

همسانه‌سازی مولکولی، جداسازی و توصیف یک ژن پکتات لیاز از بافت حبه انگور بی‌دانه سفید (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid)

Molecular Cloning, Isolation and Characterization of a Pectate Lyase Gene from Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) Berry Tissue

رحیم حداد^{۱*}، سید شرف‌الدین موسوی^۲، قاسمعلی گروسی^۲، رامین حسینی^۲ و رضا حیدری جاپلغی^۳

چکیده

یکی از فعالیت‌های مهم سلول‌های گیاهی در دوره رشد آن، فعال نمودن ژن‌های عامل و آنزیم‌های موثر در تجزیه برخی مواد ذخیره شده در مراحل اولیه تشکیل میوه است. بر اساس مطالعات انجام شده، آنزیم‌های مختلفی در تخریب دیواره سلولی و نرم شدن بافت میوه نقش دارند. از مهم‌ترین این آنزیم‌ها، آنزیم پکتات لیاز می‌باشد. در این مطالعه، cDNA ناقص یکی از ژن‌های پکتات لیاز از بافت حبه انگور بی‌دانه سفید (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase-PCR) جداسازی و در ناقل pUC19 همسانه‌سازی و ساختار مولکولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی این ژن، تحت عنوان *VvPel1*، به طول ۴۲۹ bp بوده و یک پروتئین با ۱۴۳ اسید آمینه را رمز می‌کند. وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۱۵/۷۸ کیلو دالتون و ۶/۵۳ می‌باشد. بررسی ساختارهای دوم و سوم توالی پروتئینی *VvPel1* نشان داد که این پروتئین از نظر ساختاری مشابه با توالی‌های پکتات لیاز گزارش شده از موجودات دیگر می‌باشد. توالی پروتئینی به دست آمده شباهت زیادی را با توالی‌های پکتات لیاز سایر گیاهان از قبیل *Ricinus communis*، *Fragaria ananassa*، *Prunus persica* و *Populus trichocarpa* نشان داد. بررسی فیلوژنتیکی نیز مشخص کرد که این ژن به زیرگروه I پکتات لیازهای گیاهی تعلق دارد.

کلمات کلیدی: انگور، پکتات لیاز، نرم‌شدگی، دیواره سلولی، همسانه‌سازی

۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشیار، استادیار و دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Email: raehmehaddad@ikiu.ac.ir

*: نویسنده مسئول

ژن پکتات لیاز تحت عناوین *FaPelA* و *FaPelB* را از بافت میوه جداسازی و همسانه‌سازی نموده و با بررسی لکه گذاری سادرن نشان دادند که برخلاف ژن *FaPelB* که تنها دارای یک نسخه می‌باشد، ژن *FaPelA* توسط یک خانواده چند ژنی کوچک رمز می‌گردد. هم‌چنین بررسی گیاهان تراریخته این رقم توسط جیمینز برمودز و همکاران (Jimenez-Bermudez *et al.* 2002) نشان داد که آن‌ها حاوی یک توالی آنتی‌سنس از ژن پکتات لیاز بوده به طوری که میوه‌های تراریخته در مرحله رسیدگی کامل در مقایسه با شاهد هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر رنگ، اندازه، شکل و وزن نداشته و حتی در اغلب لاین‌های تراریخته، میوه‌های رسیده به‌طور معنی‌داری سفت‌تر از میوه‌های شاهد بودند.

هدف از این مطالعه، جداسازی و همسانه‌سازی یک توالی cDNA ناقص رمز کننده پکتات لیاز، تحت عنوان *VvPel1*، از بافت حبه انگور بی‌دانه سفید (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) می‌باشد تا در پژوهش‌های آتی بتوان از آن در جهت به تاخیر انداختن نرم‌شدگی بافت حبه انگور با استفاده از تکنیک بازداری آنتی-سنس استفاده نمود. هم‌چنین، خصوصیات بیوشیمیایی و ساختارهای دو بعدی و سه بعدی توالی پروتئینی به‌دست آمده با استفاده از یک ژن پکتات لیاز به‌عنوان الگو از گیاه سرو (*Juniperus ashei*) پیش‌بینی شد. بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی ژن همسانه شده نیز برای تعیین جایگاه آن در گروه ژن‌های پکتات لیاز انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج RNA

بافت حبه در مرحله دگرفرمی از گیاه انگور بی‌دانه سفید از مزارع انگور ایستگاه تحقیقات انگور، وابسته به سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، واقع در شهر تاکستان (استان قزوین)، جمع‌آوری و پس از توزین نمونه‌های یک گرمی، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شدند. RNA کل با استفاده از روش مبتنی بر CTAB در مقیاس کوچک استخراج گردید (Heidari Japelaghi *et al.* 2011).

یکی از ویژگی‌های مهم میوه‌ها، نرم شدن بافت آن‌ها است که حاصل مجموعه‌ای از تغییرات آنزیمی و غیر آنزیمی در سوخت و ساز و ساختار دیواره سلولی بوده و تغییر بافت را در پی دارد (Barnavon *et al.* 2000). دیواره‌های سلولی مسوول یکپارچگی و شکل‌دهی بافت‌ها بوده و علاوه بر عامل تعیین کننده در عمل‌آوری میوه، به‌عنوان مانعی فیزیکی در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا عمل نموده و با تامین قطعات پکتیکی نیز موجب پاسخ‌های نموی و دفاعی در سلول‌های میوه نارس می‌شوند (Seymour & Gross, 1996). در گیاهان عالی، در حدود ۹۰٪ از مواد اولیه دیواره سلولی شامل پلی ساکاریدهای سلولز، همی‌سلولز و پکتین بوده و مابقی آن را پروتئین‌های ساختاری تشکیل می‌دهد (Nunan *et al.* 2001). در فرآیند رسیدگی میوه‌ها، پلیمرهای پکتیکی و همی‌سلولزی شکسته شده، زنجیره طویل پکتین هضم شده و قندهای خاصی مانند گالاکتوز و آرابینوز از دیواره سلولی جدا می‌شوند. این تغییرات، استحکام دیواره سلولی و اتصالات بین سلولی را کاهش داده و منجر به نرم شدن بافت میوه و رسیدن آن توسط عمل هماهنگ هیدرولازهای مختلف دیواره سلولی به‌ویژه پکتات لیازها (EC 4.2.2.2) می‌شود (Nunan *et al.* 2001). این حوادث در رشد و نمو حبه انگور (*Vitis vinifera* L.) قابل توجه می‌باشند، به‌ویژه در مرحله دگرفرمی^۱ که با نرم‌شدگی سریع و سایر تغییرات از قبیل افزایش رشد، تجمع گلوکز و فروکتوز، کاهش سطوح اسیدهای آلی و آغاز تغییر رنگ در رقم‌های رنگی همراه است (Barnavon *et al.* 2000).

تاکنون پژوهش‌های زیادی در زمینه جداسازی، همسانه‌سازی، بررسی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی و نیز به تاخیر انداختن نرم‌شدگی بافت میوه با استفاده از تکنیک بازداری آنتی‌سنس در گیاهان مختلف انجام شده است. نونان و همکاران (Nunan *et al.* 2001) با بررسی فعالیت آنزیم‌های درگیر در تخریب دیواره سلولی در طول رشد و نمو حبه انگور رقم کوردو^۲ نشان دادند که رونوشت‌های آنزیم پکتات لیاز در طول فرآیند رسیدگی به میزان زیادی وجود داشته و نشان دهنده نقش مهم این آنزیم در فرآیند تخریب دیواره سلولی و نرم‌شدگی بافت میوه است. در پژوهش دیگری در گیاه توت‌فرنگی رقم چاندلر^۳، بنیتز بوراکو و همکاران (Benitez-Burraco *et al.* 2003) دو

1. Veraison
2. *V. vinifera* cv. Gordo
3. *Fragaria ananassa* cv. Chandler

همسازسازی و توالی‌یابی cDNA رمزکننده *VvPel1*

پس از خالص‌سازی محصول Reverse Transcriptase-PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean Up Kit-Vivantis)، ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی *BamHI* (Fermentas) تیمار گردیده و مجدداً خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) انجام گرفته و محلول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 α ، انتقال داده شد (Sambrook & Russell, 2001). با انجام آزمون سفید-آبی، تعدادی کلونی به‌عنوان کلونی‌های نو ترکیب انتخاب شده و پلاسمیدهای نو ترکیب با روش تحلیل قلیایی با SDS استخراج گردیده و با استفاده از دو تکنیک PCR و برش آنزیمی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند (Sambrook & Russell, 2001). توالی‌یابی DNA پلاسمید نو ترکیب با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab¹ آلمان، انجام شد.

بررسی توالی و پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم پروتئین به دست آمده از *VvPel1*

توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرآیند توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) مورد ترجمه قرار گرفته و خصوصیات بیوشیمیایی توالی اسید آمینه‌ای به‌دست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005)، ProtScale (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/hydrophaty/index.html>) و TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی ژن *VvPel1* با استفاده از ترکیبی از سه برنامه TargetP (Emanuelsson *et al.* 2007)، iPSORT (Bannai *et al.* 2002) و YLOC (Briesemeister *et al.* 2010)، انجام گرفت. ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* با استفاده از برنامه‌های SOPMA (Geourjon & Deleage, 1995) و PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) تعیین گردیده و ساختار سوم توسط برنامه I-TASSER (Zhang, 2008) و با استفاده از ساختار کریستالی پروتئین پکتات لیاز از گیاه سرو (*J. ashei*: PDB ID 1PXZ) به‌عنوان یک الگو مورد پیش‌بینی قرار گرفت. اسیدهای آمینه

سننژ رشته اول cDNA و واکنش Reverse Transcriptase-PCR

رشته اول cDNA با استفاده از ۵ μ g محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم RNase-free DNase I (Fermentas)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس RevertAidTM M-MuiV (Fermentas) و آغازگرهای Oligo (dT)₁₈ (Qiagen) سنتز گردید. واکنش نسخه‌برداری در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام و عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه-بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. بدین ترتیب از رشته اول مولکول cDNA مولکول RNA-DNA ساخته شده به‌عنوان الگو در واکنش Reverse Transcriptase-PCR استفاده گردید. تکثیر ژن *VvPel1* با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پکتات لیاز (با شماره دستیابی AY043234) (Rychlik, 2007). آغازگرهای اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *BamHI* در انتهای ۵' بودند که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ μ l حاوی Tris- (pH 8.8) 2 mM، 10 mM KCl، 10 mM (NH₄)₂SO₄، 20 mM HCl، 0.1 mg/ml BSA، 0.1% Triton X-100، MgSO₄ 500 μ M از هر dNTP، 50 pM از هر آغازگر (رفت و برگشت)، 100 ng DNA الگو و 1.25 واحد از آنزیم *pfu* DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش Reverse Transcriptase-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne-TC512، انگلستان) قابل برنامه‌ریزی در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده شامل آغازگر رفت با توالی 5'-TACGGATCCGTC AATGTCCACATTGCTAA-3' و آغازگر برگشت با توالی 5'-ATCGGATCCCACCACATGGAAATATCCAT-3' بود.

همسانه‌سازی مولکولی، جداسازی و توصیف یک ژن پکتات لیاز از ... مهم از نظر ساختاری و فعالیت، حفظ شده در طی تکامل نیز توسط برنامه‌های Conseq (Ashkenazy et al. 2010) و PatchFinder (Nimrod et al. 2008) شناسایی شدند.

بررسی فیلوژنتیکی

توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از الگوریتم BLASTp در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^۱ مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی پروتئینی VvPel1 و توالی‌های به دست آمده به منظور شناسایی نواحی حفظ شده در طی تکامل با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 در موسسه بیوانفورماتیک اروپا^۲ (http://www.abi.ac.uk) انجام شد. یک درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor Joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.1 Beta 2 (Tamura et al. 2007) ساخته شده و بررسی Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار به منظور به دست آمدن حدود اطمینان برای شاخه‌ها نیز انجام گردید (Felsenstein, 1985). شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه‌های اطلاعات توالی NCBI، SwissProt و EMBL، مورد استفاده جهت بررسی‌های هم‌ردیف‌سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی، در جدول یک آمده است.

نتایج و بحث

همسانه‌سازی و بررسی توالی نوکلئوتیدی و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به دست آمده VvPel1

cDNA رمزکننده VvPel1 با استفاده از تکنیک Reverse Transcriptase-PCR از بافت حبه انگور بی‌دانه سفید، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه‌سازی شده و نتایج توالی‌یابی و بررسی با برنامه nBLAST نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده در جهت معمولی، یک ژن پکتات لیاز می‌باشد (شکل ۱). cDNA رمزکننده VvPel1، ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HQ333522، به طول ۴۲۹ bp بوده که با کدون GTC (رمزکننده اسیدآمینه والین) آغاز شده و با کدون GTG (رمزکننده اسیدآمینه والین) خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۴۳ اسیدآمینه را رمز می‌نماید (شکل ۲A).

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
2. European Bioinformatics Institute

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین VvPel1 با فرمول مولکولی $C_{689}H_{1054}N_{206}O_{202}S_{10}$ ، به ترتیب برابر ۱۵/۷۸ کیلو دالتون و ۶/۵۳ می‌باشد. شاخص آلیفاتیک آن، به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت، ۸۲/۴۵ محاسبه گردید که نشان دهنده مقاوم بودن ژن VvPel1 در برابر حرارت می‌باشد (Kim et al. 2008). هم‌چنین شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش، محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtParam، در حدود ۳۲/۱۷ بوده و در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود (Gasteiger et al. 2005). شاخص آب‌گریزی^۳ محاسبه شده به روش کیت و دولیتل (Kyte & Doolittle, 1982) نشان داد که پروتئین VvPel1 با داشتن نواحی آب-گریز^۴، به میزان زیادی آب‌گریز بوده (شکل ۲B) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۱۱ اسیدآمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۸ می‌باشد.

بررسی توالی اسیدآمینه‌ای و موتیف‌های ساختاری پروتئین به دست آمده VvPel1

توالی پلی‌پپتیدی به دست آمده از VvPel1، مشابه با سایر توالی‌های پکتات لیاز گیاهان، حاوی یک جایگاه فعال با شش اسیدآمینه $R_{131}MPRCR_{136}$ (Arg131-Met132-Pro133-Arg134-Cys135-Arg136) می‌باشد. به هر حال بررسی توالی‌های پکتات لیاز گیاهان نشان می‌دهد که تنها چهار اسیدآمینه Arg131، Pro133، Arg134 و Arg136 جایگاه فعال در طی تکامل حفظ شده‌اند و بنابراین جایگاه فعال در توالی‌های پکتات لیاز گیاهی به شکل RxPRxR نشان داده می‌شود (Czerwinski et al. 2005). جایگاه فعال توالی VvPel1 دارای سه اسیدآمینه با بار مثبت (Arg^+) می‌باشد که نقش مهمی را در واکنش آنزیم با غشای میانی و دیواره سلولی و در نتیجه تخریب و هضم دیواره ایفا می‌نمایند (Czerwinski et al. 2005). برخلاف توالی جایگاه فعال پروتئین VvPel1، توالی‌های پروتئینی CuPel از نارنگی (*Citrus unshiu*) و JaPel از سرو (*J. ashei*) به ترتیب به جای اسیدهای آمینه حفظ شده متئونین (Met) و سیستئین (Cys) در جایگاه فعال خودشان، دارای اسیدهای آمینه ایزولوسین (Ile) و آلانین (Ala) می‌باشند. هم‌چنین توالی

3. Hydropathy
4. Hydrophobic

G. rostochiensis نشان داد که تعداد اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} در مقایسه با توالی پروتئینی *VvPel1* و گیاهان کم تر بوده و به ترتیب شامل ۳، ۳ و ۱ اسید آمینه می باشند. موتیف های ساختاری حفظ شده در طی تکامل در توالی های پروتئینی پکتات لیاز گیاهان، در توالی پروتئینی *VvPel1* نیز مشاهده می شوند (Truong *et al.* 2001). بر این اساس، سه موتیف ساختاری در توالی پروتئینی *VvPel1* شناسایی گردید که عبارتند از:

- موتیف I ($W_{64}VDH_{67}$)
 - موتیف II ($D_{75}GLVDVAVMGSTAITISNHF_{94}$)
 - موتیف III ($L_{128}IQRMPRCRHGYFHV_{143}$)
- اسیدهای آمینه Asp75 و Asp79 به موتیف II و جایگاه فعال به موتیف III تعلق دارند.

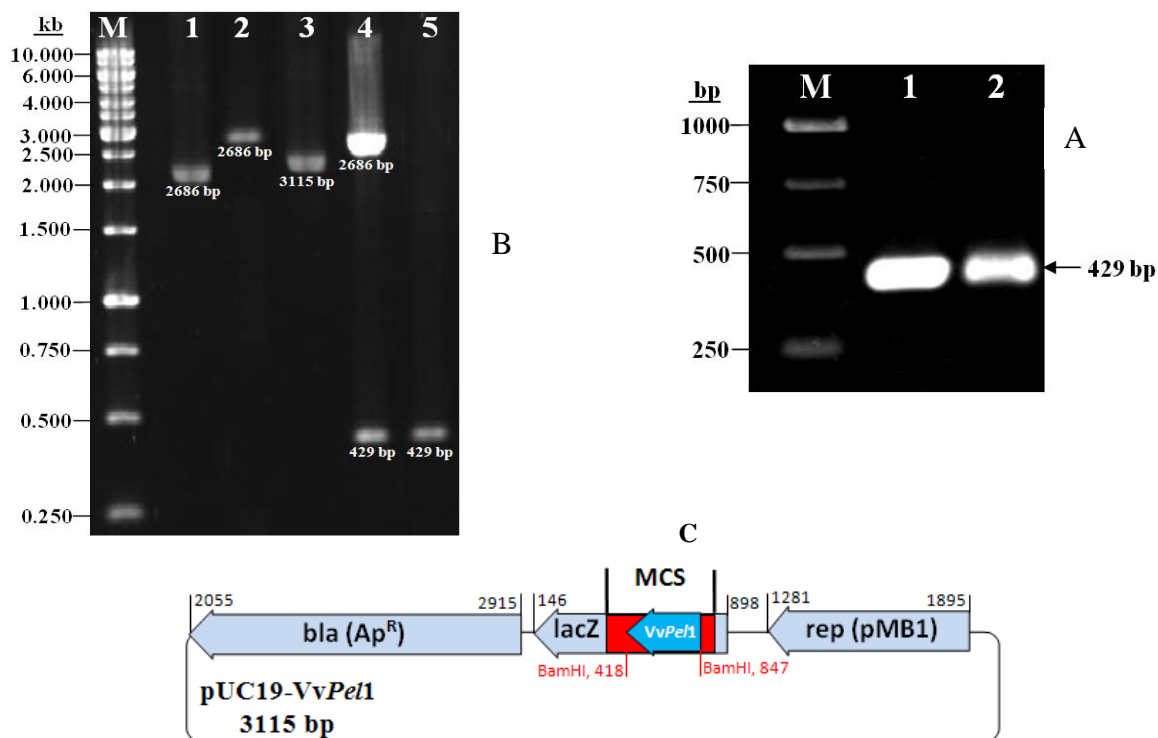
جایگاه فعال ($G_{205}LTLYG_{210}$) در توالی پروتئینی پکتات لیاز نماتد *Globodera rostochiensis* با پروتئین *VvPel1* و سایر توالی های پکتات لیاز گیاهان متفاوت بوده و فاقد هر گونه اسید آمینه با بار مثبت می باشد (Popeijus *et al.* 2000). بر اساس هم ردیف سازی چندگانه توالی پروتئینی *VvPel1* با توالی های پروتئینی پکتات لیاز از سایر گیاهان، چهار اسید آمینه آسپاراتات با موقعیت های Asp51، Asp53، Asp75 و Asp79 شناسایی شدند که با اسیدهای آمینه آسپاراتات حفظ شده در طی تکامل، موجود در توالی های پروتئینی پکتات لیاز گیاهان منطبق می باشند (شکل ۶B). اسیدهای آمینه آسپاراتات وظیفه اتصال یون Ca^{+2} به توالی پروتئینی آنزیم را ایفا نموده و به دنبال آن موجب فعال شدن آنزیم می گردند (Benitez-Burraco *et al.* 2003; Kudla *et al.* 2007). بررسی توالی های پروتئینی قارچها، باکتریها و نماتد

جدول ۱: مشخصات توالی های پروتئینی مورد استفاده برای تهیه هم ردیف سازی چندگانه و ساخت درخت فیلوژنتیکی به همراه

شماره دستیابی موجود در پایگاه های اطلاعات توالی NCBI، SwissProt و EMBL

Table 1. The protein sequences characteristics on NCBI, SwissProt and EMBL used for preparation of multiple alignment and construction of phylogenetic tree with their accession Nos

شماره دستیابی	نام ژن	نام علمی	نام گیاه	ردیف
Accession Number	Gene Name	Scientific Name	Plant Name	No.
NP_567409	<i>AtPel</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	1
CAE02420	<i>OsPel</i>	<i>Oryza sativa</i>	Rice	2
AAAY85180	<i>GhPel</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Cotton	3
AF339025	<i>FaPelA</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Strawberry	4
AF339024	<i>FaPelB</i>			
NP_001141589	<i>ZmPel</i>	<i>Zea mays</i>	Maize	5
XP_002446075	<i>SbPel</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Giant millet	6
BAE48664	<i>PmPel</i>	<i>Prunus mume</i>	Apricot	7
1PXZ_A	<i>JaPel</i>	<i>Juniperus ashei</i>	Cypress	8
ACU21247	<i>GmPel</i>	<i>Glycine max</i>	Soybean	9
AAQ84042	<i>MdPel</i>	<i>Malus domestica</i>	Apple	10
XP_002518146	<i>RcPel</i>	<i>Ricinus communis</i>	Castor been	11
ADD62392	<i>PpPel</i>	<i>Prunus persica</i>	Peach	12
XP_002297822	<i>PtPel</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Poplar	13
ABQ45845	<i>CuPel</i>	<i>Citrus unshiu</i>	Tangerine	14
AJ276331	<i>AnPelA</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Fungi	15
CH476605	<i>AtPelB</i>			
CH476606	<i>AtPelC</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Glomerella cingulata</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Bacteria	16
AF156983	<i>CgPel1</i>			
AF052632	<i>GcPelB</i>			
P29155	<i>EcPelA</i>			
P18210	<i>EcPelE</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Nematode	17
AL939110	<i>ScPel</i>			
AF127915	<i>GrPel1</i>	<i>Globodera rostochiensis</i>		



شکل ۱: RT-PCR، تایید کلونی‌های نوترکیب و ساختار ناقل نوترکیب pUC19-VvPel1 (A)، تکثیر ژن VvPel1 با استفاده از تکنیک RT-PCR و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد که منجر به تولید یک تک باند منفرد شده است. (M) نشانگر مولکولی ۱ kb، (۱) ژن VvPel1 تکثیر شده از بافت حبه، (۲) ژن VvPel1 تکثیر شده از بافت برگ. (B) تایید کلونی‌های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد. (M) نشانگر مولکولی ۱ kb، (۱) پلاسمید غیر نوترکیب هضم نشده، (۲) پلاسمید غیر نوترکیب هضم شده با آنزیم BamHI، (۳) پلاسمید نوترکیب هضم نشده، (۴) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن VvPel1 هضم شده با آنزیم BamHI، (۵) ژن VvPel1 (C) ناقل نوترکیب حاوی ژن VvPel1 در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی (MCS) می‌باشد. توالی مسئول رونوشت‌برداری ناقل نوترکیب (pMB1)، ژن‌های lacZ و مقاومت به آمپی‌سیلین (Ap^R) و جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی روی ناقل نوترکیب نیز نشان داده شده‌اند

Figure 1: The RT-PCR, analysis of recombinant clones and structure of pUC19-VvPel1 recombinant vector. A) The amplification of the VvPel1 gene using RT-PCR and 1.2% agarose gel electrophoresis that it has produced a single band. M) 1 kb DNA ladder, 1) The VvPel1 gene from berry tissue, 2) The VvPel1 gene from leaf tissue. B) Analysis of recombinant clones by enzymatic digestion and 1.2% agarose gel electrophoresis. M) 1 kb DNA ladder, 1) Non-recombinant and non-digested plasmid, 2) Non-recombinant plasmid digested by BamHI, 3) Recombinant and non-digested plasmid, 4) Recombinant plasmid digested by BamHI, 5) VvPel1 gene. C) The recombinant vector contains VvPel1 gene in correct direction into multiple cloning site (MCS). The pMB1 sequence, lacZ gene, Ap^R gene, and MCS have been also indicated on recombinant vector.

آمینو مهم از نظر ساختاری و فعالیت، حفظ شده در طی تکامل، که توسط برنامه‌های ConSeq و PatchFinder در توالی پروتئینی VvPel1 شناسایی شده‌اند (شکل ۳B)، عبارتند از:

Val1- Val3- Ile20- Asp51- Gly52- Asp53- Trp64- Asp66- His67- Asp75- Gly76- Asp79- Ser84- Thr85- Thr88- Ser90- His97- Leu102- Gly104- Asp107- Asp112- Met115- Ala120- Asn122- Gln130- Arg131- Pro133- Arg134- Arg136-Gly138- His141- Val143.

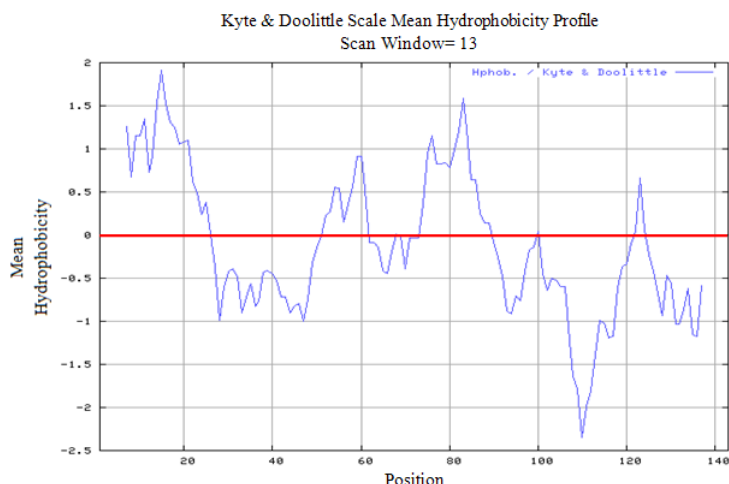
پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی VvPel1 با استفاده از ترکیبی از سه برنامه iPSORT، TargetP و YLOC نشان داد که VvPel1 متعلق به اندامک‌های سلولی نبوده و به احتمال ۹۹/۹۵٪ به مسیرهای ترشحی^۱ تعلق دارد. همچنین بررسی‌ها با برنامه TMHMM نشان داد که VvPel1 با داشتن یک دومین غشایی در انتهای آمینوی خود، به عنوان یک پروتئین خارج سلولی شناخته می‌شود (شکل ۳A). موقعیت اسیدهای

1. Secreted Pathway

A

1	gtcaatgtccacattgctaattggagcatgcatcacccgtccaatttgtcacgaatgttata	20
	V N V H I A N G A C I T V Q F V T N V I	
61	atcatggttctcacatccatgactgcaagcccactgggaatgccatggtgaggagctca	40
	I H G L H I H D C K P T G N A M V R S S	
121	ccaagtcaattgggtggaggacaatggcogatggogatgccatttcgatttttggtca	60
	P S H F G W R T M A D G D A I S I F G S	
181	agccatata tggttcgatcaca attcactctctagctgtgct gatggcctcgttgatgct	80
	S H I W V D H N S L S S C A D G L V D A	
241	gtcatgggctcgactgccattaccatttccaacaaccactttgccaccacaatgaggtg	100
	V M G S T A I T I S N N H F A H H N E V	
301	atgctgttggccacagtgattcttatgaaagagacaagcaaatgcaagtgacaattgcc	120
	M L L G H S D S Y E R D K Q M Q V T I A	
361	tataaccattttggtgaggtctgatccag aggatgccaaaggcagacatggatatttc	140
	Y N H F G E G L I Q R M P R C R H G Y F	
421	catgtggtg	143
	H V V	

B



شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و شاخص Hydrophobic (A. *VvPel1*) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن *VvPel1*. شماره نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه به ترتیب در سمت چپ و راست آورده شده‌اند. موتیف‌های ساختاری I, II و III به ترتیب با رنگ‌های آبی، قرمز و سبز و اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال و اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} نیز به ترتیب با کادرهای مستطیلی و دایره‌ای شکل نشان داده شده‌اند. (B) بررسی شاخص Hydrophobic توالی پروتئین *VvPel1*. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط قرمز رنگ قرار دارند.

Figure 2: Nucleotide and deduced amino acid sequences, and Hydrophobic index of *VvPel1* gene. A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of *VvPel1* gene. Nucleotide and amino acid residue numbers are shown on the left and right, respectively. The structural motifs of I, II, and III are indicated in blue, red, and green, respectively. The putative active site sequence and aspartate (Asp) residues involved in binding with Ca^{+2} are shown by rectangular and circular boxes. B) Hydrophobic index analysis of *VvPel1* deduced protein sequence. Hydrophobic domains are indicated by positive numbers; hydrophobic domains are above the line, and hydrophilic domains are below.

مابین صفحات 8 و 9 و در ناحیه مارپیچ پیچیده^۱ واقع شده و اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} ، به جز اسید آمینه Asp79 تشکیل دهنده صفحه 5، همگی در ناحیه مارپیچ پیچیده قرار دارند. همچنین موتیف-های ساختاری I, II و III به گونه‌ای سازمان‌دهی شده‌اند که بخشی از توالی آن‌ها تشکیل دهنده صفحه یا صفحات β و بخش دیگر تشکیل دهنده مارپیچ‌های پیچیده می‌باشند.

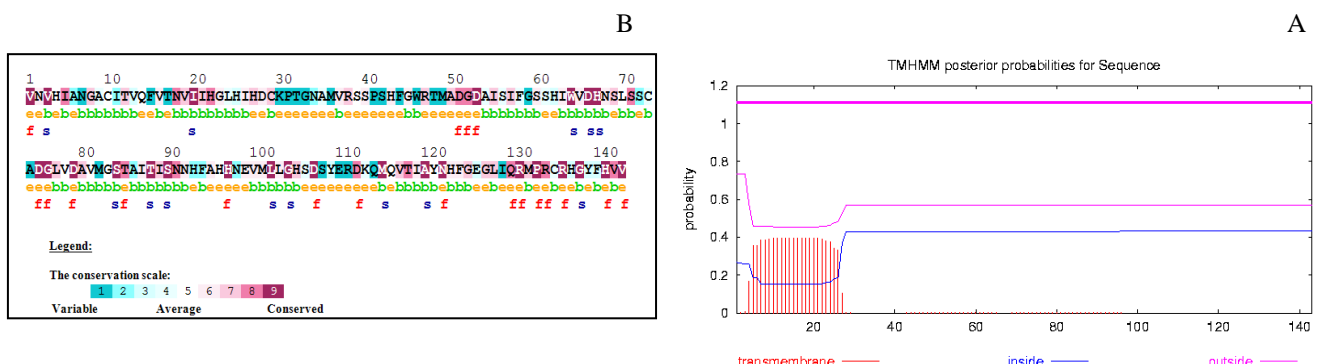
بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1*

بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* با استفاده از برنامه PSIPred نشان داد که این پروتئین مشابه با سایر توالی‌های پکتات لیاز از موجودات دیگر، حاوی ۹ صفحه کوچک β و تنها یک مارپیچ α با آرایش $\beta\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\beta\beta$ می‌باشد (Czerwinski et al. Benitez-Burraco et al. 2003; Xiao et al. 2005; (شکل ۴A). جایگاه فعال *VvPel1*

همسانه‌سازی مولکولی، جداسازی و توصیف یک ژن پکتات لیاز از ...

Benitez-Burraco et al. 2003; Zhao et al. 2007). در مقایسه با *VvPel1*، ژن *JaPel* از سرو (*J. ashei*) حاوی مارپیچ‌های α کمتری می‌باشد. این ژن شامل ۱ مارپیچ α (۰/۶۹)، ۵۸ صفحه β (۰/۴۰) متصل شده توسط ۱۳ پیچ β (۰/۸۹۷) و ۷۳ مارپیچ تصادفی (۰/۵۰۳۴) می‌باشد (Czerwinski et al. 2005). همچنین، مقایسه ساختار دوبعدی *VvPel1* با ژن‌های پکتات لیاز از نماتد *G. rostochiensis*، قارچ‌ها و باکتری‌ها نشان داد که *VvPel1* تشابه زیادی با نماتد *G. rostochiensis* و قارچ‌ها داشته اما در مقایسه با باکتری‌ها، مارپیچ پیچیده کمتری دارد (Popeijus et al. 2000) (شکل ۴B).

SOPMA ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* توسط برنامه نیز مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شد که این آنزیم حاوی ۱۶ مارپیچ α (۰/۱۱/۱۹)، ۵۶ صفحه β (۰/۳۹/۱۶)، ۱۴ پیچ β (۰/۹/۷۹) و ۵۷ مارپیچ تصادفی (۰/۳۹/۸۶) می‌باشد (شکل ۴B). این نتایج با ساختار دوم توالی پلی‌پپتیدی *FaPelA* از توت‌فرنگی (*F. ananassa*) که حاوی ۸ مارپیچ α (۰/۵/۵۹)، ۵۶ صفحه β (۰/۳۹/۱۶) متصل شده توسط ۱۳ پیچ β (۰/۹/۰۹) و ۶۶ مارپیچ تصادفی (۰/۴۶/۱۵) و ژن *PtPel* از صنوبر (*Populus trichocarpa*) با ۹ مارپیچ α (۰/۶/۲۹)، ۵۶ صفحه β (۰/۳۹/۱۶) متصل شده توسط ۱۲ پیچ β (۰/۸/۳۹) و ۶۶ مارپیچ تصادفی (۰/۴۶/۱۵) تشابه زیادی را نشان داد



شکل ۳: بررسی شاخص TMHMM و شناسایی اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت در توالی پروتئینی *VvPel1*.

(A) بررسی دومین‌های غشایی توالی پروتئینی *VvPel1* با استفاده از شاخص TMHMM. توالی پروتئینی به دست آمده *VvPel1* با داشتن یک دومین غشایی می‌تواند به غشای پلاسمایی متصل شده و موجب تخریب دیواره سلولی شود. (B) شناسایی اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت و بررسی میزان حفاظت‌شدگی آن‌ها در طی تکامل. حفاظت‌شدگی اسیدهای آمینه از متغیر تا کاملاً حفظ شده به ترتیب از رنگ سبز تیره تا قرمز تیره نشان داده شده است. e: نشان دهنده یک اسیدآمینه قرار گرفته در معرض حلال، b: نمایانگر یک اسیدآمینه مخفی شده و دور از حلال، f: یک اسیدآمینه مهم از نظر فعالیت و s: یک اسیدآمینه مهم از نظر ساختاری

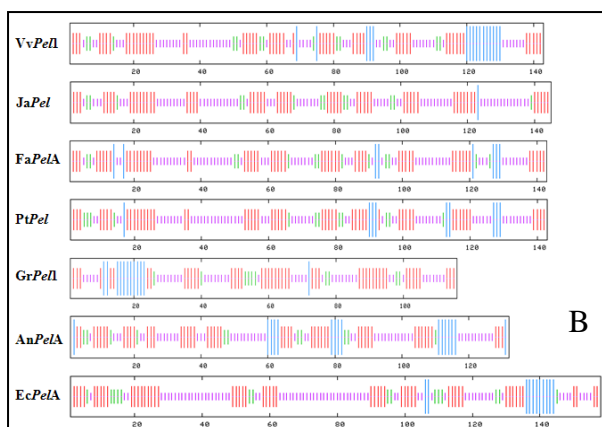
Figure 3: TMHMM index analysis and identification of functional and structural important residues in *VvPel1* deduced protein sequence. A) Analysis of membrane domains of *VvPel1* deduced protein sequence by TMHMM program. The *VvPel1* deduced protein sequence contains a membrane domain, binding to plasma membrane and modifying cell wall.

B) Identification of functional and structural important residues and conserved residue analysis of *VvPel1*. Residue conservation from variable to conserved is shown in green to dark red, respectively. e: An exposed residue according to the neural-network algorithm; b: A buried residue according to the neural-network algorithm, f: A predicted functional residue (highly conserved and exposed), s: A predicted structural residue (highly conserved and buried)

انتهای آمینوی صفحه β 9 قرار می‌گیرد (شکل ۵A). مدل روبان *VvPel1* به همراه موقعیت قرارگیری صفحات β ، مارپیچ α ، جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری و اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در واکنش با یون Ca^{+2} در شکل ۵B نمایش داده شده‌اند. اسیدهای آمینه باردار، آب‌دوست و آب-گریز و توزیع اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت به همراه سطح واندروالس در پروتئین *VvPel1* به ترتیب در شکل‌های ۵C و ۵D نشان داده شده‌اند. همچنین شکل ۵E موقعیت قرارگیری موتیف‌های ساختاری (I، II و III) در سطح پروتئین را نشان می‌دهد.

بررسی ساختار سوم توالی پروتئینی *VvPel1*

با استفاده از ژن *JaPel* به عنوان یک الگو برای مدل-سازی مقایسه‌ای، یک ساختار سه‌بعدی برای توالی پروتئینی *VvPel1* توسط برنامه I-TASSER مورد پیش‌بینی قرار گرفت. *VvPel1* مشابه با ساختار سه‌بعدی تمام توالی‌های پکتات لیاز از موجودات مختلف (Czerwinski et al. 2005; Xiao et al. 2008)، شامل ۹ صفحه کوچک β و یک مارپیچ α بوده که به شکل یک مارپیچ راست‌گرد با ۹ صفحه β مرکزی احاطه شده توسط یک مارپیچ α ، طوری در فضای سه‌بعدی آرایش می‌یابد که جایگاه فعال $R_{131}MPCR_{136}$ در



شکل ۴: بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* (A). ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* با استفاده از برنامه PSIPred. موتیف-های ساختاری I, II و III به ترتیب با رنگ‌های آبی، قرمز و سبز و اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال و اسیدهای آمینه آسپارات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} نیز به ترتیب با کادرهای مستطیلی و دایره‌ای شکل نشان داده شده‌اند. (B) ساختار دوم توالی پروتئینی *VvPel1* با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی‌های پکتات لیاز از موجودات دیگر. مارپیچ‌های α ، صفحات β ، پیچ‌های β و مارپیچ‌های تصادفی به ترتیب با خطوط آبی، قرمز، سبز و بنفش نشان داده شده‌اند

Figure 4: Analysis of secondary structure of *VvPel1* deduced protein sequence. A) The secondary structure of *VvPel1* deduced protein sequence by PSIPred program. The structural motifs of I, II, and III are indicated in blue, red, and green, respectively. The putative active site sequence and aspartate (Asp) residues involved in binding with Ca^{+2} are shown by rectangular and circular boxes. B) The secondary structure of *VvPel1* deduced protein sequence by SOPMA program and its comparison with pectate lyase sequences from other organisms. The α helix, β sheet, β turn, and coiled coil are indicated by blue, red, green, and purple lines, respectively

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی فیلوژنتیکی، توالی اسیدآمینه‌ای *VvPel1* با توالی‌های پلی‌پپتیدی پکتات لیاز از گیاهان مورد مقایسه قرار گرفت و نشان داده شد که توالی پروتئینی *VvPel1* شباهت زیادی را با گیاهانی از قبیل: کرچک (*RcPel*, *Ricinus communis*): ۹۶٪ یکسانی و ۹۸٪ شباهت، توت‌فرنگی (*FaPelA*, *F. ananassa*): ۹۶٪ یکسانی و ۹۸٪ شباهت، هلو (*PpPel*, *Prunus persica*): ۹۵٪ یکسانی و ۹۸٪ شباهت) و صنوبر (*PtPel*, *P. trichocarpa*): ۹۵٪ یکسانی و ۹۸٪ شباهت) دارد. میزان یکسانی و شباهت *VvPel1* با ژن *JaPel* از گیاه سرو که به عنوان یک الگو در مدل‌سازی مقایسه‌ای ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده *VvPel1* مورد استفاده قرار گرفت (Xiao et al. 2008)، به ترتیب برابر ۵۰٪ و ۶۸٪ می‌باشد. در بین توالی‌های پکتات لیاز گیاهی، ژن *VvPel1* بیش‌ترین تشابه را با پکتات لیازهای زیرگروه I و سپس توالی‌های زیرگروه II نشان می‌دهد. توالی پروتئینی *VvPel1* با توالی‌های پکتات لیاز از قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتد *G. rostochiensis* نیز مورد مقایسه قرار گرفت و نشان داده شد که بیش‌ترین تشابه را با قارچ‌ها (*AtPelC*, *Aspergillus terreus*): ۳۸٪ یکسانی و ۵۵٪ شباهت) و کم‌ترین تشابه را با نماتد *G. rostochiensis* (*GrPel1*): ۲۹٪ یکسانی و ۳۱٪ شباهت) دارد، (Popeijus et

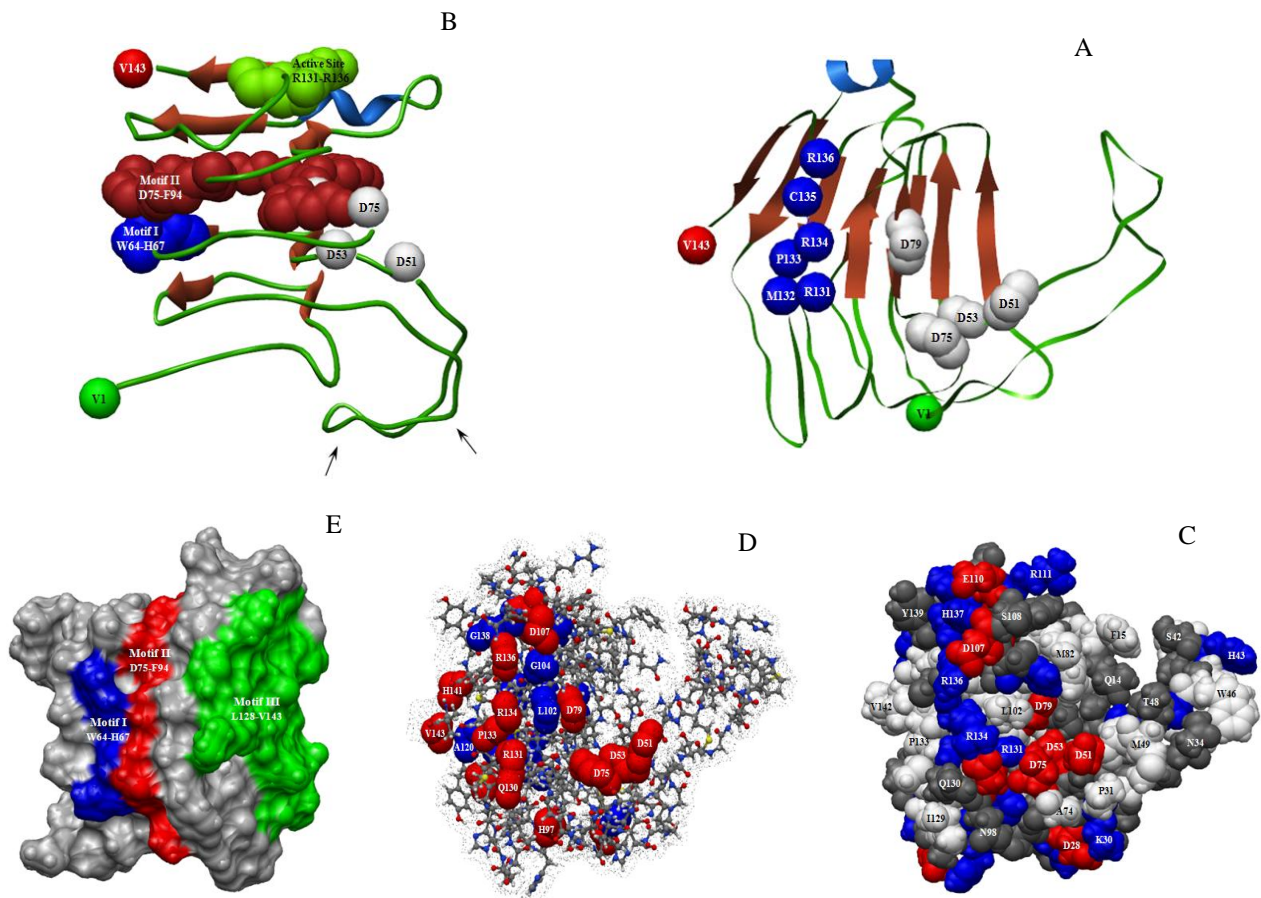
بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی ژن *VvPel1* با سایر ژن‌های پکتات لیاز از موجودات دیگر

بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئینی *VvPel1* با توالی-های پلی‌پپتیدی پکتات لیاز از موجودات مختلف با استفاده از نرم‌افزار Mega4 به روش Neighbor Joining نشان داد که درخت فیلوژنتیکی به دست آمده به سه گروه عمده شامل: گیاهان، باکتری‌ها-قارچ‌ها و نماتد تقسیم‌بندی شده؛ به طوری که گروه باکتری‌ها-قارچ‌ها خود شامل دو زیرگروه مجزا باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد (شکل ۶A). گروه پکتات لیازهای گیاهی به سه زیرگروه I, II و ژن *JaPel* تفکیک می-شود. زیرگروه I شامل یک شاخه از ژن *VvPel1* و سایر توالی‌های پکتات لیاز از گیاهان دولپه‌ای و یک شاخه از توالی‌های پکتات لیاز گیاهان تک‌لپه‌ای از قبیل: برنج (*Oryza sativa*, *OsPel*), ذرت خوشه‌ای (*Sorghum bicolor*, *SbPel*) و ذرت (*Zea mays*, *ZmPel*) می‌باشد. ژن *VvPel1* به همراه ژن‌های *FaPelA*, *FaPelB* و *RcPel* در زیرگروه I، یک زیرشاخه مجزا را تشکیل داده و به نظر می‌رسد که این ژن‌ها از یک جد مشترک مشتق شده باشند. نتایج به دست آمده از بررسی فیلوژنتیکی مشابه با تعدادی از پژوهش‌های موجود می‌باشد (Pua et al. 2001; Zhao et al. 2007).

همسانه‌سازی مولکولی، جداسازی و توصیف یک ژن پکتات لیا از ...

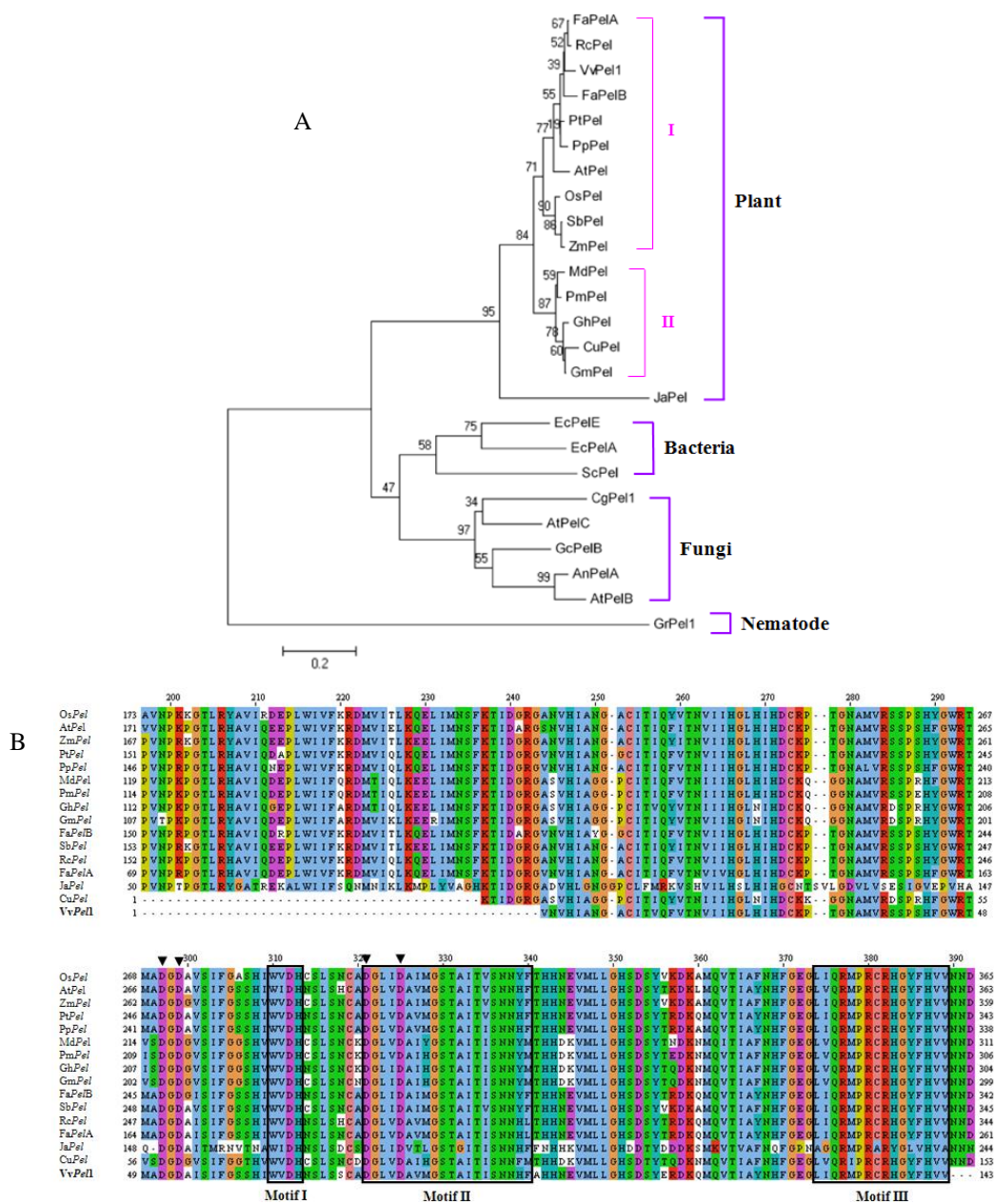
پکتات لیا از گیاهان، نواحی حفظ شده در طی تکامل را نشان می‌دهد (شکل ۵B).

(al. 2000). علاوه بر توالی جایگاه فعال، اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در واکنش با یون Ca^{+2} و موتیف‌های ساختاری، همدیف‌سازی چندگانه با سایر توالی‌های



شکل ۵: ساختار سوم توالی پروتئینی *VvPel1* (A). مدل روبان *VvPel1* به همراه مارپیچ α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده. اسیدآمینه والین آغازین (Val1)، اسیدآمینه والین پایانی (Val143)، اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال و اسیدهای آمینه آسپاراتات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} به ترتیب به شکل کره‌های سبز، قرمز، آبی و سفید نشان داده شده‌اند. (B) مدل روبان *VvPel1* و موقعیت قرارگیری مارپیچ α ، صفحات β ، جایگاه فعال، آسپاراتات‌های درگیر در واکنش با یون Ca^{+2} و موتیف‌های ساختاری I و II نسبت به هم در فضای سه‌بعدی. فلش‌ها بلندترین مارپیچ پیچیده بین صفحات $\beta 2$ و $\beta 3$ را نشان می‌دهند. (C) بررسی اسیدهای آمینه باردار (مثبت: آبی رنگ، منفی: قرمز رنگ)، آب‌دوست (خاکستری رنگ) و آب‌گریز (سفید رنگ) در پروتئین *VvPel1*. (D) بررسی اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری (آبی رنگ) و فعالیت (قرمز رنگ) به همراه ۱۰٪ سطح واندروالس در پروتئین *VvPel1*. (E) موقعیت قرارگیری موتیف‌های ساختاری در سطح پروتئین *VvPel1*. موتیف‌های ساختاری I، II و III به ترتیب با رنگ‌های آبی، قرمز و سبز نشان داده شده‌اند.

Figure 5: Three-dimensional models for *VvPel1* deduced protein sequence. A) Cartoon display of the three-dimensional structure of *VvPel1* with α -helix, β -sheets, and coiled coil regions. The initial valine (Val1) residue, end valine (Val143) residue, putative active site sequence, and aspartate (Asp) residues involved in binding with Ca^{+2} are shown by green, red, blue, and white spheres, respectively. B) Cartoon display of *VvPel1* and placement position of α -helix, β -sheets, putative active site sequence, aspartate (Asp) residues involved in binding with Ca^{+2} , and structural motifs of I and II. The longest of coiled coil between $\beta 2$ and $\beta 3$ sheets is indicated by narrows. C) Analysis of positively charged (blue), negatively charged (red), hydrophilic (gray), and hydrophobic (white) residues of *VvPel1*. D) Analysis of functional (red) and structural (blue) important residues of *VvPel1* as 10% of van der Waals. E) The placement position of structural motifs in *VvPel1* deduced protein sequence. The structural motifs of I, II, and III are indicated in blue, red, and green, respectively



شکل ۶: بررسی فیلوژنتیکی و هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی پروتئینی *VvPel1* با توالی‌های پروتئینی پکتات لیااز از موجودات دیگر. (A) بررسی فیلوژنتیکی *VvPel1* با توالی‌های پروتئینی پکتات لیااز از موجودات مختلف شامل: گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.1 Beta 2 به روش Neighbor Joining رسم گردید. (B) هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی پروتئینی *VvPel1* و توالی‌های پروتئینی پکتات لیااز از سایر گیاهان. توالی پروتئینی به دست آمده از *VvPel1* با توالی‌های پکتات لیااز گیاهی از زیرگروه‌های I و II با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 هم‌ردیف شدند. موتیف‌های ساختاری (I, II و III) و اسیدهای آمینه آسپارات درگیر در اتصال با یون Ca^{+2} به ترتیب با کادرهای سیاه رنگ و علامت‌های مثلث نشان داده شده‌اند. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در ساخت درخت فیلوژنتیکی و تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه در جدول ۱ آمده است

Figure 6: Phylogenetic analysis and multiple sequence alignment of *VvPel1* deduced protein sequence with pectate lyase protein sequences from other organisms. A) Phylogenetic analysis of *VvPel1* with pectate lyase protein sequences from different organisms including plants, fungi, bacteria, and nematode. The Neighbor Joining tree was constructed using MEGA4.1 Beta 2 software. B) Multiple sequence alignment of *VvPel1* deduced protein sequence and pectate lyase protein sequences from other plants. The protein sequence deduced from the *VvPel1* was aligned with plant pectate lyase protein sequences from subgroups I and II using the ClustalW2. The structural motifs (I, II, and III) and aspartate (Asp) residues involved in binding with Ca^{+2} are indicating by black boxes and triangles, respectively. Accession numbers of used protein sequences for construction of phylogenetic tree and multiple sequence alignment are given in Table 1

همسانه‌سازی مولکولی، جداسازی و توصیف یک ژن پکتات لیاز از ...

در این بررسی یک cDNA ناقص پکتات لیاز، تحت عنوان *VvPel1*، از بافت حبه گیاه انگور (*V. vinifera*) یک رقم ایرانی (بیدانه سفید) با استفاده از واکنش Reverse Transcriptase-PCR جداسازی و همسانه‌سازی گردیده و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از بررسی‌های مدل سازی ساختاری نشان داده شد که *VvPel1* از نظر ساختارهای دوم و سوم مشابه با سایر توالی‌های پکتات لیاز از موجودات دیگر بوده و بررسی‌های همولوژی و فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن شباهت بالایی با

توالی‌های پروتئینی پکتات لیاز گیاهان دیگر داشته و به زیرگروه I پکتات لیازهای گیاهی تعلق دارد. با توجه به تنوع و دخالت پکتات لیاز در فرآیند سوخت و ساز سلولی، جداسازی، شناسایی، بررسی فعالیت کاتالیتیکی و بیان آن‌ها در سطوح RNA و پروتئین در دوره زایشی به ویژه در سایر میوه‌ها، توصیه شده تا بتوان دیدگاه مناسبی از این آنزیم به دست آورده و اطلاعات به دست آمده را بهبود بخشید. ممکن است در آینده بتوان با دگرگونی ژنی، طول مدت مرحله رسیدگی و اضمحلال سلول را بهبود بخشید.

Molecular Cloning, Isolation and Characterization of a Pectate Lyase Gene from Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) Berry Tissue

Haddad^{1*}, R., Moosavi³, S. S., Garoosi², Gh., Hoseini², R., and Heidari Japelaghi³, R.

Abstract

One of the important activities of the plant cell on the life cycle is to promote genes and enzymes involved in degradation of the storage components at the beginning of the fruit formation. Based on the researches, different enzymes take part in the cell wall modification and fruit tissue softening. Pectate lyase is one of the most important enzymes involved in such activities. Partial cDNA of a pectate lyase gene was isolated from grape (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) berry tissue by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and then was cloned into a pUC19 plasmid. Then, molecular structure, biochemical and phylogenetic characteristics were analyzed. Nucleotide sequence of the gene, called *VvPel1*, revealed a 429 bp long, encoding a protein of 143 amino acid residues. The calculated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 15.78 and 6.53 kDa, respectively. Analysis of secondary and three dimensional structures of the deduced polypeptide sequence for *VvPel1* was shown that *VvPel1* is similar to those of previously reported pectate lyase proteins from other organisms. The deduced protein sequence was indicated a high similarity to pectate lyases isolated from plants such as *Ricinus communis*, *Fragaria ananassa*, *Prunus persica*, and *Populus trichocarpa*. Phylogenetic study was also demonstrated that *VvPel1* gene belongs to the subgroup I of plant pectate lyases.

Keywords: Grape, Pectate lyase, Softening, Cell wall, Cloning

References

- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. and Ben-Tal, N. 2010. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. http://nar.oxfordjournals.org/content/38/suppl_2/W529.abstract.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. and Miyano, S. 2002. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18(2): 298–305.
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C. and Pellerin, P. 2000. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry* 38(4): 289–300.
- Benitez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevaldo, J., Bellido, M. L., Moyano, E., Caballero, J. L. and Munoz-Blanco, J. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* 54(383): 633–645.
- Briesemeister, S., Rahnenführer, J. and Kohlbacher, O. 2010. Going from where to why-interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics* 26(9): 1232–8.
- Czerwinski, E. W., Midoro-Horiuti, T., White, M. A., Brooks, E. G. and Goldblum, R. M. 2005. Crystal structure of jun a 1, the major cedar pollen allergen from *Juniperus ashei*, reveals a parallel β -helical core. *Journal of Biology and Chemistry* 280(5): 3740–3746.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Von Heijne, G. and Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protein* 2: 953–971.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–91.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Geourjon, C. and Deleage, G. 1995. SOPMA: significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Cabios* 11: 681–684.
- Heidari Japelaghi, R., Haddad, R., and Garoosi, G. A. 2011. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology* 49: 129–137.
- Jimenez-Bermudez, S., Redondo-Nevaldo, J., Munoz-Blanco, J., Caballero, J. L., Lopez-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. and Mercado, J. A. 2002. Manipulation of strawberry fruits softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* 128: 751–759.

¹, ² and ³. Associate Professor, Assistant Professors and Graduate Students respectively, Department of Agricultural Biotechnology, Technical and Engineering Faculty, Imam Khomeini International University, Qazvin

*: Corresponding author E-mail: raheemhaddad@ikiu.ac.ir

- Kim, Y. J., Shim, J. S., Krishna, P. R., Kim, S. Y., In, J. G., Kim, M. K. and Kim, D. C. 2008. Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Molecular Biology Report* 26: 335–349.
- Kudla, U., Milac, A. L., Qin, L., Overmars, H., Roze, E., Holterman, M., Petrescu, A. J., Goverse, A., Bakker, J., Helder, J. and Smant, G. 2007. Structural and functional characterization of a novel, host penetration-related pectate lyase from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant Pathology* 8(3): 293–305.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal Molecular Biology* 157: 105–32.
- Nimrod, G., Schushan, M., Steinberg, D. M. and Ben-Tal, N. 2008. Detection of functionally important regions in hypothetical proteins of known structure. *Structure* 16: 1755–1763.
- Nunan, K. J., Davies, C., Robinson, S. P. and Fincher, G. B. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214: 257–264.
- Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., Schots, A., Bakker, J. and Smant, G. 2000. Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* 406: 36–37.
- Pua, E. C., Ong, C. K., Liu, P. and Liu, J. Z. 2001. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). *Physiologia Plantarum* 113(1): 92–99.
- Rychlik, W. 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in Molecular Biology* 402: 35-59.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol:1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Seymour, G. B. and Gross, K. C. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharv News Information* 7: 45N–52N.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596–1599.
- Truong, L. V., Tuyen, H., Helmke, E., Binh, L. T. and Schweder, T. 2001. Cloning of two pectate lyase genes from the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain ANT/505 and characterization of the enzymes. *Extremophiles* 5: 35–44.
- Xiao, Z., Bergeron, H., Grosse, S., Beauchemin, M., Garron, M. L., Shaya, D., Sulea, T., Cygler, M. and Lau, P. C. K. 2008. Improvement of the thermostability and activity of a pectate lyase by single amino acid substitutions, using a strategy based on melting-temperature-guided sequence alignment. *Applied Environ Microbiology* 74(4): 1183–1189.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40.
- Zhao, Q., Yuan, S., Zhang, Y., Zhu, H., Dai, C., Yang, F. and Han, F. 2007. Expression, purification and characterization of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1057–1064.