

Cloning and investigation of celery plant Mannose-6-phosphate reductase (*M6PR*) gene expression in *E. coli* bacteria to control the catabolism pathway

Abbasali Yadollahi 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Payame Noor University, P.P. 193954697, Tehran, Iran. E-mail address: hi.a@live.com

Ghazal Ghajari 

MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail address: ghajari.ghazal74@gmail.com

Abstract

Objective

Compared to other primary photosynthetic products (such as sucrose and starch), little is known about sugar metabolism and how it is integrated with others. Mannose-6-phosphate reductase (M6PR) is a key enzyme involved in mannitol biosynthesis in celery. This study aimed to clone the gene, express and purify the M6PR enzyme and investigate its function on mutated genes in a laboratory environment.

Materials and methods

First, the mRNA was extracted from the celery plant, then the cDNA was synthesized, and the product was used as a template to amplify the M6PR gene. The PCR product was purified in a DNA gel extraction kit. The purified PCR product was cloned into the pTZ57R vector according to the T/A Cloning recipe (Fermentase Company). Susceptible cells of *E. coli* strain Top10 were prepared using the biochemical method of calcium chloride, and the recombinant vector inside it was transformed and cultured on a plate containing ampicillin. The cloning accuracy was done using M6PR gene PCR and enzymatic digestion of the recombinant plasmid by BamHI and SacI enzymes (Fermentase Company). The M6PR gene was homogenized in the expression plasmid pET32a and transferred into *E. coli strain BL21*. The promoter was induced with IPTG and analyzed by western blotting. The protein was purified by affinity chromatography column (His. Tag/S.Tag).

Results

The results showed that the enzyme could identify the heteroduplex regions of the gene. The recombinant M6PR purified from *Escherichia coli* had specific molecular activity. The results of double digestion of the plasmid with *SacI* and *BamHI* enzymes were 2870 bp and 186 bp fragments. According to the blast test result, the current fragment had 100% similarity with the M6PR gene of the celery plant. M6PR recombinant gene transcription results showed that the M6PR recombinant gene transcription rate was 2.3 in the transgenic strains and 0.32 in control, which showed a statistically significant difference at the $P < 0.01$ level. After induction of the promoter and sampling at different times, the samples on the SDS-PAGE gel showed a protein band in the region of 42 kDa, indicating the protein's successful expression.

Conclusions

Homology of M6PR enzyme gene obtained from celery plant and then recombinant production of this enzyme in the laboratory can lead to its high expression in the prokaryotic system so that the enzyme has activity. Also, the present study showed that plant enzymes are active when expressed in bacteria and can be used as a suitable source to accelerate catabolic activity.

Keywords: M6PR enzyme, western blotting, pET32a plasmid, recombinant protein, affinity chromatography.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Yadollahi A, Ghajari Gh (2023) Cloning and investigation of celery plant Mannose-6-phosphate reductase (*M6PR*) gene expression in *E. coli* bacteria to control the catabolism pathway. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 199-216.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 199-216. DOI: 10.22103/jab.2023.20151.1425

Received: March 11, 2023.

Received in revised form: May 20, 2023.

Accepted: May 21, 2023.

Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors


همسانه سازی، و بررسی بیان ژن *Mannose-6-phosphate reductase (M6PR)* گیاه

کرفس در باکتری اشرشیاکلی جهت کنترل مسیر کاتابولیسم

عباسعلی یداللهی 

*نویسنده مسئول: استادیار، عضو هیات علمی گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ص.پ. ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷، تهران، ایران.

رایانامه: hi.a@live.com

غزل قجری 

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

رایانامه: ghajari.ghazal74@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱

چکیده

هدف: اطلاعات کمی در مورد متابولیسم قند و نحوه ادغام آن با سایر مواد، در مقایسه با سایر محصولات فتوسنتزی اولیه (مانند ساکارز و نشاسته) وجود دارد. *Mannose-6-phosphate reductase (M6PR)* یک آنزیم کلیدی است که در بیوسنتز مانیتول در کرفس نقش دارد. هدف از این پژوهش همسانه سازی ژن، بررسی بیان ژن و تخلیص آنزیم *M6PR* و بررسی عملکرد آن بر روی ژن های جهش یافته در محیط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش ها: ابتدا استخراج mRNA از گیاه کرفس انجام شد و سپس سنتز cDNA صورت گرفت و محصول به عنوان الگو در تکثیر ژن *M6PR* مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR توسط کیت استخراج DNA از روی ژل، تخلیص شد. محصول PCR خالص شده مطابق با دستور العمل Cloning T/A (فرمنتاز) در ناقل pTZ57R همسانه سازی شد. سلول مستعد *E. coli* سویه *Top10* با استفاده از روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم تهیه شد و وکتور نوترکیب درون آن ترانسفورم و روی پلیت حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند. صحت کلونینگ با استفاده از PCR ژن *M6PR* و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های *SacI* *BamHI* (شرکت فرمنتاز) انجام گرفت. سپس ژن *M6PR* در پلاسمید بیانی *pET32a* همسانه سازی شد و درون باکتری *E. coli* سویه *BL21* انتقال داده شد. پیشبر ژن با IPTG القا شد و با وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین تولید شده با ستون کروماتوگرافی تمایلی (His.Tag/S.Tag) تخلیص شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که آنزیم می‌تواند نواحی هترودوبلکس ژن را شناسایی کند. M6PR نوترکیب خالص شده از اشریشیا کلی، دارای فعالیت خاص مولکولی بود. نتایج حاصل از هضم دوگانه پلاسمید با آنزیم‌های *SacI* و *BamHI*، قطعات ۲۸۷۰ جفت بازی و ۱۸۶ جفت بازی بود. قطعه حاضر مطابق با نتیجه از مون بلاست شباهت ۱۰۰ درصدی با ژن M6PR گیاه کرفس داشت. نتایج بررسی رونویسی ژن نوترکیب M6PR نشان داد که میزان رونویسی ژن نوترکیب M6PR در سویه‌های تراریخت برابر با ۲/۳ و در کنترل ۰/۳۲ به دست آمد که تفاوت معناداری در سطح $P < 0.01$ را از نظر آماری نشان دادند. پس از القای پیشبر و نمونه برداری در زمان‌های مختلف، نمونه‌ها روی ژل SDS-PAGE باند پروتئینی در ناحیه 42 کیلو دالتون را نشان داد که نشان دهنده بیان پروتئین به صورت موفقیت آمیز بود.

نتیجه‌گیری: همسانه سازی ژن آنزیم M6PR بدست آمده از گیاه کرفس و به دنبال آن تولید این آنزیم به صورت نوترکیب در آزمایشگاه می‌تواند منجر به بیان بالای آن در سیستم پروکاریوتی شود به طوریکه آنزیم دارای فعالیت باشد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که آنزیم‌های گیاهی وقتی در باکتری بیان می‌شوند، فعال می‌باشند و می‌توانند به عنوان منبع مناسب برای تسریع فعالیت کاتابولیک استفاده شوند.

کلیدواژه‌ها: آنزیم M6PR، وسترن بلاتینگ، پلاسمید pET32a، پروتئین نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: یداللهی عباسعلی، قجری غزل (۱۴۰۲) همسانه سازی، و بررسی بیان ژن Mannose-6-phosphate reductase (*M6PR*) گیاه کرفس در باکتری اشریشیاکلی جهت کنترل مسیر کاتابولیسیم. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۱۹۹-۲۱۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

شرایط تنش‌ی مانند شوری، خشکسالی و دماهای کم عوامل محدودکننده تاثیرگذار در بهره‌وری و توزیع گیاه در سراسر جهان هستند (Fita et al. 2015). همه این شرایط موجب کمبود آب سلول‌های گیاهی شده و در طولانی مدت اثرات شدیدی بر روی گیاه ایجاد می‌کند. شوری، به خودی خود، باعث اثرات هیپراسموتیک و هیپرتونیک می‌شود (Zwiewka et al. 2015). اثر حرکتی هنگامی اعمال می‌شود که املاح خارج از سلول فشار اسمزی بالایی داشته باشد؛ این امر موجب می‌شود که سلول‌ها قادر به تامین نیازهای خود به آب نباشند. به علت وجود اثر هیپرتونیک، غلظت یون‌های سدیم در منطقه رشد ریشه بالا می‌رود که منجر به سمیت سدیم می‌شود. تابحال چندین استراتژی برای مهندسی تحمل به شوری در محصولات مهم اقتصادی بررسی شده است

(Callender et al. 2021). ژن هایی مهم دخیل در سازگاری گیاهان و بقا در شرایط شدید شوری را می توان به پنج گروه عمده گروه بندی کرد. گروه اول شامل ژن هایی است که در جذب Na دخیل هستند. گروه دوم شامل ژن هایی است که مسئول سم زدایی از گونه های فعال اکسیژن (ROS) هستند. گروه سوم شامل ژن هایی می شود که برای فعال سازی رونویسی ژن های پایین دست برای سازگاری با تنش شوری مورد نیاز هستند. گروه چهارم شامل ژن های کدکننده پروتئین ها و چاپرون هایی هستند که تحت شرایط شوری تنظیم می شوند. گروه پنجم شامل کدگذاری ژن هایی برای املاح سازگار و محافظت کننده اسمزی مانند گلاسیسین، بتائین، مانیتول و پرولین است (Khalil et al. 2017). املاح سازگار آلی (به عنوان مثال پرولین، الکل قند، تری هالوز، ترکیبات آمونیاک و ترکیبات سولفونیک) غیر سمی هستند. متابولیت هایی با وزن مولکولی کم که با غلظت بالا در سیتوزول بدون تداخل یا از بین رفتن و کاهش پتانسیل اسمزی سلول ها تجمع می یابند. بنابراین، مطالعات گسترده ای روی این املاح برای بهبود تحمل به شوری در محصولات اقتصادی مهم انجام شده است (McParland et al. 2021). الکل های قندی مانند مانیتول، گالاکتیتول و سوربیتول از نظر شیمیایی نمایانگر کاهش شکل آلدوز یا قند کتوز در گیاهان هستند (Msomi et al. 2021). مانیتول به طور طبیعی در گونه های گیاهی (گیاه قهوه، کرفس، درخت زیتون و آووکادو) و باکتری های متعدد تولید می شود و تخمین زده شده است که حدود ۳۰ درصد از کل کربن ثابت فتوسنتزی در گیاهان به شکل الکل قند تبدیل می شوند (Sánchez et al. 2002). اگرچه قند الکل ها شکل غالب کربوهیدرات های جابه جا شده (عمدتاً به شکل سوربیتول، مانیتول و گالاکتیتول) در گیاهان عالی هستند؛ اما همیشه به قندهایی مانند ساکارز و رافینوز تبدیل می شوند (Slavin et al. 2003). معمولاً فقط یک نوع الکل قند در خانواده های گیاهی موجود یا غالب است مانند سوربیتول که مشخصه خانواده گل سرخیان (آلو، گیلاس و سیب) است (Walker et al. 2020). مانیتول یکی از رایج ترین قند الکل های گیاهان است که در بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی از جمله بسیاری از محصولات زراعی مانند هویج، جعفری، کرفس، لوبیا سبز، کلم، کدو تنبل، قهوه و درختان زیتون یافت می شود (Xiaotang et al. 2018). گونه های گیاهی مانند کرفس، قهوه و زیتون که مانیتول تولید می کنند، تحمل به تنش کم آبی قابل توجهی دارند؛ و به دلیل داشتن گروه های هیدروکسیل آب مانند، می توانند باعث هیدراتاسیون ماکرومولکول ها شوند (Ladhari et al. 2022). همچنین مشخص شده است که مانیتول به عنوان یک پاک کننده واکنش عمل کرده و از پراکسیداسیون لیپیدها که می تواند منجر به آسیب در غشاء شود، جلوگیری می کند (Apak et al. 2022). علاوه بر این، تولید مانیتول به عنوان یک سازوکار مکمل برای از بین بردن کاهش توان گیاه و انباشته شدن NADPH در طول واکنش های نوری فتوسنتز عمل می کند. بنابراین، تولید مانیتول به خودی خود سازوکار دفاعی گیاه در برابر تنش است (Meena et al. 2015). ژن بیوسنتز مانیتول ابتدا از باکتری *E. coli* جداسازی شده و مورد مطالعه قرار گرفت. ژن *mtlD* که از آن همسانه سازی شد، آنزیم مانیتول-۱-فسفات دهیدروژناز را کد می کند، این آنزیم مسئول سنتز و کاتابولیسم مانیتول است. افزایش تحمل به شوری در بسیاری از گیاهان تراریخته (تنباکو، بادمجان، گندم، صنوبر، سورگوم و سیب زمینی) بیان کننده ژن *mtlD* گزارش شده است (Bhauso et al. 2014).

نقش ژن *M6PR* در تولید مانیتول در گیاه کرفس مطالعه شده است. مطالعات C۱۴ رادیواکتیو نشاندار در کرفس نشان داد که مانوز-فسفات (*M6P*) و مانیتول-۱-فسفات از جمله محصولات اولیه فتوسنتزی در برگ کرفس هستند. محققان آنزیم *M6P* را از عصاره برگ کرفس استخراج کردند. این آنزیم توانایی کاهش محصول اولیه فتوسنتزی *M6P* یعنی قند آلدو کتو به مانیتول-۱-فسفات را داشت که از طریق فسفر غیر اختصاصی به مانیتول تبدیل می‌شود (Williamson et al. 1995). محققان دیگری ژن *M6PR* را معرفی کرده اند و سپس نشان داده شد که گیاه کرفس بیان کننده ژن مانوز ۶-فسفات ردوکتاز (*M6PR*) تولید مانیتول بیشتری داشته و در شرایط تنش رشد طبیعی دارد (Meena et al. 2015). به علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم های مولکولی در زمره مهم ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی ۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می کند کنترل می شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می شود و نیز بیان ژن ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت هایی که آن محصول را می سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن ها و پروتئین های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). از این رو بررسی بیان و جدا سازی این ژن از برگ های کرفس از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در تحقیق حاضر هدف همسانه سازی ژن آنزیم *M6PR* بدست آمده از گیاه کرفس و به دنبال آن تولید این آنزیم به صورت نوترکیب در آزمایشگاه و بیان آن در سیستم پروکاریوتی بود طوریکه آنزیم دارای فعالیت باشد.

¹ DNA

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج ژنوم: قطعه کوچکی از ساقه گیاه کرفس در زیر هود به صورت قطعات ریزی بریده شد و داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری استریل ریخته شد و با استفاده از کیت RNX puls /lysis Buffer و کلوفرم mRNA آن استخراج شد. بر اساس ترادف ژن M6PR در بانک ژنی (U83687.1) دو آغازگر برای تکثیر آن توسط نرم افزار تحت وب پرایمر ۳ طراحی و توسط شرکت متابیون (آلمان) ساخته شد که جایگاه آنزیمی آن در بالادست و پایین دست آغازگرها خارج از جایگاه ژن M6PR طراحی شد. توالی آغازگر بالادست دارای جایگاه برش برای آنزیم *BamHI* : 5'- GAAGGTGTTTGGGAGGTTGA -3' و توالی آغازگر پایین دست دارای جایگاه برش برای آنزیم *SacI* : 5'- GGTGCGTCTCGATCTGATTT-3' با واکنش RT-PCR به کمک آنزیم نسخه بردار معکوس cDNA آن ساخته شد (Piri-Gharaghie et al. 2022). برای تهیه cDNA مواد زیر در یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی لیتری ریخته شدند:

جدول ۱. برنامه انجام واکنش RT-PCR برای تولید cDNA

Table 1. RT-PCR reaction schedule for cDNA production

Component	Amount
M-Mulv Buffer	(1x) 4μL
dNTP (10 mm)	(0.3mM) 2μL
primer (oligo dt)	(40pmol) 2μL
RNA	(1μLg) 1μL
Reverse transcriptase	(100 unit) 0.5μL
DEPC-Treat Water(to10μLl)	5.5μL
Total volume	15μL

واکنش به حجم 15μL رسانده شد و در ادامه واکنش PCR مطابق با پروتکل دمایی جدول ۳ انجام شد. برای انجام PCR مواد زیر در یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد. سپس واکنش PCR مطابق با پروتکل دمایی جدول ۳ انجام و محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد.

همسانه سازی ژن M6PR: محصول PCR توسط کیت استخراج DNA از روی ژل تخلیص شد. محصول PCR خالص شده مطابق با دستورالعمل Cloning T/A (شرکت فرمنتاز) در ناقل pTZ57R همسانه سازی شد. سلول مستعد *E.coli*

سویه *Top10* با استفاده از روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم تهیه شد و ناقل نوترکیب درون آن انتقال داده شد و روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند. صحت همسانه سازی با استفاده از PCR تکثیر ژن *M6PR* و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های *BamHI* و *SacI* (شرکت فرمنتاز) انجام گرفت.

جدول ۲. مواد واکنش PCR

Table 2. PCR reaction materials

cDNA (0.5-1μLg)	1μLl
dNTP (10mM)	0.5μLl (0.3 mM)
MgCl ₂ (50mM)	1μLl (1.5 mM)
Primers (work)	2μLl (40 pmol)
Buffer PCR (10x)	3μLl (1x)
Taq DNA polymerase	0.25μLl (1 unit/ML)
D.W.	up to 30μLl

جدول ۳. برنامه انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن *M6PR*

Table 3. PCR reaction program for *M6PR* gene amplification

Initial Denaturation	5 minutes	94°C	once
Denaturation	30 seconds	94°C	30 cycle
Annealing	40 seconds	58°C	
Extension	1 minutes	72°C	
Final extension	5 minutes	72°C	once

همسانه سازی مجدد ژن *M6PR* در ناقل بیانی **pET32a**: همسانه سازی مجدد ژن *M6PR* در ناقل بیانی *pET32a* انجام شد. برای این منظور ناقل نوترکیب pTZ57R/*M6PR* با آنزیم‌های *BamHI*, *SacI* هضم شد و ژن جدا شده از آن در ناقل بیانی *pET32a(+)* هضم شده با آنزیم‌های مذکور، همسانه سازی مجدد و در سلول‌های مستعد *E.coli* سویه *BL21(DE3)* انتقال داده شد. سپس سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. همسانه سازی

ژن مجدداً به روش هضم آنزیمی تایید شد. صحت همسانه سازی مجدد با استفاده از PCR تکثیر ژن *M6PR* و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های *BamHI*, *SacI* (شرکت فرمنتاز) انجام گرفت (Piri-Gharaghie et al. 2022).

بررسی رونویسی ژن *M6PR* و تایید آن: کشت شبانه با استفاده از یک کلنی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب انجام

گرفت و روز بعد مقدار 100 میکرولیتر آن به 10 میلی لیتر محیط کشت جدید منتقل شد ($OD_{600}=0.6$). پیشبر ژن با اضافه کردن 1/5 میلی مولار IPTG (ایزوپروپیل 1-D- β -تیوگالاکتوپیرانوزید) در دمای 37 درجه سانتی گراد و طی 5 ساعت القا شد. قبل از القا، نمونه برداشته شد و چند ساعت بعد نیز نمونه گیری انجام شد. سپس میزان رونویسی ژن مذکور توسط واکنش Real-time PCR سنجیده شد (Piri-Gharaghie et al. 2022).

بررسی بیان پروتئین *M6PR* و تایید آن: SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نمونه‌ها تحت شرایط دناتوره در کنار

نشانگر پروتئینی، روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت 12% انجام و باندهای پروتئینی روی غشاء نیتروسولولزی انتقال داده شدند. غشاء با محلول TBS1X به مدت 10 دقیقه روی شیکر با سرعت 200rpm شستشو داده شد؛ این مرحله دو بار تکرار شد. غشاء به ظرف مخصوص حاوی محلول Blocking منتقل شد و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد روی شیکر قرار گرفت؛ مجدداً غشاء طبق دستورالعمل مربوطه شستشو داده شد و به ظرف حاوی آنتی بادی کنژوگه اختصاصی His.Tag منتقل شد؛ سپس به مدت دو ساعت در شیکر با سرعت 80 rpm قرار گرفت. سپس به تعداد 5 بار با محلول TBST 1X با سرعت 200 rpm به مدت 10 دقیقه روی شیکر شستشو داده شد و باند پروتئین با افزودن سوبسترا ظاهر شد (Beiranvand et al. 2022).

تخلیص پروتئین نوترکیب *M6PR*: نمونه‌های باکتری جمع‌آوری شده با بافر لیز کننده مخلوط شده و سپس با

سونیکاسیون به مدت 5 ثانیه با قدرت 60 میلی ولت در حدود 20 بار (هرکدام شامل 30 ثانیه سونیکاسیون) شکسته شدند. محلول به دست آمده بلافاصله به مدت 10 دقیقه با سرعت 3000 rpm سانتریفیوژ شد و از محلول (روی) شفاف به دست آمده با ستون کروماتوگرافی (Ni-NTA/His. Bind Resin) پروتئین نوترکیب تخلیص شد. برای وسترن بلات از بافر آلکالین فسفاتاز سوبسترا (220NBT₂/BCIP) و دامینوبنزامین و پراکسید هیدروژن (DAB³/H₂O) استفاده شد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام گرفت و قبل

از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن داده ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد استفاده گردید.

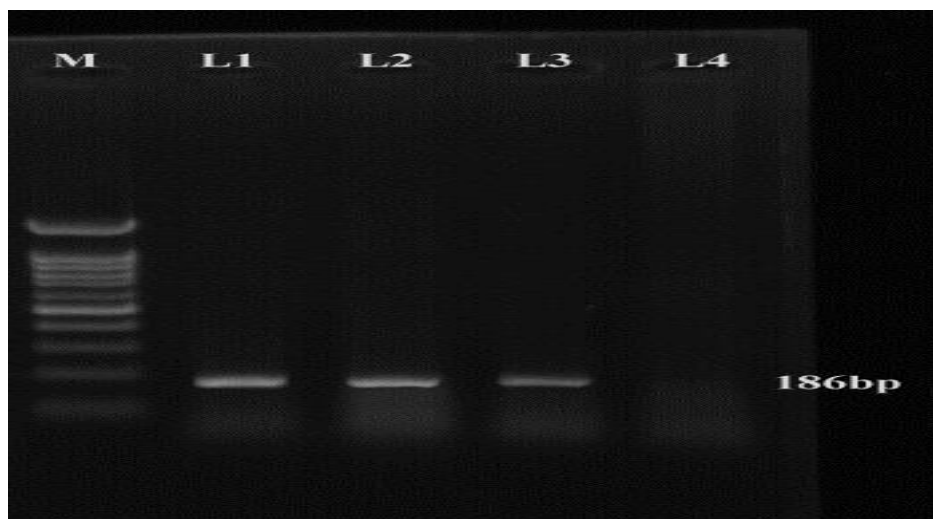
² Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

³ Nitro blue tetrazolium chloride

⁴ Di Amino Benzidine

نتایج و بحث

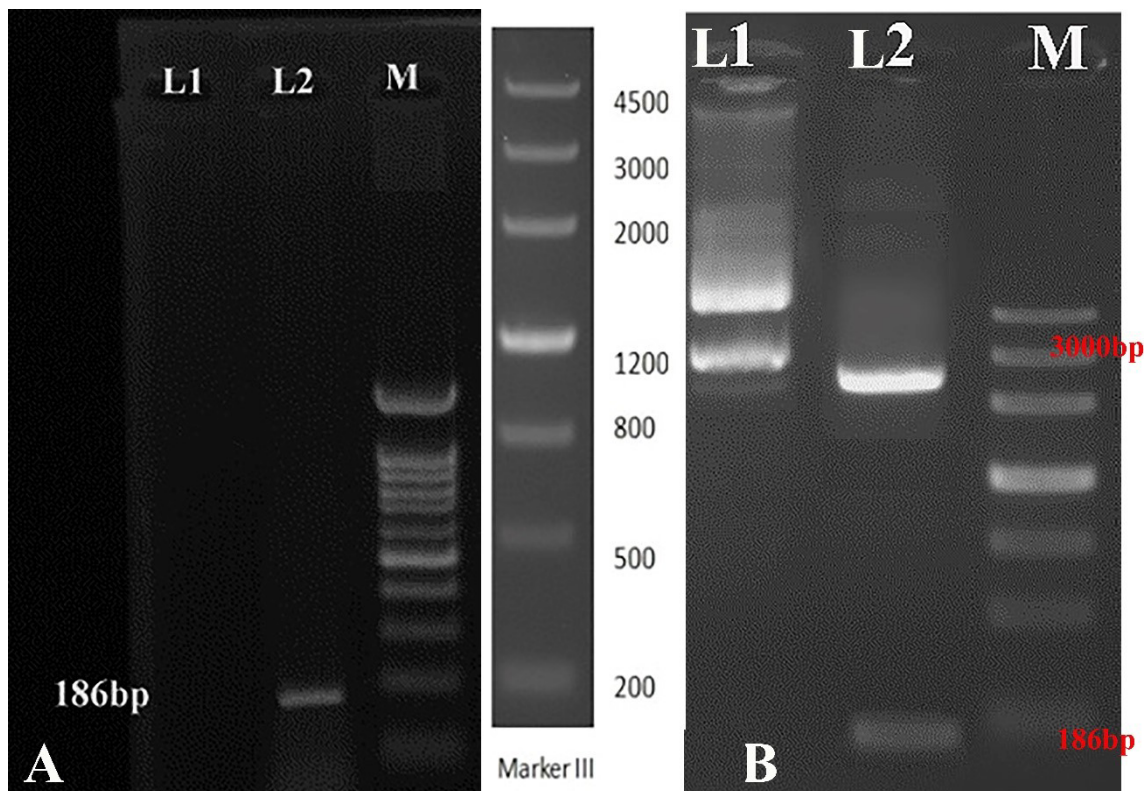
تایید صحت ساخت پلاسمید نو ترکیب: استخراج RNA و سنتز cDNA از بافت گیاه کرفس از کمیت و کیفیت قابل قبولی برخوردار بود. تحت شرایط نرمال واکنش PCR روی cDNA تهیه شده از گیاه کرفس انجام شد. یک باند حدوداً ۱۸۶ جفت نوکلئوتیدی روی ژل مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. باند حدوداً ۱۸۶ جفت نوکلئوتیدی ژن *M6PR* روی ژل آگارز ۱ درصد. M: نشانگر DNA با اندازه 100 جفت باز (متابون، آلمان)، چاهک‌های L1-L2: محصول PCR ژن *M6PR* به طول 186 bp. چاهک L3: کنترل مثبت PCR چاهک L4: کنترل منفی PCR

Figure 1. PCR product of 186 bp of M6PR gene, L1-L2 wells: indicating the PCR product of the M6PR gene with a length of 186 bp, L3 well: PCR positive control, L4 well: PCR negative control, M: 100 bp DNA marker

تایید صحت هم‌سانه سازی و هم‌سانه سازی مجدد: الگوی الکتروفورزی محصول PCR روی ناقل نو ترکیب pTZ57R/M6PR در شکل 2A و برش آنزیمی ناقل نو ترکیب در شکل 2B نشان داده شده است. نتایج حاصل از هضم دوگانه پلاسمید با آنزیم‌های *SacI* و *BamHI*، قطعات ۲۸۷۰ جفت بازی و ۱۸۶ جفت بازی است که در شکل ۲ قابل رویت می‌باشد. در این شکل قطعات ۲۸۷۰ جفت بازی مربوط به پلاسمید pET32a و قطعه ۱۸۶ جفت بازی مربوط به ژن نو ترکیب M6PR می‌باشد. هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب، درستی ساخت پلاسمید نو ترکیب را تایید کرد. همچنین نتایج توالی‌یابی DNA، صحت قطعه همانندسازی شده را تایید نمود. پس از توالی‌یابی به روش سنگر و بلاست مشخص شد که توالی ژن هدف در کرفس با توالی موجود این ژن در پایگاه داده NCBI تطابق دارد.



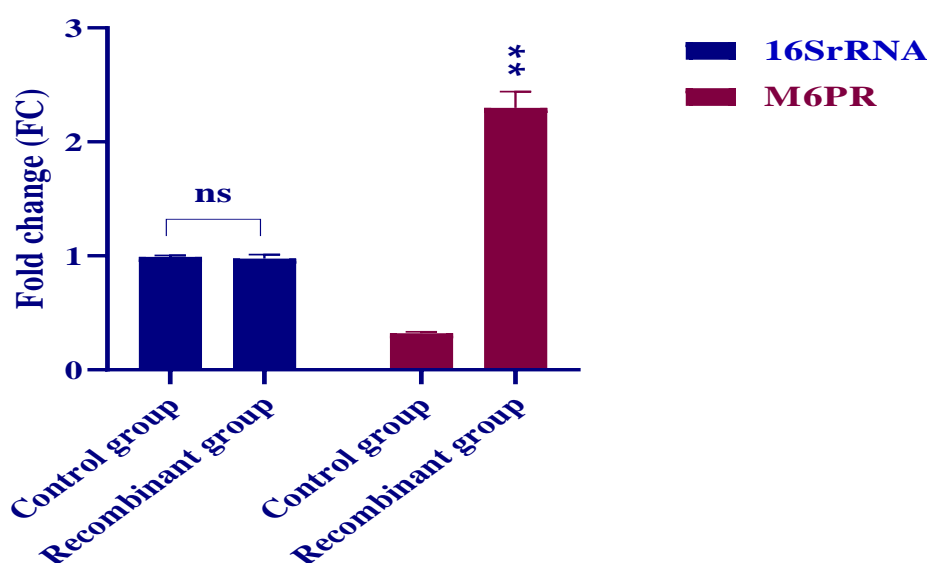
C	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/>	Apium graveolens manose-6-phosphate reductase (M6PR) mRNA, complete cds	<i>Apium graveolens</i>	2462	2462	100%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/>	Apium graveolens NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase (m6pr) mRNA, complete cds	<i>Apium graveolens</i>	2163	2163	89%	0.0	99.50%
<input checked="" type="checkbox"/>	Apium graveolens NADPH dependent mannose-6-phosphate reductase mRNA, complete cds	<i>Apium graveolens</i>	1707	1707	69%	0.0	99.78%
<input checked="" type="checkbox"/>	Bemisia tabaci NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase mRNA, partial cds	<i>Bemisia tabaci</i>	1162	1162	48%	0.0	98.77%
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like (...)	<i>Daucus carota s...</i>	1066	1066	85%	0.0	83.83%
<input checked="" type="checkbox"/>	Bemisia tabaci NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase mRNA, partial cds	<i>Bemisia tabaci</i>	931	931	38%	0.0	99.04%
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Tripterygium wilfordii NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like (LOC1200...)	<i>Tripterygium wilf...</i>	370	370	69%	3e-97	74.18%

شکل ۲. الگوی الکتروفورزی محصول PCR از ناقل نوترکیب pET32a/ M6PR و pTZ57R/ M6PR با نشانگر DNA با اندازه ۱۰۰ جفت باز در قسمت A و ۴۵۰۰ جفت باز در قسمت B. شکل A) چاهک L1: چاهک M: نشانگر DNA با اندازه ۱۰۰ جفت باز در قسمت A و ۴۵۰۰ جفت باز در قسمت B. شکل B) چاهک L1: پلاسמיד هدف کنترل منفی، L2: محصول PCR پلاسמיד نوترکیب pTZ57R/ M6PR. شکل C) چاهک L1: پلاسמיד هدف قبل از برش آنزیمی، L2: پلاسמיד نوترکیب پس از برش آنزیمی با آنزیم های *BamHI* / *SacI*. شکل C) نتایج بلاست قطعه ژنی M6PR نشان دهنده هم پوشانی ۱۰۰ درصدی ژن مربوطه با توالی ژنی کرفس بود.

Figure 2. Electrophoresis pattern of PCR product from recombinant vector pTZ57R/M6PR and pET32a/M6PR. M: DNA marker with the size of 100 bp in part A and 4500 bp in part B. Figure A) Well L1: negative control, L2 well: PCR product of recombinant plasmid pTZ57R/M6PR with 186 bp band. Part B) Well L1: target plasmid before enzymatic cleavage, L2: PCR confirmation of recombinant plasmid after enzymatic cleavage with *BamHI/SacI* restriction enzymes. Part C) Blast results of M6PR gene fragment showed 100% overlapping of Meriota gene with celery gene sequence.

نتایج بررسی رونویسی ژن نوترکیب: بررسی رونویسی ژن نوترکیب *M6PR* در سویه های تراریخت شده توسط واکنش Real-time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که میزان رونویسی *M6PR* در سویه های تراریخته نسبت به کنترل، ۷ برابر افزایش یافته است. میزان رونویسی ژن نوترکیب *M6PR* در سویه های تراریخت برابر با $\frac{2}{3}$ و در کنترل $\frac{0}{32}$ به دست آمد که تفاوت معناداری در سطح $P < 0.01$ را از نظر آماری نشان دادند. این افزایش رونویسی تایید کننده صحت تراریختگی می باشد.

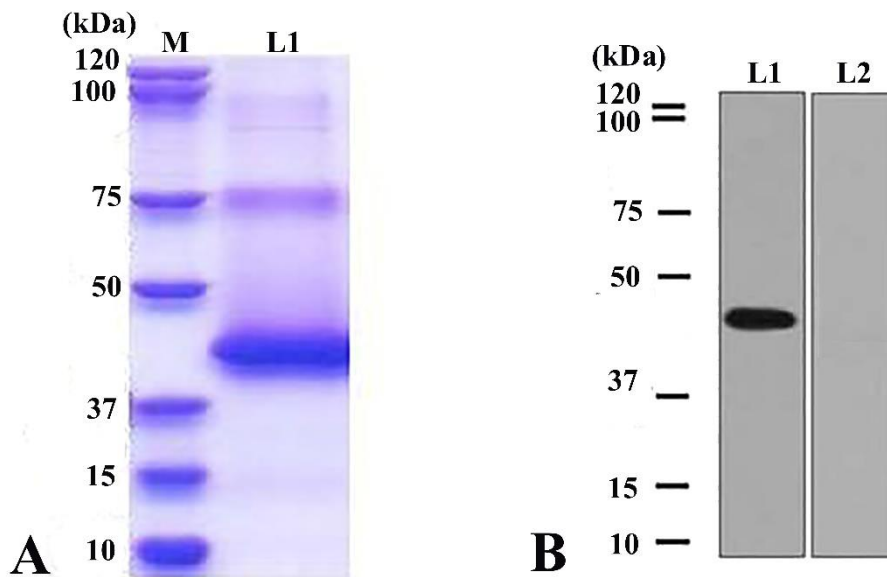
بیان پروتئین M6PR: پس از القای پیشبر و نمونه برداری در زمان های مختلف، نمونه ها روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. در شکل ۴ باند پروتئینی در ناحیه 42 کیلو دالتون را نشان می دهد. همچنین در شکل ۴ وسترن بلاتینگ با آنتی بادی علیه *M6PR* را نشان می دهد.



شکل ۳. میزان رونویسی ژن نوترکیب *M6PR* در گروه کنترل در مقایسه با سویه های تراریخته شده. **: $P < 0.01$

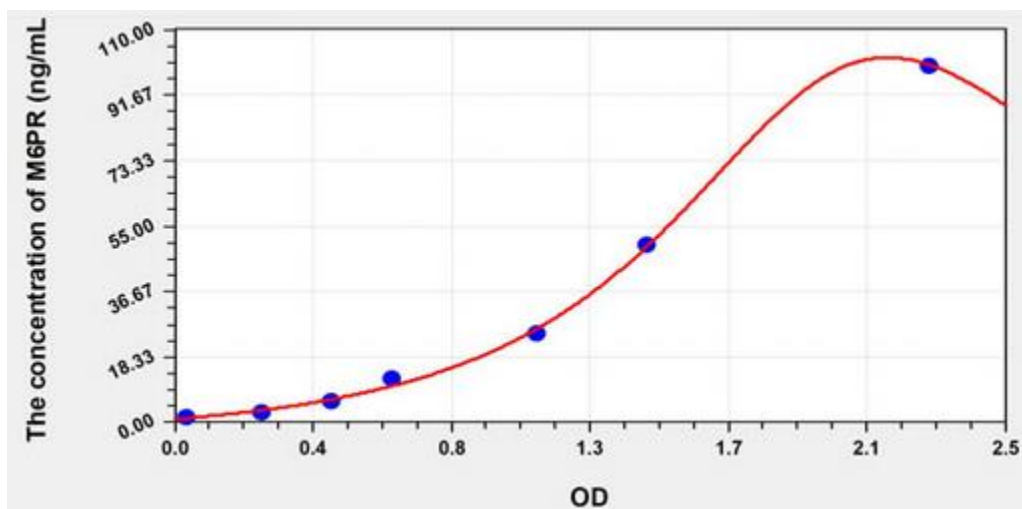
Figure 3. Transcription of recombinant *M6PR* gene in control group compared to transgenic strains. **: $P < 0.01$

کروماتوگرام مربوط به خالص سازی پروتئین *M6PR* در شکل ۵ مشاهده می شود. مطابق با شکل، بخش ابتدایی نمودار، washing اولیه است که قبل از flow through، از ستون عبور داده شد؛ بخش میانی جمع آوری flow through از ستون، و در نهایت بخش قله نمودار، washing بعد از flow through که معمولاً ۱۰ برابر حجم رزین ستون است، و جمع آوری Eluting بعد از washing رخ داده است.



شکل ۴. بررسی بیان پروتئین M6PR. A) ستون M: نشانگر پروتئین (متابون، آلمان) مخصوص SDS-PAGE. ستون L1: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب در پنج ساعت بعد از القا. B) L1-L2: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب بعد از القا و وسترن بلات. L2: لیز سلول باکتریایی فاقد پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل منفی

Figure 4. M6PR protein expression assessment. A) Column M: SDS-PAGE specific marker. Column L1: bacterial cell lysis containing the recombinant plasmid at five hours after induction. B) L1-L2: bacterial cell lysis containing recombinant plasmid after induction and western blot. L2: bacterial cell lysate without recombinant plasmid as a negative control.



شکل ۵. کروماتوگرام مربوط به خالص سازی پروتئین M6PR

Figure 5. Chromatogram of M6PR protein purification

در این مطالعه ما همسانه سازی موفقیت آمیز یک طول کامل از رونوشت کد ژنی M6PR را گزارش می‌کنیم که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوستنز مانیتول در کرفس می باشد. ابتدا همسانه سازی به روش مولکولی تایید شد و با چند معیار فقط کلون‌های احتمالی نمایش داده شدند. سپس فعالیت پیشبر M6PR با IPTG القا شد. مقایسه‌های پایگاه داده نشان داد که M6PR عضوی از ابرخانواده آلدوکتو ردوکتاز (که آنزیم‌های حیوانی هستند) است. آلدوز ردوکتازها به طور گسترده در تحقیقات جانوری مورد مطالعه قرار گرفته اند (Jannapureddy et al. 2021). در گیاهان بیشترین درجه شباهت بین M6PR و D-sorbitol-6-phosphate و dehydrogenase وابسته به NADP می باشد (Kanayama et al. 1993). همچنین آنزیم A6PR یک آنزیم کلیدی در بیوستنز سوربیتول در گونه‌های چوبی Rosaceae است (Yang et al. 2018, Piri-Gharaghie et al. 2022). نتایج حاصل از بلاست توالی گیاهی کرفس در این پژوهش تشابه توالی اسید نوکلئیک بسیاری به گونه‌هایی داشت که عموماً به عنوان سنتزکننده الکل قند (به خصوص دهیدروژناز) در نظر گرفته می‌شوند. این یافته، با این حال، مطابق با مطالعات گذشته است، زیرا دهیدروژناز از همولوگ‌های مانیتول است که آنزیم کلیدی در مسیر کاتابولیک مانیتول می باشد. این یافته‌ها ممکن است از مطالعات گذشته مبنی بر وجود الکل های قند در کرفس حمایت کنند (Pleyerová et al. 2022).

آنزیم مانیتول دهیدروژناز تنها آنزیم شبیه سازی شده در مقیاس آزمایشگاهی است که در متابولیسم مانیتول در مسیر کاتابولیک دخیل است (Hahn et al. 2003). در این پژوهش نیز با همسانه سازی آنزیم M6PR در کرفس، توالی اسید نوکلئیکی به دست آمد که محصول آن شباهت اسید آمینه‌ای بسیاری به M6PR داشت. همچنین میزان رونویسی این ژن (M6PR) توسط آزمون Real time PCR سنجیده شد. نتایج نشان دهنده افزایش رونویسی ژن M6PR در گیاه کرفس بود. مطالعات مختلفی به بررسی M6PR کلونال پرداخته است، اما تا کنون مطالعه ای در زمینه همسانه سازی این ژن در گیاه کرفس و افزایش رونویسی ژن M6PR انجام نشده بود (Ghajari et al. 2021). از این رو یکی از دستاوردهای این مطالعه افزایش میزان رونویسی ژن M6PR در گیاه کرفس بود که متعاقباً افزایش میزان رونویسی توسط آزمون های مولکولی تایید گردید.

علاوه بر این، در این مطالعه به بررسی میزان بیان پروتئین و خالص سازی آنزیم مربوطه پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش تولید پروتئین M6PR پس از همسانه سازی بود که خود به عنوان آنزیم کلیدی در مسیر تسریع فعالیت کاتابولیسیم می باشد. این نتایج همسو با مطالعات گذشته می باشد که پس از خالص سازی آنزیم M6PR از گیاه به بررسی جرم مولکولی، فعالیت ویژه و ویژگی‌های جنبشی (که ویژگی مشترک خانواده آلدوکتو ردوکتاز است)، پرداختند (Ara et al. 2018). همچنین مطالعه حاضر نشان داد که آنزیم‌های گیاهی وقتی در باکتری بیان می‌شوند، فعال می‌باشند و می‌توانند به عنوان منبع مناسب برای تسریع فعالیت کاتابولیک استفاده شوند.

نتیجه گیری: همسانه سازی ژن آنزیم M6PR بدست آمده از گیاه کرفس و به دنبال آن تولید این آنزیم به صورت نوترکیب در آزمایشگاه می تواند منجر به بیان بالای آن در سیستم پروکاریوتی شود به طوریکه آنزیم دارای فعالیت باشد. همچنین مطالعه

حاضر نشان داد که آنزیم‌های گیاهی وقتی در باکتری بیان می‌شوند، فعال می‌باشند و می‌توانند به عنوان مناسب برای تسریع فعالیت کاتابولیک استفاده شوند.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم/فرض می‌دانند از آقای دکتر توحید پیری قراچه مدیرعامل شرکت BIO3P از

هلدینگ آمیتیس ژن (ایران) به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.
- محمدآبادی محمدرضا، سفلائی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

- Apak R, Calokerinos A, Gorinstein S, et al. (2022) Methods to evaluate the scavenging activity of antioxidants toward reactive oxygen and nitrogen species (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem 94(1), 87-144.
- Ara A, Ahmed KA, Xiang, J (2018). Mannose-6-phosphate receptor: a novel regulator of T cell immunity. Cell Mol Immunol 15(11), 986-988.
- Bhauso TD, Radhakrishnan T, Kumar A, Mishra GP, et al. (2014) Overexpression of bacterial mtlD gene in peanut improves drought tolerance through accumulation of mannitol. Sci World J 19, 2014
- Beiranvand S, Piri-GharaghieT, Dehganazad B, et al. (2022) Novel NAD-independent Avibacterium paragallinarum: Isolation, characterization and molecular identification in Iran. Vete Med Sci 8(3), 1157-1165.
- Callender P, Wettig D (2021) Phase Behavior of Non-Ionic Surfactant-Medium Chain Triglyceride-Water Microemulsion Systems. J Surfactants Deterg 24(4), 603-629.
- Ghajari G, Nabiuni, M, Amini E (2021) The association between testicular toxicity induced by Li2Co3 and protective effect of Ganoderma lucidum: Alteration of Bax & c-Kit genes expression. Tissue Cell 72, 101552.

- Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, et al. (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: a new paradigm for increasing food production. *Front Plant Sci* 6, 978.
- Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2003) A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* 179(2), 101-107.
- Jannapureddy S, Sharma M, Yepuri G, et al, (2021) Aldose reductase: an emerging target for development of interventions for diabetic cardiovascular complications. *Front Endocrinol* 12, 636267.
- Kanayama Y, Yamaki S (1993) Purification and properties of NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple seedlings. *Plant Cell Physiol* 34(6), 819-823.
- Khalil SR, Ibrahim AS, Hussien BA, et al. (2017) Cloning of a functional mannose-6-phosphate reductase (M6PR) gene homolog from Egyptian celery plants (*Apium graveolens*): overexpression in non-mannitol producing plants resulted in mannitol accumulation in transgenic individuals. *3 Biotech* 7(5), 1-12.
- Ladhari A, Zarrelli A, Di Meo MC, et al. (2022) Physiological mechanisms and adaptation strategies of *Lactuca sativa* L. in response to *Olea europaea* L. and *Ficus carica* L. allelochemicals. *S Africa J Botany* 147, 106-118.
- Moenga SM, Gai Y, Carrasquilla-Garcia et al. (2020) Gene co-expression analysis reveals transcriptome divergence between wild and cultivated chickpea under drought stress. *Plant J* 104(5), 1195-1214.
- McParland EL, Alexander H, Johnson WM (2021) The osmolyte ties that bind: genomic insights into synthesis and breakdown of organic osmolytes in marine microbes. *Front Mar Sci* 8, e2021.
- Meena M, Prasad V, Zehra A, et al. (2015) Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Front Microbiol* 6, 1019.
- Msomi NZ, Erukainure OL, Islam MS (2021) Suitability of sugar alcohols as antidiabetic supplements: A review. *J Food Drug Anal* 29(1), e1.
- Piri-Gharaghie T, Beiranvand S, Riahi A, et al. (2022) Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: Improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. *Chem Biodivers* 19(3), e202100426.
- Piri-Gharaghie T, Jegargoshe-Shirin N, Saremi-Nouri S, et al. (2022) Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant *Staphylococcus Epidermidis* biofilm formed. *Sci Rep* 12(1), 1-13.

- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA (2022) Fabrication and Characterization of pcDNA3. 1 (+) Location within Chitosan/Nanoparticles Complexes for Enhanced Gene Delivery. Iran J Biotechnol 20(3), 88-100.
- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA (2022) Identification of Antigenic Properties of *Acinetobacter baumannii* Proteins as Novel Putative Vaccine Candidates Using Reverse Vaccinology Approach. Appl Biochem Biotechnol 7, 1-23.
- Pleyerová I, Hamet J, Konrádová H, et al. (2022) Versatile roles of sorbitol in higher plants: luxury resource, effective defender or something else. Planta 256(1), 1-27.
- Sánchez J, Harwood JL (2002) Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. Europ J Lipid Sci Technol 104(9-10), 564-573.
- Slavin J (2003) Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. J Food Compos Anal 16(3), 287-291.
- Williamson JD, Stoop JM, Massel MO, et al. (1995) Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. Nat Acad Sci 92(16), 7148-7152.
- Walker RP, Battistelli A, Bonghi C, et al. (2020) Non-structural carbohydrate metabolism in the flesh of stone fruits of the genus *Prunus* (Rosaceae)—A review. Fron Plant Sci 11, 549921.
- Xiaotang DI, Van Den Burg H, Takken FLW (2018) Plants comprising pathogen effector constructs. Universiteit Van Amsterdam 7, e2018.
- Yang J, Zhu L, Cui W, et al. (2018) Increased activity of MdFRK2, a high-affinity fructokinase, leads to upregulation of sorbitol metabolism and downregulation of sucrose metabolism in apple leaves. Hort Culture Res 5, e2018.
- Zwiewka M, Nodzyński T, Robert S, et al. (2015) Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. Mol plant 8(8), 1175-1187.

