مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ۴۱-۲۹

نشان ویژگی ملکولی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز (γ-tmt) از گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum* L.) رقم Memory 1

طاهره رئوف زاده .M.Sc [۱]، رامین حسینی .Ph.D [۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
۲- دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: raminh_2001@yahoo.com و r.hosseini@ikiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۰

چکیده

هدف: هدف این تحقیق همسانه سازی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز (*γ-tmt*) از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory 1، جهت تعیین توالی و خصوصیات ملکولی آن و نیز انتقال این ژن به یک گیاه روغنی مثل کلزا در پژوهش‌های آتی برای بالا بردن خاصیت تغذیه ای آن بود.

مواد و روش ها: از بافت میوه گوجه فرنگی، RNAی کل استخراج و ساخت cDNA صورت گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مذکور تکثیر و همراه با ناقل(-SK) pBluescript به کمک آنزیم برشی *Xba*I هضم و واکنش اتصال با آنزیم T_4 انجام شد. باکتری *E. coli* مستعد با ناقل نوترکیب تراریخت و شناسایی کلونی‌های نوترکیب بر اساس آزمون سفید–آبی انجام شد.

نتایج: با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی، cDNA به طول ۱۰۸۹ bp به دست آمد. همردیف سازی توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه ای ژن هدف با توالی های *γ-tmt* دیگر ثبت شده از خانواده Solanaceae به میزان ۹۸ درصد شباهت داشت. در توالی اسید آمینه ای پروتئین استنتاج شده چند تغییر مشاهده شد. با استفاده از نرم افزار PSIpred، ساختارهای دوم و سوم این پروتئین پیش بینی و با استفاده از نرم افزار ClustalW درخت فیلوژنتیکی پروتئین حاصل از این ژن ساخته شد.

نتیجه گیری: cDNAی ژن *γ-tmt* همسانه سازی شده با توالی ثبت شده از گوجه فرنگی رقم Cerasiforme ۹۸ درصد شباهت داشت. با انتقال این ژن به گیاهان دانه روغنی مانند کلزا می توان میزان آلفا توکوفرول را افزایش داد. این کار هم به اهمیت این گیاه از نظر تغذیه‌ای می افزاید و هم می تواند مقاومت آن را نسبت به تنش های محیطی بالا ببرد.

واژگان کلیدی: گاما توکوفرول متیل ترانسفراز، ساختمان دوم، ویتامین **E**

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویتامین E یکی از ویتامین‌های محلول در چربی و ضروری برای انسان است که بیشتر به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانتی‌اش در بدن شناخته شده است. از میان هشت شکل طبیعی این ویتامین، آلفا توکوفرول دارای بالاترین فعالیت و به دلیل جذب انتخابی آن توسط پروتئین جگری ناقل آلفا توکوفرول بیشتر در دسترس است (۱و۲). در بدن انسان این ویتامین دارای دو عملکرد است بدین معنا که هم به عنوان یک ویتامین عمل می‌نماید و هم نقش یک آنتی اکسیدانت مهم را ایفا می‌کند (۳). زمانی نقش بسیار مهم آلفا توکوفرول به عنوان یک آنتی اکسیدانت بیشتر آشکار می‌شود که رابطه ی بسیاری از بیماری‌ها با خاصیت مذکور روشن می شود. از آنجا که معمولا نشانه‌های بیماری پس از سال ها تجمع رادیکال های آزاد در بدن ظاهر می‌شوند لذا بیماری‌های ایجاد شده توسط این رادیکال اکثرا دارای دوره‌ی نهفتگی بلند مدت می‌باشند. برخی از اثرات این ویتامین بر این بیماری ها عبارتند از: کاهش احتمال بیماری‌های قلبی- عروقی، موثر در درمان انواع سرطان، کند شدن پدیده پیری سلول‌ها و بافت‌ها، حفظ سلامت سلول‌های قرمز خون و مقابله با کم خونی، تسریع در بهبود زخم ها، کمک به درمان اختلالات تولیدمثلی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، کند شدن پیشرفت بیماری‌هایی که با پدیده‌ی پیری همراه اند (مانند آب مروارید و آرتریتیس) (۴، ۵و۶).

ویتامین E تنها در موجودات فتوسنتز کننده و برخی از سیانوباکتری ها تولید می شود، بنابراین منبع تامین آن در انسان مصرف گیاهان است (۷). بیشترین غلظت توکوفرول را می توان در دانه های روغنی گیاهانی همچون کانولا، نخل، گلرنگ، سویا و آفتابگردان یافت که غلظت توکوفرول طبیعی در دانه ی آن ها بطور میانگین ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از بافت هایی غیر از دانه است. این درحالی است که بیشترین ایزوفرم موجود در آنها گاما توکوفرول یعنی همان پیش ماده ی بیوسنتزی آلفا توکوفرول می باشد (۸). توانایی آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در جابجایی گروه متیل در سال ۱۹۸۰ شناسایی و محل آن در غشای داخلی کلروپلاست اسفناج تعیین (۹و۱۰) و پس از آن در سال ۱۹۸۵ توسط دارلینگ و کامارا از کروموپلاست فلفل استخراج گردید (۱۱).

ژن توکوفرول متیل ترانسفراز از باکتری سینکوسیستیس از طریق یافتن همولوژی با دیگر ژن های شناسایی شده در مسیر بیوسنتز ویتامین E شناسایی شد. این ژن در اربیدوپسیس از طریق جستجوی همولوژی با ژن *γ-tmt* باکتری سینکوسیستیس در سال ۱۹۹۸ شناسایی شد. همچنین این نکته روشن گردید که گونه های مختلف گیاهان روغنی دارای مقدار زیادی توکوفرول در دانه‌های خود هستند. اما در اکثر گیاهان دانه روغنی همچون دانه‌های سویا و کلزا، میزان گاما توکوفرول (پیش ماده‌ی آلفا- توکوفرول)، نسبت به آلفا-توکوفرول بسیار بیشتر است (۸). بنابراین تبدیل متابولیکی گاما توکوفرول به آلفا توکوفرول از طریق فناوری گیاهان تراریخت جهت افزایش کارآیی جذب آن توسط انسان و جانوران مد نظر بوده است. این کار برای اولین بار با ابر بیان ژن *γ-tmt* در گیاه مدل اربیدوپسیس صورت گرفت (۸). بدین وسیله به نقش کلیدی آنزیم γ -TMT در تعیین نوع توکوفرول موجود در دانه پی برده شد . محققین طی این آزمایش ژن کد کننده ی آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز را از گیاه *Arabidopsis thaliana* همسانه سازی و سپس cDNA آن را تعیین توالی کردند. در این مطالعه محققین با ابر بیان ژن مذکور، ترکیب دانه‌های *A. thaliana* را از ۹۷ درصد گاما توکوفرول به ۹۵ درصد آلفا توکوفرول تبدیل کردند (۸).

فعالیت‌های زیستی بسیاری از جمله از بین بردن ملکول‌های اکسیژن یگانه که در طی واکنش های فتوسیستم II ایجاد می‌شوند (۱۲)، کنترل غیر آنزیمی اکسایش لیپید ها در گیاهان (۱۳) و افزایش سازگاری گیاهان به دماهای پایین (۱۴)، به توکوفرول‌ها نسبت داده شده است. در جهت افزایش میزان آلفا توکوفرول در گیاهان مختلف پژوهش‌هایی انجام شده که اجمالا به برخی از آن‌ها اشاره می گردد.

در سال ۲۰۰۵، محتوی آلفا توکوفرول برگ گیاه کاهو با ابر بیان ژن *γ- tmt* گیاه اربیدوپسیس تا سه برابر افزایش یافت. در این آزمایش نقشγ -TMT در کنترل میزان تولید آلفا توکوفرول در برگ کاهو و همبستگی میان mRNA تراریخت و میزان فعالیت ژن به اثبات رسید (۱۵). در سال ۲۰۰۶ با بیان ژن *γ- tmt* گیاه اربیدوپسیس در گیاه دانه روغنی *Brassica juncea* میزان آلفا توکوفرول دانه های این گیاه شش برابر گردید (۱۶). در سال ۲۰۰۷ (۱۷) و سپس در سال ۲۰۱۱ (۱۸) با همسانه سازی و سپس ابر بیان ژن *γ -tmt Perilla frutescens* در خود گیاه بیشتر گاما توکوفرول موجود در دانه به آلفاتوکوفرول تبدیل گردید. در سال ۲۰۰۷ نیز محققان با ابر بیان ژن گاما توکوفرول

Archive of SID
www.SID.ir

متیل ترانسفراز گیاه *Perilla frutescens* در گیاه سویا مقدار آلفا توکوفرول دانه را چندین برابر افزایش دادند (۱۹). با توجه به اینکه آلفا توکوفرول در میان تمامی ایزوفرم های دیگر این ویتامین دارای بالاترین فعالیت بیولوژیکی، و آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز آخرین آنزیم در مسیر بیوسنتز آلفا توکوفرول است در نتیجه افزایش تولید ویتامین E، هدف مهندسی گیاهان تراریخت، ترجیحا ابر بیان آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز می باشد. این پژوهش با هدف استخراج و همسانه سازی ژن گاما متیل ترنسفراز از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory 1 انجام شد تا بتوان در قدم بعدی این ژن را جهت بالا بردن ارزش تغذیه ای، به یک گیاه دانه روغنی مانند کلزا منتقل نمود. توالی این ژن در گیاه گوجه فرنگی در ارقام دیگری قبلا به ثبت رسیده است؛ اما در رقم Memory 1 تا پیش از این مطالعه، شناسایی نشده و به ثبت نرسیده بود.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA: تمامی وسایل پلاستیکی و شیشه ای و همچنین محلول های مورد نیاز به استثنای محلول های حاوی Tris با استفاده از محلول DEPC (دی اتیل پیروکربنات) یک دهم درصد ضد عفونی و عاری از آنزیم های RNase شدند. سپس وسایل و محلول ها به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری (incubation) و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند تا DEPC از طریق شکسته شدن به دی اکسیدکربن، آب و اتانول کاملا از بین برود. بافر استخراج شامل

[Tris-HCl 300mM, EDTA 25mM, NaCl 2M, CTAB 2% (w/v), PVP 2% (w/v), ß-Mercaptoethanol 2%, DEPC-treated water 0.1%]

به میزان ۲۷ میلی‌لیتر برای هر ۲/۵ گرم از نمونه ی پودر شده تهیه گردید. همه‌ی مواد بجز بتا- مرکاپتواتانول درون فالکون ۵۰ میلی لیتری ریخته و در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. استخراج RNA بر اساس روش تغییر یافته رید وهمکاران (۲۰) صورت گرفت.

واکنش نسخه برداری معکوس تهیه cDNA: جهت سنتز cDNA واکنش نسخه برداری معکوس به روش زیر انجام گرفت. مخلوط زیر در یک میکروتیوب استریل روی یخ تهیه گردید.

Template (total RNA or mRNA): 50 ng

Primer (Oligo $(dT)_{18}$): 1 pmol

Deionized and nuclease-free water to final volume: 7-12 µl

مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس روی یخ قرار داده شد و مواد زیر به آن اضافه شد:

5 X reaction buffer: 4 µl

dNTP Mix 10 mM: 2 µl

مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس مقدار ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه برداری معکوس (reverse transcriptase، سیناژن، ایران) به ترکیب فوق اضافه و مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه دردمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش فوق با قرار دادن مخلوط واکنش در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف گردید.

تکثیر cDNA ژن *tmt* با استفاده از PCR: آغازگر های اختصاصی با توجه به توالی ژن *tmt* گیاه گوجه فرنگی با شماره دستیابی DQ456876 طراحی و برای تکثیر cDNAی ژن tmt به طول ۱۰۸۹bp سنتز شدند (جایگاه برش آنزیمی *Xba*I در دو انتهای ′ ۵ دو آغازگر اختصاصی tmtF و tmtR طراحی شد).

5' TA**TCTAGA**ATGGGCAGCCAATGCTATT 3'

5' GC**TCTAGA**TTATTCAGGTTTTCGACATGTG 3'

واکنش PCR پس از بهینه سازی دمای اتصال جهت تکثیر اختصاصی و تک باند شدن محصول PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از PCR Master Mix (سیناژن، ایران) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور واکنش، تیوب ها به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

cDNAی مورد نظر پس از خالص سازی از ژل به کمک DNA Extraction Kit (شرکت فرمنتاس) و برش توسط آنزیم *Xba*I با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase به ناقل از پیش برش یافته اتصال یافت. پس از مستعد سازی سلول‌های *E. coli*، باکتری های مستعد با استفاده از ناقل های نوترکیب تراریخت شدند. آزمایش های تاییدی جهت اطمینان از نوترکیبی کلنی ها

Archive of SID

www.SID.ir

به ترتیب زیر صورت گرفت: آزمون کلنی‌های سفید- آبی، Toothpick minipreparation، استخراج فاژمید و هضم آنزیمی توسط آنزیم *Xba*I (۲۱).

پس از انجام آزمایش‌های تاییدی جهت اطمینان از حضور cDNAی ژن *tmt* در فاژمید نوترکیب و مطالعه توالی ژن همسانه سازی شده از توالی یابی استفاده شد. به این منظور ناقل نوترکیب از باکتری *E. coli* تراریخت شده استخراج و به همراه آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت جهت توالی یابی در دو جهت به شرکت Millgen فرانسه ارسال شد.

مقایسه توالی پروتئینی استنتاج شده از ژن *tmt* با دیگر پروتئین های مشابه: پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی cDNA ژن *γ-tmt* همسانه سازی شده، توالی اسید آمینه‌ای آن با استفاده از سایت http://expasy.org/translate مشخص و سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار آنلاین ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw) رسم گردید. جهت این کار توالی پروتیین‌های مشابه با شماره‌های دستیابی

(ZP-08985217) *Fisherella* sp.,
(AE68180) *Perilla frutescens,*
(ADZ24710) *Solanum penellii*,
(BAK57287) *Glycine max*,
(NP_176677) *Arabidopsis thaliana,*
(BAJ86294) *Hordeum vulgare,*
(ZP_07111019) *Oscillatoria sp*.,
(YP_003722211) *Nostoc azolae*,
(EGB05977) *Aureococcus anaphagefferens*,
(NP_091105914) *Zea mays*,
(EAZ24304) *Synechococcus* sp.,
(ADV36922) *Solanum tuberosum,*
(CBN74411) *Ectocarpus siliculosus*,
(ZP_00518612) *Crocosphaera watsonii*,
(ADC91915) *Lactuca sativa*,
(ADP00411) *Catharanthus roseus*,
(ZP_05030254) *Microcoleus chthonoplastes*,
(YP_001657502) *Microcystis aeroginosa*,
(XP_003083842) *Ostrecoccus tauri*,
(XP_002951641) *Volvox carteri,*
(XP_001421685) *Ostrococcus lucimarinus,*
(XP_00288296) *Arabidipsis lyrata*,
(XP_002319777) *Populus tricocaroa*,
(XP_001694470) *Clamydomonas reinhardtii,*
(XP_002292406) *Thalacsiosira pseudomona,*
(XP_002180606) *Phaeodactylum tricornutum,*
(AA013806) *Brassica oleracea,*
(ABB52800) *Helianthus annuus,*
(ACD03285) *Brassica napus,*
(XP_002503087) *Micromonas sp*.,
(XP_002454429) *Sorghum bicolor,*
(AC057634) *Linum sitatissimum,*
(XP_002269749) *Vitis vinifera,*
(BAH10645) *Hevea brasiliensis,*
(ACj84366) *Medicago truncaula,*
(CAI77219) *Triticum aestivum*,
(ABI23433) *Brassica juncea*.

مورد استفاده قرار گرفتند.

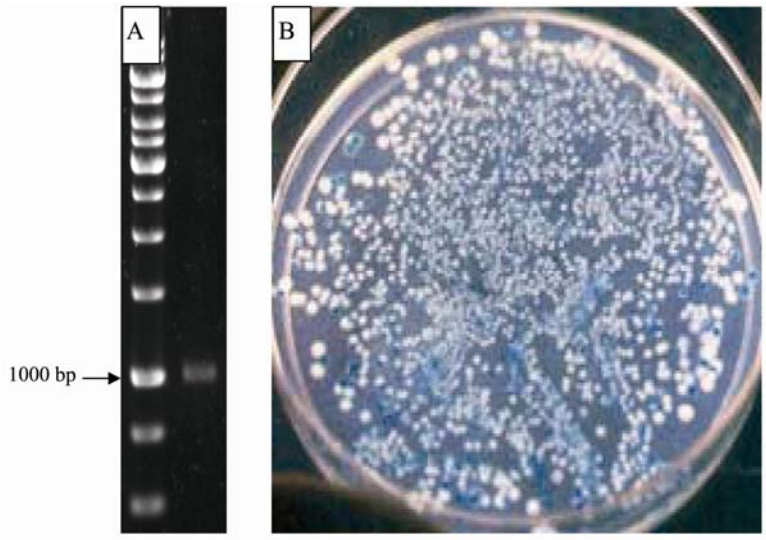
خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین ژن همسانه سازی شده در سایت ProtParam (http://web.expasy.org/protparam) بررسی گردید. ساختار دوم و سوم پروتئین نیز توسط نرم افزار آنلاین سایت PSIpred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) پیش بینی و رسم گردید. بررسی موقعیت زیر سلولی پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزارهای TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) و Psort (http://www.psort.org) و وجود پپتید پیام (signal peptide) توسط نرم افزار iPsort (http://ipsort.hgc.jp) انجام شد.

نتایج

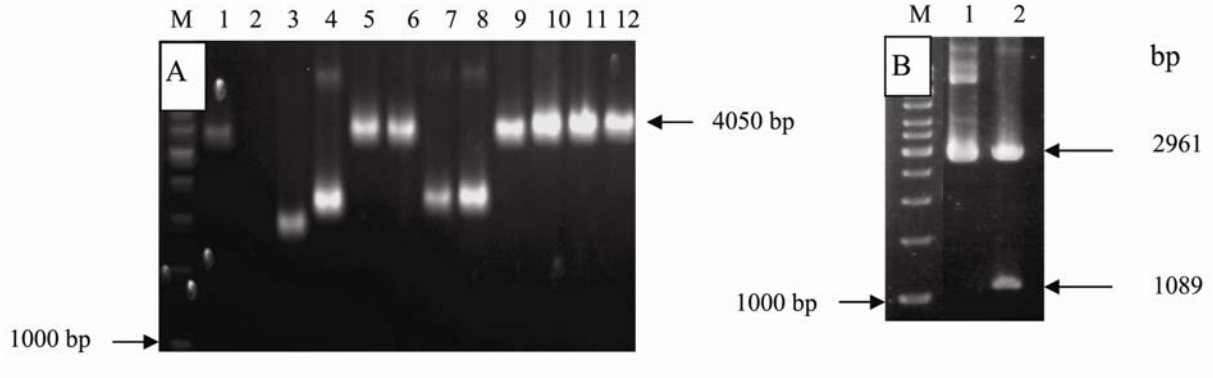
در این تحقیق cDNAی ژن *γ-tmt* از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory1 به طول ۱۰۸۹ bp جهت بررسی توالی و استفاده برای انتقال به یک گیاه دانه روغنی مانند کلزا، در پژوهش های آتی، تکثیر گردید. بدین منظور از مرحله‌ی قرمز این گیاه، RNA استخراج و واکنش RT-PCR انجام گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR روی ژل اگارز یک درصد، یک باند بطول حدود ۱/۱ Kb مشاهده گردید (شکل ۱A).

باند مذکور از ژل آگارز استخراج و خالص سازی گردید. با توجه به صحت طول قطعه، واکنش اتصال قطعه‌ی مذبور و ناقل pBluescript صورت گرفت. باکتری‌های مستعد شده *E. coli* توسط فاژمیدهای نوترکیب تراریخته شدند. کلنی های تراریخت شده‌ی نوترکیب ابتدا از طریق آزمون کلنی‌های سفید- آبی غربال گردیدند (شکل 1B). سپس جهت بررسی بیشتر، آزمون Tooth pick minipreparation نیز روی کلنی‌های سفید صورت گرفت و کلنی‌های نوترکیب از روی اختلاف اندازه شان انتخاب گردیدند (شکل ۲A). پس از انتخاب کلنی‌های نوترکیب، ناقل آنها استخراج گردید. با استفاده از آنزیم *Xba*I آزمایش هضم آنزیمی صورت گرفت که به ترتیب قطعات مورد انتظار با طول ۱۰۸۹ bp و ۲۹۶۱ bp حاصل و بدین ترتیب همسانه‌سازی ژن گاما- توکوفرول متیل ترانسفراز تایید گردید (شکل ۲B).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: A- تکثیر cDNA ی tmt-γ در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد توسط PCR. ردیف۱ نشانگر اندازه ملکولی kb ۱ (سینا ژن، ایران) .
B- تشخیص کلنی‌های نو ترکیب توسط آزمون کلنی‌های سفید- آبی. کلنی‌های آبی فاقد پلازمید نوترکیب و کلنی‌های سفید حاوی پلازمید نو ترکیب‌اند.



شکل۲: A) آزمون toothpick minipreparation. فاژمید هایی که بالاتر قرارگرفته اند (نشان داده شده با پیکان، ردیف های ۵، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲)، نوترکیب هستند. B) فاژمید نوترکیب هضم شده توسط آنزیم XbaI: مطابق انتظار ژن مورد نظر، به ترتیب از پایین به بالا، با طول bp ۱۰۸۹ و فاژمید با طول bp ۲۹۶۱ حاصل شد. M نشانگر اندازه ملکولی kb ۱ (سینا ژن، ایران).

بررسی ویژگی توالی اسیدهای آمینه و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین استنتاج شده از ژن هدف با استفاده از ابزار ProtParam نشان داد که ژن هدف، پروتئینی با طول ۳۶۲ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۹۸۰۰/۵ دالتون و pH ایزوالکتریک ۸/۲۸ را کد می‌کند. فرمول شیمیایی این پروتئین $C_{1764}H_{2785}N_{483}O_{529}S_{18}$ و در مجموع دارای ۵۵۷۹ اتم است. بیشترین و کمترین اسید آمینه را در توالی این پروتئین به ترتیب سرین (۴۲ عدد) با ۱۱/۲ درصد و هیستیدین (۷ عدد) با ۱/۹ درصد به خود اختصاص می‌دهند. این آنزیم دارای ۴۱ اسید آمینه بازی، ۳۸ اسید آمینه اسیدی، ۱۲۷ اسید آمینه آبگریز و ۹۹ اسید آمینه قطبی است. با استفاده از نرم افزار آنلاین iPsort مشخص گردید که پروتئین مذکور دارای پپتید پیام با توالی MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFSL برای انتقال به کلروپلاست است و نرم افزارهای آنلاین TargetP و Psort احتمال کلروپلاستی بودن این پروتئین را به ترتیب ۹۷ و ۱۰۰ درصد پیش بینی کردند. همردیف سازی توالی نوکلئوتیدی (شکل ۳) و اسید آمینه‌ای توالی (شکل ۴) به دست آمده با دیگر توالی‌های ثبت شده از گیاه گوجه فرنگی در بانک NCBI انجام شد. تفاوت‌هایی در نوکلئوتیدهای شماره ۸۴، ۲۷۳، ۵۶۱ و ۶۴۲ مشاهده شد. این تغییرات باعث جایگزینی دو اسید آمینه گردید (بحث را مشاهده کنید).

www.SID.ir

```
JN620365        -----------------ATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA 43
GU358684        ------------TAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA 48
GU563800        ------------TAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA 48
DQ456876        ATATATATAGTATAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA 60
ABE41794        -----------------ATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA 43
                                  ******************************************

JN620365        ACCCCACGTGTCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCTCTCTTCTTAAACCCCAGA 103
GU358684        ACCCCACGTGTCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCCAGA 108
GU563800        ACCCCACGTGTCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCCAGA 108
DQ456876        ACCCCACGTGTCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCCAGA 120
ABE41794        ACCCCACGTGTCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCCAGA 103
                ******************************************:******************

JN620365        TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTTGTAATAGTAGTAGAAGAAGAAGAAGAATGGCTA 163
GU358684        TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTTGTAATAGTAGTAGAAGAAGAAGAAGAATGGCTA 168
GU563800        TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTTGTAATAGTAGTAGAAGAAGAAGAAGAATGGCTA 168
DQ456876        TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTTGTAATAGTAGTAGAAGAAGAAGAAGAATGGCTA 180
ABE41794        TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTTGTAATAGTAGTAGAAGAAGAAGAAGAATGGCTA 163
                ************************************************************

JN620365        GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGTCTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC 223
GU358684        GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGTCTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC 228
GU563800        GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGTCTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC 228
DQ456876        GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGTCTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC 240
ABE41794        GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGTCTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC 223
                ************************************************************

JN620365        AGGAGCTGAAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA 283
GU358684        AGGAGCTGAAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA 288
GU563800        AGGAGCTGAAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA 288
DQ456876        AGGAGCTGAAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTTGGGAAGATA 300
ABE41794        AGGAGCTGAAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTTGGGAAGATA 283
                ************************************************ *********

JN620365        TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG 343
GU358684        TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG 348
GU563800        TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG 348
DQ456876        TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG 360
ABE41794        TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG 343
                ************************************************************

JN620365        ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTTGCTGCTATTTCTG 403
GU358684        ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTTGCTGCTATTTCTG 408
GU563800        ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTTGCTGCTATTTCTG 408
DQ456876        ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTTGCTGCTATTTCTG 420
ABE41794        ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTTGCTGCTATTTCTG 403
                ************************************************************

JN620365        AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT 463
GU358684        AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT 468
GU563800        AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT 468
DQ456876        AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT 480
ABE41794        AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT 463
                ************************************************************

JN620365        CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC 523
GU358684        CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC 528
GU563800        CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC 528
DQ456876        CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC 540
ABE41794        CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC 523
                ************************************************************

JN620365        AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGCTGATGCTCAGGGGTTAGGTGATAAGGTTTCATTTC 583
GU358684        AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC 588
GU563800        AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC 588
DQ456876        AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC 600
ABE41794        AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC 583
                ************************************.***********************
```

Archive of SID

www.SID.ir

```
JN620365        AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCGA 643
GU358684        AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA 648
GU563800        AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA 648
DQ456876        AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA 660
ABE41794        AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA 643
                ************************************************************ *

JN620365        TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTTGGCGAATTAGCTCGAGTGG 703
GU358684        TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTTGGCGAATTAGCTCGAGTGG 708
GU563800        TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTTGGCGAATTAGCTCGAGTGG 708
DQ456876        TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTTGGCGAATTAGCTCGAGTGG 720
ABE41794        TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTTGGCGAATTAGCTCGAGTGG 703
                ************************************************************

JN620365        CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCCTTCGG 763
GU358684        CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCCTTCGG 768
GU563800        CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCCTTCGG 768
DQ456876        CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCCTTCGG 780
ABE41794        CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCCTTCGG 763
                ************************************************************

JN620365        AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC 823
GU358684        AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC 828
GU563800        AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC 828
DQ456876        AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC 840
ABE41794        AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC 823
                ************************************************************

JN620365        TTCCGGCTTGGTGTTCCACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG 883
GU358684        TTCCGGCTTGGTGTTCCACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG 888
GU563800        TTCCGGCTTGGTGTTCCACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG 888
DQ456876        TTCCGGCTTGGTGTTCCACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG 900
ABE41794        TTCCGGCTTGGTGTTCCACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG 883
                ************************************************************

JN620365        ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT 943
GU358684        ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT 948
GU563800        ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT 948
DQ456876        ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT 960
ABE41794        ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT 943
                ************************************************************

JN620365        CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG 1003
GU358684        CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG 1008
GU563800        CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG 1008
DQ456876        CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG 1020
ABE41794        CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG 1003
                ************************************************************

JN620365        CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA 1063
GU358684        CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA 1068
GU563800        CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA 1068
DQ456876        CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA 1080
ABE41794        CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA 1063
                ************************************************************

JN620365        TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAA---------------------------------- 1089
GU358684        TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAATTATTGCTTAGCTACTGCGCG------------- 1115
GU563800        TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAATTATTGCTTAGCTACTG----------------- 1111
DQ456876        TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAATTATTGCTTAGCTACTGATGAATAATACAACATC 1140
ABE41794        TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAA---------------------------------- 1089
                *************************
```

شکل ۳: همردیف سازی توالی نوکلئوتیدی cDNAی ژن گاما توکوفرول متیل ترنسفراز بین رقم Memory 1 (با شماره دستیابی JN620365) و دیگر اکسشن های ثبت شده از گوجه فرنگی در بانک NCBI

Archive of SID

www.SID.ir

```
GU563800        MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFTLLKPQIHRRRIITCCNSSRRRRRMASVAAMN 60
GU358684        MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFTLLKPQIHRRRIITCCNSSRRRRRMASVAAMN 60
DQ456870        MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFTLLKPQIHRRRIITCCNSSRRRRRMASVAAMN 60
ABE41794        MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFTLLKPQIHRRRIITCCNSSRRRRRMASVAAMN 60
JN620365        MGSQCYSAYSIQSLNPTCPSSSSSSVIFSLLKPQIHRRRIITCCNSSRRRRRMASVAAMN 60
                ****************************:*******************************

GU563800        AVSSSSVEVGIQNQQELKKGIADLYDESSGIREDIWGDHMHHGYYEPKSSVELSDHRAAQ 120
GU358684        AVSSSSVEVGIQNQQELKKGIADLYDESSGIREDIWGDHMHHGYYEPKSSVELSDHRAAQ 120
DQ456870        AVSSSSVEVGIQNQQELKKGIADLYDESSGIWEDIWGDHMHHGYYEPKSSVELSDHRAAQ 120
ABE41794        AVSSSSVEVGIQNQQELKKGIADLYDESSGIWEDIWGDHMHHGYYEPKSSVELSDHRAAQ 120
JN620365        AVSSSSVEVGIQNQQELKKGIADLYDESSGIREDIWGDHMHHGYYEPKSSVELSDHRAAQ 120
                ****************************** ***************************

GU563800        IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGGSSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ 180
GU358684        IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGGSSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ 180
DQ456870        IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGGSSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ 180
ABE41794        IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGGSSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ 180
JN620365        IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGGSSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ 180
                ************************************************************

GU563800        ALADAQGLGDKVSFQVADALNQPFPDGQFDLVWSMESGEHMPNKEKFVGELARVAAPGGT 240
GU358684        ALADAQGLGDKVSFQVADALNQPFPDGQFDLVWSMESGEHMPNKEKFVGELARVAAPGGT 240
DQ456870        ALADAQGLGDKVSFQVADALNQPFPDGQFDLVWSMESGEHMPNKEKFVGELARVAAPGGT 240
ABE41794        ALADAQGLGDKVSFQVADALNQPFPDGQFDLVWSMESGEHMPNKEKFVGELARVAAPGGT 240
JN620365        ALADAQGLGDKVSFQVADALNQPFPDGQFDLVWSMESGEHMPNKEKFVGELARVAAPGGT 240
                ************************************************************

GU563800        IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAFYLPAWCSTADYVKLLQSNSLQDIKAED 300
GU358684        IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAFYLPAWCSTADYVKLLQSNSLQDIKAED 300
DQ456870        IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAFYLPAWCSTADYVKLLQSNSLQDIKAED 300
ABE41794        IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAFYLPAWCSTADYVKLLQSNSLQDIKAED 300
JN620365        IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAFYLPAWCSTADYVKLLQSNSLQDIKAED 300
                ************************************************************

GU563800        WSENVAPFWPAVIKSALTWKGFTSVLRSGWKTIKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK 360
GU358684        WSENVAPFWPAVIKSALTWKGFTSVLRSGWKTIKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK 360
DQ456870        WSENVAPFWPAVIKSALTWKGFTSVLRSGWKTIKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK 360
ABE41794        WSENVAPFWPAVIKSALTWKGFTSVLRSGWKTIKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK 360
JN620365        WSENVAPFWPAVIKSALTWKGFTSVLRSGWKTIKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK 360
                ************************************************************

GU563800        PE 362
GU358684        PE 362
DQ456870        PE 362
ABE41794        PE 362
JN620365        PE 362
                **
```

شکل ۴: همردیف سازی توالی اسید آمینه ای منتج شده از cDNAی ژن گاما توکوفرول متیل ترنسفراز بین رقم Memory 1 (با شماره دستیابی JN620365) و دیگر اکسشن های ثبت شده از گوجه فرنگی در بانک NCBI.

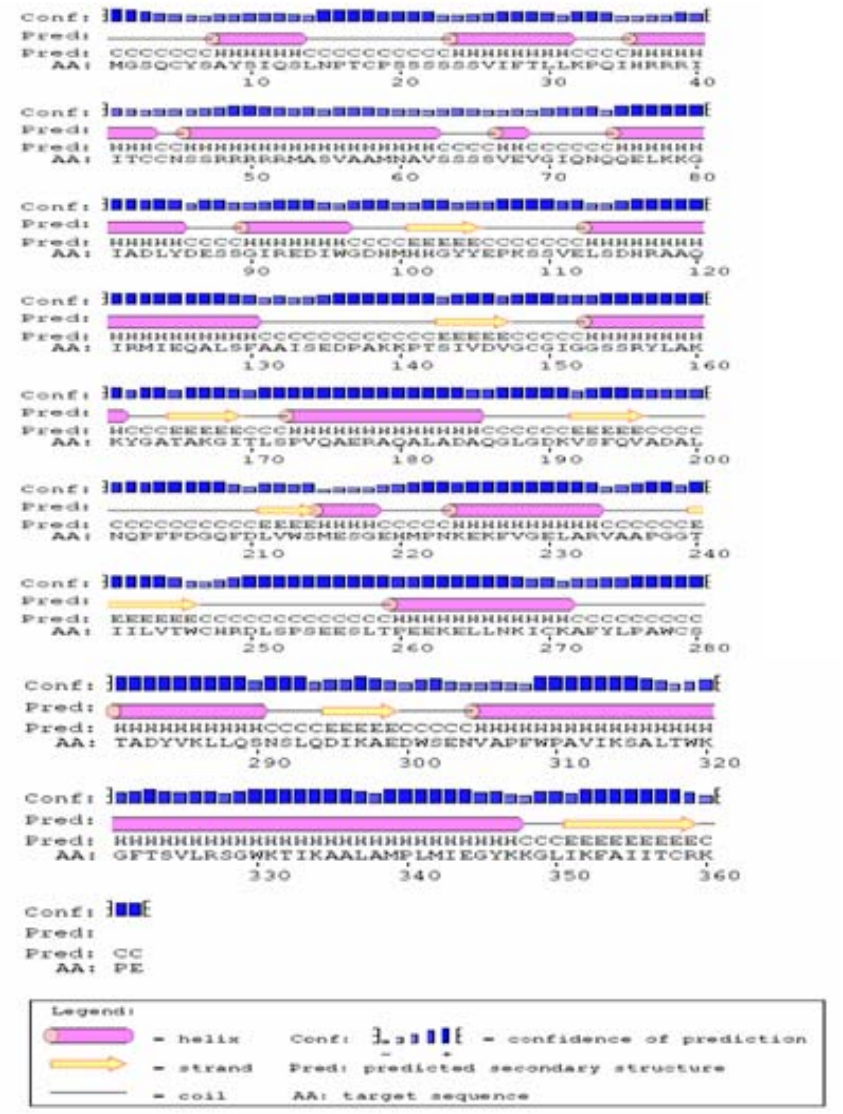
بررسی درخت فیلوژنتیکی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز با استفاده از نرم افزار Clustalw صورت گرفت. به همین منظور از ژن های گاما توکوفرول متیل ترانسفراز دیگر گیاهان ثبت شده در NCBI استفاده شد (شکل ۵). بررسی های انجام شده با استفاده از نرم افزار Clustalw نشان داد که پروتئین منتج از ژن همسانه سازی شده با پروتئین های ثبت شده مشابه در بانک ژن NCBI، ۳۲ تا ۹۹/۵ درصد تشابه دارد. ژن توالی یابی شده با داشتن ۹۹/۵ و ۹۸/۶ درصد، بیشترین تشابه را به ترتیب با توالی‌های *Solanum penellii* و *Solanum tuberosum* با شماره ی دستیابی ADZ24710 و ADV36922 و کمترین تشابه را با *Synechococcus* با ۳۲ درصد، نشان داد. ساختار دوم پروتئین در اثر فعل و انفعالات پیوند هیدروژنی باقی مانده اسیدهای آمینه در داخل یا بین زنجیره های پپتیدی ایجاد می شود. پیش بینی ساختار دوم پروتئین ژن هدف با استفاده از نرم افزار آنلاین PSIpred صورت گرفت و نتایج نشان داد که این پروتئین از ۱۶ مارپیچ آلفا، ۸ صفحه ی بتا و ۲۳ کویل تشکیل شده است (شکل ۶).

www.SID.ir
Archive of SID

*شکل ۵: درخت فیلوژنتیک پروتئین گاما توکوفرول متیل ترانسفراز گیاهان موجود در NCBI. I توالی هایی که با پروتئین منتج شده از ژن توالی یابی شده ۳۰تا۴۰ درصد شباهت دارند. II توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۴۰تا۵۰ درصد شباهت دارند، III توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۵۰تا۶۰ درصد شباهت دارند، IV توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۷۰تا۸۰ درصد شباهت دارند V توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۸۰ تا۹۰ درصد و VI توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۹۰تا۹۹ درصد شباهت دارند. * توالی پروتیین مورد بررسی.*

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۶: پیش بینی ساختار دوم پروتئین گاما توکوفرول متیل ترانسفراز با استفاده از نرم افزار آنلاین PSI pred.

شکل ۷: ساختار سوم آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز با استفاده از نرم افزار آنلاین PSI pred.

www.SID.ir

مدل سازی تطبیقی، روشی معتبر برای پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین ها بر اساس توالی اسید آمینه می باشد. برای ترسیم ساختار سوم پروتئین ژن هدف توالی اسیدآمینه ای آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در سایت PS2 مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم سارکوزین دی متیل گلایسین متیل ترانسفراز *Galdieria sulphuraria* (PDB 2O57) با ۲۱ درصد شباهت به عنوان الگو در نظر گرفته شد (شکل ۷).

بحث

در گیاهان فتوسنتز کننده، توکوفرول ها در پاسخ به بسیاری از تنش های غیر زنده افزایش نشان می دهند؛ از جمله نور شدید (۲۲) خشکی (۲۳) و دماهای پایین و بالا (۲۴). بیشتر توکوفرول ها در گیاهان در پلاستید ها قرار دارند، تنها استثنا در این مورد، گیاهان دانه روغنی است که توکوفرول‌ها در دانه این گیاهان به صورت ذرات روغن (oil bodies) که از شبکه آندوپلاسمی منشا می‌گیرند، ذخیره می شوند (۱۴). این مطالعه با هدف همسانه سازی ژن گاماتوکوفرول متیل ترنسفراز از گیاه گوجه فرنگی، مطالعه و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و ملکولی پروتئین منتج از آن و در نهایت، انتقال آن به یک گیاه دانه روغنی، در پژوهش های آینده صورت گرفت. انتقال این ژن (گاما توکوفرول متیل ترنسفراز) می تواند هم ارزش غذایی گیاه را به دلیل تولید بیشتر آلفا توکوفرول بالا ببرد و هم از نظر افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش ها، مفید واقع شود.

ژن همسانه سازی شده با ژن های ثبت شده گوجه فرنگی در بانک ژن ۹۸ درصد شباهت را نشان داد. تفاوت هایی در موقعیت های ۸۴، ۲۷۳، ۵۶۱ و ۶۴۲ در بین توالی های نوکلئوتیدی همردیف سازی شده بین ژن ثبت شده در این پژوهش با شماره دستیابی JN620365، با ژن ثبت شده با شماره دستیابی DQ456876 که به عنوان توالی مرجع استفاده شده بود، مشاهده گردید (شکل ۳). این تفاوت ها به ترتیب شامل جایگزینی یک نوکلئوتید A به جای T، یک نوکلئوتید C به جای T، یک نوکلئوتید A به جای G و یک نوکلئوتید C به جای G می شد. این تغییرات به ترتیب باعث تبدیل کدون ACT به TCT، کدون TGG به CGG، کدون GGA به GGG و TCC به TCG شده اند (شکل ۴). در دو موقعیت ۸۴ و ۲۷۳ جایگاه اول کدون و در موقعیت ۵۶۱ و ۶۴۲ جایگاه سوم کدون تغییر یافته اند. تغییر در جایگاه ۸۴ موجب تبدیل اسید آمینه ی ترئونین به سرین، در جایگاه ۲۷۳ اسیدآمینه ی تریپتوفان به آرژنین و در موقعیت های ۵۶۱ و ۶۴۲، به ترتیب، کدون گلایسین و سرین به کدون های دیگری از همین اسیدهای آمینه تبدیل شده اند (شکل های ۴ و ۵). در بین چهار تغییری که در کدون ها رخ داده بود، تنها دو کدون، اسیدهای آمینه متفاوتی را بوجود می آورند. تبدیل اسید آمینه ترئونین به سرین (تغییر در جایگاه ۸۴) شاید باعث تغییر عمده ای در ساختار و عملکرد پروتئین حاصله نشود؛ زیرا هر دوی این اسید های آمینه از نظر ساختاری بسیار به هم شبیه و جزو اسید های آمینه قطبی بدون بارند. اما تبدیل اسید آمینه تریپتوفان به آرژنین (تغییر در جایگاه ۲۷۳) می تواند تغییر اساسی در ساختار و در نتیجه در عملکرد پروتئین حاصله داشته باشد؛ زیرا تریپتوفان جز اسیدهای آمینه آبگریز و آرژنین جز اسیدهای آمینه بازی دارای بار مثبت است. چنین جایگزینی یک تغییر عمده در قسمتی از ساختار و خصوصیت بیوشیمی یک پروتئین محسوب می‌شود. این تغییر در سه اکسشن دیگر گوجه فرنگی هم به چشم می‌خورد (شکل ۵). حال این که کدام یک از این آیزوفرم ها می تواند گاما توکوفرول را به آلفا توکو فرول تبدیل نماید و یا با کارآیی بیشتری این عمل را انجام دهد، به انتقال این آیزوفرم ها به گیاهان جهش یافته‌ی فاقد این ژن و بررسی میزان تولید آلفا تو کوفرول در آن‌ها نیاز دارد. در هر صورت، پروتئین حاصله دارای ۳۶۲ اسید آمینه و وزن ملکولی حدود ۳۹ kD است که با پروتئین های مشابه از گیاه فلفل زنگوله ای با وزن ملکولی ۳۳ kD (۱۰) و پروتئین فلفل دلمه‌ای با وزن ملکولی ۳۶ kD (۲۵) مشابهت دارد.

مشاهده گردید که ژن به دست آمده در این مطالعه دارای توالی راهنمای پلاستیدی است. این یافته با حضور توکوفرول ها در کلروپلاست مطابقت دارد (۱۴)، به این معنی که این آنزیم باید جهت تبدیل گاما توکوفرول به آلفا توکوفرول، به مکان سوبسترای خود (درون کلروپلاست)، حمل گردد. توکوفرول های آلفا، بتا، گاما و دلتا دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی مختلفی دربرابر اکسایش لیپیدها در شرایط *in vivo* دارند. هر ملکول از این توکوفرول‌ها می‌تواند به ترتیب علیه ۲۲۰، ۱۲۰، ۱۰۰ و ۳۰ ملکول PUFA (polyunsaturated fatty acid) فعالیت داشته باشد. همچنین پیشنهاد شده که توکوفرول‌ها نقش مهمی را در محافظت از دستگاه فتو سنتزی گیاه دارند و دیده شده است که در پا سخ به تنش‌های غیر زنده مانند خشکی و وجود فلزات سنگین افزایش نشان می دهند (۲۶). تبدیل گاما توکوفرول به شکل فعال‌تر آن یعنی آلفا توکوفرول توسط آنزیم گاما توکوفرول

Archive of SID
www.SID.ir

متیل ترنسفراز صورت می‌گیرد (۱۶) که انتقال این ژل به گیاهان هدف، از جمله گیاهان دانه روغنی می‌تواند در افـزایش خاصـیت تغذیه ای و عملکرد آن ها در شرایط سخت نقـش مهمـی را ایفـا نماید.

نتیجه‌گیری

آلفا توکوفرول ماده ضـد اکسـنده قـوی اسـت کـه طـی واکـنش بیوشیمیایی از گاما توکوفرول ساخته می شود. با افـزایش میـزان این آنزیم از طریق مهندسی ژنتیک می توان محتوای ویتامین E گیـاه و مقاومـت آن را در برابـر تـنش هـای محیطـی بـالا بـرد. مهندسی ژنتیکی را می توان جایگزین بالقوه‌ی منبع ویتـامین E با فرض تولیـد مقـرون بـه صـرفه‌ی اقتصـادی نسـبت بـه تولیـد شیمیایی آلفـاتوکوفرول در نظـر گرفـت. در میـان گیاهـان دانـه روغنی بعلت غنی بودن از گاما توکـوفرول بهتـرین هـدف تولیـد اقتصادی توکوفرول ها از طریق مهندسی مسـیر بیوسـنتزی آنهـا می باشد. بنابراین برای ابربیان ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در گیاهـان مـذکور بایـد ژن همسـانه سـازی شـده در ناقـل pBluescript را به یک ناقـل بیـانی همسـانه سـازی کـرد و بـه گیاهان دانه روغنی انتقال داد.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از بودجه گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) تـامین گردیـد کـه بـه ایـن وسـیله تشکر می‌گردد.

منابع

1. Traber MG, Sies H. Vitamin E and humans: demand and delivery. Annu Rev Nutr. 1996; 16: 321–347.

2. Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Leishman DJ, Duthie GG, et al. Purification and partial characterization an α-tocopherol binding protein from rabbit heart cytosol. Mol Cell Biochem.1993; 123:139–44.

3. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* Antioxidant. Ann NY. Acad. Sci. 1989; 570: 7-22.

4. Stahelin, HB, et al. Cancer Mortality and Vitamin E Status. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1989; 570: 391-99.

5. Wang YeuMing, Purewal M, Nixon B, Li H, et al. Vitamin E and cancer prevention in an animal. Model. Ann NY. Acad. Sci. 1989; 570: 383-91.

6. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, et al. Oxygen radical and human disease. Ann. Inter. Med. 1987; 107: 526-45.

7. Arango Y, Heise K. Localization of alpha-tocopherol synthesis in chromoplast envelope membrane of *Capsicum annum* L. Fruits J Exp Bot. 1998; 49: 1259-1262.

8. Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science.1998; 282: 2098-2100.

9. Soll J, Kemmerling M, Schultz G. Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. Arch Biochem Biophys. 1980; 204: 544–550.

10. Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, et al. Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelop membranes from spinach chloroplasts. Arc Biochem Biophys. 1985; 238: 290-299.

11. d'Harlingue A, Camara B. Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis. J Biol Chem. 1985; 260: 15200-15203.

12. Kurk j, Hollander-Czytko H, Oett meier W, Trebst A. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. J Plant Physiol. 2005; 162: 749-757.

13. Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. Plant Physiol. 2008; 147: 764-778.

14. Maeda H, Song W, Sango TL, Dellapenna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in Arabidopsis. Plant Cell. 2006; 18: 2710-2732.

15. Kim MJ, Baek SH, Yoo NH, Yun SJ. Transformation of Arabidopsis gamma-tocopherol methyltransferase into lettuce (*Lactuca sativa* L.) Korean J Plant Tiss Cult. 2005; 27: 435-439.

16. Yusuf MA, Sarin NB. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of *Brassica juncea* with γ-TMT gene for increased α -tocopherol content. Transgenic Res. 2007; 16: 109-113.

17. Lee BK, Kim SL, Kim KH, YU SH, et al. Seed specific expression of perilla gamma-tocopherpl methyltransferase increases alpha-tocopherol content in transgenic perilla (*Perilla frutescens*). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008; 92: 47-54.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Ghimirie BK, Seong ES, Lee CO, Lim JD, et al. Enhancement of α-tocopherol content in transgenic *Perilla frutescens* containing the γ-*tmt* gene. 2011; 10: 2430-2439.

19. Tavva VK, Kim YH, Kagan IA, Dinkins RD, et al. Increased alpha-tocopherol content in soybean seed over expressing the *Perilla frutescens* gamma-tocopherol methyltransferase gene. Plant Cell Rep. 2007; 26: 61-70.

20. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real time RT-PCR during berry development. BMC Plant Biol. 2006; 6: 27. doi: 10.1186/1471-2229-6-27.

21. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 2001; 1524-1526.

22. Ledford HK, Baroli I, Shin JW, Fischer BB, et al. Comparative profiling of lipid –soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophylls-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Genet Genomics. 2004; 272: 470-479.

23. Munne-Bosch S, Schwarz K, Alegre L. Enhanced formation of α-tocopherol and highly oxidized abietane diterpene in water-stressed rosemary plants. Plant Physiol. 1999; 121: 1047-1052.

24. Bergmuller E, Porfirova S, Dormann P. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ-tocopherol methyltransferase. Plant Mol Biol. 2003; 52: 1181-1190.

25. Koch M, Lemek R, Heise K, Mock H. Characterization of γ-tocopherol methyltransferases from *Capsicum annuum* and *Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem. 2003; 270: 84-92.

26. Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, et al. Overexpression of γ-tocopherol methyltransferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. Biochemica et Biophysica Acta. 2010; 1797: 1428-1238.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Spring 2012; 3(1): 29-41

Molecular Characterisation of Gamma Tocopherol Methyl Transferase (γ-*tmt*) From Tomato CV Memory 1

Raoufzadeh T, M.Sc.[1], Hosseini R, Ph.D.[2*]

1. M.Sc. Graduated Student in Agricultural Biotechnology

2. Assistant Lecturer in Agricultural Biotechnology Department

* Email corresponding author: raminh_2001@Tahoo.com & r.hosseini@ikiu.ac.ir

Received: 10 Dec. 2011 Accepted: 19 Jun. 2012

Abstract

Aim: The aim of this research was the cloning and sequencing of gamma tocopherol methyl transferase gene (γ-*tmt*) from Memory 1 cv and transferring it into an oilseed plant such as canola, in the future studies for improving its nutritional value.

Material and Methods: Total RNA was extracted from tomato fruit and cDNA constructed. By using specific primers the γ-*tmt* gene was amplified by PCR reaction and a 1089 bp fragment was produced. The amplified fragment and the pBluescript (SK-) vector were digested by *Xba*I. The ligation reaction was carried out by T4 ligase. *E. coli* competent cells were transformed by the resulting vector and recombinant colonies were identified using the white-blue screening assay.

Results: The nucleotide sequence of the gene was determined and aligned with the available sequences recorded in the NCBI data bank. This sequence showed 98% similarity with the other recorded γ-*tmt*s from Solanaceae family. Some changes in nucleotide sequence and the deduced amino acids were observed. The secondary and tertiary structures of the protein were predicted, using PSIpred software. A phylogenetic tree was also constructed for the protein product of the gene, using ClustalW.

Conclusion: The cloned cDNA of γ-*tmt* showed 98 % similarity with the recorded sequence from tomato cv Cerasiforme. Upon transfer of this gene into an oil seed plant such as canola, one can increase both its nutritional value and resistance to environmental stresses.

Keywords: Gamma tocopherol methyltransferase, Secondary structure, Vitamin E

Archive of SID

www.SID.ir