

همسانه سازی و بررسی فیلوژنتیکی توالی های دو ژن متعلق به زیر خانواده کریپتوکروم

DASH جلبک *Volvox carteri*سعید مهدوی^۱، جعفر رازقی^{۱*}، مقصود پژوهنده^۲، آرش کیانیان مومنی^۳، علی موافقی^۱، مرتضی کوثری نسب^۴^۱ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی گیاهی^۲ایران، کیلومتر ۳۵ جاده تبریز- آذر شهر، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی^۳آلمان، بیله فلد، دانشگاه بیله فلد، گروه زیست شناسی سلولی و تکوینی گیاهی^۴ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات علوم دارویی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

در اکثر موجودات، گیرنده های نوری پیام رسانی به منظور درک و تفسیر علائم محیطی به وجود آمده اند. این مولکول ها قادرند، نور را توسط کروموفورهای خود جذب کرده، مسیرهای پیام رسانی خاصی را در سلول ها به راه انداخته و سبب بروز پاسخ مناسب در سلول شوند. شاخه جدیدی از علم به نام اپتوژنتیک تلاش می کند تا از گیرنده های نوری به عنوان ابزارهای مولکولی جهت کنترل دقیق وقایع سلولی استفاده کند. یکی از راه های توسعه اپتوژنتیک، شناسایی ابزارهای مولکولی جدید دارای خصوصیات ویژه می باشد. بدین منظور تعیین خصوصیات ژن های پیش گویی شده ای که اورتولوگ گیرنده های نوری شناسایی شده می باشند، بسیار مفید خواهد بود. در پروژه تعیین توالی ژنوم *Volvox carteri* دو ژن پیش گویی شده متعلق به خانواده ی Cryptochrome/Photolyase شناسایی شد. هدف از این مطالعه، جداسازی توالی های کدکننده ی این دو ژن، همسانه سازی دو ژن مذکور در داخل وکتور بیانی و تعیین موقعیت قالب خواندن باز آن ها در خانواده کریپتوکروم/فتولایز می باشد. بدین منظور، جلبک *V. carteri* تحت شرایط بهینه رشد داده شد. سپس با استفاده از تکنیک RT-PCR توالی های کدکننده ی این دو ژن تکثیر شد. با استفاده از تکنیک مهندسی ژنتیک قطعات تکثیر شده وارد وکتور بیانی pGEX2TK گردید. به منظور همسانه سازی وکتور نوترکیب، پلاسمیدها وارد باکتری *Escherichia coli* گردیدند و سپس تعیین توالی شدند. نتیجه پژوهش نشان داد که توالی های ثبت شده در پایگاه داده ای NCBI به عنوان توالی mRNA برای دو ژن کریپتوکروم DASH، با توالی آن ها در ولوکس تفاوت هایی را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: همسانه سازی، وکتور بیانی، گیرنده های نوری، اپتوژنتیک

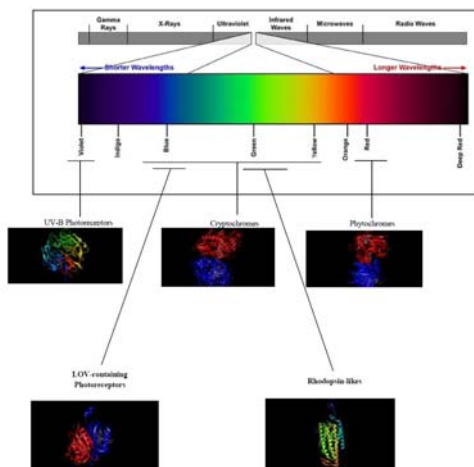
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۹۲۷۰۶ و ۰۹۱۴۴۰۳۳۴۵۰، پست الکترونیکی: Jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

یافته اند، انجام می شود. اولین بخش از این سیستم ها، سنسورهای پروتئینی گیرنده ی نور می باشد. این مولکول ها قادرند، نور را توسط کروموفورهای خود جذب کنند و مسیرهای سیگنالینگ خاصی را براه اندازند که باعث بروز پاسخ مناسب در سلول ها می شود. گیرنده های نوری را می

موجودات فتوسنتزکننده از نور، انرژی و اطلاعات موجود در محیط پیرامون خود را کسب می کنند. در این موجودات سیستم های نوری فتوستتر برای کسب انرژی تکامل پیدا کرده اند. درک اطلاعات محیط با استفاده از نور توسط سیستم های پیام رسانی ویژه ای که در این موجودات تکامل

تکامل یافته‌اند که محدوده‌ی نور نزدیک به 350 nm (~UV آبی و تا قرمز/قرمز دور 750 nm (~ را جذب می‌کند (شکل ۱) (۶،۷).



شکل ۱- طیف نور جذب شونده توسط برخی از گیرنده‌های نوری و ساختار شماتیک نمونه‌ای از هر گروه گیرنده نوری (پایین). تصاویر پروتئین‌ها از سایت PDB گرفته شده‌است. عدد دسترسی نمونه‌ی پروتئینی فیتوکروم: 4OUR، کریپتوکروم: 2J4D، UV-B: 4DNU، رودوپسین: 3UG9، و LOV: 2Z6C است (۷).

از آنجاییکه زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی سازنده‌ی پروتئین‌ها و زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها، توان جذب محدوده‌ی نور مرئی را ندارند، بناچار در گیرنده‌های نوری، اجزای غیرپروتئینی تحت عنوان کروموفور تعبیه شده‌اند. کروموفور به صورت کووالانسی و یا غیرکووالانسی به بخش آپوپروتئینی گیرنده نوری متصل می‌شود (۱۱). طی چند سال گذشته، تعدادی از گیرنده‌های نوری جلبکی شناسایی و بطور مختصر توصیف شده‌اند. برخی از این گیرنده‌های نوری، نسبت به گیرنده‌های نوری کلاسیک، ویژگی‌های جدیدی را نشان می‌دهند، بطوریکه درک ما را از مکانیسم‌های مولکولی سیستم‌های حسگر نور و فرآیندهای سلولی تنظیم‌شده توسط نور، بهبود می‌بخشند. با افزایش اطلاعات درباره‌ی نحوه‌ی عملکرد گیرنده‌های نوری و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آنها، محققان توانسته‌اند، از این Photo-sensitive modules مربوط به

توان از جنبه‌های مختلفی مانند نوع عملکرد، طیف جذبی، نوع کروموفور، محل استقرار درون سلولی، ساختار دمین آپوپروتئینی، ساختار سوم و چهارم و سیگنال خروجی آنها طبقه‌بندی نمود. برخلاف تنوع عملکردی و ساختاری فراوان، گیرنده‌های نوری اغلب از دو بخش اصلی تشکیل شده‌اند که شامل بخش درک‌کننده نور و بخش انتقال‌دهنده سیگنال می‌باشد. در بین موجودات، ریزجلبک‌های متحرک، سیستم‌های حسگر خود را بمنظور ردیابی مستمر نور، بطور ماهرانه‌ای توسعه داده‌اند و از این طریق قادرند اطلاعات مورد نیاز را از محیط پیرامون کسب کرده و فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را، با تغییرات محیطی هماهنگ کنند (۶،۷،۸،۹). کیانیان مومنی (۲۰۱۴)، گیرنده‌های نوری جلبکی را بدین طریق دسته‌بندی نمود:

1. LOV-containing algal photoreceptors

1.1 Phototropins

1.2 Aureochromes

1.3 Neochromes

2. Cryptochromes

2.1 Plant-like Cryptochromes

2.2 Animal-like Cryptochromes

2.3 DASH- Cryptochromes

3. Phytochromes

4. Rhodopsin-like photoreceptors

4.1 Channelrhodopsins

4.2 Histidine kinase rhodopsins

بجزء رودوپسین‌ها که گیرنده‌های نوری غشاء‌گذر هستند، بقیه گیرنده‌های نوری بدلیل شفاف بودن غشاهای سلولی در برابر نور، سیتوپلاسمی و محلول در آب می‌باشند. برخلاف این موارد، کمپلکس‌های جمع‌کننده نور و مراکز واکنش فتوسنتزی بدلیل آنکه باید انرژی نور را به صورت شیبی از انرژی الکتروشیمیایی در دو سمت غشاء تبدیل کنند، کمپلکس‌های درون غشایی می‌باشند. ویژگی‌های جذبی گیرنده‌های نوری، با طیف نوری رسیده به زمین، همبستگی دارد، بطوریکه این گیرنده‌های نوری بنحوی

تولید آن‌ها در سیستم‌های تولید پروتئین است (۱،۲). در پژوهش حاضر توالی کدکننده‌ی این دو ژن درون وکتوریانی pGEX2TK کلون شد و توالی دقیق نوکلئوتیدی آن‌ها مشخص گردید.

مواد و روشها

تهیه جلبک، کشت و نمونه برداری: جلبک *Volvox carteri* f. *nagariensis* strains Eve10 (female) توسط دکتر آرش کیانیان اهدا گردید. جلبک در محیط کشت SVM (۱۳) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و تحت چرخه نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی مربوط به نور سفید حاصل از لامپ LED با شدت نور تقریبی به طور میانگین ۱۷۰۰ لوکس رشد داده شد. پس از رسیدن کشت‌ها به بیوماس مناسب، نمونه برداری به منظور استخراج RNA انجام شد.

استخراج RNA: با استفاده از TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج RNA انجام شد. بترتیب، کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده توسط بیوفتومتر (Eppendorf, Germany)، تعیین نسبت جذب 260/280 و الکتروفورز برپایه ژل آگارز مشخص شد. در نهایت RNA در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

سنتز cDNA: ابتدا ۱ میکروگرم RNA استخراج شده با استفاده از کیت DNaseI (Thermo Scientific, USA) تحت واکنش هضم DNA ژنومی قرارگرفت. سپس RNA پاکسازی شده، توسط کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA)، با استفاده از آغازگر Oligo dT و براساس پروتکل شرکت سازنده، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرارگرفت.

طراحی آغازگرها: بدین منظور ابتدا توالی نوکلئوتیدی مربوط به دو ژن VcCryDASH1 و VcCryDASH2 با استفاده از سرور تحت وب BLASTp با به کار بردن توالی

گیاهان و جلبک‌ها، ابزارهای مولکولی جهت کنترل دقیق وقایع سلولی ایجاد نمایند. به این زمینه جدید که تحقیقات پایه‌ای مربوط به مسیرهای سیگنالینگ کنترل شونده توسط نور را به تحقیقات کاربردی ارتباط می‌دهد، اپتورژنتیک گفته می‌شود. گیرنده‌های نوری و اجزای موجود در مسیر سیگنالینگ نور، بعنوان ابزارهای بالقوه‌ی این زمینه علمی، مطرح می‌باشند. بدین ترتیب با افزایش تعداد گیرنده‌های نوری شناخته‌شده و تعیین ویژگی‌های آن‌ها، محدودیت‌های پیش روی این زمینه‌ی علمی نوظهور بیش از پیش برداشته می‌شود (۱۰). در بین گروه‌های گیرنده نوری فوق، شاخه کریپتوکروم‌های DASH از لحاظ مکانیسم عمل و اثرات فیزیولوژیک، کمتر شناخته شده‌اند. همچنین از آنجایی که این پروتئین‌ها از نظر ساختاری حدواسط DNA فتولیزها و کریپتوکروم‌ها هستند، تعیین خصوصیات آن‌ها در موجودات مختلف می‌تواند راه‌گشای مسیر تکامل در درون خانواده‌ی Cryptochrome/Photolyase باشد. بدلیل اهمیت جلبک‌ها به عنوان مدل در بیوتکنولوژی صنعتی و تحقیقات پایه‌ای و همچنین ظهور تکنیک‌های تعیین توالی ژنوم باتوان عملیاتی بالا، ژنوم مربوط به تعدادی از جلبک‌ها، مانند *Volvox carteri* و *Chlamydomonas reinhardtii* تعیین توالی شده‌اند. Prochnik و همکاران (۲۰۱۰) ژنوم ۱۳۸ مگابازی *Volvox carteri* را تعیین توالی و پروتئین‌های کدشونده توسط این ژنوم را پیش‌گویی کردند که در پایگاه داده‌ای NCBI قرار داده شده است (۱۲). مطالعه آن‌ها نشان داد که در این جلبک دو ژن DASH-کریپتوکروم متعلق به خانواده‌ی Cryptochrome/Photolyase کد می‌شود. با توصیف پروتئین‌های این دو جایگاه، شاید تا حدودی ابهام‌های مربوط به چگونگی عملکرد این گروه از پروتئین‌ها، نقش آن‌ها در جلبک فوق و توانایی بالقوه‌ی آن‌ها به عنوان ابزارهای اپتورژنتیک مشخص شود. به منظور استحصال مقدار مناسب پروتئین برای پژوهش‌های ساختاری و عملکردی آینده نیاز به تهیه سازه بیانی بمنظور

پروتئینی AtCry3 (با شماره دسترسی Q84KJ5 در Uniprot) و SynDASH (با شماره دسترسی P77967 در Uniprot) بعنوان مبنای جستجو در پروتئومیکس ثبت شده از *Volvox carteri* در پایگاه داده‌ای NCBI شناسایی شدند. سپس با بررسی EST مربوط به این توالی‌ها، توالی دقیق کدکننده‌ی این ژن‌ها بازیابی شد. آغازگرها طوری طراحی شدند که دارای جایگاه برشی مربوط به آنزیم‌های برشی *Bgl* II و *Eco* RI، *Bam* HI باشند.

انجام PCR برای تکثیر قطعه‌ی کدکننده‌ی دو ژن *VcCryDASH1* و *VcCryDASH2* و تخلیص آن‌ها:

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قالب باز خواندن دو ژن *VcCryDASH1* و *VcCryDASH2*

نام ژن	توالی آغازگر
<i>VcCryDASH1</i>	AAGGATCCATGGCCGCCCGCGCTG (آغازگر رفت) AAGAATTCCTACGCATACCCACCCGAGC (آغازگر برگشت)
<i>VcCryDASH2</i>	AAAGATCTATGGCGATGCCTGGTACGG (آغازگر رفت) AAGAATTCCTACGTCTGTGCCTTGGCCT (آغازگر برگشت)

استفاده از T4-DNA ligase (Thermo Scientific) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

کشت باکتری *E. coli* سویه Top10 (Invitrogen) و انتقال ژن به آن: محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای کشت باکتری مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها توسط محلول TSS مستعدسازی شدند. سپس ۵ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال، برای تراریختی باکتری با بکارگیری روش شوک حرارتی TSS، استفاده شد (۴). بمنظور انتخاب باکتری‌های تراریخت‌شده دارای وکتور نوترکیب، از محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و انجام PCR-Colony استفاده شد.

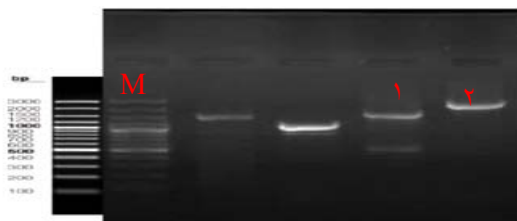
استخراج پلاسمید از باکتری‌های دارای قطعه‌ی کدکننده‌ی ژن‌ها، انجام هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای نوترکیب و تعیین توالی: باکتری‌های دارای پلاسمید

انجام واکنش تجزیه آنزیمی روی قطعات تکثیرشده و پلاسمید pGEX2TK: واکنش تجزیه آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Eco* RI، *Bam* HI و *Bgl* II (Thermo) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده بر روی قطعات کدکننده‌ی ژن‌های *VcCryDASH1* و *VcCryDASH2* و همچنین بر روی پلاسمید pGEX2TK (GE Healthcare Life Sciences) انجام شد. بر روی محصولات واکنش برشی الکتروفورز در ژل آگارز انجام و قطعات مربوط به توالی‌های کد کننده و پلاسمید برش خورده، توسط کیت PureLink™ Quick از ژل استخراج شد.

ایجاد سازه نوترکیب با استفاده از CDSهای تکثیرشده‌ی مربوط به دو ژن *VcCryDASH1* و *VcCryDASH2*: پلاسمیدهای نوترکیب pGEX2TK-*VcCryDASH1* و pGEX2TK-*VcCryDASH2* توسط وارد کردن قطعات حاصل از برش به درون وکتور pGEX2TK برش‌یافته با

نتایج و بحث

با توجه به بررسی‌های *in silico* انجام شده، برای CDS ژن‌های VcCryDASH1 و VcCryDASH2 بترتیب دو توالی (توالی 3078bp ثبت‌شده در NCBI با شماره دسترسی XM_002953647 و توالی 1710bp حاصل از بررسی EST) و یک توالی نوکلئوتیدی (توالی 2217bp ثبت‌شده در NCBI با شماره دسترسی XM_002955358) وجود دارد. دو توالی مربوط به ژن VcCryDASH1 در بخش بزرگی در ناحیه‌ی 5' یکسان هستند و تفاوت در توالی نوکلئوتیدی 3' است (نتایج حاصل از این بررسی نشان داده نشده است). بدین ترتیب برای ژن فوق یک آغازگر رفت و دو آغازگر برگشت طراحی شد. توسط آنزیم پلی‌مراز دارای قابلیت تصحیح‌کنندگی، PCR انجام شد. برای ژن VcCryDASH1 و VcCryDASH2 از دمای اتصال 58 °C استفاده شد. شکل ۲ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر قطعات کدکننده‌ی دو ژن فوق می باشد. همانطور که مشخص است در مورد ژن VcCryDASH1 طول قطعه‌ی ایجادشده با طول قطعه‌ی حاصل از بررسی EST همخوانی بیشتری دارد.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آغاز قطعات تکثیر شده با PCR. ستون ۱: حاوی باند مربوط به VcCryD1؛ ستون ۲: حاوی باند مربوط به VcCryD2.

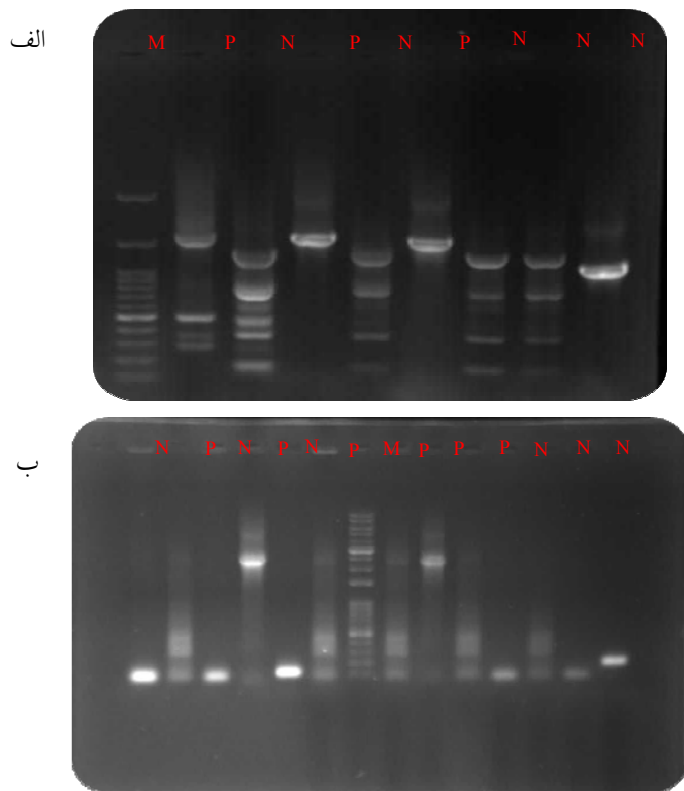
حرارتی TSS انجام شد. همسانه‌های مشاهده‌شده در سطح محیط انتخابی توسط روش کلنی PCR (شکل ۳)، استخراج پلاسمید و همچنین هضم آنزیمی پلاسمید استخراج‌شده مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴ و ۵). سپس تعیین توالی قطعات مذکور انجام شد. انجام BLAST (BLASTn) و

نو ترکیب در LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک انتخابگر، کشت داده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER, Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بمنظور تایید بیشتر بر روند مهندسی‌ساز، پلاسمیدهای استخراج‌شده تحت واکنش هضم آنزیمی قرار گرفتند. پس از تایید حضور قطعات در وکتور، نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت توپازژن (ایران) ارسال شد.

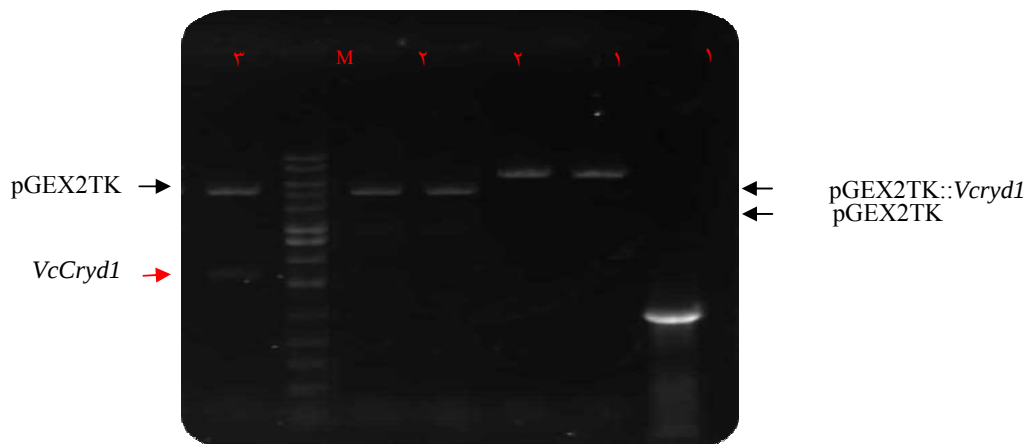
بازیابی توالی‌های پروتئینی مربوط به خانواده‌ی ژنی Cryptochrome/DNA photolyase و ترسیم درخت تکاملی: با استفاده از سرور BLASTp (۳) توالی‌های دو ژن VcCryDASH1 و VcCryDASH2 در مقابل پایگاه‌های داده‌ی Uniprot (www.uniprot.org) و PDB (www.rcsb.org) مورد جستجو قرار گرفت. توالی‌های پروتئینی توصیف شده‌ی مربوط به خانواده‌ی Cryptochrome/DNA photolyase در موجودات مختلف بازیابی شدند و توسط نرم‌افزار تحت وب Clustal Omega (۱۵) هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها انجام شد. هم‌ردیف‌سازی با استفاده از نرم افزار BioEdit V7.0.9 (۵) بهینه شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار MEGA5 (۱۶) توسط روش‌های Maximum likelihood و Neighbor-Joining (۱۴) درخت فیلوژنیک ترسیم شد.

پس از تکثیر قطعات کدکننده و تخلیص از ژل، واکنش هضم آنزیمی بر روی آن‌ها و همچنین وکتور بیانی pGEX2TK انجام شد. پس از تخلیص قطعات و وکتور برش‌یافته از ژل، واکنش اتصال اجرا گردید. تراربخشی باکتری *E.coli* سویه‌ی Top10 با استفاده از روش شوک

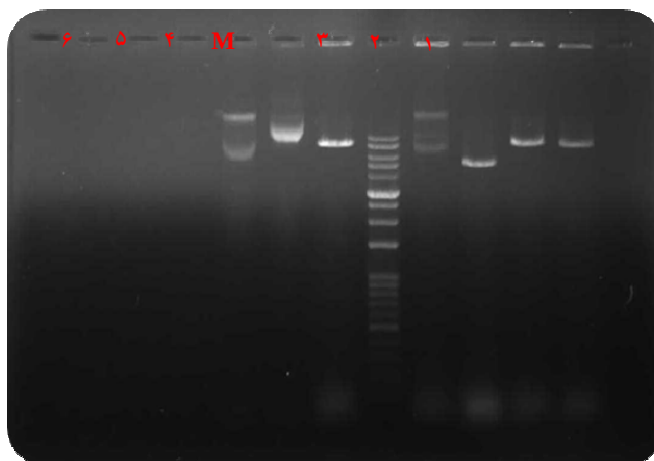
نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزارهای BLASTp نشان داد که این دو توالی نوکلئوتیدی متعلق به جلبک *Volvox carteri* هستند (جدول ۲).
تحت وب به توالی آمینواسیدی متناظر با آن تبدیل شدند (شکل ۶ و ۷).



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصولات واکنش کلنی PCR برای ژن *VcCryDASH1* (الف) و *VcCryDASH2* (ب). M: مارکر P: مشخص کننده همسانه های مثبت؛ N: مشخص کننده همسانه های منفی.



شکل ۴- ژل الکتروفورز استخراج پلاسمید نو ترکیب *pGEX2TK::VcCryd1* و برش آنزیمی آن. ستون ۱: پلاسمید نو ترکیب *pGEX2TK::VcCryd1* که توسط یک آنزیم برشی هضم شده است؛ ستون ۲: پلاسمید *pGEX2TK* که توسط یک آنزیم برشی هضم شده است؛ ستون ۳: پلاسمید نو ترکیب *pGEX2TK::VcCryd1* که توسط دو آنزیم برشی هضم شده و قطعه ای وارد شده از آن خارج شده است؛ M: مارکر.



Sequence: VcCryDASH1.dna (Linear / 1611 bp)
Features: 1 visible, 1 total

ATGGCCGCCGCCGGCTGCGGCAAGCGTGTCTGTAAGTGTGGTTCAGGAACGACCTCGGCTGCACGA	65
CGAATTACATCTGCGTCATGATGCGTGCAGCGTGTAAAGCGTGGTGAAGCGACGAGGTATGGCGCGG	130
TGTAATGTGTTTCGAGCGAGTGTGTACGCGCACTACCCCGTGGGGTCAATTTCAAGAGAGGCGGCGAC	195
CGGGCAGCGCTTCTGCTTGAATGTGTGACGGATCTCAAGTCCCGGCTTCGCGATGTAGGCAAGTGA	260
CTTGCTGGTGGCATTTTGGGAAGCCCGAGGAGGCTGCTGCCGGGTCTCTGGAAGGGCAGCTCTGGTG	325
CTCTCCTGGTCTCACTGCGGAGGAAGTCACTCGGAGGAACCCGAGACGATGTGGCGGTGGCC	390
CGGGCCCTGAAACAACAAGACCGCAAGCGGATGCTGCAGCTCGCGCGGGGGTGAAGCGG	455
TAGTGCGAAGCTGCTCGGGTCTCGGGGCCATACCATGTACCATTGACAGACCTGACTCAGCCAC	520
CAGAAGGCGGCGGCAAGGCTACCTTTGACCGGGCATGAAGGACATGCCGATGTGTTCACTCCC	585
TTCCGTGAAAGAGTGGAAAGCGCTGCCGGTATGGAAGACCTGCGCGCGCGCAGAAGGGCGA	650
CCTGCGCGCTGCCCCGACGGAAGCACTCCCGCGCGCGCGGACGCGCGCTGCGCGCGGCCCCCG	715
CCACGTGCGGACCACTGCCGTACCCGCGGACGCGCGAGGCTCCGCGCCACCAACCTCTTAA	780
GCGGTGCTGGACTTTCAAGGGCGCGAGACGCGGCTGTCGCGCGCTCGGCTACTATCTGTGGGA	845
CAGCGACCTGATCGCCTCCTACTTCGACACTCGCAACGGCATGTTGGGGGGAGCACTCTCCACCA	910
AGTTCGCCCTTGGCTCGCGCGGGATGTATCAGCCCGGGAAGATCTACCAAGAGATCCGCAAG	975
TACGAGGCCGAGCGGCAATCCAACAAGTCCACATCACTGGGTCAATTTCGAGCTATTTGGCGGGA	1040
TTACTTCAGAGTTCTTCGCGCTCAAGCACGCGCAACCGCATCTCTTTGAGACGGAAGCTTCGGGT	1105
TCCTCTTGGTTTGGAAATCCGGATGCAGATCTGTGGGATCGGTGGCGGACGCGGTACGGGCTG	1170
CCCCTGGTAGCGCAACATCGCGAGCTGCGCGCTACGGGCTCATGTCCAATCGTGCCGTCA	1235
AAACTTGGCGTCTGTAATTTGGTGTGGAATCTTGAATCGACTGGCGCGCGCGCGGATCTTGT	1300
AGAGCCAGCTGTTGGACTACGAGCTGACTTCCAAGTGGGTAAGTGGTGGCGGCTGCGGCTTG	1365
GCGGGGGGAGGATCAACCACTTCAACATTGCAAAAGACGTCAAAGGATGACCCCCAGGGCGA	1430
CTACGTCCGACCTGGTGTCCGAGGCTGCGCATGTGCGGGTGGGCAAGGTGATGAGCCCTGGC	1495
TCTAGGACAGGAGGAGCAGGAGGAGGCGGGGTGACGGATCGGTTGGACTACCCGAACCCCAT	1560
CCCGTGTCCAGACGCGTGGCCACACGCCAGCTCGGGTGGGTATGCGTAG	1611

VcCryDASH1.prot (536 aa)

MAAAGCGKRVVLWFRNDLRLHDNYIVHDAVQRVKRGEASEVLPVYCFDPRVYGTPWGHFKTGAHRAAFL
LECVTDLTKSLRDLVFGDSLLVAFGKPEEVLPLGLEGSSGPLSLVTAEEVTSSETRTDLAVARALKQRRPQ
ADAAAAGGSGSAGKLLRFWGHITHYIDLDTLPGGEGKATFAPMGKMDPVFTFPFREKEKCRPVWKDL
PPQPKGDLPLPPTLEAPAAAAAALAAAPPTWEQLPYPPAARPPPTKHPKAVLDFKGEGETAALARLYYL
WSDLIASFYDTRNGMLGGDYSTKAPFWLAAGCISPRKIYHEIRKYEQAQSNKSTYVWIFELIWRDYFR
FFALKHGNRIFFETGTSGLPLVWNPDAHLWHRWDGRGTGLPLVDANMRELAATGFMNSRGRQLNASLYLVL
DGLVDWRRRGADYFESQLLDYDVTSNWGNVAAAGLAGGRINHFNIAKQSKDYDQGGDYVRTWCPFLRHVP
VGKTHPEWLMSSKEOEKAGCRIGDVPNPPTVPSRHRGRHASSGGYA

شکل ۶- توالی، نوکلئو تیدی استنناط شده از تعیین توالی، VcCryDASH1 و توالی، آمینو اسیدی متناظر با آن‌ها.

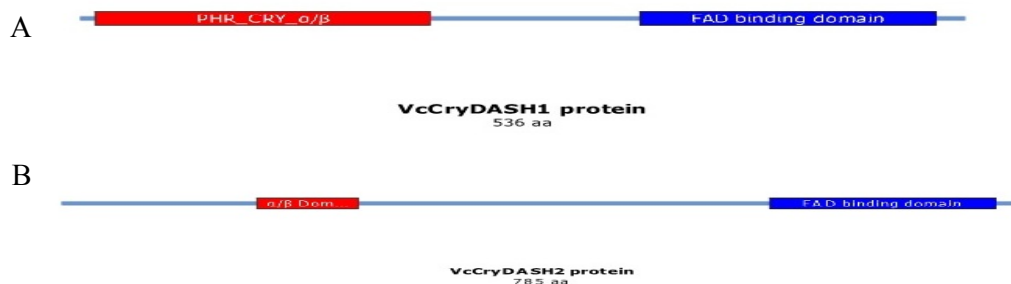
جدول ۲- نتیجه حاصل از BLASTn برای VcCryDASH1 (بالا) و VcCryDASH2 (پایین).

Organism name	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	2571	5256	99%	0.0	99%	XM_002953647.1
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	876	1137	39%	0.0	98%	XM_002959699.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	676	676	48%	0.0	82%	XM_001701819.1

Organism name	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	2778	3853	88%	0.0	99%	XM_002955358.1

ProDom تعیین شدند، که تصویر شماتیک مربوط به آنها در شکل ۸ آورده شده است.

از تعیین ساختمان اولیه‌ی این دو پروتئین، دامین‌های عملکردی این دو قالب باز خواندن با استفاده از سرورهای Pfam، CD-NCBI، Motif Scan، InterPro Scan و



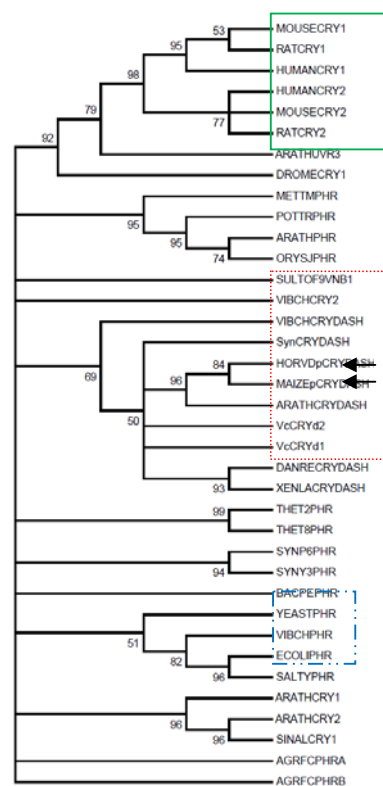
شکل ۸- دامین‌های پیش‌گویی شده در پروتئین‌های VcCryDASH1 (A) و VcCryDASH2 (B). دامین قرمز رنگ: DNA Photolyase Domain؛ دامین آبی رنگ: FAD Binding Domain.

پروتئین در شاخه مربوط به کریپتوکروم‌های DASH قرار می‌گیرند و قالب باز خواندن آنها هم همان‌طور که انتظار می‌رفت در گروه کریپتوکروم‌های DASH قرار می‌گیرند.

با مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی کدکننده‌ی بدست آمده از توالی‌یابی و توالی ژنی موجود در NCBI، محل دقیق اگزون‌ها برای هر دو ژن VcCryDASH1 و VcCryDASH2 مشخص شد. مقایسه بین اگزون‌های پیش‌گویی شده (ثبت‌شده در NCBI) و تعیین‌شده در این پژوهش نشان داد که در ژن VcCryDASH1 به جای ۲۰ اگزون (که در NCBI ثبت شده است)، فقط ۱۱ اگزون وجود دارد. اگزون‌های ۱ تا ۸ آنها دارای موقعیت یکسان

همان‌طور که انتظار می‌رفت، این دو پروتئین دارای دامین‌هایی هستند که در تمام اعضاء خانواده‌ی پروتئینی Cryptochrome/Photolyase وجود دارند. بدین ترتیب مشخص شد که این دو پروتئین در این خانواده قرار می‌گیرند. بمنظور تعیین موقعیت این دو پروتئین در این خانواده، با استفاده از توالی آمینواسیدی آنها و توالی‌های آمینواسیدی مربوط به اعضاء خانواده‌ی Cryptochrome/Photolyase در موجودات مختلف، که از پایگاه‌های داده‌ای Uniprot و NCBI بدست آمده بودند، توسط نرم‌افزار Mega 5 درخت فیلوژنتیک رسم شد (شکل ۹). همان‌طور که در درخت مذکور مشخص است این دو

می‌باشند اما موقعیت اگزون‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ در آن‌ها تفاوت دارد.



شکل ۹- درخت تکاملی ترسیم شده توسط توالی‌های پروتئینی اعضاء خانواده‌ی Cryptochrome/Photolyase توسط روش Maximum likelihood. مربع سبز رنگ موقعیت کلاسه Animal-like Cryptochromes، مربع قرمز رنگ کلاسه DASH، و مربع آبی رنگ موقعیت کلاسه Plant-like Cryptochromes را نشان می‌دهند. پیکان‌ها محل دو ژن مورد مطالعه را نشان می‌دهند.

همچنین بقیه‌ی اگزون‌های موجود در ژن ثبت شده در NCBI تکرار مربوط به اگزون‌های ۴ تا ۱۱ آن می‌باشند. اگزون شماره‌ی ۲۰ در ژن ثبت شده در NCBI منحصر بفرد است و هیچ همتایی در توالی کدکننده‌ی VcCRYDASH1 حاصل از توالی‌یابی انجام شده در این پژوهش ندارد. توالی VcCRYDASH2 ثبت شده در NCBI دارای ۱۳ اگزون می‌باشد در حالی که توالی حاصل از این پژوهش فقط ۱۲ اگزون دارد. مقایسه بین موقعیت اگزون‌ها VcCRYDASH2 مربوط به توالی کدکننده‌ی حاصل از این پژوهش با توالی

ژن ثبت شده در NCBI نشان داد که اگزون ۱ تا ۷ کاملاً مشابه است و فقط در اگزون ۶ حاصل از توالی‌یابی، کدون GAA (مربوط به اسید آمینه‌ی گلوتامات) در ۵' اگزون وارد نمی‌شود. تفاوت اصلی در این دو توالی بین اگزون‌های ۸ تا ۱۱ می‌باشد (شکل ۱۰). با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده مشخص شد که اگزون‌های ۱ تا ۳ در توالی ژن مربوط به VcCRYDASH1 منحصر بفرد بوده در حالی که اگزون‌های ۴ تا ۱۱ دارای دو نسخه‌ی تقریباً مشابه (در برخی از اگزون‌ها دو نسخه از اگزون کاملاً یکسان بوده اما در برخی دیگر از آن‌ها حذف‌شدگی یا اضافه‌شدگی و یا تغییر، مشاهده می‌شود) می‌باشد. به عنوان مثال اگزون شماره‌ی ۴ با اگزون شماره‌ی ۱۲ و یا اگزون ۵ با اگزون ۱۳ مشابه می‌باشد. با بررسی بیوانفورماتیکی بر روی اورتولوگ این ژن در کلامیدوموناس مشاهده شد که این ارگانیزم دارای یک ژن ۱۱ اگزونی می‌باشد (این بررسی‌ها در مقاله نشان داده نشده است). از آنجائیکه ولوکس و کلامیدوموناس دارای مسیر تکاملی یکسانی بوده‌اند و بنظر می‌رسد که کلامیدوموناس نیای ولوکس باشد، می‌توان این احتمال را مطرح کرد که وجود اگزون‌های ۱۲ تا ۱۹ ناشی از وقوع دوبرابری‌شدگی اگزونی در ولوکس می‌باشد. همچنین وقوع جهش‌های مختلف را می‌توان دلیل عدم تشابه کامل بین اگزون‌های مشابه در نظر گرفت. شاید وقوع این رخداد در مسیر تکامل آینده و قدرت بقاء ولوکس تاثیر گذار باشد، به گونه‌ای که در طول تکامل اگزون‌های حاصل از دوبرابری‌شدگی عملگر شده و باعث ایجاد پروتئین جدید با قابلیت اصلاح شده و یا حتی کاملاً متفاوت از پروتئین اولیه گردد.

تشکر و قدردانی

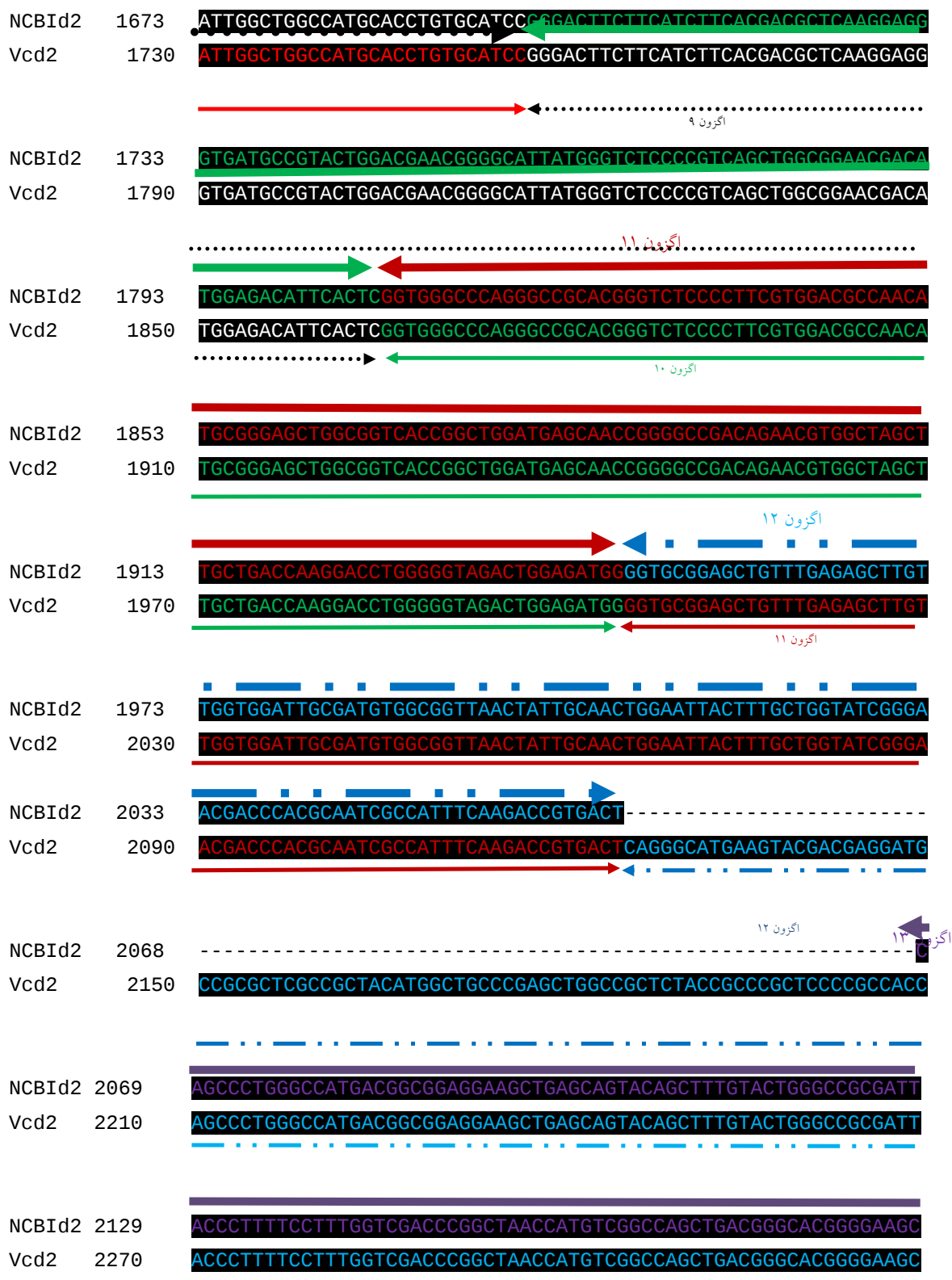
این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین المللی انجام شده است و از این طریق از مسوولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

NCBIId2	1141	CGAAGAGCGCTACAGCGCCTTCAGGAGCTGGTCGGGTTGGACTACAGCCAGCTACTGCCG
Vcd2	1141	CGAAGAGCGCTACAGCGCCTTCAGGAGCTGGTCGGGTTGGACTACAGCCAGCTACTGCCG
NCBIId2	1201	CCAGTAGAGCCCGAAGGGCCACCGGCGCCACACGACCCGCGTACGGCATTTCCTTCCAC
Vcd2	1201	CCAGTAGAGCCC---GGGCCACCGGCGCCACACGACCCGCGTACGGCATTTCCTTCCAC
NCBIId2	1261	GCCGGCTACAGCAGCGCCGTACGCCGCCTGCGGTACTACGTTTGGGGCCACCCGGAAGGG
Vcd2	1258	GCCGGCTACAGCAGCGCCGTACGCCGCCTGCGGTACTACGTTTGGGGCCACCCGGAAGGG
NCBIId2	1321	GCTCCCCCGGAGCTGCCAAGCGACCCACGGGACGGCGCCGGATCCAGCTCCCAGCCGCAT
Vcd2	1318	GCTCCCCCGGAGCTGCCAAGCGACCCACGGGACGGCGCCGGATCCAGCTCCCAGCCGCAT
NCBIId2	1381	GGGGCCCCCGTGAGCTCTCCACCCTCGTTGCTGTATTTACCAACACCCGGGCGCAGGCG
Vcd2	1378	GGGGCCCCCGTGAGCTCTCCACCCTCGTTGCTGTATTTACCAACACCCGGGCGCAGGCG
NCBIId2	1441	GTTGGTGTGGACAGCAGCACTAAGTTGTGCGCCCTTCGTGGCGCTGGGCTGCATCACGTGC
Vcd2	1438	GTTGGTGTGGACAGCAGCACTAAGTTGTGCGCCCTTCGTGGCGCTGGGCTGCATCACGTGC
NCBIId2	1501	CGCCAAATACATGAGGAGCTGTCBACCAACCA---CCGCTTCC-CGGGTCTGTITTTG
Vcd2	1498	CGCCAAATACATGAGGAGGTGGAGCAGGTACGAGCAGCTGCTACTGCGGCTGTGCT---
NCBIId2	1556	GAACCCTTGTAAAGCTCCCCTTCGCCCTGGCGGGGTCAACCTGATGGGTC-----
Vcd2	1555	--ACTGCTGCATGCAGAGC---CACACTGGCAGATACTGCAGAGCAGGAGCAGGAGCAG
NCBIId2	1609	-----TGATCCGCGCCTGGTG---CACGTGCAGGTGG-----
Vcd2	1610	GAGAAATAGCCCGTGACGGCGGGTGGTGGGACGCTGGGGCCGGCGCTACTGCCAACC
NCBIId2	1639	-----AGCAGTAGCTCAGTACCAGCCCCCGCCGAGTGTG
Vcd2	1670	CCGGCCCCGGCTCCCCTCCCCCGGCGGCAGTAGCTCAGTACCAGCCCCCGCCGAGTGTG

اگزون ۸

اگزون ۸

اگزون ۹



NCBIId2 2189 GCAGGAACAAGGCCAAGGCACAGACGTAA
 Vcd2 2330 GCAGGAACAAGGCCAAGGCACAGACGTAA

شکل ۱۰- مقایسه‌ی توالی کدکنده‌ی VcCryDASH2 ثبت‌شده در NCBI (NCBIId2) و تعیین‌شده در این پژوهش (Vcd2). فلش‌های نمایش داده‌شده در بالای هم‌ردیفی مربوط به موقعیت اگزون در توالی NCBIId2 و در پایین آن مربوط به توالی Vcd2 می‌باشد.

منابع

- ۱- شجاع ز، رجبی معماری ح، رعایایی اردکانی م. ۱۳۹۴. جداسازی، همسانسازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی اشرشیاکلی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۸ (۳). ۳۵۲-۳۵۹.
- ۲- یزدان پناه سامانی م، زمانی م. ر، مطلبی م، مقدسی جهرمی ز. ۱۳۹۴. بیان هترولوگ آنزیم کیتیناز 36 کیلو دالتونی از قارچ *Trichoderma atroviride* در میزبان پروکاریوتی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۸ (۳). ۴۴۸-۴۵۷.
- 3-Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- 4-Chung CT, Niemela SL, Miller R H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 2172-2175.
- 5-Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- 6-Hegemann P, Fuhrmann M, Kateriya S. 2001. Algal sensory photoreceptors. *Journal of Phycology*, 37: 668-676.
- 7-Heintzen C. 2012. Plant and fungal photopigments. *WIREs Membrane Transport and Signaling*, 1:411-432.
- 8-Kianianmomeni A, Hallmann A. 2014. Algal photoreceptors: in vivo functions and potential applications. *Planta*, 239:1-26.
- 9-Masuda S. 2013. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant & Cell Physiology*, 54(2): 171-179.
- 10-Mathes T. 2016. Natural resources for optogenetic tools. In: Kianianmomeni A(Ed.) *Methods in Molecular Biology: Optogenetics Methods and Protocol*. Humana Press, 19-36.
- 11-Moglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K. 2010. Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 61:21-47.
- 12-Prochnik SE, Umen J, Nedelcu AM, Hallmann A, Miller SM, Nishii I, Ferris P, Kuo A, Mitros T, Fritz-Laylin LK, Hellsten U, Chapman J, Simakov O, Rensing SA, Terry A, Pangilinan J, Kapitonov V, Jurka J, Salamov A, Shapiro H, Schmutz J, Grimwood J, Lindquist E, Lucas S, Grigoriev IV, Schmitt R, Kirk D, Rokhsar DS. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science*, 329(5988):223-226.
- 13-Provasoli L, Pintner IJ. 1959. Artificial media for freshwater algae: problems and suggestions. In: Tyron CA, Hartman RT (Eds.) *The Ecology of Alga*. Pymatuning Laboratory of Field Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, 84-96.
- 14-Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- 15-Sievers F, Higgins DG. 2014. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: Russell D. (eds) *Multiple Sequence Alignment Methods*. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1079. Humana Press, Totowa, NJ.(book)
- 16-Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731-2739.

Cloning and phylogenetic study of two genes belonging to DASH Cryptochrome subfamily in *Volvox carteri*

Mahdavi S.,¹ Razeghi J.,¹ Pazhouhandeh M.,² Kianianmomeni A.,³ Movafeghi A.¹ and Kosari-nasab M.⁴

¹ Dept. of Plant Science, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

² Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Tabriz, I.R. of Iran

³ Dept. of Cellular and Developmental Biology of Plants, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany

⁴ Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

In the most organisms, signaling photoreceptors have been made to percept and interpret of environmental signals. They can absorb light through their chromophores, trigger different signaling pathways and result in appropriate responses in the cells. Optogenetics, a new field of science, try to use the photoreceptors as molecular instruments in order to exact control of the cellular events. Determination of the new molecular instruments with special characteristics is one of the ways to develop the optogenetics. For this goal, investigation on the predicted genes ortologous with determined photoreceptors is very useful. Two Cryptochrome/ Photolyase family genes were predicted based on the results of *Volvox carteri* (the model algae) genome sequencing. The goals of this investigation are as follow: the exact determination and isolation of coding sequences related with these two predicted genes, insertion into the expression vector (pGEX2TK) and determination of the subclude of their open reading frames in the Cryptochrome/Photolyase family. *Volvox carteri* has been grown up in optimum condition. Then this two coding sequences were amplified by using RT-PCR technique. These coding sequences were inserted in the pGEX2TK by genetic engineering techniques. Produced recombinant vectors were transferred to the *Escherichia coli* strain Top10 and sequenced after plasmid extraction. In current study, it was found that documented mRNA sequences for these two genes in NCBI are different with our mRNA sequences.

Key words: Cloning, Expression vector, Photoreceptors, Optogenetics