه‌فرنگی است که باعث بیان بالای ژن *2A11* در میوه می‌شود. هدف از این تحقیق همسانه‌سازی پیشبر *2A11* و بررسی بیان آن است. پس از استخراج DNA ژنومی از گیاه گوجه‌فرنگی، پیشبر *2A11* با استفاده از پرایمر اختصاصی تکثیر و در ناقل PTZ57R/T همسانه‌سازی شد. قطعه موردنظر با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Hin*dIII جدا و جایگزین پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 گردید. پلاسمیدهای نوترکیب به‌روش شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شدند. با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن بیان ژن *GUS* در بافت میوه گیاهان گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در مقایسه با پیشبر *CaMV35S*، *2A11* نیز با کارایی بالایی باعث بیان‌ژن *GUS* در میوه گوجه‌فرنگی می‌شود. بنابراین، از این پیشبر می‌توان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در میوه گوجه‌فرنگی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اگرواینفیلتریشن، بیان موقت، پیشبر *2A11*، ژن *GUS*، همسانه‌سازی

Abstract

Transient expression of foreign genes in plant tissues is a valuable tool for plant biotechnology and to shorten the time for gene functional analysis. Transient expression is a fast, flexible, simple and easy method that could be used in fully differentiated plant tissues. *2A11* promoter is a tomato fruit specific promoter whose expression occurs in fruit significantly. Cloning of fruit-specific promoter (*2A11*) is the main purpose of this study. *2A11* promoters were amplified from genomic DNA of tomato by PCR using specific primers. The promoter fragments were cloned into cloning vector PTZ57R/T. Recombinant plasmids were transferred into *E. coli* XLI-blue strain. Fragments of the interest were digested using restriction enzymes *Bam*H1 and *Hin*dIII and were then purified and substituted in *CaMV35S* promoter in binary pBI121. Binary pBI121 was selected for cloning of *2A11* promoters as it is an ideal vector for agroinfiltration due to the presence of the *CaMV35S* promoter and the *GUS* reporter gene within its T-DNA region. Recombinant plasmids were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain with freeze and thawing method. The expression of *GUS* gene was analyzed in tomato with agroinfiltration method. The results showed that, *2A11* promoter was found as efficient as *CaMV35S* promoter in expression of *GUS* gene specifically in tomato fruit. Then, we can use this promoter for tissue specific expression of recombinant proteins in tomato fruits.

Keywords: *2A11*, Agroinfiltration, Promoter, Tomato, Transient expression

نویسنده مسئول: حسن رهنما
E-mail: hrahnama@abrii.ac.ir

مقدمه

تراریختی ژنتیکی گیاه ابزاری قدرتمند برای مطالعه بیان و تنظیم‌ژن، نمو گیاه، دست‌کاری و آنالیز فرایندهای بیوشیمیایی و ادغام ژن‌ها است. این ابزار همچنین پتانسیل افزایش ایمنی غذایی در کشورهای در حال توسعه و ایجاد محصولات دارویی را برای بهبود سلامت انسان در سراسر جهان دارد. با وجود مزایای اجتماعی، اقتصادی و زیست‌محیطی مربوط به آینده این فناوری، مهندسی‌ژنتیک گیاهی یکی از موضوعات تفرقه‌انداز در کشاورزی است. چالش‌های قانونی در مورد ایمنی گیاهان مهندسی شده هم برای مصرف‌کننده و هم محیط زیست وجود دارد (Nelson. 2001: Eaglesham *et al.*, 2001). برای به حداقل رساندن اثرات ناسازگار بالقوه گیاهان تراریخته روی موجودات غیرهدف، در برخی موارد ضروری است که ژن‌ها به‌صورت هدفمند در زمان یا مکان خاصی از گیاه بیان شوند. یکی از این راهکارها استفاده از پیشبرهای مناسب برای ژن هدف است. انتخاب درست پیشبرها برای موفقیت انتقال و بیان هدفمند پروتئین‌های خارجی بسیار حایز اهمیت است (Dale *et al.*,2002). میوه گوجه‌فرنگی به‌عنوان گیاهی مدل برای توسعه بیان موقت استفاده می‌شود. درگوجه‌فرنگی پیشبرهای مختلفی مانند *E4*، *E8*، *PG* و *2A11* شناسایی شده است که موجب بیان تراژن در میوه می‌شود. از این پیشبرها برای بیان اختصاصی و هدفمند پروتئین‌های نوترکیب در میوه گوجه‌فرنگی استفاده شده است (Orzaez *et al.*, 2006). همان‌گونه که اشاره شد، پیشبر *2A11* یکی از پیشبرهای ویژه بافتی است. بیان ژن *2A11* تنها در میوه صورت می‌گیرد و در بافت‌های دیگر گیاه و یا مرحله نموی دیگر مشاهده نشده است. mRNA مربوط به ژن *2A11* اولین بار در تخمدان در مرحله شکفتگی کامل گل کشف شد و تا ۱٪ از کل mRNA تجمع‌یافته در طی رسیدگی میوه را تشکیل می‌دهند (Fillatti *et al.*,1987). ژن *2A11* دارای یکی از بلندترین پیشبرهای گیاهی است. در مقایسه با نواحی ´۵ ژن‌های وابسته به رسیدگی و ژن القاکننده اتیلن، توالی پیشبری محافظت شده‌ای در *2A11* مشاهده نشده است که برای بیان ویژه میوه موردنیاز باشد.

بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است و برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت‌بافت و در بافت‌های تمایزیافته قابل اجرا بوده و همچنین تحت تأثیر محیط نیست. از بیان موقت بیشتر برای تایید تراریختی و اثبات تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. در این روش پروتئین در سطح بالا و در کوتاه‌ترین زمان تولید می‌شود. با توجه به این‌که ارزیابی عملکرد گیاهان تراریخته پایدار فرایندی طولانی می‌باشد، بیان موقت ژن بیگانه می‌تواند جایگزین مناسبی به‌حساب آید (Goodin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000; Kapila *et al.*, 1997). بیان موقت در چندین گونه گیاهی به‌کار گرفته شده ولی از بین آن‌ها بیشترین گزارش‌ها در گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* بوده است (Chakrabarty *et al.*, 2007; Wroblewski *et al.*, 2005; Mokrzycki-Issartel *et al.*, 2003). مزیت‌های استفاده از *N. benthamiana* برای بیان موقت پروتئین شامل موارد زیر است: اول اینکه یک گیاه مدل بوده که معمولاً در تمام آزمایشگاه‌های تحقیق گیاه به‌کار می‌رود و دوم اینکه پروتئین به راحتی در سطح بالا از طریق اگروانیفیلتریشن در برگ‌های این گیاه بیان می‌شود، می‌باشد (Kapila *et al.*, 1997; Johansen and Carrington. 2001; Voinnet *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008). این تکنیک برای گونه‌های دیگر مثل یونجه *Medicago sativum* (D´Aoust *et al.*, 2004)، کاهو *Lactuca sativa* گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* و آرابیدوپسیس *Arabidopsis thaliana*، (Wroblewski *et al.*, 2005)، نیز به‌کار رفته است. بنابراین، از این سیستم می‌توان برای تراریختی طیف وسیعی از گونه‌های دولپه‌ای استفاده نمود. Orzaez *et al.*, (2006) روشی موقت به‌نام اگروانیجکشن (Agroinjection) برای آنالیز عملکرد ژن در میوه گوجه‌فرنگی را ارائه کردند. آن‌ها نشان دادند که تزریق کشت اگروباکتریوم از طریق نوک سرنگ منجر به نفوذ آن و بیان موقت پروتئین در میوه گیاه می‌شود. با توسعه پروتکل تراریختی موقت به‌واسطه اگروباکتریوم در برنج مشخص شد که این روش را برای گونه‌های تک‌لپه‌ای نیز می‌توان به‌کار برد. البته کارایی اگروانیفیلتریشن از میزبانی به میزبان دیگر متفاوت است و در تعدادی از گونه‌ها قابل اجرا نمی‌باشد (Song and Yamaguchi. 2003). دلایل تفاوت کارایی این روش به‌خوبی مشخص نشده اما عوامل توپولوژیکی تا حدی در این امر مؤثر هستند.

با سیستم بیان موقت می‌توان چند ژن را به‌طور همزمان بیان نمود (Johansen and Carrington. 2001)؛ از طرف دیگر این روش برای بیان ژن‌های نسبتاً بزرگ (بزرگ‌تر از ۲kb) هم مناسب است (Porta and Lomonossoff. 1996). از بیان موقت بیشتر برای تأیید

تراریختی و اثبات تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. نفوذ در خلأ با اگروباکتریوم نوترکیب منجر به تراریختی موقت بعضی از سلول‌ها می‌شود. پروتئین در سطح بالا و در زمان کوتاه به‌دست می‌آید. در این تحقیق پیشبر *2A11* از گیاه گوجه‌فرنگی جداسازی شد و پلاسمید نوترکیب pBI-2A11-GUS ساخته شد. در ادامه به منظور بررسی کارایی آن از ژن گزارشگر *GUS* در سیستم اگروانیفیلتریشن- گوجه‌فرنگی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گیاه گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum* Mill متعلق به خانواده *Solanaceae* استفاده شد. بذرهای گیاه پس از شستشو در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت شد. برگ‌های جوان این گیاه در مرحله ۱۰-۸ برگی برای استخراج DNA ژنومی به روش Dellaporta *et al.*, (1983) مورد استفاده قرار گرفت. از DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو جهت جداسازی پیشبر *2A11* به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. از دمای ۹۴°C برای واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه استفاده گردید. ۳۵ چرخه برای PCR بدین‌صورت در نظر گرفته شد: واسرشت سازی یک دقیقه در دمای ۹۴°C؛ اتصال ۱ دقیقه در دمای ۶۳°C و بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲°C؛ در پایان ۴ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در ۷۲°C در نظر گرفته شد. توالی آغازگر پیشرو 5′- CAAGCTTTAAAAAGTATAGTCAATATT TAC-3 و توالی آغازگر برگشتی 5′- GGATCCGGTTTTGGATTAATTGCTAAT TGATG-3′ بود. این آغازگرها براساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI[1] با شماره دسترسی X13743.1 و با استفاده از نرم افزار Oligo طراحی گردید.

همسانه‌سازی پیشبر *2A11*

در طول تحقیق از مواد و آنزیم‌ها و همچنین نشانگرهای وزن مولکولی مربوط به شرکت Roche آلمان استفاده شد. به‌منظور تکثیر و همسانه‌سازی پیشبر *2A11* در ناقل دوگانه نهایی pBI121، ابتدا محصول PCR مستقیماً در ناقل T/A (ناقل pTZ57R/T) (InSTAclone ™ PCR Cloning Kit # K1214, Fermentas) کلون گردید. انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت. سلول‌های تراریخت حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در محیط LB مایع و محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و جهت استخراج پلاسمید به‌روش Miniprep، (Sambrook and Russell. 2001) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تأیید حضور ژن در سازه همسانه‌سازی با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III، پیشبر موردنظر از روی ژل آگارز جدا شده و با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roch) تخلیص گردید.

ناقل بیانی pBI121 استفاده گسترده‌ای در تراریختی گیاهان دارد. اندازه این ناقل ۱۴۷۵۸ bp است که ناحیه T-DNA (۶۱۹۳ bp) آن شامل قسمت‌های سرحد راست، کاست بیانی برای نئومایسین فسفو ترانسفراز II (*nptII*) به عنوان نشانگر انتخابی، پیشبر *CaMV35S*، ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز[2] (*GUS*) و پایانبر *nos* و سرحد چپ است. با توجه به نقشه پلاسمید، پیشبر *CaMV35S* با استفاده از توالی و مشخصات دریافت شده در NCBI توسط نرم‌افزار کامپیوتری Vector NTI طراحی شد. طراحی نقشه pBI121 این امکان را فراهم آورد تا محل‌های برشی مفید و موردنیاز در جهت هدف ما که خارج‌کردن پیشبر *CaMV35S* و ورود پیشبر *2A11* بود، شناسایی شود.

به‌منظور کلون‌کردن پیشبر *2A11* در پلاسمید pBI121، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید pBI121 خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA جهت انجام واکنش اتصال آماده گردید. در مرحله بعد، پیشبر *2A11* جداشده با روش فوق توسط آنزیم T_4 DNA لیگاز به پلاسمید pBI121 خطی شده الحاق شد. تراریختی سلول‌های *E.coli* با استفاده از پلاسمید نوترکیب به‌روش فیزیکی- شیمیایی انجام گردید (Sambrook and Russell. 2001). کلون‌های تراریخت باکتریایی در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. جهت تأیید الحاق پیشبر در پلاسمید pBI121 آزمون‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی *2A11* و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hin*dIII انجام گردید. به‌منظور تأیید صحت توالی قطعه مربوط به پیشبر، پلاسمیدهای نوترکیب پس از استخراج برای توالی‌یابی قطعه ورودی، به شرکت Millegene فرستاده شدند. از پرایمرهای

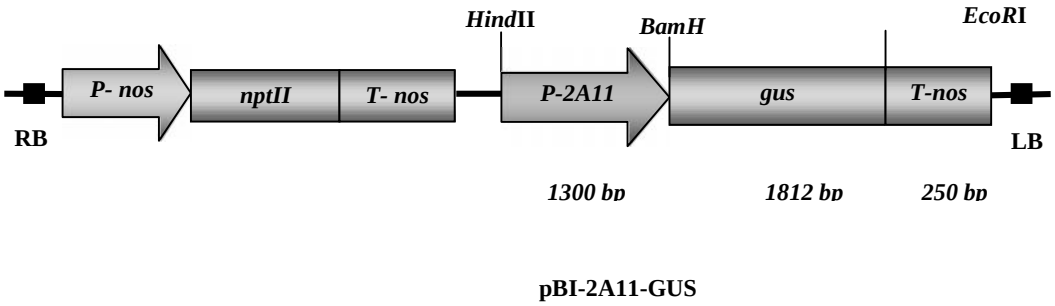
1 . National Center for Biotechnology Information

2. β- Glucoronidase

عمومی M13 برای توالی‌یابی استفاده گردید. نتیجه توالی‌یابی در برنامه Blast[1] نوکلئوتیدی، مورد جستجو قرار گرفت. پس از تأیید نهایی، سازه نوترکیب حاصل که pBI-2A11-GUS نام‌گذاری شد (شکل۱) و به باکتری *Agrobacterium tumefacience* منتقل گردید. سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد[2] تراریخت گردیدند (Sambrook and Russell. 2001) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (۵۰ mg/l) و ریفامپسین (۷۵ mg/l) در دمای ۲۸°C به‌مدت ۲ تا ۳ روز کلنی‌ها ظاهر شدند. تأیید تراریختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمون‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی*2A11* انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 به‌عنوان کنترل در تراریختی استفاده شد.

1. Basic Local Alignment Search Tool

2. Freeze – Thaw



شکل ۱– سازه نوترکیب pBI-*2A11-GUS* جایگزینی پیشبر *2A11* را به‌جای *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 نشان می‌دهد.

بررسی بیان موقت ژن *GUS* در گیاهان گوجه‌فرنگی

به‌منظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه pBI-2A11-GUS در گیاهان و بررسی بیان ژن باکتریایی *GUS* (که آنزیم بتاگلوکورونیداز را کد می‌کند) تحت پیشبرهای *2A11* و *CaMV35S* در میوه گوجه‌فرنگی، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا گردید. بدین منظور ابتدا *A. tumefaciens* سویه LBA4404 که حاوی پلاسمید نوترکیب pBI-2A11-GUS یا pBI121 بودند به میزان ۵ میلی‌لیتر در محیط LB مایع حاوی۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین همراه با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین به‌صورت شبانه در دمای ۲۸°C و بر روی شیکر، کشت گردید. صبح روز بعد ۲ میلی‌لیتر از این کشت به ۵۰ میلی‌لیتر در محیط LB مایع حاوی۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین همراه با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین افزوده شد و مجدداً در همان شرایط رشد ذکرشده قرار گرفت. پس از رسیدن OD_{600} به ۰/۵، نمونه‌های برش‌یافته میوه گوجه‌فرنگی به سوسپانسیون باکتری اضافه شد و در دسیکاتور تحت خلاء به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. با حذف سریع سیستم خلاء، ورود باکتری به داخل میوه‌ها تسهیل گردید. نمونه‌ها به پتری‌های حاوی کاغذ صافی منتقل شدند و به‌مدت ۳ روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت آزمایش هیستوشیمیایی ژن *GUS* با استفاده از X-Gluc امکان سنجش بیان‌ژن را به‌طور اختصاصی در سلول و بافت میوه فراهم آورد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc برای ۳۶–۸ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده گرفته و سپس در الکل ۷۰٪ شستشو گردیدند (Jefferson *et al.*, 1987).

نتایج و بحث

در این تحقیق قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی پیشبر *2A11* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با روش PCR از ژنوم گوجه‌فرنگی همسانه‌سازی شد. الحاق پیشبر به داخل پلاسمید T/A با استفاده از روش PCR ثابت گردید. همچنین با استفاده از واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hin*dIII و خروج قطعات DNA با اندازه ۱۳۰۰ جفت بازی، همسانه‌سازی پیشبر مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲). نتیجه توالی‌یابی در برنامه Blast نوکلئوتیدی، مورد جستجو قرار گرفت. در شکل ۳ (که قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد) توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه *2A11* همسانه‌سازی شده است و توالی ردیف دوم مربوط به توالی با شماره دسترسی X13743.1 (*2A11*) است که بیشترین تطابق را با توالی مورد جستجو دارد. به‌منظور ارزیابی

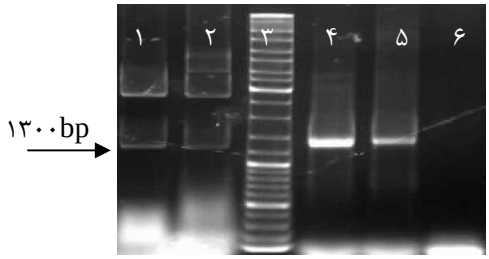
کارایی پیشبر *2A11* از ناقل دوگانه pBI121 استفاده شد. بدین‌منظور پیشبر *2A11* جایگزین پیشبر *CaMV35S* این ناقل شد. خروج پیشبر *CaMV35S* توسط آنزیم‌های *Hind*III در سمت '۵ و *Bam*HI در سمت '۳ امکان‌پذیر است. جایگزینی پیشبر *2A11* با پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه *pBI121* و ساخت سازه نوترکیب pBI-2A11-GUS با استفاده از آزمون‌های مختلف (PCR و هضم آنزیمی) مورد تأیید قرار گرفت (شکل۴). نتایج PCR سازه نوترکیب جدید نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *2A11* و همچنین هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III حضور پیشبر *2A11* را در بالادست ژن *GUS* در سازه نوترکیب pBI-2A11-GUS به اثبات رساند (شکل۱). تراریختی سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری اگروباکتریوم تومفسینس با سازه نوترکیب pBI-2A11-GUS با استفاده از روش فیزیکی-شیمیایی انجام شد. کلنی‌های باکتریایی حاوی سازه نوترکیب با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر *2A11* تأیید شدند. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که مطابق انتظار قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی تکثیر یافته است (شکل ۵).

نتایج حاصل از آزمایش بیان موقت پیشبر در میوه گوجه‌فرنگی در محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc نشان داد که پیشبر *2A11* همانند پیشبر *CaMV35S* باعث بیان‌ژن *GUS* در میوه گوجه‌فرنگی می‌شود. این امر ضمن اینکه کارایی و فعالیت پیشبر *2A11* را نشان می‌دهد حاکی از موفقیت روش اگروانیفیلتریشن برای میوه گوجه‌فرنگی می‌باشد. رنگ آبی بافت‌ها نشان داد که پیشبرها باعث بیان‌ژن *GUS* شده‌اند. عدم رنگ‌آمیزی غده‌های کنترل تاکیدی بر صحت بیان‌ژن و عدم تأثیرپذیری نتایج از عوامل محیطی و جانبی می باشد (شکل ۶).

Van Haaren and Houck (1991) بیان اختصاصی میوه را با فعالیت بتاگلوکورونیداز (GUS) تولیدشده در گیاه گوجه‌فرنگی تراریخته، تحت پیشبر *2A11*، بررسی کردند. مطالعات حذفی روی ناحیه ´۵ تعدادی از عناصر تنظیمی قوی درگیر در بیان مناسب ژن *2A11* را نشان دادند. نواحی ۴/۰ kb و ۱/۳ kb ´۵ بیان بالای *GUS* را در میوه باعث شدند. در حالی که ناحیه ۱/۸ kb ´۵ فعالیت GUS را در بافت میوه یا برگ تولید نکرد. بنابراین، یک عنصر تنظیمی منفی قوی در ناحیه بین ۱۳۲۴ bp و ۱۷۹۶ bp در بالادست شروع رونویسی و یک عنصر تنظیمی مثبت ویژه میوه بعد از ۱/۸ kb بالادست جایگاه شروع رونویسی وجود دارد. ناحیه ۱/۸ kb پیشبر را می‌توان به‌وسیله قطعه بالادست توالی تقویت‌گر *CaMV35S* فعال‌کرد که در این صورت پیشبر ویژه میوه نخواهد بود. جایگزینی ناحیه ´۳ ژن *2A11* با ناحیه ´۳ متفاوت اثر قابل توجهی در بیان ژن نداشت، ناحیه ´۳ در بیان اختصاصی میوه ژن *2A11* نقش جزیی دارد. همچنین این دو محقق در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که ژن *2A11* حاوی هر دو عنصر تنظیمی مثبت و منفی است. آن‌ها ناحیه ´۵ پیشبر ژن *2A11* را به دو قطعه کوچک حدود ۲۱۱ تا ۶۳۴ جفت بازی تقسیم کردند، این قطعه‌های کوچک DNA در *in vitro* برای مطالعات اتصال به پروتئین استفاده شدند. در مطالعات آن‌ها حداقل چهار ناحیه اتصال به پروتئین ویژه میوه و یک ناحیه اتصال به پروتئین فعال میوه و برگ مشاهده شد. بدین وسیله نقشه عملکردی پیشبر *2A11* ترسیم شد.

همچنین Line *et al.*, (2006) پیشبر *2A11* ویژه میوه در گوجه‌فرنگی را با تکنیک نستد پرایمر PCR[1] تکثیر کردند.

1 . Nested-primers PCR technology



شکل ۲- هضم آنزیمی و PCR پلاسمیدهای استخراج‌شده از کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل pTZ57R/T و پیشبر *2A11* و مشاهده باند ۱.۱۳۰۰ bp و۲ - هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج‌شده از ۲ کلنی حاصل از واکنش اتصال pTZ57R/T و پیشبر *2A11* با آنزیم های *Hind*III و *Bam*HI (هر دو کلنی پیشبر را دریافت کرده‌اند)؛ ۳- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1 kb ladder)؛ ۴ و ۵ - PCR پلاسمیدهای استخراج‌شده از ۲ کلنی حاصل از واکنش اتصال pTZ57R/T و پیشبر *2A11* با پرایمر *2A11* (هر دو کلنی پیشبر را دریافت

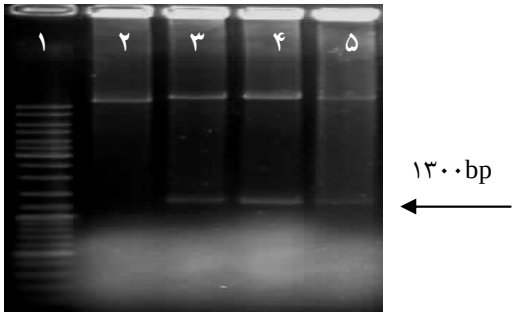
کرده‌اند)؛ ۶- واکنش PCR آب.

```
>emb|X13743.1| Lycopersicon esculentum DNA for a fruit specific protein involved in fruit maturation
Length=4654
 GENE ID: 543980 2A11 | fruit-specific protein [Solanum lycopersicum]
(10 or fewer PubMed links)
 Score = 1635 bits (885),  Expect = 0.0
 Identities = 889/891 (99%), Gaps = 1/891 (0%)
 Strand=Plus/Plus
Query  28    CTTTAAAAAGTATAGTCAATATTTACGGTGACCGTGAATTTCTTAATTATGATATATAAT  87
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9     CTTTAAAAAGTATAGTCAATATTTACGGTGACCGTGAATTTCTTAATTATGATATATAAT  68

Query  88    TTAAAAGAAATCATGATCACATTCTACTGATGAGAACATGTGCTAATCAAGGGAAAACAT  147
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  69    TTAAAAGAAATCATGATCACATTCTACTGATGAGAACATGTGCTAATCAAGGGAAAACAT  128

Query  148   GGATGTGAAAAATACTTTTTGTTAAAAGTaaaaaaaaaTGTGAAATTTTGTTAGTTATTT  207
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  129   GGATGTGAAAAATACTTTTTGTTAAAAGTAAAAAAAAAATGTGAAATTTTGTTAGTTATTT  188

Query  208   ACTACCTATACATTATTTGAGCATGTGCAAACTTTACAAATACCTAATAGAAGATTTTCA  267
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  189   ACTACCTATACATTATTTGAGCATGTGCAAACTTTACAAATACCTAATAGAAGATTTTCA  248

Query  268   CCTGCCTGTATATATGTAAATTAATTATAATGAACACTCTCACATAAAATAATTATCAGT  327
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  249   CCTGCCTGTATATATGTAAATTAATTATAATGAACACTCTCACATAAAATAATTATCAGT  308

Query  328   ATATACATTAATACTTGCCCTCCACAATGAATTAAATAAAATGTAGAACATGATCTACAC  387
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  309   ATATACATTAATACTTGCCCTCCACAATGAATTAAATAAAATGTAGAACATGATCTACAC  368

Query  388   TTCAATAAAACTAAGACCATAAAGAATAATTTCAAAATATACACATGTCAACAATAAATT  447
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  369   TTCAATAAAACTAAGACCATAAAGAATAATTTCAAAATATACACATGTCAACAATAAATT  428

Query  448   ATTTGCATATTATATTAACTTACTAAACAATCTTTACTTTTGAAATATAAAAATAATCAA  507
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  429   ATTTGCATATTATATTAACTTACTAAACAATCTTTACTTTTGAAATATAAAAATAATCAA  488

Query  508   GTTATAAGTCTGCTCAAAGTAAAGCACTTGTTAGACTCATCTGATTTTGAGAA-GTAAGC  566
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  489   GTTATAAGTCTGCTCAAAGTAAAGCACTTGTTAGACTCATCTGATTTTGAGAAGGTAAGC  548

Query  567   AAATTGATGGTGCATAATAGTCACAAGTAAAATATAAAATAGATTTCATTAGTAAAATTG  626
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  549   AAATTGATGGTGCATAATAGTCACAAGTAAAATATAAAATAGATTTCATTAGTAAAATTG  608

Query  627   TTTTTTACTTTCTTTATATATAATTATCAATATCCTTCAATGGTAGGTTAATTATATTGT  686
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  609   TTTTTTACTTTCTTTATATATAATTATCAATATCCTTCAATGGTAGGTTAATTATATTGT  668

Query  687   TAACTTCTTGTTGAATtaaagcaataagacaagaatattaaagataaaagaacaataaaa  746
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  669   TAACTTCTTGTTGAATTAAAGCAATAAGACAAGAATATTAAAGATAAAAGAACAATAAAA  728

Query  747   atagaaagactaagagataagaGTTTTCTTATTCTTCTTTCAATAAGTATCATCAAGTGT  806
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  729   ATAGAAAGACTAAGAGATAAGAGTTTTCTTATTCTTCTTTCAATAAGTATCATCAAGTGT  788

Query  807   ATACAATATAAATTTTTGTATTTTTGATCTATCTATTTATAATGTTATATATAAGCATAC  866
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  789   ATACAATATAAATTTTTGTATTTTTGATCTATCTATTTATAATGTTATATATAAGCATAC  848

Query  867   AAAAGATCAGTCataaatatgactttaatcatgaaaataatgaaaganatt  917
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  849   AAAAGATCAGTCATAAATATGACTTTAATCATGAAAATAATGAAAGAGATT  899
```

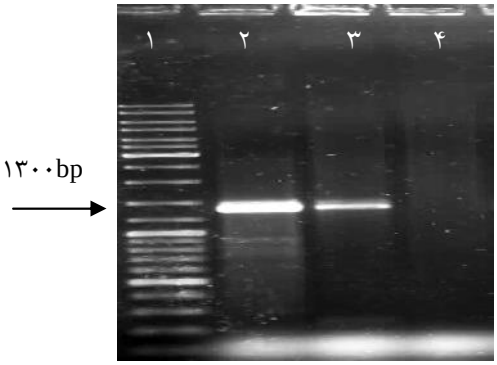
شکل۳- قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده *2A11*، توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه *2A11* است و توالی دوم مربوط به توالی شماره دسترسی X13743.1 است.

در ناقل دوگانه پیشبر ۱/۳ kb، *2A11* را به ژن *GUS* متصل کردند و بیان موقت ژن *GUS* را با واسطه *A.tumefaciens* بررسی کردند. نتیجه بیان موقت ژن *GUS* نشان داد که این پیشبر توانایی راندن این ژن را در میوه گوجه‌فرنگی دارد. آن‌ها توانستند، با موفقیت پیشبر *2A11* را همسانه‌سازی کنند و نشان دادند که استفاده از آن برای تولید واکسن خوراکی امکان‌پذیر می‌باشد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که پیشبر *2A11* همسانه‌سازی شده قادر است ژن *GUS* را در میوه‌های گیاه گوجه‌فرنگی بیان نماید. طبق بررسی‌های انجام‌شده و براساس شدت و میزان رنگ بافت‌ها تا حدی می‌توان گفت که قدرت این پیشبر تقریباً مشابه پیشبر دایمی و قدرتمند *CaMV35S* است. بنابراین، پیش‌بینی می‌شود که استفاده از این پیشبر برای بیان پروتئین‌های نوترکیب (مانند واکسن هپاتیت) قادر است به میزان نسبتاً بالایی از پروتئین موردنظر را در بافت میوه تولید نماید. به‌همین دلیل پیش‌بینی می‌شود که پیشبر مناسبی برای اهداف موردنظر خواهد بود. هرچند طبق گزارش‌های موجود اختصاصی‌بودن عملکرد این پیشبر در میوه‌های گوجه‌فرنگی ثابت شده است ولی جهت تأیید پیشبر مورد استفاده در این تحقیق لازم است با استفاده از سایر نمونه‌های بافتی (مانند برگ) این امر ثابت گردد.

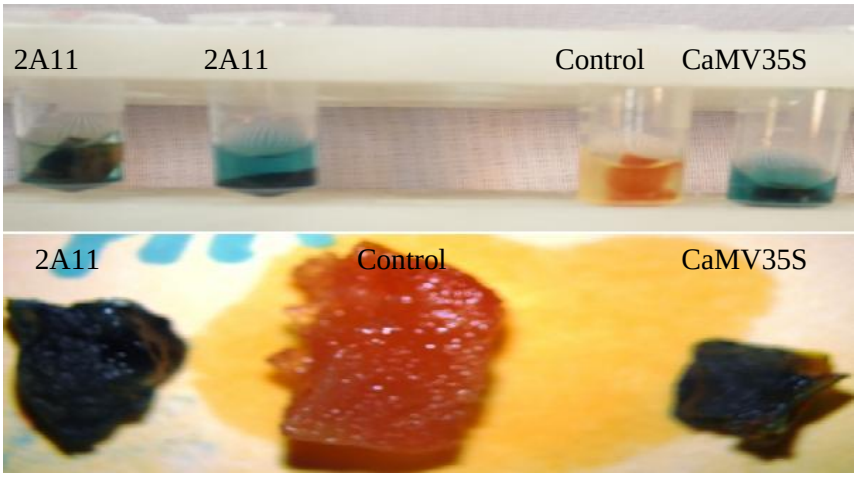


شکل ۴- هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج‌شده از کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل pBI121 و پیشبر *2A11* (pBI-*2A11GUS*) به‌منظور بررسی ورود پیشبر. ۱- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1 kb ladder)؛ ۲- هضم آنزیمی پلاسمید غیرنوترکیب که باند ۱۳۰۰ مشاهده نشد؛ ۳، ۴ و ۵- هضم آنزیمی پلاسمید استخراج‌شده حاصل از واکنش اتصال ناقل pBI121 و پیشبر *2A11* با دو آنزیم *Hind*III و *Bam*HI و مشاهده باند ۱۳۰۰ bp برای پیشبر *2A11*.



شکل ۵: الکتروفورز محصول واکنش PCR برای *A. tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی سازه

نوترکیب pBI-*2A11GUS*. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پیشبر *2A11*. ۱- نشانگر مولکول تعیین اندازه DNA (1 kb ladder)؛ ۲ و ۳- کلونی‌های حاوی سازه نوترکیب pBI-*2A11GUS* ؛ ۴- آب.



شکل ۶- بیان موقت ژن *GUS* با استفاده از اگرواینفیلتریشن به‌واسطه اگروباکتریوم حامل ناقل نوترکیب pBI-*2A11GUS* و غیرنوترکیب pBI-*35SGUS* به‌همراه اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب به‌عنوان کنترل در میوه گوجه‌فرنگی.

سپاسگزاری

نویسندگان در اجرای این پژوهش از حمایت‌های پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۹۰۰۸-۰۵-۰۵-۷ تقدیر و تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

Chakrabarty R, Banerjee R, Chung SM, Farman M, Citovsky V, Hogenhout SA, Tzfira T, Goodin M (2007) PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing Nicotiana benthamiana-virus interactions. Mol. Plant Microbe Interact. 20: 740–750.

D'Aoust MA, Lerouge P, Busse U (2004) Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. In R Fischer, S Schillberg, eds, Molecular Farming. Wiley-VCH Verlag gmbh & Co., Weinheim, Germany.

Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. Nature Biotechnol. 20: 567–574.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant. Mol Biol. Rep. 1: 19-21.

Eaglesham A, Pueppke SG, Hardy RWF (2001) Gentically modified food and the consumer. NABC Report 13. New York: National Agricultural Biotechnology Council.

Fillatti JJ, Kiser J, Rose R, Comai L (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Biotechnology. 5: 726-730.

Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO (2002) pgd vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. Plant J. 31: 375–383.

Jefferson R, Kavanagh ATA, Bevan M W (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.

Johansen LK, Carrington JC (2001) Silencing on the spot: induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. Plant Physiol. 126: 930–938.

Kapila J, derycke R, vanmontagu M, Angenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 122: 101–108.

Lin B, Li M, Lin D, Jin Z. (2006) Cloning and Functional Analysis on promoter of

tomato fruit-specific 2A11 from *Lycopersicon esculentum*.Chinese Agricultural science bulletin. 22: 62-62.

Ma P, Liu J, He H, Yang M, Li M, Zhu X, Wang X (2008) A viral suppressor P1/HC-Pro increases the GFP Gene expression in Agrobacterium- mediated transient assay. Appl. Biochem. Biotechnol. 158: 243–252.

Mokrzycki-Issartel N, Bouchon B, Farrer S, Berland P, Laparra H, Madelmont JC, Theisen M (2003) A transient tobacco expression system coupled to MALDI-TOF-MS allows validation of the impact of differential targeting on structure and activity of a recombinant therapeutic glycoprotein produced in plants. FEBS Lett. 552: 170– 176.

Nelson GC (2001) Genetically modified organisms in agriculture. Economics and politics. San Diego, CA: Academic Press.

Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A (2006) Agroinjection of tomato fruits: a total for rapid functional analaysis of transgenes directly in fruit. Plant Physiol. 140: 3-11.

Porta C, Lomonossoff G (1996) Use of viral replicons for the expression of genes in plants. Mol Biotechnol 5: 209–221.

Sambrook J, Russell DW (2001) Rapid isolation of yeast DNA. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Song GQ, Yamaguchi KI (2003) Efficient agroinfiltration–mediated transient GUS expression system for assaying different promoters in rice. Plant Biotechnology. 20: 235-239.

Vanhaaren MJJ, Houck CM (1991) Strong negative and positive regulatory elements contribute to the high level fruit-specific expression of the tomato 2A11 gene. Plant Mol. Biol. 17: 615-630.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant Journal. 33: 949-956.

Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnol. J. 3: 259–273.

Yang YN, Li RG, Qi M (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. Plant J 22: 543–551.