# همسانه سازی و آنالیز بیوانفورماتیکی ژن ACS در گیاه انار شیطان

مصطفی خوشحال سرمست1، علی نیازی2، حسن صالحی1 و علی اصغر ابلی مقدم2
1دانشجوی دوره دکتری و دانشیار بخش علوم باغبانی، مرکز کشت بافت و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
2 استادیار و دانشجوی دکتری پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده
اتیلن ساده ترین الفینی است که در شرایط گازی در گیاهان وجود دارد و درتنظیم بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک گیاه از جمله تنزیدن بذور، آغازیدن ریشه، رسیدن میوه، پیری، نمو گل و بسیاری از تنش های زنده و غیر زنده نقش دارد. ژن ACS یکی از کلیدی ترین ژنها در تولید اتیلن در گیاه است. بدین منظور یک جفت پرایمر دجنره بر اساس همردیفی تمامی توالی های کانزرو موجود در NCBI برای این ژن طراحی شد. در گام بعدی پس از استخراج RNA و ساخت cDNA و همچنین استخراج DNA و انجام PCR با جفت پرایمر دجنره و مشاهده اختلاف باند بر روی cDNA و gDNA ، محصول PCR به طور جداگانه به وکتور pTZ57R/T متصل و برای کلون کردن، با استفاده از الکتروپوریشن وارد باکتری E-Coli سویه DH5α شدند و پس از استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های برشی و اطمینان از وجود قطعه، توالی یابی شدند. نتایج داده های بیوانفورماتیکی پس از توالی یابی نشان می دهد که در قطعه 1216 جفت بازی جداسازی شده سه اگزون (986) و دو انترون (365 bp) با مرز های نوکلوتیدی AG-GT وجود دارد. نتایج آنالیز پروموتر حدود 1500 جفت باز پیش از ATG در این ژن با استفاده از Plant care نشان می دهد که این ژن دارای بسیاری از عناصر پاسخ دهنده به نور و هورمون و استرس است که این بر همکنش با دیگر هورمون های گیاهی از جمله جیبرلیک و اکسین، بیانگر این است که این ژن به تنهایی قادر به انجام نقش های متنوع خود در گیاه نخواهد بود. نتایج نشان داد که ACC سنتاز (S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase 2) مربوط به سوپر فامیلی pyridoxal- 5'-phosphate (PLP) است.

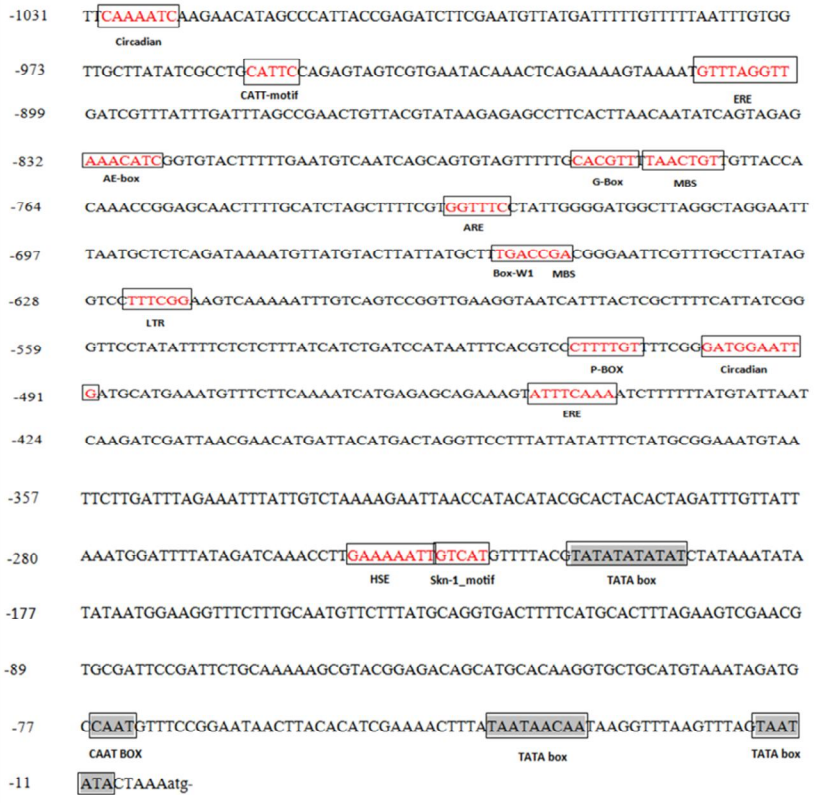
## مقدمه
اتیلن یکی از ساده ترین و در عین حال یکی از پیچیده ترین هورمون های گازی شناخته شده در گیاه است که در بساری از فرایند های حیاتی در گیاه از جمله پیری و رسیدن میوه به میزان بیشتری دخیل بوده و بر همکنش شدیدی با دیکر هورمون های گیاهی دارد. نار شیطان یک گونه درختچه ای دارویی و زینتی بوده که به دلیل مقاومت به شرایط محیطی نامطوب و خشکی اهمیت زیادی در محیط زیست دارد ولی در حال انقراض می باشد. در این مقاله برای اولین بار یک ژن زنومی از این گیاه جداسازی و به ثبت رسیده است.

## مواد و روش ها
پس از Blast ژن ACS گیاه آرابیدوپسیس در سایت NCBI و بدست آوردن توالی پروتئینی و ژنومی این ژن در تمامی گیاهان موجود در بانک داده و سپس الاینمنت آنها در نرم افزار Vector NTI یک جفت پرایمر دجنره برای این ژن طراحی شد. پس از مشاهده اختلاف باند مشاهده شده ناشی از این ژن روی cDNA و DNA گیاه انار شیطان و احتمال وجود انترون در قطعه مورد نظر باندهای مربوطه از روی ژل خالص سازی و به حامل PTZ متصل و برای همانند سازی با استفاده از الکتروپوریشن وارد باکتری E-Coli سویه DH5α شدند. و پس رشد در محیط انتخابی و استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی قطعه مورد نظر با استفاده از آنزیم های برشی Eco R1

و Pst1 و تایید و جود قطعه توالی یابی شدند. آنالیز پروموتر و پروتئین ای گیاه با استفاده از نرم افرار های معمول آنلاین بیوانفورماتیکی انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج داده های بیوانفورماتیکی پس از توالی یابی و ترجمه توالی نوکلئوتیدی در 6 چار چوب باز خواندن نشان می دهد که در قطعه 1216 جفت بازی جداسازی شده سه اگزون (986) و دو انترون (365 bp) با مرز های نوکلوتیدی AG-GT در ناحیه کد شونده این ژن وجود دارد. آنالیز بیوانفورماتیکی با استفاده از داده های بدست آمده از Phytozome با استفاده از چندین نرم افزار آنلاین بیوانفورماتیکی از جمله Plantcare انجام و عناصر عمگر سیس از data bank استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفت. تصویر زیر برخی پیش بینی از proximal transcriptional factor binding site های پروموتر ژن ACS در گیاه انار شیطان می باشد.




**Molecular cloning, characterization and in silico analysis of ACS in Tecomella undulata (Roxb.) Seem.**

**M.K. Sarmast1*, Ali Niazi2, Hassan Salehi1, Ali Asghar Abolimoghadam2**

1Department of Horticultural Science, Plant Tissue Culture and Biotechnology Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Khoshhal.sarmast@gmail.com

**Absrtact**

Ethylene, or ethene, the simplest olefin, exists in the gaseous state under ambient conditions. It regulates many aspects of the plant life cycle, including seed germination, root initiation, root hair development, flower development, sex determination, fruit ripening, senescence, and responses to biotic (such as pathogen attack) and abiotic (such as wounding, hypoxia, and chilling) stresses. ACS has a pivotal role in ethylene production. Gene specific primers for isolation of ACS gene from Tecomella undulata designed based on alignment of all ACS genes in NCBI data base. After PCR and after band detection, PCR production ligated into pTZ57R/T (Fermentas), and introduced to E. coli strain DH5α as the host bacterium according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA, cDNA were isolatated based above method and sequenced. After that for understanding of molecular mechanism of ACS we characteristic the 1500-bp 5'UTR upstream region as promoter (using phytozome database) and we analyzed it with Plant care data base. Our isolate for the first time a 1216 bp of ACS gene in T.undulata that it contains three exons (986) and two intron (365 bp) inside of CDS region. Results of promoter analysis demonstrated that ACS gene include Light-responsive element, PGRs-responsive element, Stress-responsive element and Miscellaneous-responsive element. ACC synthase (S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase 2 ) belongs to the super family of pyridoxal- 5'-phosphate (PLP) dependent enzymes. ACC synthase shares a modest level of sequence similarity with other members of this family, like aspartate aminotransferase (AATase) and tyrosine aminotransferase (TATase).