



جداسازی، همسانه‌سازی و توصیف ملکولی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی تکرشته از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* L.)

مهديه ميرزايي^۱، جعفر ذوالعلي^{۲*}، آناهيت شالوزاد^۱

^۱ دانش‌آموخته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

^۲ استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۲۰

چکیده

نوکلئازهای اختصاصی تکرشته (خانواده S1/P1)، بطور گسترده در تحقیقات ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پرکاربردترین آنزیم‌های این خانواده، اندونوکلئازهای گیاهی هستند که از قابلیت برش اختصاصی نواحی جفت‌شدگی ناجور در مولکول‌های DNA هترو دوپلکس برخوردارند. تکنیک هضم آنزیمی DNA هترو دوپلکس مبتنی بر فعالیت این اندونوکلئازها، یکی از متداول‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در ژنوم است. در این تحقیق، توالی‌های ژنی رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی تکرشته از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*) با استفاده از آغازگرهای هترو لوگ در واکنش PCR جداسازی گردیدند. توالی‌های ژنی جداسازی شده، پس از همسانه‌سازی و تعیین ماهیت، به نام‌های PARS I و PARS II نامگذاری شدند. مطالعه نرم‌افزاری خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختار مولکولی و قرابت ژنتیکی نشان داد که دو آنزیم PARS I و PARS II به خانواده نوکلئازهای S1/P1 تعلق داشته و شباهت زیادی به نوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس نشان می‌دهند. با این حال، تعیین مکانیزم فعالیت و ترجیح سوبسترای این نوکلئازها، مستلزم بررسی فعالیت نمونه خالص طبیعی یا نوترکیب آنها بر روی سوبسترای DNA هترو دوپلکس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نوکلئازهای اختصاصی تکرشته، جعفری، هضم آنزیمی DNA هترو دوپلکس، همسانه‌سازی.

مقدمه

استفاده قرار می‌گیرد (Taylor & Deeble, 1999; Henikoff & Comai, 2003; Till et al., 2004). پس از کشف آنزیم CEL I، نوکلئازهای گیاهی دیگری با قابلیت مشابه شناسایی و معرفی گردید که از جمله می‌توان نوکلئاز لویاسبز (Sung & Laskowski, 1962; Laskowski, Doetsch et al., 1980)، نوکلئاز SP1 از گیاه اسفناج (al., 1988)، نوکلئازهای سری ZEN از گل آهار (Aoyagi et al., 1998; Perez-Amador et al., 2000)، نوکلئاز DSA6 از سوسن یک‌روزه (Panavas et al., 1999)، نوکلئاز StEN1 از سیب‌زمینی (Nomura et al., 1971; Larsen, 2005)، نوکلئازهای سری Endo از آرابیدوپسیس (Triques et al., 2007)، نوکلئاز TBN1 (SIEN1) از گوجه‌فرنگی (Matousek et al., 2009) و نوکلئازهایی از کرچک، انگور و یونجه را نام برد.

شناسایی فعالیت‌های آنزیمی جدید در عصاره‌های مختلف گیاهی و توصیف آنزیم‌های متناظر، دانش موجود در مورد ساختار و مکانیزم عمل این گروه آنزیمی را افزایش داده و ابزارهای جدیدی را به خزانه آنزیمی مورد استفاده در تحقیقات غربال جهش اضافه می‌نماید. در تحقیق حاضر، با هدف دستیابی به آنزیمی با خصوصیات متفاوت نسبت به نوکلئازهای شناخته‌شده کنونی، ضمن جداسازی و همسانه‌سازی طول کامل cDNA رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی DNA هترو دوپلکس از گیاه جعفری

نوکلئازهای اختصاصی تکرشته که به نوکلئازهای خانواده S1/P1 نیز معروف می‌باشند، بطور اختصاصی مولکول‌های اسید نوکلئیک تکرشته‌ای و همچنین نواحی تکرشته‌ای موضعی در مولکول‌های دو رشته‌ای را هدف قرار می‌دهند (Desai & Shankar, 2003). شهرت نوکلئازهای این خانواده بیشتر به دلیل کاربردهای تحقیقاتی گسترده آنها می‌باشد. این آنزیم‌ها بطور گسترده در مطالعات تعیین ساختمان مولکولی اسیدهای نوکلئیک، نقشه‌یابی جهش‌ها و بررسی میان کنش‌های DNA با عوامل مولکولی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Drew, 1984). این نوکلئازها از منابع بسیار متعددی شامل میکروارگانیزم‌ها، گیاهان و جانوران جداسازی شده‌اند. با کشف اندونوکلئاز CEL I از گیاه کرفس (Oleykowski et al., 1998)، دسته جدیدی از آنزیم‌های نوکلئاز اختصاصی تکرشته با قابلیت برش اختصاصی در باند فسفودی‌استر مجاور ناحیه ۳' لوپ جفت‌شدگی ناجور در مولکول‌های DNA هترو دوپلکس به دنیا معرفی شد. در حال حاضر، تکنیک هضم قطعات DNA هترو دوپلکس مبتنی بر فعالیت آنزیمی CEL I و سایر نوکلئازهای مشابه آن به‌منظور شناسایی و آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی و درج و حذف‌های چند نوکلئوتیدی کوچک در جنبه‌های مختلف بیولوژی مولکولی و ژنتیک پزشکی مورد

پس از استخراج RNA کل با استفاده از محلول RNX-Plus Solution (Cinnagen co, Iran, Cat.No: RN7713C) و تعیین کمیت و کیفیت آن، رشته اول cDNA با استفاده از ۰/۵ میکروگرم RNA کل نمونه‌های گیاهی و کیت First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Co, Cat.No: K1611)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز گردید. پس از سنتز رشته اول cDNA، جهت تکثیر قطعات داخل ژنی، از واکنش‌های PCR در حضور ترکیبات مختلفی از جفت آغازگرهای دژنره استفاده گردید. در هر واکنش از ترکیب ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۳/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix ۱۰ میلی‌مولار، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر محصول واکنش RT، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و آب مقطر دیونیزه تا حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. پس از آماده‌سازی واکنش‌ها، برنامه PCR در ۳۸ چرخه به قرار: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه، واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دماهای مختلف (۵۶-۴۷ درجه سانتیگراد) بسته به توالی آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت شش دقیقه انجام شد. همچنین، به منظور تکثیر قطعات ژنی با طول کامل، از آغازگرهای هترولوگ و آنزیم DNA

(*Petroselinum crispum* L.) و نامگذاری این نوکلئازها به نام های PARS I و PARS II. ساختار مولکولی، خصوصیات بیوشیمیایی و جایگاه فیلوژنتیکی آنها در مقایسه با سایر نوکلئازهای هم‌خانواده مشخص گردید.

مواد و روش‌ها

بذرهای جعفری (رقم دامغان) از شرکت بهکود کرمان تأمین شد. گیاهان در گلخانه در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی با دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد پرورش داده شدند. از برگ گیاهان جعفری دو ماهه به منظور استخراج RNA استفاده گردید.

به‌منظور طراحی آغازگرهای دژنره، توالی آمینواسیدی رمزکننده معروفترین اندونوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit v. 7.0.9 و به روش ClustalW هم‌ردیف شدند. پس از هم‌ردیفی توالی‌ها، مناطقی که بیشترین مشابهت را نشان دادند، جهت طراحی آغازگرها انتخاب شدند. بدین ترتیب، هشت آغازگر دژنره مختلف جهت تکثیر قطعات مختلفی از ژن‌های رمزکننده نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته طراحی گردید (جدول ۱). پس از بررسی نتایج حاصل از تکثیر قطعات داخل ژنی، دو جفت آغازگر هترولوگ جهت تکثیر قطعه کامل رمزکننده دو آنزیم نوکلئاز اختصاصی تک‌رشته در گیاه جعفری طراحی گردید (جدول ۱). طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier v. 3.5 انجام شد.

پلیمراز (Fermentas Long PCR enzyme mix Co, Cat.No: K0181) با خاصیت تصحیح قرائت استفاده شد. در این PCR، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای جفت آغازگر Pifwd و Pirev و ۵۶ درجه سانتیگراد برای جفت آغازگر PIIifwd و PIIirev به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات داخلی (۸-۱) و طول کامل (۱۲-۹) ژنهای رمزکننده نوکلنازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس در گیاه جعفری.

Table 1- Oligonucleotide primers used to amplify internal (1-8) and full-length (9-12) fragments of genes encoding heteroduplex DNA specific nucleases in parsley.

شماره (No.)	نام آغازگر (Primer name)	توالی آغازگر (Primer sequence) 5' - 3'	طول قطعه مورد انتظار (Expected band size)	نوع آغازگر (Primer type)
1	PIF1	cgt cgc tgt gyg tnt ggc c	PIF1/PIR1~288bp	
2	PIF2	ctg gag cca ttc ara ayt tca c	PIF1/PIR2~387bp	
3	PIR1	cat gca tag gyt gat gda tat c	PIF2/PIR1~135bp	
4	PIR2	gta aga ata aty tct cka tcc c	PIF2/PIR2~234bp	دژنره
5	PIIF1	tac tgt aga gay tgc cay ga	PIIF1/PIIR1~445bp	(Degenerate)
6	PIIF2	gac cgg tgt gtn act ggn gc	PIIF1/PIIR2~275bp	
7	PIIR1	atg ctt tca gwa gcr tac	PIIF2/PIIR1~410bp	
8	PIIR2	atc att gtg tcc can acr tgr tg	PIIF2/PIIR2~240bp	
9	Pifwd	atg acg cga tta tat tct gtg ttc	Pifwd/Pirev~891bp	هترو لوگ
10	Pirev	tca tgc caa aga atg atc tgc g		(Heterologous)
11	PIIifwd	atg ggt atg ttg act tat ac	PIIifwd/PIIirev~933bp	
12	PIIirev	tta cac tat ttc aat att gtt ac		

پلاسمیدی pTZ57R/T انجام گرفت. جهت تراریزش، از سلولهای باکتری *E. coli* سویه JM107 استفاده شد. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer Co, Cat.No: K-) (3030-1) و به روش لیز قلیایی از سلولهای باکتری استخراج شدند. به منظور تأیید

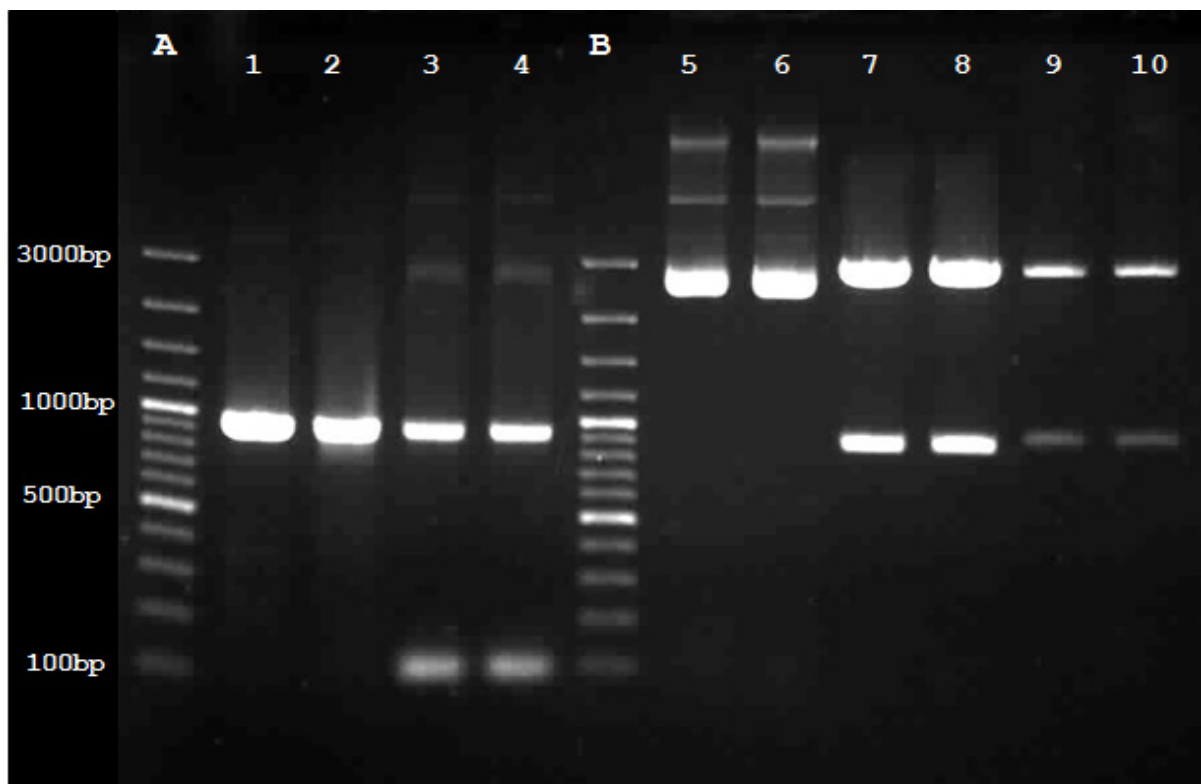
پس از آشکارسازی قطعات ژنی تکثیر شده در ژل الکتروفورز، قطعات مورد نظر با استفاده از کیت Silica Bead Gel Extraction Kit (Fermentas Co, Cat.No: K0513) خالص سازی شدند. همسانه سازی بر اساس سیستم T/A-cloning و با استفاده از کیت InsT/AClone™ PCR Cloning Kit (Fermentas Co, Cat.No: K1214) در ناقل

نتایج و بحث

جداسازی و همسانه‌سازی توالی‌های ژنی هدف تکثیر قطعه DNA منطبق بر اندازه مورد انتظار در واکنش‌های PCR با حضور جفت آغازگرهای PIF1/PIR2 (قطعه ۳۸۷ bp)، PIIF2/PIIR2 (قطعه ۲۷۵ bp) و PIIF1/PIIR2 (قطعه ۲۴۰ bp) محقق گردید. واکنش‌های PCR با حضور سایر آغازگرهای دژنره، نتیجه مورد انتظار را در پی نداشتند. پس از همسانه‌سازی و تعیین توالی قطعات تکثیر یافته، نتایج جستجوی BLAST نشان داد که قطعه ۳۸۷ bp تکثیر شده متعلق به زیرگروه آنزیمی CEL I و قطعات ۲۷۵ bp و ۲۴۰ bp تکثیر شده متعلق به زیرگروه آنزیمی CEL II از گروه نوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس در خانواده نوکلئازهای S1/P1 می‌باشند. واکنش‌های PCR جداگانه با استفاده از آغازگرهای هترو لوگ طول کامل، منتج به تکثیر دو قطعه DNA با اختلاف اندازه تقریبی ۵۰ bp گردید (شکل ۱). پس از همسانه‌سازی و تعیین توالی قطعات همسانه‌سازی شده، چارچوب قرائت ۸۹۱ bp جداسازی شده به نام *pars I* و چارچوب قرائت ۹۳۰ bp حاصل به نام *pars II* نامگذاری گردید.

پلاسمیدهای نو ترکیب و اطمینان از صحت قطعه درج شده، واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی مرتبط با هر قطعه و همچنین واکنش‌های هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم برشی *XbaI* و *BamHI* بر روی پلاسمیدهای نو ترکیب انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی قطعات همسانه‌سازی شده با استفاده از آغازگرهای عمومی M13/pUC که در بالادست و پایین دست قطعه درج شده بر روی ناقل pTZ57R/T قرار دارند، توسط شرکت بیونیر کره جنوبی مشخص شد.

پس از همسانه‌سازی و شناسایی توالی‌های کامل رمزکننده آنزیم‌های مورد نظر، توالی‌های نوکلئوتیدی مزبور با استفاده از نرم‌افزار آنالاین ExPASy translate (<http://web.expasy.org>) به توالی آمینواسیدی متناظر ترجمه شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی توالی‌های پروتئینی ترجمه شده با استفاده از برنامه‌های Compute Prosite, Protscale, pI/Mw و Signal P (<http://web.expasy.org>) و NETNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk>) مورد بررسی قرار گرفت. ساختار دوم و سوم پروتئین‌ها با استفاده از پایگاه نرم‌افزاری SWISS-MODEL (<http://web.expasy.org>)، و روابط فیلوژنتیکی آنها با سایر نوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس در نرم‌افزار MEGA v. 5.0 تعیین گردید.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش PCR تکثیر اختصاصی (A) و هضم آنزیمی *XbaI* و *BamHI* نمونه‌های پلاسمید نو ترکیب (B). نشانگر اندازه DNA: لدر ۱۰۰bp (Fermentas Co, Cat. No: SM0323); ۱ و ۳: تکثیر قطعه منطبق بر اندازه مورد انتظار (۸۹۱bp) به ترتیب مربوط به واکنش RT-PCR و پلاسمید نو ترکیب pParsI-TZ؛ ۲ و ۴: تکثیر قطعه منطبق بر اندازه مورد انتظار (۹۳۰bp) به ترتیب مربوط به واکنش RT-PCR و پلاسمید نو ترکیب pParsII-TZ؛ ۵: نمونه پلاسمید نو ترکیب pParsI-TZ؛ ۶: نمونه پلاسمید نو ترکیب pParsII-TZ؛ ۷ و ۸: قطعات برش یافته منطبق بر اندازه مورد انتظار (۸۹۱bp + ۲۸۸۶bp) حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pParsI-TZ؛ ۹ و ۱۰: قطعات برش یافته منطبق بر اندازه مورد انتظار (۹۳۰bp + ۲۸۸۶bp) حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pParsII-TZ.

Figure 2 - Electrophoresis of specific PCR products (A) and Restriction analysis of recombinant plasmids using *XbaI* and *BamHI* (B). DNA size marker: 100 bp DNA ladder (Fermentas Co, Cat. No: SM0323); 1 & 3: Amplification of DNA fragments with the expected size (891 bp) related to RT-PCR reaction and pParsI-TZ plasmid, respectively; 2 & 4: Amplification of DNA fragments with the expected size (930 bp) related to RT-PCR reaction and pParsII-TZ plasmid, respectively; 5: pParsI-TZ recombinant plasmid; 6: pParsII-TZ recombinant plasmid; 7 & 8: Excised DNA fragments with the expected sizes (891bp+2886bp) from pParsI-TZ plasmid; 9 & 10: Excised DNA fragments with the expected sizes (930bp+2886bp) from pParsII-TZ plasmid.

بررسی توالی و مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم‌های PARS I و PARS II توالی‌های رمزکننده نوکلئازهای PARS I و PARS II به ترتیب با شماره‌های دستیابی

JN974458 و JN974459 در بانک ژن به ثبت رسیدند. بررسی توالی آمینواسیدی ترجمه شده نشان داد که ژن‌های *pars I* و *pars II* به ترتیب ۲۹۶ و ۳۰۹ اسید آمینه را کد می‌نمایند که هر دو

بررسی توالی و مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم‌های PARS I و PARS II توالی‌های رمزکننده نوکلئازهای PARS I و PARS II به ترتیب با شماره‌های دستیابی

PARS I و PARS II در موقعیت‌های مشابهی قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، نه اسید آمینه حفاظت‌شده مرتبط با اتم‌های فلزی روی در نوکلئازهای PARS I و PARS II همانند سایر نوکلئازهای این خانواده بصورت حفاظت‌شده باقی مانده‌اند. یون‌های فلزی اغلب در تغییر سوبستراها و ایجاد ثبات ساختاری در مولکول پروتئین ایفای نقش می‌کنند. یون روی تا حد زیادی فعالیت DNase یی نوکلئازها را افزایش می‌دهد (Podzimek et al., 2011). با استفاده از برنامه Compute pI/Mw، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین ترجمه شده نوکلئاز PARS I به ترتیب برابر ۳۳/۹۴ کیلودالتون و $pH=6/2$ و برای نوکلئاز PARS II به ترتیب ۳۴/۸۱۹ کیلودالتون و $pH=6/45$ پیش‌بینی شد.

بر اساس ساختار آمینواسیدی نواحی دارای فعالیت RNase یی و DNase یی در نوکلئاز P1 (Maekawa et al., 1991)، دو ناحیه مربوط به فعالیت مشابه در نوکلئازهای PARS I و PARS II مشخص گردید. وجود این مناطق فعال، نشان از فعالیت نوکلئازی این دو آنزیم دارد. همچنین، اندازه‌گیری نمایه آبگریزی در برنامه Protoscale نشان داد که هر دوی این نوکلئازها دارای یک توالی بسیار آبگریز در انتهای آمینی خود می‌باشند.

پروتئین به خانواده نوکلئازهای S1/P1 تعلق دارند. همچنین بررسی دومن‌های حفاظت‌شده نشان داد که نوکلئاز PARS I دارای دومن اصلی S1/P1 (متشکل از اسیدهای آمینه ۲۳ تا ۲۸۷) و نوکلئاز PARS II نیز دارای دومن اصلی S1/P1 (متشکل از اسیدهای آمینه ۲۱ تا ۲۸۴) می‌باشند. این دومن‌ها در حقیقت، توالی پروتئین بالغ را تشکیل می‌دهند. همچنین، بر اساس جستجوی بلاست و با استفاده از توالی دومن اصلی نوکلئازهای PARS I و PARS II، پروتئین‌هایی که بیشترین همولوژی را نسبت به نوکلئازهای مزبور نشان دادند، مشخص شدند. بر این اساس، نوکلئازهای CEL I از کرفس و ZEN1 از گل آهار به ترتیب با ۹۹ و ۸۰ درصد تشابه توالی اسید آمینه، بیشترین شباهت ترادف را نسبت به نوکلئاز PARS I نشان دادند. از طرف دیگر، نوکلئاز CEL II از کرفس با داشتن ۹۵ درصد همولوژی توالی اسید آمینه، بیشترین شباهت ترادف را نسبت به نوکلئاز PARS II نشان داد.

پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II، تمام ویژگی‌ها و مشخصه‌های خاص اندونوکلئازهای خانواده S1/P1 را دارا می‌باشند (شکل ۲). نوکلئازهای این خانواده حاوی حداقل چهار سیستمین حفاظت‌شده هستند که این چهار سیستمین، دو پیوند دی‌سولفیدی درون‌مولکولی را ایجاد می‌نمایند و باعث بوجود آمدن ساختار سوم پروتئین می‌شوند (Iwamatsu et al., 1991; Maekawa et al., 1991). بررسی‌ها نشان داد که این سیستمین‌های حفاظت‌شده در اندونوکلئازهای

الف (A)

ب (B)

```

1 atgacgcgattatattctgtgtctctctctttgttggtctctgtagtgaaccgggtgtt
1 M T R L Y S V F F L L L A L V V E P G V
61 agagcctggagcaaaagaagccatgtcatgacatgcaaatgcccagggatctgttgag
61 W G K E G H F A I C K I A Q G F L T K D
21 R A W S K E G H V M T C Q I A Q D L L E
121 ccagaagcagacatctgtggaagatgtgttacggactatgctaatggcaactatcg
41 P E A A H A V K M L L P D Y A N G N L S
181 tcgtgtgtgtgtgctgacaaatcgacactgttacaagtacaggtggactagctct
61 S L C V W P D Q I R H W Y K Y R W T S S
241 ctccatttcattgataccctgatcaagcctgttcatttgattaccagagagactgcat
81 L H F I D T P D Q A C S F D Y Q R D C H
301 gatccacatggaggaggacatgtgtgtgtgctggagcattcaaaatccacatctcag
101 D P H G G E D M C V A G A I Q N F T S Q
361 ctggacattccggcaatctgctgatctgataataatgacagagctttgtta
121 L G H F R H G T S D R R Y N M T E A L L
421 tttttatcccaactcattggagatattcaatcagcctatgcatgttgattacaagtgt
141 F L S H F M G D I H Q P M H V G F T S D
481 atgggagaaacagctatagattggctgtgttcgccacaatcccaactgcacactgtt
161 M G G N S I D L R W F R H K S N L H H V
541 tgggatagagagattattctacagctgcagcagattaccatggttaagatagcactct
181 W D R E I I L T A A A D Y H G K D M H S
601 ctctacaagaacacagaggaactttacagagggtagtgggtgcaaacctgtgaatcc
201 L L Q D I Q R N F T E G S W L Q H V E S
661 tggaggaatgtgatctctacttgcccaaatagatgccaaggagagataaaaa
221 W K E C D D I S T C A N K Y A K E S I K
721 ctgactgtaactgggttacaaagatgtgaaactggcgaactctgtcagataaatac
241 L A C N W G Y K D V E S G E T L S D K Y
781 ttaacacagaagatgccaatgtcgaacgggatagctcaggtggaaatccgttatcc
261 F N T R M P I V M K R I A Q G G I R L S
841 atgatttgaaccgagctctctggagctccgcagatcaattcttggcatga
281 M I L N R V L G S S A D H S L A *
    
```

```

1 atgggtatgttgactatactgcaatttattttctgtcttactcctagtgtttcagc
1 M G M L T Y T A I Y F L L L L P S V F S
61 tggggaaggaaggacattttgcaatttgtaaaattgccaggggtcctactactaaagat
21 W G K E G H F A I C K I A Q G F L T K D
121 gcaactgactgcaatgaaagcattgctccagaatagccogattggttagcagotgtt
41 A L T A V K A L L P E Y A D G D L A A V
181 tgcctcgggtgatgaggttcgatttcaatgctgctggagtagccattacacatgtg
61 C S W A D E V R F H M R W S S P L H Y V
241 gacaagcctgatttcaggtgtaactataaactactgtagagattgcatgattctgttga
81 D T P D F R C N Y K Y C R D C H D S V G
301 oggaaagacoggtgtgttactggagcaatttacaactacacagagcaactctattgggt
101 R K D R C V T G A I Y N Y T E Q L L L G
361 gttcattgactggactcaaaatgaataacaactgacggaggcaactattgttctatca
121 V H D L D S K M N N L T E A L M F L S
421 catttctgttggtgatgctcactcactcactcactcactcactcactcactcactcact
141 H F V G D V H Q P L H V G F L G D E G G
481 aacacaattacogtccogtggatcggaggaaaccaattgcatcattgtatggagataca
161 N T I T V R W Y R R K T N L H H V W D T
541 atgatgatagaatccctctgaagacatttcaaatcagatctctctagcttaatacaa
181 M M I E S S L K T F Y N S D L S S L I Q
601 tctatccagagcaatattacaggtatctggttaccagacagctattctggagaaattgc
201 S I Q S N I T G I W L T D S L S W R N C
661 actgctgacaaagtgctgtgcccagaccctgattgcttgaagcagcagattggctgct
221 T A D Q V A C P D P Y A S E S I E L A C
721 aagtttgctacagaaatgccaccacaggaccatttaggagatgagtagctcctctct
241 K F A Y R N A T P G T T L G D E Y F L S
781 oggttgcctgtgtggagaaggctggcacaggctgggtccgttggctgctactctt
261 R L P V V E K R L A Q A G V R L A A T L
841 aaccgaattttacttcaaaaccagcaatctcaagaattgaattgcatatggttggga
281 N R I F T S K P S N L T R L N V H N G G
901 catagcagtaacaattgaaatagtgtaa
301 H S S N N I E I V *
    
```

شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی اندونوکلئازهای PARS I (الف) و PARS II (ب). کدون شروع با حروف بولد و کدون خاتمه با علامت ستاره مشخص شده است. اسیدآمینوهای سیستئین حفاظت شده دخیل در ایجاد پیوندهای دیسولفیدی در داخل دایره، نه اسیدآمینو حفاظت شده متصل شونده به سه اتم روی بصورت سایه دار، ترادف های آمینواسیدی سیگنال گلیکوزیلاسیون با خط زیرین، توالی سیگنال پپتید با حروف ایتالیک و مناطق دارای فعالیت RNase و DNase نیز به ترتیب در کادرهای مستطیل و بیضی مشخص شده اند.

Figure 2- Nucleotide and amino acid sequences of PARS I (A) and PARS II (B) endonucleases. Start codon is shown by bold letters and asterisk indicates the stop codon. Open circles: conserved cysteine residues involved in the formation of disulfide bonds; Shades: nine conserved residues interacting with Zn atoms; underlines: potential N-glycosylation sites; Italics: signal peptide sequence; Rectangular: site with RNase activity; Oval: site with DNase activity.

یک توالی سیگنال پپتید به طول ۲۲ اسیدآمینو در انتهای آمینی خود می باشد. منطقه برش نیز در بین اسیدآمینوهای Ala22 و Trp23 مشخص گردید که این برش توسط آنزیم سیگنال پپتیداز انجام می شود. در نوکلئاز PARS II، توالی سیگنال پپتید

لذا به منظور تعیین حضور توالی سیگنال پپتید در انتهای آمینی این نوکلئازها، توالی رمزکننده آنها با استفاده از برنامه SignalP 4.0 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی نوکلئاز PARS I نشان داد که این نوکلئاز دارای

خود برای گلیکوزیله شدن، در مسیر ترشحي سلول قرار می‌گیرند.

بررسی ساختمان دوم و مدلسازی مولکولی

پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II

ساختمان دوم و سوم نوکلئازهای PARS I و PARS II با استفاده از مجموعه نرم‌افزاری SWISS-MODEL مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی توالی بالغ این نوکلئازها نشان داد که ساختمان دوم و سوم هر دوی آنها متشکل از ۱۷ مارپیچ آلفا و پنج رشته بتا می‌باشد. بررسی ساختمان سوم با استفاده از مدل‌سازی مبتنی بر همولوژی، یک ابزار کمکی جهت ارزیابی خصوصیات پروتئین‌های مورد مطالعه است. جهت بررسی ساختمان سه‌بعدی نوکلئازهای PARS I و PARS II به ترتیب از ساختار کریستالی نوکلئاز TBN-1 از گوجه‌فرنگی (با شماره دستیابی 3sng در پایگاه PDB) و نوکلئاز ENDO2 از آرابیدوپسیس (با شماره دستیابی 3w52 در پایگاه PDB) به عنوان الگو استفاده شد. هر دوی این نوکلئازها به خانواده S1/P1 تعلق داشته و به ترتیب ۷۶/۷۸ درصد و ۵۷/۷۴ درصد تشابه توالی با نوکلئازهای PARS I و PARS II نشان می‌دهند. این میزان تشابه برای ایجاد مدل‌های سه بعدی قابل اطمینان کافی است (Podzimek et al., 2011). نتایج حاصل، نشان از اهمیت اسیدآمینه تریپتوفان انتهای آمینی برای فعالیت این پروتئین‌های آنزیمی داشت. انتهای آمینی در تمام اندونوکلئازهای این خانواده از

به طول ۲۰ اسیدآمینه با منطقه برش در بین اسیدآمینه‌های Ser20 و Trp21 مشخص شد (شکل ۲). بنابراین، پروتئین بالغ در هر دو نوکلئاز با اسیدآمینه تریپتوفان آغاز خواهد شد. نتیجه حاصل با قانون "۱-، ۳-" نیز مطابقت دارد، زیرا هر دو اسیدآمینه Val20 و Ala22 در نوکلئاز PARS I و اسیدآمینه‌های Val18 و Ser20 در نوکلئاز PARS II، کوچک و غیرقطبی می‌باشند (Von Heijne, 1985; Nielsen et al., 1997).

جهت تعیین سیگنال‌های گلیکوزیلاسیون، توالی آمینواسیدی نوکلئازهای مورد مطالعه در پایگاه PROSITE و همچنین در نرم‌افزار آنالاین NETNGlyc 1.0 بر اساس حضور توالی Asn- Xaa-Ser/Thr (Marshall, 1979) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل مشخص گردید که نوکلئاز PARS I دارای چهار سیگنال گلیکوزیلاسیون متشکل از NLSS در موقعیت ۵۸، NFTE در موقعیت ۱۱۶، NMTE در موقعیت ۱۳۴ و NFTE در موقعیت ۲۰۸ می‌باشد. بر این اساس، پنج سیگنال گلیکوزیلاسیون در نوکلئاز PARS II نیز به ترتیب زیر مشخص گردید: NYTE در موقعیت ۱۱۲، NLTE در موقعیت ۱۳۱، NITG در موقعیت ۲۰۵، NCTA در موقعیت ۲۱۹ و NLTR در موقعیت ۲۹۰ (شکل ۲). مقایسه این مناطق با سایر نوکلئازهای اختصاصی تکررشته نشان می‌دهد که تمامی این نوکلئازها دارای اسپارژین‌های گلیکوزیله شونده مشابهی می‌باشند. بنابراین، دو نوکلئاز PARS I و PARS II نیز مانند سایر نوکلئازهای هم‌خانواده

خارجی پروتئین قرار گرفته‌اند. تعیین موقعیت اسپارژین‌های گلیکوزیله شونده بر روی ساختمان سه‌بعدی نوکلئازهای PARS I و PARS II نیز نشان داد که این اسپارژین‌ها بر روی سطح خارجی پروتئین قرار گرفته و با اتصال به واحدهای گلیکان، باعث افزایش ثبات پروتئین و مقاومت در برابر پروتولیز می‌شوند (شکل ۳).

مقایسه ساختمان نوکلئازهای PARS I و PARS II نشان داد که اگرچه این دو نوکلئاز تنها ۴۹ درصد شباهت ساختمان اول نسبت به یکدیگر نشان می‌دهند، ولی در سطح ساختمان سوم، بسیار به یکدیگر شبیه می‌باشند. البته وجود این شباهت در ساختار سه‌بعدی نمی‌تواند دلیل بر عملکرد یکسان این دو نوکلئاز باشد. چنین موضوعی در مورد دو نوکلئاز CEL I و CEL II نیز دیده می‌شود که این دو نوکلئاز با داشتن تنها ۴۵ درصد شباهت در سطح آمینواسیدی و وجود شباهت بسیار بالا در ساختار سوم، فعالیت آنزیمی متفاوت، وزن مولکولی متفاوت و خصوصیات ساختاری و عملکردی متفاوتی نسبت به یکدیگر نشان می‌دهند (Shandilya et al., 2009). به طور کلی، وجود شباهت در ساختار سه‌بعدی اندونوکلئازهای گیاهی را می‌توان تا حد زیادی به حضور مناطق فعال حفاظت‌شده در این نوکلئازها نسبت داد.

ساختار مشابهی برخوردار است و اسیدآمینو ترپتوفان در حفره منطقه فعال پروتئین قرار می‌گیرد. ترپتوفان انتهای آمینی با استفاده از بخش‌های آمینو و کربونیل خود، یکی از یون‌های روی را درگیر می‌نماید (Podzimek et al., 2011). این موضوع بایستی در تولید و فعالسازی پروتئولیتیک این آنزیم‌ها و بطور کلی در روش‌های تولید نوترکیب آنها مدنظر قرار گیرد. هماهنگی میان سه اتم روی در منطقه فعال نوکلئازهای گیاهی به احتمال زیاد در نوکلئازهای مورد مطالعه نیز وجود خواهد داشت. مشاهده مدل‌های سه‌بعدی نشان می‌دهد که سه اتم روی در مرکز پروتئین قرار گرفته و دو صفحه بتا نیز در خلاف جهت یکدیگر و در سطح خارجی پروتئین قرار می‌گیرند. نحوه آرایش صفحات بتا به گونه‌ای است که یک ساختار ته‌سنجاقی را ایجاد می‌نمایند. این درحالی است که ماریچ‌های آلفا بصورت درهم قرار گرفته و دارای نظم خاصی نسبت به یکدیگر نمی‌باشند (شکل ۳).

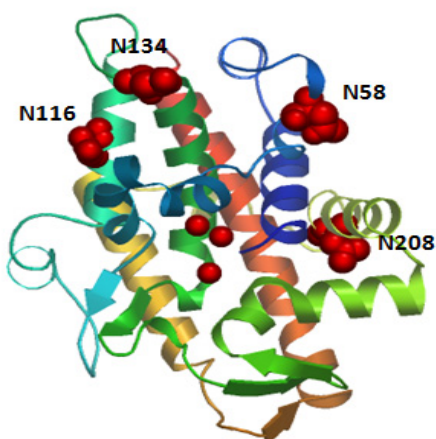
همچنین، جایگاه پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار سه‌بعدی پروتئین، مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس، در نوکلئاز PARS I سیستمین‌های ۹۱، ۹۹ و ۲۲۴ به ترتیب با سیستمین‌های ۲۴۳، ۱۰۹ و ۲۳۰، و در نوکلئاز PARS II نیز سیستمین‌های ۳۰ با ۶۱، ۹۵ با ۱۰۵ و ۲۲۰ با ۲۲۷ پیوند دی‌سولفیدی تشکیل می‌دهند. پیوندهای دی‌سولفیدی در هر دو نوکلئاز، در فاصله کمی از یکدیگر و در سطح

بررسی فیلوژنتیکی پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II

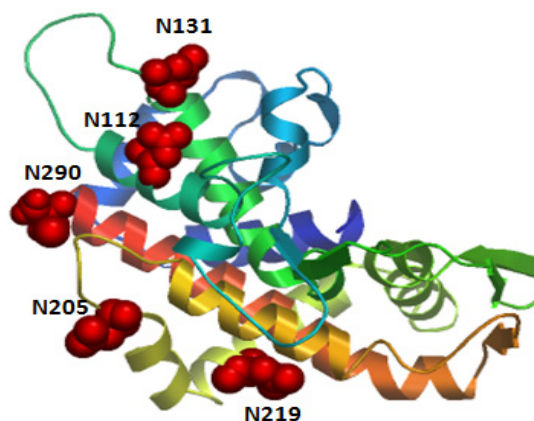
اصلی پروتئین‌های این خانواده، جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. نتایج نشان داد که نوکلئازهای گیاهی به دو زیرگروه CEL I و CEL II تقسیم می‌شوند. در این گروه‌بندی، نوکلئاز PARS I در زیرگروه CEL I و نوکلئاز PARS II در زیرگروه CEL II قرار گرفت (شکل ۴).

از آنجا که تاکنون بررسی فیلوژنتیکی جامعی بر روی نوکلئازهای خانواده S1/P1 صورت نگرفته بود، از توالی پروتئینی بالغ مهمترین نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته، مرتبط با دومن

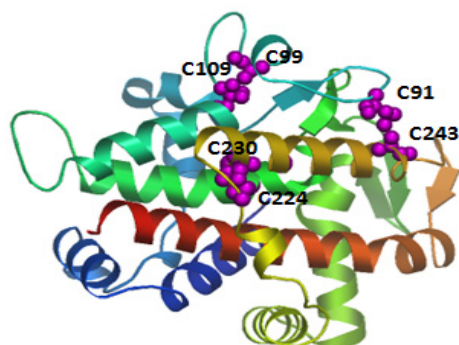
(a₁)



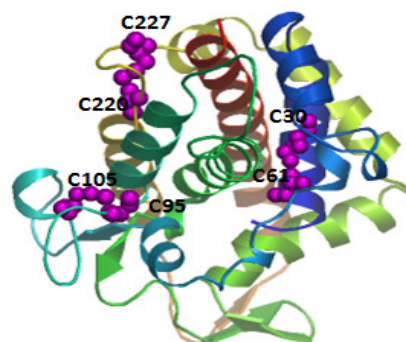
(b₁)



(a₂)

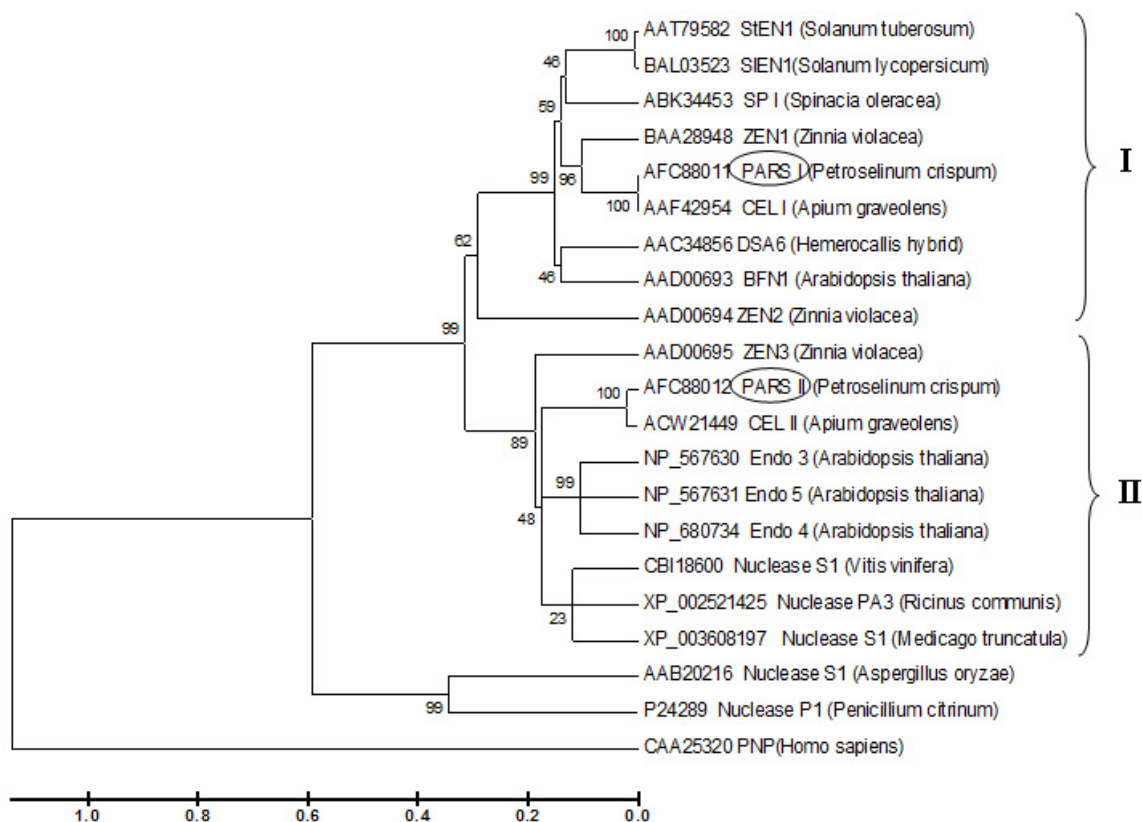


(b₂)



شکل ۳- مدل ساختار سه‌بعدی نوکلئازهای PARS I (a) و PARS II (b) ایجاد شده با استفاده از پایگاه SWISS-MODEL. a₁ و a₂: اجزای ساختار دوم (مارپیچ‌های آلفا، رشته‌ها و چرخش‌های بتا)، اتم‌های روی (سه دایره مستقل) و موقعیت آسپارژین‌های گلیکوزیله شونده؛ b₁ و b₂: موقعیت اسیدآمینوهای سیستئین و پل‌های دی‌سولفیدی حفاظت‌شده.

Figure 3- The 3-D structure models of PARS I (a) and PARS II (b) proteins created by SWISS-MODEL server. a₁ and b₁: α -helices, β -sheets, beta hairpin, zinc ions (single bulbs) and glycosylated asparagine residues (aggregated bulbs) are clearly visible. a₂ and b₂: Magenta bulbs represent positions of disulphide bonds.



شکل ۴- آنالیز فیلوژنتیکی توالی آمینواسیدی اندونوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس با استفاده از نرم افزار MEGA v5.0 (Tamura et al., 2011) به روش Neighbor-Joining و با ارزش بوتستراب ۱۵۰۰. توالی آمینواسیدی آنزیم پورین نوکلئوزید فسفوریلاز انسانی بعنوان برون گروه مورد استفاده قرار گرفت. شماره های موجود بر روی شاخه ها، نشان دهنده ارزش بوتستراب می باشند.

Figure 4- Phylogenetic analysis of amino acid sequences of heteroduplex DNA specific endonucleases using MEGA v5.0 software (Tamura et al., 2011) with the Neighbor-Joining method and 1500 Bootstrap value. Amino acid sequence of human Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) enzyme was used as out-group. The numbers on branches indicate bootstrap values.

است، می توان فعالیت آنزیمی قوی تر عصاره آنزیمی جعفری ایرانی در برش سوبسترای DNA هترو دوپلکس را تا حد زیادی به فعالیت متفاوت آنزیم PARS II نسبت داد. نتایج حاصل از جداسازی و توالی یابی نوکلئازهای PARS I و PARS II نیز این احتمال را تقویت می نماید.

فعالیت نوکلئازی قوی تر عصاره آنزیمی گیاه جعفری در مقایسه با گیاه کرفس علی رغم سطح پایین بیان آنزیم متناظر CEL I (آنزیم PARS I) در این گیاه قبلا گزارش شده بود (Zolala et al., 2009). با توجه به این که بیان آنزیم PARS I در جعفری کمتر از بیان آنزیم CEL I در کرفس

هترودوپلکس در عصاره جعفری قبلاً به اثبات رسیده است، ولی در حال حاضر هیچ اطلاعی از میزان فعالیت هر یک از این دو نوکلئاز، مکانیزم فعالیت و ترجیح سوبسترای آنها در دست نیست. دستیابی به این اطلاعات ارزشمند، مستلزم بررسی فعالیت نمونه خالص و یا فرم نوترکیب این نوکلئازها بر روی سوبسترای DNA هترودوپلکس است.

مقایسه توالی نوکلئازهای PARS I و CEL I نشان داد که این دو نوکلئاز تنها در دو اسیدآمینو با یکدیگر اختلاف دارند. درحالی که نوکلئازهای PARS II و CEL II، اختلاف بیشتری نسبت به یکدیگر نشان می‌دهند. بنابراین، انتظار می‌رود که نوکلئاز PARS I فعالیتی مشابه نوکلئاز CEL I داشته باشد، اما نوکلئاز PARS II فعالیت آنزیمی خود را با شدت متفاوتی نسبت به نوکلئاز CEL II بروز دهد. فعالیت آنزیمی برش DNA

منابع

- Aoyagi S, Sugiyama M, Fukuda H (1998). BFN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Letters* 429: 134-138.
- Desai NA, Shankar V (2003). Single-strand specific nucleases. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 457-491.
- Doetsch PW, McCray Jr WH, Lee K, Bettler DR, Valenzuela MRL (1988). Nuclease SP1: a novel enzyme from spinach that incises damaged duplex DNA preferentially at site of adenine. *Nucleic Acid Research* 16: 6935-52.
- Drew HR (1984). Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *Journal of Molecular Biology* 176: 535-557.
- Henikoff S, Comai L (2003). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 54: 375-401.
- Iwamatsu A, Aoyama H, Dibo G, Tsunasawa S, Sakiyama F (1991). Amino acid sequence of nuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry* 110: 151-8.
- Larsen K (2005). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding endonuclease from potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology* 162: 1263-1269.
- Laskowski SM (1980). Purification and properties of the mung bean nuclease. *Methods Enzymology* 65: 263-275.
- Maekawa K, Tsunasawa S, Dibo G, Sakiyama F (1991). Primary structure of nuclease PI from *Penicillium citrinum*. *European Journal of Biochemistry* 200: 651-661.
- Marshall RD (1979). Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 41: 673-702.
- Matousek J, Podzimek T, Pouckova P, Stehlik J, Skvor J, Soucek J, Matousek J (2009). Antitumor effect and cytotoxicity of recombinant plant nucleases. *Oncology Research* 18: 163-171.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-10.
- Nomura A, Suno M, Mizuno Y (1971). Studies on 3'-nucleotidase nuclease from potato tubers, Purification and some properties of the enzyme. *Journal of Biochemistry* 70: 993-1001.

- Oleykowski CA, Mullins CRB, Godwin AK, Yeung AT (1998). Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research* 26: 4597-4602.
- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B, Walker EL (1999). Identification of senescence associated genes from daylily petals. *Plant Molecular Biology* 40: 237-48.
- Perez-Amador MA, Ablor ML, DeRocher EJ, Thompson DM, Van Hoof A, LeBrasseur ND, Lers A, Green PJ (2000). Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 169-179.
- Podzimek T, Matousek J, Lipovova P, Pouckova P, Spiwok V, cek J (2011). Biochemical properties of three plant nucleases with anticancer potential. *Plant Science* 180: 343-351.
- Shandilya H, Gerard GF, Qiu P (2009). Nucleic acid sequences encoding CEL II endonuclease. United States Patent, US7560261B2.
- Sung SC, Laskowski Sr M (1962). A nuclease from mung bean sprouts. *Journal of Biological Chemistry* 237: 506-11.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor GR, Deeble J (1999). Enzymatic methods for mutation scanning. *Genetic Analysis* 14: 181-6.
- Till BJ, Bortner C, Comai L, Henikoff S (2004). Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Research* 32: 2632-2641.
- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M, Bendahmane A (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *The Plant Journal* 51: 1116-1125.
- Von Heijne G (1985). Signal sequences. *Journal of Molecular Biology* 184:99-105.
- Zolala J, Bahrami AR, Farsi M, Matin M, Yassae V (2009). Comparison of CEL I gene expression and mismatch cleavage activity in some Apiaceae plants. *Molecular Breeding* 24: 17-24.

Isolation, cloning and molecular characterization of genes encoding single-strand specific endonucleases from Parsley (*Petroselinum crispum* L.)

Mirzaei M.¹, Zolala J.*², Shalouzad A.¹

¹ M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

² Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Single-strand specific (sss) nucleases (S1/P1 family) are widely used in molecular genetics studies. The most widely used sss-nucleases are those plant endonucleases with the ability of specific cleavage of mismatch loops in heteroduplex DNA molecules. Because of the valuable activity of these endonucleases, enzymatic cleavage of heteroduplex DNA molecules is one of the most common techniques of point mutation detection in genomes. In this study, gene sequences encoding single-strand specific endonucleases were isolated from parsley (*Petroselinum crispum* L.) using heterologous primers in PCR reactions. The isolated gene sequences, after cloning and molecular identification, were designated as *pars* I and *pars* II. Physicochemical, structural and phylogenetic analysis using software tools, verified PARS I and PARS II as two members of S1/P1 family with a substantial homology to heteroduplex DNA specific endonucleases. However, it is essential to produce pure enzyme preparations as native or recombinant forms to determine mechanisms of activity and substrate preferences of these nucleases on heteroduplex DNA substrates.

Key words: *single-strand specific nucleases, Petroselinum crispum, Enzymatic cleavage of heteroduplex DNA, cloning.*

* Corresponding Author: Zolala J.

Tel: 03431322654

Email: j.zolala@uk.ac.ir