Cloning and bioinformatics analyses of the coding DNA sequence (CDS) of Delta 6 Desaturase gene from *Mortierella alpina* (CBS 754.68)

Esmat Ashaar ghadim
MSc. in Agricultural Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran, n.ashaarghadim@gmail.com
Shahrokh Gharanjik *
Assistant Professor in Molecular Genetics & Genetics Engineering, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran, gharanjik@shahroodut.ac.ir

Abstract

Introduction: Membrane-bound desaturases and related enzymes play a pivotal role in the biosynthesis of unsaturated fatty acids. Delta6 desaturase is a key enzyme in the biosynthesis of the unsaturated fatty acids. *Mortierella alpina* is an oleaginous fungus with active Delta 6 desaturase which has been greatly considered recently.

Materials and methods: In order to isolate and clone Δ6D gene from *Mortierella alpina*, after extraction of total RNA and synthesis cDNA, PCR amplification has been done using gene specific primers. The amplified fragment was cloned into the pBlueScriptSK$^+$ containing seed specific promoter *napin*. Then the recombinant plasmid was transformed into *E.coli* DH5a by freezing and thawing method. The confirmed gene construct was cloned into the binary vector pBI121 and transformed into *Agrobacterium* LBA4404 in order to transform canola plants. Bioinformatics characterization of target gene was investigated by servers TMHMM, ProtParam and Psipred.

Results: Correctness of cloning was confirmed by PCR with specific primers, enzymatic digestion and sequencing. The proliferation of a fragment with 830 bp using internal primer of *napin* promoter and Delta6 desaturase primer confirmed insertion of the gene along with *napin* promoter. Nucleotide sequencing results showed that cloned CDS includes 1374 nucleotides that will translate to a protein with 448 amino acids. Using bioinformatics analysis, presence of cytochrome b5 domain, three His-box, secondary and spatial structures, transmembrane and conserved domains were confirmed.

Discussion and conclusion: Based on the results of BLAST analysis using nucleotide and protein sequences, and also presence of functional domains in the protein, it can be predicted that cloned CDS will show proper enzyme activity after transformation into plants. Confirming these results requires expression analysis of the gene in appropriate plant system and studying its function in the enzyme level.

Key words: Cloning, Unsuturated Fatty acid, Delta 6 Desaturase, *Mortierella alpina*

* Corresponding author
Received: December 30, 2016 / **Accepted:** July 30, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۹۹- ۸۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۸

همسانه‌سازی و بررسی بیوانفورماتیکی توالی رمزگردان (CDS) ژن *دلتا ۶ دسچوراز* از قارچ *مورتیرلا آلپینا* سویه CBS 754.68

عصمت اشعارقدیم: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران، n.ashaarghadim@gmail.com
شاهرخ قرنجیک*: استادیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران، gharanjik@shahroodut.ac.ir

چکیده

مقدمه: دسچورازهای غشایی و آنزیم‌های وابسته به آنها نقشی اساسی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع ایفا می‌کنند. دلتا ۶ دسچوراز، آنزیمی کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع است. قارچ *مورتیرلا آلپینا*، گونه‌ای روغنی و دارای دلتا ۶ دسچوراز فعال است و در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج RNA و سنتز cDNA از قارچ *مورتیرلا آلپینا* سویه CBS 754.68، ژن *دلتا ۶ دسچوراز* توسط آغازگرهای اختصاصی حاوی توالی کوزاک تکثیر و قطعه تکثیرشده در ناقل همسانه‌سازی pBlueScriptSK^{+} حاوی پروموتور اختصاصی بذر ناپین درج شد. پلاسمید نوترکیب با استفاده از روش شیمیایی به باکتری *اشریشیا کلی* سویه DH5α ترانسفورم شد. سازه حاصل در ناقل دوگانه pBI121 همسانه‌سازی و برای انتقال به گیاه، به *آگروباکتریوم* سویه LBA4404 ترانسفورم شد. ویژگی‌های بیوانفورماتیکی ژن موردنظر با سرورهای TMHMM، ProtParam و Psipred بررسی شد.

نتایج: درستی همسانه‌سازی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آغازگرهای اختصاصی، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد. تکثیر قطعه ۸۳۰ جفت نوکلئوتیدی با استفاده از آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن *دلتا ۶ دسچوراز*، الحاق ژن در امتداد پروموتور ناپین را تأیید کرد. نتایج توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان دادند که توالی نوکلئوتیدی این ژن، ۱۳۷۴ جفت باز است و پروتئینی با ۴۵۷ آمینواسید را رمز می‌کند. وجود دمین سیتوکروم b5، سه موتیف جعبه هیستیدین، دمین‌های تراغشایی و حفاظت‌شده از طریق بررسی بیوانفورماتیک تأیید شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: با استناد به نتایج بلاست پروتئینی و تأیید حضور دمین‌های کارکردی، پیش‌بینی می‌شود که توالی همسانه‌سازی‌شده از این قارچ دارای فعالیت آنزیمی مدنظر است. تأیید این نتایج به بررسی بیان این ژن در سیستم گیاهی مناسب و بررسی کارکرد آن در سطح آنزیمی نیازمند است.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، اسیدهای چرب غیراشباع، ژن *دلتا ۶ دسچوراز*، *مورتیرلا آلپینا*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

امروزه نقش اسیدهای چرب غیراشباع[۱] در جلوگیری ازگسترش بیماری‌های قلبی- عروقی اثبات شده است (۱). اسیدهای چرب غیراشباع از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده غشاهای زیستی در موجودات زنده هستند و به همین دلیل خصوصیات ویژه‌ای به آن می-بخشند. این اسیدهای چرب باعث قابلیت انعطاف، سیالیت و نفوذپذیری انتخابی غشاها می‌شوند و در انتقال پیام سلولی نقش دارند (۲ و ۳).

اسیدهای چرب غیراشباع بر اساس موقعیت نخستین پیوند دوگانه به سه گروه امگا ۹، امگا ۶ و امگا ۳ تقسیم می‌شوند. اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ جزو اسیدهای چرب ضروری هستند و باید به میزان مناسب و متعادلی در رژیم غذایی وجود داشته باشند. اسیدهای چرب امگا ۶ به‌وفور در روغن‌های مایع مانند روغن دانه آفتابگردان، ذرت و روغن‌هایی یافت می‌شود که برای تهیه غذاهای بسته‌بندی‌شده و آماده استفاده می‌شوند و از این رو، میزان مصرف این روغن در عامه مردم بیش از حد مطلوب است. همچنین، مصرف ماهی یا کپسول روغن ماهی و دیگر غذاهای دریایی به‌عنوان اصلی‌ترین منابع تأمین اسیدهای چرب امگا ۳ در رژیم غذایی با بهره‌برداری بیش از اندازه ذخایر در طولانی‌مدت پاسخگوی نیاز رشد جمعیتی نخواهد بود (۴). این امر همراه با خطرسازبودن آلودگی‌های محیطی مانند دیوکسین‌ها و فلزهای سنگین مانند جیوه که ماهی‌ها جذب می‌کنند و در کبد و سایر اندام‌های آنها تجمع می‌یابد (۵)، باعث شده است که پژوهشگران در سال‌های اخیر به جستجوی منابع مناسب دیگری برای تهیه این اسیدهای چرب و نیز مهندسی متابولیک مسیر بیوسنتزی آنها در ریزموجودات و گیاهان مورد توجه فراوان محققین قرارگیرد.

سنتز اسیدهای چرب غیراشباع به کمک آنزیم دلتا ۶ دسچوراز با ایجاد پیوند دوگانه بین کربن‌های ۶ و ۷ لینولئیک‌اسید (LA 18:2 $\Delta^{9,12}$) [۲] و آلفالینولنیک‌اسید [۳]($\Delta^{9,12,15}$ ALA 18:3) آغاز و به‌ترتیب باعث تولید گامالینولنیک‌اسید [۴]($\Delta^{6,9,12}$ GLA 18:3) و استئاریودونیک‌اسید [۵]($\Delta^{6,9,12,15}$ SDA 18:4) می‌شود. بنابراین دلتا ۶ دسچوراز، آنزیم کلیدی برای ورود به مراحل بعدی غیراشباع‌سازی، طویل‌سازی و بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیره مانند آراشیدونیک‌اسید [۶] ($\Delta^{5,8,11,14}$ ARA 20:4)، اکزاپنتانوئیک‌اسید [۷]($\Delta^{5,8,11,14,17}$ EPA 20:5) و دکزاهگزانوئیک‌اسید [۸] ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ DHA 22:6) است (۶).

قارچ *مورتیرلا آلپینا*[۹] متعلق به زیرشاخه ماکورمیکوتینا[۱۰]، قارچی روغنی است که لیپید به‌شکل تری‌اسیل‌گلیسرول، حدود ۵۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد. این قارچ با داشتن دلتا ۶ دسچوراز فعال، منبع غنی تولید آراشیدونیک‌اسید است و در سال‌های اخیر مورد توجه فراوان بشر قرارگرفته است (۷). هدف پژوهش حاضر، تکثیر و همسانه‌سازی ژن *دلتا ۶ دسچوراز* از قارچ *مورتیرلا آلپینا* سویه CBS 754.68، دسترسی به توالی رمزگردان این ژن و بررسی درصد همسانی توالی ژنی و آمینواسیدی با گونه‌های مشابه، تعیین ساختار دوم و جایگاه دمین‌های کارکردی آن است. دستاورد پژوهش حاضر، علاوه بر انتقال ژن یادشده به گیاهان دانه روغنی برای تولید اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیره، اطلاعات مفیدی را برای مطالعات بعدی آنزیم‌های دلتا ۶ دسچوراز در متابولیسم اسیدهای چرب و اطلاعات پایه تعیین ساختار سه بعدی آنها را نیز فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر شامل *اشریشیا کلی*[11] سویه DH5α و *آگروباکتریوم تومیفاسینس*[12] سویه LBA4404 بودند. باکتری *اشریشیا کلی* به‌عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه‌های ساخته‌شده و *آگروباکتریوم* برای انتقال ژن مدنظر به گیاه استفاده شدند. ناقل‌های استفاده‌شده شامل pBlueScriptSK$^+$ برای همسانه‌سازی اولیه و ارسال برای توالی‌یابی، pSK$^+$ حاوی پروموتور ناپین و وکتور دوگانه pBI121 برای انتقال سازه ژنی مدنظر به گیاه بودند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: نمونه قارچی در محیط YPD[13] کشت و به مدت دو شبانه‌روز در انکوباتور با سرعت ۱۵۰دور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن[14]) انجام و برای سنتز cDNA از آغازگر عمومی الیگو (dt) و آنزیم نسخه‌بردار معکوس[15] (شرکت فرمنتاز[16] Cat No. PR911658) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و اسپکتروفتومتر بررسی شد. برای شناسایی و اطمینان از حضور ژن *دلتا ۶ دسچوراز* در سطح DNA ژنومی، استخراج DNA به روش CTAB[17] (ستیل تری‌متیل آمونیوم‌بروماید) انجام و از آغازگرهای داخلی به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.

طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: آغازگرهای ژن *دلتا ۶ دسچوراز* از ناحیه CDS ژن مدنظر قارچ *مورتیرلا آلپینا* با شماره دسترسی AF110510 ثبت‌شده در بانک اطلاعاتی NCBI طراحی شدند. در طراحی آغازگرها، پس از تحلیل نقشه برشی ژن *دلتا ۶ دسچوراز*، توسط نرم‌افزار NEB Cutter سایت برشی *XbaI* همراه با توالی افزایش‌دهنده بیان گیاهی کوزاک در آغازگر مستقیم و سایت برشی *SacI* در آغازگر معکوس اضافه شدند. برای افزایش کارایی برش آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی به‌عنوان لنگرگاه آنزیم به دو سمت آغازگرها افزوده شدند. همچنین برای اطمینان از درستی جهت قرارگیری ژن در ابتدای پروموتور ناپین، یک جفت آغازگر دیگر با استفاده از نواحی داخلی پروموتور ناپین و ژن *دلتا ۶ دسچوراز* طراحی شد (جدول ۱). سنتز آغازگرها به سفارش شرکت تکاپوزیست توسط شرکت بایونیر[18] (کره جنوبی)، انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

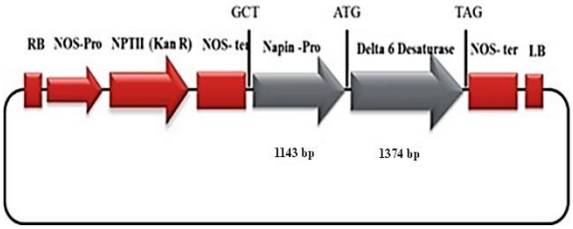
نام آغازگر	توالی	اندازه قطعه تکثیری	TM
D6D-F	5´-aaTCTAGAccaccatggctgctgctcccag-3´	1396 bp	62˚C
D6D-R	5´-gcGAGCTCttactgcgccttacccatcttg-3´		
Pro.*N* –F	5´-AGTAAGGATGACCTACCC-3´	830 bp	54˚C
D6D- R	5´-AGAACATCTCCAACGCA-3´		

cDNA سنتزشده به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، برای سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن توسط آنزیم *تک* پلیمراز[19] (شرکت سیناژن) استفاده شد. شرایط بهینه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌شکل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول واکنش پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد برده و خالص‌سازی قطعه DNA تکثیرشده توسط کیت استخراج از ژل آگارز (شرکت ویوانتس[20]، مالزی) انجام شد.

همسانه‌سازی در ناقل پلاسمیدی و انجام توالی‌یابی: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت استخراج از ژل، خالص‌سازی و توسط آنزیم‌های برشی *XbaI* و *SacI* برش داده شد؛ هم‌زمان، وکتور $pBlueScriptSK^+$ نیز با این آنزیم‌ها هضم شد. برای ساخت پلاسمید نوترکیب، عمل اتصال محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و وکتور هضم‌شده با استفاده از آنزیم لیگاز انجام شد. برای تهیه باکتری‌های مستعد *اشریشیا کلی* و انتقال پلاسمید نوترکیب به آنها به‌ترتیب از روش کلریدکلسیم سرد و شوک حرارتی استفاده شد (۸). باکتری‌های ترانسفورم‌شده در محیط‌کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal[21] (ایزوپروپیل β-۱-D-تیوگالاکتوپیرانوزید) و IPTG[22] (۵ برمو-۴ کلرو-۳ ایندول-β-D-گالاکتوپیرانوزید) کشت شدند. با توجه به قرارگیری قطعه همسانه‌سازی‌شده در ناحیه ژن *بتا-گالاکتوزیداز*، غربال‌گری سلول‌های حاوی DNA نوترکیب با ناتوانایی آنها در ساخت این آنزیم همراه بود و کلنی‌های سفیدرنگ، نوترکیب بودند. بنابراین، چند کلنی سفید انتخاب و پس از تأیید اولیه با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آغازگرهای اختصاصی این ژن، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی (۹) انجام و ابتدا و انتهای ژن با آنزیم‌های برشی هضم شد. برای اطمینان از درستی همسانه‌سازی و تأیید نهایی توالی ژن مدنظر، توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای T7 و T3 به سفارش شرکت فزابیوتک[23] انجام شد.

پس از اطمینان از درستی توالی قطعه همسانه‌سازی‌شده، همسانه‌سازی در پلاسمید pSK^+ حاوی پروموتور اختصاصی بذر ناپین از طریق هضم آنزیمی پلاسمید و محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم‌های برشی *XbaI* و *SacI* و اتصال نواحی انتهای چسبنده ایجادشده با آنزیم T4 DNA لیگاز انجام شد (شکل ۱). انتقال به باکتری‌های مستعد انجام و باکتری‌های ترانسفورم‌شده در محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به‌شکل شبانه کشت شدند. تأیید همسانه‌سازی با استفاده از کلنی-PCR و هضم آنزیمی انجام و برای اطمینان از درستی جهت قرارگیری پروموتور ناپین در ابتدای ژن، آغازگر داخلی بر اساس نواحی داخلی پروموتور ناپین و ژن *دلتا ۶ دسچوراز* به طول ۸۳۰ جفت نوکلئوتید طراحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد (جدول ۱).

همسانه‌سازی در ناقل دوگانه pBI121: برای همسانه‌سازی سازه در ناقل دوگانه pBI121، پلاسمید نوترکیب از جایگاه‌های برشی ابتدای پروموتور و انتهای ژن (*HindIII* و *SacI*) برش داده شد. هضم دوگانه ناقل pBI121 با این آنزیم‌ها موجب حذف ژن *بتاگلوکورونیداز* (*GUS*) شد. برای افزایش احتمال اتصال صحیح قطعه های مدنظر، قطعه حاوی پروموتور ناپین- ژن *دلتا ۶ دسچوراز* و پلاسمید برش‌یافته pBI121، از روی ژل خالص‌سازی و سپس انتهاهای چسبنده ایجادشده با آنزیم T4 DNA لیگاز به هم متصل شدند. سلول‌های مستعد *آگروباکتریوم* تهیه و انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به روش ذوب و انجماد انجام شد. باکتری‌های ترانسفورم‌شده در محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین به‌شکل شبانه کشت و کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از کلنی- PCR و هضم آنزیمی شناسایی شدند.



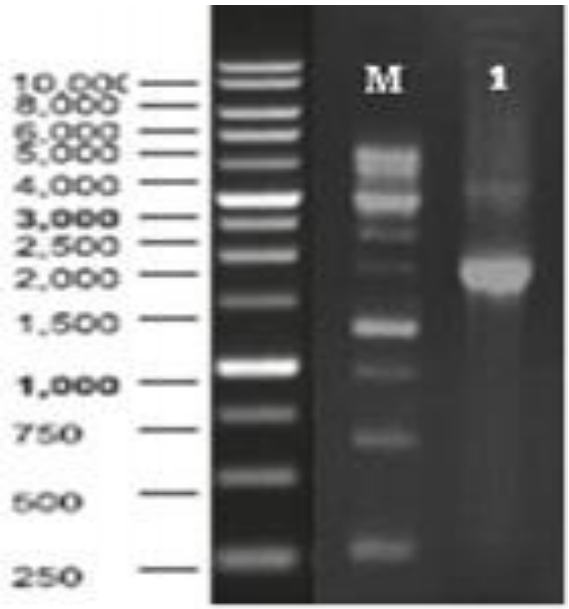
شکل ۱- سازه نوترکیب پروموتور ناپین- دلتا ۶ دسچوراز. قطعه ناپین-دلتا ۶ دسچوراز با حذف ژن *GUS*، بین دو جایگاه برشی *HindIII-SacI* پیش از ترمیناتور NOS همسانه‌سازی شده است.

بررسی بیوانفورماتیکی: توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی cDNA ژن *دلتا ۶ دسچوراز*، در سایت Expasy[۲۴] به پروتئین ترجمه شد. ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئین حاصل با برنامه ProtParam[۲۵] تعیین و وجود دمین‌های احتمالی با سرور Interpro[۲۶] بررسی شد. اطلاعات بیشتر درباره ساختار دوم پروتئین با سرور psipred)[۲۷] پیش‌بینی شدند. پروفایل هیدروپاتی توالی با ابزار TopPred[۲۸] تحلیل و وجود دمین‌های تراغشایی[۲۹] با سرور TMHMM[۳۰] تأیید شد. برای تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن *دلتا ۶ دسچوراز* همسانه‌سازی‌شده با توالی این ژن در گونه‌های دیگر، درختچه فیلوژنتیکی با نرم‌افزار مگا۷[۳۱]، روش Neighbor-Joining رسم شد. به علت قرارگرفتن دلتا ۶ دسچوراز و دلتا ۸ اسفنگولیپید در یک خانواده و شباهت زیاد آنها به یکدیگر، از توالی پروتئینی چند ژن *دلتا ۸ اسفنگولیپید* و *دلتا ۵ دسچوراز* علاوه بر *دلتا ۶* در رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده شد.

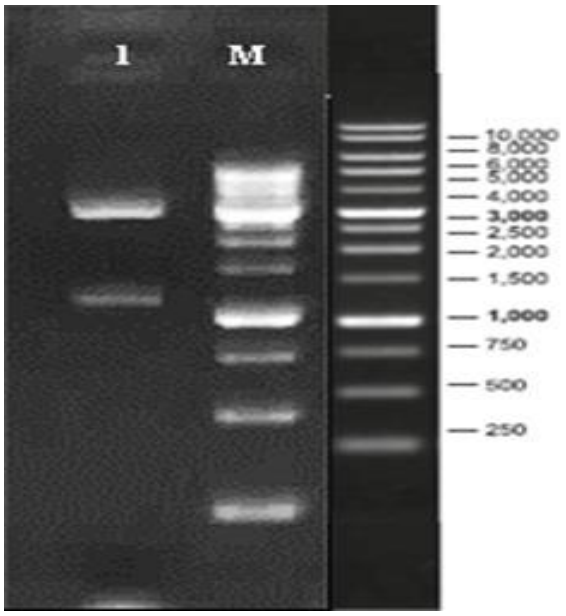
نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای داخلی، وجود ژن *دلتا ۶ دسچوراز* را روی DNA ژنومی اثبات کرد. انجام واکنش RT-PCR روی cDNA سنتزشده موجب تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۳۹۰ جفت نوکلئوتید شد که معادل طول کامل منطقه کدکننده ژن *دلتا ۶ دسچوراز* است (شکل ۲).

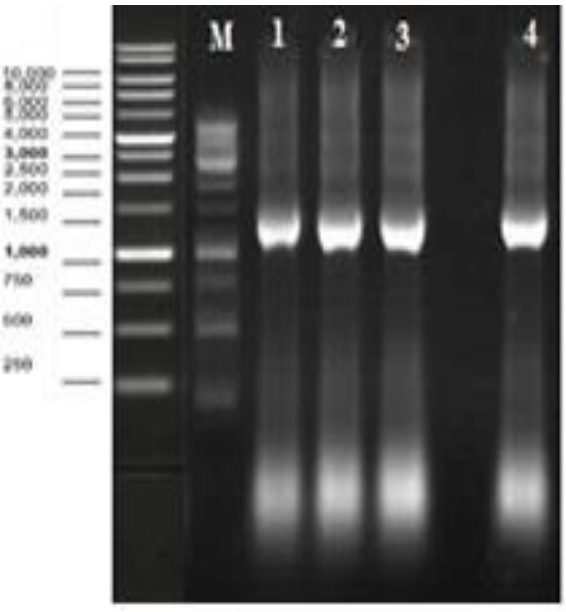
پس از اتصال این ژن به پلاسمید pBlueScriptSK^{+}، رشد کلنی‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان‌دهنده وجود پلاسمید در باکتری و وجود کلنی‌های سفید نشان‌دهنده نوترکیب‌بودن باکتری‌های حامل آنها بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی پلاسمیدهای نوترکیب سفید برای تأیید وجود ژن انجام شد که طول کامل ژن در پلاسمید نوترکیب حاصل شد (شکل ۳).



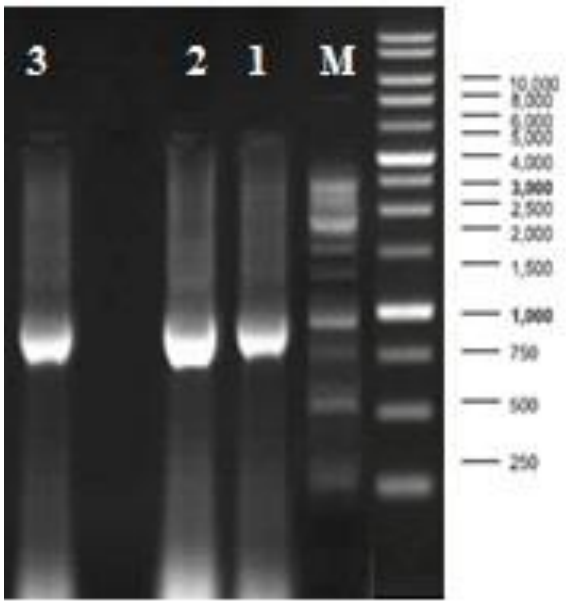
شکل ۲- محصول تکثیر ژن *دلتا ۶ دسچوراز* با واکنش RT-PCR روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (شرکت سیناژن)، چاهک 1: محصول تکثیر ژن *دلتا ۶ دسچوراز* توسط آغازگرهای اختصاصی به طول تقریبی ۱۳۹۰ جفت باز



شکل ۴- نتایج هضم آنزیمی pSK^+ نوترکیب. چاهک M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp (شرکت سیناژن)، چاهک 1: هضم آنزیمی pSK^+ نوترکیب و ایجاد قطعه‌هایی با طول تقریبی ۲۹۰۰bp وکتور و ۱۳۹۰bp قطعه همسانه‌سازی‌شده



شکل ۳- تأیید حضور ژن *دلتا ۶ دسچوراز* در ناقل pSK^+ توسط کلنی PCR. چاهک M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (شرکت سیناژن)، چاهک‌های 1، 2 و 3: تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۳۹۰ جفت باز، چاهک 4: کنترل مثبت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن روی cDNA

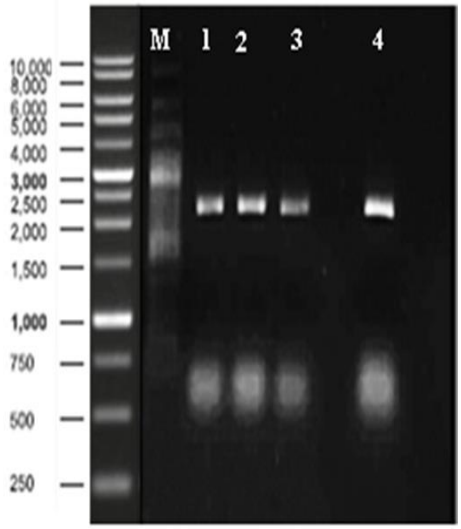


شکل ۵- محصول PCR آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن *دلتا ۶ دسچوراز*. چاهک M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (شرکت سیناژن)، چاهک‌های 1، 2 و 3: تکثیر قطعه با استفاده از آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن *دلتا ۶ دسچوراز* به طول ۸۳۰bp

پس از استخراج پلاسمیدهای نوترکیب، نتایج هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی و ایجاد قطعه‌ای با طول تقریبی ژن مدنظر،درستی همسانه‌سازی در پلاسمید را تأیید کردند (شکل ۴).

نتایج توالی‌یابی که برای تأیید نهایی و یافتن توالی ناحیه کدکننده ژن *دلتا ۶ دسچوراز* با استفاده از آغازگرهای عمومی T7 و T3 انجام شد، همسانه‌سازی ناحیه CDS با طول ۱۳۷۴ جفت نوکلئوتید از ژن مدنظر را تأیید کرد. پس از اطمینان از درستی قطعه cDNA سنتزشده، این قطعه در ناحیه MCS وکتور $pBlueScriptSK^+$ از طریق برش در جایگاه های *XbaI* و *SacI* در پایین‌دست پروموتور ناپین، که یک پروموتور اختصاصی بذر بوده و باعث بیان اختصاصی ژن در این بافت خواهد شد، همسانه‌سازی شد. پس از ترانسفورم‌کردن پلاسمید نوترکیب حاصل در باکتری *اشریشیا کلی*، کلنی-PCR روی کلنی‌های سفید با آغازگرهای اختصاصی، درستی همسانه‌سازی و تکثیر طول کامل ژن را تأیید کرد. تکثیر قطعه ۸۳۰ جفت نوکلئوتیدی با استفاده از آغازگرهای داخلی پروموتور و ژن *دلتا ۶ دسچوراز*، جهت درست قرارگیری این ژن در امتداد پروموتور ناپین را تأیید کرد (شکل ۵).

پس از همسانه‌سازی سازه حاوی پروموتور ناپین و ژن مدنظر در ناقل دوگانه pBI121 و انتقال آن به *آگروباکتریوم* LBA4404 برای انتقال بعدی به گیاه، درستی همسانه‌سازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ابتدای پروموتور ناپین و انتهای ژن *دلتا ۶ دسچوراز* و تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۲۵۰۰ جفت باز اثبات شد (شکل ۶).

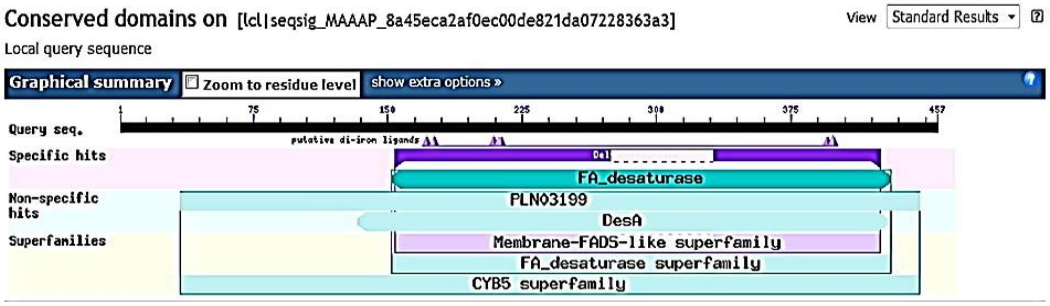


شکل ۶- محصول PCR آغازگر ابتدای پروموتور ناپین و انتهای ژن *دلتا ۶ دسچوراز*. چاهک M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (شرکت سیناژن)، چاهک‌های 1، 2 و 3: تکثیر قطعه به طول تقریبی ۲۵۰۰bp، چاهک 4: کنترل مثبت

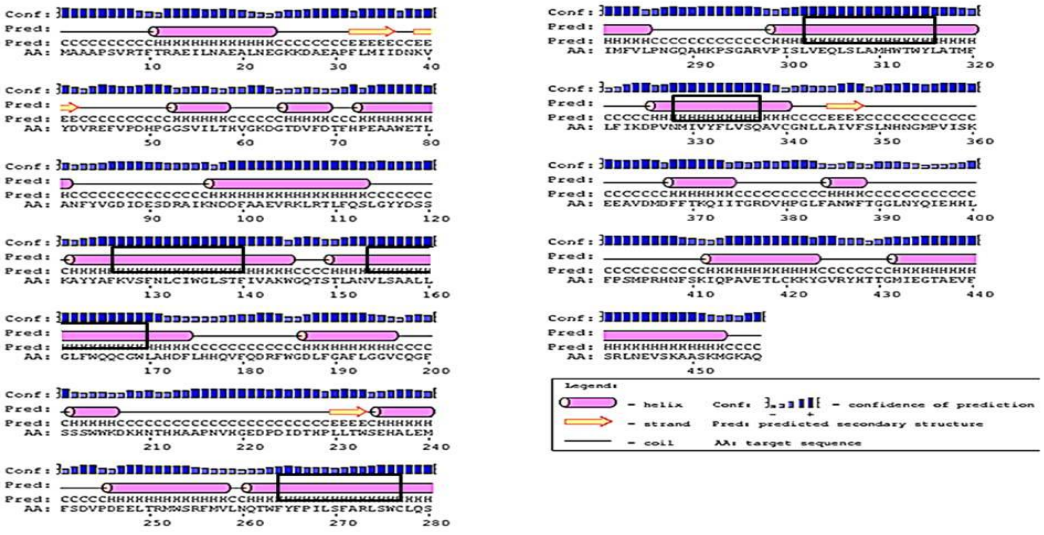
نتایج توالی‌یابی ژن مدنظر نشان دادند که قطعه همسانه‌سازی‌شده در وکتور pSK^+، ۱۳۷۴ نوکلئوتید دارد و پروتئینی با طول ۴۵۷ آمینواسید را کد می‌کند. این پروتئین بیشترین شباهت با میزان ۹۸درصد را به ژن *دلتا ۶ دسچوراز مورتیرلا آلپینا* با شماره دسترسی BAA85588.1 و ABN69090.1 داشت که حفاظت زیاد ژن در این قارچ را نشان می‌دهد. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئین حاصل با ProtParam، وزن مولکولی این توالی را ۵۱۹۶۹/۲ دالتون و نقطه ایزوالکتریک (IP) آن را ۵/۶۹ تعیین کرد. شاخص ناپایداری پروتئین ۳۰/۶۸ محاسبه شد، اما با توجه به وجود توالی متیونین در انتهای N این پروتئین، نیمه‌عمر برآوردی در شرایط آزمایشگاه ۳۰ ساعت است که پایداری این پروتئین را نشان می‌دهد. از مجموع کل آمینواسیدها، ۳۴ آمینواسید دارای بار مثبت (آرژنین و لیزین) و ۴۹ آمینواسید دارای بار منفی (آسپارتات و گلوتامات) تعیین شدند. با انجام بلاست در پایگاه

Interpro روی توالی همسانه‌سازی‌شده و خانواده‌های دمینی شناسایی‌شده و با توجه به بررسی‌های پیشین روی این ژن، دمین‌های سیتوکروم b5 و اسیدچرب دسچوراز شناسایی شدند. پایگاه CDD[۳۲]، این نتایج را تأیید کرد. سه موتیف حفاظت‌شده غنی از هیستیدین در پایگاه CDD به‌عنوان ناحیه اتصال آهن تعیین شدند؛ نخستین موتیف غنی از هیستیدین از آمینواسید ۱۷۱ تا ۱۷۵، دومین موتیف از آمینواسید ۲۰۸ تا ۲۱۲ و سومین موتیف در جایگاه ۳۹۶ تا ۳۹۹ قرار گرفته است (شکل ۷).

نتایج سرور Psipred نشان دادند که ساختار دوم این توالی دارای ۱۸ مارپیچ آلفا[۳۳] و بیش از ۱۵ عدد سوپرکویل است. طول ۵ عدد از مارپیچ‌های آلفا بیش از ۲۰ آمینواسید است و بنابراین ژن *دلتا ۶ دسچوراز* در درجه اول از مارپیچ آلفا تشکیل شده که از ویژگی‌های پروتئین‌های غشایی و دسچوراز‌هاست (شکل ۸).



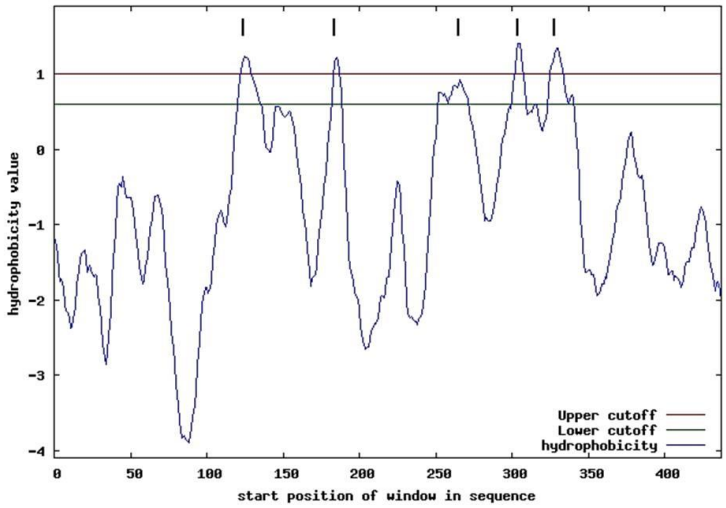
شکل ۷- دمین‌های شناسایی‌شده توسط پایگاه CDD و تعیین موتیف‌های حفاظت‌شده هیستیدین. دمین‌های سیتوکروم b5 و اسید چرب دسچوراز شناسایی شده‌اند. محل موتیف‌های هیستیدین به‌شکل نشانه‌های مثلثی با عنوان putative di-iron ligands مشخص شده است.



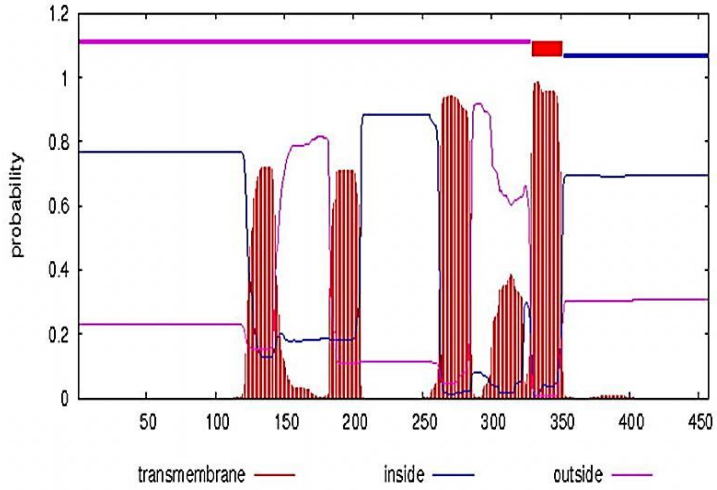
شکل ۸- تعیین ساختارهای دوم توالی پروتئینی (α-helices، Strand و Supercoil) توسط سرور psipred. مناطق تراغشایی با کادرهای مستطیلی مشخص شده‌اند.

نمودار هیدروپاتی این ژن با نرم‌افزار TopPred، ۵ قطعه گذرنده از غشا را نشان داد. این مناطق، موقعیت‌های آب‌گریز را مشخص می‌کنند. نواحی آب‌گریز، مارپیچ‌های تراغشایی هستند که در بیشتر دسچورازهای غشایی وجود دارند و به‌عنوان دمین‌های حفاظت‌شده بین تمام هومولوگ‌های این ژن بیان شده‌اند (شکل ۹).

نتایج سرور TMHMM نیز احتمال مارپیچ‌های غشایی را در ۵ منطقه تأیید کردند (شکل ۱۰).

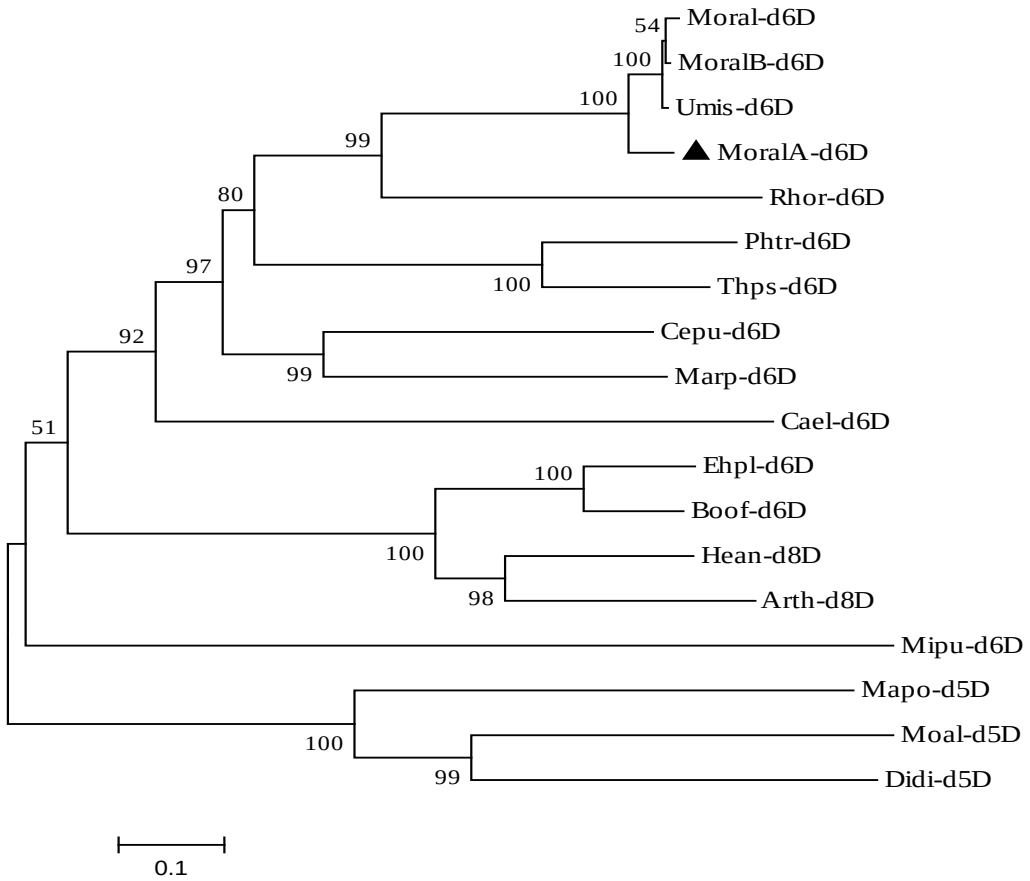


شکل ۹- نمودار هیدروپاتی ژن *دلتا ۶ دسچوراز* با نرم‌افزار TopPred. ۵ قطعه گذرا از غشا در موقعیت آمینواسیدهای ۱۲۵ تا ۱۴۵، ۱۸۵ تا ۲۰۵، ۲۶۶ تا ۲۸۶، ۳۰۵ تا ۳۲۵ و ۲۳۹ تا ۳۴۹ قرار دارند.



شکل ۱۰- تعیین مناطق تراغشایی با سرور TMHMM

بر اساس نتایج درختچه فیلوژنتیکی رسم‌شده با نرم‌افزار مگا۷، توالی پروتئینی ژن مدنظر هم‌ردیف سایر توالی‌های ژن *دلتا ۶ دسچوراز مورتیرلا آلپینای* گزارش‌شده قرار گرفت، اما با *دلتا ۸* و *دلتا ۵ دسچورازها* هم‌گروه نشد. این نتایج، حفاظت زیاد ژن *دلتا ۶ دسچوراز* را در این قارچ نشان می‌دهند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار مگا۷. شماره دسترسی توالی‌های پروتئینی:

Mortierella alpina D6-desaturase(MoralA-d6D) (▲); *Mortierella alpina* D6-desaturase MoralB-d6D(BAA85588.1); *Mortierella alpina* D6-desaturase(MoralII-d6D) (BAC82359.1); *Umbelopsis isabellina* D6-desaturase (Umis-d6D) (AAL73948.1); *Echium plantagineum* D6-desaturase (Ehpl-d6D) (AAZ08559.1); *Borago officinalis* D6-desaturase (Boof-d6D) (AAC49700.1); *Helianthus annuus* D8-desaturase (Hean-d8D) (Q43469.1); *Micromonas pusilla* CCMP1545 D6-desaturase (Mipu-d6D) (EEH58637.1); *Mortierella alpina* D5-desaturase (Moal-d5D)(AAR28035.1); *Marchantia polymorpha* D5-desaturase (Mapo-d5D) (AAT85663.1); *Dictyostelium discoideum* D5-desaturase (Didi-d5D) (BAA37090.1); *Arabidopsis thaliana* D8-desaturase (Arth-d8D) (AAO30042.1); *Rhizopus oryzae* D6-desaturase(Rhor-d6D) (AAS93682.1); *Ceratodon purpureus* D6-desaturas(Cepu-d6D) (CAB94993.1); *Phaeodactylum tricornutum* D6-desaturase (Phtr-d6D) (AAL92563.1); *Thalassiosira pseudonan* D6-desaturase (Thps-d6D) (AAX14505.1); *Marchantia polymorpha* D6-desaturase (Marp-d6D) (AAT85661.1); *Caenorhabditis elegans* D6-desaturase (Cael-d6D) (AAC15586.1).

بحث و نتیجه‌گیری

دسچورازهای غشایی و آنزیم‌های وابسته، نقشی اساسی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع ایفا می‌کنند. دلتا ۶ دسچوراز، آنزیمی غشایی است که دارای نقشی کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع و دروازه‌ای برای ورود اسیدهای چرب به مراحل بعدی غیراشباع‌سازی و طویل‌سازی است. قارچ *مورتیرلا آلپینا* گونه‌ای روغنی است که برای تولید تجاری اسیدهای چرب غیراشباع به کار می‌رود. در پژوهش حاضر پس از کشت قارچ *مورتیرلا آلپینا*، استخراج RNA و سنتز cDNA برای ژن *دلتا ۶ دسچوراز* انجام و پس از تأیید توالی، برای انتقال این ژن به گیاه در ناقل دوگانه pBI121 حاوی پروموتور *نایپین* همسانه‌سازی شد. در طراحی آغازگرها، توالی افزایش‌دهنده سیستم بیان گیاهی کوزاک (CCACCAUGG) به‌شکل همپوشان با جایگاه برشی *XbaI* وکدون آغاز، برای افزایش بیان

ایـن ژن اسـتفاده شـد. ریبـوزوم، تـوالی کـوزاک در مولکول‌های mRNA یوکاریوتی را جایگاه آغاز ترجمه شناسایی می‌کند و هرچه مشابهت آن با توالی توافق‌شده بیشتر باشد، سیگنال قوی‌تری برای ترجمه است (۱۰). بـر اساس نتایج توالی‌یابی، توالی نوکلئوتیدی ایـن ژن ۱۳۷۴ جفـت بـاز اسـت و پروتئینـی بـا ۴۵۷ آمینواسـید را رمـز مـی‌کنـد. در بررسـی درصـد همسـانی و مشـابهت قطعـه همسانه‌سـازی‌شـده بـا سـایر تـوالی‌هـای GeneBank در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینـی، بیشـترین همسـانی تـوالی نوکلئوتیدی (۹۸ درصد) با ژن *دلتا ۶ دسچوراز مـورتیرلا آلپینـا* بـا شـماره دسترسـی AB020032.1 و در سـطح پروتئینی به میـزان ۹۸درصـد بـا BAA85588.1 حاصـل شد. در بررسی فیلوژنتیکی، ژن استخراج‌شده بـا *دلتا ۶ دسچوراز* پروکاریوت‌ها و گیاهان در یک خـانواده قـرار گرفـت. نتیجـه هـم‌ردیفـی در سـطح نوکلئوتیـدی و پروتئینی، تغییری در توالی‌های حفاظت‌شده این ژن نشان نداد.

بر اساس نتایج بررسی‌هـای بیـو انفورماتیـک، وجـود دمـین سـیتوکروم b5، سـه موتیـف جعبـه هیسـتیدین، پیش‌بینی ویژگی‌های پروتئینـی، دمـین‌هـای تراغشـایی و حفاظـت‌شـده تأییـد شـدند. نتـایج پـژوهش‌هـا نشـان داده‌اندکه ایجـاد پیونـد دوگانـه در زنجیـره اسـید چـرب توسط آنزیم‌های دسچوراز بـه واسـطه دهنـده اکسـیژن و الکترون کاتالیز می‌شود (۱۱). سریع‌ترین دهنده الکتـرون برای بسیاری از دسچورازها، سیتوکروم b5، همـوپروتئین کوچک واکنش‌های اکسیداسیون و کاهش اسـت (۱۲). دمـین سـیتوکروم b5 ردوکتـاز در مـورتیرلا *آلپینـا*، مونومری از ۲۹۸ آمینواسید است که مطابق با طول دیگر سیتوکروم‌اکسیدازها اسـت. دمـین FAD در انتهـای N و دمین NADH در انتهای **C**، شباهت زیاد توالی بـا دیگـر سیتوکروم‌اکسیدازها را نشان می‌دهنـد. ایـن دمـین شـامل موتیف سـیتوکروم b5 (HPGG) (هیسـتیدین- پـرولین- گلایسین- گلایسـین) اسـت کـه هسـته دمـین متصـل بـه گـروه هِـم را تشـکیل مـی‌دهـد. همچنـین آنـزیم‌هـای دسـچوراز غشـایی، سـه موتیـف حفاظـت‌شـده غنـی از هیســتیدین شــامل Hxx(x)H، HxxxH و Q/HxxHH دارنـد؛ ایـن موتیـف‌هـا از نظـر کاتـالیتکی ضـروری و لیگاندهایی برای اتم آهن هستند کـه بـرای دسترسـی بـه یون‌های آهن و تشکیل بخش فعـال در حدفاصـل غشـا و سیتوپلاسم پس از اتصال به غشا ضروری هستند (۱۳). بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین، حضـور ایـن موتیـف‌هـا برای فعالیت آنزیم ضروری است و حذف یـا جهـش در هر یک از آمینواسیدهای کلیدی این موتیف‌ها، کارکرد آنزیم را مختل می‌کند. این دمین‌ها بدون هیچ تغییری در توالی ترجمه‌شده شناسایی شدند. ویژگی‌هـای شـیمیایی، ساختار ثانویه و مارپیچ‌های تراغشایی تعیین‌شده ایـن ژن، تطـابق بسـیار زیـادی بـا تـوالی گـزارش‌شـده لـی‌یـو[۳۴] و همکـاران از ایـن ژن داشـت (۷). بـا توجـه بـه حضـور اسیدهای چرب در غشای سلولی، تولید اسیدهای چـرب غیراشـباع در فرآینـدهای غشـایی تأثیرگـذار اسـت. در مطالعـه حاضـر، پروموتـور اختصاصـی بـذر مربـوط بـه پروتئین ذخیره‌ای بذر نـاپین جداسـازی‌شـده از کلـزا، در ناحیه بالادست ژن *دلتا ۶ دسچوراز* اضافه شد. اسـتفاده از پروموتور اختصاصی بذر در مسیر تولیـد ایـن اسـیدهای چرب، بیان ژن را به بخش‌های ویـژه‌ای از گیـاه محـدود کرده و علاوه بر ممانعت از تأثیر بـر فرآینـدهای غشـایی سبب استحصال آسان‌تر روغن از ایـن بافـت‌هـا مـی‌شـود (۱۴).

با استناد به نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینـی و بـا توجه به عدم تغییر دمین‌های حفاظت‌شده، انتظار مـی‌رود

که توالی همسانه‌سازی‌شده فعالیت آنزیمی مدنظر را داشته باشد. تأیید بیشتر درستی این ادعا مستلزم بیان آن در سیستم گیاهی مناسب، بررسی عملکرد آن در سطح آنزیمی و تولید محصول اسید چرب مدنظر است.

References

(1) Kew S., Mesa MD., Tricon S., Buckley R., Minihane AM., Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *The American journal of clinical nutrition* 2004; 79(4): 674-81.

(2) Ward OP., Singh A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry* 2005; 40(12): 3627-3652.

(3) Sakuradani E., Kobayashi M., Ashikari T., Shimizu S. Identification of Δ12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *European journal of biochemistry* 1999; 261(3): 812-820.

(4) Myers RA., Worm B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* 2003; 423 (6937): 280-283.

(5) Ruiz-López N., Sayanova O., Napier A., Haslam RP. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *Journal of experimental botany* 2012; 63(7): 2397-2410.

(6) Tan Li C. Cloning and functional analysis of the genes from entomopathogenic fungi involved in the biosynthesis of eicosatetraenoic acid (ETA). [Dissertation]. Saskatoon: University of Saskatchewan; 2010.

(7) Liu J., Li D., Yin Y., Wang H., Li M., Yu L. Δ6-Desaturase from *Mortierella alpina:* cDNA cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Biotechnology letters* 2011; 33(10): 1985-1991.

(8) Maniatis T., Fritsch E., Sambrook F. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1995.

(9) Sambrook J., Russell DW. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 3ra. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

(10) Wang XQ., Rothnagel JA. 5′-Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic acids research* 2004; 32(4): 1382-1391.

(11) Chen YQ., Edwards IJ., Kridel SJ., Thornburg T., Berquin IM. Dietary fat'gene interactions in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2007; 26(3-4): 535-551.

(12) Smith MA., Cross AR., Jones OT., Griffiths WT., Stymne S., Stobart K. Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Δ12-desaturase (Δ12-desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons. *Biochemical journal* 1990; 272(1): 23-29.

(13) Shanklin J., Achim C., Schmidt H., Fox BG., Münck E. Mössbauer studies of alkane ω-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94(7): 2981-2986.

(14) Petrie JR., Shrestha P., Liu Q., Mansour MP., Wood CC., Zhou XR., et al. Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. *Plant Methods* 2010; 6(1): 1-6.

[1]- Unsaturated fatty acids
[2]- Linolenic acid
[3]- α-Linolenic acid
[4]- Gamma-linolenic acid
[5]- Stearidonic acid
[6]- Arachidonic acid
[7]- Eicosapentaenoic acid
[8]- Docosahexaenoic acid
[9]- *Mortierella alpina*
[10]- Mucoromycotina
[11]- *Escherichia coli*
[12]- *Agrobacterium tumefaciens*
[13]- Yeast extract Peptone Dextrose
[14]- Cinnagen
[15]- M-MuLV Reverse transcriptas
[16]- Fermentaze
[17]- Cetyl tri methyl ammonium bromide
[18]- Bioneer
[19]- Taq DNA Polymerase
[20]- Vivantis
[21]- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-yranoside
[22]- Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
[23]- Faza Biotech
[24]- http://web.expasy.org/translate
[25]- http://web.expasy.org/protparam
[26]- https://www.ebi.ac.uk/interpro
[27]- http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred
[28]- http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html
[29]- Transmembrane
[30]- http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
[31]- MEGA.7
[32]- Conserved Domains Database
[33]- α-helix
[34]- Liu