مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 3، شماره 2، پاییز و زمستان 1390)

همسانه‌سازی پیشبر *E8* گیاه گوجه‌فرنگی و بررسی بیان موقت با استفاده از سیستم اگروباکتریوم

ناهید احمدی[1]، حسن رهنما[2*]، سید کمال کاظمی تبار[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[2] استادیار بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
[3] استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: 1390/04/25، تاریخ پذیرش: 1390/12/28

چکیده

جداسازی و بررسی خصوصیات پیشبرهای اختصاصی بافت میوه، برای دستورزی و بیان هدفمند پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است. پیشبر *E8* یک پیشبر اختصاصی بافت میوه گیاه گوجه‌فرنگی بوده که طول کامل آن 2/2 kb می‌باشد. در این پژوهش بخش هسته‌ای این پیشبر به طول 1/1 kb مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم *pfu* پلیمراز، قطعه مورد نظر از روی DNA استخراج شده گوجه فرنگی تکثیر و همسانه‌سازی شد. پس از تعیین توالی و تایید نهایی، پیشبر *E8* جایگزین پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 گردید. پلاسمید نوترکیب با کمک شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شد. با استفاده از روش اگروباکتریوم بیان اختصاصی ژن *gus* در بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. اگروباکتریوم حاوی ناقل دوگانه pBI121 به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ژن *gus* در میوه‌های گوجه فرنگی به طور اختصاصی بیان می‌شود. از این پیشبر فعال می‌توان برای بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در میوه-های گیاه گوجه فرنگی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *اگروباکتریوم، بیان موقت، پیشبر E8، گوجه فرنگی، gus.*

* نویسنده مسئول: حسن رهنما تلفن: 026-32703536 Email: hrahnama@abrii.ac.ir

مقدمه

تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته (کشاورزی مولکولی) یکی از جنبه‌های کاربردی جدید مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود. پروتئین‌های تولید شده توسط گیاهان برخلاف سیستم‌های تولید مبتنی بر سلول‌های جانوری، به علت عدم وجود عوامل بیماریزای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند (Larrick & Thomas, 2001) عوامل مختلفی در افزایش تولید پروتئین-های نوترکیب در گیاهان تراریخته نقش دارند که از آن جمله می‌توان به بهینه‌سازی کدونی، بیان کافی و پایدار ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این وجود، روش، زمان و محل بیان ژن در گیاهان بوسیله مجموعه‌ای از عوامل کنترلی تنظیم می‌گردد. پیشبرها[1] به عنوان یکی از عوامل اصلی رونویسی نقش مهمی در بیان ژن دارند.

پیشبر *CaMV35S* (ویروس موزائیک گل کلم) به طور موثری سبب بیان ژن‌هایی که تحت کنترل آن قرار دارند می‌شود و به همین دلیل در مهندسی ژنتیک گیاهی کاربرد زیادی دارد (Jani *et al.*, 2002). با این وجود، این پیشبر یک پیشبر دایمی بوده و هیچ گونه بیان اختصاصی در یک مرحله نموی یا در یک بافت خاص را سبب نمی-شود. به همین دلیل بیان هدفمند پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته اهمیت زیادی دارد. یکی از مزایای بیان هدفمند پروتئین‌های خارجی در میوه‌ها این است که این بخش‌های خوراکی را می-توان بدون پختن و یا با حداقل فراوری مصرف نمود. به همین علت، میوه‌ها به عنوان یکی از محل-های هدف تولید واکسن‌های نوترکیب محسوب می‌شوند. چندین پیشبر اختصاصی میوه در گوجه-فرنگی شناسایی شده است که از آن جمله می‌توان به *E4*، *E8*، *PG* و *2A11* اشاره نمود (Coupe & Deikman, 1997; Deikman *et al*, 1998). این پیشبرها اغلب برای بررسی نفش اتیلن در رسیدگی میوه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پیشبر *E8* یکی از شناخته شده‌ترین پیشبرهای وابسته به رسیدگی میوه گوجه فرنگی محسوب می‌شود. **ژن** *E8* یکی از ژن‌های وابسته به بیوسنتز اتیلن است که اولین بار توسط Lincoln *et al.* (1987, 1988) از گوجه فرنگی همسانه‌سازی شد. رونویسی ژن *E8* بوسیله اتیلن القا شده و در مراحل آغازی رسیدگی میوه فعال می‌گردد (Zhao *et al.*, 2009). بیان ژن *E8* از نظر زمانی و مکانی در میوه‌های رسیده گوجه فرنگی تنظیم می‌شود (Deikman & Fischer, 1988). پروتئین E8 عضوی از خانواده دی-اکسیژنازها است که در گیاهان وجود داشته و وابسته به 1-آمینوسیکلوپروپان 1- کربوکسیلیک اکسیداز (ACO) است که مرحله پایانی مسیر بیوسنتزی اتیلن را کاتالیز می‌کند (Penarrubia *et al.*, 1992; Prescott *et al.*, 1993). E8 و ACO همولوژی بالایی دارند، به طوری که توالی آمینو

[1] - Promoters

اسیدی آنها 34% (معادل 295 باقیمانده آمینواسیدی) با هم شباهت دارد (Deikman *et al*., 1992).

رسیدگی میوه گوجه فرنگی با افزایش میزان تولید اتیلن کنترل می‌شود (Penarrubia *et al*., 1992). با توجه به نقش E8 به عنوان پروتئین وابسته به رسیدگی میوه گوجه فرنگی، این پروتئین می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم فرایند نمو میوه گوجه فرنگی را از طریق دخالت در مسیر بیوسنتز اتیلن تحت تاثیر قرار دهد (Deikman *et al*., 1992).

در سال‌های اخیر، پیشبر *E8* به طور گسترده‌ای برای اصلاح و بهبود کیفی میوه های گوجه فرنگی و همچنین بیان پروتئین‌های نوترکیب دارویی در گوجه فرنگی‌های تراریخته مورد استفاده قرار گرفته است (Giovannoni *et al*., 1989; Good *et al*, 1994; Lewinsohn *et al*., 2001; Mehta *et al*., 2002; Garza *et al*., 2004; Jiang *et al*., 2007; He *et al*., 2007; Ramirez *et al*., 2007).

در مطالعه حاضر، پس از همسانه‌سازی پیشبر *E8* از گیاه گوجه فرنگی، بیان اختصاصی آن در بافت‌های میوه گوجه فرنگی در مقایسه با پیشبر *CaMV35s* با استفاده از روش بیان موقت اگروباکتریوم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این پژوهش از گیاه گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum* Mill متعلق به خانواده *Solanaceae* استفاده گردید. بذور این گیاه پس از شستشو در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت گردید. برگ‌های جوان این گیاه در مرحله 8-10 برگی برای استخراج DNA ژنومی به روش Dellaporta *et al*. (1983) مورد استفاده قرار گرفت. از DNA استخراج شده بعنوان الگو جهت جداسازی پیشبر *E8* بوسیله واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. برای انجام PCR از دمای $94^{\circ}C$ برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت 4 دقیقه استفاده گردید. در ادامه 35 چرخه با شرایط زیر انتخاب شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ ؛ اتصال یک دقیقه در دمای $59^{\circ}C$ و بسط یک دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ ؛ در پایان 4 دقیقه اضافه برای بسط نهایی در $72^{\circ}C$ در نظر گرفته شد. توالی آغازگر پیشرو 5′- aagcttctagaaatttcacgaaat-3′ و توالی آغازگر برگشتی 5′- ggatccttcttttgcactgtgaatgat- 3′ بود. این آغازگرها بر اساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI با شماره دسترسی AF515784 و با استفاده از نرم افزار Oligo طراحی گردید.

همسانه‌سازی پیشبر *E8*

به منظور تکثیر و همسانه‌سازی پیشبر *E8* 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 به روش Miniprep مورد استفاده قرار گرفتند (Sambrook & Russell, 2001). پس از تائید حضور ژن در سازه همسانه‌سازی، با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III، پیشبر مورد نظر از روی ژل آگارز جدا شده و با استفاده از کیت خالص‌سازی *DNA* (شرکت Roche) تخلیص گردید. به منظور تایید صحت توالی قطعه مربوط به پیشبر، پلاسمیدهای نوترکیب پس از استخراج برای توالی‌یابی قطعه ورودی، به شرکت Millegene فرستاده شدند. از پرایمرهای عمومی M13 برای توالی‌یابی استفاده گردید. نتیجه توالی‌یابی در برنامه Blast نوکلئوتیدی ، مورد جستجو قرار گرفت.

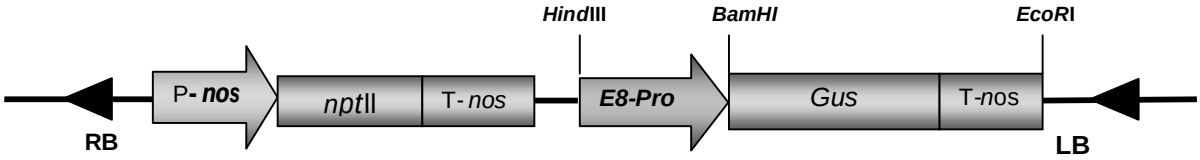
به منظور کلون کردن پیشبر *E8* در پلاسمید pBI121، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید pBI121 خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA جهت انجام واکنش اتصال آماده گردید. در مرحله بعد، پیشبر *E8* جدا شده با روش فوق توسط آنزیم *DNA* -T_4 لیگاز به پلاسمید pBI121 خطی شده الحاق شد. تراریختی سلول‌های *E.coli* با استفاده از پلاسمید نوترکیب به روش فیزیکی- شیمیایی انجام گردید (Sambrook & Russell, 2001). کلون‌های تراریخت باکتریایی در محیط انتخابی حاوی آنتی-بیوتیک کانامایسین انتخاب گردیدند. جهت تایید الحاق پیشبر در پلاسمید pBI121 آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *E8* و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hin*dIII انجام گردید. پس از تایید نهایی سازه نوترکیب حاصل که pBI-E8-GUS نامگذاری شد (شکل 1)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* انجام گرفت. سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد[1] تراریخت گردیدند (Sambrook & Russell, 2001) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (50 mg/l) و ریفامپسین (75 mg/l) در دمای 28°C به مدت 2 تا 3 روز کلنی‌ها ظاهر شدند. تایید تراریختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی *E8* انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 به عنوان کنترل در تراریختی استفاده شد.

بررسی بیان موقت ژن *gus* در گیاهان گوجه-فرنگی

به‌منظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه pBI-E8-GUS در گیاهان و بررسی بیان ژن باکتریایی *gus* (که آنزیم بتاگلوکورونیداز را کد می-کند) تحت پیشبرهای *E8* و *CaMV35S* در میوه گوجه‌فرنگی، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا

[1] Freeze – Thaw

گردید. بدین منظور ابتدا اگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pBI-E8-GUS یا pBI121 در 5 میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و 75 میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین به صورت شبانه در دمای 28°C و بر روی شیکر، کشت گردید. از اگروباکتریوم فاقد پلاسمیدهای فوق به عنوان کنترل در مورد استفاده قرار گرفت. صبح روز بعد 2 میلی‌لیتر از این کشت به 50 میلی-لیتر در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک‌های فوق افزوده شد و مجددا در همان شرایط رشد ذکر شده قرار گرفت. پس از رسیدن OD_{600} به 0/5، نمونه‌های برش یافته میوه گوجه‌فرنگی به سوسپانسیون باکتری اضافه شد و در دسیکاتور تحت خلاء به مدت 15 دقیقه قرار گرفتند. با حذف سریع سیستم خلا، ورود باکتری به داخل غده‌ها تسهیل گردید. نمونه‌ها به پتری‌های حاوی کاغذ صافی منتقل شدند و به مدت 3 روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت آزمایش هیستوشیمایی ژن *gus* با استفاده از X-Gluc امکان سنجش بیان ژن را به طور اختصاصی در سلول و بافت میوه فراهم آورد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc برای 8-36 ساعت در دمای 37°C قرار داده گرفته و سپس در الکل 70% شستشو گردیدند (Jefferson *et al*., 1987).



شکل 1- سازه نوترکیب pBI-E8-GUS مورد استفاده در تراریختی موقت گیاه گوجه فرنگی.

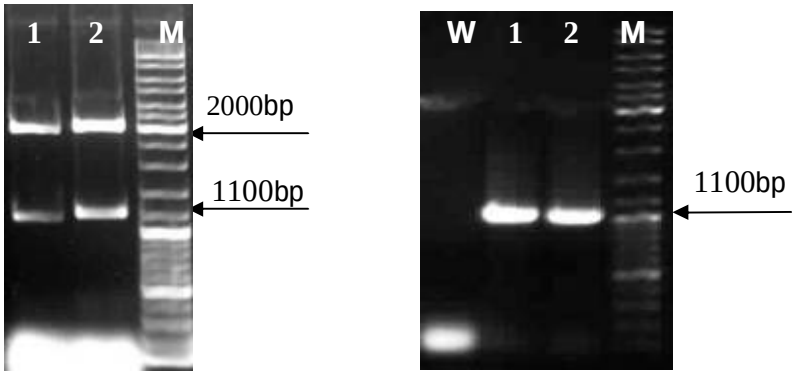
Figure1- T-DNA region of pBI-E8-GUS vector used for transient transformation of tomato plant.

نتایج و بحث

در سال‌های اخیر، گیاهان به عنوان یک مکانیسم جایگزین مناسب، ایمن و اقتصادی برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب مانند آنتی بادی‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌های صنعتی، پلیمرهای زیستی و غیره معرفی شده‌اند (Schillberg *et al*., 2005). گوجه فرنگی هم به دلیل خوش خوراک بودن و ارزش غذایی بالا و همچنین تازه خوری به عنوان یک گیاه میزبان برای تولید واکسن‌های گیاهی شناخته شده است.

تولید کافی و بیان مناسب این پروتئین‌ها در گیاهان نیازمند شرایط و عوامل کنترلی مختلفی در روش‌های مهندسی ژنتیک است. پیشبرها یکی از مهمترین عناصر تنظیمی برای بیان ژن‌های داخلی و خارجی در یوکاریوت‌ها محسوب می‌شوند (Zhao *et al*., 2009). به همین دلیل فعالیت و اختصاصی

بودن یک پیشبر می‌تواند میزان بیان ژن را در گیاهان تحت تاثیر قرار دهد. پیشبر *E8* گیاه گوجه فرنگی باعث بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در بافت میوه می‌شود. از زمانی که این پیشبر برای اولین بار در گوجه فرنگی چری همسانه‌سازی شد (Deikman *et al.*, 1988)، مطالعات زیادی در زمینه نحوه عملکرد آن با استفاده از بیان ژن‌های خارجی در گوجه فرنگی انجام شده است (Jiang *et al.*, 2007; Ramirez *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). در این پژوهش بجای استفاده از کل قطعه 2/2 کیلو بازی پیشبر *E8* از قطعه هسته‌ای (Core) 1/1 کیلو بازی آن استفاده شد. این پیشبر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با روش PCR از ژنوم گوجه‌فرنگی کلون گردید (شکل 2). الحاق پیشبر بداخل پلاسمید T/A با استفاده از روش PCR ثابت شد. همچنین با استفاده از واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و*Hin*dIII و خروج قطعات DNA با اندازه 1100 جفت‌بازی، همسانه‌سازی پیشبر مورد تائید قرار گرفت (شکل 2- ب). تعیین توالی و مقایسه پیشبر همسانه‌سازی شده با توالی موجود در NCBI نشان داد که پیشبر جدا شده 98% با توالی-های مورد جستجو شباهت دارد (شکل 3). جایگزینی پیشبر *E8* با پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 و ساخت سازه نوترکیب pBI-E8-GUS (شکل1) با استفاده از آزمون‌های مختلف (PCR و هضم آنزیمی) مورد تائید قرار گرفت. نتایج PCR سازه نوترکیب جدید نشان-دهنده تکثیر قطعه 1100 جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *E8* و همچنین هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و*Hin*dIII حضور پیشبر *E8* را در بالادست ژن *gus* در سازه نوترکیب pBI-E8-GUS به اثبات رساند (شکل 4). تراریختی سلول‌های مستعد سویه LBA4404 باکتری اگروباکتریوم تومفسینس با سازه نوترکیب pBI-E8-GUS با استفاده از روش فیزیکی-شیمیایی انجام شد. کلنی‌های باکتریایی حاوی سازه نوترکیب با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر *E8* تائید شدند. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که مطابق انتظار قطعه 1100 جفت بازی تکثیر یافته است (شکل 5). برای ارزیابی بیان اختصاصی پیشبر *E8* در میوه‌های گیاه گوجه فرنگی، از روش تراریختی موقت با استفاده از اگروباکتریوم استفاده شد. بیان موقت ژن یک روش سریع، قابل انعطاف و تکرار پذیر برای بررسی سطح بیان آن است. در روش‌های مرسوم، ارزیابی توالی‌های تنظیمی نیازمند یک پروتوکل کارآمد برای تراریختی گیاه است. بنابراین، در گونه‌هایی که تراریختی آنها مشکل و زمان بر می-باشد، یک عامل محدود کننده برای ارزیابی سریع پیشبرها خواهد بود.



ب B　　الف A

شکل 2- تایید مولکولی همسانه‌سازی پیشبر *E8* در ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T. الف- آزمون PCR کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل pTZ57R/T و پیشبر *E8* به منظور بررسی ورود پیشبر *E8* و مشاهده باند 1100 bp. ب- هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاصل از همسانه‌سازی با استفاده از دو آنزیم *Hin*dIII و *Bam*HI. W) کنترل منفی (آب)؛ M) نشانگر اندازه وزن مولکولی1 kb ladder. 1 و2) پلاسمیدهای استخراج شده از 2 کلنی حاصل از واکنش اتصال pTZ57R/T و پیشبر *E8* .

Figure 2- Molecular analysis of *E8* promoter in pTZ57R/T cloning vector. A: PCR analysis of bacterial colony containing the product of pTZ57R/T+ *E8* ligation for the presence of 1100 bp *E8* promoter. B: Enzymatic digestion of the recombinant plasmid using *Hin*dIII and *Bam*HI. W- Negative control (water); M- DNA molecular weight marker 1 kb ladder; 1, 2- Two sample plasmids from two bacterial colony.

به همین دلیل، سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دایمی دارای مزایای فراوانی هستند که از آن جمله می‌توان به عدم نیاز به باززایی گیاه از سلول‌های تراریخته و کاهش زمان رسیدن به نتیجه بیان ژن اشاره نمود. بنابراین، سیستم های بیان موقت ژن ابزاری سریع و کارا برای بررسی و مقایسه فعالیت پیشبرهای مختلف در گیاهان بوده و کاربرد گسترده‌ای در زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی دارند (Agius *et al.*, 2005; Orzaez *et al.*, 2006; Zhao & Zhao, 2009).

نتایج حاصل از آزمایش بیان موقت پیشبر در میوه گوجه‌فرنگی در محلول رنگ آمیزی X-Gluc نشان داد که پیشبر *E8* همانند پیشبر *CaMV35S* باعث بیان ژن *gus* در میوه گوجه‌فرنگی شده است. این امر ضمن اینکه کارایی و فعالیت پیشبر *E8* را نشان می‌دهد حاکی از موفقیت روش اگروایفیلتریشن برای میوه گوجه‌فرنگی می‌باشد. رنگ آبی بافت‌ها نشان داد که پیشبرها باعث بیان ژن *gus* شده‌اند. عدم رنگ آمیزی نمونه‌های کنترل تاکیدی بر

صحت بیان ژن و عدم تاثیرپذیری نتایج از عوامل محیطی و جانبی می‌باشد (شکل 6).

>emb|X13437.1| Tomato ethylene-responsive fruit ripening gene E8
Length=3042;Score = 1766 bits (956), Expect = 0.0;Identities = 977/998 (98%), Gaps = 0/998 (0%;Strand=Plus/Plus

Query 38 **AATTTCACGAAAT**CGGCCCTTATTCaaaaataacttttaaataatgaattttaaatttta 97
Sbjct 9 AATTTCACGAAATCGGCCCTTATTCAAAAATAACTTTTAAATAATGAATTTTAAATTTTA 68
Query 98 agaaataatatccaatgaataaatGACANGTAGCATTTTACCTAAATATTTCAACTATTT 157
Sbjct 69 AGAAATAATATCCAATGAATAAATGACATGTAGCATTTTACCTAAATATTTCAACTATTT 128
Query 158 TAATCCAATATTAATTTGTTTTATTCCCAACAATAGAAAGTCTTGTGCAGACATTTAATC 217
Sbjct 129 TAATCCAATATTAATTTGTTTTATTCCCAACAATAGAAAGTCTTGTGCAGACATTTAATC 188
Query 218 TGACTTTTCCAGTACTAAATATTAATTTTCTGAAGATTTTCGGGTTTAGTCCACAAGTTT 277
Sbjct 189 TGACTTTTCCAGTACTAAATATTAATTTTCTGAAGATTTTCGGGTTTAGTCCACAAGTTT 248
Query 278 TAGTGAGAAGTTTTGCTCAAAATTTTAGGTGAGAAGGTTTGATATTTATCTTTTGTTAAA 337
Sbjct 249 TAGTGAGAAGTTTTGCTCAAAATTTTAGGTGAGAAGGTTTGATATTTATCTTTTGTTAAA 308
Query 338 TTAATTTATCTAGGTGACTATTATTTATTTAAGTAGAAATTCATATCATTACTTTTGCCA 397
Sbjct 309 TTAATTTATCTAGGTGACTATTATTTATTTAAGTAGAAATTCATATCATTACTTTTGCCA 368
Query 398 ACTTGTAGTCATAATAGGAGTAGGTGTATATGATGAAGGAATAAACAAGTTCAGTGAAGT 457
Sbjct 369 ACTTGTAGTCATAATAGGAGTAGGTGTATATGATGAAGGAATAAACAAGTTCAGTGAAGT 428
Query 458 GATTAAAATAAAATATAATTTAGGTGTACATCAAATAAAAACCTTAAAGTTTAGAAAGGC 517
Sbjct 429 GATTAAAATAAAATATAATTTAGGTGTACATCAAATAAAAACCTTAAAGTTTAGAAAGGC 488
Query 518 ACCGAATAATTTTGCATAGAAGATATTAGTAAATTTATAAAAATAAAAGAAATGTAGTTG 577
Sbjct 489 ACCGAATAATTTTGCATAGAAGATATTAGTAAATTTATAAAAATAAAAGAAATGTAGTTG 548
Query 578 TCAAGTTGTCTTCttttttttGGATAAAAATAGCAGTTGGCTTATGTCATTCTTTTACAA 637
Sbjct 549 TCAAGTTGTCTTCTTTTTTTTGGATAAAAATAGCAGTTGGCTTATGTCATTCTTTTACAA 608
Query 638 CCTCCATGCCACTTGTCCAATTGTTGACACTTAACTAATTAGTTTGATTCATGTATGAAT 697

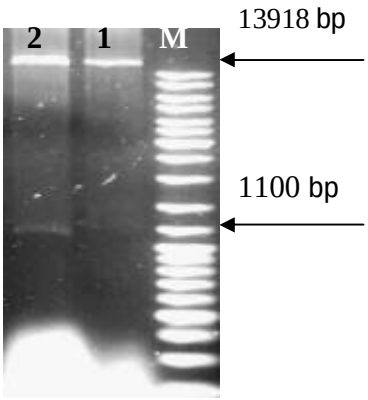
```
Sbjct 609
CCTCCATGCCACTTGTCCAATTGTTGACACTTAACTAATTAGTTTGATTCATGTATGAAT 668
Query 698
ACTAAATAATTTTTTAGGACTGACTCAAATATTTTTATATTATCATAGTAATATTTATCT 757
Sbjct 669
ACTAAATAATTTTTTAGGACTGACTCAAATATTTTTATATTATCATAGTAATATTTATCT 728
Query 758
AATTTTTAGGACCACTTATTACTAAATAATAAATTAACTACTACTATATTATTGTTGTGA 817
Sbjct 729
AATTTTTAGGACCACTTATTACTAAATAATAAATTAACTACTACTATATTATTGTTGTGA 788
Query 818
AACAACAACGTTTTGGTTGTTATGATGAAACGTACACTATATCAGTATGAAAAATTCAAA
877
Sbjct 789
AACAACAACGTTTTGGTTGTTATGATGAAACGTACACTATATCAGTATGAAAAATTCAAA
848
Query 878
ACGATTAGTATAAATTATATTGAAAATTTGATATTTTTCTATTCTTAATCAGACGTATTG 937
Sbjct 849
ACGATTAGTATAAATTATATTGAAAATTTGATATTTTTCTATTCTTAATCAGACGTATTG 908
Query 938
GGTTTCATATTTTAAAANNGGACTAAACTTanaannnnaGTTNGTTTNNAACTANTTTTG 997
Sbjct 909
GGTTTCATATTTTAAAAAGGGACTAAACTTAGAAGAGAAGTTTGTTTGAAACTACTTTTG 968
Query 998  NCTCTTTNNNGTTCCCATTTCNNNNNTAGATTTCaaaa 1035
Sbjct 969  TCTCTTTCTTGTTCCCATTTCTCTCTTAGATTTCAAAA 1006
```

شکل3- قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده *E8* ، توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه *E8*است و توالی دوم مربوط به توالی شماره دسترسی AF515784 است.

Figure 3- Blast on the sequenced *E8* promoter. Query is the *E8* promoter isolated from tomato plant; subject is the sequence of accession number AF515784.

بیان موقت ژن تجزیه‌کننده آفت‌کش ارگانوفسفری (*opd*) تحت کنترل پیشبر *E8* در گیاه گوجه فرنگی با روش اگروواینفیلتریشن منجر به بیان اختصاصی آن در میوه‌های این گیاه شد (Zhao & Zhao, 2009). در این پژوهش محققان هچنین موفق شدند با همان روش ژن *gus* را تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* در میوه‌های گوجه فرنگی بیان کنند. در پژوهشی Orzaez *et al.* (2006) بیان موقت را برای آنالیز عملکرد ژن در میوه گوجه-فرنگی توسعه داده و مشخص کردند که تزریق سوسپانسیون اگروباکتریوم با استفاده از سوزن سرنگ (اگروواینجکشن) منجر به نفوذ بهتر باکتری در میوه می‌شود. بیان دایمی ژن *gus* تحت کنترل پیشبر *E8* 2/2 bp در گیاه گوجه فرنگی نشان داد

که بیان ژن *gus* در میوه‌های نارس تنها در سلول-های پارانشیم آوندی میوه‌ها صورت می‌گیرد در حالی که در میوه‌های رسیده گوجه فرنگی، کل میوه ژن *gus* را بیان می‌کند (Kniessl & Deikman, 1996). در پژوهش حاضر بجای قطعه 2/2 kb پیشبر *E8* از قطعه 1/1 bp آن استفاده شد. نتایج نشان داد که قطعه پیشبری مورد استفاده هم می-تواند بیان ژن *gus* را در میوه‌های رسیده القا نماید.

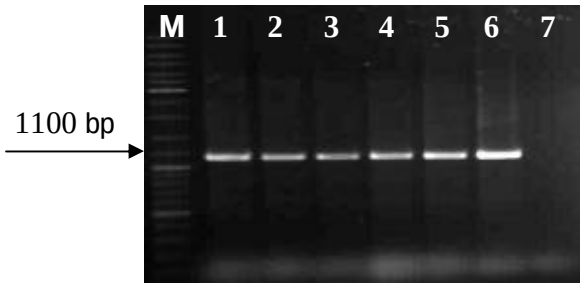


شکل 4- هضم آنزیمی پلاسمید های نوترکیب pBI-E8-GUS به منظور تایید ورود پیشبر *E8* . M- نشانگر اندازه مولکولی 1 kb ladder؛ 1 و 2- هضم آنزیمی دو نمونه پلاسمید pBI-E8-GUS با دو آنزیم *Hind*III و *Bam*HI.

Figure 4- Enzymatic digestion of pBI-E8-GUS. M-DNA molecular weight marker 1kb ladder; 1,2- Plasmid digested with *Hid*III and *Bam*HI

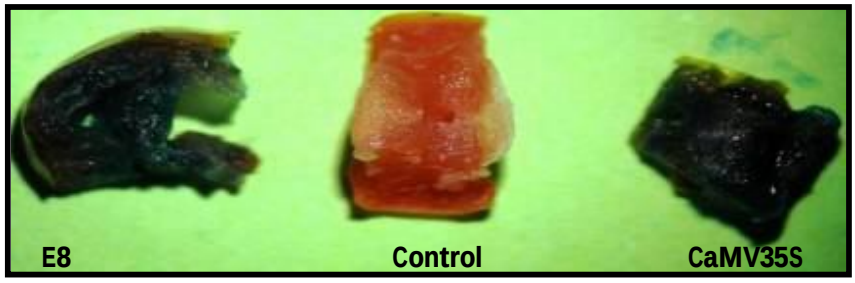
در پژوهش هایی Zhou *et al.* (2003) و نیز Wang *et al.* (2003) پیشبر *E8* را همسانه سازی و توالی‌یابی کردند. آنها نشان دادند که امکان استفاده از این پیشبر در تولید واکسن خوراکی در گوجه‌فرنگی تراریخته و همچنین هلوی تراریخته وجود دارد.(2007) He *et al.* پیشبر *E8* ویژه میوه گوجه‌فرنگی را در بیان آنتی‌ژن واکسن ارزیابی کردند. آنها پیشبر 1/1 kb و 2/2 kb را از *Lycopersicon esculentum* cv. Jinfeng جدا و توالی‌یابی کردند. پیشبر *E8* و پیشبر *CaMV35S* را به ژن HBsAg متصل و به *Nicotiana tabacum* منتقل نمودند. بیان ژن *HBsAg* تحت کنترل پیشبر 1/1 kb، *E8* در بافتهای برگ، گل، دانه توتون مشاهده نشد ولی تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* در توتون تراریخته بیان شدند. با سنجش الایزا ثابت شد که پیشبر 1/1 kb، *E8* قادر به بیان ژن خارجی در میوه‌های رسیده گوجه‌فرنگی تراریخته می‌باشد و در برگ، گل و میوه نارس بیان نمی‌شود. نتایج نشان داد که این پیشبر نه تنها در اندام ویژه، بلکه در گونه‌های خاصی هم عمل می‌کند. همانند

گزارش ارائه شده توسط Jiang *et al.* (2007)، نتایج این پژوهش هم نشان داد که قطعه 1/1 kb پیشبر *E8* هم می‌تواند بیان هدفمند ژن در میوه گوجه فرنگی را سبب شود. بنظر می‌رسد که بقیه بخش‌های پیشبر 2/2 کیلو بازی شاید برای افزایش بیان ژن ضروری باشند (Deikman *et al.*, 1998). بنابراین، از این پیشبرمی‌توان برای تولید هدفمند پروتئین‌ها و واکسن‌های نوترکیب در گوجه فرنگی استفاده کرد.



شکل 5- تایید انتقال پلاسمید نوترکیب pBI-E8-GUS به *A. tumefaciens* سویه LBA4404 با استفاده از PCR. 1 - نشانگر اندازه مولکولی 1 kb ladder، 2-7- کلونی‌های حاوی سازه نوترکیب pBI1-E8-GUS و مشاهده باند 1100 bp 8- کنترل منفی (آب).

Figure 5- PCR analysis of *A. tumefaciencs* LBA4404 containing pBI-E8-GUS recombinant vector using E8 primers. 1- DNA Molecular weight marker 1 kb ladder; 2-7- Different agrobacterial colony containing pBI-E8-GUS. 8- Negative control (water).



شکل 6- بیان موقت ژن *gus* با استفاده از اگروواینفیلتریشن برای پیشبرهای *E8* و *CaMV35S* و اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب (کنترل).

Figure 6- Transient expression of *gus* gene under the control of *E8* and *CaMV35S* promoter using Agroinfilteration system. Control- agroinfilteration using agrobacterium free from plasmids

منابع

Agius F, Amaya I, Botella MA, Valpuesta V (2005). Functional analysis of homologus and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. Journal of Experimental Botany 56: 37-46.

Coupe SA, Deikman J (1997). Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 50 flanking regions of two fruit-ripning genes. Plant Journal 11: 1207–1218.

Deikman J, Kline R, Fischer RL (1992). Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Physiology 100: 2013–7.

Deikman J, Xu R, Kneissl ML, Ciardi JA, Kim KN, Pelah D (1998). Separation of *cis* elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 50 flanking region of the ripeningrelated *E8* gene. Plant Molecular Biology 37: 1001–1011.

Deikman J, Fischer RL (1988). Interaction of a DNA binding factor with the 5'-fl anking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato; EMBO Journal 7: 3315–3320.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprepration: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

Garza RD, Quinlivan EP, Klaus SMJ, Basset GJC, Gregory JF, Hanson AD (2004). Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis; Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 101 13720–13725.

Giovannoni J, DellaPenna D, Bennett AB, Fischer RL (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. Plant Cell 1: 53–63.

Good X, Kellogg JA, Wagoner W, Langhoff D, Matsumura W, Bestwick RK (1994). Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. Plant Molecular Biology 26: 781–790.

He ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ (2007). Assessment of the utility of the tomato fruit-specifi c E8 promoter for driving vaccine antigen expression; Genetica 133: 207–214.

Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK (2002). Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. Transgenic Research 11: 447–454.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal 6: 3901-3907.

Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu SY (2007). Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. Transgenic Research 16:169–75.

Kneissl ML, Deikman J (1996). The tomato *E8* gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers; Plant Physiology 112: 537–547.

Larrick JW, Thomas DW (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. Current Opinion in Biotechnology 12: 411–418.

Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam KH, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. Plant Physiology 127: 1256–1265.

Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL (1987). Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit ripening. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 84: 2793–2797.

Lincoln JE, Fischer RL (1988). Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. Molecular and General Genetic 212**:** 71–75.

Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK, Mattoo AK (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life; Nature Biotechnology 20**:** 613–618.

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

Penarrubia L, Aguilar M, Margossian L, Fischer RL (1992). An antisense gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening; Plant Cell 4: 681–687.

Prescott AG (1993) A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet. Journal of Experimental Botany 44: 849–861.

Ramirez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Lim MAG (2007). Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. Clinical and Vaccine Immunology 14: 685–92.

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

Schillberg S, RTwyman RM, Fischer R (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants- technology assessment. Vaccine 23: 1764-1769.

Wang J, Oard JH (2003). Rice Ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. Plant Cell Reports 22: 129–34.

Zhao L, Lu L, Zhang L, Wang A, Wang N, Liang Z, Lu X, Tang K (2009). Molecular evolution of *E8* promoter in tomato and some of its relative wild species. Journal of Biosciences 34: 71-83.

Zhou XH, Chen XG, Zhang XD., Wang YN, Li L, Xi JF, Hu JJ (2003). Cloning and sequence analysis of tomato fruit-specific *E8* promoter from *Lycopersicon esculentum* (Zhongshu No.5). Biological sciences 23: 25-8.

Zhao JH, Zhao DG (2009). Transient expression of organophosphorus hydrolase to enhance the degrading activity of tomato fruit on coumaphos. Journal of Zhejiang University Science B 10:142-146.

Cloning of tomato *E8* promoter and its analysis in transient assays using Agro-infilteration system

Ahmadi N.[1], Rahnama H.[*2], Kazemi Tabar S.K.[3]

[1] MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of agriculture and natural resources of Sari
[2] Assistant Professor, Department of Plant tissue culture and gene transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Karaj, Iran
[3]Assistant Professor, Department of agronomy and plant breeding, Faculty of agriculture and natural Resources of Sari.

Abstract

Isolation and characterization of fruit specific promoters is important for manipulation and targeted expression of recombinant proteins in plants. *E8* is a fruit specific promoter with 2.2 kb length. In this study, a 1.1 kb core part of *E8* promoter was used. The amplification of the *E8* promoter was conducted using specific primers and *pfu* polymerase by Polymerase Chain Reaction (PCR). After sequencing of *E8* promoter for its confirmation, the CaMV35S promoter in pBI121 binary vector replaced by *E8* promoter. The recombinant plasmid pBI-E8-GUS was transfered to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by using freeze-thaw method. The specific expression of *gus* gene in tomato tissue was evaluated using Agro-infiltration method. *Agrobacterium* harboring pBI121 was used as control. The results showed that *gus* gene can express specifically in tomato fruits under the control of *E8* promoter. Therefore, *E8* promoter can be used for tissue specific expression of recombinant protein in the fruit of tomato plants.

Key words: Agro-infiltration, *E8* promoter, Tissue specific, Tomato, Transient expression,

[*] Corresponding Author: Rahnama H. Tel: 026-32703536 Email: hrahnama@abrii.ac.ir