زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 1، بهار و تابستان 1394

کلونینگ، بیان ژن، خالص‌سازی و تعیین خصوصیات آنزیم ACC دآمیناز از باکتری *سودوموناس فلورسنس*

داود فرج زاده[1*]، نعمت سخندان-بشیر[2]، ناصر پولادی[3]

1- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز
2- دانشیار گروه ویروس‌شناسی، دانشگاه تبریز
3- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز

* تبریز، صندوق پستی 71379- 53751
farajzadeh@azaruniv.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/2/15 پذیرش مقاله: 94/2/21)

چکیده- گروهی از باکتری‌های هم‌زیست با گیاهان، تحت عنوان PGPR (باکتری‌های محرک رشد گیاهان) آنزیمی به نام ACC دآمیناز (EC4.1.99.4) را کد می‌کنند که این آنزیم، تنظیم کننده تولید اتیلن از طریق متابولیزه نمودن ACC (حد واسط بیوسنتز اتیلن) و شکستن آن به آمونیاک و α-کتوبوتیرات است. این آنزیم نقش مهمی در تسهیل رشد گیاهان از طریق کاهش میزان اتیلن بخصوص در شرایط سخت محیطی دارد. بنابراین هدف این مطالعه، بیان، تخلیص و تعیین شرایط بهینه فعالیت آنزیم ACCدآمیناز (ACCD) از سویه FY32 باکتری *سودوموناس فلورسنس* و بررسی خصوصیات سینتیکی این آنزیم می‌باشد. بدین منظور، ژن *acdS* از باکتری *سودوموناس فلورسنس* بومی جداسازی و در وکتور بیانی pET28 a(+) کلون شد و سپس وکتور نوترکیب pET28-*acdS* به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل گردید. پس از مشاهده بیان، آنزیم ACCD توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل-سفاروز تخلیص و سپس، شرایط بهینه فعالیت این آنزیم و خصوصیات سینتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که این آنزیم، در pH: 7 و دمای 28 درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را دارد. این آنزیم فعالیت بالایی را در حضور $MgSO_4$ در مقایسه با سایر یون‌های فلزی مورد مطالعه نشان داد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم در غلظت 160 ppm نمک NaCl معنی‌دار بود. با توجه به پارامترهای سینتیکی آنزیم یعنی K_m (9/66 mM) و V_{max} (0/11 nM α-ketobutyrate mg^{-1} h^{-1})، مشخص گردید که کارایی این آنزیم در مقایسه با ACCDهای شناخته شده قبلی نسبتاً بالاست.

کلیدواژگان: ACCدآمیناز، *سودوموناس فلورسنس*، کلونینگ، کروماتوگرافی تمایلی، K_m، V_{max}.

1- مقدمه

1-آمینوسیکلوپروپان-1-کربوکسیلات (ACC) پیش‌ماده سنتز اتیلن گیاهی است [1،2]. در گیاهان عالی، S-آدنوزیل متیونین توسط آنزیم ACCسنتاز که یک آنزیم وابسته به پیریدوکسال 5-فسفات (PLP) می باشد، به ACC تبدیل می‌شود [3]. ACC توسط آنزیم ACC-اکسیداز، اکسیده شده و تبدیل به اتیلن می‌شود [2]. بسیاری از سویه‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

(PGPRs) حاوی آنزیم ACCدآمیناز هستند. این آنزیم ترکیب ACC را به α-کتوبوتیرات و آمونیوم تبدیل می‌کند [4]. ACCدآمینازها از تعدادی از سویه‌های *سودوموناس*، مخمر *Hansenula saturnus* و قارچ *Penicillium citrinum* جداسازی شده است [5]. یافته‌های قبلی نشان داد که باکتری *سودوموناس فلورسنس* FY32 حاوی آنزیم ACCدآمیناز بوده و مقاومت گیاه را تحت شرایط تنش خشکی و شوری افزایش می‌دهد [6]. Hontzeas و همکاران K_m=3.4±0.2 mM را در pH: 8 و دمای 22 °C برای آنزیم ACCدآمیناز از باکتری *Pseudomonas putida* UW4 گزارش کردند [7]. Fedorov و همکاران K_m برای آنزیم ACCدآمیناز باکتری *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831 و *Methylobacterium nodulans* ORS2060 به ترتیب 0/8±0/04 و 1/8±0/3 mM بدست آوردند [8]. بطورکلی باوجود مطالعات بیولوژیکی روی اثرات باکتری‌های محرک رشد گیاه، به ویژگی‌های بیوشیمیایی ACCدآمینازی آنها توجه کمتری شده است. بنابراین در این مطالعه، اقدام به کلون، بیان، تخلیص آنزیم ACCدآمیناز از سویه FY32 باکتری *سودوموناس فلورسنس* بومی نموده و سپس شرایط بهینه فعالیت این آنزیم و نیز خصوصیات سینتیکی آن مطالعه شد. نتایج اطلاعات جدیدی را در مورد ویژگی‌های این آنزیم نشان داد که می‌تواند در مطالعات بهینه‌سازی ویژگی‌های این آنزیم برای کاربردهای بعدی و نیز در مقایسه با یافته های قبلی دیگران مورد استفاده قرار گیرد.

2- مواد

آنزیم‌های *Nde*I و *Sac*I برای هضم قطعات نوکلئوتیدی و آنزیم T_4 DNA ligase برای اتصال قطعات نوکلئوتیدی از شرکت فرمتاس و پلاسمید pET28 a(+) برای کلونینگ و بیان ژن مورد نظر از شرکت Invitrogen تهیه شدند.

باکتری *سودوموناس فلورسنس* سویه FY32 از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد و برای کلونینگ از میزبان *E. coli* سویه BL21 (DE3) استفاده گردید.

3- روشها

3-1- کلونینگ ژن ACC دآمیناز (*acdS*) درباکتری *E. coli*

باکتری *سودوموناس فلورسنس* به عنوان منبع ژن *acdS* از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد. DNA ژنومی باکتری *سودوموناس* توسط کیت استخراج DNA (Bioneer, Korea) طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید. با استفاده از پرایمرهای NdeIcdS F با ترادف:

5'- AGCATATGAATCTGAATCGTTTTGAAC-3'

و SacIacdS R با ترادف:

5'- GTGAGCTCTCAGCCGTTGCGGAACAG-3'

و DNA ژنومی باکتری *سودوموناس*، ژن کدکننده آنزیم ACCدآمیناز توسط PCR با برنامه (دناتوره آغازین در 94 درجه به مدت 120 ثانیه، 30 چرخه تکثیر هر یک شامل دناتوره در 94 درجه به مدت 45 ثانیه، جفت شدن پرایمر در 52 درجه به مدت 30 ثانیه، پلی‌مریزه شدن در 72 درجه به مدت 90 ثانیه و پلی‌مریزه شدن نهایی در 72 درجه به مدت 10 دقیقه) و با آنزیم *pfu* DNA polymerase تکثیر شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات توالی ژن *acdS* در بانک اطلاعات ژن NCBI به شماره دسترسی FJ465155 انجام شد. ژن تکثیر یافته در پلاسمید pBR322کلون شد. پس از تأیید کلونینگ توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه حاوی ژن از حامل کلونینگ توسط آنزیم‌های *Nde*I و *Sac*I جدا و در حامل بیانی(Invitrogen) pET28 a(+) ساب‌کلون گردید. برای تأیید کلونینگ در حامل بیانی از آنزیم *Sac*I و *Nde*I استفاده شد که به ترتیب هرکدام یک جایگاه برش در ژن مربوطه داشتند. نهایتاً برای ژن موردنظر یک کلون هم از

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

لحاظ اندازه قطعه کلون شده و هم از لحاظ جهت آن تأیید شد. انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان *E. coli* سویه BL21 (DE3) مطابق دستورالعمل سازنده کیت (اینویتروژن) انجام شد. پلیت‌ها 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا کلونی‌های باکتری نوترکیب تشکیل شدند. کلنی‌های نوترکیب حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بوده و در محیط حداقل حاوی کانامایسین $50\ \mu g\ mL^{-1}$ می‌توانند رشد کنند [9].

3-2- بررسی بیان پروتئین

ابتدا تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نوترکیب مورد نظر، در حجم کم در محیط کشت LB حاوی کانامایسین $50\mu g\ mL^{-1}$ به مدت یک شب کشت داده شد. سپس به نسبت 1:100 در 50 mL محیط کشت جدید رقیق شده و در انکوباتور در دمای $37\ ^0C$ با دور 140 rpm منتقل شد و بعد از رسیدن به OD برابر 0/8 از ایزوپروپیل D - تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت نهایی 0/5 میلی‌مولار به عنوان القاکننده استفاده شد. بمنظور تعیین زمان مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب مقدار 2 mL از محیط کشت در حال رشد در زمان‌های مختلف 0، 3، 6 و 24 ساعت پس از القا نمونه‌برداری شدند. نمونه‌ها با دور 8000 g در دمای 4 °C به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل با بافر نمک فسفات با pH 7.4 مخلوط و پس از سه بار انجماد و ذوب با ازت مایع سلول‌ها لیز شدند. برای جداسازی پروتئین‌های بخش محلول و رسوب، نمونه‌ها با دور 10000 g در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردیدند. سپس همه نمونه‌ها به همراه بافر نمونه در دمای 100 °C به مدت 5 دقیقه حرارت داده شدند. برای آنالیز بیان پروتئین نوترکیب نمونه‌ها بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بارگذاری شدند و با بریلیانت-بلو G250 رنگ‌آمیزی گردیدند [10].

3-3- تخلیص پروتئین با استفاده ازستون کروماتوگرافی IMAC:

به منظور خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، از کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز (IMAC) مطابق با دستورالعمل کیت (Qiagen, USA) استفاده شد. نمونه پروتئینی روی ستون کروماتوگرافی IMAC حاوی رزین‌های مخصوص His-tag که توسط بافر شستشو (300mM NaCl و $50mM\ NaH_2PO_4$) به تعادل رسیده بود، بارگذاری شد و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای 4 °C روی روتور چرخان، چندین بار با بافر شستشو، شسته شدند. در نهایت برای جداسازی پروتئین اتصالی از ستون، از بافر حاوی $50\ mM\ NaH_2PO_4$، 300mM NaCl و 250 mM Imidazole استفاده گردید.

3-4- سنجش فعالیت ACC deaminase:

در ابتدا 200 ماکرولیتر از سوسپانسیون لیز شده و 20 ماکرولیتر از 0/5 مولارACC، به یک میکروسانتریفیوژ 1/5 میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ورتکس کوتاهی بر روی آن انجام گرفته و به مدت 15دقیقه در دمای 30 °C انکوبه گردید. پس از گذشت این زمان، 1 میلی‌لیتر از 0/56 مولار HCl ، به نمونه ها اضافه و بعد از ورتکس به مدت 5 دقیقه در دور 12000g در دمای اتاق انکوبه گردید. به 1 میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، میزان800 ماکرولیتر از HCl اضافه و ورتکس شد و بعد از آن میزان 300 ماکرولیتر از معرف 2و4 دی نیترو فنیل هیدرازین به نمونه اضافه و پس از آن نمونه‌ها در دمای 30 °C به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. با افزودن 2 میلی‌لیتر از NaOH 2N و مخلوط نمودن آن ها، جذب هرکدام از تیوب‌ها در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری گردید [4]. میزان مولاریته α-کتوبوتیرات تولید شده توسط آنزیم، با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌هایی از α-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

کتوبوتیرات در محدوده‌ی بین 0/1 تا 1 نانومول و اندازه-گیری جذب در طول موج 540 نانومتر محاسبه گردید. همچنین برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل نمونه‌ها از روش برادفورد استفاده شد. میزان پروتئین با مقایسه جذب نوری با منحنی استاندارد تهیه شده با پروتئین خالص آلبومین در طول موج 595 نانومتر به دست می‌آید [11].

3-5- بهینه‌سازی فعالیت آنزیم در شرایط مختلف

3-5-1- اثر غلظت ACC بر روی سرعت واکنش

فعالیت آنزیمی در محدوده غلظت ACC بین0 تا 2/5 میلی مولار ، تحت شرایط pH و درجه حرارت مناسب انجام شد. حجم نهایی واکنش با افزودن آب مقطر دیونیزه به 1 میلی‌لیتر تنظیم گردید. میزان K_m و V_{max} آنزیم با رسم منحنی $\frac{1}{v}$ در مقابل $\frac{1}{[s]}$ محاسبه گردید [12].

3-5-2- اثر pH

برای تعیین اثر pH، محدوده pH را بین 1 تا 10 انتخاب کرده و در نهایت pHی که در آن، آنزیم بیشترین فعالیت را دارا باشد، pH بهینه در نظر گرفته شد.

3-5-3- اثر درجه حرارت

برای تعیین بهترین درجه حرارت برای عملکرد بهینه آنزیم، درجه حرارت بین 5 تا 60°C انتخاب شد. در درجه حرارت مورد نظر، سوبسترای آنزیم به آن اضافه و پس از انکوباسیون به مدت 30 دقیقه فعالیت آنزیمی بررسی گردید تا مناسب‌ترین درجه حرارت انتخاب شود.

3-5-4- اثر یون‌های فلزی

اثر یون‌های فلزی مختلف بر روی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز از طریق انکوبه‌کردن آنزیم تخلیص شده به مدت 60 دقیقه در دمای اتاق تعیین گردید.

3-5-5- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl

برای تعیین اثر غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز، از غلظت‌های مختلف نمک NaCl بین 20 تا 180 ppm استفاده شد و فعالیت آنزیم در هر یک از این غلظت‌ها اندازه‌گیری گردید.

3-6- آنالیز داده‌ها

تمام آزمایش‌هابا سه تکرار انجام شد. تجزیه‌های آماری و رسم نمودارها به کمک برنامه‌های آماری SPSS و Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه-ای دانکن با سطح احتمال 1 درصد استفاده شد.

4- نتایج

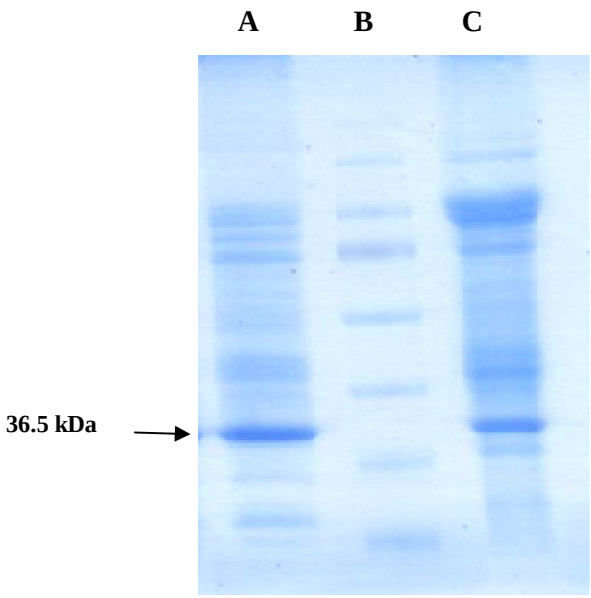
4-1- بررسی بیان پروتئین ACC دآمیناز

برای بررسی بیان ژن و ارزیابی مقدار پروتئین تولید شده توسط وکتور pET28acds، باکتری BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب، توسط 1 mM IPTG القا شد. با توجه به اینکه در زمان‌های مختلف میزان بیان یکسان بود و در زمان 24 ساعت بیان پروتئین بیشترین میزان بود، لذا 24 ساعت بعد از القا، نمونه‌برداری انجام شد و بعد از لیز سلولی نمونه، رسوب و محلول رویی در چاهک‌های ژل SDS-PAGE لود شدند. همان‌طور که شکل 1 نشان می‌دهد باند مربوط به پروتئین مورد نظر در هردو چاهک‌های A و C دیده می‌شود که بیانگر بیان پروتئین و حضور آن در هر دو فاز محلول و رسوب است. با مشاهده باند تشکیل شده در محدوده وزن پروتئینی 36/5 کیلو دالتونی، می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین، نسبتاً به خوبی بیان شده است.

4-2- فعالیت آنزیمی بعد از کروماتوگرافی تمایلی

شکل 2 نشان‌دهنده فعالیت آنزیم ACC دآمیناز در فرکشن‌های مختلف خالص‌سازی از ستون IMAC sepharose6flow column fast می‌باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]



شکل 1 آنالیز بیان پروتئین ACCD (چاهک‌های A و C بترتیب شامل محلول رویی و رسوب عصاره سلولی بوده و چاهک B نشانگر وزن مولکولی پروتئینی THERMO 26619 می‌باشد)

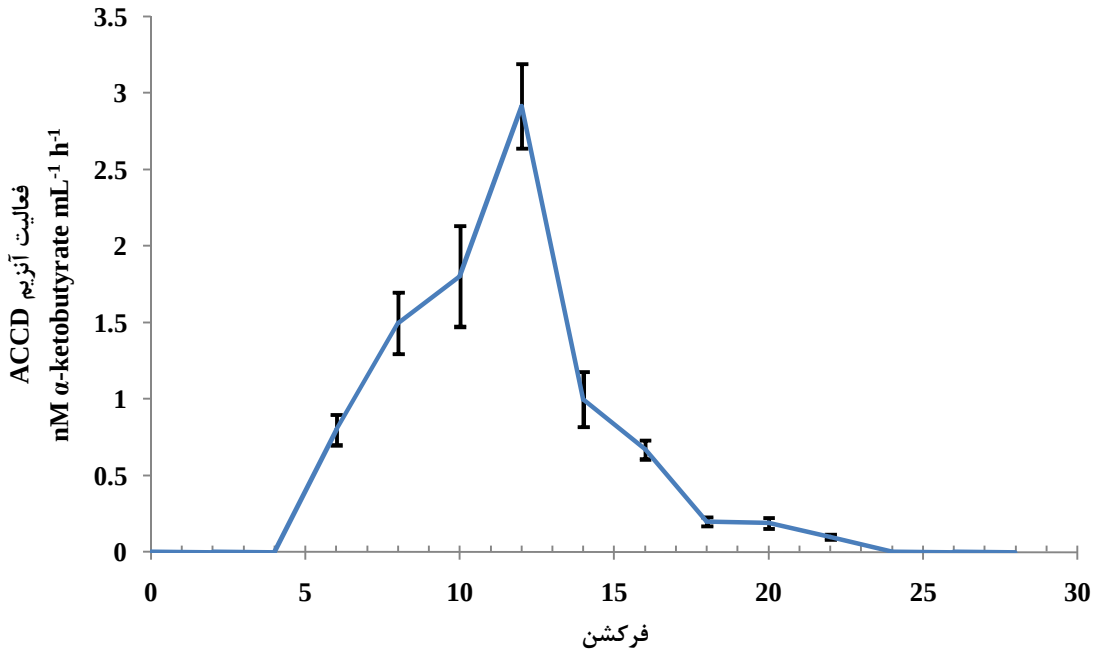
همان‌طوری که در شکل دیده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیم در فرکشن دوازدهم و برابر 2.9 nM α-ketobutyrate $mL^{-1}\ h^{-1}$ است.

4-3- بهینه‌سازی فعالیت آنزیم در شرایط محیطی مختلف

4-3-1- pH و درجه حرارت بهینه

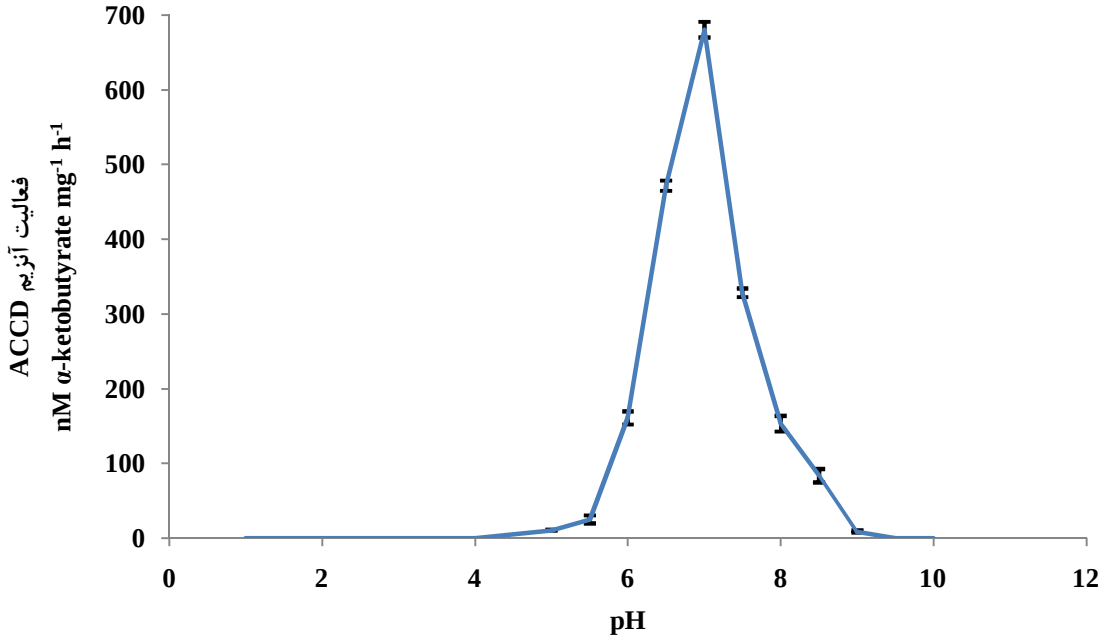
نتایج آزمایش‌های pH بر روی ACCD تخلیص شده نشان می‌دهد که این آنزیم، در محدوده pH خاصی فعالیت می‌کند. همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیم ACCD تخلیص شده در pH: 7 و برابر 680 nM $mg^{-1}\ h^{-1}$ است.

از سوی دیگر شکل 4 نشان می‌دهد که در شروع فعالیت آنزیم، هرچه میزان دما بیشتر می‌شود، فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم تا زمانی که درجه حرارت به 28 °C می‌رسد افزایش یافته و پس از آن تا رسیدن به دمای 60°C شروع به کاهش می‌کند.

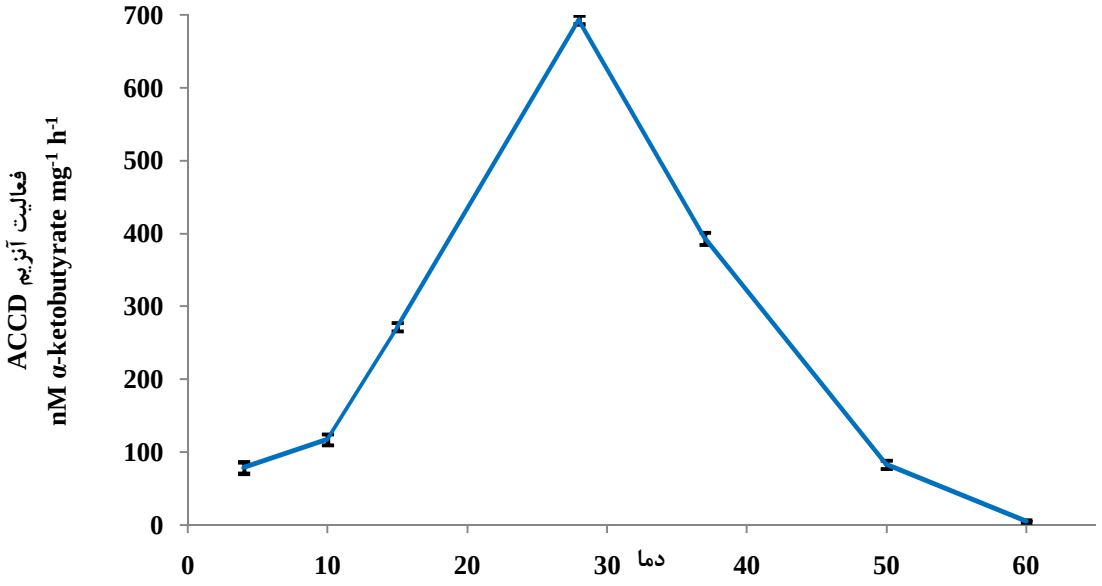


شکل 2 فعالیت آنزیم ACCD پس از تخلیص با ستون کروماتوگرافی IMAC

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]



شکل 3 اثر pH بر روی فعالیت ACCD

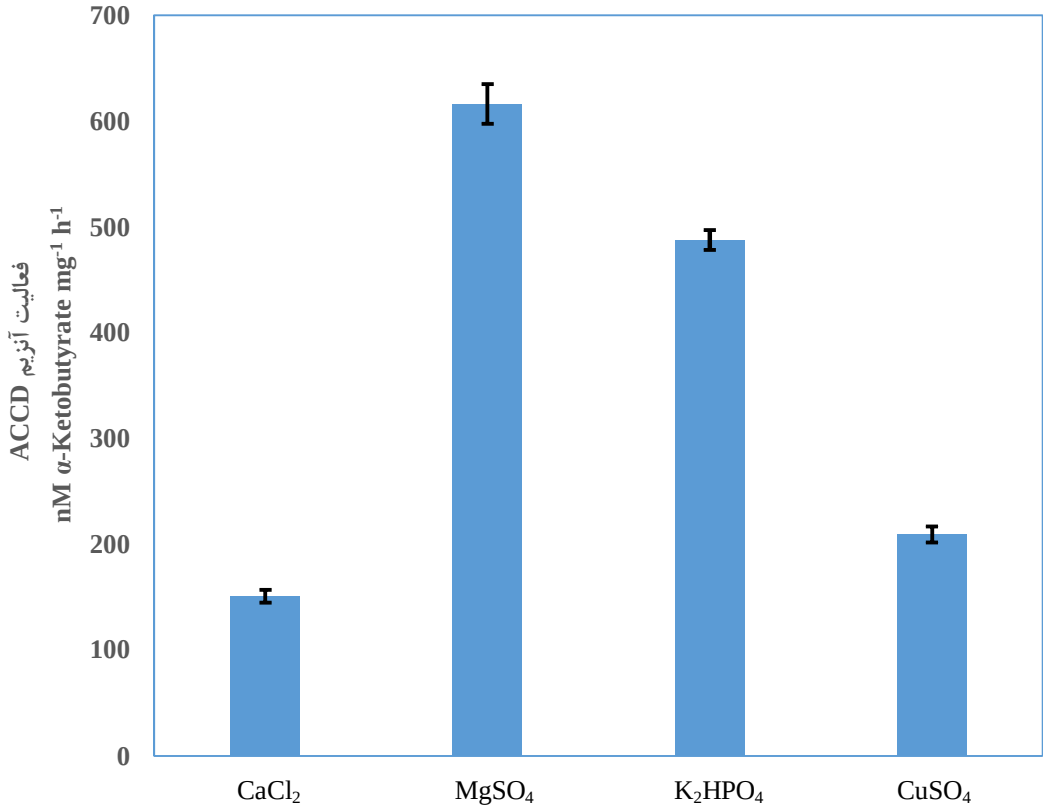


شکل 4 اثر دما بر فعالیت آنزیم ACCD

4-3-2- اثر یون‌های فلزی روی فعالیت آنزیم ACCD:

برای تعیین اثر یون‌های فلزی مختلف بر فعالیت آنزیم، از یون‌های فلزی مختلف همانند $CaCl_2$، $MgSO_4$، K_2HPO_4 و $CuSO_4$ با غلظت 30 میلی‌مولار استفاده شدند. شکل 5 میزان فعالیت آنزیم را در حضور این فلزات نشان می‌دهد. این آنزیم بیشترین فعالیت را درحضور $MgSO_4$ دارد که برابر $630\ nM\ mg^{-1}\ h^{-1}$ است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]



شکل 5 اثریون های فلزی بر روی فعالیت آنزیم ACCD

4-3-3- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی فعالیت آنزیم ACCD

با توجه به شکل 6، فعالیت آنزیم از غلظت 20 تا ppm 160 از نمک NaCl به طور ملایمی کاهش یافت که این کاهش از غلظت 160 به ppm 180 معنی‌دار بود، بطوری که فعالیت آنزیم از 290 به $nM\ \alpha\text{-ketobutyrate}\ mg^{-1}\ h^{-1}$ 75 کاهش نشان داد.

4-3-4- اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت ACCD

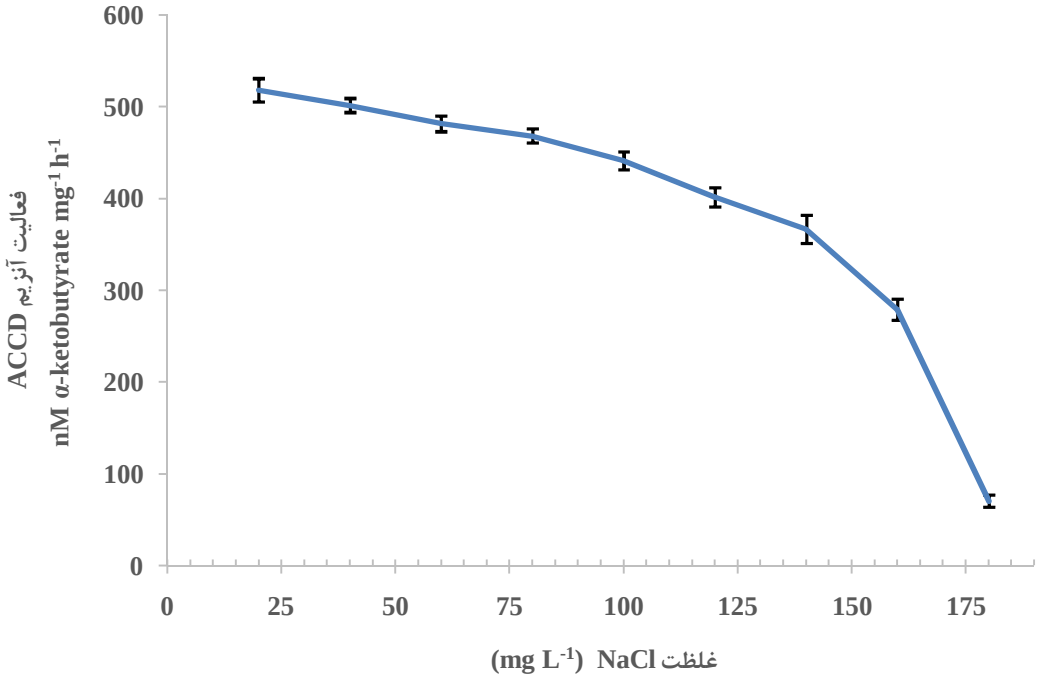
برای مشاهده اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم، نمودار $\frac{1}{v}$ درمقابل $\frac{1}{[s]}$ برای تعیین K_m و V_m آنزیم رسم گردید (شکل 7). بر اساس شکل 7، مقادیر K_m و V_{max} برای این آنزیم بترتیب mM 9/66 و $nM\ \alpha\text{-ketobutyrate}\ mg^{-1}\ h^{-1}$ 0/11 تعیین شد.

5- بحث

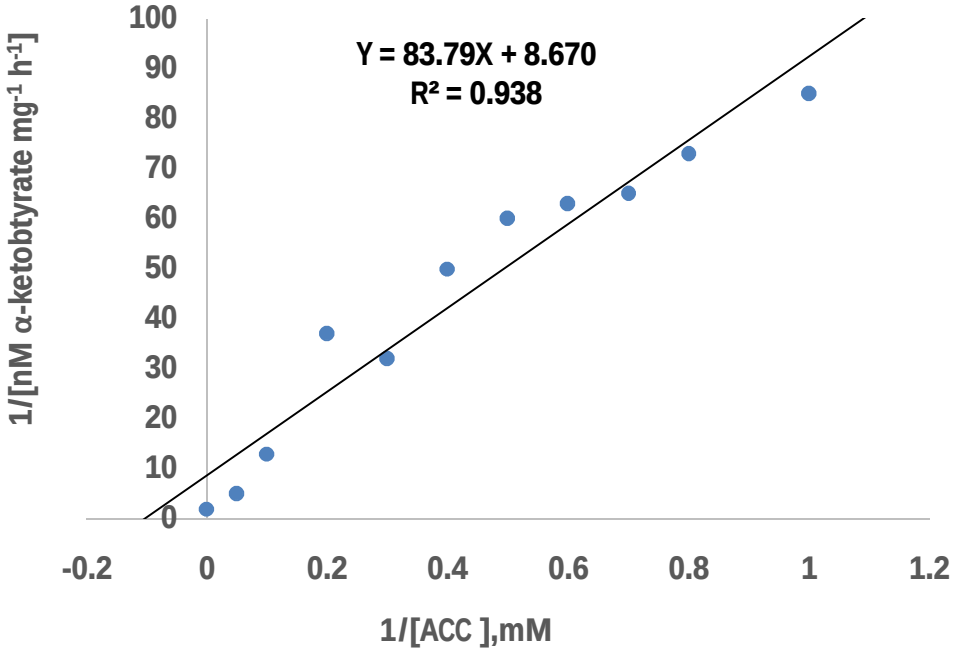
جداسازی آنزیم ACCD برای اولین بار از *Pseudomonas fluoresens* به دلیل تاثیرات مثبتی که در رشد گیاهان داشت، صورت گرفت. این مسأله بر اهمیت انجام مطالعات، بر روی ریزوسفرها که محل جداسازی گونه‌های باکتریایی با عملکردهای بیوتکنولوژیکی هستند، تأکید دارد. مطالعات نشان می‌دهد سویه‌های PGPR دارای آنزیم ACCدآمینازی دسته‌ای از میکروارگانیسم‌ها هستند که بسیاری از اثرات نامطلوب زنده و غیرزنده استرس‌زا را برای گیاهان کم می کنند [13]. آنزیمACCD جدا شده از این گروه از میکروارگانیسم ها مورد مناسبی برای مطالعه بر روی گیاهان زراعی است. آنزیم ACC-دآمیناز تولید شده توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و مکانیسم ذاتی آن جهت رشد در گیاهان، این باکتری را تبدیل به یک باکتری مفید در زمینه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

بیوتکنولوژی زیست‌محیطی و کشاورزی نموده است. در کنار فعالیت این آنزیم در کاهش سطوح اتیلن در شرایط استرس، اکولوژی باکتری و فیزیولوژی گیاه با سیستم گیاهی میانکنش مناسبی داده که باعث افزایش مقاومت گیاه در شرایط سخت می‌شود [14].



شکل 6 اثرغلظت‌های مختلف NaCl بر روی فعالیت آنزیم ACCD



شکل 7 اثر غلظت‌های مختلف ACC بر روی فعالیت آنزیم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

به هر حال مکانیسم‌های خاصی در ریزوباکترهای همزیست با گیاه رخ می‌دهد که موجب کاهش آسیب به گیاهان در شرایط سخت محیطی می‌شود. به همین دلیل حضور این دسته از میکروارگانیسم‌ها در شرایط سخت محیطی نقطه عطفی در صنعت کشاورزی و زیست محیطی محسوب می‌شود. ریزوباکترهای تولید کننده آنزیم ACCD دارای ویژگی‌های تولید سایر آنزیم‌ها همانند آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز و β-1 و 3-گلوکوناز و تولید موادی مانند هیدروسیانیک اسید (HCN) هستند که موجب مقاومت گیاهان به پاتوژن های قارچی می‌شود. دستاوردهای ترانس ژنیک، همانند انتقال افقی ژن مربوط به آنزیم ACCD و سپس فعالیت این آنزیم بر روی رشد گیاهان در یک طیف وسیع مطالعه شد که تأخیر در رسیدگی میوه‌ها، افزایش مقاومت گیاهان به فلزات سنگین و کاهش حساسیت به شرایط نامساعد محیطی از تاثیرات این آنزیم مهم است. با افزایش مطالعات در مورد اثرات مثبت ACC دآمیناز تولید شده توسط باکتری‌های ریزوسفری و اثرات مثبت آن بر گیاهان با تغییرات مولکولی و ژنتیکی بر روی آن، می‌توان موجبات افزایش کاربردهای اقتصادی آنها را فراهم آورد.

مطالعات مختلف نقش کلیدی ACCدآمیناز را در باکتری‌های آزادزی محرک رشد گیاهان اثبات کرده‌اند. همچنین ACCدآمیناز بخاطر اینکه بازکردن حلقه سیکلوپروپان را با مکانیسم متفاوتی انجام می‌دهد توجه زیادی را طی سال‌های اخیر بخود جلب کرده است. در اینجا آنزیم ACCدآمیناز از باکتری *سودوموناس فلورسنس* سویه FY32 جداسازی و شناسایی شد. در این مطالعه به ترتیب مقادیر K_m و V_{max} برابر 9.66 mM و α- 0.11 nM ketobutyrate mg^{-1} h^{-1} برای آنزیم ACCD جداسازی شده نشان داده شد. نکته مهم این که تمامی ACC-دآمینازها تمایل کمی برای ACC دارند. K_m این آنزیم درمیکروارگانیسم‌های مختلف در شرایط دمایی و pH نشان داده که در محدوده 1/5 تا 17/4 mM قرار می‌گیرد که نشان دهنده تمایل کم این آنزیم به ACC است. برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی برای افزایش کارایی آنزیم ($\frac{K\,cat}{Km}$)، بایستی یا k_{cat} آنزیم را افزایش داد و یا K_m آن را کاهش داد که از طریق موتاسیون‌های ژنی هدفدار یا تصادفی می‌توان باعث افزایش کارایی آنزیم شد که این زمینه نیاز به مطالعه و تحقیقات بیشتری دارد.

6- تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره 462/ص/217 از محل اعتبار پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان می‌باشد.

7- منابع

[1] Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc Natl Acad Sci U S A 76 (1):170-174
[2] Wang KL, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell 14 Suppl:S131-151
[3] Li JF, Qu LH, Li N (2005) Tyr152 plays a central role in the catalysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. J Exp Bot 56 (418):2203-2210.
[4] Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol Plant 118 (1):10-15.
[5] Varma A, Abbott LK, Werner D, Hampp R (2004) Plant Surface Microbiology. 2004.
[6] Farajzadeh D, Aliasgharzad N, Sokhandan Bashir N, Yakhchali B (2010) Cloning and characterization of a plasmid encoded ACC deaminase from an indigenous Pseudomonas fluorescens FY32. Curr Microbiol 61 (1):37-43.
[7] Hontzeas N, Zoidakis J, Glick BR, Abu-Omar MM (2004) Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium Pseudomonas putida UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. Biochim Biophys Acta 1703 (1):11-19.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[8] Fedorov DN, Ekimova Ga Fau - Doronina NV, Doronina Nv Fau - Trotsenko YA, Trotsenko YA 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from Methylobacterium radiotolerans and Methylobacterium nodulans with higher specificity for ACC. 1574-6968.

[9] Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3 edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

[10] .Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227 (5259):680-685

[11] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

[12] .Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry. 5 edn. W H Freeman, New York

[13] Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR (containing ACC deaminase in stress agriculture. J Ind Microbiol Biotechnol 34 (10):635-648.

[14] Maheshwari DK (2011) Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs, 1 edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg,

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]