

ساخت پروموتر مصنوعی حامل توالی GTCA

فرهاد شکوهی فر^۱، ناهید عباسپور^۲، نیره سادات غفاریان نیا^۳

۱: عضو هیات علمی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد،

۲: فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه بین المللی قزوین

۳: فارغ التحصیل کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Shokouhifar@um.ac.ir

ظهور و توسعه استراتژی ساخت پروموتورهای مصنوعی دورنمای امیدبخشی را برای تنظیم هدفمند بیان تراژن فراهم آورده است. عناصر کنشی نقش کلیدی را در پروموتورهای القایی ایفا می نمایند و انتخاب آنها یکی از مراحل مهم در ساخت پروموتورهای مصنوعی القایی بشمار می رود. توالی GTCA بعنوان یک توالی هسته ای در ساختار چند پروموتور پاسخده سریع به پاتوژن مشاهده شده است. در این مطالعه توالی هسته ای GTCA بمنظور ساخت یک پروموتور مصنوعی پاسخده به پاتوژن بکار گرفته شد. بدین منظور با استفاده از تکنیک پرایمر دنباله دار توالی هسته GTCA در بالادست قطعه حامل توالی حداقل پروموتوری و ژن گزارشگر GUS کلون گردید. وکتور pBFGi بعنوان الگو جهت تکثیر قطعه مورد نظر بوسیله پرایمرها PSh40-F/R استفاده شد. قطعه تکثیر شده پس از هضم محصول PCR با استفاده از جایگاه آنزیم های *SpeI* و *SnaBI* طی مراحل کلونینگ بجای قطعه معادل خود در وکتور جایگزین و سازه pBFGi ساخته شد. کلنی های نو ترکیب با پرایمرهای PSh40-F و PSh4-R تایید شد. در نهایت صحت توالی GTCA و موقعیت صحیح آن با توالی یابی مشخص گردید. پروموتور ساخته شده بنام SP-F نامگذاری شد و در مطالعات آتی عملکرد آن مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

واژگان کلیدی: پروموتور مصنوعی، عناصر کنشی، هسته GTCA، پروموتور القایی

مقدمه

چگونگی تنظیم بیان تراژن یکی از مراحل مهم و تاثیر گذار در موفقیت برنامه های انتقال ژن بشمار می رود. بروز و توسعه تکنولوژی ساخت پروموتورهای مصنوعی امکان مدیریت هدفمند بیان تراژن را مهیا نموده است.

شناسایی و بررسی عملکرد عناصر کنشی پاسخده به پاتوژن ها بعنوان اجزاء سازنده اولیه جهت ساخت پروموتورهای مصنوعی ضروری است. همچنین در ساخت پروموتورهای مصنوعی مواردی از جمله استفاده از توالی حداقل پروموتوری مناسب، قراردادن توالی های کنشی در فاصله مناسب نسبت به توالی TATA Box که در مقالات مروری متعددی (۸، ۱۰-۱۱) اشاره شده است ضروری است.

طی سال های گذشته عناصر کنشی پاسخده به عواملی مانند کیتین، زخم، سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید، پاتوژن های نکروتروف، بیوتروف شناسایی و گزارش شده اند (۵-۷، ۹). در این بین عناصر پاسخده به پاتوژن ها که قادرند بصورت فوق العاده سریع در محل تنش اسپورهای قارچ فعال شوند بنام عناصر F و E17 گزارش شده اند (۱ و ۵). مطالعات انجام شده به شناسایی توالی های هسته ای در این عناصر منتج شده است که از نظر تعداد و موقعیت قرار گرفتن با یکدیگر شباهت ها و تفاوت هایی دارند (۱ و ۶).

نتایج این مطالعات نشان داده است در توالی عنصر کنشی F سه هسته با توالی GTCA قرار دارد که دو هسته تنها با دو نوکلئوتید از یکدیگر مجزا شده اند و هسته سوم در فاصله بیست نوکلئوتیدی از هسته دوم قرار گرفته است. مطالعات گذشته نشان داده است که حضور هسته های F در نحوه عملکرد پروموتور تاثیر گذار است (۱). بررسی ها نشان داده است توالی عنصر کنشی F با عنصر کنشی دیگری بنام E17 از نظر حضور توالی های هسته ای GTCA قابل مقایسه هستند. گزارش های ارائه شده در خصوص توالی عنصر E17 نشان داده است که این عنصر دارای دو نسخه از توالی هسته GTCA است که در فاصله سه نوکلئوتیدی از یکدیگر قرار گرفته اند (۵). در دو مطالعه مجزا نشان داده شده است پروموتورهای مصنوعی در برگیرنده این توالی ها در گیاه آرابیدوسیس و کلزا الگوی بیانی متفاوتی را در پاسخ به تنش ها و عوامل محرک سیستم دفاعی نشان می دهند (۳ و ۶). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که دو توالی کامل عنصر کنشی F در پشت سر هم قادرند ضمن بروز واکنش اختصاصی در مقابل بیمارگر نکروتروف اسکروتینیا در بافت های مختلف گیاه کلزا از جمله گل، ساقه و برگ، ژن گزارشگر GUS را بیان نماید (۲).

هرچند تعداد نسخه از توالی هسته ای GTCA می تواند دلیلی بر واکنش متفاوت توالی های پروموتوری حامل آنها در پاسخ به عوامل محرک بشمار آید ولی وجود توالی های حد واسط متفاوت نیز میتواند در بروز این تفاوت ها مؤثر باشد. این نکته توسط محققان دیگر نیز مورد توجه قرار گرفته است (۱) ولی تا کنون آزمایشی جهت پاسخگویی به این سؤال انجام نشده است. در صورتیکه بتوان واکنش توالی هسته ای GTCA را بطور مجزا در ساختار یک پروموتور مصنوعی قرار داد امکان بررسی اثر آن مهیا خواهد شد. از آنجا که واکنش اختصاصی این عنصر در پاسخ به پاتوژن های نکروتروف قبلا گزارش شده است انتظار می رود پروموتور مصنوعی حاوی این عنصر در پاسخ به دیگر پاتوژن های نکروتروف مانند قارچ *Ascochyta rabiei* که یکی از عوامل مخرب در حبوبات بشمار می رود نیز کاربرد داشته باشد.

لذا این مطالعه بمنظور ساخت پروموتور مصنوعی حامل یک نسخه از توالی GTCA انجام شد تا در مراحل بعدی عملکرد این توالی تنظیمی در واکنش به محرک های مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

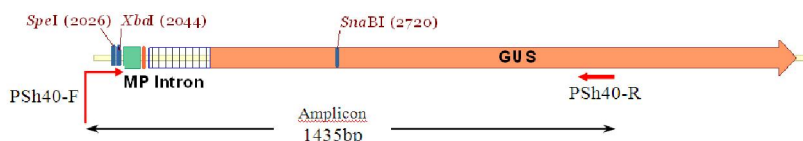
پرایمرهای مناسب جهت تکثیر توالی هسته GTCA در بالادست قطعه حامل توالی حداقل پروموتوری و ژن گزارشگر GUS با استفاده از نرم افزار VectorNTI,11 طراحی گردید.

واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتری و شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی به همراه ۲۵ میلی مولار، ۱۰ میلی مولار، ۱۰x PCR Buffer، یک واحد از آنزیم Taq پلیمرز (PrimeTM Taq DNA polymerase, GeNetBio, South Korea) و ۵ پیکومول از آغازگرهای PSh40f/r (سنتز شده توسط SBS Genetech Co., Beijing's, China) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf mastercycler gradient, germany) و با برنامه حرارتی ۴ دقیقه در ۹۳ درجه سانتیگراد و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد) و مرحله تکثیر نهایی با پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد. قطعه تکثیر شده ی هدف ابتدا در وکتور pTG19 با استفاده از کیت cloning pTG19-T vector (Vivantis, Malaysia) کلون گردید و روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.

استخراج پلاسمید از کلنی های نوترکیب بوسیله کیت (Plasmid extraction kit, BIONEER, South Korea) صورت گرفت. هضم آنزیمی سازه pTFGi و وکتور pBFGi با استفاده از آنزیم های *SpeI* و *XbaI* (Fermentas Life Sciences, Canada) انجام شد. قطعات هضم شده با استفاده از کیت (gel purification kit, BIONEER, South Korea) خالص سازی شد و پس از انجام لاگیشن به سلول های مستعد DH5 α ترانسفورم شد. به منظور تأیید سازه pTFGi پرایمرهای یونیورسال M13 و جهت تأیید سازه pBFGi پرایمرهای اختصاصی PSh40f/4r با استفاده از روش کلنی PCR به کار برده شد. داده های حاصل از توالی یابی با استفاده از برنامه SegMan در بسته نرم افزاری DNA Star مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث

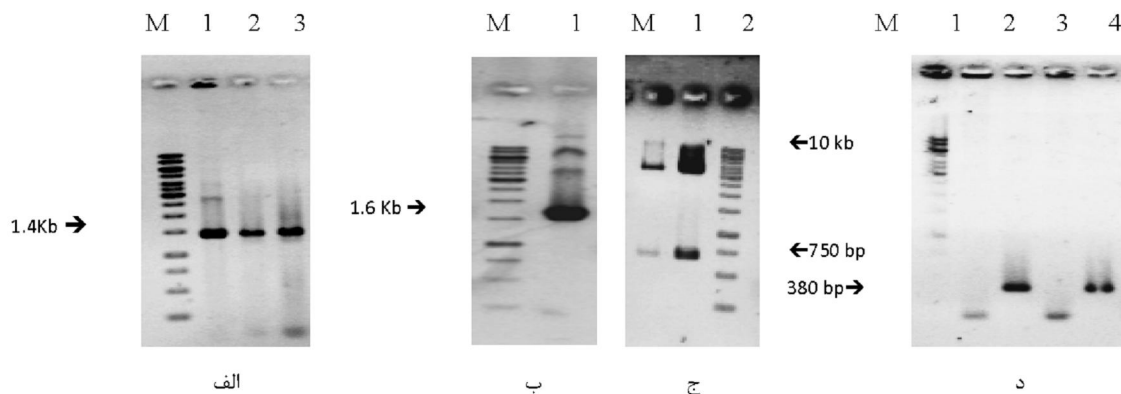
طراحی پرایمر و تکثیر توالی: بمنظور ساخت پروموتور مصنوعی حامل توالی هسته GTCA و قرار دادن آن در موقعیت مناسب در بالادست توالی حداقل پروموتوری از تکنیک پرایمر دنباله دار استفاده شد. از وکتور pBFGi بعنوان DNA الگو استفاده شد و پرایمر PSh40-F بگونه ای طراحی شد تا توالی هسته GTCA در فاصله ۲۰ نوکلئوتیدی از توالی TATA Box قرار گیرد. همچنین بمنظور انجام مراحل بعدی کلونینگ دو جایگاه *SpeI* و *XbaI* به ترتیب در بالادست و پائین دست توالی هسته GTCA لحاظ گردید (شکل ۱). از آنجا که در مراحل بعدی جهت آنالیز عملکرد پروموتور ژن گزارشگر مناسب مورد نیاز خواهد بود پرایمر PSh40-R در داخل ژن گزارشگر GUS واجد اینترون و در پائین دست جایگاه آنزیمی *SnaBI* طراحی شد (شکل ۱).



شکل ۱: نمای شماتیک بخشی از وکتور pBFGi {Shokouhifar, 2009 #13} استفاده شده بعنوان DNA الگو. شکل نشان دهنده موقعیت ژن گزارشگر بتا گلوکونیداز واجد اینترون (GUS)، توالی پروموتور حداقل (MP)، محل اتصال آغازگرهای PSh40-F/R و جایگاه آنزیم های برشی مورد استفاده در مراحل کلونینگ.

انجام PCR با استفاده از پرایمرهای PSh40-F/R تک باندی را در اندازه حدود ۱.۵ کیلوباز از وکتور pBFGi تکثیر نمود (شکل ۲-الف) که با اندازه مورد انتظار (۱۴۳۵ جفت باز) انطباق داشت. بمنظور بررسی صحت قطعه تکثیر شده و تایید توالی GTCA قطعه تکثیر شده پس از خالص سازی از ژل در وکتور pTG19 کلون گردید. غربال کلنی های بدست آمده با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 به تکثیر باندی به اندازه ۱.۶ کیلوباز در کلنی های مثبت منتج شد. کلنی های کاندید حامل سازه نوترکیب به نام pTFGi انتخاب گردید (شکل ۲-ب).

سازه pTFGi به همراه وکتور pBFGi با استفاده از آنزیم های *SpeI/SnaBI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. تولید قطعات با طول های 3.5kb و 700bp در سازه pTFGi و قطعات 4kb و 700bp در وکتور pBFGi تأیید کننده صحت هضم آنزیمی انجام شده بود (شکل ۲-ج). به منظور ساخت سازه pBFGi، قطعه 700bp از سازه pTFGi و قطعه از وکتور pBFGi از روی ژل جدا و خالص سازی شد. غربال کلنی های بدست آمده با پرایمر های psh40f/psh4r و تولید باند 380bp ساخت سازه pBFGi را تأیید نمود (شکل ۲-د). آنالیز توالی یابی انجام شده نیز ساخت سازه جدید را تأیید نمود.



شکل ۲: (الف) الگوی الکتروفورزی نشان دهنده تکثیر قطعه با استفاده از پرایمرهای دنباله دار PSh40-F/R، (ب) نتیجه کلنی PCR جهت تایید سازه نو ترکیب pTFGi با استفاده از پرایمرهای M13، (ج) شکل ۳: الف: هضم سازه pTGF و وکتور pBFGi با آنزیم های SpeI/SnaB1؛ د: کلنی PCR با آغازگرهای psh40f/psh4r جهت تایید سازه نو ترکیب pBFGi

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم را جهت اجرای این تحقیق مهیا نمودند، صمیمانه تشکر می نمایم. بودجه این تحقیق از محل طرح شماره ۱۵۲۸۵ مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است.

منابع

1. Bao Z., Duvick J.P., Hu X., Lu G. (2003) Sclerotinia-inducible promoters and their uses, Google Patents.
2. Gurr S.J., Rushton P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: How are we going to express it? Trends in Biotechnology 23:283-290.
3. Heise A., Lippok B., Kirsch C., Hahlbrock K. (2002) Two immediate-early pathogen-responsive members of the AtCMPG gene family in Arabidopsis thaliana and the W-box-containing elicitor-response element of AtCMPG1. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:9049.
4. Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E., Hahlbrock K. (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in Petroselinum crispum. The Plant Journal 26:217-227.
5. Mazarei M., Teplova I., Hajimorad M.R., Stewart C.N. (2008) Pathogen phytoensing: plants to report plant pathogens. Sensors 8:2628-2641.
6. Mehrotra R., Gupta G., Sethi R., Bhalothia P., Kumar N., Mehrotra S. (2011) Designer promoter: an artwork of cis engineering. Plant molecular biology 75:527-536.
7. Rushton P.J., Reinstädler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I.E. (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. The Plant Cell Online 14:749-762.
8. Shokouhifar F. (2009) Construction and functional analysis of pathogen inducible promoters in canola, Biotechnology, National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, Tehran. pp. 204.
9. Shokouhifar F., Zamani M.R., Motallebi M. (2011a) Expression pattern of the synthetic pathogen-inducible promoter (SynP-FF) in the transgenic canola in response to Sclerotinia sclerotiorum. Iranian Journal of Biotechnology 9. ouhifar F., Zamani M., Motallebi M., Mousavi A., Malboobi M. (2011b) Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in Brassica napus. Biologia Plantarum 55:689-695
10. Shok. Venter M., Botha F. (2010) Synthetic promoter engineering. Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives:393-414.