

جداسازی، کلونینگ و بررسی بیوانفورماتیکی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز از مخمر *Pichia pastoris* GS115 جهت افزایش تولید اسید چرب آلفالینولیک اسید در دانه‌های روغنی

مرضیه حسنی^۱، شاهرخ قرنجیک^{۲*}، حمید رضا صمدلوئی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران.

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران.

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۳)

چکیده

اسید آلفالینولیک یکی از اجزای تشکیل دهنده اسیدهای چرب امگا۳ می‌باشد که برای حفظ سلامت بدن انسان ضروری بوده ولی در داخل بدن انسان ساخته نمی‌شوند. روغن برخی از دانه‌های روغنی و نیز برخی گیاهان از اصل‌ترین منابع حاوی اسید آلفالینولیک به شمار می‌آیند ولی محتوای اسید آلفالینولیک دانه‌های روغنی عمده، نظیر سویا و کلزا نسبتاً کم می‌باشد. هدف از این پژوهش همسانه‌سازی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز به منظور افزایش تولید اسید آلفالینولیک در گیاهان دانه روغنی می‌باشد. بدین منظور، پس از استخراج RNA و سنتز cDNA از مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115، این ژن توسط پرایمرهای اختصاصی حاوی توالی کوزاک تکثیر، و جهت توالی‌یابی در وکتور PTZ57R/T همسانه سازی شد. قطعه نو ترکیب پس از تایید توالی از وکتور TA جدا و به وکتور pBluescript KS(+) حاوی پروموتور ناپین الحاق و در باکتری اشرشیاکلی سویه DH5α ترانسفورم شد. سپس سازه ژنی طراحی شده جهت انتقال به گیاه، در ناقل دوگانه pBI121 همسانه‌سازی و به آگروباکتریوم تومفاسینس سویه LBA4404، منتقل شد. خصوصیات بیوانفورماتیکی ژن مورد بررسی توسط ابزارهایی مانند ProtParam, TMHMM, TopPred و SOPMA بررسی گردید. نتایج واکنش PCR و تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲۴۶ bp صحت همسانه‌سازی این ژن را تایید کرد. همچنین تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲۱۰ bp توسط پرایمرهای داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۱۵ دسچوراز، و نیز ایجاد قطعه ۲۱۴۵ bp در هضم آنزیمی، تاییدی بر الحاق صحیح این ژن در امتداد پروموتور ناپین بود. نتایج توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان داد که توالی کد کننده این آنزیم مشتمل بر ۱۲۴۶ نوکلئوتید و کد کننده ۴۱۵ اسید آمینه می‌باشد. آنالیز توالی آمینواسیدی وجود دو دومین و ۵ هلیکس تراغشایی را تایید کرد. همچنین پیش‌بینی خواص پروتئینی، بررسی سیگنال پپتیدها و ساختار دوم، ثابت کرد که این آنزیم جزء آنزیم‌های پایدار غشایی محسوب می‌شود.

کلید واژگان: ژن کلونینگ، اسید آلفالینولیک، دلتا ۱۵ دسچوراز، پیکیا پاستوریس

* مسئول مکاتبات: gharanjik@shahroodut.ac.ir

۱- مقدمه

اخیرا در صنایع غذایی، روغن های گیاهی با محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر^۱ و مقاوم در برابر اکسیداسیون مورد توجه قرار گرفته است [۱]. این اسیدهای چرب نقش مهمی در رشد، تولید مثل، حفظ سلامت بینایی، ساختار سلولی، متابولیسم کلسترول، تنظیم ژنی، پیشگیری از بیماری های قلبی و عروقی و سرطان ها دارند [۲]. در حال حاضر، روغن ماهی منبع اصلی و تجاری اسیدهای چرب غیر اشباع در رژیم غذایی انسان ها محسوب می شود، اما بدلیل آلودگی دریاها با فلزات سنگین، جیوه و دی اکسین ها، نیاز به یافتن منابع جدید حاوی این اسیدهای چرب ضروری به نظر می رسد [۳]. اسید آلفا لینولنیک^۲ ($\Delta^{9,12,15}$ ALA 18:3)، یک اسید چرب ضروری از خانواده امگا ۳ است که بدن قادر به سنتز آن نیست و باید از طریق رژیم غذایی وارد بدن شود. اسید آلفا لینولنیک به عنوان سوپراسترا توسط یک سری از آنزیم های دسچوراز به اسیدهای چرب امگا ۳ با زنجیره بلندتر شامل اسید ایکوزاپنتانوئیک^۳ ($\Delta^{5,8,11,14,17}$ EPA 20:5) و اسید دوکوزاهگزانوئیک^۴ ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ DHA 22:6) تبدیل می شوند [۴]. روغن برخی از دانه های روغنی و نیز برخی گیاهان از اصلی ترین منابع حاوی اسید آلفا لینولنیک به شمار می آیند ولی محتوای اسید آلفا لینولنیک دانه های روغنی عمده، نظیر سویا و کلزا نسبتا کم می باشد. آنزیمی که اسید آلفا لینولنیک را تولید می کند دلتا ۱۵ دسچوراز^۵ نام دارد. این آنزیم با اضافه کردن یک باند دوگانه به اسید لینولئیک، اسید آلفا لینولنیک را تولید می کند. مخمر پیکیا پاستوریس^۶ گونه مخمری متیلوتروف است که بیشترین مقدار اسیدهای چرب آن از اسید اولئیک و اسید آلفا لینولنیک

تشکیل شده است. آنزیم دلتا ۱۵ دسچوراز موجود در این مخمر یک آنزیم منحصر به فرد با گستردگی کاتالیزوری غیر اختصاصی در کاربرد هر دو نوع ۱۸ و ۲۰ کربنه اسیدهای چرب امگا ۶ به عنوان سوپراسترای اولیه برای تولید اسید آلفا لینولنیک و دیگر اسیدهای چرب امگا ۳ می باشد [۵]. هدف از این پژوهش جداسازی و همسانه سازی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز از این مخمر، همچنین بررسی بیوانفورماتیکی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن و در نهایت طراحی سازه ژنی مناسب جهت انتقال به گیاه با هدف تنظیم مسیرهای بیوشیمیایی اسیدهای چرب و افزایش تولید محتوای اسید آلفا لینولنیک در گیاهان دانه روغنی می باشد.

۲- مواد و روش ها

به منظور استخراج RNA و تکثیر ژن مورد نظر، از مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115 (انستیتو پاستور، تهران، ایران) استفاده گردید. باکتری های مورد استفاده در این تحقیق شامل اشریشاکلی^۷ سویه DH5 α و آگروباکتریوم تومیفاسینس^۸ سویه LBA4404 بودند (دانشگاه رازی، کرمانشاه). باکتری ایکولای به عنوان میزبان جهت نگهداری و تکثیر سازه های ساخته شده و آگروباکتریوم جهت انتقال بعدی ژن مورد نظر به گیاه استفاده گردید. ناقل های مورد استفاده شامل PTZ57R/T (شرکت اینویترژن^۹، آمریکا) جهت همسانه سازی اولیه و ارسال جهت توالی یابی، pBlueScript KS(+) حاوی پروموتور نابین و وکتور دوگانه pBI121 به عنوان ناقل بیانی استفاده شد.

۲-۱- استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه مخمری در محیط YPD^{۱۰} (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پپتون و ۲٪ دکستروز) (MERCK، آلمان) کشت و در شیکر انکوباتور به مدت ۱۶ ساعت با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای ۳۰ °C

1. Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA)
2. α -Linolenic acid (ALA)
3. Eicosapentaenoic acid (EPA)
4. Docosahexaenoic acid (DHA)
5. $\Delta 15$ Desaturase ($\Delta 15d$)
6. *Pichia Pastoris*

7. *Escherichia coli*
8. *Agrobacterium tumefaciens*
9. Invitrogen
10. Yeast extract Peptone Dextrose

دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی^۶ یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال^۷ یک دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، بسط^۸ یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت بسط نهایی^۹ در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه به دست آمد. صحت قطعه تکثیری حاصل بیان ژن دلتا۵ دسچوراز توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. در نهایت محصول PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل (شرکت بایونیر، کره جنوبی) خالص سازی شد.

۲-۳- همسانه‌سازی در ناقل TA^{۱۰} و انجام

توالی‌یابی

پس از خالص سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن دلتا۵ دسچوراز از ژل آگارز، در پلاسمید pTZ57R/T (شرکت اینویترژن، آمریکا) به کمک آنزیم T4 لیگاز، مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده به وکتور متصل گردید. برای تهیه باکتری‌های مستعد ایکولای سوبه DH5α و انتقال پلاسمید نو ترکیب به آن به ترتیب از روش کلریدکلسیم سرد و شوک حرارتی استفاده گردید [۷]. باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط LB جامد حاوی ۵۰ μg/ml آمپی‌سیلین، کشت داده شدند. جهت بررسی صحت همسانه‌سازی، چند کلونی بصورت تصادفی انتخاب و پس از تأیید اولیه با استفاده از کلونی PCR توسط آغازگرهای اختصاصی این ژن، استخراج پلاسمید، به روش لیز قلیایی (۸) انجام و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *SacI* و *XbaI* انجام گرفت. جهت اطمینان از صحت همسانه‌سازی و تأیید نهایی توالی ژن مورد نظر، توالی‌یابی با استفاده از آغازگر T7 به سفارش شرکت فزایوتک^{۱۱} انجام گرفت.

جهت رشد قرار داده شد. RNA کل با استفاده از روش فنل گرم استخراج شد [۶]. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA، از آغازگرهای عمومی 18 Oligo (dt) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV Revers transcriptas (شرکت سیناژن، تهران، ایران) استفاده شد. جهت شناسایی و اطمینان از حضور ژن دلتا۵ دسچوراز در سطح DNA ژنومی، استخراج DNA به روش CTAB^۱ (ستیل‌تری‌متیل آمونیوم بروماید) انجام و به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای داخلی استفاده گردید.

۲-۲- طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز (RT-PCR)

طراحی آغازگرهای ژن دلتا۵ دسچوراز، با توجه به توالی این ژن از مخمر پیکیا پاستوریس در پایگاه اطلاعاتی NCBI (شماره دسترسی EF116884) انجام گرفت. جهت سهولت در مراحل همسانه‌سازی، در طراحی آغازگرها پس از آنالیز نقشه برشی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز، توسط نرم‌افزار NEB Cutter، در آغازگر رفت^۲ سایت برشی *XbaI* به همراه توالی افزایش دهنده بیان، ژن کوزاک، و در آغازگر برگشت^۳ سایت برشی *SacI* اضافه گردید. سنتز آغازگرها به سفارش شرکت تکاپوزیست، توسط شرکت بایونیر^۴ (کره جنوبی) صورت گرفت (جدول ۱).

cDNA سنتز شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن، توسط آنزیم تک پلی‌مراز^۵ (شرکت سیناژن) مورد استفاده قرار گرفت. شرایط بهینه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

6. Denaturation
7. link
8. Extension
9. Final extension
10. TA cloning vector
11. Faza Biotech

1. Cetyl tri methyl ammonium bromide
2. Forward primer
3. Reverse primer
4. Bioneer
5. Taq DNA Polymerase

Table 1 The primers used in this study

Primer	Sequence	Product (bp)	TM
D15-F	5'-ggcTCTAGAgccaccatgtcaaaagtcaactgttcggg-3'	1246 bp	65°C
D15-R	5'- gccGAGCTCcttagtatccttaggttaacacc-3'		
Pro. N-F	5'-AAACCGTTCGGCTCCTATCC-3'	1210 bp	57°C
$\Delta 15d$ - R	5'- ACCAGTAGCATTCGTGGCAA-3'		

گردید. جهت افزایش احتمال اتصال صحیح قطعات مورد نظر، قطعه حاوی پروموتور ناپین- ژن دلتا ۱۵ دسچوراز و پلاسمید برش یافته pBI121، از روی ژل خالص سازی شده و سپس انتهای چسبنده ایجاد شده توسط آنزیم T4 لیگاز به هم متصل شدند (شکل ۱). سلول های مستعد آگروباکتریوم تهیه و انتقال پلاسمیدهای نو ترکیب به روش ذوب و انجماد صورت گرفت. باکتری ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی مقادیر مناسبی از ۵۰ µg/ml کانامایسین و ۵۰ µg/ml ریفامپسین به صورت شبانه کشت داده شدند. کلونی های حاوی پلاسمید نو ترکیب، با استفاده از کلونی PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

۶-۲- بررسی های بیوانفورماتیکی

توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی یابی ناحیه کد کننده ژن دلتا ۱۵ دسچوراز، در سایت (<http://web.expasy.org/translate/>) به پروتئین ترجمه گردید. خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده توسط برنامه ProtParam (<http://expasy.chl/tools/protparam.html/>) تعیین شد. آنالیز وجود دومین های هیدروپاتی توسط سرور TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) تأیید شد. برای پیش بینی ساختار دوم از سایت SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) استفاده شد. دومین پروتئینی $\Delta 15de$ از بانک اطلاعاتی Pfam با آدرس اینترنتی (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>) مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل هیدروپاتی توالی توسط ابزار TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) رسم گردید. جهت تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز

۲-۴- ساب کلونینگ ژن در وکتور (+)

pBluescript II KS حاوی پروموتور ناپین

پس از اطمینان از صحت قطعه همسانه سازی شده، جهت همسانه سازی در وکتور (+) pBluescript II KS حاوی پروموتور ناپین، هر دو وکتور PTZ57R/T و (+) pBluescript II KS، با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *SacI* مورد هضم دو گانه قرار گرفتند و پس از خالص سازی از روی ژل، اتصال نواحی انتهایی چسبنده ایجاد شده به کمک آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. مراحل همسانه سازی و انتقال پلاسمید نو ترکیب به سلول های مستعد باکتری *E.coli* طبق مراحل قبل انجام گرفت و باکتری های ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک ۵۰ µg/ml آمپی سیلین به صورت شبانه کشت گردیدند. کلونی های رشد یافته به عنوان کلون های واجد و احتمالاً واجد قطعه ژن مورد نظر انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در حامل، چند کلونی تصادفی انتخاب شده و به وسیله کلونی-PCR و هضم آنزیمی و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جهت اطمینان از صحت قرارگیری پروموتور ناپین در ابتدای ژن، RT-PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی پروموتور ناپین (آغازگر رفت) و ژن دلتا ۱۵ دسچوراز (آغازگر برگشت) طراحی و واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گرفت (جدول ۱).

۲-۵- همسانه سازی در ناقل دو گانه pBI121

جهت همسانه سازی سازه در ناقل دو گانه pBI121، پلاسمید نو ترکیب توسط جایگاه های برشی ابتدای پروموتور و انتهای ژن (*HindIII* و *SacI*) برش داده شد. هضم دو گانه ناقل pBI121 توسط این آنزیم ها موجب حذف ژن بتا گلوکورونیداز (GUS)

1. Napin gene promotor

به دلیل شباهت بالای دلتا ۱۵ دسچوراز و دلتا ۱۲ دسچوراز به هم، از توالی پروتئینی چند ژن دلتا ۱۲ دسچوراز نیز، در رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده گردید.

همسازسازی شده با توالی این ژن در گونه‌های دیگر، درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) رسم گردید.

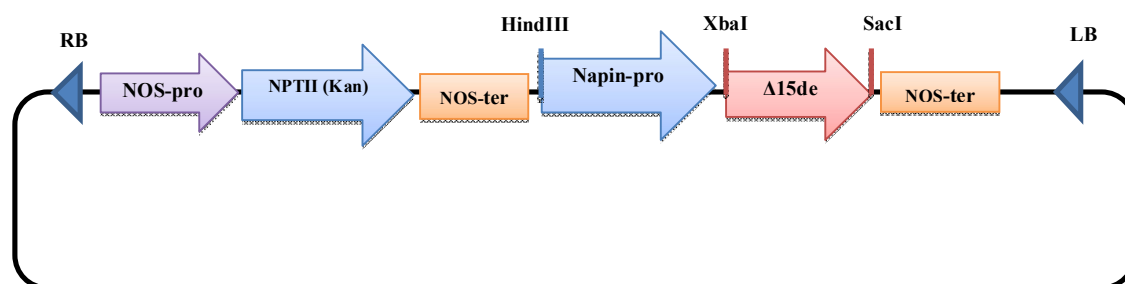


Fig 1 schematic feature of recombinant vector pBI121: Nap + Δ15de, containing Napin promoter and Delta 15 Desaturase gene construct.

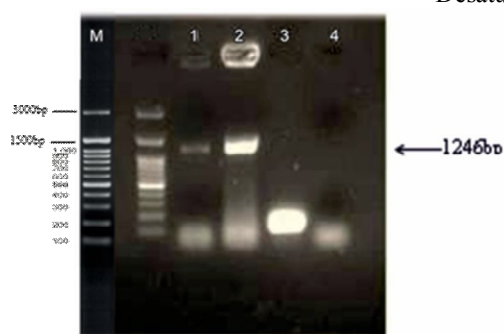


Fig 3 Electrophoresis pattern of RT-PCR products on a 1% agarose gel. M: 100 bp Ladder, lanes 1 and 2: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene specific primers. Lane 3: PCR positive control using yeast actin gene (148 bp), lane 4: negative control (without template).

واکنش کلونی-PCR بر روی کلونی‌های انتخابی با پرایمرهای اختصاصی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز به منظور تایید وجود ژن انجام گرفت که طول کامل ژن در پلاسمید نوترکیب بدست آمد (شکل ۴).

پس از استخراج پلاسمیدهای نوترکیب، نتایج هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی و ایجاد قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۲۴۶bp صحت همسازسازی در پلاسمید مورد نظر را تایید نمود. نتایج حاصل از توالی‌یابی که جهت تایید نهایی و بدست آوردن توالی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز با استفاده از آغازگر T7 انجام گرفت، همسازسازی ژن مورد نظر به طول ۱۲۴۶ bp را تایید نمود.

۳- نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای داخلی، و تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۲۲ bp، وجود ژن دلتا ۱۵ دسچوراز را بر روی DNA ژنومی مخمر *P.pastoris* اثبات کرد (شکل ۲).

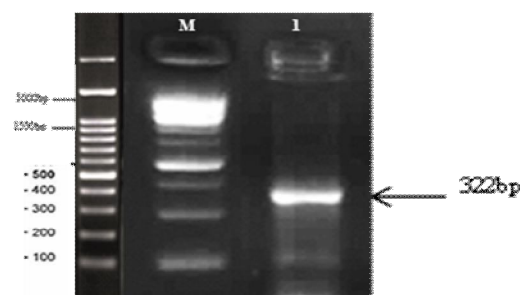


Fig 2 Electrophoresis pattern of PCR product using Delta 15 Desaturase internal primers. M: 100 bp Ladder, lanes 1: amplified expected 322 bp fragment.

انجام واکنش RT-PCR برای cDNA سنتز شده تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۲۴۶ bp را به همراه داشت که معادل طول کامل منطقه کد کننده ژن دلتا ۱۵ دسچوراز می‌باشد (شکل ۳). از آغازگرهای ژن اکتین^۱ از ژنوم مخمر *P. pastoris* پاستوریس به عنوان کنترل مثبت در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده گردید، که طول قطعه تکثیری این آغازگرها ۱۴۸bp می‌باشد. پس از الحاق این ژن به پلاسمید pTZ57R/T، رشد کلونی‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشانگر وجود پلاسمید نوترکیب در باکتری‌های حامل آن‌ها می‌باشد.

1. Actin

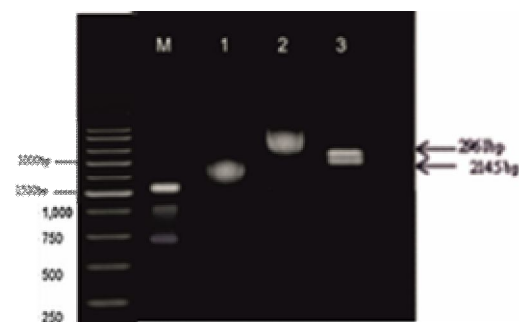


Fig 6 Agarose gel electrophoresis pattern of double digestion of recombinant pBluescript KS(+) vector using *SacI* and *HindIII* restriction enzymes. M: 100 bp Ladder, lane 1: non-recombinant plasmid. Lane 2: recombinant plasmid harboring napin promoter and Delta 15 desaturase gene, Lane 3: double digested recombinant plasmid created two fragments, including 2145 bp gene construct and 2896 bp rest of the plasmid.

پس از همسانه‌سازی سازه حاوی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۱۵ دسچوراز در ناقل دوگانه pBI121 و انتقال آن به اگروباکتریوم LBA4404، صحت همسانه‌سازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز و آغازگرهای داخلی ناپین - دلتا ۱۵ دسچوراز انجام گرفت که نتیجه آن به ترتیب تکثیر قطعاتی به طول تقریبی ۱۲۴۶ bp توالی ژن و ۱۲۱۰ bp نواحی داخلی پروموتور و ژن بود (شکل ۷).

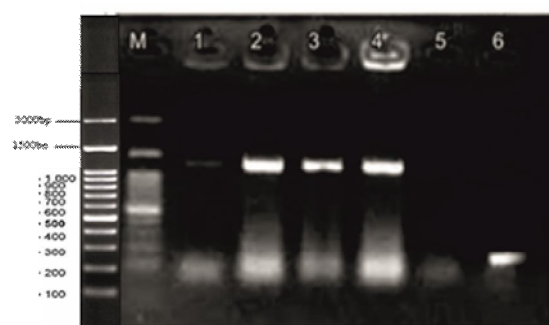


Fig 7 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on *Agrobacterium* containing recombinant pBI121 vector. M: 100 bp Ladder, lanes 1,2,3: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane 4: amplified 1210bp using internal primer of napin promoter and Delta 15 desaturase primer, Lane 5, 6: negative control (non recombinant plasmid).

نتایج توالی‌یابی ژن مورد نظر نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده در وکتور pTZ57R/T، قطعه‌ای به طول ۱۲۴۶ نوکلئوتیدی بوده و پروتئینی به طول ۴۱۵ اسیدآمینه را کد می‌کند. این

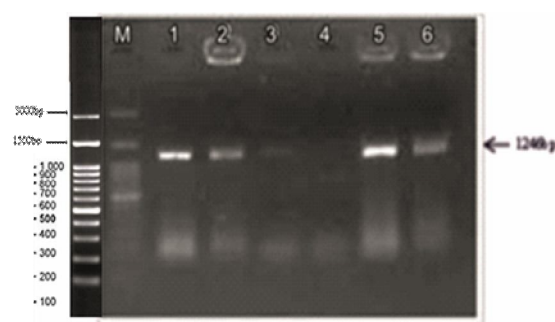


Fig 4 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on recombinant pTZ57R/T vector. M: 100 bp Ladder, lanes 1,2,3,5,6 : amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane 4: negative control (non recombinant plasmid).

پس از اطمینان از صحت ژن تکثیری، این قطعه در ناحیه MCS وکتور pBluescript KS(+) از طریق برش در جایگاه‌های *SacI* و *XbaI* در پایین دست پروموتور ناپین همسانه‌سازی گردید. پس از ترانسفورم کردن پلاسمید نو ترکیب حاصل در باکتری *E. coli*، کلونی-PCR بر روی کلونی‌ها با آغازگرهای اختصاصی، صحت همسانه‌سازی و تکثیر طول کامل ژن به طول ۱۲۴۶bp توالی ژن مورد نظر را تأیید کرد و تکثیر قطعه ۱۲۱۰bp با استفاده از آغازگرهای داخلی پروموتور و ژن دلتا ۱۵ دسچوراز، جهت قرارگیری این ژن در امتداد ناپین را تأیید کرد (شکل ۵).

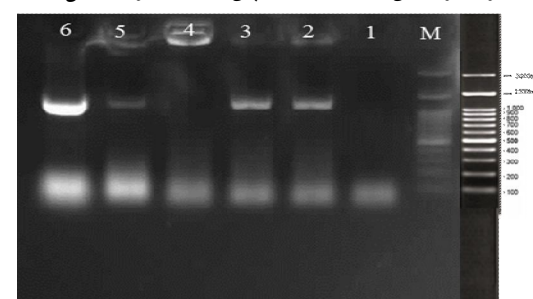


Fig 5 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on recombinant pBluescript KS(+) vector. M: 100 bp Ladder, lanes 2,3,5: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane 6: amplified 1210bp using internal primer of napin promoter and Delta 15 desaturase primer, Lane 1, 4: negative control (non recombinant plasmid).

هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های برشی ابتدای پروموتور و انتهای ژن (*SacI* , *HindIII*) قطعاتی به طول تقریبی ۲۱۴۵ bp مربوط به پروموتور و ژن و ۲۸۹۶ bp پلاسمید حاصل گردید (شکل ۶).

دارای دو دومین شامل یک دومین FA desaturase و یک دومین با کارکرد ناشناخته^۱ (DUF3474) بود (شکل ۹).

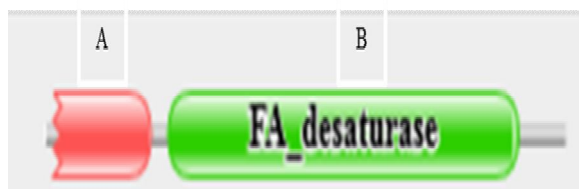


Fig 9 Two domains of the Delta 15 desaturase enzyme. A: Domain with unknown function, B:FA-desaturase domain.
(<http://pfam.xfam.org/search/sequence>).

بر طبق مطالعات انجام شده اکثر دسجورازها دارای هلیکس‌های ترانس‌ممبرانی می‌باشند. نتایج حاصل از سایت TMHMM نشان داد که پروتئین دلتا ۱۵ دسجوراز نیز جزو پروتئین‌های غشائی طبقه‌بندی می‌شود که دارای ۵ هلیکس تراغشایی^۲ می‌باشد (شکل ۱۰).

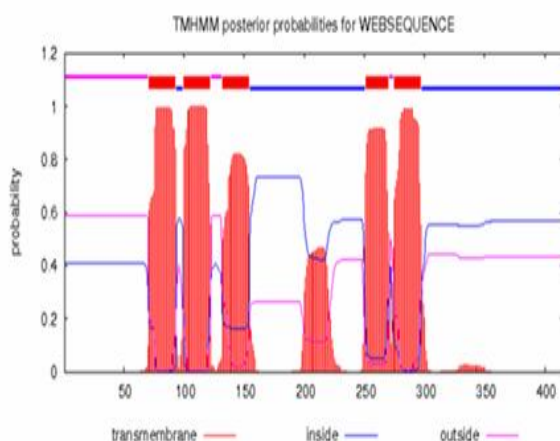


Fig 10 Prediction of trans-membrane regions of the Delta 15 desaturase enzyme using TMHMM server.

بر اساس داده‌های حاصل از آنالیز توالی پروتئینی توسط نرم‌افزار TopPred و نمودار هیدروپاتی حاصل، این پروتئین هیدروفوب بوده که در ناحیه هلیکس‌های ترانس‌ممبرانی مابین اسیدهای آمینه ۷۵-۹۵، ۱۰۲-۱۲۲، ۱۳۷-۱۵۷، ۱۹۹-۲۱۹، ۲۷۲-۲۹۲، میزان هیدروفوبی بالایی می‌باشد. نواحی هیدروفوب، مارپیچ‌های تراغشائی می‌باشند که در اکثر دسجورازهای غشائی موجود بوده و به‌عنوان

پروتئین بیشترین شباهت را به میزان ۹۹٪ با پروتئین حاصل از بیان ژن دلتا ۱۵ دسجوراز *P. pastoris* سویه GS115 با شماره دسترسی EF116884.1 داشت که نشان دهنده حفاظت بالای ژن در این مخمر می‌باشد (شکل ۸).

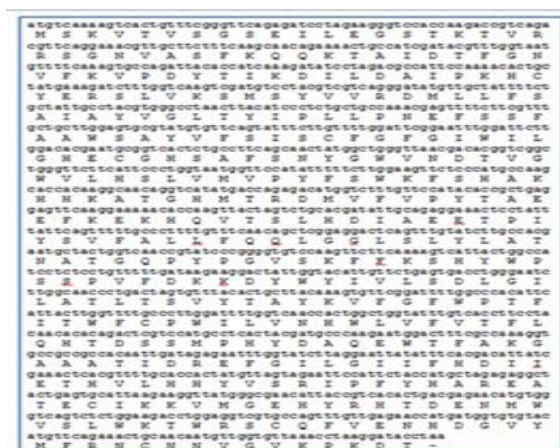


Fig 8 The nucleotide and amino acid sequences of the Delta 15 desaturase gene.
(<http://web.expasy.org/translate/>)

با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده توسط نرم افزار ProtParam، وزن مولکولی این توالی را ۴۷۷۷۲/۷ دالتون، نقطه ایزوالکتریک (PI) آن ۷/۰۸ محاسبه گردید. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیانگر میزان پایداری آن‌ها در لوله آزمایش می‌باشد و پروتئین‌های با شاخص کمتر از ۴۰ جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند. آنزیم دلتا ۱۵ دسجوراز موجود در مخمر *P.pastoris* دارای شاخص ناپایداری ۳۵/۷۵ می‌باشد که جزء پروتئین‌های پایدار محسوب می‌شود. شاخص آلفاتیک ۸۰/۰۵ محاسبه گردید. ضریب خاموشی نشان دهنده میزان جذب نور در یک طول موج خاصی توسط یک پروتئین می‌باشد. میزان ضریب خاموشی این پروتئین ۱۱۵۶۵۵ محاسبه گردید. از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۳۵ اسید آمینه (آرژنین و لیزین) دارای بار مثبت و ۳۶ اسید آمینه (آسپارات و گلوتامات) دارای بار منفی بودند. نتایج حاصل از سایت SOPMA برای بررسی ساختار دوم اسیدهای آمینه نشان داد که ساختار پروتئینی این ژن دارای ۳۸/۸۰٪ آلفاهلیکس، ۷/۷۱٪ مارپیچ بتا و ۳۲/۰۵٪ سوپراکویل می‌باشد. دومین پروتئینی دلتا ۱۵ دسجوراز از بانک اطلاعاتی Pfam مورد بررسی قرار گرفت. این سایت دومین‌های پروتئینی توالی مورد نظر را نشان می‌دهد. ژن دلتا ۱۵ دسجوراز

1. Domains of unknown function
2. Transmembrane helix

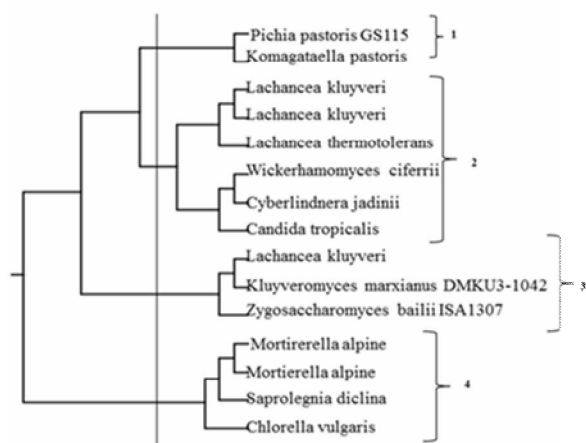


Fig 12 Phylogenetic trees using ClustalW software, to determine the proximity of the delta 15 desaturase protein in yeast *P. pastoris* with other species. The

accession No. of proteins is: *Pichia pastoris* GS115: (VIRT26852), *Komagataella pastoris* : (ABL63813), *Lachancea kluyveri*: (ADE06664), *Lachancea kluyveri*: (BAD11952), *Lachancea thermotolerans*: (XP-002553950), *Wickerhamomyces ciferrii*: (XP_011275445), *Cyberlindnera jadinii*: (BAJ78984), *Candida tropicalis*: (ADN42964), *Lachancea kluyveri*: (BAD08375), *Kluyveromyces marxianus*: (BAO38850), *Zygosaccharomyces*: (CDH15170), *Mortierella alpine*: (BAA81754), *Mortierella lpine*: (BAD91495), *Saprolegnia diclina*: (AAR20443), *Chlorella vulgaris*: (BAB78716)

۵- بحث

کمبود اسیدهای چرب غیر اشباع در رژیم غذایی، یکی از شایع-ترین مشکلات تغذیه‌ای در جهان به شمار می‌رود. به دلیل کاهش استفاده از منابع دریایی در غذای مصرفی انسان و نیز کمبود اسیدهای چرب امگا-۳ در روغن‌های گیاهی، توسعه یک منبع غذایی غنی، حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ از طریق مهندسی ژنتیک بسیار حائز اهمیت می‌باشد [۹]. در این پژوهش با هدف افزایش تولید اسیدآلفالینولنیک به عنوان یکی از اسیدهای چرب ضروری از خانواده امگا-۳، در گیاهان دانه روغنی، ژن دلتا ۱۵ دسچوراز از مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115 جداسازی و پس از تعیین توالی، به همراه پروموتور ناپین در ناقل بیانی pBI121 همسانه‌سازی شد. ژن دلتا ۱۵ دسچوراز با اضافه کردن یک باند دوگانه به لینولنیک اسید، اسیدآلفالینولنیک را تولید می‌کند. این عمل غیراشباع‌سازی^۱ اسیدهای چرب طبق فرایندی

دومین‌های حفاظت‌شده بین تمام هومولوگ‌های این ژن بیان گردیده‌اند (شکل ۱۱).

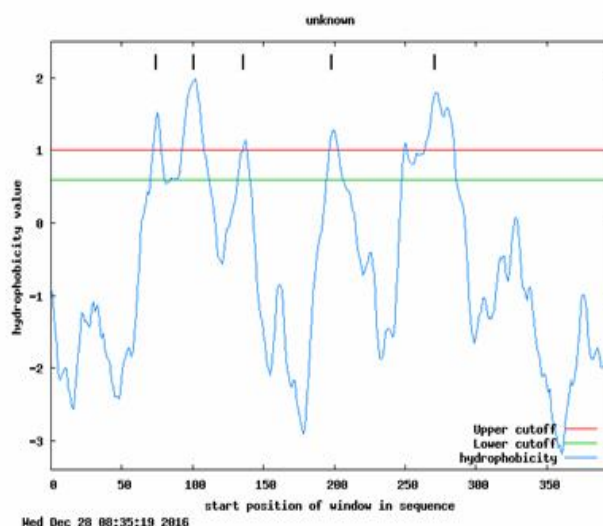


Fig 11 Hydrophobicity graph of the Delta 15 desaturase enzyme using TopPred software.

جهت تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز مخمر *P. pastpris* با توالی این ژن در گونه‌های دیگر، درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار ClustalW رسم گردید (شکل ۱۲). در این بررسی ۱۴ گونه که دارای میزان تشابه بالای ۶۰٪ با این ژن بودند را انتخاب کردیم. بر طبق نتایج بدست آمده در درخت فیلوژنتیکی حاضر ۴ کلاستر اصلی مشاهده می‌شود که در کلاستر اول ژن دلتا ۱۵ دسچوراز در گونه *Pichia pastoris* با ژن دسچوراز در گونه *Komagataella pastoris* در یک کلاستر قرار گرفته است که نشانگر قرابت بسیار نزدیک با ژن دلتا ۱۵ دسچوراز در این گونه می‌باشد و همچنین بر اساس مشاهده می‌شود که گونه‌های کلاستر اول با گونه‌های کلاستر دوم دارای یک جد مشترک می‌باشند که گویای این مطلب می‌باشد که ژن دسچوراز موجود در گونه‌های موجود در این دو کلاستر از یک جد مشترک جدا شده و در طول زمان تکامل یافته‌اند.

1. Desaturation

همسانه‌سازی شده با سایر توالی‌های GenBank در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی، بیشترین همسانی توالی نوکلئوتیدی به میزان ۹۹٪ با ژن دلتا ۱۵ دسچوراز *Pichia pastoris*، با شماره دسترسی EF116884 و در سطح پروتئینی نیز به میزان ۹۷٪ با پروتئینی با شماره دسترسی ABL63813 بدست آمد. نتایج هم‌ردیفی^۲ در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی، تغییری در توالی‌های حفاظت شده این ژن نشان نداد. خصوصیات شیمیایی، ساختار ثانویه و هلیکس‌های ترانس‌ممبران تعیین شده این ژن، تطابق بسیار بالایی با توالی‌های گزارش شده داشت. با استناد به نتایج بلاست پروتئینی و تأیید حضور دومین‌های کارکردی، می‌توان پیش‌بینی کرد که توالی همسانه‌سازی شده از این مخمر دارای فعالیت آنزیمی موردنظر باشد. تأیید بیشتر این ادعا، مستلزم بیان آن در سیستم گیاهی مناسب، بررسی کارکرد آن در سطح آنزیمی و تولید محصول اسیدچرب مورد نظر می‌باشد. انتظار می‌رود با افزایش میزان تولید اسیدآلفالینولیک در گیاهان، بتوان با بیان همزمان سایر ژن‌های دسچوراز و الانگاز موجود در زنجیره، اقدام به تولید اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر (PUFA) پایدار در گیاهان نمود.

۶- منابع

- [1] Damude, H. G., and Yada N. S. 2012. Delta-15 desaturase genes suitable for increasing levels of omega-3 fatty acids. U.S. Patent, Application number, 13/611,554.
- [2] Liu L, Yin ZJ, Xiao L, Xu YN., and Qu L Q. 2012. Identification and evaluation of ω -3 fatty acid desaturase genes for hyperfortifying α -linolenic acid in transgenic rice seed., *Journal of experimental botany*. 63(8): 3279-3287.
- [3] Alonso D. L., and Maroto F. G. 2000. Plants as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances*, 18(6): 481-497.
- [4] Parker-Barnes, J. M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A. E., Thurmond, J. M., Chaung, L.T., Huang YS., Mukerji, P. 2000. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15): 8284-8289.

صورت می‌گیرد که در طی آن، باندهای دوگانه (C=C) در نقاط ویژه‌ای به زنجیره‌های اسیل‌آلفاتیک اضافه می‌گردد [۱۰ و ۱۱]. علاوه بر این آنزیم‌ها، آنزیم‌های دیگری به نام الانگاز^۱ وجود دارند که باعث طولیل شدن، طول زنجیرهای کربنی اسید چرب می‌شوند. فرآیندهای غیراشباع کردن و طولیل‌سازی‌های متعدد و پی‌درپی که روی سوبسترهای خاص انجام می‌پذیرد، منجر به سنتز اسیدهای چرب غیر اشباع تک‌گانه و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه می‌شود.

اخیرا تحقیقات زیادی با هدف دستکاری‌های ژنتیکی برای مهندسی گیاهان به منظور افزایش تولید اسیدآلفالینولیک در حال انجام می‌باشد [۱۶-۱۲]. در تحقیقی بیان ژن دلتا ۱۵ دسچوراز در گیاه سویا به تنهایی باعث افزایش سطوح اسیدآلفالینولیک در دانه‌ها از حدود ۱۰٪ به بیشتر از ۵۳٪ و بیان همزمان این ژن به همراه ژن دلتا ۶ دسچوراز، منجر به افزایش سطح اسید چرب غیراشباع استتاریدونیک اسید (SDA) به بیشتر از ۵/۲۹٪ شده است [۱۷]. در تحقیق دیگری ژن دلتا ۱۵ دسچوراز را از سویا به برنج منتقل کردند که در گیاهان تراریخته حاصل، مقدار اسیدآلفالینولیک از ۲/۲٪ به ۴۰٪ افزایش یافت (۱۸). استفاده از پروموتورهایی مانند پروموتور ناپین که یک پروموتور اختصاصی دانه بوده و از پروتئین ذخیره‌ای بذر ناپین در کلزا جداسازی شده، در مسیر تولید این اسیدهای چرب بیان آن‌ها را به دانه‌های گیاه محدود کرده و علاوه بر ممانعت از تأثیر بر فرآیندهای غشائی، استحصال روغن، از بافت دانه‌ها را با سهولت بیشتری امکان‌پذیر خواهد کرد [۱۹] در طراحی آغازگرها برای تکثیر این ژن، توالی افزایش دهنده سیستم بیانی کوزاک به صورت موتیف GCC(A/G)CC همپوشان با جایگاه برشی XbaI و کدون آغاز، جهت افزایش بیان این ژن استفاده شد. مطالعات مختلف نشان داده است که کوزاک از جمله توالی‌های شناخته شده تنظیمی و از ویژگی‌های ساختاری مولکول‌های mRNA در اکثر یوکاریوت‌های پر سلولی می‌باشد و توسط ریبوزوم به‌عنوان جایگاه آغاز ترجمه شناخته می‌شود و هرچه مشابهت آن با توالی مورد توافق بیشتر باشد، سیگنال قوی‌تری برای ترجمه است (۲۱،۲۰). بر اساس نتایج، توالی نوکلئوتیدی ژن کلون شده در این تحقیق، ۱۲۴۶ bp بدست آمد که پروتئینی با ۴۱۵ اسید آمینه را رمز می‌کند. در بررسی درصد همسانی و مشابهت قطعه

- of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97: 8284-8289.
- [15] Domergue F., Abbadi A., Ott C., Zank TK., Zahringer U., and Heinz E. 2003. Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 35115-35126.
- [16] Qi B., Fraser T., Mugford S., Dobson G., Sayanova O., Butler J., Napier J.A., Stobart A.K., Lazarus C.M. 2004. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnology*. 22: 739-745
- [17] Eckert, H., Lavallee, B., Schweiger, B., J., Kinney, A.J., Cahoon, E.B. and Clemente, T. 2006. Coexpression of the borage $\Delta 6$ desaturase and the Arabidopsis $\Delta 15$ desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. *Planta* 224, 1050-1057.
- [18] Anai T., Koga M., Tanaka H., Kinoshita T., Rahman S.M., Takagi Y. 2003. Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene. *Plant Cell Report*. 21: 988-992.
- [19] Jalali-Jvaran M., Mirza-ghaderi G., Shakib A.M. 2004. Study CaMV 35S promoter with GUS reporter gene in canola (*Brassica napus*) transgenic. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* (in Persian). 35(3): 613-620.
- [20] Wu Q., Liu H., and Zheng G. 2009. Unsaturated fatty acid: Metabolism, synthesis and gene regulation. *African journal of Biotechnology*. 8(9): 1782-1785.
- [21] Wang XQ., and Rothnagel JA. 2004. 5'- Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic acids research*. 32(4): 1382-91
- [5] Zhang X., Li M., Wei D., and Xing L. 2008. Identification and characterization of a novel yeast $\omega 3$ - fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. *Yeast*. 25(1): 21-27.
- [6] Collart M. A., and Oliviero S. 2001. Preparation of yeast RNA. *Current protocols in molecular biology*. 13-12.
- [7] Maniatis T., Fritsch E., Sambrook F. 1995. Molecular cloning. A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York.
- [8] Sambrook J., and Russell DW. 2001. Molecular cloning A Laboratory Manual. 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York.
- [9] Van de Loo FJ., and Somerville C. 1994. Plasmid omega-3 fatty acid desaturase cDNA from *Ricinus communis*. *Plant Physiology*. 105(1): 443-444.
- [10] Kinney, J.A., 1994. Genetic modification of the storage lipids of plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 144-151.
- [11] Horrobin, D. F., 1995. Medical roles of metabolites of precursor EFA. *Information*, 6: 428-435.
- [12] Qi B., Fraser T., Mugford S., Dobson G., Sayanova O., Butler J., Napier J., Stobart K., Lazarus C. 2004. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnology*. 22: 739-45.
- [13] Venegas-Calero M., Sayanova O., Napier JA. 2010. An alternative to fish oils, Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 49: 108-119.
- [14] Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, Leonard AE, Thurmond JM, Chaung LT, Huang YS, and Mukerji P. 2000. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proceedings*

Isolation, cloning and bioinformatics analyses of the Delta 15 desaturase gene from the yeast *Pichia pastoris* GS115 in order to increasing of alpha-linolenic acid content of oilseeds

Hasani, M. ¹, Gharanjik, Sh. ^{2*}, Samadloiy, H. ³

1. MSc Student of Agricultural Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Food Science, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

(Received: 2017/02/06 Accepted: 2017/06/03)

Alpha-linolenic acid is an omega-3 fatty that is essential for maintaining a healthy body but can't produce in the human body. The oils of some oilseeds, as well as some plants are the main sources of alpha-linolenic acid but the content of alpha-linolenic acid, in important oilseed plants like soybean and rapeseed are relatively low. The aim of this study was the cloning of Delta 15 Desaturase gene to increase alpha-linolenic acid production in the oilseed plants. For this purpose, after extracting total RNA and cDNA synthesis from *Pichia pastoris* GS115, the gene was amplified using gene-specific primers containing Kozak sequence and then cloned in PTZ57R / T vector and transformed into *E.coli* strain DH5 α . After sequencing, the recombinant fragment was isolated from TA vector and was cloned into pBluescript KS(+) vector containing Napin promoter. The designed gene construct was cloned in pBI121 binary vector and then was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Bioinformatics characterization of the target gene was investigated by servers TopPred, TMHMM, ProtParam and SOPMA. The results of the colony PCR and amplification of the 1246 bp fragment, confirmed the accuracy of the gene cloning. The amplification of a 1210 bp fragment using an internal primer of napin promoter and Delta 15 desaturase, as well as the production of the 2145 bp fragment in enzymatic digestion confirmed the correct incorporation of the gene along with Napin promoter. Nucleotide sequencing results showed that the cloned CDS include 1246 nucleotides and translated to a protein with 415 amino acids. The amino acid sequence analysis confirmed the presence of two domains and five Transmembrane helices. Also, prediction of the protein's properties, signal peptides, and the second structure, proved that this enzyme is stable transmembrane enzymes.

Key words: Gene cloning, Alpha-linolenic acid, Delta 15 Desaturase, *Pichia pastoris*.

* Corresponding Author E-Mail Address; gharanjik@shahroodut.ac.ir