

همسانه سازی cDNA و بررسی بیان ژن، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ساختارهای عملکردی آنزیم های بتاگالاکتوزیداز در میوه گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum* cv. Falcato)

cDNA Cloning and Investigating Gene Expression, Physicochemical Characteristics and Functional Structures of β -galactosidase Enzymes of Tomato Fruit (*Lycopersicum esculentum* cv. Falcato)

علیرضا قنادسبزواری^۱ و رامین حسینی^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۰۶

چکیده

بتاگالاکتوزیدازها در بسیاری از فرآیندهای مرتبط با رشدونمو گیاه شرکت نموده و به عنوان آنزیم های کلیدی در نرمی وابسته به رسیدگی میوه های گوشتی معرفی شده اند. در این مطالعه، طول کامل شش cDNA رمزکننده آنزیم های بتاگالاکتوزیداز (نام گذاری شده STBG2-7) از بافت میوه گوجه فرنگی رقم فالكاتو (Falcato) همسانه سازی و سطوح بیان و توالی اسید آمینه مربوط به آنها بررسی گردیدند. با هم ردیفی توالی های پروتئینی منتج از STBG2-7، دو نیمه بسیار حفاظت شده و کم حفاظت شده در این آنزیم ها شناسایی گردیده و براساس خصوصیات نیمه های کم حفاظت شده و یافته های آزمایش های اخیر پیشنهاد گردید که عملکردهای افتراقی این آنزوفرم ها مرتبط با این نیمه های کم حفاظت شده می باشند، که این نیمه های کم حفاظت شده با زیرواحدهای کوچک بتاگالاکتوزیدازهای هتروداایمر متناظر می باشند و با دو باقیمانده Trp و Glu کاملاً حفاظت شده آغاز می گردند.

واژه های کلیدی: RT-PCR، PCR نیمه کمی، تکنیک RACE، دمین لکتین، پروتئین

۱. کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۲. استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

* نویسنده مسؤول Email: raminh_2001@yahoo.com

این مقاله خلاصه ای از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده نخست می باشد که با راهنمایی نویسنده دوم در دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین به انجام رسیده است.

مقدمه

بتاگالاکتوزیدازها (EC3.2.1.23) خانواده‌ای وسیع از گلاکتوزیل هیدرولازها هستند که قادرند باقیمانده‌های بتا-دی-گالاکتوزیل انتهایی را از پلیمرهای بتا-دی-گالاکتوزید هیدرولیز نمایند مونیکی و همکاران (Mwaniki et al., 2005). گلاکتوزیل هیدرولازها براساس شباهت‌های ساختاری به خانواده‌هایی تقسیم‌بندی شده‌اند هنریست (Henrissat, 1991) که از این میان خانواده‌های ۱، ۲، ۳۵ و ۴۲ به بتاگالاکتوزیدازها تعلق دارند و براساس شباهت‌های توالی اسیدآمینه، بتاگالاکتوزیدازهای گیاهی متعلق به خانواده ۳۵ با جایگاه فعال توافقی G-G-P-[LIVM]-x-x-Q-x-E-N-E-[FY] می‌باشند هنریست (1998)، هنریست و بایروچ (Henrissat and Bairoch, 1993).

براساس نوع عملکرد، بتاگالاکتوزیدازهای گیاهی را می‌توان دست کم به دو زیرگروه تقسیم نمود. زیرگروه I آنزیم‌هایی با خصوصیات اگزو-بتا-گالاکتانازی هستند که به‌طور ویژه اتصالات بتا-(۱-۴)-گالاکتان را هدف قرار می‌دهند و نشان داده‌اند که در هیدرولیز پکتین‌ها و اگزیلوگلوکان‌ها نقش دارند. زیرگروه II آنزیم‌هایی با توانایی هیدرولیز پنیتروفیل-بتا-گالاکتوزید و اتصالات بتا-(۱-۳) و بتا-(۱-۶) باقیمانده‌های گالاکتوزیل هستند و نشان داده‌اند که در هیدرولیز زنجیره‌های هیدرات کربنی پروتئین‌هایی نظیر آرابینوگالاکتان شرکت دارند کری و همکاران، کوتیک و همکاران، ایگلزیاس و همکاران، تانتانچ و همکاران (Carey et al., 1995, Kotake et al., 2005, Iglesias et al., 2006, Tanthanuch et al., 2008). عملکرد اختصاصی بتاگالاکتوزیدازها و تنوع در سوبسترای آنها سبب شده تا این آنزیم‌ها در سطوح مختلف گیاه و در مراحل رشدی مختلف عملکردهای متفاوتی را از خود به نمایش بگذارند. برخی از این اعمال عبارتند از: آزادسازی انرژی ذخیره‌شده برای رشد سریع و فراهم‌سازی گالاکتوز آزاد در طول چرخه سوخت‌وساز گالاکتولیپیدها، گلیکو پروتئین‌ها و ترکیبات دیواره سلولی رز و همکاران (Ross et al., 1994)، ریتیر و ونزین (Reiter and Vanzin 2001)، دی آلکانتارا و همکاران (De Alcantara et al., 1999 and 2006)، شرکت در تقسیم و تولیدسازی سلول‌ها به‌ویژه در اندام‌های با نرخ رشد بالا/استبان و همکاران (Esteban et al., 2003 and 2005)، شرکت در توسعه و رشد لوله کرده روگرس و همکاران، گوگرس و همکاران (Rogers et al., 2001, Gogers et al., 2001)، بالغ‌سازی ترکیبات ژلاتینی احاطه‌کننده بذر مکویت و همکاران (Macquet et al., 2007)، شرکت در فرآیندهای

رشدونمو اولیه و همچنین شرکت در فرآیندهای درگیر در پیری و ریزش اندام‌ها/استبان و همکاران (2005)، وو و برنس (WU and Burns 2004). در این میان یکی از برجسته‌ترین اعمال این آنزیم‌ها شرکت در تغییرات دیواره سلولی است. در میوه‌های گوشتی، تغییرات دیواره سلولی در مراحل اولیه رشد به توسعه میوه کمک نموده و در اواخر رشد منجر به نرمی میوه در حین رسیدگی و پس از آن می‌گردد. از آن‌جا که استحکام و ماندگاری پس از برداشت در میوه‌های گوشتی بسیار حائز اهمیت است، مطالعات گسترده‌ای روی عوامل دخیل در نرمی میوه‌های گوشتی از جمله گوجه‌فرنگی صورت گرفته و آنزیم‌های بتاگالاکتوزیداز به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در نرمی وابسته با رسیدگی معرفی شده‌اند برومل و هارپرستر، تاتشی و همکاران، لازان و همکاران (Brummell and Harpster, 2001, Tateishi et al., 2001, Lazan et al., 2004). در میوه گوجه‌فرنگی رقم روتگرس یک خانواده متشکل از هفت cDNA رمزکننده بتاگالاکتوزیداز شناسایی شده است/سمیت و گروس (Smith and Gross 2000) و مطالعه برخی از این آیزوفرما نشان داده است که آنها علی‌رغم شباهت‌هایی که به یکدیگر دارند نقش‌های کاملاً متفاوتی را در طول رشد و رسیدگی میوه دارند کری و همکاران (2001)، موکتزوم و همکاران،/سمیت و همکاران (Moctezuma et al., 2002, Smith et al., 2003). اگرچه عملکردهای متفاوت اعضای خانواده بتاگالاکتوزیداز در بسیاری از گیاهان مشاهده شده است/استبان و همکاران (2005)، مونیکی و همکاران (2005)، تاتشی و همکاران (2007) اما این مهم که چه خصوصیتی در این آیزوفرما سبب گزینش سوبسترای متفاوت و در نتیجه بروز عملکردی متفاوت می‌شود هنوز در پرده‌ای از ابهام باقی مانده است.

در این مطالعه توالی کامل شش cDNA رمزکننده آنزیم‌های بتاگالاکتوزیداز در گوجه‌فرنگی رقم فالتکو، که یک رقم گلخانه‌ای رایج در ایران می‌باشد، همسازسازی گردید و سطوح بیان و توالی اسیدآمینه مربوط به آنها با آیزوفرماهای متناظرشان در رقم روتگرس مقایسه و تفاوت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جداسازی RNA کل

تعداد ۹ نمونه از بافت میوه گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum* L. cv. Falcato)، شامل سه تکرار از سه مرحله رشدی ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی (۱۰dpp)، آغاز تغییر رنگ از سبز به قرمز (Turning) و قرمز رسیده (Red-ripe)، از سه

همسانه سازی طول کامل cDNA

براساس توالی های انتهای ۵' ناحیه رمزکننده هفت cDNA بتاگالاکتوزیداز در گوجه فرنگی رقم روتگرس (با نام های TBG1-7 و شماره های دستیابی AF023847, AF154420, AF154421, AF154423, AF020390, AF154424 و AF154422 در بانک ژن NCBI) آغازگرهای اختصاصی ژن-های بتاگالاکتوزیداز طراحی گردیدند. به انتهای ۵' هر آغازگر، توالی یک جایگاه شناسایی آنزیم برشی و ۴ تا ۵ نوکلئوتید اضافی افزوده گردید (جدول ۱). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ μl حاوی (۸/۸ pH): mM Tris-HCl ۲۰، mM Triton X- ۲، mM MgSO₄ ۱۰، mM KCl ۱۰، (NH₄)₂SO₄ ۱۰۰٪، ۰/۱ mg/ml BSA، ۵۰۰ μM از هر dNTP، ۵۰ از هر آغازگر (رفت و برگشت)، ng cDNA ۱۰۰ به دست آمده از میوه های ۱۰ dpp و ۱/۲۵ واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط یک دستگاه ترموسایکلر (Techne-TC512، انگلستان) با برنامه دمایی به شرح ذیل انجام شد. یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشتگی در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای مناسب (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۱/۵ دقیقه، و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات RT-PCR روی ژل آگارز ۰/۷٪ الکتروفورز گردیدند. سپس قطعات تکثیر شده با طول مورد انتظار (جدول ۱) از ژل بریده شده و با استفاده از کیت AccuPrep Gel Purification (Bioneer) خالص سازی شدند. قطعات خالص سازی شده و ناقل پلاسمیدی pTZ19R (Fermentas) توسط آنزیم های برشی (Fermentas) مربوطه (جدول ۱) هضم گردیدند و واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) انجام گرفت. محصولات واکنش به طور مستقیم و با استفاده از روش شوک حرارتی برای تراریختی سلول های مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α مورد استفاده قرار گرفتند. سلول های تراریخته *E. coli* روی محیط کشت جامد SOB آغشته به آنتی بیوتیک آمپی-سیلین، IPTG و X-gal غربال شدند و پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش محلول قلیایی و SDS بیرن بوم و دولای (Birnbom and Doly 1979) از سلول های تراریخته استخراج گردیدند. سپس محصولات RT-PCR همسانه سازی شده، با روش توالی یابی Dideoxynucleotide توسط شرکت Sequence Laboratories Gottingen آلمان توالی یابی شدند. همچنین، توالی های غیر رمزکننده در پایانه های این

بوته جمع آوری گردیدند. نمونه ها بلافاصله پس از جداسازی میوه از گیاه، در اندازه های کوچک بریده و پس از بسته بندی با فویل آلومینیوم در نیتروژن مایع انداخته شدند و سپس به فریزر ۸۰ °C- منتقل گردیدند.

به منظور استخراج RNA، بافر استخراج (SDS ۱٪، mM EDTA ۱۰، pH=۸ Tris-HCl ۰/۱ M، LiCl ۰/۱ M) در حمام آب ۸۰ °C قرار داده شد. سپس به هر تیوب ۲ ml، حدود ۰/۱ گرم بافت پودر شده منجمد و ۹۰۰ μl بافر استخراج اضافه گردید و تیوب ها به مدت ۱ دقیقه ورتکس شدند. به هر تیوب ۱ μ ۴۰۰ فنول اسیدی (۴/۵ pH) و ۵۰۰ μl کلروفرم: ایزوآمیل-الکل (۲۴ : ۱) افزوده شد. تیوب ها به مدت ۱ دقیقه ورتکس و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن، کلروفرم : ایزوآمیل الکل (۲۴ : ۱) افزوده گردید. سپس تیوب ها ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. مجدداً فاز رویی به تیوب جدید منتقل و به هر تیوب ۰/۳ حجم، لیتیم کلراید ۸ M اضافه گردید. سپس تیوب ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ °C- قرار داده و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل در ۲۵۰ μl آب عاری از RNase حل شد. به هر تیوب ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ M (۲/۵ pH) و سپس ۲ حجم اتانول خالص افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰ °C- قرار داده شد. پس از آن تیوب ها به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل توسط اتانول (۷۰/۷۰ v/v) شستشو و سپس در ۳۰ μl آب مقطر استریل عاری از RNase حل و در دمای ۸۰ °C- نگهداری گردید.

سنتز رشته نخست cDNA

ابتدا ۵ μg از محلول RNA کل به همراه ۰/۵ μg از (Fermentas) Oligo(dT)₁₈ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C تیمار و سپس بر روی یخ قرار داده شد. در ادامه، ۴ μl بافر واکنش ۵X، ۲ μl مخلوط (۱۰ mM) dNTP و ۲ μl آنزیم نسخه بردار معکوس (Fermentas) M-MuLV (۲۰ u/μl)، به هر تیوب اضافه شدند و مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ μl به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C تیمار گردید. در نهایت غیرفعال سازی آنزیم نسخه بردار معکوس در دمای ۷۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

cDNA های کلون شده، از طریق تکثیر سریع دو انتهای cDNA (RACE) با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن ها، شامل *FSTBG2*، *RSTBG2*، *FSTBG3*، *RSTBG3*، *FSTBG4*، *RSTBG4*، *FSTBG5*، *RSTBG5*، *FSTBG6*، *RSTBG6*، *FSTBG7*، *RSTBG7* به ترتیب با توالی های *ACCAGAAATGCACTTGCAGTGTGAC*

CTCGATGACATCTGCACCACCTTC، *CGTGCCTCTCTGGTCAGAAGATTA*، *TCAGCAGAAGCATAAGGTCCAATC*، *CCTTCTCAGAGATGGCACCATGTTC*، *CCAGGAGAAGGCTCATGTCCATTC*، *GTCGATGCAGTAGCAGCAATGCTCT*، *CTTCTCCTTCCGTCAACAACCAATG*، *CCCAAAGTTCGCATTCATCTGTGCTC*، *CTTCCCACATCTCAGGGGTACTTC*، *CCTAATGGTACATGTGGCTCCTACATGCTAG*، *AGGATAGTGAATGGAAGCGGAGATG*

و کیت *GeneRacer* (Invitrogen) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به دست آمدند.

بررسی الگوی بیان زمانی آیزوفرم های بتاگالاکتوزیداز
سطوح بیان آیزوفرم های بتاگالاکتوزیداز در مراحل مختلف رشد میوه، با به کارگیری تکنیک RT-PCR نیمه کمی بررسی گردیدند. به این منظور رشته های نخست cDNA با به کارگیری RNA های به دست آمده از سه مرحله رشدی میوه شامل dpp ۱۰، Turning و Red-ripe تهیه گردیدند. سپس PCR با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن های بتاگالاکتوزیداز (جدول ۱) و کیت PCR Master Mix 2X (Fermentas) اجرا گردید. همچنین آغازگرهای اختصاصی ژن اکتین گوجه فرنگی (شماره دستیابی SLU60482)، به عنوان یک ژن مرجع برای نرمال سازی بیان ژن های بتاگالاکتوزیداز، در PCR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). پنج میکرولیتر از محصولات RT-PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با غوطه وری در محلول اتیدیوم-بروماید (۱ μg/ml) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس شدت باندهای حاصله با به کارگیری نرم افزار (W.S. ImageJ; Rasband; 1997-2007; National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) اندازه گیری و براساس آن نرمال سازی بیان ژن های بتاگالاکتوزیداز نسبت به ژن اکتین صورت گرفت.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای به کار گرفته شده در RT-PCR و طول مورد انتظار محصول. در هر آغازگر، حروف بزرگ نمایانگر توالی اختصاصی ژن، حروف کوچک ضخیم نمایانگر جایگاه شناسایی آنزیم محدودگر و حروف کوچک نمایانگر نوکلئوتیدهای اضافی می باشند

Table 1: Specifications of the primers used in RT-PCR, and the expected length of amplicon. In the primer sequences, the capital letters show the gene-specific sequence, the small bold letters show the recognition site of restriction enzyme, and the small letters show the extra nucleotides

ژن	آغازگر	توالی (۵'→۳')	آنزیم برشی	دمای اتصال	اندازه محصول
Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Restriction enzyme	Annealing (°C)	Length of amplicon(pb)
TBG1	Forward	tgatc gagctc ATGGGTTTTTGGATGGCAATGT	<i>Sac</i> I	52-62	2507
	Reverse	tgatc gagctc TCAACTACAAATGGCTTCCAC			
TBG2	Forward	gtatc ctaga ATGGTAGAAGCTATGAGCA	<i>Xba</i> I	59.5	2678
	Reverse	gtatc ctaga TCACGAGGAAGCTGAAGT			
TBG3	Forward	tgatc gagctc ATGGGTTGTACGCTTATACTA	<i>Sac</i> I	62	2516
	Reverse	tgatc gagctc TCAACTGCAAATAACCTCAACT			
TBG4	Forward	gatc gagctc ATGCTAAGGACTAATGTGTTG	<i>Sac</i> I	60	2174
	Reverse	gact gagctc TTATCTTGATCTCCTGACTAG			
TBG5	Forward	agtc gagctc ATGGAAAGAAGAAGTGGGTAT	<i>Sac</i> I	62	2558
	Reverse	agtc gagctc GAGGCATCATGTACAAGAAG			
TBG6	Forward	gact ggatcc ATGGAGGTTAACTCACTTCAG	<i>Bam</i> H I	62	2538
	Reverse	agtc ggatcc TCAATTCTGAGTAGGTGTAC			
TBG7	Forward	agtc ggatcc ATGAACACAATGAGTTGTTT	<i>Bam</i> H I	62	2612
	Reverse	agatc ggatcc TCAGCTGCAATTCACCTTC			
Actin	Forward	TATCCGATTGAACATGGTATTG	-----	62	546
	Reverse	AATGGTGATAACCTGTCCATC			

پیوستگی متشکل از ۱۹ اگزون و ۱۸ اینترون دارند. این الگو به عنوان یک الگوی اجدادی شناخته شده است و پیشنهاد گردیده که دیگر الگوها، عمدتاً به واسطه فقدان اینترون، از آن مشتق شده اند (Ahn et al., 2007). ترجمه cDNAهای همسانه سازی شده به توالی های اسید آمینه نشان داد که آنها طول کاملی از پروتئین های بتاگالاکتوزیداز را با خصوصیات فیزیکی شیمیایی ارائه شده در جدول ۲ رمز می نمایند. محاسبه ارزش هیدروپاتی به روش کیت و دولیتل (Kyte and Doolittle, 1982) نشان داد که این پروتئین ها با شدت تقریباً برابری آب دوست هستند (جدول ۲)، در عین حال، برنامه های SignalP و iPSORT نشان دادند که این پروتئین ها در پایانه N خود دارای یک پپتید سیگنال آب گریز می باشند (شکل ۱). محاسبه شاخص آلفاتیک به عنوان یک فاکتور مثبت در مقاومت به حرارت نشان داد که تمامی این پروتئین ها به طور مشابهی از مقاومت حرارتی برخوردار می باشند (جدول ۲). بررسی تعداد اسید آمینه ها آشکار ساخت که پروتئین رمز شده توسط آیزوفرم STBG4 به طور قابل توجهی کوچک تر از پروتئین های رمز شده توسط دیگر آیزوفرم ها می باشد (جدول ۲). تجزیه و تحلیل توالی های پروتئینی توسط PROSITE علت اندازه کوچک تر پروتئین رمز شده توسط STBG4 را مشخص کرد. به طور قابل توجهی تمامی پروتئین ها، به جز پروتئین منتج از STBG4، در پایانه C خود دارای یک دمین مشابه لکترین تخم جوجه تیغی دریایی بودند (شکل ۱). هم ردیفی دمین های مشابه لکترین تخم جوجه تیغی دریایی، برگرفته شده از STBG2,3,5,6,7 و گونه های جانوری متفاوت، نشان داد که در همه این دمین ها هفت باقیمانده سیستمین کاملاً حفاظت شده اند (شکل ۲). این نوع از حفاظت شدگی در دمین های مشابه لکترین تخم جوجه تیغی دریایی موجود در TBG1,2,3,5,6,7 نیز مشاهده گردید. این در حالیکه لکترین های گیاهی شناخته شده ساختار کاملاً متفاوتی دارند؛ به طور مثال، لکترین نخود عاری از باقیمانده های سیستمین می باشد (Kardailsky et al., 1996). شباهت لکترین تخم جوجه تیغی دریایی با دیگر لکترین های جانوری بیانگر وجود یک الگوی لکترین جانوری در آنزیم های بتاگالاکتوزیداز گوجه فرنگی است.

نرم افزارهای بیواینفورماتیکی به کار گرفته شده در آنالیز

توالی های پروتئینی

پپتیدهای سیگنال با به کارگیری برنامه های signalP V3.0 بندسن و همکاران (Bendtsen et al., 2004) و iPSORT بانایی و همکاران (Bannai et al., 2002) مشخص گردیدند. دمین ها و نواحی عملکردی پروتئین ها توسط داده پایگاه PROSITE دی کسترو و همکاران (De Castro et al., 2006) شناسایی شدند. خصوصیات فیزیکی شیمیایی پروتئین ها توسط نرم افزار ProtParam گاستیگر و همکاران (Gasteiger et al., 2005) بررسی گردید. ساختارهای دوم پروتئین با برنامه های PHD روست و ساندر (Rost and Sander, 1993) و SOPMA جئورجون و دلیج (Geourjon and Deleage, 1995) پیش بینی شدند و هم ردیفی چندتایی توالی های پروتئینی توسط برنامه ClustalW تامپسون و همکاران (Thompson et al., 1994) انجام شد.

نتایج و بحث

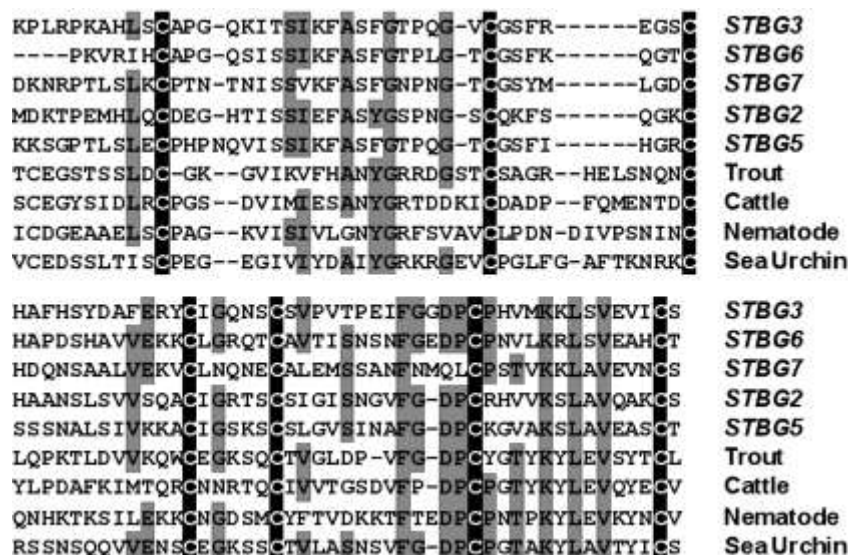
توالی های نوکلئوتیدی و پلی پپتیدی cDNAهای همسانه سازی شده

بر اساس توالی cDNA های رمز کننده هفت بتاگالاکتوزیداز در گوجه فرنگی رقم روتگرس (TBG1-7) و روش RACE-PCR طول کامل شش cDNA رمز کننده آنزیم های بتاگالاکتوزیداز (آیزوفرم های متناظر با TBG2-7) از میوه گوجه فرنگی رقم فالکاتو همسانه سازی شدند. cDNA های همسانه سازی شده، STBG2-7 نام گذاری شدند و با شماره های HM627532، HM627533، HM627534، HM627535، HM627536 و HM627537 در بانک ژن NCBI در دسترس قرار گرفتند. STBG2 تا STBG7 به ترتیب طولی معادل ۲۹۹۶، ۳۰۵۲، ۲۶۳۰، ۲۸۲۳، ۳۰۹۲ و ۳۰۱۲ جفت باز را داشتند و به ترتیب یک قالب خوانش باز متشکل از ۲۶۷۹، ۲۵۱۷، ۲۱۷۵، ۲۵۵۹، ۲۵۳۸ و ۲۶۱۳ جفت باز را شامل شدند. مقایسه این cDNA ها با DNA ژنومی متناظرشان، برگرفته شده از شبکه ژنومیکس گوجه فرنگی بامبیرلی و همکاران (Bombarely et al., 2011)، نشان داد که به جز STBG4 که یک الگوی پیوستگی متشکل از ۱۸ اگزون و ۱۷ اینترون دارد بقیه این آیزوفرم ها یک الگوی



شکل ۱: هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی منتج از STBG2-7 و توالی‌های پایانه N از زیرواحدهای کوچک بتاگالاکتوزیدازهای هتروداایمر خرمالو و جو. حروف سایه‌دار، باقیمانده‌های حفاظت‌شده را نمایش می‌دهند. اسیدآمیندهای حفاظت‌شده در جایگاه فعال مفروض خانواده ۳۵ گلایکوزیل هیدرولازها توسط حروف سفید روی پس‌زمینه سیاه نشان داده شده‌اند. حروف آبی‌رنگ جایگاه‌های N- گلایکوزیل‌اسیون بالقوه (N-X-S/T) را نمایش می‌دهند. توالی‌های قرمز رنگ، توالی‌های کوتاه حفاظت‌نشده بین نیمه‌های انتهایی N و C را نشان می‌دهند. توالی‌های زیر خط‌دار در پایانه‌های N و C به ترتیب پپتیدهای سیگنال و دمین‌های مشابه لکتین تخم جوجه تیغی دریایی را نشان می‌دهند. توالی زیر خط‌دار در بخش میانی STBG2 محدوده پلی‌پپتید متفاوت در پروتئین‌های منتج شده از STBG2 و TBG2 را نشان می‌دهد

Fig. 1: Alignment of the protein sequences resulted from STBG2-7 and the N-terminal sequences of the small subunits of the heterodimeric persimmon and barley β -galactosidases. The conserved residues are shaded. The conserved residues in the putative active sites of the glycosyl hydrolases family 35 are shown by white letters on a black background. The blue letters show the potential N-glycosylation sites (N-X-S/T). The red sequences show the non-conserved short sequences between the N- and C-terminal halves. The underlined sequences in the N- and C-terminals show the signal peptides and the sea urchin egg lectin like domains, respectively. The underlined sequence in the middle part of STBG2 shows the different polypeptide in the proteins resulted from TBG2 and STBG



شکل ۲: هم‌ردیفی دامین‌های لکتین، به‌دست آمده از STBG2-7، ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss* - accession No. BAA92255)، گاو (*Bos taurus* - No. AAD05309)، نماتود (*Caenorhabditis elegans* - No. CAA91091) و جوجه‌تیغی‌دریایی (*Anthocidaris crassispina* - No. P22031). اسیدآمین‌های سیستمین حفاظت‌شده توسط حروف سفید روی پس‌زمینه سیاه نشان داده شده‌اند. اسیدآمین‌های سایه‌دار، دیگر باقیمانده‌های یکسان را نشان می‌دهند

Fig. 2: Alignment of the lectin domains from STBG2-7, Trout (*Oncorhynchus mykiss* - accession No. BAA92255), Cattle (*Bos taurus* - No. AAD05309), Nematode (*Caenorhabditis elegans* - No. CAA91091), and Sea urchin (*Anthocidaris crassispina* - No. P22031). The conserved cysteine residues are shown by white letters on a black background. The shaded residues show the other identical residues

جدول ۲: خصوصیات فیزیکوشیمیایی توالی‌های پروتئینی منتج شده از STBG2-7

Table 2: The physicochemical characteristics of the protein sequences resulted from STBG2-7

آیزوفرْم	تعداد اسیدآمین‌ها	جرم مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	ارزش هیدروپاتی	شاخص آلیفاتیک
Isoform	Number of amino acids	Molecular mass (KD)	Isoelectric point	Hydropathy value	Aliphatic index
STBG2	892	99.82	6.24	-0.27	75.54
STBG3	838	92.93	8.55	-0.20	76.00
STBG4	724	80.45	9.05	-0.31	75.25
STBG5	852	93.21	6.80	-0.22	74.74
STBG6	845	94.07	6.67	-0.26	75.33
STBG7	870	97.00	8.38	-0.28	70.62

سولیس و همکاران، دیویدی و همکاران (Tello-Solís et al., 2005, Dwevedi et al., 2010). بنابراین مشاهده نقاط ایزوالکتریک بسیار متفاوت در این آیزوفرْم‌ها نشان می‌دهد که آن‌ها برای موقعیت‌های خاصی تکامل یافته‌اند و نمی‌توانند در همه نقاط یک گیاه پایدار یا فعال باشند. از این‌رو، شاید نقاط ایزوالکتریک متفاوت در عملکرد اختصاصی این آنزیم‌ها مؤثر باشند و اتصال این آنزیم‌ها به سوبستراهای مختلف در نقاط مختلف گیاه را تا حدودی توجیه نمایند.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها نشان داد که یک اختلاف مهم بین این آیزوفرْم‌ها مربوط به نقاط ایزوالکتریک آنهاست، به‌طوری‌که پروتئین‌های مشابه تفاوت قابل توجهی را در نقاط ایزوالکتریک نشان می‌دهند (جدول ۲). وضعیت pH می‌تواند در نقاط مختلف یک گیاه متفاوت باشد و در طول رشد نیز تغییر یابد رولین و همکاران، فاسانو و همکاران، دمورکس (Rolin et al., 2000; Fasano et al., 2001, Demareux, 2002). از طرف دیگر، وضعیت pH می‌تواند بار الکتریکی گروه‌های R- اسیدآمین‌ها را بسته به نقاط ایزوالکتریک آنها تغییر دهد و در نتیجه ساختار دوم، ساختار سوم، پایداری و فعالیت آنزیم را تحت تأثیر قرار دهد تلو

الگوی بیان زمانی آیزوفرم‌های STBG2-7 در میوه

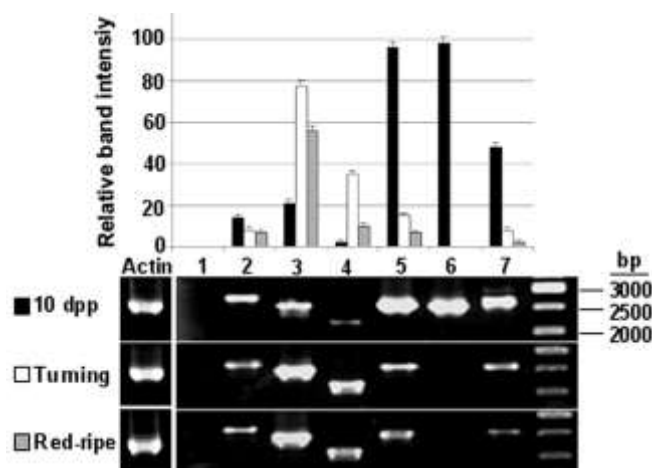
بیان آیزوفرم‌های بتاگالاکتوزیداز در بافت میوه گوجه‌فرنگی رقم فالکاتو از طریق تکنیک RT-PCR نیمه‌کمی و در سه مرحله رشدی شامل ۱۰ dpp، Turning و Red-ripe بررسی گردید. الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل آگارز (شکل ۳) نشان داد که از هفت آیزوفرم بتاگالاکتوزیداز شناسایی شده در رقم روتگرس (TBG1-7)، شش آیزوفرم به‌طور قطعی در رقم فالکاتو دارای بیان هستند (آیزوفرم‌های متناظر با TBG2-7)، در حالی‌که آیزوفرم متناظر با TBG1 یا در رقم فالکاتو بیان نشده و یا آن‌که آغازگرهای اختصاصی آن نتوانسته‌اند رونوشت‌های آن را تکثیر نمایند. به هر حال شش آیزوفرم به‌دست آمده (STBG2-7) الگوهای بیان متفاوتی را در مراحل مختلف رشد میوه به نمایش گذاشتند. STBG2 بیش‌ترین بیان را در مرحله ۱۰ dpp نشان داد و در دو مرحله بعدی رشد، سطوح بیان پایین‌تری را به نمایش گذاشت. STBG3 در مراحل Turning و Red-ripe سطوح بیان به‌مراتب بالاتری را نسبت به مرحله dpp ۱۰ نشان داد، در حالی‌که بیش‌ترین سطح بیان آن مربوط به مرحله Turning بود. سطح بیان STBG4 در مرحله dpp ۱۰ در پایین‌ترین میزان خود بود و در مرحله Turning با افزایش قابل‌توجهی به بالاترین حد خود رسید و در مرحله Red-ripe مجدداً کاهش نشان داد. STBG5 سطح بیان بسیار بالایی را در مرحله dpp ۱۰ به نمایش گذاشت و سطوح نسخه‌های آن به‌طور چشمگیری با افزایش سن میوه کاهش نشان دادند. STBG6 به‌شدت در مرحله dpp ۱۰ بیان شد در حالی‌که در دو مرحله بعدی رشد فاقد بیان بود. STBG7 نیز مانند STBG5 با نسخه‌های فراوان در مرحله dpp ۱۰ ظاهر شد و بیان آن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با افزایش سن میوه کاهش نشان داد.

مقایسه توالی اسیدآمینه بتاگالاکتوزیدازها در دو رقم

فالکاتو و روتگرس

هم‌ردیفی توالی cDNAهای رمزکننده بتاگالاکتوزیدازها در دو رقم فالکاتو و روتگرس اختلافات نوکلئوتیدی را میان آیزوفرم-

های متناظر نشان داد (اطلاعات نشان داده نشده است). بررسی توالی‌های اسیدآمینه منتج‌شده از این cDNAها آشکار ساخت که این اختلافات نوکلئوتیدی منجر به بروز تفاوت‌هایی در توالی اسیدآمینه به‌شرح ذیل گشته‌اند. در STBG2، اسیدآمینه‌های Asp-200، Thr-424، Ser-425، Ile-426، Leu-427، Pro-427، Asp-428، Cys-429، Arg-430، Asn-431، Thr-432، Ala-433، Phe-434، Asn-435، Thr-436، Ala-437، Lys-438، Val-439، Thr-441، Ala-442، Gln-443، Thr-444، Ser-444، Ile-445، Thr-447، Val-448، Gly-449، Ser-450، Asp-451، Ser-452، Val-453، Ser-454، Val-455، Asn-457، Asn-458، Ser-459، Leu-460، Leu-462، Gln-463، Val-464، Ile-465، Thr-466، Ser-468، Lys-469 و Leu-470، Ile-752 به‌ترتیب جایگزین Ser-200، Val-424، Phe-425، Cys-426، Gln-427، Ile-428، Ala-429، Gln-432، Ile-431، Glu-430، Arg-438، Leu-437، Gln-436، Thr-435، Ser-434، Trp-439، His-441، Lys-442، Leu-443، Gln-444، Ser-445، Gln-447، Trp-448، Ala-449، Ile-451، Gln-450، Ile-458، Ile-457، Leu-455، Gln-454، Phe-453، Leu-452، Cys-460، Tyr-462، Lys-463، Leu-464، Ser-465، Leu-466، Ala-468، Ser-469، Ser-470، Thr-752 در TBG2 شده‌اند. در STBG3 اسیدآمینه Pro-764 جایگزین Ser-764 شده است. در STBG4 اسیدآمینه‌های Arg-218، Arg-484، Val-610، Gly-635 و His-690 به‌ترتیب جایگزین Gln-218، Lys-484، Met-610، Asp-635 و Tyr-690 در TBG4 شده‌اند. در STBG5 اسیدآمینه‌های Lys-112، Ile-361، Lys-523 و Ile-747 به‌ترتیب جایگزین Arg-112، Val-361، Arg-523 و Thr-747 در TBG5 شده‌اند. در STBG6 اسیدآمینه‌های Glu-33 و Thr-250 به‌ترتیب جایگزین Lys-33 و Ile-250 در TBG6 شده‌اند. در STBG7 اسیدآمینه‌های Ala-569 و Ser-783 به‌ترتیب جایگزین Ser-569 و Asn-783 در TBG7 شده‌اند.



شکل ۳: آنالیز نیمه کمی بیان زمانی آیزوفرم‌های *STBG2-7* در سه مرحله رشدی میوه، شامل مراحل ۱۰ dpp، Turning و Red-ripe. عدد ۱ مربوط به آیزوفرم متناظر با *TBG1* می‌باشد که در هیچ یک از مراحل رشدی به دست نیامد. اعداد ۲ تا ۷ نیز به ترتیب سطوح بیان آیزوفرم‌های *STBG2* تا *STBG7* را نشان می‌دهند. تصویر یک ژل به نمایندگی از سه تکرار مستقل آورده شده است. شدت نسبی باندها نسبت به شدت باند اکتین نرمال سازی شده‌اند. نمودارهای ستونی، به طور معنی داری متفاوت بوده ($P < 0.01$) و میانگین $\pm$ انحراف معیار بدست آمده از سه واکنش RT-PCR مستقل را ارائه می نماید.

Fig. 3: Temporal semi-quantitative expression analysis of the *STBG2-7* isoforms at three developmental stages of fruit, including 10 dpp, turning and red-ripe stages. Number 1 is related to the isoform corresponding to *TBG1*, which was not obtained at none of the developmental stages. Numbers 2 to 7 show the expression levels of the *STBG2* to *STBG7* isoforms, respectively. One representative gel is shown from three independent replicates. Relative band intensities were normalized to the actin band intensity. Bars are significantly different ($P < 0.01$). Each histogram represents the mean $\pm$ standard deviation obtained from three independent RT-PCR reactions.

گذاری نوردن بررسی گردیده است / سمیت و گروس (۲۰۰۰). *TBG1* در رقم روتگرس در مرحله ۱۰ dpp ظاهر نشده و در مراحل Turning و Red-ripe با سطوح پایینی بیان شده است؛ درحالی‌که ما از طریق تکنیک RT-PCR موفق به شناسایی آیزوفرم متناظر با آن در رقم فالکاتو نشدیم. *TBG2* از مرحله ۳۰ dpp به بعد ظاهر شده و تا مرحله رسیدگی کامل میوه، پایین‌ترین سطح بیان را در میان دیگر آیزوفرم‌ها داشته است؛ درحالی‌که *STBG2* از مرحله ۱۰ dpp دارای بیان می‌باشد و در سرتاسر مراحل رشد میوه سطوح بیان متفاوت و گاهی بالاتر از دیگر آیزوفرم‌ها را نشان می‌دهد. *TBG3* تا مرحله ۴۰ dpp بیان نشده و در مراحل Turning و Red-ripe سطوح بیان بسیار پایینی را نشان داده است؛ درحالی‌که *STBG3* در مرحله ۱۰ dpp بیان قابل توجهی دارد و به خصوص در مراحل Turning و Red-ripe نسبت به دیگر آیزوفرم‌ها بالاترین سطح بیان را نشان می‌دهد. *TBG4* تا مرحله ۴۰ dpp ظاهر نشده، در مرحله Turning بالاترین بیان را داشته و در مرحله Red-ripe بیان آن کاهش یافته است؛ درحالی‌که *STBG4* بیان کمی را در مرحله ۱۰ dpp نشان می‌دهد و در دیگر مراحل رشدی بیانی مشابه *TBG4* را دارد. *TBG5* در مراحل ۱۰ dpp و Turning به شدت بیان شده و در مرحله Red-ripe سطوح بیان آن به طور چشم‌گیری کاهش یافته است؛ *STBG5* نیز بیانی مشابه *TBG5*

برخلاف آیزوفرم‌های *STBG3,4,5,6,7* که در یک یا چند اسیدآمینو اختلاف نشان دادند، آیزوفرم *STBG2* دامنه وسیعی از اختلافات اسیدآمینو را به نمایش گذاشت. بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی در *STBG2* و *TBG2* نشان داد که وارد شدن یک نوکلئوتید آدنین در موقعیت ۱۲۷۰ و حذف یک نوکلئوتید گوانین در موقعیت ۱۴۱۱ از ژن *STBG2* سبب شده تا در ناحیه مرکزی پروتئین به دست آمده (باقیمانده‌های ۴۲۴ تا ۴۷۰) توالی اسیدآمینو تغییر یابد. بررسی خصوصیات این پلی‌پپتیدی تغییر یافته در *STBG2* نشان داد که در مقایسه با توالی متناظرش در *TBG2* وزن مولکولی آن از ۵۴۶۷ به ۴۹۱۱ دالتون کاهش، pH ایزوالکتریک آن از ۹/۵۹ به ۹/۶۳ افزایش، شاخص آلیفاتیک آن به عنوان یک فاکتور مثبت در مقاومت به حرارت از ۱۲۰ به ۹۵ کاهش و شاخص هیدروپاتی آن نیز به عنوان یک فاکتور مثبت در آب‌گریزی از ۰/۳۴ به ۰/۰۶ کاهش یافته است.

مقایسه بیان آیزوفرم‌های بتاگالاکتوزیداز در دو رقم فالکاتو و روتگرس و بررسی اهمیت این آیزوفرم‌ها در رشد و رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی

پیش از این، بیان هفت آیزوفرم بتاگالاکتوزیداز در میوه گوجه‌فرنگی رقم روتگرس (*TBG1-7*) با استفاده از تکنیک لکه-

دارد با این تفاوت که در مرحله Turning سطح بیان پایینی دارد. به‌طور کاملاً مشابه *TBG6* و *STBG6* در هر دو رقم تنها در مراحل اولیه رشد میوه ظاهر شده‌اند و در مراحل Red-ripe و Turning هیچ بیانی را نشان نداده‌اند. *TBG7* در مرحله ۱۰ dpp و نسخه پایین در مرحله Red-ripe بیان گردیده است؛ *STBG7* نیز الگویی مشابه با *TBG7* دارد با این تفاوت که علاوه بر دو مرحله ذکر شده، در مرحله Turning نیز دارای بیان می‌باشد.

مقایسه الگوهای بیان آیزوفرماهای بتاگالاکتوزیداز در دو رقم روتگرس و فالکاتو نشان می‌دهد که آیزوفرماهای ۲ و ۳ و شاید آیزوفرما ۱ الگوهای بیان بسیار متفاوتی را در این دو رقم دارند. در مقابل، آیزوفرماهای ۴، ۵، ۶ و ۷ الگوهای بیان نسبتاً مشابهی را دارا هستند. ظهور الگوهای بیان مشابه در آیزوفرماهای ۴، ۵، ۶ و ۷ دلیلی بر نقش این آیزوفرما در رشد و رسیدگی میوه می‌باشد. این فرضیه با نتایج آزمایشات صورت گرفته روی آیزوفرماهای *TBG1*، *TBG3*، *TBG4* و *TBG6* مطابقت دارد. آزمایش‌های سرکوب بیان ژن نشان داده‌اند که *TBG4* نقش مهمی را در ایجاد نرمی وابسته به رسیدگی میوه بازی می‌نماید / سمیت و همکاران (2002) و *TBG6* نقش مهمی در رشد و نمو اولیه میوه دارد مکتزوم و همکاران (2003). در مقابل، *TBG3* تأثیری روی نرمی و نمو میوه نداشته و سرکوبی آن تنها طول مدت انبارداری را افزایش داده است دی سیلو/ و ورهوی (de Silva and Verhoeven, 1998) و سرکوبی *TBG1* نیز هیچ تأثیر قابل ملاحظه‌ای در هیچ یک از خصوصیات میوه نداشته است کری و همکاران (2001). بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آیزوفرماهای ۵ و ۷ نسبت به آیزوفرما ۲ از اهمیت و اولویت بیشتری برای انجام مطالعات سرکوبی بیان ژن در آینده برخوردارند. اگرچه نقش آیزوفرماهای ۲، ۵ و ۷ در رشد و رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است اما الگوهای بیان این آیزوفرما می‌توانند بیانگر نقش احتمالی آنها باشند. در هر دو رقم فالکاتو و روتگرس، آیزوفرماهای ۵، ۶ و ۷ در مرحله dpp-10 دارای سطوح بیان بسیار بالایی می‌باشند. از این رو انتظار می‌رود آیزوفرماهای ۵ و ۷ نیز مانند آیزوفرما ۶ نقش مهمی را در رشدنمو اولیه میوه بازی نمایند. آیزوفرما ۲ برخلاف دیگر آیزوفرماها که حداقل در یکی از مراحل رشدی بیان بالایی را نشان داده‌اند در هیچ یک از مراحل رشدی میوه فالکاتو با فراوانی بالایی بیان نشده و در رقم روتگرس نیز در تمامی مراحل رشدی پایین‌ترین سطح بیان را در میان دیگر آیزوفرماها

داشته است. بنابراین انتظار می‌رود این آیزوفرما نیز مانند آیزوفرما ۱ تأثیر مهمی بر رشد و نرمی میوه نداشته باشد. خصوصاً آن‌که پروتئین‌های رمز شده توسط *TBG2* و *STBG2* نسبت به پروتئین‌های رمز شده توسط دیگر آیزوفرماها کم‌ترین درجه حفاظت‌شدگی را دارند.

خصوصیات ساختاری و اجزای عملکردی پروتئین‌های منتج از آیزوفرماهای *STBG2-7*

به‌منظور شناخت مؤلفه‌های درگیر در عملکرد افتراقی بتاگالاکتوزیدازها، ساختارهای اول و دوم پروتئین‌های منتج از آیزوفرماهای *STBG2-7* مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان دادند که در خانواده گلاپکوزیل هیدرولاز ۳۵ علاوه بر بتاگالاکتوزیدازهای مونومر، مانند بتاگالاکتوزیدازهای ۷۵KD در گوجه‌فرنگی کری و همکاران (1995) و ۷۷KD در فلفل *اگساوارا* و همکاران (Ogasawara et al., 2007)، گروه دیگری از بتاگالاکتوزیدازها وجود دارند که هتروداایمرند، مانند بتاگالاکتوزیداز جو که از دو زیر واحد ۳۳ KD و ۴۵ KD تشکیل شده *تریانتافیلیدو* و *گئورگاتسوس* (Triantafyllidou and Georgatsos, 2001) و بتاگالاکتوزیداز نخود که از دو زیر واحد ۳۸ KD و ۴۸ KD تشکیل شده است کیشور و کایاستا (Kishore and Kayastha 2012). این بتاگالاکتوزیدازهای هتروداایمر از شکست یک پلی‌پپتید منفرد حاصل شده‌اند و زیرواحدهای بزرگ و کوچک در آنها به ترتیب با نیمه‌های انتهایی N و C در بتاگالاکتوزیدازهای مونومر متناظر می‌باشند *تریانتافیلیدو* و *گئورگاتسوس* (2001). این یافته‌ها وجود دو دمین اصلی را در این پروتئین‌ها پیشنهاد می‌کنند، که ممکن است خصوصیات عملکردی متفاوتی داشته باشند. هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی آیزوفرماهای *STBG2-7* (شکل ۱) دو ناحیه متمایز را در این آنزیم‌ها آشکار ساخت؛ شامل یک نیمه بسیار حفاظت‌شده در پایانه N (ناحیه قبل از توالی‌های قرمز رنگ) و یک نیمه کم حفاظت‌شده در پایانه C (ناحیه آغاز شده با توالی‌های قرمز رنگ). همچنین هم‌ردیفی این توالی‌های پروتئینی با توالی‌های پایانه N از زیرواحدهای کوچک بتاگالاکتوزیدازهای هتروداایمر جو *تریانتافیلیدو* و *گئورگاتسوس* (2001) و *خرمالو کانگ* و همکاران (Kang et al., 1994) آشکار ساخت که توالی‌های آغازین این زیرواحدهای کوچک با توالی‌های آغازین این نیمه‌های کم حفاظت‌شده مطابقت دارند (شکل ۱). بنابراین به‌وضوح مشخص گردید که این نیمه‌های کم حفاظت‌شده با زیرواحدهای کوچک بتاگالاکتوزیدازهای هتروداایمر متناظر

اختلاف بزرگ در توالی پروتئینی آیزوفریم ۲ بتاگالاکتوزیدازها در دو رقم روتگرس (*TBG2*) و فالکاتو (*STBG2*) اشاره گردید. به‌طور جالب توجهی بخش عمده این اختلاف در محدوده این توالی‌های کوتاه حفاظت‌نشده قرار می‌گیرد (شکل ۱) که نشان‌دهنده اهمیت ناچیز این نواحی است. همچنین بزرگ‌ترین شکاف در هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی بتاگالاکتوزیدازها (شکل ۱) در این نواحی رخ داده است که باز هم بر کم اهمیت بودن نقش آنها دلالت دارد.

می‌باشند و با دو باقیمانده Trp و Glu کاملاً حفاظت‌شده آغاز می‌گردند. این هم‌ردیفی همچنین آشکار ساخت که علاوه بر نیمه‌های بسیار حفاظت‌شده در پایانه‌های N و نیمه‌های کم حفاظت‌شده در پایانه‌های C، توالی‌های کوتاه حفاظت‌نشده‌ای وجود دارند که در حد فاصل این نیمه‌های انتهایی N و C قرار گرفته‌اند (توالی‌های قرمز رنگ). به‌نظر می‌رسد این توالی‌های کوتاه حفاظت‌نشده تنها به‌عنوان یک اتصال‌دهنده برای این نیمه‌ها عمل می‌نمایند و هیچ‌گونه عملکرد دیگری ندارند. وجود چنین اتصال‌دهنده‌ای بین نیمه‌های انتهایی N و C برای بتاگالاکتوزیدازهای باکتری و مخمر نیز پیشنهاد شده است پوچ و همکاران (*Poch et al., 1992*). به‌علاوه، در بالا به یک

جدول ۳: آنالیز ساختارهای ثانویه پروتئین‌های منتج از آیزوفریم‌های *STBG2-7* توسط برنامه‌های SOPMA و PHD. حروف α و β

محتوای ماریچ α و رشته β را در نیمه بسیار حفاظت‌شده پایانه N و نیمه کم حفاظت‌شده پایانه C نشان می‌دهند

Table 3: Analysis of the secondary structures of the proteins resulted from *STBG2-7* by the SOPMA and PHD programs. The α and β letters show the α -helix and β -strand contents in the highly conserved N-terminal and less conserved C-terminal halves

	SOPMA				PHD			
	N-terminal		C-terminal		N-terminal		C-terminal	
	α (%)	β (%)	α (%)	β (%)	α (%)	β (%)	α (%)	β (%)
<i>STBG2</i>	28.1	23.8	10.2	27.6	24.4	22.8	4.5	32.8
<i>STBG3</i>	27.7	25.7	14.2	29.4	26.5	25.3	5.3	32.3
<i>STBG4</i>	27.6	24.7	9.4	33.1	24.7	22.2	4.3	39.1
<i>STBG5</i>	30.5	23.2	10.8	28.5	27	25.1	7.1	31.7
<i>STBG6</i>	28.3	24	12.3	29	27.6	23.3	2.1	38.7
<i>STBG7</i>	30.1	23.5	11.9	29.8	30.1	22.5	2.9	34.4
Average	28.7	24.1	11.4	29.5	26.7	23.5	4.3	34.8

جالب توجهی در تمامی این پروتئین‌ها نیمه‌های بسیار حفاظت‌شده پایانه‌های N دارای یک نسبت تقریباً برابری از ساختارهای ماریچ α و رشته β بودند درحالی‌که نیمه‌های کم حفاظت‌شده پایانه‌های C محتوای رشته β بسیار بالاتری نسبت به محتوای ماریچ α داشتند (جدول ۳). محتوای رشته β بالا در نیمه‌های انتهایی C می‌تواند چندین فاکتور انرژی‌تیک مهم، از قبیل شکل‌گیری شبکه باندهای هیدروژنی و میانکنش‌های آب‌گریز، را درگیر نماید و در نتیجه نقشی حیاتی را در شکل‌گیری و بقای ساختار سوم و پایداری آنزیم بازی نماید فابیولا و همکاران؛ پاریزین و میجر (Fabiola et al., 1997, Parisien and Major, 2007). همچنین حضور ۱۵ جایگاه N-گلیکوزیلاسیون بالقوه (از کل ۲۲ جایگاه شناسایی-شده در این پروتئین‌ها) در نیمه‌های انتهایی C دوباره بر اهمیت نقش این نواحی در تاخوردگی صحیح پروتئین و پایداری آن تأکید می‌نماید تیلور و دریکامر، ورکی و همکاران (Taylor and Drickamer, 2006, Varki et al., 2009) به-

طبیعت بسیار حفاظت‌شده نیمه‌های انتهایی N و حضور سایت فعال آنزیم در این نواحی و همچنین شناسایی باقیمانده‌های متناظر با Glu-195 و Glu-262 در پروتئین منتج از *STBG2* به‌عنوان دهنده‌ی پروتون و نوکلئوفیل (پروتون دوست) بالقوه در واکنش‌های کاتالیتیک آیزوفریم‌های *STBG2-7* هنریست و همکاران (1995) این فرضیه را به‌وجود می‌آورند که این نیمه‌های انتهایی N عهده‌دار نقش کاتالیتیک این آنزیم‌ها هستند. در مقابل چون نیمه‌های انتهایی C کمتر حفاظت شده‌اند منطقی است که فرض کنیم برخی خصوصیات اختصاصی این آنزیم‌ها، مانند اتصال به سوبسترای خاص، مرتبط با این نواحی هستند. این فرضیه توسط خصوصیات نیمه‌های انتهایی C در بتاگالاکتوزیدازهای *STBG2-7* و یافته‌های آزمایش‌های اخیر به‌شرح ذیل تأیید می‌گردد. بررسی ساختارهای دوم در این پروتئین‌ها آشکار ساخت که این نیمه‌های انتهایی N و C علاوه بر اینکه درجه حفاظت‌شدگی متفاوتی دارند در ساختار دوم نیز بسیار متفاوتند. به‌طور

خصوص آن که تنها جایگاه N-گلاایکوزیلاسیون کاملاً حفاظت شده در این پروتئین‌ها در نیمه انتهایی C واقع شده است (شکل ۱). هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی (شکل ۱) همچنین آشکار نمود که در این نیمه‌های انتهایی C، سه باقیمانده Gly (در ۱۶ موقعیت)، Leu (در ۹ موقعیت) و Trp (در ۸ موقعیت) نسبت به دیگر باقیمانده‌ها بیشتر حفاظت شده‌اند. Trp یکی از باقیمانده‌های حفاظت شده در سطوح مشترک نواحی آب‌گریز می‌باشد. این اسیدآمینه در میانکنش‌های پروتئین-پروتئین شرکت نموده و همچنین نقش مهمی در پایداری ساختار سوم پروتئین دارد کلاکسون و ولس؛ بوگان و تورن؛ گالیوان و دفرتی؛ سامانتا و همکاران (Clackson and Wells, 1995; Bogan and Thorn 1998; Gallivan and Dougherty, 1999, Samanta et al., 2000). به علاوه، ارجحیت محتوای رشته β و میان‌کنش‌های بینابینی از طریق Trp می‌توانند نقشی حیاتی را در مولتی‌مریزاسیون وابسته به pH آنزیم بازی نمایند که فاکتوری ضروری برای پایداری آنزیم در شرایط طبیعی است دویویدی و همکاران (2010). بنابراین به نظر می‌رسد که این نیمه‌های انتهایی C با محتوای رشته β بالا و باقیمانده‌های Trp حفاظت شده و جایگاه‌های N-گلاایکوزیلاسیون فراوان می‌توانند نقش محوری را در تاخوردگی صحیح و پایداری این آنزیم‌ها بازی نمایند. از طرف دیگر نشان داده شده است که Trp عامل مهمی در میان‌کنش‌های پروتئین-هیدرات‌کربن است. باقیمانده‌های Trp-999 و Trp-568 در بتاگالاکتوزیداز *E. coli* به طور قوی به هیدرات‌کربن‌ها متصل می‌شوند. به علاوه، جایگزینی‌ها برای Trp-999 منجر به کاهش چشم‌گیری در توانایی اتصال این آنزیم به نواحی سطحی سوبسترا شده است هابر و همکاران، اسپووک و همکاران (Huber et al., 2003, Spiwok et al. 2004). آزمایش‌های مشابهی همچنین روی Gly-794 در بتاگالاکتوزیداز *E. coli* انجام شده است مارتینز بیلباو و همکاران (Martinez-Bilbao et al., 1991) که نشان می‌دهند این باقیمانده به طور مستقیم در تشخیص سوبسترا نقش دارد. همچنین جایگزینی Gly-794 موجب تغییراتی در میان‌کنش‌های اتصال آنزیم به سوبسترا شده و عملکرد آنزیم را تحت تأثیر قرار داده است مارتینز بیلباو و همکاران (1994). بنابراین بسیار محتمل است که این نیمه‌های کم حفاظت شده با باقیمانده‌های Gly و Trp حفاظت شده در تشخیص سوبسترا و میان‌کنش‌های اتصال آنزیم به سوبسترا نقش داشته باشند. این احتمال توسط ظهور دمین‌های مشابه لکتین تخم جوجه-

تیغی دریایی در این نیمه‌های انتهایی C تقویت می‌شود (شکل ۱). لکتین تخم جوجه تیغی دریایی قادر است به کربوهیدرات-هایی مانند D-گالاکتوز و L-رامنوز متصل شود /وزیکی و همکاران، هاسونو و همکاران (Ozeki et al., 1991, Hosono et al., 1999) و پیشنهاد شده است که دمین‌های مشابه لکتین تخم جوجه تیغی دریایی نیز در اتصال به سوبستراهای کربوهیدراتی نقش دارند زنگ و لیو (Zhang and Liu 2005)، آن و همکاران (2007). به علاوه، دمین مشابه لکتین تخم جوجه تیغی دریایی در آیزوفریم *STBG4* وجود ندارد که نشان می‌دهد این دمین برای فعالیت کاتالیتیک آنزیم ضروری نیست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حضور و یا غیبت این دمین‌ها در نیمه‌های انتهایی C تنها توانایی اتصال آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد و آن گواه دیگری برای تأیید نقش احتمالی این نواحی در میان‌کنش‌های اتصال به سوبسترا می‌باشد. براساس شواهد و مدارک فوق بسیار محتمل است که این نیمه‌های انتهایی C نقش بحرانی را هم در پایداری و هم در اتصال به سوبسترای این آنزیم‌ها بازی کنند در حالی که به نظر می‌رسد نیمه‌های انتهایی N عمدتاً در فعالیت‌های کاتالیتیک این آنزیم‌ها درگیر باشند. امکان وجود دو دمین اصلی با ساختارهای ثانویه متفاوت و خصوصیات عملکردی متفاوت در یک آنزیم بتاگالاکتوزیداز گیاهی توسط نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی دو رنگ‌نمایی دورانی بتاگالاکتوزیداز نخود کاملاً تأیید می‌گردد دویویدی و همکاران (2010) که نشان می‌دهد این آنزیم دارای دمینی متشکل از ساختارهای مارپیچ α و رشته β با فعالیت کاتالیتیک می‌باشد درحالی که آن دمین دیگری را در برگرفته که غنی در محتوای رشته β و فاقد فعالیت کاتالیتیک است.

اطلاعات حاضر برای شروع دست‌کاری‌های ژنتیکی در نیمه‌های انتهایی C و بررسی نقش این نواحی در اتصال به سوبسترا و نفوذ این نواحی روی شدت فعالیت کاتالیتیک این آنزیم‌ها مفید می‌باشد. نتایج چنین مطالعاتی متعاقباً برای افزایش یا کاهش فعالیت این آنزیم‌ها از طریق تغییر توانایی اتصال به سوبسترا مفید خواهند بود. این تکنیک می‌تواند با انعطاف‌پذیری بالایی در کنار دیگر تکنیک‌های محدود و انعطاف‌ناپذیر مانند بیان سنس و آنتی‌سنس ژن برای تنظیم فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تراریخته به کار گرفته شود.