همسانه سازی ژن پکتات لیاز، عامل تخریب دیواره سلولی در انگور

رحیم حداد (۱)، سید شرف الدین موسوی (۲)، قاسمعلی گروسی (۱)، رامین حسینی (۱)

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

پکتات لیاز (EC 4.2.2.2) آنزیمی است که سبب پوسیدگی نرم و تحلیل بافت گیاهان از طریق تخریب دیواره سلولی در اندام ها می گردد. در این بررسی همسانه سازی cDNAی مورد نظر با طراحی آغازگر از ژن پکتات لیاز انگور تحت عنوان *GPL1* از *Vitis vinifera* بوسیله تکثیر سریع انتهایی cDNA صورت گرفت. ژن حاصله دارای ۴۲۲ جفت باز می باشد که ۱۴۰ آمینو اسید از پیش ماده پروتئین را کد می نماید. در مرحله نخست پس از طراحی آغازگرها با استفاده از cDNA که از استخراج RNA حاصل شده بود واکنش PCR انجام شد. سپس قطعه مورد نظر با آنزیم های برشی با استفاده از سایت های برشی تعبیه شده در دو طرف خود بهمراه پلاسمید pUC19 هضم شده و طی فرایند لیگاسیون به یکدیگر متصل شدند. در این بررسی ژن پکتات لیاز در باکتری *E. coli* همسانه سازی گردید. کلنی های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR وهضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آن جهت اطمینان از صحت توالی همسانه سازی شده، از توالی یابی DNA استفاده گردید. نتایج توالی یابی DNA با استفاده از نرم افزارهای Blast و Clustalw2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: پکتات لیاز، PCR، آنزیم های برشی، کلونی، pUC19، cDNA

مقدمه

یکی از محصولات مهم دنیا، که سطح زیر کشت آن سالانه افزایش می یابد، انگور است. میوه انگور از میوه های نافراز گرا می باشد که خصوصیات رشدی نمودار دابل سیگموئیدی را از خود نشان می دهد. در مرحله ترش- شیرین این میوه، تعدادی از رویدادها اتفاق می افتد که شامل گسترش رنگ، نرم شدن، تسریع در رشد و نمو و همچنین افزایش وزن حبه میباشد. تحقیقات نشان داده اند که آنزیمهای بسیاری در این رویداد دخیل اند که از آن جمله میتوان به آلفا گالاکتوزیداز، بتاگالاکتوزیداز، پلی گالاکتورونـاز، پکتات لیاز، پکتین متیل استراز، سلولاز، گزایلو گلوکان اندوترانسگلیکوزیلاز و غیره اشاره نمود. بررسی های بیشتر نشان داده اند که از این بین، آنزیم پکتات لیاز دارای تاثیر قابل توجهی نسبت به سایر آنزیم ها در مرحله ترش-شیرین گیاه انگور در رابطه با تخریب دیواره سلولی و به دنبال آن نرم شدن حبه انگور دارا می باشد که این مسئله موجب کاهش عمر نگهداری و ماندگاری میوه و افزایش فساد پذیری میوه می شود. بنابراین به نظر می رسد که پس از همسانه سازی، با کاهش فعالیت آنزیم پکتات لیاز از طریق تکنیک بازداری آنتی سنس، بتوان میزان ماندگاری میوه را افزایش داد.

مواد و روش ها

در ابتدا اقدام به استخراج RNA کل گردید. در این راستا بافت حبه انگور واریته بی دانه سفید در مرحله ترش– شیرین با استفاده از هاون و ازت مایع بصورت پودر در آمده و بمیزان ۰/۱ گرم به یک تیوب ۲ml حاوی ۱ml بافر استخراج (PVP2%, β-mercaptoethanohl 2%, SDS 1%, CTAB 2%, 25Mm EDTA pH 8, 2M NaCl,

Tris-HCl pH 8 100mM) اضافه گردید. پس از آن تیوپ مورد نظر بمدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و هر ۵ دقیقه به آرامی ورتکس شد. در مرحله بعد پروتئین ها دو مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴ v/v) استخراج گردیده و با دور rpm ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک تیوب جدید منتقل گردید. سپس ۰/۱ حجم محتویات، سدیم استات ۳M و ۰/۶ حجم محتویات، ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. پلیت اسید نوکلئیک بوسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جمع آوری شده و در ۲۰۰µl آب DEPC شده حل گردید. در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید M ۸ به نمونه ها افزوده شد و تیوب ها به مدت یک طول شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از آن RNAی کل به وسیله سانتریفیوژ با دور rpm۱۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد رسوب داده، بوسیله اتانول ۷۰٪ شسته شده و در هود لامینارفلو خشک و در مقدار مناسب آب DEPC شده حل شد. در این تحقیق واکنش نسخه برداری معکوس با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) و پرایمر اولیگوdT انجام گرفت و ملکول های cDNA سنتز شد. جهت جداسازی ژن پکتات لیاز، از توالی DNAی ژنومی ژن پکتات لیاز انگور با شماره شناسایی AY043234 موجود در بانک ژن NCBI استفاده و آغاز گرهای اختصاصی طراحی گردید. سپس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز رشته تکثیر گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR و ناقل پلاسمیدی و اتصال آن ها مکان برشی آنزیم محدود کننده *Eco*RI از طریق آغاز گرهای اختصاصی در دو انتهای ژن پکتات لیاز تعبیه گردید و پس از آن ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم محدود کننده *Eco*RI هضم گردیده و پس از خالص سازی، رسوب داده شده اند. در مرحله بعد واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4، انجام گرفت. انتقال پلاسمید حاوی ژن به سلول های مستعد (*E. coli*) که پس از تهیه سلول های مستعد، برای این منظور، از تکنیک شوک حرارتی (کوهن و همکاران، ۱۹۷۲) استفاده گردید. پس از آن استخراج پلاسمید با استفاده از محلول قلیایی و SDS صورت گرفت.

نتایج و بحث

در مرحله نخست آغازگرها با استفاده از برنامه الیگو طراحی شدند. آغازگرهای رفت با طول ۲۲ نوکلئوتید که به ترتیب شامل ۱۰ نوکلئوتید از ابتدای ژن ۳ نوکلئوتید با توالی ACC بمنظور افزایش بیان ژن قبل از این توالی وبلافاصله ۶ نوکلئوتید جهت سایت برشی وهمچنین توالی های اختیاری اضافی که برای انجام فعالیت آنزیم برشی در انتهای رشته ضروری است، طراحی گردید. آغازگرهای برگشت نیز بهمین ترتیب منتهی با طول ۲۳ نوکلئوتید وبدون نیاز به توالی ACC طراحی شدند. سایت برشی که برای هر دو آغازگر در نظر گرفته شده بود مربوط به آنزیم *Eco*RI بود. با استفاده ازcDNA library که از استخراج RNA حاصل شده بود واکنش PCR انجام شد وسپس قطعه مورد نظر با استفاده از سایت های برشی تعبیه شده در دو طرف خود بهمراه پلاسمید مورد نظر هضم شده و طی فرآیند لیگاسیون به یکدیگر متصل شدند. در این تحقیق ژن پکتات لیاز در باکتری *E. coli* همسانه سازی گردید. کلنی های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آن جهت اطمینان از صحت توالی همسانه سازی شده، از توالی یابی DNA استفاده گردید. نتایج توالی یابی DNA با استفاده از نرم افزارهای Blast و Clustalw2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. و توالی یابی cDNA نشان داد که این ژن با طولbp ۴۲۲ با ژن عامل پکتات لیاز انگور رقم شیراز با شماره شناسایی AY043234 در NCBI با طول bp ۴۲۹، حدود ۹۹٪ شباهت دارد که بیانگر ایزوفرمی جدید از این ژن در رقم ایرانی بی دانه سفید می باشد.

منابع

1. Celia. M., Orchard. J., Graham B. S. (2002). "Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening". Journal of Experimental Botany, **53**: 2115-2119

2. Nunan. J., simon. P., fincher. B., (2001). "Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grap berry development".Planta **214**: 257-264

3. Rodriguez. M.C., Smith. D., Manning. K., Orchard. J., Seymour, G.B.,(2002) "Pectate Lyase Gene Expression and Enzyme Activity in Ripening Banana Fruit". Plant Molecular Biology **56**:1123-130

4. **Robert. D., Steven. R., Arland. T., Noel. T., Jacques. A. E., Harry. C. M., Jaap. V., and Frances J.,(1999).** "Structure of a Plant Cell Wall Fragment Complexed to Pectate Lyase C". Plant Cell 11:1081-1092

Pectate lyase gene cloning, the agent of cell wall modifying in grapevine

Raheem Haddad[1], Sharaf aldin Mussavi[2], Qasemali Garoosi[1] , Ramin Hoseini[1]

1- Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin,

2- MSc student of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University.

Abstract

Pectate lyase (EC 4.2.2.2) is an enzyme involved in the maceration and soft rotting of plant tissue via degradation of cell wall in organisms. In this study, the cloning of a novel full-length cDNA of pectate lyase gene was designed using primers catch from *GPL1* cDNA of *Vitis vinifera* by rapid amplification of cDNA ends. The achieved cDNA exhibited 422 bp encoding a 140 amino acid protein precursor. In the first step, the primers were designed using forementioned cDNA (*GPL1*). Total RNA was extracted and cDNA was achieved by PCR reaction. Then, aforesaid segment digested by restriction enzyme site in the two restriction site of fragment. The pUC19 vector plasmid were digested and adjoined with fragment applying ligation process. Pectate lyase gene cDNA was cloned in the *E. coli*. Recombinant clones were analyzed by both PCR and enzyme digesting method to confirm cloning. The inserted fragment was analyzed by sequencing to indicate recombination. The result of DNA sequencing was evaluated by Blast and Clustalw2 software.

Key words: Pectate lyase, PCR, Restriction enzymes, pUC19, cDNA.