همسانه سازی ژن بتا- گالاکتوزیداز، عامل تخریب دیواره سلولی در انگور

رضا حیدری (۱)، رحیم حداد (۲)، قاسمعلی گروسی (۳)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ۲- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ۳- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

یکی از ویژگی های مهم میوه ها، نرم شدن بافت آنها است که حاصل مجموعه ای از تغییرات آنزیمی و غیر آنزیمی در سوخت وساز و ساختار دیواره سلولی است، بنابراین، این موضوع اثرات قابل توجهی بر حمل ونقل وانبارداری میوه ها پس از برداشت بر جای می گذارد، چرا که بسیاری از میوه ها فساد پذیرند. براساس مطالعات انجام شده، آنزیم بتا- گالاکتوزیداز نقش بسیار مهمی در تخریب دیواره سلولی وبه دنبال آن نرم شدن حبه انگور دارد. بدین ترتیب به نظر می رسد که با کاهش فعالیت آنزیم بتا- گالاکتوزیداز از طریق تکنیک بازداری آنتی سنس بتوان میزان ماندگاری میوه پس از برداشت را افزایش داد و در نتیجه میزان ضایعات و فسادپذیری میوه در هنگام برداشت، حمل و نقل و انبارداری به میزان قابل توجهی کاسته می شود. در این تحقیق ژن کد کننده این آنزیم از طریق تکنیک PCR جداسازی و در ناقل pUC19 کلون گردید تا در تحقیقات آتی بتوان آنرا به گیاه انگور انتقال داد و اثرات آنرا بر روی نرم شدگی حبه انگور مطالعه نمود.

مقدمه

میوه ها منابع ضعیف پروتئین و چربی بشمار می روند، اما به سبب محتوای بالای ویتامین و مواد معدنی، در رژیم غذایی بشر اهمیت بسزایی دارند و در مقایسه با سایر منابع غذایی گیاهی مانند بذور، از فعالیت سوخت و ساز نسبتا بالایی برخوردار می باشند. نرم شدن میوه ها، که یکی از ویژگی های مهم رسیدگی آنها بشمار می رود، حاصل مجموعه ای ازتغییرات آنزیمی و غیر آنزیمی در سوخت وساز وساختار دیواره سلولی است که تغییر بافت را در پی دارد. در انگور آنزیم بتا- گالاکتوزیداز نقش بسیار مهمی در تخریب دیواره سلولی و به دنبال آن نرم شدن حبه انگور دارد و این مسئله موجب کاهش ماندگاری میوه و افزایش فسادپذیری میوه می شود. بنابراین به نظر می رسد که با کاهش فعالیت آنزیم بتا- گالاکتوزیداز از طریق تکنیک بازداری آنتی سنس، بتوان میزان ماندگاری میوه را افزایش داد.

مواد و روش ها

جهت استخراج RNAی کل، بافت حبه انگور واریته بی دانه سفید در مرحله ترش – شیرین (Verasion) با استفاده از هاون و ازت مایع بصورت پودر در آمده و به میزان ۰/۱ گرم به یک تیوب ۲ml حاوی ۱ml بافر استخراج (PVP, 2% (2%β-mercaptoethanol, ٪۲CTAB, 25mM EDTA pH 8, 2M NaCl, 300mM Tris-HCl pH 8 اضافه گردید. سپس پروتئین ها دومرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴ v/v) استخراج گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردید، و ۰/۱ مقدارسدیم استات ۳M و ۰/۶ مقدار ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. پلیت اسید نوکلئیک بوسیله سانتریفیوژ با سرعت بیشینه جمع آوری شده ودر آب DEPC حل گردید. در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید ۸ M به نمونه ها اضافه گردید وتیوب ها به مدت یک طول شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند، سپس RNAی کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت بیشینه رسوب و با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ شسته شده و در مقدار مناسب آب DEPC حل گردید. در نهایت،

کمیت و کیفیت RNA کل استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش نسخه برداری معکوس، از توالی DNAی ژنومی ژن بتا- گالاکتوزیداز انگور با شماره شناسایی AM430243 موجود در بانک ژن NCBI استفاده شد و آغاز گرهای اختصاصی جهت تکثیر این ژن با استفاده از تکنیک PCR، طراحی گردید. پس از خالص سازی محصول PCR، جهت سهولت همسانه سازی، مکان برشی آنزیم محدود کننده *Kpn*I از طریق آغاز گرهای اختصاصی در دو انتهای ژن بتا- گالاکتوزیداز تعبیه گردید و پس از آن ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم محدود کننده *Kpn*I هضم گردید و خالص سازی شدند. سپس واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (محصول شرکت فرمنتاز) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، انجام گرفت. پس از تهیه سلول های مستعد، برای انتقال پلاسمید حاوی ژن به این سلول ها، از تکنیک شوک حرارتی استفاده گردید. در مرحله بعد استخراج پلاسمید با استفاده از محلول قلیایی و SDS انجام گرفت و کلنی های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در این بررسی، پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی و تعبیه مکان برشی آنزیم محدود کننده *Kpn*I در انتهای ´۵ آنها، به منظور استخراج ژن مورد نظر، از تکنیک PCR استفاده شد. پس از استخراج و خالص سازی محصول PCR، عمل هضم آنزیمی ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از آنزیم محدودگر *Kpn*I انجام شد و سپس فرآیند اتصال انجام گرفت و پلاسمید نوترکیب طی فرآیند تراریزش به باکتری *E. coli*، سویه DH5α، انتقال داده شد. بررسی کلنی های نوترکیب با استفاده تکنیک های PCR و هضم آنزیمی نشان داد که ژن همسانه شده همان ژن مورد نظر است. جهت اطمینان کامل از صحت توالی همسانه سازی شده، توالی یابی DNA انجام گرفت و نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزار Clustalw2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی یابی DNA نشان داد که این ژن با طول 336 bp، با ژن مورد نظر با شماره شناسایی AM430243 در NCBI با طول 345 bp، حدود ۹۹٪ شباهت دارد، که می تواند بیانگر ایزوفرمی جدید از این ژن در رقم بی دانه سفید باشد.

منابع

1- **Birnboim H.C. and Doly J. (1979).** "A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acid Research* **7**: 1513- 1525.

2- **Cohen S.N., Chang A. C. Y. and Hsu L. (1972).** " Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R- factor DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110- 2114.

3- **Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F. andLund S.T. (2006).** "An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real- time RT- PCR during berry development". *BMC Plant Biology.* **6**: 27- 37.

4- **Sambrook J. and Russell D. W. (2001)**. "Molecular cloning: a laboratory manual", 3nd ed.

Vol: 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

β-galactosidase gene cloning, the agent of cell wall modifying in grapevine

Reza Heidari[1], Raheem Haddad[2], Ghasem ali garousi[3]
1- Ms student of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University 2- Imam Khomeini International University, Department of Agricaltural Biotechnology 3- Imam Khomeini International University, Department of Agricaltural Biotechnology

Abstract
One of the important characteristics of fruits, is their tissue softening that is result of some enzymatic and nonenzymatic varieties in metabolism, catabolism and structure of cell wall. Therefore, this subject has the most effects on fruits transition and storage in post- harvest step, as the most fruits are curropting. β-galactosidase enzyme has the important role in cell wall modifying and berry tissue softening. Therefore, it seems that with the reduce of β-galactosidase enzyme activity by antisense inhibition technique, it is possible to increase fruit settlering in post harvest step and decrease the loss value and fruit decaying during harvest time. In this research project, the coding gene of forementioned enzyme was extracted by PCR technique and was cloned in pUC19 vector to be able to transfer into the grapevine plant for the future research and characterize the effects on the grape berry softening.