



همساز سازی و بررسی روابط تکاملی یک آنزیم اکسیدو ردوکتاز در مسیر تولید هورمون اتیلن

زهره جعفری^۱، رحیم حداد^{۲*}، رامین حسینی^۲، قاسمعلی گروسی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین.

^۲ اعضاء هیات علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۲

چکیده

آنزیم ۱- آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوسیلکلیک اسید اکسیداز (ACO) عضوی از خانواده اکسیدو ردوکتازهای وابسته به آهن II بوده و برای فعالیت خود به Fe^{2+} به عنوان کوفاکتور و آسکوربات به عنوان سوبسترای همراه نیاز دارد. این آنزیم، تنها آنزیم اکسیدو ردوکتاز مسیر تولید هورمون اتیلن بوده و مرحله نهایی بیوسنتز این هورمون را کاتالیز می کند. در این تحقیق، RNA کل از بافت میوه گوجه فرنگی، رقم Memory I استخراج شده و سپس cDNA کد کننده ژن *LeACO1* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ساخته شد. این ژن در ناقل پلاسمیدی pUC19 همساز سازی شده و خصوصیات بیوشیمی، ساختاری و روند تکامل ژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی توالی پروتئینی *LeACO1* و دیگر پروتئین های این خانواده آنزیمی نشان داد که در جایگاه فعال آن ها سه اسید آمینه His177، His234 و Asp179 تشکیل یک مثلث کاتالیزور کننده را داده و به اتصال Fe^{2+} در این جایگاه کمک می کنند. بررسی روابط فیلوژنتیکی و همردیف سازی چندگانه نشان داد که این ژن شباهت زیادی با ژن *ACO1* در دیگر گیاهان دارد. همچنین بررسی روابط تکاملی میان اعضای خانواده دی اکسیژنازهای وابسته به یون آهن نشان داد که از نظر تکاملی پروتئین های *ACO* از سایر اعضای خانواده دی اکسیژنازها متمایز هستند.

واژه های کلیدی: *ACO1* اکسیدو ردوکتاز، جایگاه فعال، گوجه فرنگی، همساز سازی.

مقدمه

جایگاه فعال دارای یون آهن بوده که در یک آرایش لیگاند سه شاخه ای تحت عنوان آرایش سه وجهی «2-His-1-carboxylate» قرار می گیرد (Costas *et al.*, 2004). بر خلاف سایر اعضای خانواده دی اکسیژنازهای آهنی غیر هم، که از آلفا کتو گلوپتارات به عنوان سوبسترای همراه برای احیا اکسیژن به آب استفاده می نمایند. آنزیم ACO از آسکوربات دو الکترون جهت احیا اکسیژن دریافت می کند. بررسی مکانیسم عمل آنزیم ACO نشان می دهد که ACC از طریق گروه های آمینو و کربوکسیل خود به آهن مرکزی متصل می شود. در این اتصال گروه آمین ACC در مقابل اسید آمینه His234 و گروه کربوکسیل آن در مقابل Asp179 قرار می گیرد (Rocklin *et al.*, 2004). Arg175 و Arg244 در اتصال بی کربنات نقش داشته و دو اکسیژن به حالت ترانس با اسید آمینه His177 قرار می گیرند. کمپلکس ACCO-Fe-ACC-bicarbonate-dioxygen واکنش پذیری کمی جهت اکسیداسیون ACC دارد. اولین انتقال الکترون به آهن متصل به دی اکسیژن از آسکوربات یا مولکول ACC دیگری صورت می گیرد. متعاقبا تجزیه O-O توسط بی کربنات، اکسو آهنی تولید می کند که با اکسیداسیون ACC باعث تولید اتیلن، آب، سیانید و ACO-Fe(III) می شود. ACO-Fe(III) توسط آسکوربات احیا می شود تا ACO-Fe(II) برای چرخه کاتالیزی مجدد فراهم شود (Tierney *et al.*, 2005).

اتیلن یکی از هورمون های مهم گیاهی است که در بسیاری از جنبه های رشد، توسعه و تمایز سلولی، جوانه زنی دانه، رسیدگی میوه، پیری گل و برگ شرکت می کند (Abeles *et al.*, 1992; Ahmadi *et al.*, 2011; Bleecker & Kende, 2000; Lasserre *et al.*, 1996). این هورمون همچنین در پاسخ گیاه به محدوده وسیعی از تنش های زنده و غیر زنده مانند حمله پاتوژن، آسیب های مکانیکی (Bleecker & Kende, 2000)، غرقابی (Olson *et al.*, 1995) و سرما (Leliever *et al.*, 1997) نقش دارد. آخرین مرحله در مسیر بیوسنتزی اتیلن اکسیداسیون دو الکترون ۱- آمینو سیکلو پروپان-۱- کربوکسیلیک اسید (ACC) و سپس تبدیل آن به اتیلن، دی اکسید کربن، سیانید و آب است که این عمل توسط آنزیم ۱- آمینوسیکلو پروپان-۱- کربوکسیلیک اسید اکسیداز (ACO) انجام می گیرد (Adams & Yang, 1979; Costas *et al.*, 2004). فعالیت ACO با کاهش پیوسته اکسیژن به آب و اکسیداسیون آسکوربات به دی هیدرو آسکوربات همراه است. در این واکنش بی کربنات به عنوان فعال کننده واکنش عمل می کند.

ACO متعلق به خانواده دی اکسیژنازهای آهنی غیر هم (Hem) است که از یون آهن به عنوان کوفاکتور و ۲ اکسو گلوپتارات به عنوان سوبسترای همراه استفاده می کند. با وجود اینکه میزان تشابه توالی در میان این خانواده آنزیمی کم است (Ahmadi *et al.*, 2011)، اما در همه آن ها

ارقام ثبت شده در پایگاه های اطلاعاتی ۹۸٪ مشابهت دارد. همچنین با همسانه سازی ژن *DenACS* از گیاه ارکیده (*Dendrobium hybrid*) نشان داده شد که این ژن در باز شدن گل، پیری گل و رشد و توسعه سلول های رویشی نقش دارد (Nagtong *et al.*, 2009; Nagtong *et al.*, 2010). تراریختی خربزه با سازه آنتی سنس cDNA ژن *ACO* سیب نشان داد که نقش *ACO* در بیوسنتز اتیلن کلیدی است، در این روش با ممانعت از تولید آنزیم *ACO* مقدار اتیلن در این گیاه به طور معنی داری کاهش می یابد (Rombaldi *et al.*, 2002).

با توجه به نقش مهم اتیلن در رسیدگی میوه و پیری و ضایعاتی که توسط این هورمون ایجاد می شود، با کاهش میزان آن می توان بخش عمده ای از ضایعات مربوط به انبارداری محصولات کشاورزی را تقلیل داد. به همین منظور نخست همسانه سازی ژن *ACO1* که ایزوفرم غالب رسیدگی است صورت گرفت تا بتوان در قدم های بعدی به منظور تغییر بیان آن و کاهش میزان اتیلن، از این ژن جهت انتقال به گیاه استفاده کرد. در این مطالعه پس از شناسایی و همسانه سازی ژن *LeACO1*، با استفاده از بررسی های همولوژی و فیلوژنتیکی با سایر اکسیژنازها نشان می دهیم که از نظر تکاملی پروتئین های *ACO* از سایر اعضای خانواده اکسیژنازها متمایز هستند. به علاوه این ژن شباهت زیادی با ژن *ACO* در دیگر گیاهان دارد.

آنزیم *ACO* توسط خانواده ژنی کوچکی کد می شود. مثلاً پنج ژن در گوجه فرنگی (Sell & Hehl, 2005)، و لاله (Momonoi *et al.*, 2007)، چهار ژن در اطلسی (Tang *et al.*, 1993) و ذرت (Gallie & Yong, 2004) و سه ژن در خربزه (Lasserre *et al.*, 1996) گزارش شده است. خانواده ژنی *ACO* در طول رشد و نمو گیاه به صورت های مختلفی بیان می گردند. در گل لاله *TgACO1*، *TgACO3* و *TgACO5* به ترتیب در گلبرگ های پژمرده، برگ ها و ساقه بیان می شوند، در حالیکه *TgACO2* و *TgACO4* فقط در سطح پایه در این بافت ها بیان می گردند (Momonoi *et al.*, 2007). پیر شدن گلبرگ اطلسی با افزایش تولید اتیلن شروع می شود و اتیلن نقش اساسی در تنظیم مرگ سلول بازی می کند (Hoekstra & Weges, 1986). بررسی مسیر بیوسنتزی اتیلن در میوه موز نشان داد که *MA-ACO1* و *ACS1* دو ژن اصلی رسیدگی در میوه موز بوده و نقش مهمی در تنظیم تولید اتیلن در طی رسیدگی ایفا می کنند (Choudhury *et al.*, 2008). دانه گرده اطلسی دارای مقدار زیادی ACC است که پس از گرده افشانی از طریق کلالة به اتیلن تبدیل می شود. اتیلن تولید شده در رشد و نمو پس از گرده افشانی نقش مهمی به عهده دارد (Singh *et al.*, 1992). جداسازی و کلون ایزوفرم جدید ژن *ACO* از *Dendrobium* Anna (عضوی از بزرگترین گونه ارکیده) نشان داد که توالی آمینو اسیدی *ACO* این رقم با *ACO* های موجود در دیگر

مواد و روش ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

میوه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L. cv, Memory I) از گلخانه ای واقع در مینودر قزوین جمع آوری و پس از توزین به مقدار ۳ گرم درون ورقه های آلومینیومی بسته بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از یک روش بهینه شده مبتنی بر CTAB، که تغییر یافته روش Reid et al. (2006) می باشد، استفاده شد. در این روش کلرید سدیم جهت حذف پلی ساکاریدها، پلی وینیل پیرولیدون به منظور حذف ترکیبات فنولی و کلروفرم جهت حذف پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت RNA با استفاده از استات سدیم و ایزوپروپانول و لیتیوم کلراید رسوب داده شد. بافت مورد نظر به صورت پودر در آمده و به میزان ۳ گرم از بافت پودر شده به یک تیوب فالكون ۵۰ ml حاوی بافر استخراج (۰.۲ (w/v) CTAB، ۰.۲ (w/v) PVP، ۲۵ mM Tris- (pH= ۸)، ۲۵ mM EDTA (pH= ۸) β-mercaptoethanol، ۲ M NaCl، ۳۰۰ HCl (v/v) ۰.۲٪ اضافه گردید. تیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (Techne انگلستان مدل FTE10AE) با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار

داده شده و هر ۵ دقیقه به آرامی ورتکس (Techne انگلستان مدل FVORTECE) گردیدند. سپس پروتئین ها دو مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴ v/v) استخراج گردیده و لایه بالایی به یک تیوب فالكون جدید منتقل و ۰/۱ حجم سدیم استات M ۳ و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول به آن افزوده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. رسوب اسید نوکلئیک به وسیله سانتریفیوژ (Hermel آلمان مدل Z36HK) با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد جمع آوری و در آب حاوی DEPC حل گردید. در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید M ۸ به نمونه ها اضافه شده و تیوب ها به مدت ۶-۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد رسوب و با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ شستشو و در ۲۰۰ μl آب حاوی DEPC حل گردید. در نهایت، کمیت و کیفیت RNA کل استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed انگلستان، UVD3200) در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز cDNA و واکنش RT-PCR

واکنش نسخه برداری معکوس با استفاده از ۵ μg محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم DNase (Fermentas)، آنزیم نسخه بردار

همسانه سازی و توالی یابی cDNA کد کننده

LeACOI

پس از خالص سازی محصول PCR از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (K0513, Fermentase) ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentase) توسط آنزیم برشی *BamHI* (Fermentase) هضم گردیده و مجدداً خالص سازی شدند. سپس واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentase) انجام گرفت (Sambrook *et al.*, 2001). پس از تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5 α ، انتقال پلاسمید حاوی ژن با استفاده از روش شوک حرارتی انجام گرفته (Cohen *et al.*, 1972) و باکتری روی محیط کشت جامد SOB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و پروتئین *LacZ* به منظور انجام گزینش سفید-آبی کشت شدند. در مرحله بعد تعدادی کلونی سفید و آبی کم رنگ به عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، استخراج پلاسمید های نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS انجام شده (Birnboim & Doly, 1979) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو روش PCR و هضم آنزیمی با ۳ آنزیم *BamHI*، *EcoRI* و *SacI* مورد بررسی قرار گرفتند. توالی یابی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آغازگر های اختصاصی ژن *LeACOI* در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab (Sequence Laboratories) (Gottingen) آلمان انجام شد.

معکوس RevertAidTMM-MuiV

(Fermentase) و آغازگرهای Oligo dT (QIAGEN) در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام شده و پس از آن، عمل غیر فعال سازی آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. برای تکثیر ژن *LeACOI* مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ μ l حاوی Mm PCR buffer، ۵۰ mM MgCl₂، ۱۰ dNTP Mix، ۱۰ \times Taq DNA polymerase، ۵ U/ μ l و محلول ۲۰ پیکو مولار آغازگرهای رفت و برگشت به میزان ۱ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. جهت طراحی آغازگر مورد نیاز از توالی آنزیم ۱- آمینو سیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید اکسیداز موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره شناسایی X58273.1 استفاده گردید.

آغازگر رفت با توالی (5' TTA GGA) و آغازگر برگشت با توالی (3' TCC ATG GAG AAC TTC CCA AT) و آغازگر برگشت با توالی (5' TAA GGA TCC) که شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه برشی *BamHI* در انتهای ۵' بودند سنتز شدند. واکنش PCR در ۳۵ سیکل چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود.

ade.html) انجام شد. جهت آنالیز فیلوژنی آنزیم های خانواده دی اکسیژناز گیاهی شامل سیب، آرابیدوپسیس، اطلسی، گوجه فرنگی، از اطلاعات ثبت شده در سایت NCBI استفاده شد (جدول ۱). همچنین شماره دستیابی توالی های پروتئینی موجود در NCBI، مورد استفاده در بررسی های همردیف سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی در جدول ۲ نشان داده شده است.

پس از انتخاب پروتئین های مورد نظر ضمن استفاده از برنامه Blast (http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، همردیف سازی توالی ها با استفاده از برنامه ClustalW (http://www.clustalw.Genome.ad.jp) و Boxshade (http://www.bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxsh

جدول ۱- آنزیم های خانواده دی اکسیژناز گیاهی.

Table: Enzymes of plant dioxygenase family.

شماره دستیابی (Accession number)	نام گیاه (Plant name)
<i>MdANS</i> (BAB92997), <i>MdF3H</i> (AAX89401), <i>MxdFS</i> (BAB92998)	سیب (<i>Malus domestica</i>)
<i>AtF3H</i> (Q9S818), <i>AtANS</i> (Q96323), <i>AtFS</i> (Q96330)	آرابیدوپسیس (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>PxhF3H</i> (O22530), <i>PxhFS</i> (CAA80264)	اطلسی (<i>Petunia x hybrid</i>)
<i>LeACO3</i> (CAA68538), <i>LeACO2</i> (HQ322499), <i>LeACO1</i> (BAA34924), <i>LeACO4</i> (CAA90904), <i>LeACO5</i> (CAG29395)	گوجه فرنگی (<i>Lycopersicon esculentum</i>)

نتایج و بحث

هضم آنزیمی و توالی یابی

طول ۹۴۸ bp و ۲۶۸۶ bp را تولید کند. آنزیم *SacI* یک ناحیه برش بر روی پلاسمید داشته و فاقد ناحیه برشی بر روی قطعه ژن *LeACO1* است، بنابراین انتظار می رود که با هضم پلاسمید نوترکیب با این آنزیم تنها یک قطعه با طول ۳۶۳۴ bp تشکیل شود. در شکل (۱B) جایگاه برشی آنزیم های به کار برده شده برای تأیید پلاسمید نوترکیب نشان داده شده است.

نتایج هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با ۳ آنزیم *BamHI*, *EcoRI* و *SacI* در شکل (۱A) نشان داده شده است. از آنجا که انتقال این ژن به داخل pUC19 با استفاده از آنزیم *BamHI* صورت گرفته بود، انتظار می رفت که هضم پلاسمید نوترکیب توسط این آنزیم قطعاتی به

جدول ۲- توالی های پروتئینی مورد استفاده در بررسی های همردیف سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی.

Table 2: Protein sequences used in the multiple Alignment and phylogenetic relationships.

شماره دستیابی (Accession number)	نام گیاه (Plant name)
(Q8S932.1)	خرمالو (<i>Diospyros kaki</i>)
(ACX71872.1)	سنگ دانه صحرایی (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)
(BAH15311.1)	کاهو (<i>Lactuca sativa</i>)
(Q08508.1) <i>PxhACO3</i> ، (Q08507.1) <i>PxhACO1</i>	اطلسی (<i>Petunia x hybrida</i>)
(P24157.1) <i>LeACO3</i> ، (P07920.1) <i>LeACO2</i>	گوجه فرنگی (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
(BAG30908.1)	فلفا (<i>Capsicum chinense</i>)
(AAB71421.1) ، (Q43792.1)	تنباکو (<i>Nicotian tabacum Nicotiana glutinosa</i>)
(AAK68075.1)	سیب زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)
(BAH15311.1)	کاهو (<i>Lactuca sativa</i>)
(BAD61000.1)	گللابی (<i>Pyrus pyrifolia</i>)
(BAC53656.1)	سیب (<i>Malus x domestica</i>)
(AAF36483.1)	هلو (<i>Prunus persica</i>)
(BAB83762.1)	لوبیا (<i>Phaseolus lunatus</i>)
(AAP41850.1)	هویا (<i>Hevea brasiliensis</i>)
(BAA94601.1)	صنوبر (<i>Populus x canadensis</i>)
(AAC48977)	شمعدانی (<i>Pelargonium x hortorum</i>)
(AAZ83342.1)	پنبه (<i>Gossypium hirsutum</i>)
(AAF64528.1)	پاپایا (<i>Carica papaya</i>)
(CAA71738.1)	توس (غان) (<i>Betula pendula</i>)
(AAD28196.2)	شبدر (<i>Trifolium repens</i>)
(ABF61805.1)	یونجه (<i>Medicago sativa</i>)
(CAJ56065.1)	ماش (<i>Vigna radiate</i>)
(BAG06705.1)	انجیر (<i>Ficus carica</i>)

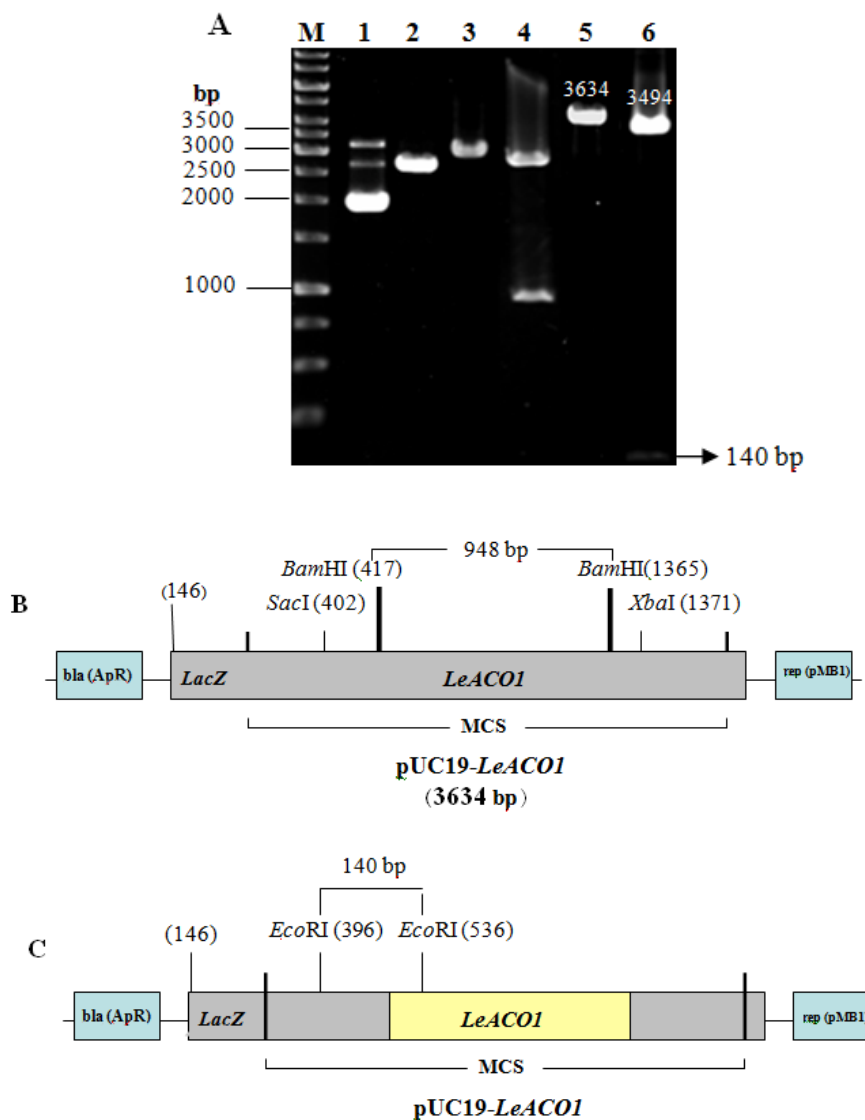
(flavonone 3-hydroxylases) و *ACO* در گوجه فرنگی و تعدادی از گیاهان با استفاده از الگوریتم الحاق به نزدیکترین همسایه ۱ رسم شد و نشان داد که پروتئین های *ACO* از نظر تکاملی از سایر اعضای خانواده دی اکسیژنازها متمایز هستند (Hudgins et al., 2006). شناسایی اکسیدو ردوکتازهای همولوگ با ژن *LeACOI* با استفاده از برنامه GenTHREADER (http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) نشان داد که همه پروتئین های این بانک اطلاعاتی، تشابه توالی کمتر از ۳۰٪ را با *LeACOI* دارند. بنابراین پروتئین های آنتوسیانین سیتاز و ایزو پنی سیلین N سیتاز که بیشترین تشابه توالی پروتئینی را با ژن مورد نظر داشتند، مورد انتخاب واقع شدند. لازم به ذکر است که آنتوسیانین سیتاز (ANS, PDB code 1gp6) و ایزوپنی سیلین N سیتاز (IPNS, PDB 1odm) به ترتیب تشابه توالی ۲۷/۳٪ و ۱۷/۸٪ را نشان دادند. این دو پروتئین عضوی از خانواده پروتئین های غیر هم (Hem) هستند که برای فعالیت خود به Fe^{2+} و سوبسترای همراه نیاز دارند. به جز *ACO* و IPNS که دارای سوبسترای همراه آسکوربات هستند، سایر اعضای این خانواده از آلفا کتو گلو تارات استفاده می کنند، موتیف های متصل به آهن (His-X-Asp-X-His) و اسیدهای آمینه متصل به هیدروژن سوبسترای همراه (Arg-X-Ser) در تمام اعضای این خانواده حضور دارند (شکل ۳).

همچنین دو جایگاه برشی *SacI* و *XbaI* جهت جداسازی و انتقال این ژن به داخل pBI121 استفاده می شوند. برای تعیین جهت ژن *LeACOI* در داخل پلاسمید، از آنزیم *EcoRI* استفاده شد. این آنزیم پلاسمید را در ناحیه ۱۱۹ bp و ژن را در ناحیه ۳۹۶ bp (شکل ۱C) بنابراین انتظار می رود در صورتی که ژن درون پلاسمید، در خلاف جهت *LacZ* قرار گرفته باشد، دو قطعه به اندازه های ۱۴۰ bp و ۳۴۹۴ bp تشکیل شود و در صورت موافق بودن جهت آن با *LacZ*، دو باند به طول ۸۵۰ bp و ۲۷۸۴ bp مشاهده گردد. با هضم توسط آنزیم *EcoRI* دو باند به طول ۱۴۰ bp و ۳۴۹۴ bp روی ژل آگارز دیده شد که گویای آنتی سنس بودن قطعه ژن در پلاسمید نو ترکیب است. همچنین نتایج توالی یابی DNA نشان داد که قطعه همسانه سازی شده در خلاف جهت *LacZ* قرار گرفته است که با نتایج هضم آنزیمی مطابقت دارد (شکل ۲). چارچوب باز خواندنی cDNA کد کننده *LeACOI* ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی GeneBank با شماره دستیابی HQ322499، به طول ۹۴۸ باز بوده است.

بررسی توالی اسید آمینه ای و موتیف های

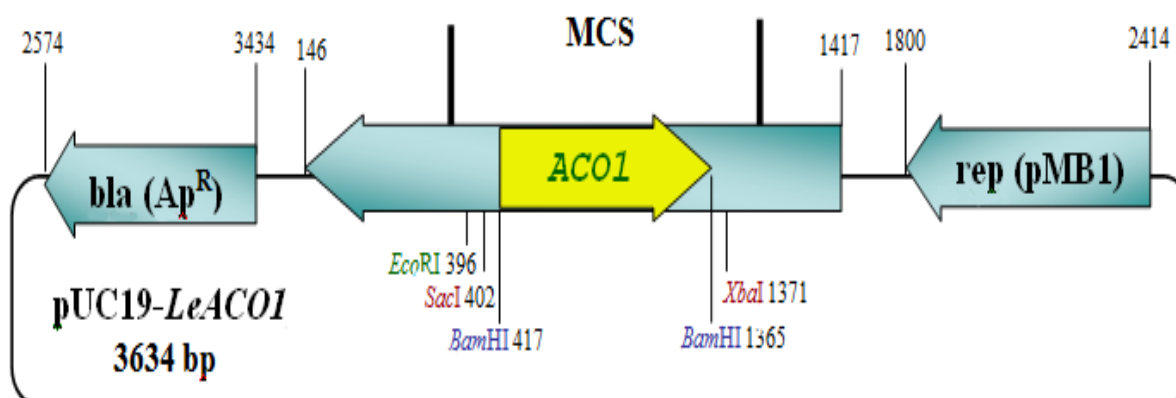
ساختاری پروتئین *LeACOI*

ترسیم درخت فیلوژنتیکی برای چهار پروتئین FS (flavonol synthases)، ANS و F3H (anthocyanidin synthases)



شکل ۱- A: الکتروفورز ژل آگاروز کلونی های نو ترکیب با استفاده از هضم آنزیمی. M- نشانگر مولکولی ۱ Kb (Fermentas)، ۱- DNA پلاسمیدی شاهد هضم نشده، ۲- DNA پلاسمیدی شاهد هضم شده بوسیله *BamHI*، ۳- پلاسمید نو ترکیب هضم نشده، ۴، ۵ و ۶- پلاسمید نو ترکیب هضم شده بوسیله *BamHI*، *SacI* و *EcoRI* به ترتیب. B: نقشه پلاسمید نو ترکیب *pUC19-LeACO1* و جایگاه برشی آنزیم های *BamHI*، *SacI* و *XbaI* (از دو آنزیم *SacI* و *XbaI* جهت انتقال این ژن به ناقل دوتایی *pBI121* استفاده می شود). C: نقشه تعیین جهت ژن *ACO1* داخل پلاسمید *pUC19* به وسیله آنزیم *EcoRI*

Figure 1- A: Agarose gel electrophoresis of recombinant vectors using enzymatic digestion, M: 1 Kb molecular marker (Fermentase), 1: Non-digested control DNA plasmid, 2: Digested control DNA plasmid by *BamHI*, 3: Non-digested recombinant plasmid, 4, 5, and 6: Digested recombinant plasmid by *BamHI*, *SacI*, and *EcoRI*, respectively. B: Recombinant plasmid map of *pUC19-LeACO1* and restriction sites of *BamHI*, *SacI*, and *XbaI* (Both restriction enzymes of *SacI* and *XbaI* are used to transfer forementioned gene into binary vector of *pBI121*). C: Restriction map to illustrate direction of cloned *ACO1* gene into the *pUC19* vector plasmid using *EcoRI*.



شکل ۲- ساختار ناقل نو ترکیب pUC19-LeACO1. موقیت ژن کلون شده *LeACO1* در جهت معکوس روی جایگاه چند گانه همسانه سازی (MCS) نشان داده شده است. ناحیه رونوشت برداری (pMB1)، ژن های *LacZ* و مقاومت به آمپی سیلین (Ap^R)، و جایگاه چند گانه برای همسانه سازی روی نقشه ناقل نو ترکیب نشان داده شده اند.

Figure 2- Structure of recombinant vector pUC19-LeACO1. Location of cloned *LeACO1* are exhibited in the reverse direction on the multiple cloning sites (MCS). Transcription region (pMB1), *LacZ* and recombinant sites (Ap^R), and multiple regions for replication have been shown on the map of recombinant vector plasmid.

سازي اين ژن با ساير دي اکسيژنازاها نشان مي دهد که ۳۱٪ تشابه با *ACO* گیاه رمکس (Y10034) و ۳۰٪ تشابه توالی با G3H (*gibberellin 3 β -hydroxylase*) آرابیدوپسیس (L37126) دارد و بنابراین بر اساس نتایج قبلی این ژن دی اکسیژناز جدیدی را کد می کند و علی رغم تفاوت عملکرد این دی اکسیژنازاها، در توالی همه آن ها موتیف های اتصال به آهن و سوبسترا به صورت کاملاً حفاظت شده می باشد (Butler & Gallagher, 1999).

شکل ۴ موتیف های ساختاری و مناطق حفاظت شده پروتئین های *LeACO1*، ANS (PDB 1gp6) و IPNS (PDB 1odm) را پس از همردیف سازی و ترتیب توالی آن ها نشان می دهد. بررسی توالی دی اکسیژنازاها نمایانگر این است که آنزیم هایی با تشابه توالی کمتر از ۳۲٪، عملکردهای مختلفی دارند (Prescott & John, 1996).

جداسازی ژن کد کننده دی اکسیژنازی که در مراحل ابتدایی تشکیل ریشه های نا به جا در میوه سیب بیان می شود (ARRO-1) و همردیف

ایزوفرم ۴ گوجه فرنگی که تشابه توالی پروتئینی کمتری با سایر ایزوفرم ها در گوجه فرنگی داشت با ایزوفرم های دیگر این ژن در گیاهان دیگری چون هویا، صنوبر و شمعدانی در یک گروه قرار گرفت.

بررسی فیلوژنی آنزیم *ACO* در گیاه اطلسی نشان می دهد که پروتئین کد شده توسط ایزوفرم های ۱، ۳ و ۴ بیش از ۹۰٪ تشابه توالی دارند و با *ACO* سایر گیاهان بیش از ۷۰٪ تشابه توالی نشان می دهند، پروتئین های *ACO* تشابه توالی قابل توجه ای با آنزیم هایی دارند که برای فعالیت کاتالیزوری خود از آسکوربات و یون آهن استفاده می کنند (Tang et al., 1993).

جداسازی cDNA ژن *ST-ACO3* و بررسی روابط فیلوژنی این ژن نشان می دهد که بیشترین تشابه توالی را با ژن *ACO* آراییدوپسیس و کمترین تشابه را با *ACO* برنج، خربزه، کیوی و اطلسی دارد (Zanetti et al., 2002).

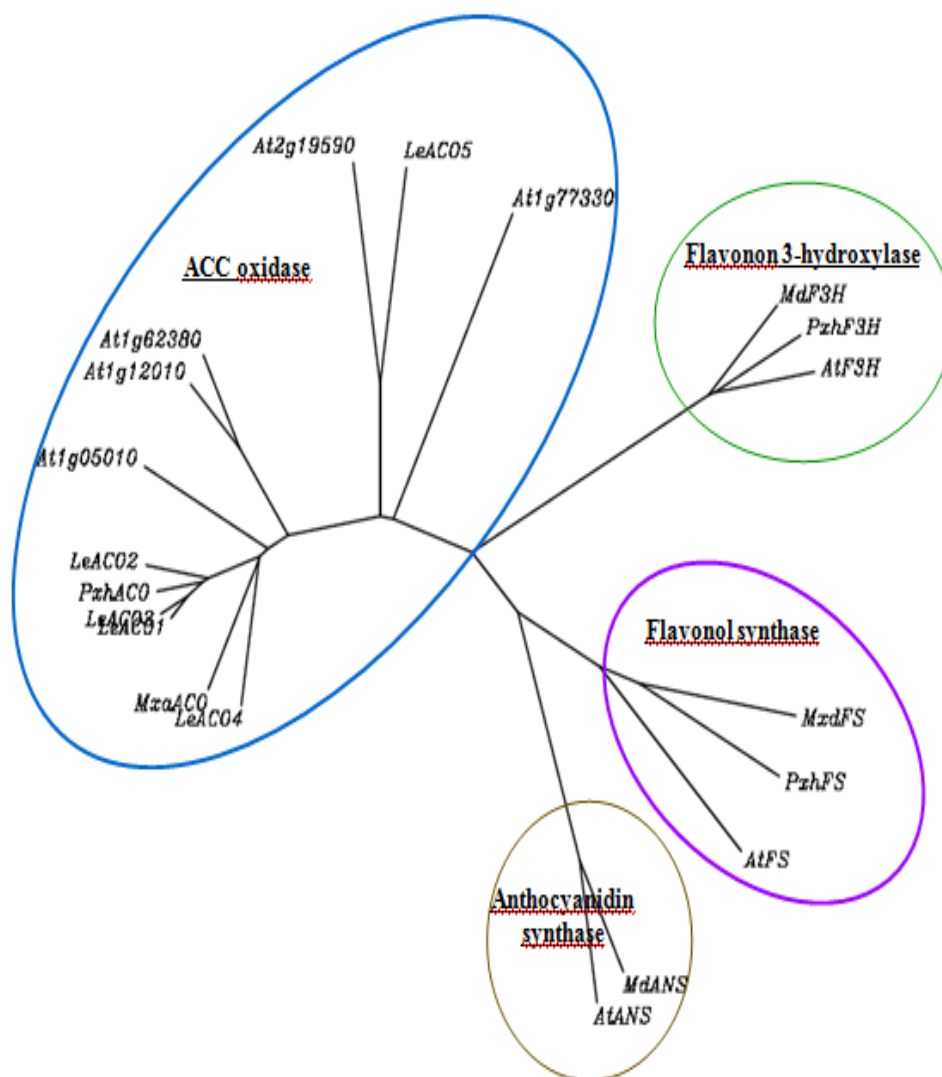
ایزوفرم یک و دو *ST-ACO* بیش از ۷۰٪ تشابه توالی با یکدیگر داشته و ایزوفرم سه با دو ایزوفرم قبلی تنها ۴۲٪ تشابه دارد و لذا مبین آن است که ایزوفرم ۳ یک عضو منشعب از این خانواده ژنی می باشد.

مطالعات موتاژنی و کریستالوگرافی ساختار *ACO* اطلسی (*PxhACO1*) و *ACO* سیب (*MDACO1*) و دو پروتئین همولوگ آن (*ANS* و *IPNS*)، به حضور موتیف های (-His-X-Asp) و (-X-His) در این توالی ها اشاره دارد و دو اسید آمینه هیستیدین و آسپارات را به عنوان لیگاندهای Fe^{2+} معرفی می کند (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 2004; Seo et al., 2004).

بررسی های همولوژی و فیلوژنتیکی ژن *LeACO1*

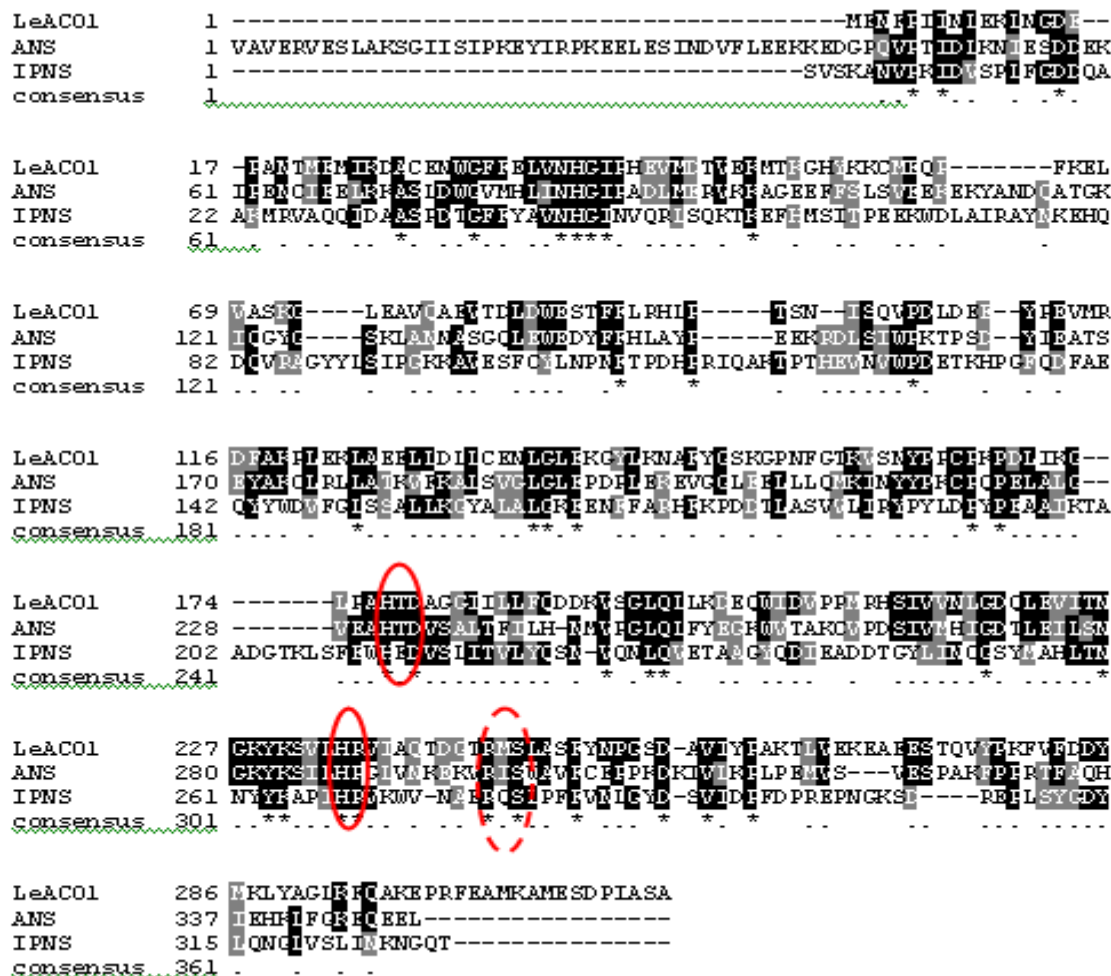
رابطه تکاملی تعدادی از توالی های پروتئینی منابع مختلف که بیشترین شباهت را با توالی *LeACO1* داشتند، در شکل ۵ و ۶ نشان داده شده است. بررسی ترتیب توالی پروتئینی ژن *LeACO1* با سایر توالی های پروتئینی نشان می دهد که این ژن بیشترین تشابه را با گیاهان سیب زمینی، اطلسی، فلفل و تنباکو به ترتیب به میزان ۹۸٪، ۹۳٪، ۹۱٪ و ۹۰٪ و کمترین تشابه را با گیاهان ماش و صنوبر به میزان ۷۰٪ دارد.

درخت فیلوژنی به دو گروه اصلی A و B تقسیم گردید به گونه ای که ایزوفرم های ۱، ۲ و ۳ ژن *ACO* که تشابه بیشتری را در توالی با یکدیگر نشان دادند، در گروه اصلی A و ایزوفرم ۴ در گروه B قرار گرفت. ایزوفرم های ۱ و ۳ گوجه فرنگی با ژن *ACO* سیب زمینی و تنباکو که اعضای خانواده سولاناسه هستند در یک گروه و ایزوفرم ۲ گوجه فرنگی با ایزوفرم ۱ این ژن در اطلسی در گروه دیگری قرار گرفته اند.



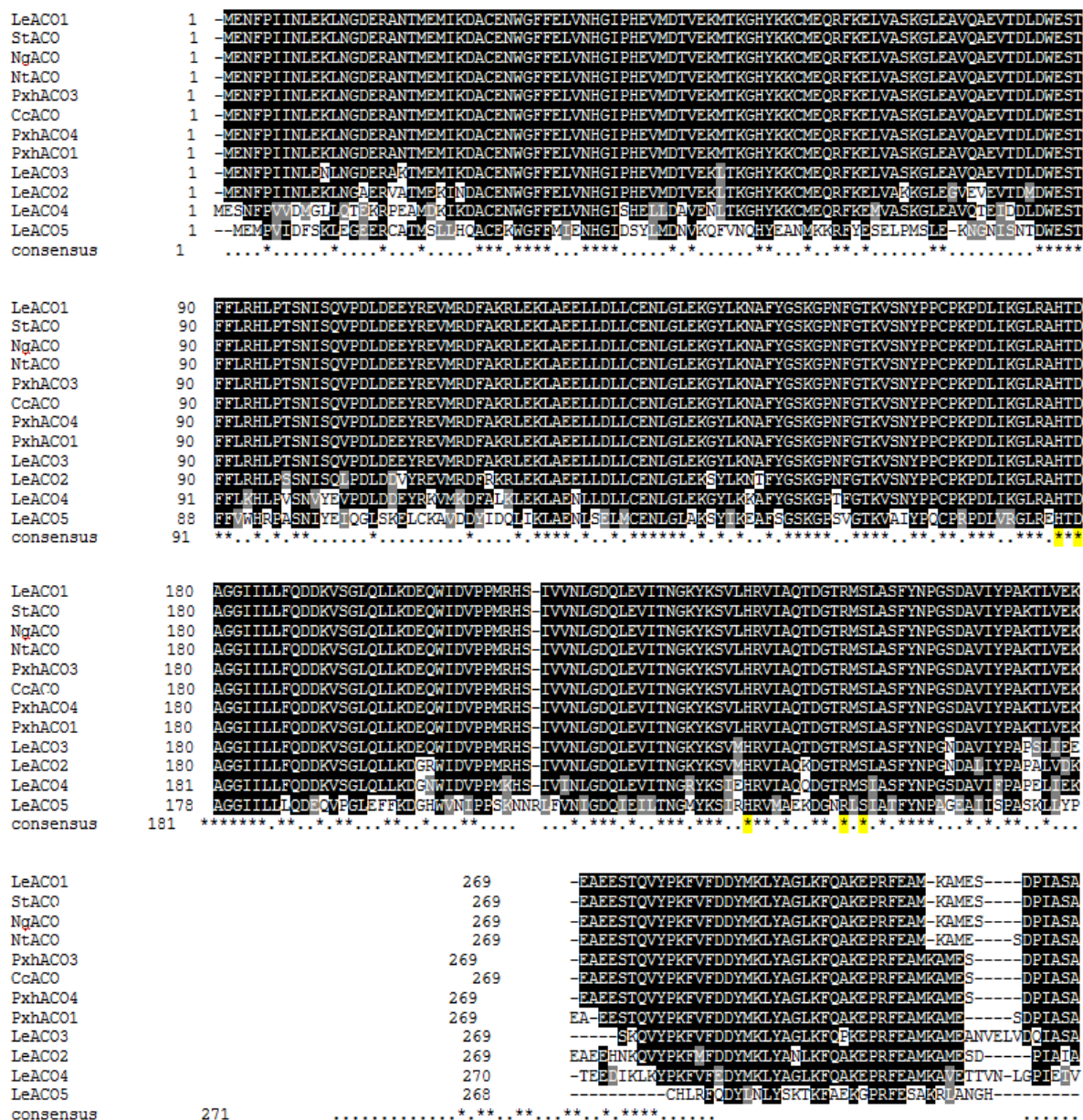
شکل ۳- آنالیز فیلوژنی تعدادی از آنزیم های دی اکسیژناز گیاهی برای نشان دادن زیر گروه و کلاس های ژن هم خانواده. شماره دستیابی ژن ها در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

Figure 3- The phylogenetic tree analysis for number of plant dioxygenases to demonstrate the subgroup and subclass of the homogene families. Accession numbers have been given in Tables 1 and 2.



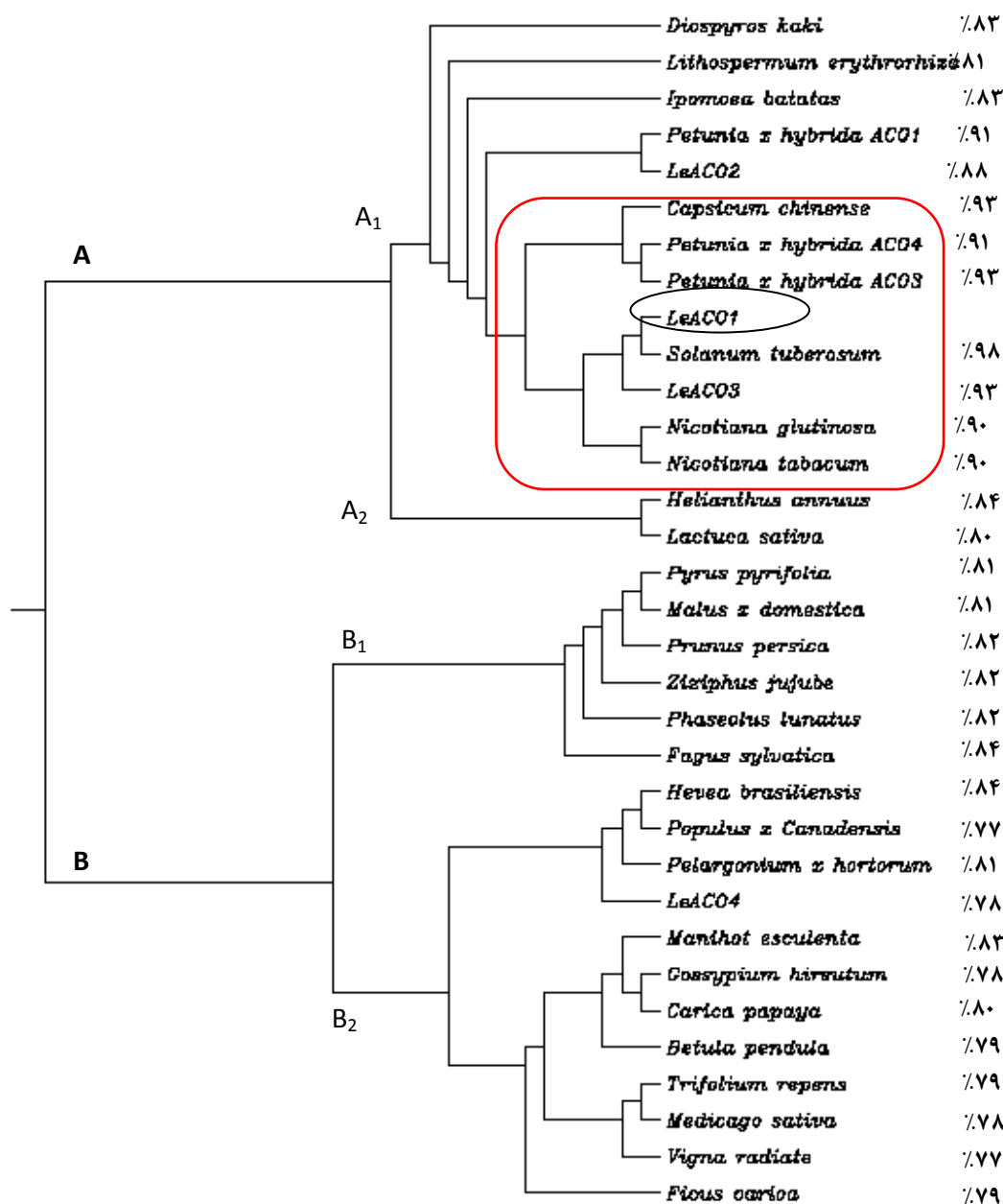
شکل ۴- همردیف سازی پروتئین و تجزیه توالی سه آنزیم اکسیدو ردوکتاز (*LeACOI*) و *ANS* و *IPNS*). اسیدهای آمینه یکسان و مشابه به ترتیب با رنگ سیاه و خاکستری نشان داده شده اند. علامت * نشان دهنده اسیدهای آمینه حفاظت شده در توالی ها می باشد. موتیف های متصل به Fe^{2+} با بیضی ممتد (—) و موتیف متصل به سوبسترای همراه با بیضی غیر ممتد (---) نمایش داده شده است.

Figure 4- Protein alignment and sequence analysis of three oxidoreductases (*LeACOI*, *ANS* and *IPNS*). Unique and similar deduced amino acids are illustrated by black and gray colors, respectively. Protected amino acid residues are shown by * symbol in the sequence structure. Conjugated motifs to Fe^{2+} and associated substrate are exhibited by extended (—) and non-extended (---) ovals, respectively.



شکل ۵- هم‌ردیف‌سازی چندگانه پروتئینی ژن *LeACO1* با سایر ایزوفرم‌هایی که بیش از ۹۰ درصد با *ACO1* گوجه‌فرنگی تشابه دارند. ستاره‌های رنگی اسیدهای آمینه‌ای که در اتصال سوبسترا و یون آهن نقش دارند را نشان می‌دهد. شماره‌های دستیابی اسیدهای آمینه در جدول ۲ آورده شده است.

Figure 5- Multiple protein sequence alignment of *LeACO1* gene with other isoforms that illustrated more than %90 similarities with tomato *ACO1* gene. Color stars are exhibited amino acid residues involving to bind relevant substrate with hem ion. Amino acid accession numbers have been given in Table 2.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم افزار ClustalW. ژن همسانه سازی شده *LeACO1* با بیضی نشان داده شده است. اعداد (به درصد)، تشابه توالی پروتئینی ژن همسانه سازی شده با توالی پروتئینی سایر گیاهان را نشان می دهد. شماره های دستیابی اسیدهای آمینه در جدول ۲ درج شده است.

Figure 6. Drown phylogenetic tree employing ClustalW software. Cloned *LeACO1* gene are shown with circular. Percentage numbers are shown the protein sequence similarity of coned gene with those of other plants. Amino acid accession numbers have been given in Table 2.

این ژن می‌تواند اطلاعات بیشتری در اختیار محققین قرار دهد. همچنین همسانه سازی این ژن در جهت آنتی سنس و معرفی آن به داخل ژنوم گیاه گوجه فرنگی می‌تواند سرعت رسیدن میوه این گیاه را کند نماید. در صورت همولوژی بالای ژن ایزوفرم، می‌توان برای سایر گیاهان از همین شیوه استفاده نمود.

در مجموع این بررسی، علاوه بر همسانه سازی ژن *LeACO1*، اطلاعات مولکولی پایه و مفیدی برای تحقیقات بعدی در اختیار قرار می‌دهد. به نظر می‌رسد که در مطالعات تکمیلی، تحقیقاتی نظیر شناسایی، همسانه‌سازی، بررسی ساختار ژن و نیز فعالیت کاتالیتیکی در گیاهان خانواده سولاناسه، سایر ارقام گوجه فرنگی و همچنین گیاهان کلیماکتربیک، ایزوفرم‌های دیگر

منابع

- Ahmadi N, Rahnama H, Kazemi Tabar SK (2011). Cloning of tomato E8 promoter and its analysis in transient assays using Agro-infiltration system. *Journal of Agricultural Biotechnology (in Persian)* 2: 1-14.
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992). *Ethylene in plant biology*. 2nd edn. Academic, San Diego, pp 26-55.
- Adams DO, Yang SF (1979). Ethylene biosynthesis: identification of l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceeding of National Academy Sciences* 76: 170-174.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* 7: 1513-1525.
- Bleecker AB, Kende H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 16: 1-18.
- Butler ED, Gallagher TF (1999). Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* 'Jork 9') stem discs. *Experimental Botany* 50: 551-552.
- Choudhury SR, Roy S, Saha PP, Singh SK, Sengupta DN (2008). Characterization of differential ripening pattern in association with ethylene biosynthesis in the fruits of five naturally occurring banana cultivars and detection of a GCC-box-specific DNA-binding protein. *Plant Cell Report* 27: 1235-49.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceeding of National Academy Sciences*. 69: 2110-2114.
- Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models and intermediates. *Chemical Review* 104: 939-986.
- Gallie DR, Yong TE (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in Maize. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 267-281.
- Hoekstra FA, Weges R (1986). Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting in *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiology* 80: 403-408.

- Hudgins JW, Ralph SG, Franceschi VR, Bohlmann J (2006). Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta* 224: 865-77.
- Kende H (1993). Ethylene biosynthesis. *Annu Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 44: 283-307.
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez JA, Bull J, Pech JC, Balague C (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L). *Molecular Genetics and Genomics* 251: 81-90.
- Lelievier JM, Tichit L, Dao P, Fillion L, Nam YW, Pech JC, Latche A (1997). Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane Pear (*Pyrus communis* L.) Fruits. *Plant Molecular Biology* 33: 847-855.
- Momonoi K, Shoji K, Yoshida K (2007). Cloning and characterization of ACC oxidase genes from Tulip. *Plant Biotechnology* 24: 241-246.
- Nagdong T, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P (2009). Cloning and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 gene from orchid (*Dendrobium* spp). *World Applied Sciences* 7 (11): 11-18.
- Nagdong T, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P (2010). Cloning and differential expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene in different floral tissues of *Dendrobium anna* flowers. *African Journal of Biotechnology* 9: 2256-2266.
- Olson DC, Oetiker JH, Yang SF (1995). Analysis of Le-ACS3, a 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plant. *Biochemistry* 270: 14056-14061.
- Prescott AG, John P (1996). Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 47: 245-271.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development *BMC Plant Biology* 6: 27-37.
- Rocklin AM, Kato K, Liu HW, Jr LQ, Lipscomb JD (2004). Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: single turnover reaction. *Biological Inorganic Chemistry* 9: 171-182.
- Rombaldi CV, Silva JA, Wally L, Da Costa TS, Zanuzo MR (2002). Characterization of transgenic melons expressing an apple ACC oxidase antisense gene. NATO advanced research workshop on biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. Murcia Spain, April 23-27, 2002. p. 161. Abs # S8-P4.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol: 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sell S, Hehl R (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA sequence* 16: 80-82.
- Seo SY, Yoo A, Jung J, Sung SK, Yang DR, Kim WT, Lee W (2004). The active site and substrate-binding mode of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase determined by site-directed mutagenesis and comparative modelling studies. *Biochemistry* 380: 339-346.
- Singh A, Evensen KB, Kao TH (1992). Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata*. *Plant Physiology* 99: 38-45.

- Tang X, Wang H, Brandt AS, Woodson WR (1993). Organization and structure of the 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* 23: 1151-1164.
- Tierney DL, Rocklin AM, Lipscomb JD, Que L, Hoffman BM (2005). ENDOR studies of the ligation and structure of the non-heme iron site in ACC oxidase. *American Chemical Society* 127: 7005-7013.
- Zanetti ME, Terrile MC, Arce D, Godoy AV, Segundo BS, Casalongue C (2002). Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress. *Experimental Botany* 53: 2455-2457.
- Zhang Z, Barlow JN, Baldwin JE, Schofield CJ (1997). Metal-catalyzed oxidation and mutagenesis studies on the iron(II) binding site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochemistry* 36: 5999-6007.
- Zhang Z, Ren JS, Clifton LJ, Schofield CJ P (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase-the ethylene-forming enzyme. *Chemistry & Biology* 11: 1383-1394.

Cloning and Phylogenetic Relationships Analysis of an Oxidoreductase Gene in Product Pathway of Ethylene Hormone

Jafari Z.¹, Haddad R.*², Hosseini R.², Garousi Gh.A.²

¹M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

²Academic member, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Abstract

1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (*ACO*) enzyme is a member of the Fe (II)-dependent family of oxidases/ oxygenases) and for activity requires Fe²⁺ as cofactors and ascorbate as a co-substrate. This enzyme is the only oxidoreductase in the ethylene biosynthesis pathway and catalysis the biosynthesis terminal step. In the present study, total RNA was extracted from tomato fruit (cv, Memory I), and then, coding cDNA of the *LeACO1* gene was synthesized by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR product was cloned into a pUC19 plasmid, and then, their biochemical, structural and phylogenetic characteristics were analyzed. *LeACO1* amino acid sequence studies in tomato and other plant of such family were indicated that His177, His234 and Asp179 amino acids are formed a triangle catalytically site to play a role in binding Fe²⁺ cofactor. Phylogenetic and multiple alignment analysis were illustrated a high degree of identity to those of the *ACO1* gene from other plants.

Key Words: *Active site, ACO1, Cloning, Oxidoreductase, Tomato.*

* Corresponding Author: Haddad R.

Tel: 02833901165

Email: raheemhaddad@yahoo.co.uk

