ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۱۰-۱

آزمون مکمل سازی برای بررسی نقش ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در آرابیدوپسیس

Complementation assay to evaluate the role of putative aminotransferase in *Arabidopsis*

مهرآنا کوهی دهکردی*[۱]، محمود خدام باشی[۲]

۱و۲- دانشجوی دکتری و دانشیار اصلاح نباتات، دانشگاه شهرکرد

Kohi dehkordi M*[1], khodambashi M[2]

1,2. PhD Student and Associate Professor, Dept of Plant Breeding, Sharekord University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.koohi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

پس از توالی‌یابی کامل ژنوم آرابیدوپسیس و شناسایی حدود ۲۵۴۹۸ ژن، نقش برخی از ژن‌ها در آن به صورت احتمالی تعیین شد. از جمله این موارد می‌توان به تعیین نقش هفت ژن در آرابیدوپسیس به عنوان ژن‌های احتمالی کد کننده آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز اشاره نمود که تا به حال نقش سه ژن با تحقیقات انجام شده مورد تایید قرار گرفته است. در تحقیق حاضر، نقش ژن احتمالی دیگری از این خانواده با استفاده از آزمون مکمل سازی با باکتری اگزوتروف DL39 بررسی شد. به دلیل وقوع جهش در ژن تیروزین آمینوترانسفراز باکتری DL39، این باکتری برای اسید آمینه تیروزین اگزوتروف می‌باشد. به منظور بررسی توانایی ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز مورد نظر در مکمل سازی نقصان فعالیت تیروزین آمینوترانسفرازی باکتری، توالی ناحیه کد کنند ژن در ناقل‌های بیان pQE همسانه سازی شد و برای تراریختی باکتری DL39 مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمون مکمل سازی موفقیت آمیز بود و باکتری‌های تراریخت شده قابلیت رشد در محیط بدون مکمل اسید آمینه تیروزین را بدست آوردند. بررسی فعالیت آنزیمی نیز نشان داد که آنزیم قادر است اسید آمینه تیروزین را به ۴- هیدروکسی فنیل پیروات تبدیل نماید. نتایج بدست آمده در این تحقیق، نقش تیرزوین آمینوترانسفرازی ژن مورد بررسی را تایید می‌کند.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس، آزمون مکمل سازی، آمینوترانسفراز، همسانه‌سازی، *E.coli*

Archive of SID

www.SID.ir

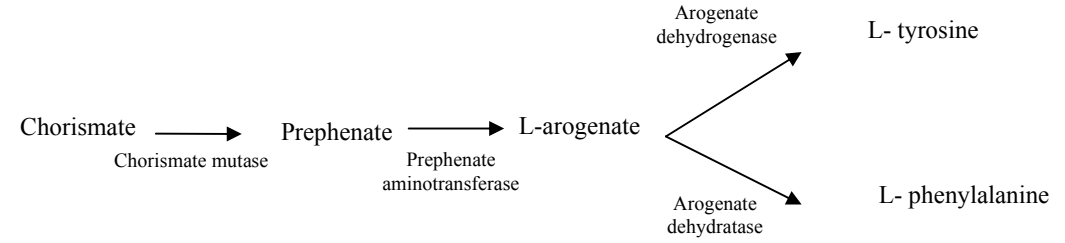
مقدمه

پس از اتمام پروژه توالی‌یابی ژنوم در آرابیدوپسیس، ۲۵۴۹۸ ژن در آن شناسایی شد. به منظور ارزیابی نقش ژن‌های شناسایی شده، ژنوم آرابیدوپسیس با ژنوم توالی‌یابی شده موجودات یوکاریوت دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. فعالیت حدود ۶۹ درصد از ژن‌های آرابیدوپسیس بر اساس تشابه توالی آنها با پروتئین‌هایی با عملکرد مشخص در موجودات دیگر تعیین شد که نسبت قابل توجهی از این ژن‌ها، در فرآیندهای متابولیسم و تنظیم ژن نقش داشتند و تنها نه درصد از ژن‌ها از طریق انجام آزمایش مورد شناسایی قرار گرفتند (Arabidopsis Genome Initiative 2000). از جمله این موارد می‌توان به نامگذاری ۴۴ ژن با نقش احتمالی آمینوترانسفراز در آرابیدوپسیس اشاره نمود که نقش هفت ژن از این ۴۴ ژن به عنوان ژن‌های کد کننده آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز پیش بینی شد (Liepman and Olsen 2004). آمینوترانسفراز یا ترانس‌آمیناز، آنزیمی است که انتقال یک گروه آمین از یک ترکیب دهنده آمین را به محل کربونیل یک ترکیب پذیرنده آمین بر عهده دارد. معمولا اسید آمینه به عنوان دهنده آمین و ۲- کتو اسید به عنوان گیرنده آمین عمل می‌کند. آمینوترانسفراز آنزیمی است که در ایجاد اسید آمینه‌های مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است. در گیاهان، سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک (L- تیروزین و L- فنیل‌آلانین) از طریق حدواسط کوریسمات انجام می‌گیرد (شکل۱، الف). کوریسمات از طریق فعالیت آنزیم کوریسمات موتاز به پریفنات تبدیل می‌شود سپس واکنش انتقال آمین از پریفنات توسط آنزیم پریفنات آمینوترانسفراز کاتالیز می‌شود. محصول انتقال آمین، L-Argonate، توسط آنزیم آرگونات دهیدروژناز، اکسید شده تا اسید آمینه L تیروزین را ایجاد نماید و یا از طریق فعالیت آنزیم آرگونات دهیدراتاز به اسید آمینه L- فنیل آلانین تبدیل شود (شکل۱، الف). در باکتری اشرشیاکولی نیز همانند گیاهان، تیروزین و فنیل‌آلانین از طریق حدواسط مشترک کوریسمات سنتز می‌شوند (شکل۱، ب). در این مسیر نیز اولین مرحله، تبدیل کوریسمات به پریفنات می‌باشد با این تفاوت که در باکتری، برای سنتز اسید آمینه L فنیل‌آلانین، آنزیم دو عملکردی prephenate (dehydratase/ chorismate mutase) که توسط ژن *pheA* کد می‌شود تبدیل کوریسمات به پریفنات و پس از آن تبدیل پریفنات به فنیل پیروات را کاتالیز می‌نماید. در مرحله نهایی نیز آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز کد شده توسط ژن *tyrB* سنتز فنیل‌آلانین را از طریق تبدیل فنیل پیروات به L- فنیل‌آلانین سرعت می‌بخشد (شکل۱، ب) در حالیکه برای سنتز اسید آمینه L- تیروزین، آنزیم دو عملکردی chorismate mutase/prephenate dehydrogenase که توسط ژن *tyrA* کد می‌شود تبدیل کوریسمات به ۴- هیدروکسی فنیل پیروات را کاتالیز نموده و آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز کد شده توسط ژن *tyrB* مرحله نهایی سنتز تیروزین از طریق تبدیل ۴- هیدروکسی فنیل پیروات به L- تیروزین را هدایت می‌کند (شکل۱، ب). (Mavrides and Orr 1975; Whitaker et al. 1982).

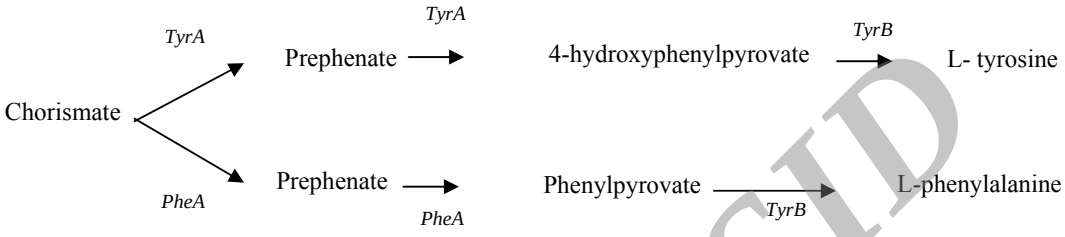
همانطور که اشاره شد هفت ژن با نقش احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در آرابیدوپسیس نامگذاری شده‌اند و تا کنون نقش سه ژن از این خانواده ژنی با تحقیقات انجام شده مورد تایید قرار گرفته است (Titarenko et al. 1997; Lopukhina et al. 2001; Prabhu and Hudson 2010). نتایج دو تحقیق انجام شده با استفاده از ژن تیروزین آمینوترانسفراز *Psedomonas aeruinosa* (Gu et al. 1998) و همچنین یکی از هفت ژن خانواده تیروزین آمینوترانسفراز آرابیدوپسیس دارای کد ژنی At5g36160 در بانک داده آرابیدوپسیس (Prabhu and Hudson 2010)، نشان داد که این ژن‌ها قادر به مکمل سازی باکتری اگزوتروف جهش یافته در ژن تیروزین آمینوترانسفراز با نام DL39 بودند. در تحقیق حاضر نیز بررسی نقش ژن دیگری از این خانواده، با کد ژنی At5g53970 در بانک داده آرابیدوپسیس، TARE، WWW.arabidopsis.org، مورد نظر قرار گرفت. به این منظور از آزمون مکمل‌سازی باکتری اگزوتروف DL39 با دستوارهای تهیه شده از ژن مورد نظر و بررسی توانایی آنزیم برای تبدیل اسید آمینه L- تیروزین به ۴- هیدروکسی فنیل پیروات استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir



الف)



ب)

شکل۱- مسیر سنتز L-تیروزین و L-فنیل‌آلانین در گیاهان (الف) و باکتری *E. coli* (ب). هر یک از اختصارها عبارتند از *PheA* (chorismate mutase/prephenate dehydratase)، *TyrA* (chorismate mutase, prephenate dehydrogenase) و *TyrB* (tyrosine aminotransferase) برگرفته از (Prabhu and Hudson 2010)

مواد و روش‌ها

تکثیر و همسانه‌سازی ژن

ناقل‌های بیان pQE-32 و pQE-60، با برچسب هیستیدین به ترتیب در انتهای N و C و دارای پروموتور T5، برای همسانه‌سازی ژن مورد نظر استفاده شدند. هضم آنزیمی اولیه در ناقل pQE-60 و ناقل pQE-32، به ترتیب با استفاده از آنزیم برشی *Nco*I و *Bam*HI مطابق سیستم بافری و درجه حرارت توصیه شده کارخانه سازنده (فرمنتاس، آلمان) انجام شد. پس از هضم آنزیمی برای ایجاد دنباله صاف درانتهای '۵، از آنزیم DNA پلی‌مراز Klenow (فرمنتاس، آلمان) با توجه به دستورالعمل سازنده استفاده گردید. برای انجام واکنش هضم آنزیمی ثانویه، ابتدا به دلیل تفاوت سیستم بافری آنزیم‌های برشی انتخاب شده برای این واکنش نسبت به واکنش هضم اولیه، از کیت خالص سازی (کیاژن، آلمان) به منظور پاکسازی ناقل استفاده شد و در مرحله بعد، آنزیم برشی *Bgl*II برای ناقل pQE-60 و آنزیم برشی *Kpn*I برای ناقل pQE-32 مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA نمونه‌های برگی آرابیدوپسیس اکوتیپ کولمبیا با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (کیاژن، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و برای از بین بردن آلودگی DNA ژنومی، کیت RNase-Free DNase Set (کیاژن، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA، با استفاده از کیت SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit (اینویتروژن، آمریکا)، در حضور یک میکروگرم RNA و الیگونوکلئوتید $(dT)_{18}$ انجام شد. برای تکثیر ژن مورد نظر، طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد تا حاوی سایت برش مناسب برای درج در ناقل pQE باشند، علاوه بر این برای تهیه پروتئین نوترکیب بدون دنباله هیستیدین، طراحی آغازگر به گونه‌ای انجام شد که دارای اسید آمینه پایان بوده تا برای درج در ناقل pQE-60 استفاده شود (جدول۱). توالی ناحیه کد کننده ژن با استفاده از واکنش PCR در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰x)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط دئوکسی ریبونوکلئوتید (۱۰ میلی‌مولار،

Archive of SID

www.SID.ir

فرمنتاس، آلمان)، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (۲۰ پیکومول) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu* (فرمنتاس، آلمان) مورد تکثیر قرار گرفت. حدود ۱۰۰ نانوگرم از cDNA نیز به هر یک از واکنش‌ها اضافه شد. شرایط دمایی مورد استفاده به صورت: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، سپس ۳۰ چرخه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه، و در نهایت بسط نهایی ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصول PCR حاوی جایگاه برش در انتهای '۳ بود که پس از خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت خالص سازی QIAquick PCR purification kit (کیاژن، آلمان)، از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *Kpn*I به ترتیب برای درج در ناقل‌های بیان pQE-60 و pQE-32 استفاده شد. ناقل و قطعه ژن مورد نظر، روی ژل آگارز TAE یک درصد الکتروفورز شدند و جداسازی آنها از ژل با کمک کیت gel extraction kit QIAquick (کیاژن، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش اتصال توالی ژن تیروزین آمینوترانسفراز با هر یک از ناقلین با استفاده از حدود ۷۵ نانوگرم محصول PCR، حدود ۲۵ نانوگرم ناقل، دو میکرولیتر بافر اتصال، دو میکرولیتر PEG، یک میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز (فرمنتاس، آلمان) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

تاریختی و تایید آن

باکتری مستعد شده اشرشیاکلی سویه DH10B از طریق روش شوک حرارتی (Van Die et al. 1983) با دستوارهای تهیه شده تاریخت شد و در محیط انتخابیLB– آگار حاوی آمپی‌سیلین ($۱۰۰\mu l\ mg^{-1}$) کشت داده شد. برای غربال‌گری همسانه‌های بدست آمده، روش Colony PCR مورد استفاده قرار گرفت و به منظور بررسی حضور قطعه مورد نظر در ناقل، از هضم آنزیمی استفاده شد. استخراج پلاسمید از همسانه‌های انتخاب شده با استفاده از کیت QIAprep Spin Miniprep (کیاژن، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت مربوطه انجام شد. برای حصول اطمینان از صحت درج ژن مورد نظر در ناقل‌های مذکور، پلاسمیدها برای تعیین توالی ارسال شدند و از آغازگرهای اختصاصی pQE برای توالی‌یابی استفاده شد.

آزمون مکمل سازی

باکتری اشرشیاکلی جهش یافته DL39 از مرکز استوک ژنومی اشرشیاکولی (Coli Genome Stock Center, CGSC) تهیه شد. به منظور انجام آزمون مکمل سازی، سویه DL39، با استفاده از روش شوک حرارتی با دستوارهای تهیه شده و همچنین ناقل‌های pQE-32 و pQE-60 (ناقل خالی) به عنوان شاهد تراریخت شد. از محیط LB– آگار حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیروزین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فنیل‌آلانین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین برای پخش نمودن باکتری‌های تراریخته شده استفاده گردید. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد همسانه‌ها، پنجاه همسانه به صورت تصادفی انتخاب و در محیط M9 حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیروزین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فنیل‌آلانین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسپارتات، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لوسین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایزولوسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر والین، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر یوراسیل، ۰/۵ درصد گلیسرول و ۰/۲ درصد آرابینوز به عنوان مکمل غذایی کشت داده شد. برای بررسی اینکه cDNA قادر به تکمیل نقصان‌های باکتری شده است یا خیر، همسانه‌های انتخابی در محیط M9 با مکمل‌های اسید آمینه مربوط و همچنین محیط M9 بدون مکمل واکشت شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیمی و خالص سازی پروتئین

برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی، باکتری سویه M15 از طریق شوک حرارتی با دستوارهای انتخاب شده، تراریخت گردید. از توالی‌یابی برای اطمینان از انتخاب همسانه‌های مناسب استفاده شد. پس از انتخاب همسانه مناسب برای هر یک از دستوارها، برای تهیه عصاره آنزیمی و استخراج پروتئین نوترکیب، همسانه‌های انتخاب شده به مدت یک شب در محیط مایع LB کشت داده شدند. یک میلی‌لیتر از محیط کشت داده شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط LB جدید اضافه شد و از IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۰/۸ میلی‌مولار در محیط برای القاء بیان ژن استفاده شد. نمونه‌ها در شیکر نگهداری شدند تا به OD معادل ۰/۶ برسد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و درون یخ قرار

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی TAT برای همسانه سازی در ناقل pQE

نام آغازگر	توالی آغازگر
pQETATf	5′-GAGAATGGAGCAACGACGACGAGC-3′
pQE-60TATr	5′-AGAAATAGATCTTATGGTTGGATATTGAGTCTTGGC-3′
pQE-60TATSr	5′-ATCAGAAGATCTCTATATGGTTGGATATTGAGTCTT-3′
pQE-32TATr	5′-ATCAGAGGTACCCTATATGGTTGGATATTGAGTCTT-3′

گرفتند. مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌های رسوب یافته در بافر شکستن (Breaking buffer) (۴ میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌لیتر) حل شدند. برای شکسته شدن سلول‌ها از دستگاه سونیکاتور استفاده شد. سپس مجددا نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. عصاره حاصله برایاندازه گیری‌های فعالیت آنزیمی بر اساس روش (Lopukhina et al. 2001) مورد استفاده قرار گرفت. استخراج پروتئین مطابق روش ریوه و همکاران (Riewe et al. 2008) و با استفاده از رزین nickel-nitriloacetic acid (کیاژن، آلمان) انجام شد. از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برای الکتروفورز پروتئین استفاده شد.

نتایج و بحث

تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که واکنش‌هایی که توسط آنزیم آمینوترانسفراز کاتالیز می‌شود نقش ضروری در مسیرهای متابولیکی مختلف از جمله بیوسنتز و کاتابولیسم اسیدهای آمینه، بیوسنتز ویتامین، متابولیت‌های ثانویه و واکنش به تنش‌های گیاهی دارد. به عنوان نمونه طی تحقیقی که در آرابیدوپسیس به منظور بررسی نقش اکتادکانوئیدها در اثر متقابل گیاه- پاتوژن انجام گرفت، مشخص شد کد ژنی (At4g23600)، با نقش احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در بانک داده آرابیدوپسیس، در این ارتباط متقابل نقش دارد. نقش تیروزین آمینوترانسفرازی این مکان ژنی با تهیه پروتئین نوترکیب و بیان آن مورد تایید قرار گرفت و نتیجه گیری شد که احتمالا در حمله پاتوژن‌ها، تولید مواد فنولی حاصل از ۴- هیدروکسی فنیل پیروات می‌تواند یکسری اتصالات عرضی در دیواره سلولی ایجاد نموده و از این طریق باعث استحکام این حصار فیزیکی شود (Lopukhina et al. 2001). در تحقیق دیگری که به منظور شناسایی ژن‌های القاء شونده آرابیدوپسیس طی ایجاد زخم یا تیمار با جاسمونات صورت گرفت گزارش شد که یکی از مکان های ژنی کد کننده تیروزین آمینوترانسفراز با کد ژنی (At2g24850) در این واکنش دخالت دارد (Titarenko et al. 1997). در تحقیق Prabhu and Hudson (2010) نیز نقش تیروزین آمینوترانسفرازی مکان ژنی دیگری با کد ژنی (At5g36160)، از طریق همسانه‌سازی ژن مورد نظر و آزمون مکمل سازی مورد تایید قرار گرفت. بنابراین، نتایج این سه تحقیق نقش احتمالی این سه مکان ژنی را تایید نمود اما در تحقیق دیگری که به منظور شناسایی ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات انجام شد، مشخص شد کد ژنی (At2g20610) که در بانک داده‌های آرابیدوپسیس تحت عنوان ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز نام گرفته بود، فعالیت آنزیمی C-S Lyase داشته و در بیوسنتز گلوکوزینولات نقش دارد. آنها دلیل نامگذاری نادرست این مکان ژنی را به دلیل تشابه این دو آنزیم به یکدیگر عنوان نمودند (Mikkelsen et al. 2004). در تحقیق حاضر نیز به منظور بررسی کد ژنی (At5g53970)، با نقش احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در بانک داده آرابیدوپسیس، فعالیت این ژن در شرایط *In vivo* از طریق آزمون مکمل‌سازی با باکتری DL39 و در شرایط *In vitro* از طریق سنجش فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID

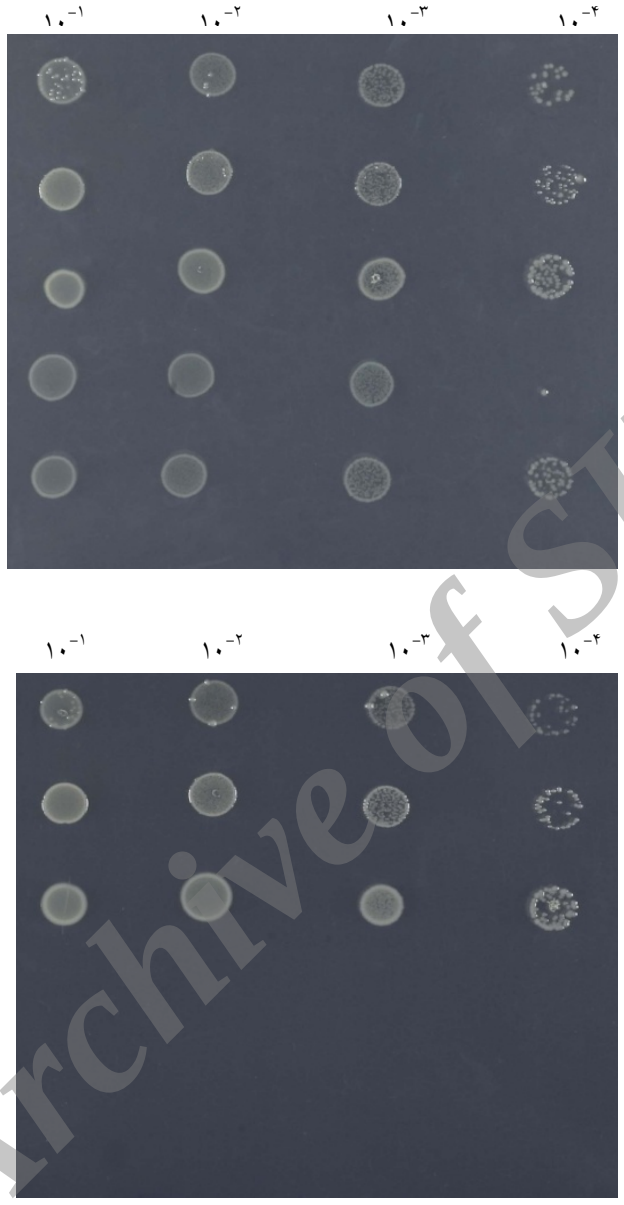
www.SID.ir

باکتری اگزوتروف DL39، باکتری جهش یافته‌ای است که در سه ژن آن جهش اتفاق افتاده است (LeMaster and Richards 1988). جهش‌ها در ژن‌های آمینوترانسفراز (L- آسپارتات آمینوترانسفراز)، *tyrB* (L- تیروزین آمینوترانسفراز) و *ilvE* (آمینوترانسفراز زنجیره فرعی Branched chain) منجر به غیرفعال شدن نقش این ژن‌ها و اگزوتروف شدن این باکتری به اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید، تیروزین، فنیل آلانین و اسیدهای آمینه زنجیره فرعی از جمله والین، لوسین و ایزولوسین شده است. لذا این باکتری در محیط M9 حاوی این شش اسید آمینه قادر به رشد بوده ولی فقدان یکی از این مواد منجر به اختلال در رشد این باکتری می‌گردد. با توجه به توضیحات ذکر شده از این باکتری برای تراریختی با ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز استفاده شد با این فرض که اگر ژن احتمالی دارای نقش تیروزین آمینوترانسفرازی باشد می‌بایست نقصان این باکتری جهش یافته برای ژن *tyrB* (L- تیروزین آمینوترانسفراز) را مرتفع نماید و امکان رشد باکتری در محیط حاوی اسیدهای آمینه ذکر شده به جز تیروزین و فنیل‌آلانین را فراهم نماید. به همین منظور باکتری DL39 با دستوارهای تهیه شده و همچنین ناقل‌های pQE-32 و pQE-60 به عنوان شاهد تراریخت شد. نتایج تراریختی موفقیت آمیز بود و باکتری‌های تراریخت شده با هر سه دستواره قابلیت خود را برای رشد در محیط رشد M9 فاقد اسید آمینه‌های مکمل تیروزین و فنیل‌آلانین بدست آوردند (شکل۲، ب) در حالی‌که باکتری تراریخت شده با ناقل‌های pQE-32 و pQE-60 قادر به رشد در این محیط نبود (شکل۲، ب). نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج بدست آمده از تحقیق (Prabhu and Hudson 2010) که برای تایید نقش ژن احتمالی دیگری از خانواده تیروزین آمینوترانسفراز با کد ژنتیکی (At5g36160) انجام شد، مطابقت دارد همانطور که اشاره شد باکتری DL39 برای سه ژن، آمینوترانسفراز (L- آسپارتات آمینوترانسفراز)، *tyrB* (L- تیروزین آمینوترانسفراز) و *ilvE* (آمینوترانسفراز زنجیره فرعی) جهش یافته است. به منظور بررسی اینکه تراریختی با ژن تیروزین آمینوترانسفراز می‌تواند منجر به بازگرداندن نقصان این باکتری در ژن‌های آمینوترانسفراز (L- آسپارتات آمینوترانسفراز) و *ilvE* (آمینوترانسفراز زنجیره فرعی) گردد یا خیر، باکتری‌های تراریخت شده با هر سه نوع دستواره در محیط حاوی تمام اسیدهای آمینه بجز آسپارتیک اسید و همچنین محیط دیگری حاوی تمام اسیدهای آمینه بجز والین، لوسین و ایزولوسین بازکشت شدند. هیچ یک از باکتری‌ها قادر به رشد در محیط‌های ذکر شده نبودند (جدول.۲). این نتایج نشان داد که این ژن تنها نقش تیروزین آمینوترانسفرازی دارد و قادر نیست نقصان این باکتری را در ژن‌های L- آسپارتات آمینوترانسفراز و آمینوترانسفراز برای اسیدهای آمینه زنجیره فرعی (والین، لوسین و ایزولوسین) جبران نماید. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت مکان ژنی با کد At5g53970 تنها دارای نقش تیروزین آمینوترانسفرازی است و در مسیرهای مربوط به سنتز آسپارتات، لوسین، ایزولوسین و والین نقشی ندارد.

علیرغم اینکه ژن تیروزین آمینوترانسفراز گیاهان، باکتری‌ها و پستانداران بر اساس درخت فیلوژنتیکی که تشابه توالی‌ها را مورد مقایسه قرار داده است، از یکدیگر مجزا شده‌اند با این وجود، آن‌ها در زیر گروه مشابهی از کلاس یک آمینوترانسفرازها گروه بندی گردیده‌اند (Mehta et al. 1989). در این درخت فیلوژنتیکی آنزیم‌ها در سه هم‌نیا (Clade) گروه بندی شده‌اند (شکل۳). هم‌نیای A نشان دهنده آنزیم‌های باکتریایی از باکتری‌های مختلف است. هم‌نیای B متعلق به آنزیم‌های پستانداران انتخاب شده است و هم‌نیای C نشان دهنده خانواده آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز در آرابیدوپسیس است (Mehta et al. 1989; Jensen and Gu 1996). در تحقیق حاضر علیرغم اینکه توالی پروتئین مورد نظر تنها به میزان ۱۲ درصد با توالی پروتئین تیروزین آمینوترانسفراز در اشرشیاکلی شباهت دارد اما توانست نقصان آنرا جبران نماید. نتیجه مشابهی نیز در تحقیق پرابهو و همکاران علیرغم تشابه هفت درصدی میان توالی پروتئین تیروزین آمینوترانسفراز باکتری و پروتئین مورد مطالعه بدست آمده است (Prabhu and Hudson 2010).

فعالیت آنزیمی پروتئین استخراج شده برای تبدیل تیروزین به ۴- هیدروکسی فنیل پیروات مورد آزمون قرار گرفت. در این واکنش، تیروزین به عنوان دهنده گروه آمین و ۴- هیدروکسی فنیل

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲- آزمون مکمل سازی با استفاده از باکتری *E. Coli* جهش یافته DL39. باکتری‌ها تا رسیدن به OD حدود ۶۰۰ نانومتر رشد داده شدند، نمونه‌ها در رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، و ۰/۰۰۰۱ در محیط کشت حاوی تمام اسیدهای آمینه(الف) و محیط فاقد تیروزین و فنیل آلانین (ب) کشت شدند. نتایج حاکی از رشد تمام نمونه‌ها در محیط حاوی تمام اسیدهای آمینه‌ها (الف) و امکان رشد باکتری تراریخت شده با دستواره‌ها بجز نمونه‌های شاهد در محیط کشت فاقد تیروزین و فنیل آلانین بود (ب).

پیروات به عنوان گیرنده گروه آمین عمل می‌کند. برای انجام این آزمون سه همسانه از هر یک دستواره‌ها و همچنین نمونه‌های شاهد (ناقل pQE-32 و pQE-60) انتخاب شد. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره آنزیمی حاصل از تمامی دستواره‌ها بجز نمونه‌های شاهد دارای فعالیت تیروزین آمینوترانسفرازی بوده و تفاوت معنی‌داری میان فعالیت آنزیمی حاصل از عصاره نمونه‌های

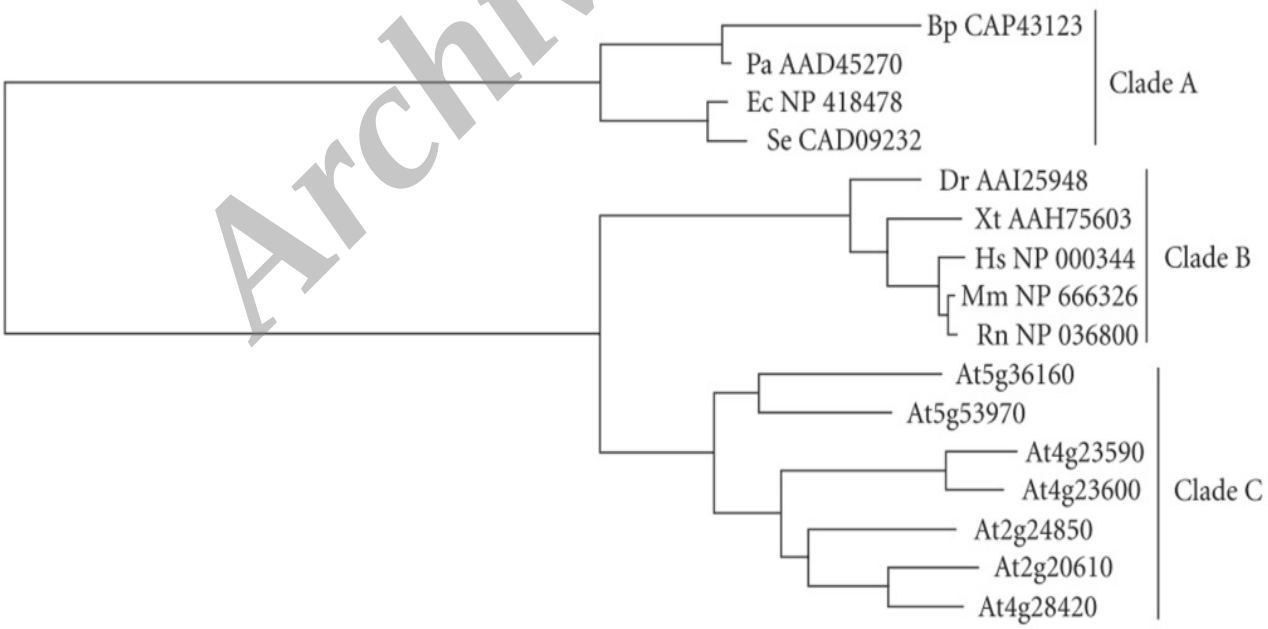
Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- آزمون مکمل سازی باکتری اگزوتروف DL39 با استفاده از دستوارههای تهیه شده

محیط رشد	مشخصه محیط رشد M9 بر اساس نوع اسیدهای آمینه موجود			امکان رشد در محیط M9
	L-Tyr+L-Phe	L-Leu+L-Ileu+L-Val	L-Asp	
محیط رشد ۱	افزوده شد	افزوده شد	افزوده شد	رشد نمونهها
محیط رشد ۲	حذف شد	افزوده شد	افزوده شد	رشد نمونهها
محیط رشد ۳	افزوده شد	افزوده شد	حذف شد	عدم رشد
محیط رشد ۴	افزوده شد	حذف شد	افزوده شد	عدم رشد

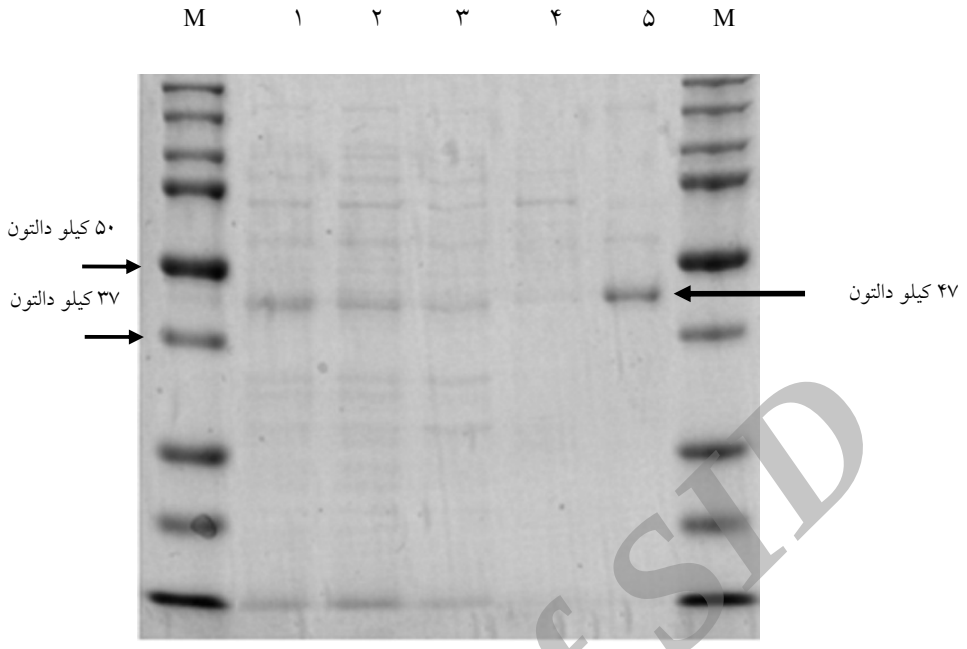
مورد بررسی مشاهده نشد. به منظور خالصسازی پروتئین نوترکیب (شکل۴، چاهک ۵)، عصاره خام آنزیم (شکل۴، چاهک ۱) مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین استخراج شده روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شد. همانطور که در شکل ۴ ملاحظه میشود باند مربوط به پروتئین نوترکیب در محدوده مورد انتظار (۴۷ کیلودالتون) قرار گرفت.

در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده میتوان گفت از آنجا که آزمون مکمل سازی منجر به بازگرداندن فعالیت آنزیمی در باکتری تراریخت شده با دستوارههای تهیه شده گردید و از طرف دیگر سنجش آنزیمی نشان داد که پروتئین نوترکیب فعالیت آنزیمی داشته و تبدیل تیروزین به ۴- هیدروکسی فنیل پیروات را کاتالیز نموده، این شواهد میتواند تاییدی بر نقش تیروزین آمینوترانسفرازی ژن مورد نظر باشد. هرچند نتایج تحقیق حاضر نقش احتمالی ژن مورد بررسی را مورد تایید قرار داده است، اما ایجاد لاینهای تراریخته برای ژن مورد نظر میتواند امکان بررسی نقش این ژن را در مسیرهای بیوشیمیایی با جزییات بیشتری فراهم نماید.



شکل۳- درخت فیلوژنی ژنهای تیروزین آمینوترانسفراز در گیاهان، باکتریها و پستانداران (Prabhu and Hudson 2010).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴- خالص سازی پروتئین تیروزین آمینوترانسفراز روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو. M) نشانگر پروتئین؛ ۱) عصاره خام؛ ۲) خروجی ستون تخلیص؛ ۳) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۵ میلی‌مولار؛ ۴) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵ میلی‌مولار؛ ۵) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار؛ M) نشانگر پروتئین

تشکر و قدردانی

از آنجا که این تحقیق در موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی آلمان (IPK) انجام شده است، بدین وسیله از همکاری بی‌دریغ کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه هتروزیس بویژه خانم‌ها آندریا آپلت و گوندا ورشت تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815.

Gu W, Song J, Bonner CA, Xie G, Jensen RA (1998) PhhC is an essential aminotransferase for aromatic amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 144: 3127-3134.

Jensen RA, Gu W (1996) Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases. J Bacteriol 178: 2161-2171.

LeMaster DM, Richards FM (1988) NMR sequential assignment of Escherichia coli thioredoxin utilizing random fractional deuteriation. Biochemistry 27: 142-150.

Liepman AH, OLsen LJ (2004) Genomic analysis of Aminotransferase in *Arabidopsis thaliana*. Cr Rev Plant Sci 23: 73-89.

Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Hollander-Czytko H (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. Plant Physiol 126: 1678-1687.

Mavrides C, Orr W (1975) Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. J Biol Chem 250: 4128-4133.

Mehta PK, Hale TI, Christen P (1989) Evolutionary relationships among aminotransferases. Tyrosine aminotransferase, histidinol-phosphate aminotransferase, and aspartate aminotransferase are homologous proteins. Eur J Biochem 186: 249-253.

Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA (2004) Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. Plant J 37:770-777.

Archive of SID
www.SID.ir

Prabhu PR, Hudson AO (2010) Identification and Partial Characterization of an L-Tyrosine Aminotransferase (TAT) from *Arabidopsis thaliana*. Biochem Res Int, 2010, 549572. doi: 10.1155/2010/549572

Riewe D, Grosman L, Zauber H, Wucke C, Fernie AR, Geigenberger P (2008) Metabolic and developmental adaptations of growing potato tubers in response to specific manipulations of the adenylate energy status. Plant Physiol 146: 1579-1598.

Titarenko E, Rojo E, Leon J, Sanchez-Serrano JJ (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 115: 817-826.

Van Die IM, Bergmans HE, Hoekstra WP (1983) Transformation in *Escherichia coli:* studies on the role of the heat shock in induction of competence. J Gen Microbiol 129: 663-670.

Whitaker RJ, Gaines CG, Jensen RA (1982) A multispecific quintet of aromatic aminotransferases that overlap different biochemical pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 257: 13550-13556.

Archive of SID

www.SID.ir