

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

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

مهرآنا کوهی دهکردی^{۱*}، محمود خدام باشی^۲

۱- دانشجوی دکتری و دانشیار اصلاح بناات، دانشگاه شهرکرد

Kohi dehkordi M¹, khodambashi M²

۱,2. 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 آمینوترانسферاز اشاره نمود که تا به حال نقش سه ژن با تحقیقات انجام شده مورد تأیید 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 آمینوترانسферاز باکتری DL39، این باکتری برای اسید آمینه تیروزین اگزوتروف می‌باشد. به منظور بررسی توانایی ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسферاز مورد نظر در مکمل سازی نقصان فعالیت تیروزین آمینوترانسферازی باکتری، توالی ناحیه کد کنند ژن در ناقل‌های بیان pQE محسانه سازی شد و برای تواریختی باکتری DL39 مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمون مکمل سازی موفقیت آمیز بود و باکتری‌های تواریخت 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 $\text{--}^4\text{-} \text{هیدروکسی فنیل پیرووات}$ تبدیل نماید. نتایج بدست آمده در این تحقیق، نقش تیروزین آمینوترانسферازی ژن مورد بررسی را تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی

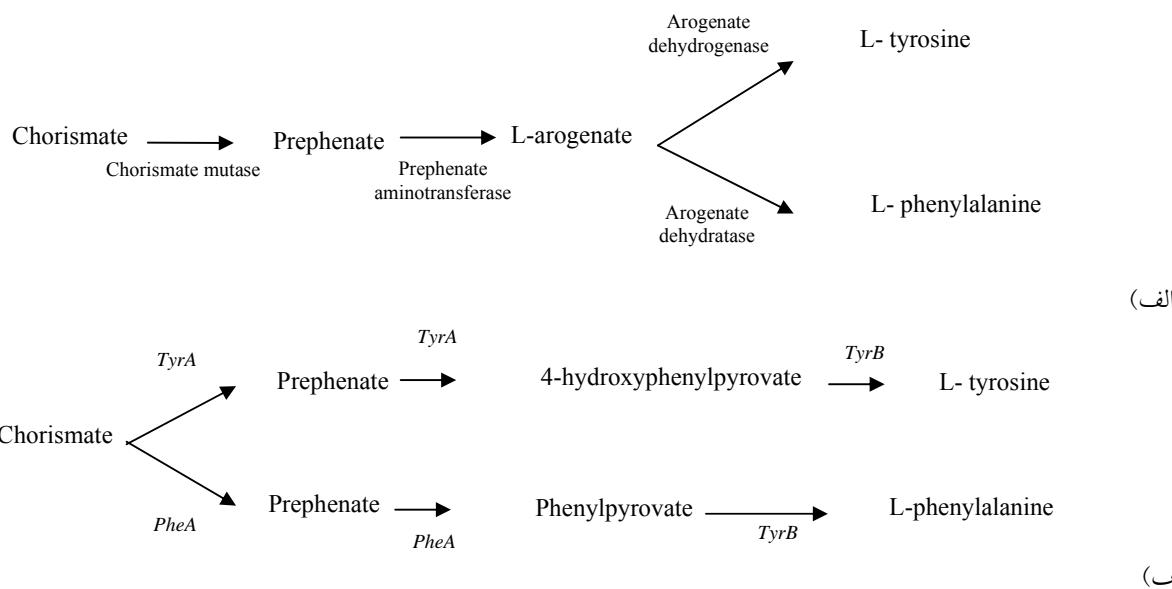
آرابیدوپسیس،
آزمون مکمل سازی،
آمینوترانسферاز،
همسانه‌سازی،
E.coli

مقدمه

فنیلآلانین، آنزیم دو عملکردی prephenate dehydratase (chorismate mutase) که توسط ژن *pheA* کد می شود تبدیل کوریسمات به پریفناٹ و پس از آن تبدیل پریفناٹ به فنیل پیرووات را کاتالیز می نماید. در مرحله نهایی نیز آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز کد شده توسط ژن *tyrB* سنتز فنیلآلانین را از طریق تبدیل فنیل پیرووات به L-فنیلآلانین سرعت می بخشد (شکل ۱، ب) در حالیکه برای سید آمینه L-تیروزین، آنزیم chorismate mutase/prephenate dehydrogenase دو عملکردی که توسط ژن *tyrA* کد می شود تبدیل کوریسمات به ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات را کاتالیز نموده و آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز کد شده توسط ژن *tyrB* مرحله نهایی سنتز تیروزین از طریق تبدیل ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات به L-تیروزین را هدایت می کند (شکل ۱، ب). (Mavrides and Orr 1975; Whitaker et al. 1982).

همانطور که اشاره شد هفت ژن با نقش احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در آراییدوپسیس نامگذاری شده اند 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. 2010) Prabhu and Hudson 2010 با استفاده از ژن تیروزین آمینوترانسفراز *Pseudomonas aeruginosa* (Gu et al. 1998) و همچنین یکی از هفت ژن خانواده تیروزین آمینوترانسفراز آراییدوپسیس دارای کد ژنی At5g36160 در بانک داده آراییدوپسیس (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 آراییدوپسیس، TARE.WWW.arabidopsis.org، در مورد نظر قرار گرفت. به این منظور از آزمون مکمل سازی باکتری اگزوتروف DL39 با دستواره های تهیه شده از ژن مورد نظر و بررسی توانایی آنزیم برای تبدیل سید آمینه L-تیروزین به ۴-هیدروکسی فنیل پیرووات استفاده شد.

پس از اتمام پروژه توالی یابی ژنوم در آراییدوپسیس، ۲۵۴۹۸ ژن در آن شناسایی شد. به منظور ارزیابی نقش ژن های شناسایی شده، ژنوم آراییدوپسیس با ژنوم توالی یابی شده موجودات یوکاریوت دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. فعالیت حدود ۶۹ درصد از ژن های آراییدوپسیس بر اساس مشابه توالی آنها با پروتئین هایی با عملکرد مشخص در موجودات دیگر تعیین شد که نسبت قابل توجهی از این ژن ها، در فرآیندهای متابولیسم و تنظیم ژن نقش داشتند و تنها نه درصد از ژن ها از طریق انجام آزمایش مورد شناسایی قرار گرفتند (Arabidopsis Genome Initiative 2000) از جمله این موارد می توان به نامگذاری ۴۴ ژن با نقش احتمالی آمینوترانسفراز در آراییدوپسیس اشاره نمود که نقش هفت ژن از این ۴۴ ژن به عنوان ژن های کد کننده آنزیم تیروزین آمینوترانسفراز پیش بینی شد (Liepmann and Olsen 2004). آمینوترانسفراز یا ترانس آمیناز، آنزیمی است که انتقال یک گروه آمین از یک ترکیب دهنده آمین را به محل کربونیل یک ترکیب پذیرنده آمین بر عهده دارد. معمولاً سید آمینه به عنوان دهنده آمین و ۲-کتو اسید به عنوان گیرنده آمین عمل می کند. آمینوترانسفراز آنزیمی است که در ایجاد اسید آمینه های مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است. در گیاهان، سنتز اسید های آمینه آروماتیک (L-تیروزین و L-فنیلآلانین) از طریق حدوات کوریسمات انجام می گیرد (شکل ۱، الف). کوریسمات از طریق فعالیت آنزیم کوریسمات موتاز به پریفناٹ تبدیل می شود سپس واکنش انتقال آمین از پریفناٹ توسط آنزیم پریفناٹ آمینوترانسفراز کاتالیز می شود. 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-فنیلآلانین تبدیل شود (شکل ۱، الف). در باکتری اشرشیاکولی نیز همانند گیاهان، تیروزین و فنیلآلانین از طریق حدوات مشترک کوریسمات سنتز می شوند (شکل ۱، ب). در این مسیر نیز اولین مرحله، تبدیل کوریسمات به پریفناٹ می باشد با این تفاوت که در باکتری، برای سنتز اسید آمینه L-



شکل ۱- مسیر ستر L-تیروزین و L-فینیلانین در گیاهان (الف) و باکتری *E. coli* (ب). هر یک از اختصارها عبارتند از (tyrosine *TyrB* و *TyrA* (chorismate mutase, prephenate dehydrogenase) *PheA* (chorismate mutase/prephenate dehydratase) (Prabhu and Hudson 2010) برگرفته از aminotransferase)

نمونه‌های برگی آراییدوپسیس اکوتیپ کولمبيا با استفاده از RNA کیت RNeasy Mini Kit (کيائزن، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و برای از بین بردن آلودگی DNA ژنومی، کیت RNase-Free DNase Set (کيائزن، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. ستر cDNA (اینوبتروژن، آمریکا)، در حضور یک میکروگرم RNA و الیگونوکلئوتید₁₈ (dT₁₈) انجام شد. برای تکثیر ژن مورد نظر، طراحی آغازگرها به گونه‌ای pQE شد تا حاوی سایت برش مناسب برای درج در ناقل 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 (جدول ۱). توالی ناحیه کد کننده ژن با استفاده از واکنش PCR در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰×)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط دئوكسی ریبونوکلئوتید (۱۰ میلی مولار،

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 پرومотор 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 *NcoI* و *BamHI* مطابق سیستم بافری و درجه حرارت توصیه شده کارخانه سازنده (فرمتوس، آلمان) انجام شد. پس از هضم آنزیمی برای ایجاد دنباله صاف در انتهای اند، از آنزیم پلی‌مراز *Klenow* (فرمتوس، 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 (کيائزن، آلمان) به منظور پاکسازی ناقل استفاده شد و در مرحله بعد، آنزیم برشی *BglII* برای ناقل pQE-60 و آنزیم برشی *KpnI* برای ناقل pQE-32 مورد استفاده قرار گرفت. استخراج

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 ۳۹ DL39، با استفاده از روش شوک حرارتی با دستواره‌های تهیه شده و همچنین ناقل‌های pQE-32 و pQE-60 (ناقل خالی) به عنوان شاهد تاریخت شد. از محیط LB-آگار حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیروزین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فنیل‌آلین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین برای پخش نمودن باکتری‌های تاریخته 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 فنیل‌آلین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسپاراتات، 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 آرایینوز 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 واکنش شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیمی و خالص سازی پروتئین

برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی، باکتری سویه M15 از طریق شوک حرارتی با دستواره‌های انتخاب شده، تاریخت گردید. از توالی‌یابی برای اطمینان از انتخاب همسانه‌های مناسب استفاده شد. پس از انتخاب همسانه مناسب برای هر یک از دستواره‌ها، 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 سانتریفیوژ شده و درون یخ قرار

فرمتاس، آلمان)، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (پیکومول) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu* (فرمتاس، 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 سانتی‌گراد 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 *Bg*/II و *Kpn*I به ترتیب برای درج در ناقل‌های بیان ۰/۵ pQE-60 و ۰/۵ 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 (کیاژن، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده QIAquick شد. واکنش اتصال توالی ژن تیروزین آمینوترانسферاز با هر یک از ناقلین با استفاده از حدود ۷۵ نانوگرم محصول PCR، ۲۵ نانوگرم ناقل، دو میکرولیتر بافر اتصال، دو میکرولیتر PEG، یک میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز (فرمتاس، 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 دستواره‌های تهیه شده تاریخت شد و در محیط انتخابی LB-آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ µl 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.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی TAT برای همسانه سازی در ناقل pQE

نام آغازگر	توالی آغازگر
pQETATf	5'-GAGAATGGAGCAACGACGACGAGC-3'
pQE-60TATr	5'-AGAAATAGATCTTATGGTTGGATATTGAGTCTGGC-3'
pQE-60TATSr	5'-ATCAGAAGATCTCTATGGTTGGATATTGAGTCTT-3'
pQE-32TATr	5'-ATCAGAGGTACCCATATGGTTGGATATTGAGTCTT-3'

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 آراییدوپسیس طی ایجاد زخم یا تیمار با جاسمونات صورت گرفت گزارش شد که یکی از مکان‌های ژنی کد کننده تیروزین آمینوترانسفراز با کد ژنی (Titarenko et al. At2g24850) در این واکنش دخالت دارد. در تحقیق Prabhu and Hudson (2010) نیز نقش تیروزین آمینوترانسفرازی مکان ژنی دیگری با کد ژنی (At5g36160)، از طریق همسانه سازی 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 بیوسیتر گلوکوزینولات انجام شد، مشخص شد کد ژنی (At2g20610) که در بانک داده‌های آراییدوپسیس تحت عنوان ژن احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز نام گرفته بود، فعالیت آنزیمی C-S Lyase داشته و در بیوسیتر 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 آراییدوپسیس، فعالیت این ژن در شرایط *In vivo* از طریق آزمون مکمل سازی با باکتری DL39 و در شرایط *In vitro* از طریق سنجش فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

گرفتند. مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌های رسوب یافته در بافر شکستن (Breaking buffer) (۴ میلی لیتر به ازای ۲۵۰ میلی لیتر) حل شدند. برای شکسته شدن سلول‌ها از دستگاه سونیکاتور استفاده شد. سپس مجدداً نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ 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-PAGE ۱۲ درصد برای الکتروفورز پروتئین استفاده شد.

نتایج و بحث

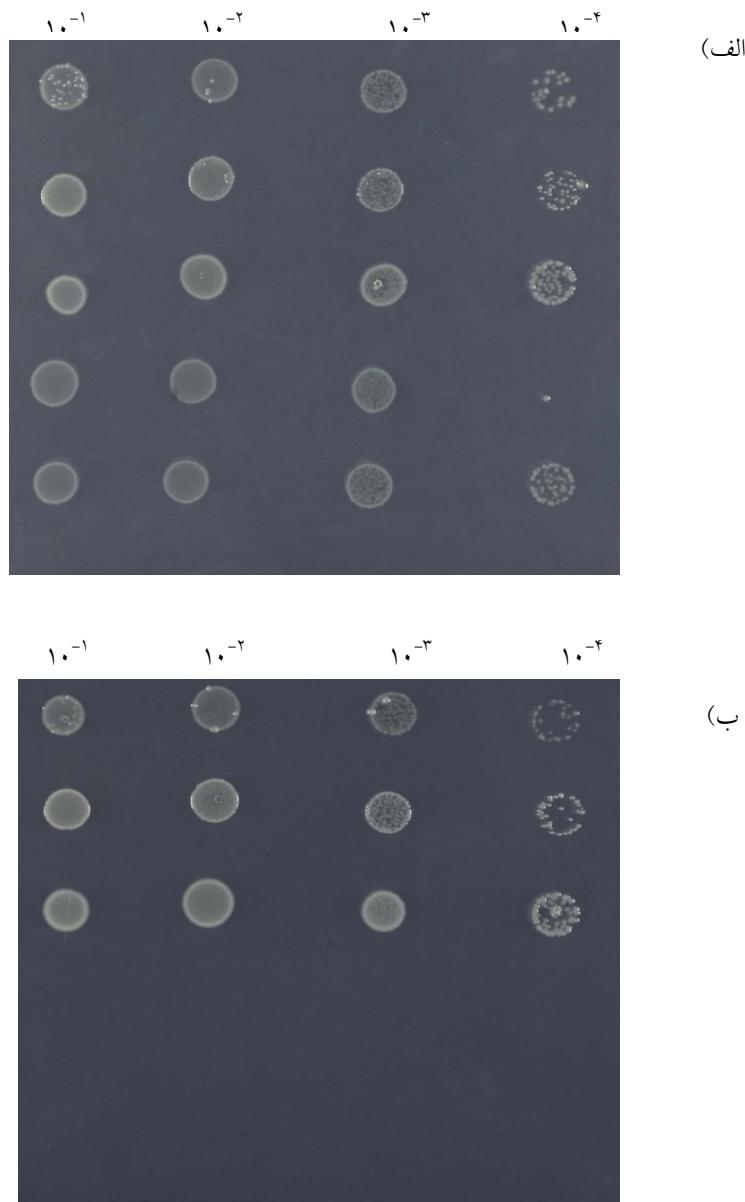
تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که واکنش‌هایی که توسط آنزیم آمینوترانسفراز کاتالیز می‌شود نقش ضروری در مسیرهای متابولیکی مختلف از جمله بیوسیتر و کاتابولیسم اسیدهای آمینه، بیوسیتر ویتامین، متابولیت‌های ثانویه و واکنش به تشنهای گیاهی دارد. به عنوان نمونه طی تحقیقی که در آراییدوپسیس به منظور بررسی نقش اکتاکانوئیدها در اثر متقابل گیاه- پاتوژن انجام گرفت، مشخص شد کد ژنی (At4g23600)، با نقش احتمالی تیروزین آمینوترانسفراز در بانک داده آراییدوپسیس، 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 احتمالاً در حمله پاتوژن‌ها، تولید مواد فنولی حاصل

ilvE (آمینوتранسفراز زنجیره فرعی) گردد یا خیر، باکتری های تاریخت 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 باکتری ها قادر به رشد در محیط های ذکر شده نبودند (جدول ۲). این نتایج نشان داد که این ژن تنها نقش تیروزین آمینوتранسفرازی دارد و قادر نیست نقصان این باکتری را در ژن های L- آسپارتات آمینوتранسفراز و آمینوتранسفراز برای اسیدهای آمینه زنجیره فرعی (والین، لوسین و ایزولوسین) جبران نماید. بر اساس نتایج بدست آمده می توان گفت مکان ژنی با کد At5g53970 تنها دارای نقش تیروزین آمینوتранسفرازی است و در مسیرهای مربوط به سنتز آسپارتات، لوسین، ایزولوسین و والین نقشی ندارد.

علیرغم اینکه ژن تیروزین آمینوتранسفراز گیاهان، باکتری ها و پستانداران بر اساس درخت فیلوزنیکی که تشابه توالی ها را مورد مقایسه قرار داده است، از یکدیگر مجزا شده اند با این وجود، آن ها در زیر گروه مشابهی از کلاس یک آمینوتранسفرازها گروه بندی گردیده اند (Mehta et al. 1989). در این درخت فیلوزنیکی آن زیم ها در سه همنیا (Clade) گروه بندی شده اند (شکل ۳). همنیای A نشان دهنده آن زیم های باکتریایی از باکتری های مختلف است. همنیای B متعلق به آن زیم های پستانداران انتخاب شده است و همنیای C نشان دهنده خانواده آن زیم تیروزین آمینوتранسفراز در (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 آمینوتранسفراز در اشرشیاکلی شباهت دارد اما توانست نقصان آنرا جبران نماید. نتیجه مشابهی نیز در تحقیق پرابه و همکاران علیرغم تشابه هفت درصدی میان توالی پروتئین تیروزین آمینوتранسفراز باکتری و پروتئین مورد مطالعه بدست آمده است (Prabhu and Hudson 2010).

فعالیت آنریمی 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

باکتری اگزوتروف DL39، باکتری جهش یافته ای است که در سه ژن آن جهش اتفاق افتاده است (LeMaster and Richards 1988). جهش ها در ژن های آمینوتранسفراز (L- آسپارتات آمینوتранسفراز)، *tyrB* (L- تیروزین آمینوترانسفراز) و *ilvE* (آمینوتранسفراز زنجیره فرعی Branched chain) منجر به غیرفعال شدن نقش این ژن ها 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 می گردد. با توجه به توضیحات ذکر شده از این باکتری برای تاریختی با ژن احتمالی تیروزین آمینوتранسفراز استفاده شد با این فرض که اگر ژن احتمالی دارای نقش تیروزین آمینوتранسفرازی باشد می باشد 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 فنیل آلانین را فراهم نماید. به همین منظور باکتری DL39 با دستواره های تهیه شده و همچنین ناقل های pQE-32 و pQE-60 به عنوان شاهد تاریخت شد. نتایج تاریختی موقفيت آمیز بود و باکتری های تاریخت شده با هر سه دستواره قابلیت خود را برای رشد در محیط رشد M9 فاقد اسید آمینه های مکمل تیروزین و فنیل آلانین بدست آورده اند (شکل ۲، ب) در حالی که باکتری تاریخت شده با ناقل های pQE-32 و pQE-60 قادر به رشد در این محیط نبود (شکل ۲، 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 آمینوتранسفراز با کد ژنتیکی (At5g36160) انجام شد، مطابقت دارد همانطور که اشاره شد باکتری DL39 برای سه ژن، آمینوتранسفراز (L- آسپارتات آمینوترانسفراز)، *tyrB* (L- تیروزین آمینوترانسفراز) و *ilvE* (آمینوترانسفراز زنجیره فرعی) جهش یافته است. به منظور بررسی اینکه تاریختی با ژن تیروزین آمینوترانسفراز می تواند منجر به بازگرداندن نقصان این باکتری در ژن های آمینوترانسفراز (L- آسپارتات آمینوترانسفراز) و



شکل ۲- آزمون مکمل سازی با استفاده از باکتری *E. Coli* DL39. باکتری‌ها تا رسیدن به OD حدود ۶۰۰ نانومتر رشد داده شدند، نمونه‌ها در رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} 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 ترازیخت شده با دستواره‌ها بجز نمونه‌های شاهد در محیط کشت فاقد تیروزین و فنیل آلانین بود (ب).

نشان داد که عصاره آنزیمی حاصل از تمامی دستواره‌ها بجز نمونه‌های شاهد دارای فعالیت تیروزین آمینوتранسفرازی بوده و تفاوت معنی‌داری میان فعالیت آنزیمی حاصل از عصاره نمونه‌های

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

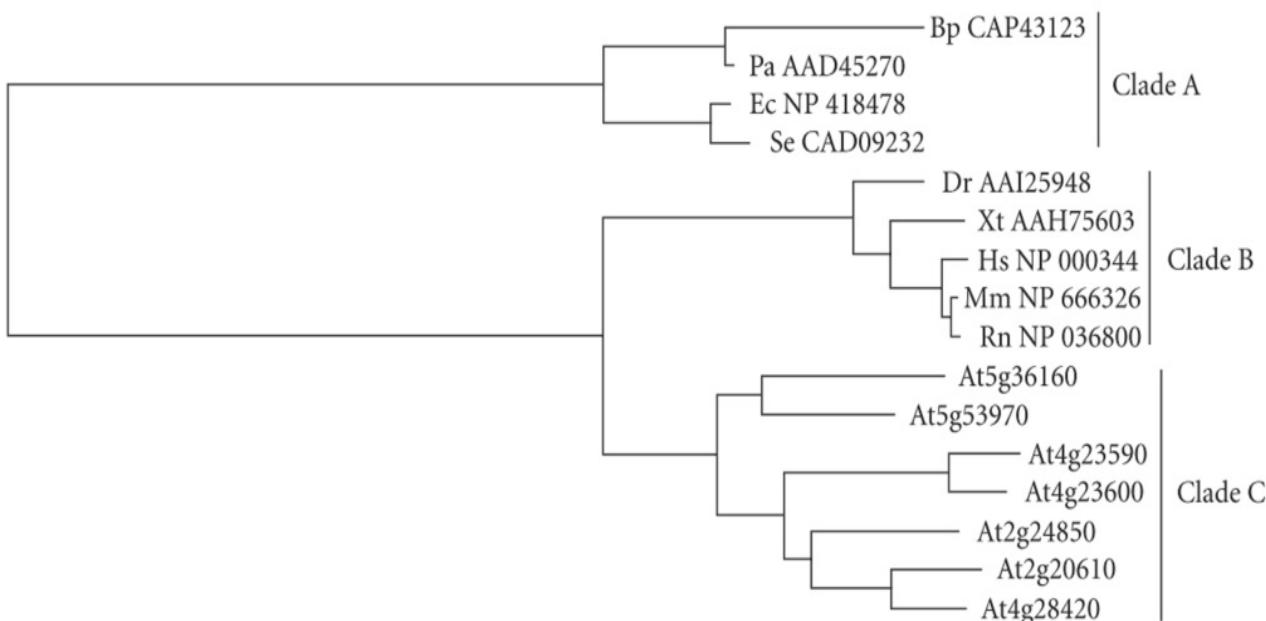
جدول ۲- آزمون مکمل سازی باکتری اگرتوتروف DL39 با استفاده از دستواره های تهیه شده

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

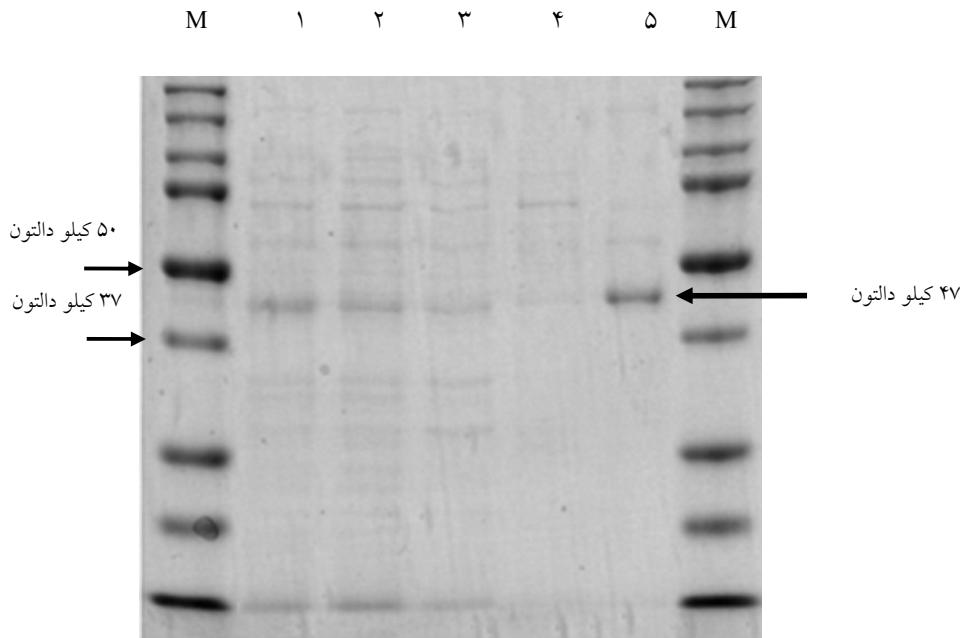
سن جوش آنزیمی نشان داد که پروتئین نوترکیب فعالیت آنزیمی داشته و تبدیل تیروزین به ۴-هیدروکسی فنیل پیروات را کاتالیز نموده، این شواهد می تواند تاییدی بر نقش تیروزین آمینوتранسفرازی ژن مورد نظر باشد. هرچند نتایج تحقیق حاضر نقش احتمالی ژن مورد بررسی را مورد تایید قرار داده است، اما ایجاد لاینهای تاریخخته برای ژن مورد نظر می تواند امکان بررسی نقش این ژن را در مسیرهای بیوشیمیابی با جزییات بیشتری فراهم نماید.

مورد بررسی مشاهده نشد. به منظور خالص سازی پروتئین نوترکیب (شکل ۴، چاهک ۵)، عصاره خام آنزیم (شکل ۴، چاهک ۱) مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین استخراج شده روی ژل ۱۲ SDS-PAGE در صد الکتروفورز شد. همانطور که در شکل ۴ ملاحظه می شود باند مربوط به پروتئین نوترکیب در محدوده مورد انتظار (۴۷ کیلو دالتون) قرار گرفت.

در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت از آنجا که آزمون مکمل سازی منجر به بازگرداندن فعالیت آنزیمی در باکتری تاریخت شده با دستواره های تهیه شده گردید و از طرف دیگر



شکل ۳- درخت فیلوجنی ژن های تیروزین آمینوتранسفراز در گیاهان، باکتری ها و پستانداران (Prabhu and Hudson 2010).



شکل ۴- خالص سازی پروتئین تیروزین آمینوتранسферاز 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 میلی مولار؛ ۴) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵ میلی مولار؛ ۵) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵ میلی مولار؛ (M) نشانگر پروتئین

کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه هتروزیس بویژه خانم‌ها آندریا آپلت و گوندا ورشت تشكر 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 deuteration. *Biochemistry* 27: 142-150.
 Liepmann AH, OLsen LJ (2004) Genomic analysis of Aminotransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Cr Rev Plant Sci* 23: 73-89.

تشکر و قدردانی
از آنجا که این تحقیق در موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی آلمان (IPK) انجام شده است، بدین وسیله از همکاری بی‌دربیغ

- 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.

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.