

جداسازی و تعیین خصوصیات پروموتور ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز در

ریحان

Isolation and characterization of cinnamate- 4-hydroxylase gene promoter in *Ocimum basilicum* L.

رویا کریمی گویجه لو^۱، بابک عبدللهی مندولکانی^{*۱}

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Karimi Goyjelo R¹, Abdollahi Mandoulakani B^{*1}

1- MSc Student of Plant Breeding, Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۹/۰۸/۹۹ - تاریخ پذیرش: ۲۳/۰۶/۱۴۰۰)

چکیده

اسانس ریحان (*Ocimum basilicum* L.) سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوییدی مانند فنیل سینامات، متیل چاویکول، متیل اوژنول و اوژنول می‌باشد. در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها ژن‌های کلیدی مهمی از جمله سینامات-۴-هیدروکسیلاز دخالت دارد. امروزه با توجه به اهمیت پروموتور در دستکاری‌های ژنتیکی، انتقال ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، آگاهی از توالی پروموتور و عناصر تشکیل‌دهنده آن ضروری می‌باشد. بنابراین در این تحقیق با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نامتقارن دمایی (Thermal asymmetric interlaced PCR) توالی ناحیه بالادست ژن سینامات-۴-هیدروکسیلاز در گیاه ریحان شناسایی شد. در این تحقیق از دو نوع آغازگر که از نظر طول و دمای اتصال باهم متفاوت هستند استفاده شد تا توالی هدف تکثیر شود. آغازگرهای نوع اول اختصاصی با دمای اتصال بالا و دارای سه توالی متفاوت بود. آغازگرهای نوع دوم اختیاری (شش عدد) با طول کوتاه و دمای اتصال پایین بود. واکنش‌های TAIL-PCR در سه مرحله صورت گرفت که در مرحله دوم و سوم به ترتیب از فرآورده‌های رقیق شده مراحل اول و دوم به‌عنوان DNA الکو استفاده شد. بعد از الکتروفورز محصولات PCR و شناسایی باند مورد نظر، قطعه مورد نظر از ژل آگارز استخراج و تلیخیص شد و توالی‌یابی آن در دو جهت انجام گرفت. آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی با استفاده از برنامه‌های PLACE، PLANT CARE، Softberry و Neural Network Promoter Prediction انجام گرفت و مشخص شد پروموتور مورد نظر ۷۹۴ جفت‌باز طول دارد. ناحیه TATA Box این پروموتور در اطراف نوکلئوتید ۳۵- و ناحیه شروع رونویسی ۱۷۰ نوکلئوتید بالا دست کدون آغاز ترجمه قرار دارد. چندین ناحیه تنظیمی عملکردی نظیر CAAT box، W box، G box و I box نیز در توالی پروموتور شناسایی شد. بنابراین پروموتور شناسایی شده (بعد از ارزیابی و تایید نهایی) می‌تواند در برنامه‌های انتقال ژن و دستکاری‌های ژنتیکی در گیاه ریحان جهت افزایش برخی متابولیت‌های با ارزش استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

پروموتور
ریحان
سینامات-۴-هیدروکسیلاز
TAIL-PCR

ریحان یک گیاه مهم دارویی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که نام علمی آن *Ocimum basillicum* L. می باشد (Ziaei et al. 2014). منشأ این گیاه هند و ایران گزارش شده است (Omidbaigi 2008). مواد مؤثره پیکر رویشی این گیاه اشتهاآور است و برای معالجه نفخ شکم و کمک به هضم غذا استفاده می شود. از این گیاه برای معالجه برخی ناراحتی های قلبی و همچنین برای مداوای بزرگ شدن طحال استفاده می شود (Omidbaigi 2008). ریحان همانند سایر گیاهان خانواده نعناع عملکرد ضد انگلی، ضد باکتری، ضد قارچی و آنتی اکسیدانتی دارد (Labra et al. 2004). اسانس ریحان شامل ترکیبات متنوع و پیچیده ای است که به دو گروه ترپنوئیدها و فینیل پروپانوئیدها تقسیم می شوند (Sangwan et al. 2001). بخش عمده اسانس گیاه ریحان شامل فینیل پروپانوئیدها می باشند که ۹۰ درصد ترکیبات اسانس را شامل می شوند. ترکیبات فنولی به میزان فراوان در همه گیاهان وجود دارند که اساس ساختاری همه آنها حلقه آروماتیک است. این ترکیبات باعث ایجاد رنگ، طعم و ویژگی های فیزیولوژیکی خاصی در گیاهان می شوند و از گیاه در برابر تنش های زیستی و غیر زیستی به خصوص علف کش ها حفاظت می کنند (Boudent 2007). ترکیبات مهم فینیل پروپانوئیدی شامل اوژنول^۱، چاویکول^۲، متیل اوژنول^۳، فینیل سینامات^۴ و ترکیبات دیگر است که به اسانس ریحان خاصیت دارویی می دهند (Achine et al. 2004). بیوستنز فینیل پروپانوئیدها از مسیر شیکیمات می گذرد و توسط یک گروه آنزیمی هدایت می شود که این آنزیم ها به صورت آزاد یا در ارتباط با غشاهای سلولی می باشند (Cochrane et al. 2004). ترکیبات فنولی از سینامیک اسید مشتق می شوند که این ترکیبات از عمل آمین زدایی توسط آنزیم فینیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) بر روی L-فینیل آلانین حاصل می شود. آنزیمی که بعد از آنزیم PAL در مسیر تولید فینیل پروپانوئیدها نقش دارد آنزیم سینامات -۴- هیدروکسیلاز (C₄H) است که عمل اصلی آن هیدروکسیله کردن سینامیک اسید و تبدیل

¹ Eugenol² Chavicol³ Methyl eugenol⁴ phenyl cinnamate

آن به P-کوماریک اسید است (Iijima et al. 2004). بسیاری از مطالعات، سینامیک اسید را به عنوان یک کانال بین آنزیم های PAL و C₄H معرفی می کنند که در نتیجه باعث تولید P-کوماریک اسید می شود که یک ماده حد واسط در مسیر بیوستنز فینیل پروپانوئیدها می باشد (Boudet 2007). P-کوماریک اسید یا توسط آنزیم P-کومارات -۳- هیدروکسیلاز (C₃H) تبدیل به کافئیک اسید می شود و در مسیر تولید اوژنول و متیل اوژنول قرار می گیرد و یا توسط آنزیم ۴-کومارات CoA لیگاز (4CL) تبدیل به P-کوماریل آلدهید می شود که در مسیر تولید چاویکول و متیل چاویکول قرار می گیرد (Ziaei et al. 2012). آنزیم های اوژنول سینتتاز ۱ (EGS1)، اوژنول O- متیل ترانسفراز (EOMT)، سینامات -۴- هیدروکسیلاز و چاویکول O- متیل ترانسفراز (CVOMT) از جمله آنزیم های مهمی هستند که نقش کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فینیل پروپانوئیدی دارند (Iijima et al. 2004). ژن C₄H نقش اساسی در بیوستنز لیگنین و سیستم دفاعی از طریق بیوستنز فلاونوئیدها دارد (Liu et al. 2009). توسعه تنظیم بیان ژن C₄H با لیگنینی شدن و محل های فعال دیگر متابولیسم فینیل پروپانوئیدها در ارتباط است. این ژن باعث تولید ترکیب فینیل سینامات در اسانس ریحان می شود و آنزیم حد واسط برای ترکیبات مهم فینیل پروپانوئیدی مانند اوژنول و متیل اوژنول می باشد (Iijima et al. 2004). با توجه به اهمیت پرموتر در بهبود کارایی سیستم های ترانسژنیک گیاهی، مطالعات گسترده ای بر روی آنها صورت می گیرد. شناسایی نواحی تنظیمی پرموتر نقش به سزایی در تنظیم بیان ژن ها دارد، بنابراین تلاش های بسیاری برای شناسایی توالی پرموتری ژن های مختلف صورت گرفته است (Choupani et al. 2015). استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور زنده این امکان را فراهم آورده که بتوان محصول مورد نظر را در بافت های اختصاصی و با هزینه کم به دست آورد. با این حال استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور دارای محدودیت هایی از جمله تولید و پایداری کم پروتئین های نوترکیب است و بیان کم ژن های خارجی در گیاهان عامل محدود کننده در مهندسی ژنتیک گیاهان است که یکی از دلایل آن فعالیت تنظیم کننده پرموترها در گیاهان می باشد. به همین دلیل شناسایی و جداسازی پرموترهای ژن های کلیدی امری ضروری برای دستکاری و افزایش بیان ژن ها

مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه نمونه‌های گیاهی جهت استخراج DNA، بذر گیاه ریحان رقم کشکنی لولو در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. از زمان جوانه‌زنی بذر تا رسیدن به مرحله ۴ تا ۸ برگی، آبیاری هر دو روز یکبار به‌صورت مرتب انجام گرفت. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ۴ تا ۸ برگی، نمونه‌برداری از برگ‌ها برای استخراج DNA به روش CTAB (De Masi et al. 2006) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. به‌منظور شناسایی ناحیه بالادست ژن *C4H* در گیاه ریحان از روش TAIL-PCR استفاده شد (Kiem et al. 2008). در ابتدا توالی ناحیه کد کننده ژن *C4H* از سایت NCBI با شماره دسترسی HM990150.1 دانلود و ذخیره شد. برای اجرای TAIL-PCR نیاز به چند آغازگر داخلی (اختصاصی) و چند آغازگر غیراختصاصی می‌باشد، بنابراین برای تکثیر ناحیه هدف سه آغازگر اختصاصی بر اساس انتهای ۵' ژن *C4H* طراحی شد. این آغازگرها به‌همراه شش آغازگر غیراختصاصی به طول ۱۰ نوکلئوتید (Kiem et al. 2008) مورد استفاده قرار گرفتند. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی از برنامه‌های Fast PCR نسخه ۶/۲ و GenRunner استفاده شد.

و به‌دنبال آن تولید محصول کافی است (Cunha et al. 2010). نتایج تجزیه پرموتر ژن متیل چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMT) در گیاه ریحان نشان داد که این توالی شامل عناصر مهم تنظیمی پاسخ‌دهنده به دمای بالا و تنش خشکی از جمله MYB، MYC و HSE می‌باشد. بنابراین افزایش بیان این ژن در سطوح بالای تنش مربوط به جایگاه‌های اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری است که در شرایط تنش خشکی موجب افزایش بیان این ژن می‌شود (Khakdan et al. 2017). همچنین در تحقیقی دیگر پرموتر ژن آمورفا ۴-۱۱-داین سینتاز (ADS) دخیل در مسیر بیوستز آرتمیزیین که فارنسیل دی فسفات را به آمورفا داین در گیاه درمنه (*Artemisia annua*) تبدیل می‌کند توسط روش TAIL-PCR جداسازی شد. سه آغازگر داخلی یا اختصاصی که بر اساس ناحیه ۵' توالی ژن ADS طراحی شده بود به‌همراه شش آغازگر تصادفی استفاده شد، پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی این توالی، گزارش شد که این پرموتر دارای موتیف‌های عملکردی پاسخ به برخی الیستورها مانند هورمون‌ها می‌باشد (Wang et al. 2008). با توجه به اهمیت پرموتر در دست‌کاری‌های ژنتیکی، انتقال ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و همین‌طور اهمیت ژن *C4H* در گیاه ریحان، آگاهی از توالی پرموتر این ژن و عناصر تشکیل‌دهنده آن ضروری می‌باشد بنابراین در تحقیق حاضر توالی پرموتر ژن *C4H* و همچنین خصوصیات و اجزای این پرموتر با روش‌های بیوانفورماتیکی تعیین شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در TAIL-PCR برای تکثیر پرموتر ژن *C4H* ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

آغازگر*	توالی (۳' → ۵')	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
TR1	TGCGGTGGTTTAGGTCATCG	55
TR2	TGGCGGCAGCTTGAACCT	55
TR3	ACGACGATGGCGGAGAAGA	55
AD1	GGTGCTCCGT	49
AD2	GTGTGCCCCA	50
AD3	ACGGTGCCTG	50
AD4	CGATGAGCCC	49
AD5	CTATCGCCGC	49
AD6	CGCAGACCTC	49

TR1, TR2, TR3: آغازگرهای اختصاصی، AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6: آغازگرهای تصادفی

با حجم برابر با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد و غلظت و مقدار اجزای واکنش مشابه TAIL-PCR دوم بود. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۲۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه بود.

برای جداسازی و تخلیص باند مورد نظر، ابتدا مقدار زیادی از محصول PCR (۶۰ میکرولیتر) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد لود و الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. بعد از اینکه باند مورد نظر به حد کافی ران شد، زیر نور UV تشخیص و برش داده شد. سپس تخلیص محصول PCR به وسیله کیت QIAquick Gel Extraction kit (کیاژن، آمریکا) انجام و برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد. توالی‌یابی در هر دو جهت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تصادفی انجام گرفت. توالی رفت و برگشت قطعه توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR ترکیب و بعد از شناسایی نقاط مشترک براساس جایگاه آغازگرهای اختصاصی و تصادفی، توالی بازسازی شده برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی استفاده شد. هم‌ردیفی توالی بازسازی شده با ژن *C₄H* جهت اطمینان از صحت باند توالی‌یابی شده انجام گرفت. بعد از اطمینان از صحت توالی، شناسایی پروموتور با استفاده از نرم‌افزارهای Softberry و Neural network promoter prediction انجام گرفت. سپس برای جستجوی موتیف‌های عملکردی مهم در توالی از نرم‌افزارهای آنالین PLANTCARE و PLACE استفاده شد.

نتایج و بحث

واکنش PCR در سه مرحله جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌عنوان برگشت و پرایمرهای تصادفی به‌عنوان رفت انجام گرفت. محصولات حاصل از تکثیر در هر واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شد. ابتدا محصول TAIL-PCR بر روی ژل آگارز به‌صورت اسمیر دیده شد که یکی از معایب این روش می‌باشد. دلیل ایجاد اسمیر در این روش طول کوتاه و غیر

در این واکنش به‌منظور تکثیر ناحیه ناشناخته، از آغازگر اختصاصی اول (TR1) به‌همراه آغازگرهای غیراختصاصی (AD) استفاده شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر آغازگر AD ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر آغازگر TR1 ۱۰ میکرومولار، ۳ میکرولیتر DNA الگو (۲۰ نانوگرم) و ۰/۲۵ واحد Taq DNA پلیمراز (سیناکلون، ایران) در دستگاه ترموسایکلر Flex Cycler (Analytikjen، آلمان) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. پس از انجام واکنش، محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز یک و نیم درصد تفکیک شد. غلظت محصول حاصل از واکنش اول به نسبت ۱:۱۰ رقیق و سه میکرولیتر از آن به‌عنوان الگو در مرحله دوم استفاده شد.

در این مرحله نیز هر یک از آغازگرهای غیراختصاصی به‌طور جداگانه با آغازگر اختصاصی دوم (TR2) استفاده شد. در این مرحله آغازگرهای غیراختصاصی با حجم یک برابر بیشتر نسبت به آغازگر اختصاصی توالی استفاده شد. غلظت و مقدار سایر اجزای واکنش مشابه TAIL-PCR اول بود. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۲۸ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۱۶ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود.

در سومین واکنش تکثیر، برای تهیه DNA الگو محصول واکنش مرحله دوم TAIL-PCR به نسبت ۱:۵ رقیق و مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله نیز هر یک از آغازگرهای غیراختصاصی به‌طور جداگانه با آغازگر اختصاصی سوم (TR3) به‌کار برده شد. در این مرحله برخلاف دو مرحله قبلی آغازگرهای غیراختصاصی

```

tgcagagcgtatgttacacacatgataagcaacacatctctcttattatctggaccacaaaatccaaataagggtggat
ggggattagggtctctctccgagggtaaaaaaagaagtttaaacgattctgataatagtagctgcccgttaaacataag
attaaagaagaaatcggccttaaacatctctcaaaagaagcagatataagtcasaatanao:ctggggaacgtatgttaafca
gggtaaaaaacagagcctctcgaatgggaaatccagctagtgaggaaaaaaagcttagacaacgtagcctcccg
accataacagttggggggaataaacctaacctccaccctctttctgattctctcaaaagcagcgttagggggggg
gaataaaccaattctctctctcattgggtggatgctctgacagctctcaatataagaggaacatcaattccatctccaaatag
ttactamaaaaaataaaattatanaa:aggggtgcaacacagttacacaatctctctctctctctcgaacgttagagctc
agcgttagaacacataataaggagtcacaaagcagcctgctcagcctcgaaaaaaataaataaatttc
    
```

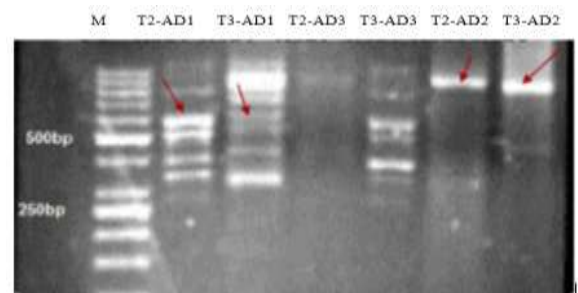
شکل ۳- توالی باند تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD1 با اندازه ۷۳۰ جفت نوکلئوتید

با توجه به اینکه آغازگر TR3، ۵۶ نوکلئوتید از ابتدای ۵' ژن *C4H* فاصله داشت بنابراین برای اطمینان از انتخاب صحیح یکی از دو قطعه توالی یابی شده، BLAST این دو توالی در برابر ناحیه بین آغازگر TR3 تا ابتدای ۵' ژن *C4H* انجام گرفت. با توجه به نتایج BLAST مشاهده شد که بین بخشی از قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 و ناحیه فوق الذکر، ۸۵ درصد شباهت وجود دارد (شکل ۴) در حالی که درصد تشابه در همین ناحیه بین قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD1 و ناحیه بین آغازگر TR3 تا ابتدای ۵' ژن *C4H*، ۶۱ درصد بود بنابراین از توالی قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 برای تشخیص پرموتر و دیگر آنالیزهای بیوانفورماتیکی استفاده شد.

اختصاصی بودن آغازگرهای تصادفی و تکثیر بیش از حد محصول است. برای رفع این مشکل و حذف اسمیر، تعداد آغازگرهای تصادفی افزایش داده شد و دمای اتصال آغازگر چرخه‌های TAIL-PCR افزایش یافت. ترکیب سه نوع آغازگر اختصاصی به همراه شش نوع آغازگر تصادفی (مجموعاً ۱۸ نوع ترکیب آغازگری) باعث تولید باندهای متعددی در چرخه‌های PCR شد که مشاهده باند حاصل از واکنش اول (TR1) به همراه آغازگرهای تصادفی) به دلیل میزان تکثیر پایین محسوس نبود. آغازگرهای اختصاصی TR2 و TR3 با فاصله ۴۵ نوکلئوتیدی از هم روی توالی ژن طراحی شده بودند و از بین ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای TAIL-PCR، محصولات حاصل از ترکیب آغازگری TR2 و TR3 با آغازگرهای غیراختصاصی AD1 و AD2 نشان‌دهنده این فاصله بودند (شکل ۱). در واقع این تفاوت ۴۵ جفت نوکلئوتیدی مشاهده شده بین باندهای حاصل از ترکیبات آغازگری مذکور نشانگر تکثیر احتمالی پرموتر مورد نظر بود بنابراین دو باند مربوط به ترکیبات آغازگری TR3-AD1 و TR3-AD2 توالی‌یابی شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۴- BLAST توالی بین آغازگر TR3 و ابتدای ۵' ژن *C4H* در برابر توالیهای قطعات تکثیری با ترکیب آغازگری TR3-AD2 (بالا) و TR3-AD1 (پایین)



شکل ۱- محصولات حاصل از مراحل دوم و سوم TAIL-PCR ناحیه ۵' ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز (*C4H*) ریحان، TR2 و TR3: آغازگرهای اختصاصی ژن، AD: آغازگر تصادفی

```

tgggaaacctogcggcggctgagccgctcggggtcgttccatgtggaacccctcgggctgtaattagatgaactgacc
gggggtgaaatgattaaagccccgaagggtcagataactgctgattgggggaattgacgcgtgacgtggtcaattc
aatcacaattgtagatgctgctcaagctatgtagtgaactgactctacgatccgcataggtatagtagtacgaggtgaaan
atgagatgtagagctgaccttagatataatgtaggggagccgctcccaagttggctgcccgaactatccatgtagcc
gcatgtamttactgaagggaaggtgaaattgctcgttacaagactctgctcgtcaatgctatattccctgacccattttctatag
ctaacgaaagcattcccaaccacaaaggtactatgataatctgtagctcacaatataaacaagctctagtagaaatttag
tgaattgastmgaaagggagaaatagattacagcaagcaaatatgctccgccaatganaaafcaaaatcaaagaac
acaaagcagagattgtagaatcaacacagctcccaagcccaactagcggcaattttcgaagggaatgpatctctctccga
gaaagccatgcccgaactctctccgcaatcgtga
    
```

شکل ۲- توالی باند تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 با اندازه ۷۹۴ جفت نوکلئوتید

بعد از انتخاب قطعه تکثیری حاوی پرموتر، از برنامه‌های آنلاین Prediction Neural Network Promoter^۱ و Softberry^۲ برای شناسایی ناحیه پرموتری استفاده شد. نتایج آنالیز با این نرم‌افزارها وجود یک پرموتر بین نوکلئوتیدهای ۵۲۶ و ۵۷۶ با احتمال ۹۳ درصد را تأیید کرد (شکل ۵). جایگاه آغاز رونویسی

¹ http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
² <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>

ناحیه با اعداد منفی نمایش داده می‌شوند. در توالی پروموتوری شناسایی شده در این تحقیق، ناحیه TATA box در منطقه ۳۵- قرار داشت و موتیف CAAT box در نواحی ۱۵۸- (رشته آنتی‌سنس)، ۳۷۹- و ۳۹۱- قرار داشت. ناحیه شروع رونویسی ۱۷۰ نوکلئوتید بالادست کدون آغاز قرار دارد. توالی بین کدون آغاز و نقطه +۱ تحت عنوان ناحیه ترجمه نشدنی ۵' (5'UTR) نامیده می‌شود که نقش مهمی در محافظت mRNA از آگزونوکلازها و نیز در شروع ترجمه بر عهده دارد.

جدول ۲- موتیف‌های مهم شناسایی شده در پروموتور ژن *C₄H* ریحان و عملکرد آن‌ها

نام موتیف	عملکرد
TATA Box	عنصر پایه ای در اغلب پروموتورهای یوکاریوتی
CAAT Box	عنصر پایه ای در اغلب پروموتورهای یوکاریوتی
G Box	توالی تنظیمی پاسخ به نور
GATA Box	عوامل پاسخ به نور
CCAAT Box	پاسخ به شوک حرارتی
ABRE	پاسخ به هورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید
I Box	پاسخ به نور
W Box	مسئول پاسخ به محرک‌های قارچی
HSE	پاسخ به شوک حرارتی
MBS	عوامل تنظیمی در زمان خشکی
DOFCOREZM	پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی

موتیف‌های TATA box و CAAT box توالی‌های کاملاً شناخته‌شده‌ای هستند که در اکثر پروموتورهای ژن‌های یوکاریوتی وجود دارند. این موتیف‌ها در شروع رونویسی نقش عمده‌ای دارند. بدین صورت که آنزیم RNA پلیمراز II از طریق فاکتور سیگمای خود توالی CAAT box را شناسایی کرده و بعد از شناسایی پروموتور توسط آنزیم، باز شدن دو رشته DNA در ناحیه TATA box صورت گرفته و بدین ترتیب کمپلکس باز رونویسی تشکیل می‌شود (Smale and Kandonaga 2003). یکی از موتیف‌های مهم که در توالی این پروموتور شناسایی شد، G box است که یک موتیف با توالی حفاظت‌شده در اکثر پروموتورهای ژن‌های گیاهی می‌باشد (Menkens et al. 1995). این توالی اولین توالی تنظیمی شناسایی شده در پاسخ به نور است. این موتیف و موتیف ABRE در شروع پاسخ به یک سری از هورمون‌های گیاهی مهم نظیر آبسزیک اسید نقش دارند. آبسزیک اسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان مهم در پاسخ به تنش‌های خشکی

که توسط این برنامه‌ها شناسایی شد ۱۷۰ نوکلئوتید بالاتر از کدون آغاز ترجمه قرار دارد (شکل ۶). این توالی همان ناحیه 5' UTR است که به پروتئین ترجمه نمی‌شود ولی نقش بسیار مهمی در پایداری و حفاظت mRNA از آگزونوکلازها و نیز شروع ترجمه بر عهده دارد.

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.90 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for seq1:

Start	End	Score	Promoter Sequence
526	576	8.93	CTCAATATATATACAAATCTCAGTAGAATATTATTAAATGATTTT

شکل ۵- آنالیز اولیه توالی قطعه حاوی پروموتور با برنامه Neural Network Promoter Prediction به منظور شناسایی پروموتور در ناحیه ۵' ژن *C₄H*

```

Tegggaaaccctcggcggcggctgagccgcacgggacggcttccaaigtggaacccctcggggcgtaattagatgaactaga
ccgggtagaataagtaaaagcccccgaagggtcagataactgatttcgctgagggggaattgacccggtgacgctgggttcaatt
tcanttcantgtgaggggtctgctcctagctnigtatgtaggactgtgacictacgatccgcgtagggatagagctacgctgtaga
aaatgagatgcagagtcctgatcctatataatgtagtggggcagccgctcctacaaagtctgccccagttctatccatgtagac
cgcattgtttactatgtaaggcacggtgaaattgctcgttacacactctgctgacggtgcatantcccttgatccacmctctata
gctaacgaaaggcattcccaccasaaagtgactatgctgattatctctgcttcccaaatatutalacacaaagctctggtgcaattarr
Agtgvtttgaaatgaaigtgaggganatagatttacttttaggafscaggcaatfatngtccggccatagaantcaasactaaga
aaccaaaagacgagagattttgtagaactataacacagtcaccaagcccccattctagcggccattcttcaggggaa-ATGgattcttcc
tctctgagaagccatgctccgcaccctctctccgcctatctgga
  
```

شکل ۶- توالی پروموتور شناسایی شده ژن *C₄H* ریحان، TR3: آغازگر اختصاصی، ATG: کدون آغاز و A: جایگاه آغاز رونویسی

در مرحله بعد برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی و شناسایی موتیف‌های عملکردی (جدول ۲) در توالی پروموتور شناسایی شده از برنامه‌های PlantCARE^۱ و PLACE^۲ استفاده شد.

هر یک از این موتیف‌ها فاکتورهای مهمی هستند که در تنظیم رونویسی و بیان ژن‌ها تحت شرایط محیطی مختلف و در پاسخ به فرآیندهای بیولوژیکی متفاوت مثل پاسخ به هورمون‌ها، فرآیندهای نموی و تنش‌های زنده و غیر زنده دخالت دارند. در سازمان‌دهی ژنی، ناحیه رونویسی در پایین دست کدون آغاز قرار دارد و عناصر تنظیمی (شامل موتیف‌های عملکردی پروموتور) در بالادست کدون آغاز قرار دارد. شماره‌گذاری نوکلئوتیدی این ناحیه بدین صورت است که اولین نوکلئوتید رونویسی شده با علامت +۱ نام‌گذاری شده و اعداد به ترتیب بعد از آن ناحیه افزایش می‌یابد. موقعیت صفر وجود ندارد و نواحی قبل از این

¹ <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>

آمینوهای حفظ شده سیستین و هیستیدین در ساختار انگشت روی قرار دارند (Yamasaki et al. 2005). توالی آمینو اسیدی WRKYGQK موجب برآمدگی سطح پروتئین شده و توانایی پروتئین را در اتصال به شیارهای DNA افزایش می‌دهد. عوامل رونویسی WRKY توالی حفاظت شده (TTGACC/T) W را به‌عنوان علامت موجود در پرموتر شناسایی کرده و موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند. ویژگی خاص عوامل رونویسی WRKY در اتصال به DNA وجود پهنه تقریباً غیرقابل تغییر WRKY در انتهای آمینی پروتئین است. این فاکتورهای رونویسی در تنظیم اعمال مختلف گیاه نقش ایفا می‌کنند. این موتیف در کنترل بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارند (Rushton et al. 2010). همچنین توالی تنظیمی MBS نیز در این پرموتر شناسایی شد که مهم‌ترین جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی نوع MYB است. فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ به تنش‌های محیطی MYB پروتئین‌هایی مشتمل بر یک، دو یا سه توالی تکراری ناقص (۵۱-۵۳ آمینو اسید) در دامنه اتصال به DNA هستند. این عوامل تنظیمی در زمان بروز تنش خشکی فعال می‌شوند و بیان ژن C_4H را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ling et al. 2005). مقایسه بین موتیف‌های عملکردی واقع در ناحیه پرموتر ژن‌های C_4H و $CVOMT$ مشخص کرد که علاوه بر دو ناحیه TATA box و CAAT box که در اغلب پرموترهای یوکاریوتی وجود دارد، سه موتیف W box، HSE و MBS بین آن‌ها مشترک بود که به ترتیب در پاسخ به محرک‌های قارچی و شوک حرارتی و عوامل تنظیمی در زمان تنش خشکی نقش دارند (khakdan et al. 2017). در نهایت بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد می‌شود عملکرد این پرموتر از طریق انتقال ژن و مهندسی ژنتیک بررسی شود. همچنین موتیف‌های تنظیمی شناسایی شده در این تحقیق با موتیف‌های شناسایی شده در پرموتر سایر ژن‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها از نظر موقعیت و تعداد مقایسه و نقش دقیق موتیف‌های عملکردی مانند W box و HSE نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

و سایر تنش‌های محیطی نقش دارد. در ریحان گزارش شد که تنش خشکی روی بیان ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C_4H) تأثیر گذاشته و آن را کاهش می‌دهد (Abdollahi Mandoulakani et al. 2017). وجود موتیف‌های تنظیمی GT1 و GATABox در پرموتر ژن C_4H که از عوامل پاسخ به نور هستند تأییدکننده اهمیت نور در افزایش بیان ژن C_4H است (Ko and Engel 1993). نور یک فاکتور ضروری برای رشد گیاهان است و نه تنها به‌عنوان یک منبع برای تولید انرژی است بلکه به‌عنوان یک محرک فرآیندهای رشدی و متابولیسمی را نیز تنظیم می‌کند. توالی تنظیمی I box که توسط برنامه Plant CARE در پرموتر ژن C_4H شناسایی شد، در بالادست ژن‌های پاسخ به نور قرار داشته و در تنظیم بیان این دسته از ژن‌ها دخالت دارد (Giuliano et al. 1988). همچنین توالی تنظیمی CCAAT box که یکی از توالی‌های مهم پاسخ به شوک حرارتی است در پرموتر ژن C_4H شناسایی شد. حضور نواحی تنظیمی HSE و CCAAT box تأییدکننده این موضوع است که بیان ژن C_4H تحت تأثیر تغییرات دمایی قرار دارد. همچنین در ریحان گزارش شد که بیان ژن C_4H در ریحان تحت تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (Rezaie et al. 2020). چندین ناحیه تنظیمی به نام DOFCOREZM نیز در توالی پرموتر شناسایی شد که محل اتصال پروتئین‌های تنظیمی DOF می‌باشد. DOF یک فاکتور رونویسی در گیاهان می‌باشد که دمین اتصال به DNA آن دارای حفاظت‌شدگی بالا و شامل سیستین C_2C_2 است که قادر به تشکیل یک حلقه به همراه اتم Zn می‌باشد. این فاکتورهای رونویسی برای اولین بار از برگ ذرت جدا شده و منحصراً در گیاهان یافت می‌شوند و نقش بسیار مهمی در متابولیسم کربن، رشد دانه یا جوانه‌زنی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد (Yanagisawa and Schmidt 1999). همچنین چندین ناحیه W box نیز در این تحقیق در پرموتر ژن C_4H مشخص شد. این ناحیه جایگاه اتصال اصلی برای فاکتورهای رونویسی متعلق به خانواده WRKY است. ساختار دمین^۱ WRKY شامل چهار صفحه بتا^۲ است که در آن‌ها اسید

¹ Domain² b- sheet

منابع

- Abdollahi Mnadoulakani B, Eyvazpour E, Ghadimzadeh M (2017) The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 139:1-7.
- Achnine L, Blancaflor E, Rasmussen S, Dixon R (2004) Colocalization of L phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 16: 90-98.
- Boude A (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:22-35.
- Chupani A, Bagheri KH, Maleki Zanjani B (2015) Isolation of the beta-phageolin promoter from *phaseolus vulgaris* and its cloning in the expression vector. *International conference on sustainable development, strategies and challenges with a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism*. Tabriz, Iran (In Farsi).
- Cochrane F, Davin L, Lewis N (2004) The arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene Family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65:57-64.
- Cunha N, Araújo A, Leite A, Murad A, Vianna G, Rech E (2010) Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. *Genetics and Molecular Research* 9:63-70.
- DE MASI L, Siviero P, Esposito C, Castaldo D, Siano, F, Laratta B (2006) Assessment of Agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology* 223:273-281.
- Giuliano G, Pichersky E, Malik V, Timko M, Scolnik P, Cashmore A (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:7089-7093.
- Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang D, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004) The biochemical and molecular basis for the divergent in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate gland of three cultivars of basil. *Plant Physiology* 136:24-36.
- Khakdan F, Shahryari F, Ranjbar M, Bagheri A, Alizadeh H (2017) Study of gene expression pattern of chavicol O-methyl transferase gene (*CVOMTs*), sequencing and characterization of promoter of *CVOMTs* gene of basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit stress. *Modern Genetics Journal* 12:1-10 (In Farsi).
- Kim S, Chang J, Kim S (2008) Tissue specificity and developmental pattern of Amorpha-4, 11-diene synthase (ADS) proved by ADS promoter-driven GUS expression in the heterologous plant, *Arabidopsis thaliana*. *Planta Medica* 74:188.
- Ko L, Engel J (1993) DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and Cellular Biology* 13:11-22.
- Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F (2004) Morphological Characterization essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science* 167:25-31.
- Liang Y, Dubos C, Dodd I, Holroyd G, Hetherington A, Campbell M (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB Transcription Factor Controlling Stomatal Aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 15:1201-1206.
- Liu S, Hu Y, Wang X, Han L, Song S, Cheng H, Lin Z (2009) Isolation and characterization of a gene encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Parthenocissus henryana*. *Molecular Biology Reports* 36:5-10.
- Menkens A, Schindler U, Cashmore A (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plant bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Science* 20:506-510.
- Omidbaigi R. Production and Processing of medicinal plants. *Astan'e Qods'e Razavi publication*. Vol 3. Tehran-Iran, 2008-397 (In Farsi).
- Rezaie, R, Abdollahi Mandoulakani B, Fattahi M (2020) Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. *Scientific Reports* 10:5290 (In Farsi).
- Rushton P, Smossich I, Ringler P, Shen Q (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15:247-258.
- Smale S, Kadonaga T (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of Biochemistry* 72:49-79.
- Sangwan N, Farooqi A, Shabih F, Sangwan R (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34:3-21.
- Telci I, Bayram E, Yılmaz G, Avc B (2006) Variability in essential oil composition of turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology* 34:89-97.
- Wang H, Olofsson L, Lundgren A, Brodelius PE (2011) Trichome-Specific Expression of Amorpha-4, 11-Diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L., as Reported by a Promoter-GUS Fusion. *American Journal of Plant Sciences* 2:619-628.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama Sh (2005) Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *Plant Cell* 17:44-56.
- Yanagisawa S, Schmidt R (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal* 17:9-14.
- Ziaei M, Sharifi M, Tahsili J, NaghdiBadi H (2014) Review of Basil with emphasis on the major secondary compounds the major secondary compounds (*Ocimum basilicum* L.) and characteristics of agricultural and pharmaceutical. *Journal of Medicinal Plants* 52:26-40 (In Farsi).
- Ziaei M, Sharifi M, Behmanesh M, Razavi K (2012) Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. *Iranian Journal Biotechnology* 10:32-39.