

نشان ویژگی ملکولی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز (γ -tmt) از گیاه گوجه فرنگیMemory 1 رقم (*Lycopersicon esculentum* L.)طاهره رئوف زاده M.Sc.^۱، رامین حسینی Ph.D.^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
 ۲- دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: r.hosseini@ikiu.ac.ir و raminh_2001@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۹

چکیده

هدف: هدف این تحقیق همسانه سازی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز (γ -tmt) از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory 1، جهت تعیین توالی و خصوصیات ملکولی آن و نیز انتقال این ژن به یک گیاه روغنی مثل کلزا در پژوهش‌های آتی برای بالا بردن خاصیت تغذیه ای آن بود.

مواد و روش‌ها: از بافت میوه گوجه فرنگی، cDNA کل استخراج و ساخت cDNA صورت گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مذکور تکثیر و همراه با ناقل pBluescript (SK-) به کمک آنزیم برشی *XbaI* هضم و واکنش اتصال با آنزیم T₄ انجام شد. باکتری *E. coli* مستعد با ناقل نوترکیب تراریخت و شناسایی کلونی‌های نوترکیب بر اساس آزمون سفید-آبی انجام شد.

نتایج: با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی، cDNA به طول ۱۰۸۹ bp به دست آمد. همدریف سازی توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینو ای ژن هدف با توالی های γ -tmt دیگر ثبت شده از خانواده Solanaceae به میزان ۹۸ درصد شباهت داشت. در توالی اسید آمینو ای پروتئین استنتاج شده چند تغییر مشاهده شد. با استفاده از نرم افزار PSIPred، ساختارهای دوم و سوم این پروتئین پیش بینی و با استفاده از نرم افزار ClustalW درخت فیلوژنتیکی پروتئین حاصل از این ژن ساخته شد.

نتیجه گیری: cDNA ژن γ -tmt همسانه سازی شده با توالی ثبت شده از گوجه فرنگی رقم Cerasiforme ۹۸ درصد شباهت داشت. با انتقال این ژن به گیاهان دانه روغنی مانند کلزا می توان میزان آلفا توکوفرول را افزایش داد. این کار هم به اهمیت این گیاه از نظر تغذیه‌ای می افزاید و هم می تواند مقاومت آن را نسبت به تنش های محیطی بالا ببرد.

واژگان کلیدی: گاما توکوفرول متیل ترانسفراز، ساختمان دوم، ویتامین E

مقدمه

ویتامین E یکی از ویتامین‌های محلول در چربی و ضروری برای انسان است که بیشتر به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانتی‌اش در بدن شناخته شده است. از میان هشت شکل طبیعی این ویتامین، آلفا توکوفرول دارای بالاترین فعالیت و به دلیل جذب انتخابی آن توسط پروتئین جگری ناقل آلفا توکوفرول بیشتر در دسترس است (۲۰۱). در بدن انسان این ویتامین دارای دو عملکرد است بدین معنا که هم به عنوان یک ویتامین عمل می‌نماید و هم نقش یک آنتی‌اکسیدانت مهم را ایفا می‌کند (۳). زمانی نقش بسیار مهم آلفا توکوفرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بیشتر آشکار می‌شود که رابطه‌ی بسیاری از بیماری‌ها با خاصیت مذکور روشن می‌شود. از آنجا که معمولاً نشانه‌های بیماری پس از سال‌ها تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن ظاهر می‌شوند لذا بیماری‌های ایجاد شده توسط این رادیکال‌ها اکثری دارای دوره‌ی نهفتگی بلند مدت می‌باشند. برخی از اثرات این ویتامین بر این بیماری‌ها عبارتند از: کاهش احتمال بیماری‌های قلبی-عروقی، موثر در درمان انواع سرطان، کند شدن پدیده پیری سلول‌ها و بافت‌ها، حفظ سلامت سلول‌های قرمز خون و مقابله با کم‌خونی، تسریع در بهبود زخم‌ها، کمک به درمان اختلالات تولیدمثلی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، کند شدن پیشرفت بیماری‌هایی که با پدیده‌ی پیری همراه اند (مانند آب مروارید و آرتروز) (۴، ۵ و ۶).

ویتامین E تنها در موجودات فتوسنتز کننده و برخی از سیانوباکتری‌ها تولید می‌شود، بنابراین منبع تامین آن در انسان مصرف گیاهان است (۷). بیشترین غلظت توکوفرول را می‌توان در دانه‌های روغنی گیاهانی همچون کانولا، نخل، گلرنگ، سویا و آفتابگردان یافت که غلظت توکوفرول طبیعی در دانه‌ی آن‌ها بطور میانگین ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از بافت‌هایی غیر از دانه است. این درحالی است که بیشترین ایزوفرم موجود در آنها گاما توکوفرول یعنی همان پیش ماده‌ی بیوسنتزی آلفا توکوفرول می‌باشد (۸). توانایی آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در جابجایی گروه متیل در سال ۱۹۸۰ شناسایی و محل آن در غشای داخلی کلروپلاست اسفناج تعیین (۹ و ۱۰) و پس از آن در سال ۱۹۸۵ توسط دارلینگ و کامارا از کروموپلاست لفل استخراچ گردید (۱۱).

ژن توکوفرول متیل ترانسفراز از باکتری سینکوسیستیس از طریق یافتن همولوژی با دیگر ژن‌های شناسایی شده در مسیر

بیوسنتز ویتامین E شناسایی شد. این ژن در اربیدوپسیس از طریق جستجوی همولوژی با ژن γ -tmt باکتری سینکوسیستیس در سال ۱۹۹۸ شناسایی شد. همچنین این نکته روشن گردید که گونه‌های مختلف گیاهان روغنی دارای مقدار زیادی توکوفرول در دانه‌های خود هستند. اما در اکثر گیاهان دانه روغنی همچون دانه‌های سویا و کلزا، میزان گاما توکوفرول (پیش ماده‌ی آلفا-توکوفرول)، نسبت به آلفا-توکوفرول بسیار بیشتر است (۸). بنابراین تبدیل متابولیکی گاما توکوفرول به آلفا توکوفرول از طریق فناوری گیاهان تراریخت جهت افزایش کارایی جذب آن توسط انسان و جانوران مد نظر بوده است. این کار برای اولین بار با ابر بیان ژن γ -tmt در گیاه مدل اربیدوپسیس صورت گرفت (۸). بدین وسیله به نقش کلیدی آنزیم TMT- γ در تعیین نوع توکوفرول موجود در دانه پی برده شد. محققین طی این آزمایش ژن کد کننده‌ی آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز را از گیاه *Arabidopsis thaliana* همسانه سازی و سپس cDNA آن را تعیین توالی کردند. در این مطالعه محققین با ابر بیان ژن مذکور، ترکیب دانه‌های *A. thaliana* را از ۹۷ درصد گاما توکوفرول به ۹۵ درصد آلفا توکوفرول تبدیل کردند (۸).

فعالیت‌های زیستی بسیاری از جمله از بین بردن ملکول‌های اکسیژن یگانه که در طی واکنش‌های فتوسیستم II ایجاد می‌شوند (۱۲)، کنترل غیر آنزیمی اکسایش لیپیدها در گیاهان (۱۳) و افزایش سازگاری گیاهان به دماهای پایین (۱۴)، به توکوفرول‌ها نسبت داده شده است. در جهت افزایش میزان آلفا توکوفرول در گیاهان مختلف پژوهش‌هایی انجام شده که اجمالا به برخی از آن‌ها اشاره می‌گردد.

در سال ۲۰۰۵، محتوی آلفا توکوفرول برگ گیاه کاهو با ابر بیان ژن γ -tmt گیاه اربیدوپسیس تا سه برابر افزایش یافت. در این آزمایش نقش TMT- γ در کنترل میزان تولید آلفا توکوفرول در برگ کاهو و همبستگی میان mRNA تراریخت و میزان فعالیت ژن به اثبات رسید (۱۵). در سال ۲۰۰۶ با بیان ژن γ -tmt گیاه اربیدوپسیس در گیاه دانه روغنی *Brassica juncea* میزان آلفا توکوفرول دانه‌های این گیاه شش برابر گردید (۱۶). در سال ۲۰۰۷ (۱۷) و سپس در سال ۲۰۱۱ (۱۸) با همسانه سازی و سپس ابر بیان ژن γ -tmt *Perilla frutescens* در خود گیاه بیشتر گاما توکوفرول موجود در دانه به آلفا توکوفرول تبدیل گردید. در سال ۲۰۰۷ نیز محققان با ابر بیان ژن گاما توکوفرول

Primer (Oligo (dT)₁₈): 1 pmol

Deionized and nuclease-free water to final volume:
7-12 μl

مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس روی یخ قرار داده شد و مواد زیر به آن اضافه شد:

5 X reaction buffer: 4 μl

dNTP Mix 10 mM: 2 μl

مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس مقدار ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه برداری معکوس (reverse transcriptase، سیناژن، ایران) به ترکیب فوق اضافه و مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش فوق با قرار دادن مخلوط واکنش در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف گردید.

تکثیر cDNA ژن tmt با استفاده از PCR: آغازگرهای اختصاصی با توجه به توالی ژن tmt گیاه گوجه فرنگی با شماره دستیابی DQ456876 طراحی و برای تکثیر cDNA ژن tmt به طول ۱۰۸۹bp سنتز شدند (جایگاه برش آنزیمی XbaI در دو انتهای ۵' و آغازگر اختصاصی tmtF و tmtR طراحی شد).

5' TATCTAGAATGGGCAGCCAATGCTATT 3'

5' GCTCTAGATTATTCAGGTTTTTCGACATGTG 3'

واکنش PCR پس از بهینه سازی دمای اتصال جهت تکثیر اختصاصی و تک باند شدن محصول PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از PCR Master Mix (سیناژن، ایران) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور واکنش، تیوب‌ها به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

cDNA مورد نظر پس از خالص سازی از ژل به کمک DNA Extraction Kit (شرکت فرمنتاس) و برش توسط آنزیم XbaI با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase به ناقل از پیش برش یافته اتصال یافت. پس از مستعد سازی سلول‌های *E. coli*، باکتری‌های مستعد با استفاده از ناقل‌های نوترکیب تراریخت شدند. آزمایش‌های تاییدی جهت اطمینان از نوترکیبی کلنی‌ها

متیل ترانسفراز گیاه *Perilla frutescens* در گیاه سویا مقدار آلفا توکوفرول دانه را چندین برابر افزایش دادند (۱۹). با توجه به اینکه آلفا توکوفرول در میان تمامی ایزوفرم‌های دیگر این ویتامین دارای بالاترین فعالیت بیولوژیکی، و آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز آخرین آنزیم در مسیر بیوسنتز آلفا توکوفرول است در نتیجه افزایش تولید ویتامین E، هدف مهندسی گیاهان تراریخت، ترجیحاً ابر بیان آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز می‌باشد. این پژوهش با هدف استخراج و همسانه سازی ژن گاما متیل ترانسفراز از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory 1 انجام شد تا بتوان در قدم بعدی این ژن را جهت بالا بردن ارزش تغذیه‌ای، به یک گیاه دانه روغنی مانند کلزا منتقل نمود. توالی این ژن در گیاه گوجه فرنگی در ارقام دیگری قبلاً به ثبت رسیده است؛ اما در رقم Memory 1 تا پیش از این مطالعه، شناسایی نشده و به ثبت نرسیده بود.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA: تمامی وسایل پلاستیکی و شیشه‌ای و همچنین محلول‌های مورد نیاز به استثنای محلول‌های حاوی Tris با استفاده از محلول DEPC (دی اتیل پیروکربنات) یک دهم درصد ضد عفونی و عاری از آنزیم‌های RNase شدند. سپس وسایل و محلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری (incubation) و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند تا DEPC از طریق شکسته شدن به دی اکسیدکربن، آب و اتانول کاملاً از بین برود. بافر استخراج شامل

[Tris-HCl 300mM, EDTA 25mM, NaCl 2M, CTAB 2% (w/v), PVP 2% (w/v), β-Mercaptoethanol 2%, DEPC-treated water 0.1%]

به میزان ۲۷ میلی‌لیتر برای هر ۲/۵ گرم از نمونه ی پودر شده تهیه گردید. همه‌ی مواد بجز بتا- مرکاپتواتانول درون فالتون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. استخراج RNA بر اساس روش تغییر یافته رید و همکاران (۲۰) صورت گرفت.

واکنش نسخه برداری معکوس تهیه cDNA: جهت سنتز cDNA واکنش نسخه برداری معکوس به روش زیر انجام گرفت. مخلوط زیر در یک میکروتیوب استریل روی یخ تهیه گردید.

Template (total RNA or mRNA): 50 ng

(XP_002269749) *Vitis vinifera*,
(BAH10645) *Hevea brasiliensis*,
(ACJ84366) *Medicago truncatula*,
(CAI77219) *Triticum aestivum*,
(ABI23433) *Brassica juncea*.

مورد استفاده قرار گرفتند.

خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین ژن همسانه سازی شده در سایت ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) بررسی گردید. ساختار دوم و سوم پروتئین نیز توسط نرم افزار آنالیزن سایت PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) پیش بینی و رسم گردید. بررسی موقعیت زیر سلولی پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزارهای TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) و Psort (<http://www.psort.org>) و وجود پپتید پیام (signal peptide) توسط نرم افزار iPsport (<http://ipsort.hgc.jp>) انجام شد.

نتایج

در این تحقیق cDNA ژن γ -tmt از گیاه گوجه فرنگی رقم Memory1 به طول 1089 bp جهت بررسی توالی و استفاده برای انتقال به یک گیاه دانه روغنی مانند کلزا، در پژوهش های آتی، تکثیر گردید. بدین منظور از مرحله قرمز این گیاه، RNA استخراج و واکنش RT-PCR انجام گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد، یک باند بطول حدود 1/1 Kb مشاهده گردید (شکل 1A).

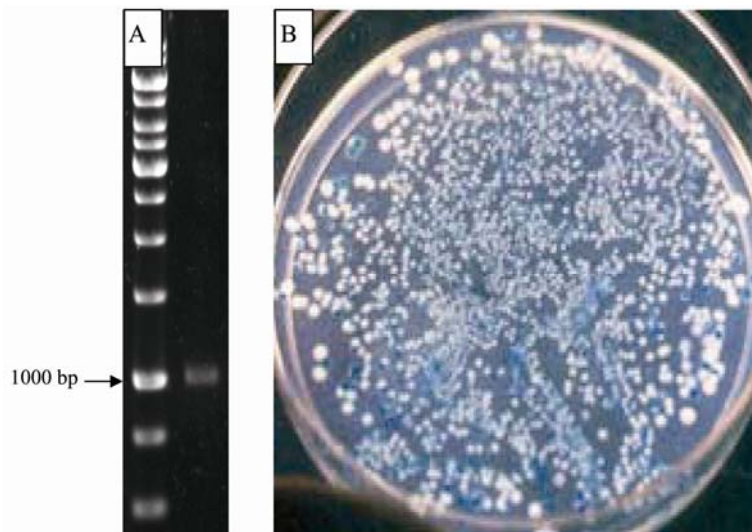
باند مذکور از ژل آگارز استخراج و خالص سازی گردید. با توجه به صحت طول قطعه، واکنش اتصال قطعه مذکور و ناقل pBluescript صورت گرفت. باکتری های مستعد شده *E. coli* توسط فازمیدهای نوترکیب تراریخته شدند. کلنی های تراریخته شده نوترکیب ابتدا از طریق آزمون کلنی های سفید-آبی غربال گردیدند (شکل 1B). سپس جهت بررسی بیشتر، آزمون Tooth pick minipreparation نیز روی کلنی های سفید صورت گرفت و کلنی های نوترکیب از روی اختلاف اندازه شان انتخاب گردیدند (شکل 2A). پس از انتخاب کلنی های نوترکیب، ناقل آنها استخراج گردید. با استفاده از آنزیم *XbaI* آزمایش هضم آنزیمی صورت گرفت که به ترتیب قطعات مورد انتظار با طول 1089 bp و 2961 bp حاصل و بدین ترتیب همسانه سازی ژن گاما-توکوفرول متیل ترانسفراز تایید گردید (شکل 2B).

به ترتیب زیر صورت گرفت: آزمون کلنی های سفید-آبی، Toothpick minipreparation، استخراج فازمید و هضم آنزیمی توسط آنزیم *XbaI* (21).

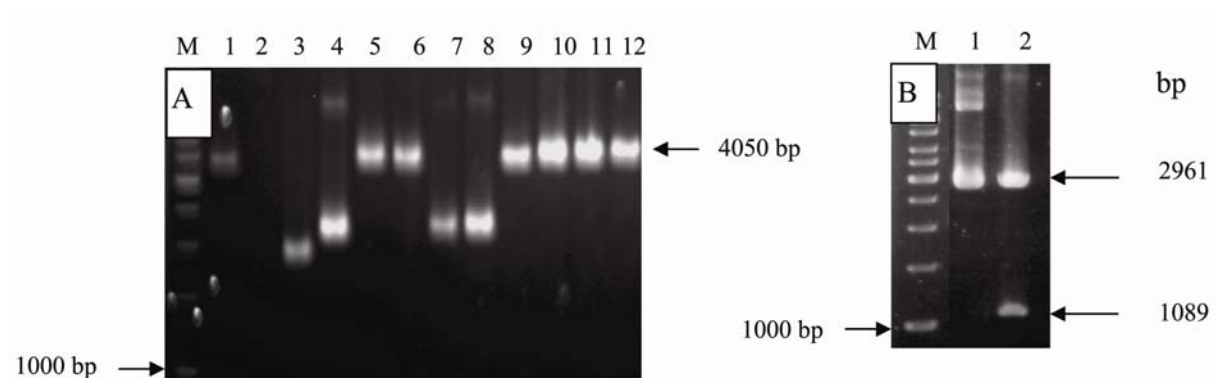
پس از انجام آزمایش های تاییدی جهت اطمینان از حضور cDNA ژن *tmt* در فازمید نوترکیب و مطالعه توالی ژن همسانه سازی شده از توالی یابی استفاده شد. به این منظور ناقل نوترکیب از باکتری *E. coli* تراریخته شده استخراج و به همراه آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت جهت توالی یابی در دو جهت به شرکت Milligen فرانسه ارسال شد.

مقایسه توالی پروتئینی استنتاج شده از ژن *tmt* با دیگر پروتئین های مشابه: پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی cDNA ژن γ -tmt همسانه سازی شده، توالی اسید آمینهای آن با استفاده از سایت <http://expasy.org/translate> مشخص و سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار آنالیز ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw>) رسم گردید. جهت این کار توالی پروتئین های مشابه با شماره های دستیابی

(ZP-08985217) *Fisherella* sp.,
(AE68180) *Perilla frutescens*,
(ADZ24710) *Solanum penellii*,
(BAK57287) *Glycine max*,
(NP_176677) *Arabidopsis thaliana*,
(BAJ86294) *Hordeum vulgare*,
(ZP_07111019) *Oscillatoria* sp.,
(YP_003722211) *Nostoc azolae*,
(EGB05977) *Aureococcus anophagefferens*,
(NP_091105914) *Zea mays*,
(EAZ24304) *Synechococcus* sp.,
(ADV36922) *Solanum tuberosum*,
(CBN74411) *Ectocarpus siliculosus*,
(ZP_00518612) *Crocospaera watsonii*,
(ADC91915) *Lactuca sativa*,
(ADP00411) *Catharanthus roseus*,
(ZP_05030254) *Microcoleus chthonoplastes*,
(YP_001657502) *Microcystis aeruginosa*,
(XP_003083842) *Ostrecoccus tauri*,
(XP_002951641) *Volvox carteri*,
(XP_001421685) *Ostrococcus lucimarinus*,
(XP_00288296) *Arabidopsis lyrata*,
(XP_002319777) *Populus trichocarpa*,
(XP_001694470) *Clamydomonas reinhardtii*,
(XP_002292406) *Thalassiosira pseudomona*,
(XP_002180606) *Phaeodactylum tricoratum*,
(AA013806) *Brassica oleracea*,
(ABB52800) *Helianthus annuus*,
(ACD03285) *Brassica napus*,
(XP_002503087) *Micromonas* sp.,
(XP_002454429) *Sorghum bicolor*,
(AC057634) *Linum sitatissimum*,



شکل ۱: A- تکثیر γ -tmt cDNA در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد توسط PCR. ردیف ۱ نشانگر اندازه ملکولی ۱ kb (سینا ژن، ایران). B- تشخیص کلنی‌های نو ترکیب توسط آزمون کلنی‌های سفید-آبی. کلنی‌های آبی فاقد پلازمید نو ترکیب و کلنی‌های سفید حاوی پلازمید نو ترکیب‌اند.



شکل ۲: A) آزمون *toothpick miniprep* فاژمید هایی که بالاتر قرار گرفته اند (نشان داده شده با پیکان، ردیف های ۵، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲)، نو ترکیب هستند. B) فاژمید نو ترکیب هضم شده توسط آنزیم *XbaI*: مطابق انتظار ژن مورد نظر، به ترتیب از پایین به بالا، با طول ۱۰۸۹ bp و فاژمید با طول ۲۹۶۱ bp حاصل شد. M نشانگر اندازه ملکولی ۱ kb (سینا ژن، ایران).

نرم افزار آنالین iSort مشخص گردید که پروتئین مذکور دارای پپتید پیام با توالی MGSQCYSAYSISLNPCTPSSSSSVIFSL برای انتقال به کلروپلاست است و نرم افزارهای آنالین TargetP و Psort احتمال کلروپلاستی بودن این پروتئین را به ترتیب ۹۷ و ۱۰۰ درصد پیش بینی کردند. هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی (شکل ۳) و اسید آمینه‌ای توالی (شکل ۴) به دست آمده با دیگر توالی‌های ثبت شده از گیاه گوجه فرنگی در بانک NCBI انجام شد. تفاوت‌هایی در نوکلئوتیدهای شماره ۸۴، ۲۷۳، ۵۶۱ و ۶۴۲ مشاهده شد. این تغییرات باعث جایگزینی دو اسید آمینه گردید (بحث را مشاهده کنید).

بررسی ویژگی توالی اسیدهای آمینه و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین استنتاج شده از ژن هدف با استفاده از ابزار ProtParam نشان داد که ژن هدف، پروتئینی با طول ۳۶۲ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۹۸۰۰/۵ دالتون و pH ایزوالکتریک ۸/۲۸ را کد می‌کند. فرمول شیمیایی این پروتئین $C_{1764}H_{2785}N_{483}O_{529}S_{18}$ و در مجموع دارای ۵۵۷۹ اتم است. بیشترین و کمترین اسید آمینه را در توالی این پروتئین به ترتیب سرین (۴۲ عدد) با ۱۱/۲ درصد و هیستیدین (۷ عدد) با ۱/۹ درصد به خود اختصاص می‌دهند. این آنزیم دارای ۴۱ اسید آمینه بازی، ۳۸ اسید آمینه اسیدی، ۱۲۷ اسید آمینه آبگریز و ۹۹ اسید آمینه قطبی است. با استفاده از

JN620365	-----ATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA	43
GU358684	-----TAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA	48
GU563800	-----TAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA	48
DQ456876	ATATATATAGTATAGTAATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA	60
ABE41794	-----ATGGGCAGCCAATGCTATTCCGCTTATTCTATCCAATCATTGA	43

JN620365	ACCCACGCTGCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCTCTCTTCTAAACCCAGAG	103
GU358684	ACCCACGCTGCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCAGAG	108
GU563800	ACCCACGCTGCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCAGAG	108
DQ456876	ACCCACGCTGCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCAGAG	120
ABE41794	ACCCACGCTGCCATCATCTTCTTCCTCCTCTGTTATCTTCACTCTTCTTAAACCCAGAG	103

JN620365	TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTGTAATAGTAGTAGAGAAGAAGAAGAATGGCTA	163
GU358684	TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTGTAATAGTAGTAGAGAAGAAGAAGAATGGCTA	168
GU563800	TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTGTAATAGTAGTAGAGAAGAAGAAGAATGGCTA	168
DQ456876	TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTGTAATAGTAGTAGAGAAGAAGAAGAATGGCTA	180
ABE41794	TTCACAGAAGAAGAATCATTACTTGTGTAATAGTAGTAGAGAAGAAGAAGAATGGCTA	163

JN620365	GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGCTTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC	223
GU358684	GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGCTTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC	228
GU563800	GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGCTTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC	228
DQ456876	GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGCTTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC	240
ABE41794	GTGTTGCTGCGATGAATGCTGTGCTTTCGTCATCTGTAGAAGTTGGAATACAGAATCAAC	223

JN620365	AGGAGCTGAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA	283
GU358684	AGGAGCTGAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA	288
GU563800	AGGAGCTGAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA	288
DQ456876	AGGAGCTGAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA	300
ABE41794	AGGAGCTGAAAAAGGAATTGCAGATTTATATGATGAGTCTTCTGGGATTCGGGAAGATA	283

JN620365	TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG	343
GU358684	TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG	348
GU563800	TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG	348
DQ456876	TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG	360
ABE41794	TTTGGGGTGACCATATGCATCATGGATATTATGAACCTAAATCCTCTGTGGAACTTTCAG	343

JN620365	ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTGTGCTATTTCCTG	403
GU358684	ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTGTGCTATTTCCTG	408
GU563800	ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTGTGCTATTTCCTG	408
DQ456876	ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTGTGCTATTTCCTG	420
ABE41794	ATCATCGTGCTGCTCAGATCCGTATGATTGAACAGGCTCTAAGTTTGTGCTATTTCCTG	403

JN620365	AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT	463
GU358684	AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT	468
GU563800	AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT	468
DQ456876	AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT	480
ABE41794	AAGATCCAGCGAAGAAACCAACGTCATAGTTGATGTTGGATGTGGCATCGGTGGCAGTT	463

JN620365	CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC	523
GU358684	CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC	528
GU563800	CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC	528
DQ456876	CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC	540
ABE41794	CTAGGTACCTTGCAAAGAAATATGGCGCTACAGCTAAAGGTATCACTTTGAGTCCTGTAC	523

JN620365	AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC	583
GU358684	AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC	588
GU563800	AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC	588
DQ456876	AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC	600
ABE41794	AAGCAGAGAGGGCTCAAGCTCTTGTGCTGATGCTCAGGGATTAGGTGATAAGGTTTCATTTC	583

JN620365	AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA	643
GU358684	AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA	648
GU563800	AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA	648
DQ456876	AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA	660
ABE41794	AAGTAGCAGACGCCTTGAATCAGCCTTTTCCAGATGGGCAATTCGACTTGGTTTGGTCCA	643

JN620365	TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTGGCGAATTAGCTCGAGTGG	703
GU358684	TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTGGCGAATTAGCTCGAGTGG	708
GU563800	TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTGGCGAATTAGCTCGAGTGG	708
DQ456876	TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTGGCGAATTAGCTCGAGTGG	720
ABE41794	TGGAGAGTGGAGAACACATGCCGAACAAAGAAAAGTTTGTGGCGAATTAGCTCGAGTGG	703

JN620365	CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTGCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCTTCGG	763
GU358684	CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTGCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCTTCGG	768
GU563800	CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTGCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCTTCGG	768
DQ456876	CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTGCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCTTCGG	780
ABE41794	CAGCACCAGGAGGCACAATCATCCTTGTGCACATGGTGCCACAGGGACCTTTCCCTTCGG	763

JN620365	AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC	823
GU358684	AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC	828
GU563800	AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC	828
DQ456876	AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC	840
ABE41794	AGGAATCTCTGACTCCAGAGGAGAAAGAGCTGTTAAATAAGATATGCAAAGCCTTCTATC	823

JN620365	TTCCGGCTTGGTGTTCCTACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG	883
GU358684	TTCCGGCTTGGTGTTCCTACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG	888
GU563800	TTCCGGCTTGGTGTTCCTACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG	888
DQ456876	TTCCGGCTTGGTGTTCCTACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG	900
ABE41794	TTCCGGCTTGGTGTTCCTACTGCTGATTATGTGAAGTTACTTCAATCCAATTCTCTTCAGG	883

JN620365	ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT	943
GU358684	ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT	948
GU563800	ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT	948
DQ456876	ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT	960
ABE41794	ATATCAAGGCAGAAGACTGGTCTGAGAATGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTCATAAAGT	943

JN620365	CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG	1003
GU358684	CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG	1008
GU563800	CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG	1008
DQ456876	CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG	1020
ABE41794	CAGCACTGACATGGAAGGGCTTCACATCAGTACTACGCAGTGGATGGAAGACAATCAAAG	1003

JN620365	CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA	1063
GU358684	CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA	1068
GU563800	CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA	1068
DQ456876	CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA	1080
ABE41794	CTGCACTGGCAATGCCACTGATGATTGAAGGATACAAGAAAGGTCTCATCAAATTTGCCA	1063

JN620365	TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAA-----	1089
GU358684	TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAAATTATTGCTTAGCTACTGCGC-----	1115
GU563800	TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAAATTATTGCTTAGCTACTG-----	1111
DQ456876	TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAAATTATTGCTTAGCTACTGATGAATAATACACATC	1140
ABE41794	TCATCACATGTCGAAAACCTGAATAA-----	1089

شکل ۳: هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی cDNA ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز بین رقم *Memory 1* (با شماره دستیابی *JN620365*) و دیگر اکسشن های ثبت شده از گوجه فرنگی در بانک *NCBI*

GU563800	MGSQCYSAYSISQSLNPTCPSSSSSSSVIF	TLLKPKIHRRIITCCNSSRRRRMASVAAMN	60
GU358684	MGSQCYSAYSISQSLNPTCPSSSSSSSVIF	TLLKPKIHRRIITCCNSSRRRRMASVAAMN	60
DQ456870	MGSQCYSAYSISQSLNPTCPSSSSSSSVIF	TLLKPKIHRRIITCCNSSRRRRMASVAAMN	60
ABE41794	MGSQCYSAYSISQSLNPTCPSSSSSSSVIF	TLLKPKIHRRIITCCNSSRRRRMASVAAMN	60
JN620365	MGSQCYSAYSISQSLNPTCPSSSSSSSVIF	TLLKPKIHRRIITCCNSSRRRRMASVAAMN	60
	*****:*****		
GU563800	AVSSSSVEVGIQNQQELKKGADLYDESSGIRE	DIWGDHMHGYYEPKSSVELSDHRAAQ	120
GU358684	AVSSSSVEVGIQNQQELKKGADLYDESSGIRE	DIWGDHMHGYYEPKSSVELSDHRAAQ	120
DQ456870	AVSSSSVEVGIQNQQELKKGADLYDESSGIRE	DIWGDHMHGYYEPKSSVELSDHRAAQ	120
ABE41794	AVSSSSVEVGIQNQQELKKGADLYDESSGIRE	DIWGDHMHGYYEPKSSVELSDHRAAQ	120
JN620365	AVSSSSVEVGIQNQQELKKGADLYDESSGIRE	DIWGDHMHGYYEPKSSVELSDHRAAQ	120

GU563800	IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGG	SSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ	180
GU358684	IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGG	SSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ	180
DQ456870	IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGG	SSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ	180
ABE41794	IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGG	SSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ	180
JN620365	IRMIEQALSFAAISEDPAKKPTSIVDVGCGIGG	SSRYLAKKYGATAKGITLSPVQAERAQ	180

GU563800	ALADAQGLGDKVSFQVADALNQFPDPGQFDLV	SMESGEHMPNKEK FVGELARVAAPGGT	240
GU358684	ALADAQGLGDKVSFQVADALNQFPDPGQFDLV	SMESGEHMPNKEK FVGELARVAAPGGT	240
DQ456870	ALADAQGLGDKVSFQVADALNQFPDPGQFDLV	SMESGEHMPNKEK FVGELARVAAPGGT	240
ABE41794	ALADAQGLGDKVSFQVADALNQFPDPGQFDLV	SMESGEHMPNKEK FVGELARVAAPGGT	240
JN620365	ALADAQGLGDKVSFQVADALNQFPDPGQFDLV	SMESGEHMPNKEK FVGELARVAAPGGT	240

GU563800	IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAF	YLPAWCSTADYVKLLQSNLQDIKAED	300
GU358684	IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAF	YLPAWCSTADYVKLLQSNLQDIKAED	300
DQ456870	IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAF	YLPAWCSTADYVKLLQSNLQDIKAED	300
ABE41794	IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAF	YLPAWCSTADYVKLLQSNLQDIKAED	300
JN620365	IILVTWCHRDLSPSEESLTPEEKELLNKICKAF	YLPAWCSTADYVKLLQSNLQDIKAED	300

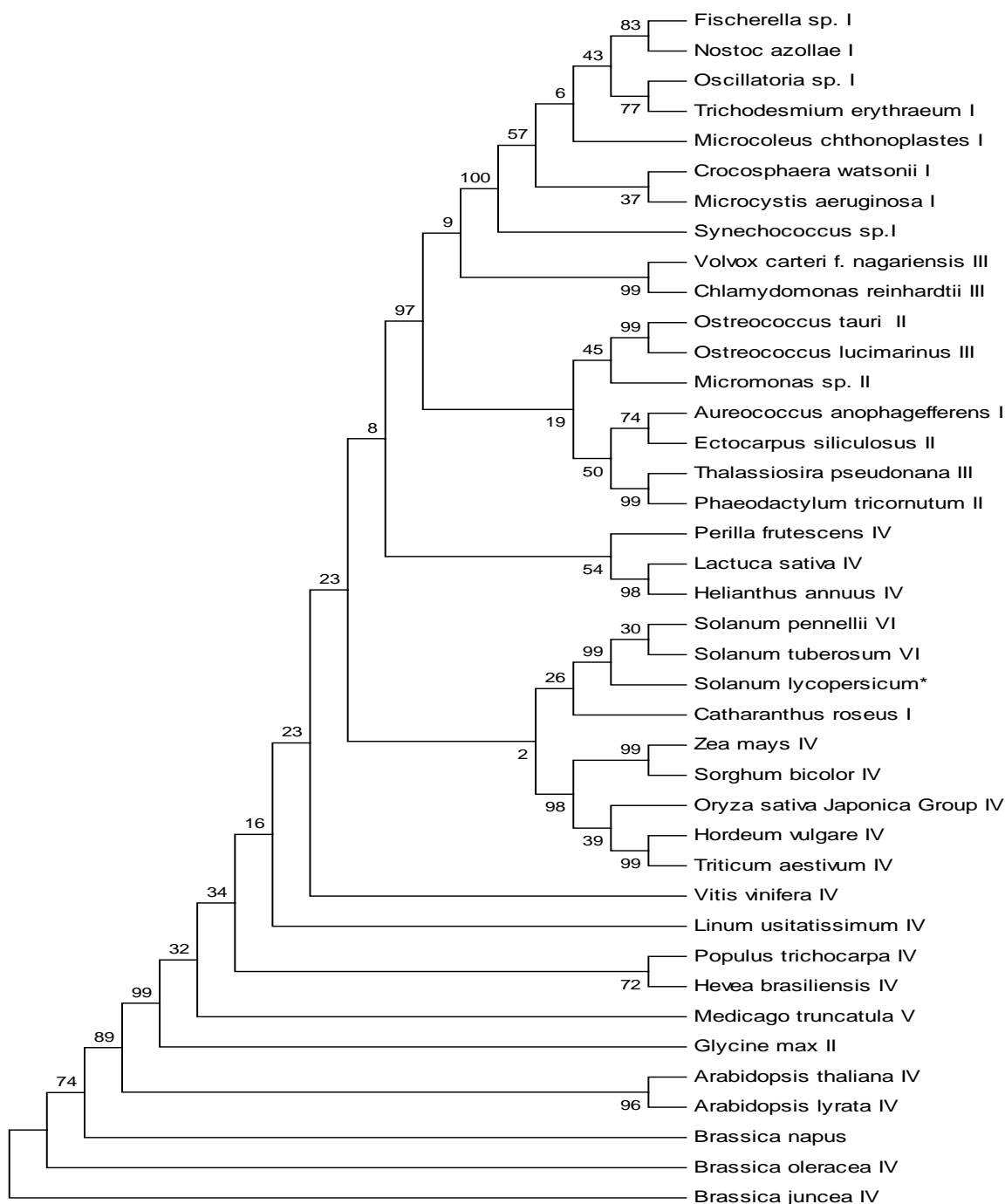
GU563800	WSENVAPFWPAVIKSALTWKGF	TSVLRSGWTKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK	360
GU358684	WSENVAPFWPAVIKSALTWKGF	TSVLRSGWTKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK	360
DQ456870	WSENVAPFWPAVIKSALTWKGF	TSVLRSGWTKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK	360
ABE41794	WSENVAPFWPAVIKSALTWKGF	TSVLRSGWTKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK	360
JN620365	WSENVAPFWPAVIKSALTWKGF	TSVLRSGWTKAALAMPLMIEGYKKGLIKFAIITCRK	360

GU563800	PE	362	
GU358684	PE	362	
DQ456870	PE	362	
ABE41794	PE	362	
JN620365	PE	362	
	**		

شکل ۴: هم‌ریدیف سازی توالی اسید آمینه ای منتج شده از DNAی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز بین رقم *Memory 1* (با شماره دستیابی JN620365) و دیگر اکسشن های ثبت شده از گوجه فرنگی در بانک NCBI.

شماره ی دستیابی ADZ24710 و ADV36922 و کمترین تشابه را با *Synechococcus* با ۳۲ درصد، نشان داد. ساختار دوم پروتئین در اثر فعل و انفعالات پیوند هیدروژنی باقی مانده اسیدهای آمینه در داخل یا بین زنجیره های پپتیدی ایجاد می شود. پیش بینی ساختار دوم پروتئین ژن هدف با استفاده از نرم افزار آنلاین PSIPred صورت گرفت و نتایج نشان داد که این پروتئین از ۱۶ مارپیچ آلفا، ۸ صفحه ی بتا و ۲۳ کوپیل تشکیل شده است (شکل ۴).

بررسی درخت فیلوژنتیکی ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز با استفاده از نرم افزار Clustalw صورت گرفت. به همین منظور از ژن های گاما توکوفرول متیل ترانسفراز دیگر گیاهان ثبت شده در NCBI استفاده شد (شکل ۵). بررسی های انجام شده با استفاده از نرم افزار Clustalw نشان داد که پروتئین منتج از ژن همسانه سازی شده با پروتئین های ثبت شده مشابه در بانک ژن NCBI، ۳۲ تا ۹۹/۵ درصد تشابه دارد. ژن توالی یابی شده با داشتن ۹۹/۵ و ۹۸/۶ درصد، بیشترین تشابه را به ترتیب با توالی های *Solanum tuberosum* و *Solanum penellii* با



شکل ۵: درخت فیلوژنتیک پروتئین گاما توکوفرول متیل ترانسفراز گیاهان موجود در NCBI. I. توالی هایی که با پروتئین منتج شده از ژن توالی یابی شده ۳۰ تا ۴۰ درصد شباهت دارند. II. توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۴۰ تا ۵۰ درصد شباهت دارند. III. توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۵۰ تا ۶۰ درصد شباهت دارند. IV. توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۷۰ تا ۸۰ درصد شباهت دارند. V. توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۸۰ تا ۹۰ درصد شباهت دارند. VI. توالی هایی که با پروتئین ژن توالی یابی شده ۹۰ تا ۹۹ درصد شباهت دارند. * توالی پروتئین مورد بررسی.

مدل سازی تطبیقی، روشی معتبر برای پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین ها بر اساس توالی اسید آمینه می باشد. برای ترسیم ساختار سوم پروتئین ژن هدف توالی اسید آمینه ای آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در سایت PS2 مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم سارکوزین دی متیل گلیسین متیل ترانسفراز (*Galdieria sulphuraria* (PDB 2057) با ۲۱ درصد شباهت به عنوان الگو در نظر گرفته شد (شکل ۷).

بحث

در گیاهان فتوسنتز کننده، توکوفرول ها در پاسخ به بسیاری از تنش های غیر زنده افزایش نشان می دهند؛ از جمله نور شدید (۲۲) خشکی (۲۳) و دماهای پایین و بالا (۲۴). بیشتر توکوفرول ها در گیاهان در پلاستید ها قرار دارند، تنها استثنا در این مورد، گیاهان دانه روغنی است که توکوفرول ها در دانه این گیاهان به صورت ذرات روغن (oil bodies) که از شبکه آندوپلاسمی منشا می گیرند، ذخیره می شوند (۱۴). این مطالعه با هدف همسانه سازی ژن گاماتوکوفرول متیل ترانسفراز از گیاه گوجه فرنگی، مطالعه و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و ملکولی پروتئین منتج از آن و در نهایت، انتقال آن به یک گیاه دانه روغنی، در پژوهش های آینده صورت گرفت. انتقال این ژن (گاما توکوفرول متیل ترانسفراز) می تواند هم ارزش غذایی گیاه را به دلیل تولید بیشتر آلفا توکوفرول بالا ببرد و هم از نظر افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش ها، مفید واقع شود.

ژن همسانه سازی شده با ژن های ثبت شده گوجه فرنگی در بانک ژن ۹۸ درصد شباهت را نشان داد. تفاوت هایی در موقعیت های ۸۴، ۲۷۳، ۵۶۱ و ۶۴۲ در بین توالی های نوکلئوتیدی همردیف سازی شده بین ژن ثبت شده در این پژوهش با شماره دستیابی JN620365، با ژن ثبت شده با شماره دستیابی DQ456876 که به عنوان توالی مرجع استفاده شده بود، مشاهده گردید (شکل ۳). این تفاوت ها به ترتیب شامل جایگزینی یک نوکلئوتید A به جای T، یک نوکلئوتید C به جای T، یک نوکلئوتید A به جای G و یک نوکلئوتید C به جای G می شد. این تغییرات به ترتیب باعث تبدیل کدون ACT به TCT، کدون TGG به CGG، کدون GGA به GGG و TCC به TCG شده اند (شکل ۴). در دو موقعیت ۸۴ و ۲۷۳ جایگاه اول کدون و در موقعیت ۵۶۱ و ۶۴۲ جایگاه سوم کدون تغییر یافته اند. تغییر در جایگاه ۸۴ موجب تبدیل اسید آمینه ی ترئونین به سرین، در جایگاه ۲۷۳ اسید آمینه ی تربیتوفان به

آرژنین و در موقعیت های ۵۶۱ و ۶۴۲، به ترتیب، کدون گلیسین و سرین به کدون های دیگری از همین اسیدهای آمینه تبدیل شده اند (شکل های ۴ و ۵). در بین چهار تغییری که در کدون ها رخ داده بود، تنها دو کدون، اسیدهای آمینه متفاوتی را بوجود می آورند. تبدیل اسید آمینه ترئونین به سرین (تغییر در جایگاه ۸۴) شاید باعث تغییر عمده ای در ساختار و عملکرد پروتئین حاصله نشود؛ زیرا هر دوی این اسید های آمینه از نظر ساختاری بسیار به هم شبیه و جزو اسید های آمینه قطبی بدون بارند. اما تبدیل اسید آمینه تربیتوفان به آرژنین (تغییر در جایگاه ۲۷۳) می تواند تغییر اساسی در ساختار و در نتیجه در عملکرد پروتئین حاصله داشته باشد؛ زیرا تربیتوفان جز اسیدهای آمینه آبگریز و آرژنین جز اسیدهای آمینه بازی دارای بار مثبت است. چنین جایگزینی یک تغییر عمده در قسمتی از ساختار و خصوصیت بیوشیمی یک پروتئین محسوب می شود. این تغییر در سه اکسشن دیگر گوجه فرنگی هم به چشم می خورد (شکل ۵). حال این که کدام یک از این آیزوفرم ها می تواند گاما توکوفرول را به آلفا توکو فرول تبدیل نماید و یا با کارایی بیشتری این عمل را انجام دهد، به انتقال این آیزوفرم ها به گیاهان جهش یافته ی فاقد این ژن و بررسی میزان تولید آلفا تو کو فرول در آن ها نیاز دارد. در هر صورت، پروتئین حاصله دارای ۳۶۲ اسید آمینه و وزن ملکولی حدود ۳۹ kD است که با پروتئین های مشابه از گیاه فلفل زنگوله ای با وزن ملکولی ۳۳ kD (۱۰) و پروتئین فلفل دلمه ای با وزن ملکولی ۳۶ kD (۲۵) مشابهت دارد.

مشاهده گردید که ژن به دست آمده در این مطالعه دارای توالی راهنمای پلاستییدی است. این یافته با حضور توکوفرول ها در کلروپلاست مطابقت دارد (۱۴)، به این معنی که این آنزیم باید جهت تبدیل گاما توکوفرول به آلفا توکوفرول، به مکان سوبسترای خود (درون کلروپلاست)، حمل گردد. توکوفرول های آلفا، بتا، گاما و دلتا دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی مختلفی در برابر اکسایش لیپیدها در شرایط *in vivo* دارند. هر ملکول از این توکوفرول ها می تواند به ترتیب علیه ۲۲۰، ۱۲۰، ۱۰۰ و ۳۰ ملکول PUFA (polyunsaturated fatty acid) فعالیت داشته باشد. همچنین پیشنهاد شده که توکوفرول ها نقش مهمی را در محافظت از دستگاه فتو سنتزی گیاه دارند و دیده شده است که در پا سخ به تنش های غیر زنده مانند خشکی و وجود فلزات سنگین افزایش نشان می دهند (۲۶). تبدیل گاما توکوفرول به شکل فعال تر آن یعنی آلفا توکوفرول توسط آنزیم گاما توکوفرول

5. Wang YeuMing, Purewal M, Nixon B, Li H, et al. Vitamin E and cancer prevention in an animal. Model. Ann NY. Acad. Sci. 1989; 570: 383-91.
6. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, et al. Oxygen radical and human disease. Ann. Inter. Med. 1987; 107: 526-45.
7. Arango Y, Heise K. Localization of alpha-tocopherol synthesis in chromoplast envelope membrane of *Capsicum annum* L. Fruits J Exp Bot. 1998; 49: 1259-1262.
8. Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science. 1998; 282: 2098-2100.
9. Soll J, Kemmerling M, Schultz G. Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. Arch Biochem Biophys. 1980; 204: 544-550.
10. Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, et al. Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelop membranes from spinach chloroplasts. Arc Biochem Biophys. 1985; 238: 290-299.
11. d'Harlingue A, Camara B. Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis. J Biol Chem. 1985; 260: 15200-15203.
12. Kurk j, Hollander-Czytko H, Oett meier W, Trebst A. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. J Plant Physiol. 2005; 162: 749-757.
13. Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. Plant Physiol. 2008; 147: 764-778.
14. Maeda H, Song W, Sango TL, Dellapenna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in Arabidopsis. Plant Cell. 2006; 18: 2710-2732.
15. Kim MJ, Baek SH, Yoo NH, Yun SJ. Transformation of Arabidopsis gamma-tocopherol methyltransferase into lettuce (*Lactuca sativa* L.) Korean J Plant Tiss Cult. 2005; 27: 435-439.
16. Yusuf MA, Sarin NB. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of *Brassica juncea* with γ -TMT gene for increased α -tocopherol content. Transgenic Res. 2007; 16: 109-113.
17. Lee BK, Kim SL, Kim KH, YU SH, et al. Seed specific expression of perilla gamma-tocopherol methyltransferase increases alpha-tocopherol content in transgenic perilla (*Perilla frutescens*). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008; 92: 47-54.

متیل ترانسفراز صورت می‌گیرد (۱۶) که انتقال این ژل به گیاهان هدف، از جمله گیاهان دانه روغنی می‌تواند در افزایش خاصیت تغذیه ای و عملکرد آن‌ها در شرایط سخت نقش مهمی را ایفا نماید.

نتیجه‌گیری

آلفا توکوفرول ماده ضد اکسند قوی است که طی واکنش بیوشیمیایی از گاما توکوفرول ساخته می‌شود. با افزایش میزان این آنزیم از طریق مهندسی ژنتیک می‌توان محتوای ویتامین E گیاه و مقاومت آن را در برابر تنش های محیطی بالا برد. مهندسی ژنتیکی را می‌توان جایگزین بالقوه‌ی منبع ویتامین E با فرض تولید مقرون به صرفه‌ی اقتصادی نسبت به تولید شیمیایی آلفاتوکوفرول در نظر گرفت. در میان گیاهان دانه روغنی بعلت غنی بودن از گاما توکوفرول بهترین هدف تولید اقتصادی توکوفرول‌ها از طریق مهندسی مسیر بیوسنتزی آنها می‌باشد. بنابراین برای ابر بیان ژن گاما توکوفرول متیل ترانسفراز در گیاهان مذکور باید ژن همسانه سازی شده در ناقل pBluescript را به یک ناقل بیانی همسانه سازی کرد و به گیاهان دانه روغنی انتقال داد.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از بودجه گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) تامین گردید که به این وسیله تشکر می‌گردد.

منابع

1. Traber MG, Sies H. Vitamin E and humans: demand and delivery. Annu Rev Nutr. 1996; 16: 321-347.
2. Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Leishman DJ, Duthie GG, et al. Purification and partial characterization an α -tocopherol binding protein from rabbit heart cytosol. Mol Cell Biochem. 1993; 123: 139-44.
3. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* Antioxidant. Ann NY. Acad. Sci. 1989; 570: 7-22.
4. Stahelin, HB, et al. Cancer Mortality and Vitamin E Status. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1989; 570: 391-99.

18. Ghimirie BK, Seong ES, Lee CO, Lim JD, et al. Enhancement of α -tocopherol content in transgenic *Perilla frutescens* containing the γ -tmt gene. 2011; 10: 2430-2439.
19. Tavva VK, Kim YH, Kagan IA, Dinkins RD, et al. Increased alpha-tocopherol content in soybean seed over expressing the *Perilla frutescens* gamma-tocopherol methyltransferase gene. Plant Cell Rep. 2007; 26: 61-70.
20. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real time RT-PCR during berry development. BMC Plant Biol. 2006; 6: 27. doi: 10.1186/1471-2229-6-27.
21. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 2001; 1524-1526.
22. Ledford HK, Baroli I, Shin JW, Fischer BB, et al. Comparative profiling of lipid –soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophylls-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Genet Genomics. 2004; 272: 470-479.
23. Munne-Bosch S, Schwarz K, Alegre L. Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpene in water-stressed rosemary plants. Plant Physiol. 1999; 121: 1047-1052.
24. Bergmuller E, Porfirova S, Dormann P. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. Plant Mol Biol. 2003; 52: 1181-1190.
25. Koch M, Lemek R, Heise K, Mock H. Characterization of γ -tocopherol methyltransferases from *Capsicum annuum* and *Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem. 2003; 270: 84-92.
26. Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, et al. Overexpression of γ -tocopherol methyltransferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. Biochemica et Biophysica Acta. 2010; 1797: 1428-1238.

Molecular Characterisation of Gamma Tocopherol Methyl Transferase (γ -tmt) From Tomato CV Memory 1

Raoufzadeh T, M.Sc.¹, Hosseini R, Ph.D.^{2*}

1. M.Sc. Graduated Student in Agricultural Biotechnology

2. Assistant Lecturer in Agricultural Biotechnology Department

* Email corresponding author: raminh_2001@Tahoo.com & r.hosseini@ikiu.ac.ir

Received: 10 Dec. 2011

Accepted: 19 Jun. 2012

Abstract

Aim: The aim of this research was the cloning and sequencing of gamma tocopherol methyl transferase gene (γ -tmt) from Memory 1 cv and transferring it into an oilseed plant such as canola, in the future studies for improving its nutritional value.

Material and Methods: Total RNA was extracted from tomato fruit and cDNA constructed. By using specific primers the γ -tmt gene was amplified by PCR reaction and a 1089 bp fragment was produced. The amplified fragment and the pBluescript (SK-) vector were digested by *Xba*I. The ligation reaction was carried out by T4 ligase. *E. coli* competent cells were transformed by the resulting vector and recombinant colonies were identified using the white-blue screening assay.

Results: The nucleotide sequence of the gene was determined and aligned with the available sequences recorded in the NCBI data bank. This sequence showed 98% similarity with the other recorded γ -tmts from Solanaceae family. Some changes in nucleotide sequence and the deduced amino acids were observed. The secondary and tertiary structures of the protein were predicted, using PSIPred software. A phylogenetic tree was also constructed for the protein product of the gene, using ClustalW.

Conclusion: The cloned cDNA of γ -tmt showed 98 % similarity with the recorded sequence from tomato cv Cerasiforme. Upon transfer of this gene into an oil seed plant such as canola, one can increase both its nutritional value and resistance to environmental stresses.

Keywords: Gamma tocopherol methyltransferase, Secondary structure, Vitamin E