

جداسازی، همسانه‌سازی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی زیر واحد I ژن سیتوکروم اکسیداز C در مرکبات

علی عباسی^۱، مریم غایب زمهریر^{۲*}، مسعود توحیدفر^۳ و نادر حسن زاده^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی

^۲ ایران، تهران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی و زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی



تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۳

چکیده

سیتوکروم اکسیداز C، کمپلکس پروتئینی در غشای داخلی میتوکندری یوکاریوتها و غشای پلاسمایی پروکاریوت‌های هوازی است که به عنوان آخرین آنزیم در چرخه انتقال الکترون به اکسیژن ایفای نقش می‌کند. سیتوکروم اکسیداز C در ساختار خود ۳ زیر واحد (۲، ۱ و ۳) دارد. در این مطالعه زیر واحد ۱ سیتوکروم سی اکسیداز متعلق به پرتقال *Citrus sciences* بررسی شد. به این منظور پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالیهای حاصل از مطالعه قبلی cDNA-AFLP بر روی گریپ‌فروت، پرتقال، لیمو ترش، نارنگی و سلطان مرکبات، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر شد و در پلاسمید pGEM-T همسانه شد. انتخاب نوترکیبها از طریق سیستم گزینش آبی - سفید صورت گرفت. قطعات همسانه شده برای تأیید نهایی توالی یابی شدند. بررسی نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن پروتئینی با وزن مولکولی ۲۳۰۵۹/۳۴ کیلودالتون را کد کرده و دارای ۲۱۷ اسیدآمینو بوده و نقطه ایزوالکتریک آن ۴/۹۴ می‌باشد. هدف این مطالعه جداسازی و همسانه‌سازی ژن سیتوکروم اکسیداز از ژنوم گیاه پرتقال و تعیین مشخصات آن است.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، سیتوکروم C، پرتقال، ژنوم میتوکندری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۷۰۸۱۲۸، پست الکترونیکی: zamharir2005@yahoo.com

مقدمه

اساسی در فعالیت آن دارند. وزن این کمپلکس ۲۰۰ kD است. آنزیم سیتوکروم C اکسیداز آنزیمی است که به طور عمومی در کلیه موجودات زنده وجود دارد (۱۳ و ۲۲). این حقیقت بیانگر آن است که آنزیم مذکور از تکامل قدیمی برخوردار است و احتمالاً در یک موجود قدیمی ابتدا به وجود آمده و طی تکامل و ایجاد نسل‌های بعدی به همه موجودات انتقال یافته است (۱۷). این ژن با توجه به اینکه در داخل میتوکندری قرار دارد دارای جایگاه اختصاصی خوبی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین راسته‌های مختلف موجودات است. اکسیدازها (oxidase) به

در طول دهه‌های اخیر ژنتیک دانان از ژن سیتوکروم اکسیداز برای بررسی تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای موجودات زنده استفاده کرده‌اند. سیتوکروم اکسیداز آخرین آنزیم زنجیره تنفسی میتوکندری است و وظیفه انتقال الکترون از سیتوکروم احیاء شده به اکسیژن را برعهده دارد. سیتوکروم اکسیداز خود یک کمپلکس پروتئینی در غشای داخلی میتوکندری است. این کمپلکس از ۱۳ زیر واحد پروتئینی تشکیل شده که ۱۰ عدد آن توسط ژنوم هسته و ۳ عدد باقیمانده توسط ژنوم میتوکندری کد می‌شود (۲۲). زیر واحدهای کد شده توسط ژنوم میتوکندری نقش

حساسیت یا مقاومت به یک پاتوژن تغییر می‌کند (۲۳؛ ۲۶؛ ۲۷ و ۳۱).

نتایج تحقیقی که به تازگی انجام پذیرفته است نشان می‌دهد بیان این ژن در مرکبات در طی آلودگی به بیماری میوه سبز مرکبات تغییر می‌کند (۷). همچنین این آنزیم در مقاومت القایی و اکتسابی سیستمیک گیاهان به پاتوژنها عمل می‌کند (۲۰ و ۳۲). با توجه به اهمیت این آنزیم در انتقال سیگنال در بیماریهای مختلف گیاهی هنوز اطلاعات زیادی در مورد خصوصیات پروتئینی آن در گیاهان مختلف از جمله پرتقال وجود ندارد. به این منظور در این مطالعه برای اولین بار به جداسازی، همسانه سازی، و بررسی خصوصیات پروتئین این آنزیم در پرتقال پرداخته شده است.

مواد و روشها

تهیه نمونه های گیاهی و استخراج دی ان ای: نمونه های برگگی از پرتقال *Citrus sinensis* (L.) Osbeck از باغات جنوب کرمان (جیرفت) تهیه شد. نمونه ها پس از جمع آوری بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند. استخراج DNA کل از برگ نمونه های جمع آوری شده به روش CTAB (۳) انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR: بر اساس مطالعات cDNA-AFLP بر روی گریپ فروت، پرتقال، لیمو ترش، نارنگی (۶) و سلطان مرکبات (۵ و ۱۸) آغازگرهای مختلف به منظور جداسازی ژن سیتوکروم اکسیداز *COI* از روی پرتقال با استفاده از نرم افزار Vector NTI طراحی شد. از جمله مناسب ترین آنها، آغازگر 5'-CGGGGCGTCTAACTCATAGA-3' به عنوان آغازگر روبه جلو و توالی 5'-GGGAAAGACAACCTTGGA-3' به عنوان آغازگر برگشتی در نظر گرفته شدند. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام

عنوان آنزیم پایانی در پمپ پروتئینی آهن-مس اکسیداز و در زنجیره انتقال تنفسی در یوکاریوتها و پروکاریوتها (۶) حضور دارد. این کمپلکس آنزیمی در زیرواحد کاتالیک خود شامل ۴-۳ زیرواحد در پروکاریوتها و ۱۳ واحد در یوکاریوتها می‌باشد. زیرواحدهای متنوع اکسیداز تنفسی اجازه رشد در شرایط مختلف محیطی را به موجودات می‌دهد. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که Cytochrome c oxidase در یوباکتریها از باکتریهای گرم مثبت و آرکی باکتریها مشتق شده است و پیشنهاد شده است یوباکتریها از طریق انتقال ژن این آنزیم را از باکتریهای گرم مثبت دریافت کرده‌اند (۶). زیرواحد ۱ آنزیم سیتوکروم اکسیداز سی (COI) ۶۴۸ جفت باز طول دارد و به تنهایی این ظرفیت را دارد که تا حدود ۹۸ درصد از گونه های جانوری را در تاکسونهای مختلف شناسایی کند (۲۳).

تنوع ژن سیتوکروم C اکسیداز در گیاهان نسبت به جانوران بسیار اندک است و برای گیاهان از دو ژن کلروپلاستی *matK* و *rbcL* برای مطالعه تنوع ژنتیکی بیشتر استفاده می‌شود (۲۵ و ۳۳). لذا خصوصیات این آنزیم در گیاهان کمتر مورد توجه قرار گرفت و در حال حاضر اطلاعات کمی از خصوصیات این آنزیم که آنزیم کلیدی در تولید انرژی در میتوکندری است در گیاهان وجود دارد (۲۴، ۲۵ و ۳۲). علاوه بر این تحقیقات اخیر نشان می‌دهد این آنزیم نه تنها یک آنزیم کلیدی در تولید انرژی در میتوکندری است، بلکه نقش مهمی در اکسیداز جایگزین در طی تشهای زیستی و غیرزیستی دارد (۱۱ و ۲۳). اکسیداز جایگزین (AOX) یک واکنش اکسیداز پایانی بدون ذخیره انرژی در چرخه انتقال الکترون در میتوکندری گیاهان است که با استراحت دادن به چرخه تنفس کربن و انتقال الکترون فعال می‌شود و واکنش احیای چهار الکترونی اکسیژن به آب را کاتالیز می‌کند (۲۳ و ۳۱). مطالعات اخیر نشان داد که بیان این ژن در گیاهان در واکنشهای مختلف

پذیرفت. آنزیم DNA پلیمرز Taq با حجم ۲ یونیت، آغازگرهای رو به جلو و برگشتی ۰/۵ میکرومولار، DNA الگو ۵۰۰ نانوگرم، دو میلی مولار $MgCl_2$ ۰/۸، میکرومولار dNTP ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش و آب مقطر تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید. برنامه انجام PCR شامل واسرشتگی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و انجام ۳۵ سیکل متوالی (۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه) انجام شد. این آغازگر قطعه ای به طول ۴۵۰ bp را در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر نمود.

برای هم‌ردیفی چندگانه توالیها به کار رفت و برای رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم‌افزار MEGA6 به روش UPGMA انجام شد. عملکرد و هدف‌گیری پروتئین به ترتیب در بانک Blocks، و TargetP انجام شد. تعیین قسمتهای درون، خارج سلولی و غشایی پروتئین با استفاده از برنامه TMHMM (Prediction of transmembrane helices in proteins) صورت گرفت.

با استفاده از بانک swissprot مشخصات پروتئین بررسی شد. از سرور Interproscan دومینهای موجود در پروتئینها و کارکرد آنها به دست آمد. دامنه‌های محافظت شده ژن مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از نرم افزار Interproscan (Protein sequence analysis & classification) بررسی شد. همچنین محتوی GC با استفاده از نرم افزار protparam که زیر مجموعه بانک اطلاعاتی UniProtKB است، به دست آمد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل تعداد آمینواسید پروتئین، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، درصد چربی و درصد آبگریزی در این مطالعه با protparam صورت گرفت. الگوی جانیشینی، مدل جایگزینی و D-Tajima توالی پروتئین نیز تعیین گردید. برای پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئینها از نرم‌افزار PSIPRED و سرور GoRI استفاده شد.

نتایج

پس از استخراج DNA از گیاهان مرکبات، PCR به منظور تکثیر ژن CO1 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در مرحله قبل صورت گرفت. اندازه محصول PCR یک قطعه ۴۵۰ جفت بازی بود (شکل ۱).

آنالیز بلاست نشان داد که توالی مورد نظر بیشترین شباهت (۹۰ درصد) را با ژن اکسیداز میتوکندریایی *Chondrostoma sp* که جزء یوکاریوت است دارد. عدم

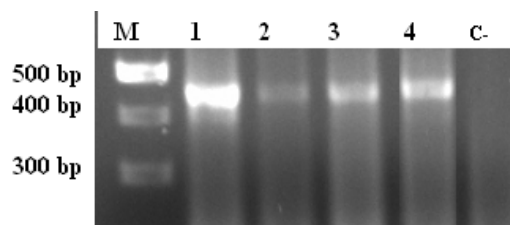
همسانه سازی در ناقل ژنی pGEM-T: خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction (Vivantis, Malasia) عمل همسانه سازی در پلاسمید (Promega, Cat number pGEM-T easy pGEM-T easy vector system A3600) به روش سمبروک و همکاران ۲۰۰۱ vector system I صورت گرفت. انتخاب نوترکیبها به روش کلونی سفید و آبی انجام شد. تکثیر نوترکیبها در *E. coli* نژاد Top10 صورت گرفت. باکتریهای نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند. پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، تعدادی کلنی سفید به عنوان کلنیهای نوترکیب انتخاب و در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت Plasmid Extraction Kit (Vivantis, Malasia) انجام گرفته و کلنیهای نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR برای تأیید حضور قطعه ژنتیکی وارد شده مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 در شرکت ماکروژن (کره جنوبی) انجام شد.

آنالیزهای تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی: با استفاده از بانک ژن بین‌المللی NCBI و موتور جستجوگر BLAST، توالیهای نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن CO1 به همراه ویژگیهای آن در پرتقال و چندین گونه دیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. برنامه T-Coffee به آدرس

مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 در شرکت ماکروژن (کره جنوبی) انجام شد.

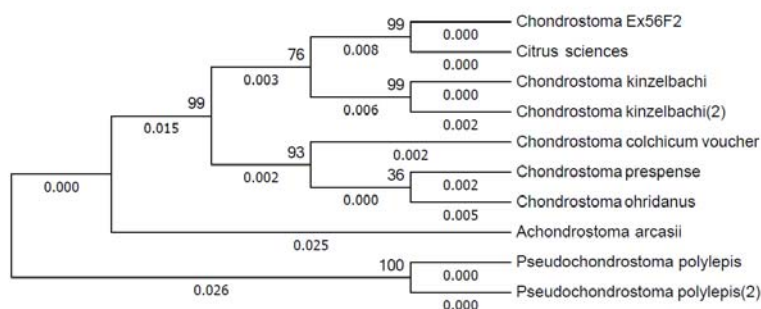
تحقیق درخت فیلوژنی رسم شد، تا میزان شباهت آنها با سایر گیاهان موجود در پایگاه بررسی شود. در این آنالیز سعی شد از توالیهایی استفاده شود که در گونه‌های نظیر مشابه باشند. آنالیز فیلوژنی ۶ گروه ایجاد گردید و فقط در یک گروه توالی موردنظر با یک نوع ماهی *Chondrostoma* با هم قرار گرفتند که نشان می‌دهد توالی جدا سازی شده بیشترین شباهت را با *Chondrostoma* دارد. اگر چه این دو مربوط به موجودات مختلف هستند، ولی این ژن در آنها وجود دارد. در بقیه گروهها موجودات یک نوع با هم قرار دارند. فقط دو گروه که شامل *Achondrostoma arcasii* با کد پذیرش KJ552537 و *C. colchicum* با کد پذیرش KU729241 است، به طور جداگانه از بقیه گروهها قرار گرفته اند که کمترین شباهت را و دورترین فاصله را با بقیه گروهها در ماتریس تشابه با بقیه گروهها نشان دادند. نکته مهم این است که وجود ژن مورد نظر در موجودات مختلف نشان دهنده نقش کلیدی آن است که توانست به صورت حفاظت شده در موجودات مختلف ظاهر شود.

شباهت آن با *Citrus* به علت نبود ژنوم میتو کندریایی در بانکهای اطلاعاتی است که تاکنون ژنوم آن در دسترس عموم قرار نگرفته است و در بانکهای اطلاعاتی موجود نیست.



شکل ۱- تکثیر ژن *COI* از روی DNA حاصل از گیاهان پرتقال (راهک ۱) نارنگی (راهک ۲) و گریپفروت (راهک ۳ و ۴) کنترل منفی (راهک C-) و M سایز مارکر ۱۰۰ bp (فرمتناز).

آنالیزهای بیشتر نشان داد که توالی جداسازی شده جزء قسمتی از توالی کد کننده ((Coding sequence (CDS)) است که به طور کامل توالی یابی نشده است. آنالیزهای هم‌ردیفی چند تایی با استفاده از نرم افزار T-coffee نشان داد که کل توالی، حفاظت شدگی بالایی در موجودات مختلف دارد که نشان از نقش مؤثر این ژن در عملکردهای حیاتی در طول تکامل دارد. به منظور بررسی روابط تکاملی بین مرکبات مختلف مورد مطالعه در این



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی زیر واحد I ژن سیتوکروم اکسیداز با همتای خود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA6. گونه‌های نام برده در شاخه به ترتیب *Chondrostoma kinzelbachi* (KJ553146)، *C. kinzelbachi* (KJ553200)، *C. colchicum* (KU729241)، *C. ohridanus* (KJ552832)، *C. prespense* (KJ552842)، *Achondrostoma arcasii* (KJ552537)، *P. polylepis isolate Ex38G8* (KJ554113)، *Pseudochondrostoma polylepis* (KJ554190).

داخل سلولی و خارج سلولی است که به صورت متوالی در طول پروتئین قرار دارند.

بررسی ساختار دوم پروتئین ژن مورد نظر نشان داد که زنجیره α این پروتئین کمتر از زنجیره بتای آن است. آنالیز دامنه‌ها نشان داد که این پروتئین دارای سه دامنه غشایی،

بالاست تاجیما D مثبت (بزرگتر از صفر) دارند و با انتخاب متعادل در جمعیت همراه هستند.

بحث

داده‌های به دست آمده در مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیان ژن سیتوکروم اکسیداز در برهمکنش مرکبات با باکتری عامل میوه سبز مرکبات تغییر می‌کند (۳، ۷ و ۸). مطالعه دیگر نشان داد بیان این ژن در واکنش گیاهان حساس گوجه فرنگی به ویروس سرکوپه ای افزایش می‌یابد (۶، ۹ و ۲۲). این ژن برای اولین بار از گیاه پرتقال جدا شد. شماره دسترسی به این ژن در بانک جهانی ژن K775596 است. این اولین گزارش از جداسازی و همسانه سازی این ژن می‌باشد.

آنالیز محتوی GC با استفاده از سرور ProtParam نشان داد درصد GC در ژن سیتوکروم اکسیداز پرتقال بالاست. هر چه درصد GC در ژن بیشتر باشد، پایداری ژن و در نتیجه پایداری پروتئین تولید شده از آن بیشتر خواهد بود، زیرا بین سیتوزین و گوانین سه پیوند هیدروژنی و بین آدنین و تیمین دو پیوند هیدروژنی برقرار است (۱۴). باند هیدروژنی بیشتر باعث پایداری بیشتر ژن و پروتئین در برابر حرارت می‌شود (۱۲ و ۱۴).

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئینها می‌تواند برای شناخت بهتر پروتئینها و شناسایی آنها بسیار سودمند باشد. با توجه به وزن مولکولی تخمین زده شده، این پروتئین جزء پروتئینهای با وزن مولکولی بالا می‌باشد (۲۸). در نقطه pH ایزوالکتریک، آمینواسید و پروتئین بار خود را از دست می‌دهد. یکی از کاربردهای نقطه ایزوالکتریک انتخاب روش مناسب برای خالص‌سازی پروتئین مانند تبادل یونی و الکتروفوروز ایزوالکتریک فوکوسینگ می‌باشد (۲۸ و ۲۹). پروتئینهایی که در محدوده pH ایزوالکتریک قرار دارند مجموع بار مثبت و منفی رشته پپتیدی با یکدیگر برابر بوده و پروتئین توانایی نگهداری آب را ندارد

آنالیز در پایگاه Blocks نشان داد که پروتئین این ژن با $e\text{-value} = 2.4e-142$ متعلق به خانواده سیتوکروم اکسیداز c است که این خانواده ۸ بلوک حفاظت شده دارد. نتایج مربوط به هدف‌گیری نشان داد که پروتئین این ژن با احتمال بالا به صورت ترشحی عمل می‌کند.

درصد GC این ژن ۴۶/۶۵ درصد تخمین زده شد. آنالیز محتوی GC مشخص کرد که ژنهایی با محتوی GC بالا پایداری بیشتری در برابر حرارت نسبت به ژنهایی با محتوی GC کمتر دارند.

وزن مولکولی این پروتئین ۲۳۰۵۹/۳۴ دالتون و تعداد اسیدآمینوهای آن ۲۱۷ عدد تخمین زده شد. مقدار دامنه ایزوالکتریک این پروتئین ۴/۹۴ است. بعلاوه GRAVY (خاصیت آبگریزی پروتئین) ۰/۹۱۷ می‌باشد. شاخص ناپایداری پروتئین ۲۴/۹۴ و Aliphatic Index آن ۱۲۴/۹۸ تعیین گردید. این نتایج نشان می‌دهد که این پروتئین، جزء پروتئینهای پایدار و قطبی می‌باشد.

آزمون فرضیه خنثی نشان داد که ژن مورد بررسی همولوژی بالایی با همه گونه‌های مورد بررسی دارد. این الگوی جانمایی نشان می‌دهد در طول تکامل این گونه‌ها از یکدیگر جدا نشده‌اند (شک ۲). بر اساس آنالیز انتخاب مدل جایگزینی، بهترین مدل جایگزینی برای آنالیز فیلوژنی، مدل JTT است. آنالیز تنوع ژنتیکی ژن مورد بررسی نشان داد که حدود ۲۲ درصد از طول توالی ژن اسید فسفاتاز (ACP) جهشهای نوع جایگزینی رخ داده که در این میان حدود ۸ درصد از طول توالی ژن دارای چندشکلیهای قابل فهم و کاربردی می‌باشد. تنوع نوکلوتیدی در جمعیت مورد مطالعه در حدود ۹ درصد می‌باشد. نتایج نشان داد تاجیما D که به منظور بررسی اثر فشار انتخاب بر روی یک ژن به کار برده می‌شود، در ژن مورد بررسی ۰/۳۶ است. با استفاده از تاجیما D که برای آزمون تنوع خنثی به کار برده می‌شود مشخص شد ژنهایی که تنوع فراوانی آلی آنها

تکامل یافته‌اند، کاربرد دارد. پایه این تئوری مقایسه فرکانس نوکلئوتید یا آمینواسید در توالی جفتی و تعداد تفاوت مشاهده شده بین آنها می‌باشد. این مدل جایگزینی فرآیندی را که در آن تغییر یک صفت بر اثر فشار انتخاب در یک دوره زمانی نشان می‌دهد توصیف می‌کند. این مدل در تفسیر درخت تکاملی در فیلوژنتیک و شاخه‌بندی و شبیه‌سازی توالی با تست روشها و الگوریتمهای دیگر کاربرد دارد. یکی از آزمونهایی که برای بررسی اثر فشار انتخاب بر روی یک ژن به کار برده می‌شود تاجیما D (Tajima D) است. این آزمون بر اساس مقایسه تنوع نوکلئوتیدی حاصل از فراوانی آللی جایگاههای چند شکلی است (۴ و ۲۱). با استفاده از تاجیما D که برای آزمون تئوری خنثی به کار برده می‌شود مشخص شد ژنهایی که تنوع فراوانی آللی آنها بالاست تاجیما D مثبت (بزرگتر از صفر) دارند و با انتخاب متعادل در جمعیت همراه هستند، در حالی که، ژنهایی که تنوع فراوانی آللی آنها پایین است تاجیما D منفی دارند و با فشار انتخابی همراه هستند که یک واریانت سودمند را در جمعیت جایگزین سایر واریانتها کرده است. ژنهایی که به تازگی در معرض انتخاب قرار گرفته‌اند و آلل سودمند هنوز آلل اصلی در جمعیت نشده است، به سادگی با استفاده از تاجیما D قابل مطالعه نیستند (۱۰ و ۲۱). مثبت بودن تاجیما D ژن مورد بررسی در بررسی تکامل آن مشخص کرد که هر جمعیت تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند و تنوع آللی در آن بالا می‌باشد و فشار انتخابی بر روی آن مؤثر نبوده است.

معمول‌ترین مکان برای مارپیچ آلفا سطح هسته‌های پروتئین است که یک رابط را برای تعامل با محیط آبی بیرون ایجاد می‌کند. قسمت داخلی مارپیچ تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب‌گریز و قسمت بیرون تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب‌دوست دارد؛ بنابراین در طول مارپیچ از هر چهار آمینواسید، سه آمینواسید آب‌گریز خواهند بود. سایر آمینواسیدهای موجود در هسته پروتئین و یا داخل غشای سلولی خاصیت آب‌گریزی دارند (۲، ۱۴ و ۱۸). به

و ناگزیر رسوب می‌کند. شاخص ناپایداری پروتئینها بیانگر میزان پایداری آنها در لوله آزمایش در برابر حرارت است و این به نوع اسید آمینه‌های موجود در آن بستگی دارد. شاخص ناپایداری محاسبه شده برای پروتئینها تعیین کرد پروتئینهایی که شاخص ناپایداری آنها کوچکتر از ۴۰ باشند با ثبات و در غیر این صورت بی‌ثبات خواهند بود (۱۵). بر اساس نتایج این تحقیق پروتئین مورد بررسی جزء پروتئینهای پایدار می‌باشد. پایدار بودن پروتئینها باعث حفظ ساختار آن در شرایط تنش مثل تنش حرارتی، حفظ ساختار سوم خود و در نتیجه حفظ عملکردشان در شرایط تنش می‌شود (۲۸ و ۲۹). شاخص آلیفاتیک عبارت است از حجم نسبی پروتئین که از زنجیره‌های آلیفاتیک (L و I ، $A.V$) تشکیل شده‌اند و به عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئینها به حساب می‌آید و به همین دلیل در باکتریهای مقاوم به گرما، پروتئینها دارای شاخص آلیفاتیک بالایی می‌باشند. پروتئینهایی با شاخص آلیفاتیک بسیار بالا (بالا تر از ۱۰۰) در دامنه دمایی بسیار بالا از خود ثبات نشان می‌دهند. در بررسی حاضر شاخص آلیفاتیک پروتئین مورد نظر پایداری نسبتاً بالایی را در برابر حرارت نشان داد، در نتیجه این پروتئین در دماهای بالا قادر به حفظ ساختار سوم و عملکرد خود می‌باشد. متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY) نشان‌دهنده شاخص آبگریزی پروتئین است. در صورتی که GRAVY محاسبه شده برای یک پروتئین منفی باشد آن پروتئین غیر قطبی و در صورت مثبت بودن آن قطبی محسوب می‌شود (۲۷ و ۲۸). پروتئین مورد بررسی در این تحقیق دارای GRAVY مثبت و قطبی می‌باشد. حلالیت پروتئینهای قطبی بیشتر از حلالیت پروتئینهای غیرقطبی در مواد حلال بوده و در برابر حلالهای ویژه هر پروتئین، پروتئینهای غیر قطبی در وسط و پروتئینهای قطبی در قسمت بیرونی تجمع پیدا می‌کنند (۱۱ و ۱۲).

بررسی فرضیه خنثی به منظور اندازه‌گیری اختلاف مشاهده شده برای یک جفت توالی که با الگوی جایگزینی مشابه

و ۲۹). پیوندهای هیدروژنی بین‌رشته‌ای که میان گروه‌های CO یک رشته بتا و NH رشته بتای مجاور ایجاد می‌شوند، به صفحات بتا پایداری می‌بخشند و باعث می‌شوند که این صفحات ظاهری زیگزاگ داشته باشند (۱۶ و ۱۹). بررسی ساختار دوم پروتئین مورد بررسی نشان داد زنجیره α این پروتئین کمتر از زنجیره بتای آن است و این پروتئین دارای انعطاف کمتر بوده و حلالیت کمتری دارد. انعطاف‌پذیری کمتر باعث پایداری بیشتر پروتئین می‌شود، در نتیجه می‌توان گفت که این پروتئین دارای پایداری می‌باشد (۳۰، ۳۳ و ۳۴). این خصوصیات با خصوصیات پروتئین‌هایی که در مقاومت نقش دارند سازگار است (۱۲؛ ۱۹ و ۲۵).

طور کلی مارپیچهای قرار گرفته در سطح، تعداد کمتری آمینو اسید آب‌گریز دارند. از این ویژگی می‌توان در پیش‌بینی ساختار پروتئینها کمک گرفت. برای مثال نواحی با مقادیر بیشتر از آلانین، گلوتامین اسید، لوسین و متیونین و مقادیر کمتر از پرولین، گلیسین، تیروزین و سرین تمایل به تشکیل مارپیچ آلفا دارند (۱ و ۱۴). ساختار صفحه‌های بتا، ساختار دوم بسیار کشیده و چین‌دار می‌باشد. یکی از تفاوت‌های مهم صفحه‌های بتا با مارپیچ آلفا این است که اسید آمینه‌هایی که معمولاً در ساختار اول زنجیره پروتئینی با فاصله زیاد از هم قرار گرفته‌اند، برای تشکیل این ساختار در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند، بنابراین صفحه‌های بتا تمایل به سختی داشته و انعطاف‌پذیری ناچیزی دارند (۱۸).

منابع

- ۱- خلیلی سعید، جهانگیری ابولفضل، امانی جعفر، هاتف سلمانیان علی (۱۳۹۳) کاربرد بیوانفورماتیک در مطالعات ایمنی‌شناسی. پژوهش‌های سلولی مولکولی، ۲۷ (۲): ۱۹۲-۲۱۰.
- ۲- وهابی مهرو، صفریان شاهرخ، زرگر سید جلال، علی اصغری لعیا (۱۳۹۳) مطالعه کمی بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای بقاء *Candidatus Liberibacter asiaticus* in disease late stage. *J. phytopathology*, 162 (11-12): 811-819.
- 3- Alexandre G, Bally R, Taylor B L and Zhulin IB, 1999. Loss of Cytochrome c Oxidase Activity and Acquisition of Resistance to Quinone Analogs in a Laccase-Positive Variant of *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 181 (21): 6730-6738.
- 4- Carlson CS, Thomas DJ, Eberle MA, Swanson JE, Livingston RJ, Rieder MJ, Nickerson DA, 2005. Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data. *Genome Research*, 15 (11): 1553-1565.
- 5- Doyle JJ and Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- 6- Garcia-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J, Gennis RB, 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176: 5587-600.
- 7- Ghayeb Zamharir M, 2014. Study of host-pathogen interaction in citrus Infection by citrus greening. Final report of project No. 45548.
- 8- Gholampour H, Ghayeb Zamharir M, Karimi J, Farrokhi N, Alizadeh A and Taheri P, 2015. Identification of genes differentially expressed during interaction of Grapefruit infected with
- 9- Hafez EE, Moustafa MFM, 2011. Differential expression of cytochrome oxidase and ALY-family genes in resistant and susceptible tomato cultivars (*Solanum lycopersicum*) inoculated with Tomato bushy stunt virus. *JGEB*, 9(1): 43-49.
- 10- Hamblin MT, Thompson EE and Rienzo D, 2002. Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. *A. Am. J. Hum. Genet.*, 70 (2): 369-383.
- 11- Huang G, Zhang L and Birch RG, 2000. Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 193 1: 129-136.
- 12- Juszczuk IM and Rychter AM, 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochemica polonica*, 50 (4):1257-1271.
- 13- Kosakyan A, Heger TJ, Leander BS, Todorov M, Mitchell EA and Lara E, 2012. "COI barcoding of *Nebelid testate amoebae*

- (Amoebozoa: Arcellinida): extensive cryptic diversity and redefinition of the Hyalospheniidae Schultze". *Protist.* 163 (3): 415–34.
- 14- Kyte J, Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. mol. Biology.* 157:105–132.
 - 15- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE, 2004. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry.* 25(13): 1605-1612.
 - 16- Quesada, A, Guijo M I, Merchán F, Blázquez B, Igeño M I and Blasco R, 2007. Essential Role of Cytochrome bd-Related Oxidase in Cyanide Resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (16): 5118-5124.
 - 17- Saraste M, Castresana J, Higgins DG, Lubben M (1994). "Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen". *EMBO J.*, 13 (11): 2516–2525.
 - 18- Slabinski L, 2007. The challenge of protein structure determination--lessons from structural genomics. *Protein Sci.*, 16:2472–2482.
 - 19- Sluse FE and Jarmuszkiewicz W, 1998. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31(6): 733-747.
 - 20- Taheri P, Ghayeb Zamharir M, Karimi J, Farrokhi N, Alizadeh A and Gholampour H, 2015. Study of gene expression pattern in *Citrus grandis* plants infected by *Candidatus Liberibacter asiaticus* at symptoms developing in sensitive host. *J. Ent. and phytopathol.*, 83 (1): 15-26.
 - 21- Tajima F, 1989. "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism". *Genetics.* 123 (3): 585–95.
 - 22- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, 1996. "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å". *Science.*, 272 (5265): 1136–44.
 - 23- Vanlerberghe GC, 2013. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 6805-6847.
 - 24- Wagner AM and Krab K. 1995. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiol. Plant.* 95: 318 – 325.
 - 25- Wagner AM, 1995. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.*, 368: 339–342.
 - 26- Wang H, Huang J, Liang X and Bi Y, 2012. Involvement of hydrogen peroxide, calcium, and ethylene in the induction of the alternative pathway in chillingstressed *Arabidopsis* callus. *Planta*, 235: 53 – 67.
 - 27- Wang J and Vanlerberghe GC, 2013. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. *Physiol. Plant.* doi: 10.1111/ppl.12059.
 - 28- Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M, 2013. Predicting enzymatic function from global binding site descriptors. *Proteins*, 81: 479–489.
 - 29- Yang G X, Li X, Snyder M, 2012. Investigating metabolite-protein interactions: an overview of available techniques. *Methods*, 57: 459–466.
 - 30- Yabuuchi H, Nijima S, Takematsu H, Ida T, Hirokawa T, Hara T, 2011. Analysis of multiple compound-protein interactions reveals novel bioactive molecules. *Mol. Syst. Biol.*, 7: 472–472.
 - 31- Zsigmond L, Rigo' G, Szarka A, Sze'kely G, Otvo's K, Darula Z and Medzihradsky KF, 2008. *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.*, 146: 1721–1737.
 - 32- Zhao J, 2007. Interplay among nitric oxide and reactive oxygen species. A complex network determining cell survival or death. *Plant Signal Behav.*, 2: 544– 547.
 - 33- Zhou GP, 2011. "The disposition of the LZCC protein residues in wenxiang diagram provides new insights into the protein-protein interaction mechanism". *J. Theor. Biology*, 284 (1): 142–8.
 - 34- Zhou GP, 2011. "The Structural Determinations of the Leucine Zipper Coiled-Coil Domains of the cGMP-Dependent Protein Kinase I alpha and its Interaction with the Myosin Binding Subunit of the Myosin Light Chains Phosphate". *Protein and Peptide Lett.*, 18 (10): 966–978.

Isolation, cloning and bioinformatic analysis of cytochrom oxidase C subunit I in *Citrus*

Abasi A.,¹ Ghayeb Zamharir M.,² TowhidFar M.³ and HasanZadeh N.⁴

¹ Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science & Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Plant Diseases, Iranian Research Institute of Plant protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Plant Biotechnology, Faculty of life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Cytochrome oxidase is one of a superfamily of proteins which act as the terminal enzymes of respiratory chains. The two main classes are cytochrome c oxidases, and quinol oxidases. There are two catalytic subunits, I and II. Subunit I contains two heme centers. In this study we have isolated the cytochrom oxidase (*COX*) gene from orange by PCR and clone it by ligation of this product to pGEM-T vector transformed *E. coli* bacteria. Sequencing analysis shows that open reading frame for this gene that encode a protein with 217 amino acids. Results of phylogenetic analysis showed that this gene in orange has related to *Chondrostoma* cytochrom oxidase gene (*COX*). *COX* protein secrete in membrane and it's extracellular secretion is little. The aim of this study was isolation and cloning of *COX* genes from citrus genome and determining of it's characterizations to practical use in the plants.

Key words: Cloning, cytochrome oxidase C, Mitochondria genome and orange.