



شناسایی و بیان نو ترکیب ایزوفرم ژنی سنتز کننده کروسین در کلاله زعفران

نورالدین حسین پورآزاد^{*۱}

تاریخ دریافت: ۸ خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۱۲ آذر ۱۳۹۷

حسین پور آزاد، ن. ۱۳۹۸. شناسایی و بیان نو ترکیب ایزوفرم ژنی سنتز کننده کروسین در کلاله زعفران. زراعت و فناوری زعفران،

۴۸۱-۴۹۰: (۴)۷

چکیده

وجود ایزوفرم‌های ژنی مختلف در گیاهان منجر به ایجاد ایزومرهای مختلف از متابولیت‌ها به مانند متابولیت‌های گلیکوزیده شده می‌گردند. در تحقیق حاضر به شناسایی و بیان هترو لوگ ایزوفرم ژنی کدکننده آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز کلاله گیاه زعفران در مرحله گرده افشانی پرداخته شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی ژنی جدا شده از ژنوم گیاه زعفران با استفاده از آغازگرهای هرزگرد نشان داد که این توالی ژنی با اندازه ۱۳۶۸ جفت باز متعلق به خانواده پروتئینی گلیکوزیل ترانسفرازها بوده که بصورت آپوپلاستی در سلول ترشح می‌گردد. جهت بررسی عملکرد آنزیمی، ابتدا توالی کامل ژنی ایزوله شده با تکنیک Gibson Assembly در وکتور بیانی pThio-UGT تحت پروموتور القایی آرایینوز، ساب کلون شده و با روش الکتروپوراسیون در سویه باکتریایی BL21-pGro که بیان کننده پروتئین‌های چاپرونی با زیرواحدهای EL و ES بود تراریخت گردید. پروتئین‌های بیانی به دنبال تخریب دیواره باکتری با روش فراصوت و سوسپانسیون سازی رسوب باکتری در محلول PBS، به روش جوشانیدن استخراج شد. نهایتاً جداسازی پروتئین‌های نو ترکیب با بارگذاری روی ژل SDS-PAGE٪۱۰ نشان داد که حاصل بیان هترو لوگ ایزوفرم ژنی آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز پروتئینی با وزن مولکولی ۶۹/۵ kDa می‌باشد. نتایج حاصل از این پروژه می‌تواند در تعیین استراتژی‌های اصلاح نژادی برای بهبود صفات کیفی و کمی مانند رنگ و عطر در گیاه زعفران به کار گرفته شوند.

کلمات کلیدی: بیان نو ترکیب، باکتری *E. coli*، کروسین، گلیکوزیل ترانسفراز.

۱ - استادیار گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشکین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی
(* - نویسنده مسئول: Gmplant21@gmail.com)

مقدمه

زعفران^۱ از جمله با ارزش ترین محصولات معروف در جهان بوده که از کلاله آن به عنوان ادویه، دارو و افزایش دهنده های غذایی استفاده می شود. کیفیت کلاله زعفران به داشتن آپوکاروتنوئیدهایی هم چون کروستین و فلانوئیدها بستگی دارد. ویژگی های آنتی اکسیدانی این متابولیت ها همراه با مزه تلخ آن ها در کیفیت عوامل حسی ادویه تأثیر گذار می باشند (Hansen et al., 2003). گیاهان در واکنش به عوامل محیطی و تعامل با آن و همچنین در نتیجه اثرات متقابل با دیگر ارگانیزم ها هزاران نوع از ترکیبات را تحت عنوان متابولیت های ثانویه تولید می نمایند. گستردگی و تنوع متابولیت های ثانویه به دلیل تغییرات ثانویه در اسکلت اصلی آن ها می باشد که یکی از این تغییرات ثانویه گلیکوزیلاسیون می باشد. عمل گلیکوزیلاسیون شامل اتصال یک یا چند واحد از قندهای فعال به گلیکون ها (تأمین کننده های مشتقات کربوهیدرات و اسیدهای آمینه) به فرم باندهای گلیکوزیدی می باشد که کاتالیز این واکنش ها بر عهده آنزیم های گلیکوزیل ترانسفراز (*UGT*) می باشد این آنزیم ها نقش عمده ای در توسعه و تنظیم هموستازی متابولیکی و فرایند سم زدایی سلولی دارند (Kumar et al., 2012). آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز دارای ایزوفرم های مختلفی در گیاه زعفران (*Crocus sativus*) بوده که محل اثر این آنزیم سیتوپلاسم و هسته سلول های کلاله و مادگی می باشد. آنالیز بیان این ژن نشان می دهد که نسخه های ژنی گلیکوزیل ترانسفراز تقریباً در کلاله تمامی گونه های زعفران یافته می شود و از مهمترین نقش این آنزیم های گلیکوزیله کننده افزایش قطبیت و محلول پذیری متابولیت ها در سلول می باشد (Lunken et al., 2006). گلیکوزیلاسیون از طریق UDP-کربوهیدرات وابسته به آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز

حاصل می گردد همچنین این آنزیم باعث کاتالیز انتقال کربوهیدرات از منابع قندی مختلف به مولکول های کوچک گیرنده و ایجاد فرم های باندهای گلیکوزیدی می گردد (Gosch et al., 2010; Li et al., 2010). رنگ زعفران (کروستین) فرم گلیکوزیله شده ماده تلخ کروستین در کلاله های گیاه زعفران می باشد. در تحقیقی حسین پورآزاد و همکاران (Hosseinpour et al., 2017) به جداسازی و شناسایی ایزومرهای کروستین و کروستین در عصاره متانولی و کلرفرمی کلاله زعفران در مرحله گرده افشانی با دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی (LC-APCI-MS) پرداخته و تعداد ۷ ترکیب را به عنوان ایزومرهای سیس و ترانس کروستین شناسایی نمودند. فرم های مختلف شناسایی شده کروستین ها که از جمله ترکیبات مهم قطبی گروه متابولیت های کاروتنوئیدی در کلاله زعفران می باشند به فرم استرهای کروستین-گلوکز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل) و جنتیوبیوز (بتا دی گلوکوپیرانوزیل دی گلوکز) شناسایی گردیدند. در تحقیق دیگری دمورتاس و همکاران به بررسی بیان هترولوگ یکی از ایزوفرم های ژنی کدکننده آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز کلاله زعفران (*CsUGT74AD1*) در سویه های مختلف باکتری اشرشیاکلی پرداخته و بیان آبشاری گروهی از ژن های دخیل در مسیر بیوسنتزی رنگ زعفران (کروستین) را از محل شکست آنزیمی پیش ماده بتاکاروتن تا سنتز کروستین را به اثبات رساندند (Demurtas et al., 2018). در تحقیق حاضر با توجه به نقش های اساسی آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز (*UGT*) در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت های گیاهی، به شناسایی و همسانه سازی توالی ژنی کدکننده این آنزیم در زمان گرده افشانی کلاله زعفران و بیان هترولوگ این توالی ژنی در باکتری اشرشیاکلی پرداخته شده است.

1 *Crocus sativus*

مواد و روش‌ها

شد. سپس ارزیابی محصول PCR حاصله با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ صورت گرفته و خالص سازی محصول PCR با بکارگیری ستون حاوی رزین (Seohadex G50) انجام و خلوص و مقدار محصول خالص گردیده با روش نانودراپ جهت استفاده در واکنش اتصال^۲ تعیین گردید. قطعه ژنی جدا شده به طول ۱۳۶۸bp در پلاسمید pBlue script با اندازه ۳۰۰۰bp به عنوان ناقل همسانه سازی طی واکنش اتصال با آنزیم T4 لیگاز (Fermentas) قرار گرفته و محصول واکنش اتصال با روش الکتروپوراسیون به باکتری‌های مستعد DH5 α انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت، واکنش Colony PCR از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، IPTG (100mM) و X-gal (۲٪) انجام شد. تعداد ۱۵ کلنی نوترکیب حاوی ژن مورد نظر در محیط LB مایع که حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود تلقیح گردیده و پس از کشت شبانه، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب pBlue-UGT توسط کیت استخراج Miniprep (کیاژن) انجام گرفت، به دنبال خالص سازی پلاسمیدهای استخراج شده با ستون حاوی رزین (Sephadex G50)، توالی‌یابی قطعه ژنی UGT با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از قسمت داخلی ژنی مورد نظر و توالی‌های جانبی مجاور با ژن از پلاسمید pBluescript، با استفاده از دستگاه توالی‌یابی Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer به روش پایان‌دهی زنجیر (سانگر) انجام گردیده و پس از تعیین کانتیگ‌های حاصل از توالی‌یابی با نرم افزار ژنتیکی Aligner ver. 3، در سایت NCBI بلاست ژن صورت پذیرفت که نتایج حاصله نشان داد قطعات تکثیر یافته با توالی ژنی مرتبط با آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز همولوژی دارند. توالی‌های با تشابه بالاتر از ۷۰٪ با توالی ژنی تکثیر یافته انتخاب و با استفاده از

کلاله‌های خشک شده زعفران در مرحله گرده افشانی جمع-آوری گردیده و در دمای ۸۰°C- تا زمان آزمایش نگهداری گردیدند. جهت شناسایی و جداسازی ژن *CsUGT* بیان شده در کلاله‌های گیاه زعفران RNA کل و mRNA با استفاده از کیت Neb magnetic RNA isolation kit طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس با به کارگیری مقدار ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده و آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی الیگو dt با استفاده از کیت (Qiagen) طبق پروتکل سنتز گردید. از استراتژی همولوژی بر پایه نواحی اختصاصی حفاظت شده جهت طراحی آغازگرهای مناسب و ایزوله سازی ژن کدکننده آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز (*UGT*) در کلاله‌های زعفران استفاده گردید (Woo et al., 2007). سپس cDNA های سنتز شده به عنوان الگو جهت تکثیر ناحیه ژنی کد کننده UGT با به کارگیری پرایمرهای هرزگرد^۱ طراحی شده از نواحی ژنی حفاظت شده به عنوان آغازگر رفت و برگشت مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۰/۵ واحد از آنزیم Q5 پلیمرز (NEB)، ۱ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی-مولار dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر 5SQ5 و همچنین ۵۰ نانوگرم از رشته cDNA حاصل از کلاله زعفران به عنوان الگو انجام پذیرفت. واکنش PCR در ۲۰ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمان مورد نیاز در هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۸°C به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر توالی ژنی مورد هدف در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام

2Ligation

1Degenerate Primer

حاصله با سانتیفریوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جمع آوری گردیده و نمونه‌های رسوب داده شده با محلول PBS به صورت سوسپانسیون در آمده و به منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتیفریوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت و فاز رویی آن جهت جداسازی پروتئین‌های بیان شده بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ بارگذاری شده و الکتروفورز گردیدند.

نتایج و بحث

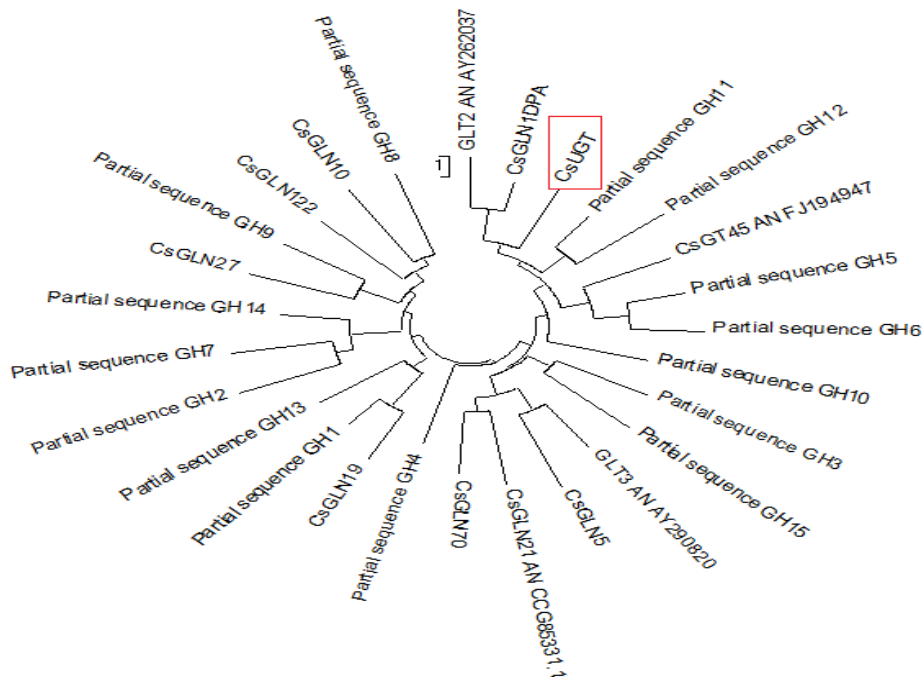
تعیین توالی کامل پلاسمید نوترکیب pBlue script-UGT با دستگاه Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer تأیید کننده صحت الحاق قطعه ژنی UGT در پلاسمید بود. جهت شناسایی گلیکوزیل ترانسفرازهای احتمالی در کتابخانه‌های مختلف EST بلاست توالی‌های UGT حاصله از آغازگرهای هرزگرد با توالی‌های ثبت شده در NCBI انجام پذیرفت (Subramanian et al., 2007; Ono et al., 2010). بلاست توالی حاصل در برابر توالی‌های موجود در سایت NCBI نشان داد که قطعه ژنی جدا شده مربوط به خانواده ژنی کدکننده گلیکوزیل ترانسفرازها می‌باشد (شکل ۱). در نهایت بزرگترین کانتینگ در مقایسه با داده‌های موجود در پایگاه داده‌ای NCBI بر پایه هم‌ردیفی چندگانه با افزونه CLUSTAL W به عنوان توالی ژنی UGT زعفران جهت بیان در باکتری *E. coli* انتخاب گردید.

به دلیل اینکه زعفران گیاهی تریپلوئید می‌باشد جهت شناسایی آلل‌های بالقوه UGT از داده‌های EST حاصله از روش آنالیز *In silico* در پایگاه ساپروژن استفاده گردید. با اطمینان از اینکه توالی ژنی تکثیر یافته از مجموعه ژنی

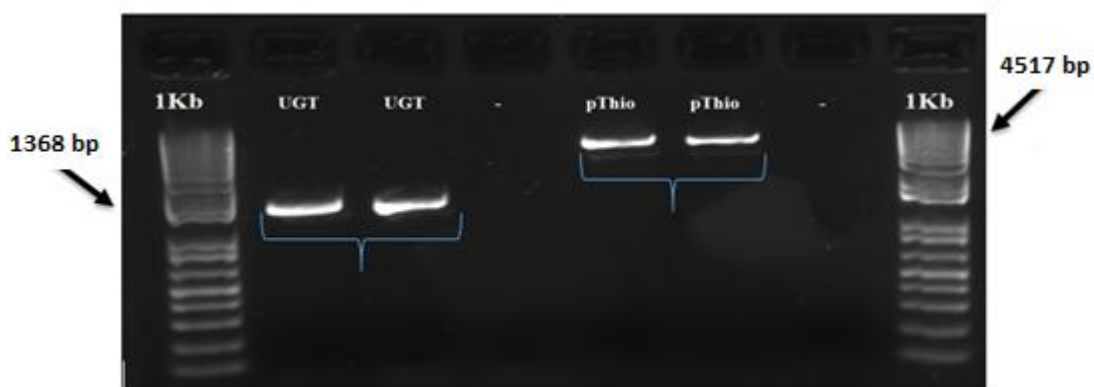
افزونه Clustal W در نرم افزار Bioedit ver 7.09 هم‌ردیفی چندگانه انجام شده و مقایسه فاصله مولکولی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و تحلیل‌های فیلوژنتیک، با محاسبه درخت-های مولکولی میانبرترین (Maximum Parsimony, MP) برای توالی ژن‌های مورد مطالعه انجام، و برای آزمون میزان صحت گره‌ها از شاخص بوت استرپ ۱۰۰۰ جهت تحلیل‌ها استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل از بلاست توالی، نهایتاً تعداد سه کلنی که حاوی قطعه کاملی از ژن گلیکوزیل ترانسفراز بود جهت بررسی بیان در باکتری BL21-pGro7 انتخاب گردیدند. عمل ساب کلونینگ قطعه ژنی UGT از پلاسمید pBlue script به پلاسمید بیانی pThio-Dan که خود دارای توالی ژنی مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین (Spec) بود با استفاده از تکنیک Gibson Assembly انجام شد این تکنیک فرایند همسانه‌سازی را بدون نیاز به آنزیم‌های برشی امکانپذیر می‌سازد (Gibson et al., 2009). پس از الحاق قطعه ژنی UGT در پلازمید pThio-Dan سازه ژنی حاصله pThio-UGT جهت اطمینان از صحت توالی انتقال یافته از نظر عدم وجود جهش-های نقطه‌ای در بخش‌های مختلف ژن از جمله نواحی پروموتوری، به طور کامل توالی‌یابی گردیدند. نهایتاً یکی از کلنی‌های مربوط به پلاسمید نوترکیب pThio-UGT که دارای توالی کاملی از قطعه ژنی UGT بود با استفاده از روش الکتروپوراسیون جهت ارزیابی بیان هترولوگ در باکتری BL21 pGro7 که هم دارای توالی ژنی مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلروآمفینیکل (Cm) و هم قابلیت بیان پروتئین‌های شاپرونی را داشت تراریخت گردید. کلنی‌های حاصله در محیط کشت مایع (-LB) به حجم ۵۰ میلی‌لیتر که حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفینیکل (۲۰ ug/ml) و اسپکتینومایسین (۱۰۰ ug/ml) (-LB-Cm-Spec) بود در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت تا رسیدن به OD ۰/۷-۰/۶ رشد داده شدند. سلول‌های

زعفران از ایزوفرم‌های ژنی خانواده گلیکوزیل ترانسفرازها می- باشد به بررسی بیان این توالی ژنی در باکتری BL21-pGro7 پرداخته شد. Colony PCR و توالی‌یابی پلاسمید حاصل از ساب کلونینگ توالی ژنی *UGT* از پلاسمید نو ترکیب pBlue script- *UGT* به پلاسمید بیانی pThio-Dan با تکنیک Gibson Assembly نشان داد که قطعه ژنی *UGT* بطور کامل تحت پروموتور القایی آرابینوز در پلاسمید pThio-Dan قرار گرفته و منجر به ایجاد پلاسمید نو ترکیب بیانی pThio-Dan-*UGT* گردیده است (شکل ۲).

شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به گلیکوزیل ترانسفرازهای گیاهی و *UGT* توالی‌یابی شده از کلاله زعفران



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به گلیکوزیل ترانسفرازهای گیاهی و *UGT* توالی‌یابی شده از کلاله زعفران
Figure1- Saffron stigma *UGT* sequence in plant glycosyl transferase phylogenetic tree.



شکل ۲- ژل الکتروفورز حاصل از جداسازی محصول PCR، مرتبط با ژن‌های *UGT* و توالی پلاسمید pThio-Dan
Figure 2- Gel electrophoresis of *CsUGT* PCR product and pThio-Dan plasmid.

محل جعبه PSPG در انتهای C بوده و شامل توالی‌های حفاظت شده بوده که منجر به فعال‌سازی گروه هیدروکسی مولکول پذیرنده گلیکوزیل، جهت اتصال و شکل‌گیری ارتباطات گلیکوزیدی می‌گردند (شکل ۳).

نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که ژن حاصله به طول 1368 جفت باز بوده که قادر به کد نمودن 456 اسید آمینه می‌باشد. تمامی آنزیم‌های خانواده UGT دارای جعبه PSPG در محل فعال آنزیم بوده که کربوکسیل انتهایی پروتئین حاوی موتیف سیگنال جعبه ثانویه UGT گیاهی (PSPG) می‌باشد.

```

UGT-Noraddin      38LSPDQTNEIASGLIATNKSFIWVVRTSELAKLPANFTQENASRGLVWTWCDQLDVLAH
CsH005928         38LSPDQTNEIASGLIATNKSFIWVVRTSELAKLPANFTQENASRGLVWTWCDQLDVLAH
CsT043155         38LSPDQTNEIASGLIATNKSFIWVVRTSELAKLPANFTQENASRGLVWTWCDQLDVLAH
CsN001135         38LSPDQTNEIASGLIATNKSFIWVVRTSELAKLPANFTQENASRGLVWTWCDQLDVLAH
CsN012644         -----
c10097_g1_i1     -----

UGT-Noraddin      VATGCFVTHCGWNSTMEGIALGVPVGVVPQWSDQPMNAKYVEDVWKVGVRAKTYGKDFVR
CsH005928         VATGCFVTHCGWNSTMEGIALGVPVGVVPQWSDQPMNAKYVEDVWKVGVRAKTYGKDFVR
CsT043155         VATGCFVTHCGWNSTMEGIALGVPVGVVPQWSDQPMNAKYVEDVWKVGVRAKTYGKDFVR
CsN001135         VATGCFVTHCGWNSTMEGIALGVPVGVVPQWSDQPMNAKYVEDVWKVGVRAKTYGKDFVR
CsN012644         -----
c10097_g1_i1     -----

UGT-Noraddin      GEEFKRCVEEVMDGERSGKIRENAARWCKLAKDSVSEGGSSDKCIKEFIHQCK-----
CsH005928         GEEFKRCVEEVMDGERSGKIRENAARWCKLAKDSVSEGGSSDKCIKEFIHQCK-----
CsT043155         GEEFKRCVEEVMDGERSGKIRENAARWCKLAKDSVSEGGSSDKCIKEFIHQCK-----
CsN001135         GEEFKRCVEEVMDGERSGKIRENAARWCKLAKDSVSEGGSSDKCIKEFIHQCK-----
CsN012644         -----
c10097_g1_i1     -----
    
```

شکل ۳- هم‌ردیفی چندگانه پروتئین‌های خانواده *CsUGT*، (توالی رنگی مربوط به جعبه PSPG حفاظت شده در خانواده گلیکوزیل ترانسفرازها می‌باشد)

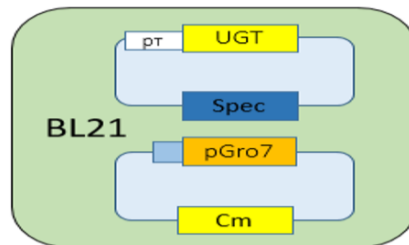
Figure 3- Multiple alignment of *CsUGT* protein family (the colored area is related to conserved PSPG box in glycosyl transferase family).

مشخص و شناخته شده چارون‌های مولکولی GroEs و GroEL بوده که در این پروژه استفاده گردید. نقش این مولکول‌ها تاخوردگی صحیح پلی‌پپتیدهای جدید، تصحیح تاخوردگی‌های پلی‌پپتیدی و جلوگیری از تجمع آن‌ها می‌باشد. وجود انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه در کلاله زعفران می‌تواند به دلیل وجود گستردگی در توالی‌های مرتبط با *UGT* در مقایسه با گیاهانی هم چون *M. P. trichocarpa* و

بر پایه وجود جعبه PSPG می‌توان به وجود انواع کانتیگ‌های کدکننده ایزوفرم‌های مختلف آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز پی برد. سویه باکتریایی BL21-pGro7 با انتقال پلازمید نوترکیب pThio-UGT از طریق روش الکتروپوراسیون جهت مطالعه بیان ژن کدکننده آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز تراریخت گردید (شکل ۴). این سویه باکتریایی شامل یکسری توالی‌های ژنی بوده که کدکننده پروتئین‌های چارپرونی می‌باشند. نوع

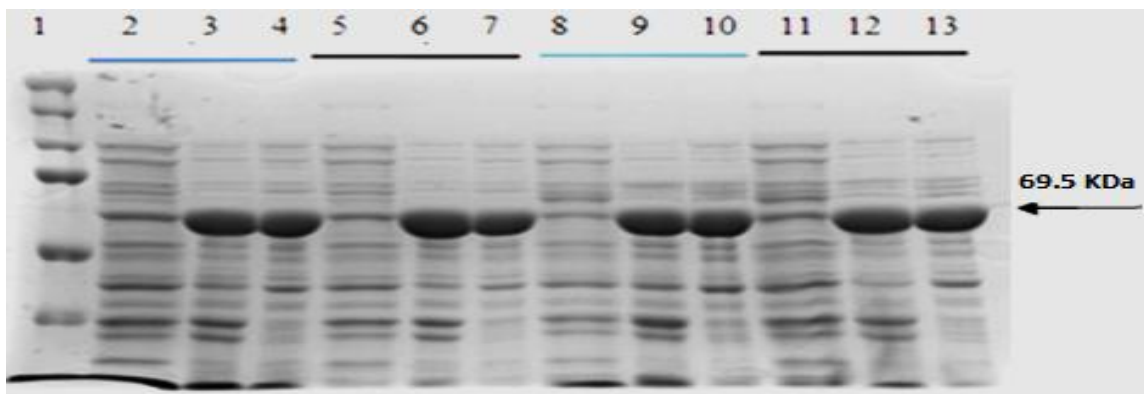
UGTs را فراهم می‌نماید (شکل ۱). از آنجایی که تشابه توالی درک کاملی از فعالیت‌های آنزیمی را ارائه نمی‌دهند نسخه‌های ژنی و متابولیت‌های تولید شده می‌توانند ابزاری مؤثر در شناسایی متابولیت‌های کاندید حاصل از فعالیت آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز باشد (Moraga et al., 2004). بدین جهت در این تحقیق جهت بررسی بیشتر پروتئین‌های بیان شده به تفکیک باندهای پروتئینی و شناسایی انواع پروتئین‌های بیان شده در عصاره پروتئینی باکتریایی پرداخته شد (شکل ۵).

truncatula باشد. زعفران حاوی گروه‌های پیچیده از متابولیت‌ها بوده که بیشتر آن‌ها به فرم گلیکوزیل شده هستند. وجود ساختارهای گلیکوزیدی برای هر یک از متابولیت‌های ثانویه موجودیت خانواده‌های مختلف از *UGTs* را که منجر به الحاق و حذف مولکول‌های قندی به آن‌ها می‌شود را اثبات می‌نماید. وضعیت تریپلوئیدی گیاه زعفران نیز می‌تواند از دیگر علل وجود تعداد بیشتر خانواده‌های *UGTs* در گیاه زعفران نسبت به دیگر گیاهان باشد. با این حال وجود همولوژی با سایر توالی‌های ژنی در پایگاه‌های داده‌ای ژنتیکی امکان دسته‌بندی خانواده‌های



شکل ۴- شکل شماتیکی سویه باکتریایی BL21-Gro7 تراریخت شده با پلازمید نو ترکیب *pThio-UGT* اشاره دارد به پلازمید دارای ژن مقاومت به کانامایسین و *Spec* (اسپیکترومایسین)

Figure 4: Schematic forms of transformed BL21-Gro7 bacteria by *pThio-UGT* as an expression plasmid. (*pGro7-Cm* refers which plasmid contain Kanamycin resistance gene and *Spec* (Spectinomycin).



شکل ۵- (۱) مارکر پروتئینی، ۲، ۳، ۴: پروتئین خام استخراج شده از پلاسمید کنترل القا شده با آرابینوز ۰،۰۸٪ (به ترتیب ۳، ۶ و ۱۶ ساعت)، ۵، ۶، ۷: پروتئین خام استخراج شده از پلاسمید کنترل القا شده با آرابینوز ۰،۲٪ (به ترتیب ۳، ۶ و ۱۶ ساعت)، ۸، ۹، ۱۰: پروتئین خام استخراج شده از پلاسمید نو ترکیب القا شده با آرابینوز ۰،۰۸٪ (به ترتیب ۳، ۶ و ۱۶ ساعت)، ۱۱، ۱۲، ۱۳: پروتئین خام استخراج شده از پلاسمید نو ترکیب القا شده با آرابینوز ۰،۲٪ (به ترتیب ۳، ۶ و ۱۶ ساعت)

Figure 5: Coomassie stained SDS-PAGE gel of total or soluble proteins extracted from not-induced or induced BL21-Gro7 strain overexpressing the *CsUGT* (1: protein marker; 2, 3,4: Arabinose 0.08% induced control plasmid crude protein (3, 6 and 16 h induction); 5,6,7: Arabinose 0.2% induced control plasmid crude protein (3, 6 and 16 h induction); 8,9,10: Arabinose 0.08% induced recombinant plasmid crude protein (3, 6 and 16 h induction); 11,12,13: Arabinose 0.2% induced control plasmid crude protein (3, 6 and 16 h induction).

اطلاعاتی می تواند در شناخت سطوح بیان هر یک از نسخه های ژنی بیان شده در مراحل مختلف توسعه کلاله زعفران مؤثر واقع شده و هم چنین ارتباط بین بیان هر یک از نسخه ها و سطوح متابولیت های گلیکوزیده شده در بافت های کلاله را تعیین نماید. در تحقیقی آنالیز کانتینگ های UGT نشان داد که بیشترین میزان بیان UGT در مرحله بلوغ کلاله ها بوده بطوری که ۱۸٪ از توالی های UGT در مرحله زردی کلاله، ۱۱٪ در مرحله نارنجی، ۱۵٪ در مرحله قرمزی در حالیکه ۱۶٪، ۱۵٪ و ۲۵٪ از توالی های ژنی مرتبط با UGT به ترتیب در مرحله گرده افشانی، دو روز بعد از گرده افشانی و دو روز قبل از گرده افشانی اتفاق می افتد. استفاده از توالی های حاصل از ترانسکریپتوم کلاله زعفران در مرحله گرده افشانی کمک مؤثری در شناسایی توالی ژنی ایزوله شده در این تحقیق نمود. نظر به اینکه اصلی ترین نقش آنزیم های بیان شده از ایزوفرم های ژنی UGT در کلاله گیاه زعفران الحاق واحدهای قندی فعال به مواد غیرقطبی هم چون کروسیتین و تبدیل آن ها به انواع مختلف ایزوفرم های ماده کروسین می باشد نتایج حاصل از این پروژه می تواند به شناسایی ایزوفرم های متفاوت از آنزیم UGT و هم چنین عملکرد این گونه از آنزیم ها کمک مؤثری نموده و توالی های ژنی حاصله می توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مؤثر در مراحل اولیه اصلاح ژنتیکی گیاه زعفران به جهت گزینش لاین های برتر از نظر کمیت و کیفیت رنگ زعفران مورد استفاده قرار گیرند.

مطالعات اخیر در رابطه با شناسایی ویژگی ها و عملکردهای مختلف آنزیم UGT نشان داده که عملکرد این آنزیم ها در رشد و توسعه دهی تحت تأثیر محیط قرار می گیرد (Wang & Hou, 2009). بدین ترتیب ارزیابی دقیق عملکرد این آنزیم ها نیازمند آزمایشات کنترل شده هم چون بیان هترولوگ در میکروارگانیزم هایی هم چون باکتری ها می باشد. با توسعه ابزارهای ژنتیکی روش های مانند استفاده از کتابخانه ژنی EST و شناسایی بر پایه همولوژی توالی توانسته است انواع مختلفی از ایزوفرم های جدید این آنزیم را معرفی نماید (Ono et al., 2006). هر چند که نقش بسیاری از آنزیم گلیکوزیل ترانسفرازهای معرفی شده هنوز نامعلوم می باشد اما دسترسی به توالی ژنومی کامل بسیاری از گیاهان امکان شناسایی خانواده های چند ژنی را میسر نموده است. به عنوان مثال در گیاه آراییدوپسیس استفاده از موتیف های حفاظت شده PSPG شناسایی ۱۲۰ نوع از ژن های مربوط به خانواده ژنی UGTs را در مجموعه کتابخانه ژنومی این گیاه را فراهم نموده است هم چنین در سایر گونه های گیاهی هم چون *Carica papaya* و *Glycine max* تعداد ژن های شناسایی شده مرتبط با ایزوفرم های UGTs با استفاده از داده های حاصل از توالی یابی ژنومی به ترتیب ۵۶ و ۲۴۲ ژن می باشند (Yonekura & Hanada, 2011). وجود EST ها در هر یک از کانتینگ ها دلالت بر وجود mRNA مرتبط در بافت کلاله می باشد. چنین

منابع

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. 2009. Enzymatic assembly of Hölscher, D., Stich, K. 2010. Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus x*

DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6 (5): 901-903.
Gosch, C., Halbwirth, H., Schneider, B., domestica and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin). *Plant Science* 178

- (3): 299-306.
- Hansen, K.S., Kristensen, C., Tattersall, D.B., Jones, P.R., Olsen, C.E., Bak, S., and Møller, B.L. 2003. The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyl transferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 64 (1): 143-151.
- Hosseinpour, A.N., Nematzadeh, G.A., Giuliano G., Ranjbar G.A., and Yamchi, A. 2017. Identification of Apo- Carotenoids' crocin and crocetin isomers in saffron crude extracts by HPLC coupled to atmospheric pressure chemical ionization and high resolution orbitrap mass spectrometry. *Saffron Agronomy and Technology* 4 (4): 291-300.
- Kumar, R., Sangwan, R.S., Mishra, S., Sabir, F., and Sangwan, N.S. 2012. In silico motif diversity analysis of the glycon preferentiality of plant secondary metabolic glycosyltransferases. *Plant Omics* 5 (3): 200-210.
- Li, Y., Luo, H.M., Sun, C., Song, J.Y., Sun, Y.Z., Wu, Q., Wang, N., Yao, H., Steinmetz, A., and Chen, S.L. 2010. EST analysis reveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis. *BMC genomics* 11 (1): 268.
- Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E.M., Kaldenhoff, R., Coiner, H.A., Munoz Blanco, J., and Schwab, W. 2006. Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose: cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant physiology* 140 (3): 1047-1058.
- Demurtas, O. C., Frusciante, S., Ferrante, P., Diretto, G., Hosseinpour Azad, N., Pietrella, M., and Al Babili, S. 2018. Candidate enzymes for saffron crocin biosynthesis are localized in multiple cellular compartments. *Plant physiology* 177 (3): 990-1006.
- Moraga, A.R., Nohales, P.F., Perez, J.A., and Gomez-Gomez, L. 2004. Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta* 219 (6): 955-966.
- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., and Tanaka, Y. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (29): 11075-11080.
- Ono, E., Ruike, M., Iwashita, T., Nomoto, K., and Fukui, Y. 2010. Co-pigmentation and flavonoid glycosyltransferases in blue *Veronica persica* flowers. *Phytochemistry* 71 (7): 726-735.
- Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O. 2007. Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Science* 12 (7): 282-285.
- Wang, J., and Hou, B. 2009. Glycosyltransferases key players involved in the modification of plant secondary metabolites. *Front Biol China* 4 (1): 36-46.
- Woo, H.H., Jeong, B.R., Hirsch, A.M., and Hawes, M.C. 2007. Characterization of *Arabidopsis* AtUGT85A and AtGUS gene families and their expression in rapidly dividing tissues. *Genomics* 90 (1): 143-153.
- Yonekura-Sakakibara, K., and Hanada, K.

2011. An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases.

Plant Journal 66 (1): 182–193.

Identification and Recombinant Expression of Crocin Synthesis Isoform Gene in Saffron Stigma

Noraddin Hosseinpour Azad^{1*}

Submitted: 29 May 2018

Accepted: 3 December 2018

Hosseinpour Azad, N. 2020. Identification and recombinant expression of Crocin synthesis isoform gene in Saffron stigma. *Saffron Agronomy & Technology*, 7(4): 481-490.

Abstract

The existence of isoform genes in plants led to creation of the different types of isomeric metabolites like these glycosylated forms. This study was conducted to investigate the identification and heterologous expression of Saffron stigmas *Glycosyl transferase* coding isoform gene during the pollination stage. The results have been obtained by sequencing and bioinformatics analysis of an isolated gene from saffron genomes by degenerate oligo's revealed that the gene is in 1283 bp length and belongs to the *CsUGT* protein family which has Apo-plastic secretion in the cell. To evaluate the enzymatic function, firstly the isolated sequence was sub-cloned under arabinose induce promoter in pThio-UGT expression vector by the Gibson assembly technique. Then, the recombinant vector transformed into BL21-pGro7 bacteria which were able to express chaperon proteins with EL& ES subunits. Followed by destructing the bacteria cell wall via ultrasound, the pellet was suspended by PBS solution and then the soluble proteins were extracted by the boiling method. Finally, the protein electrophoresis by SDS pages 10% showed that the recombinant protein of *CsUGT* expressed correctly in bacteria with 69.5 kDa molecular weight. The results obtained in this project could be applied to determine the breeding's strategies to improve qualitative and quantitative traits such as color and aroma in saffron.

Keywords: Recombinant expression, Glycosyl transferase, Crocin, *E. coli*.

1- Assistant Professor of Plant Genetics engineering, Plant Science and Medicinal Plants Branch, Meshgin Shahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(*- Corresponding author. Email: Gmplant21@gmail.com)

DOI: 10.22048/jsat.2019.133922.1302