جداسازی، کلونینگ و بررسی بیوانفورماتیکی ژن دلتا ۱۵ دسچوراز از مخمر *Pichia pastoris* GS115 جهت افزایش تولید اسید چرب آلفالینولنیک 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 آلفالینولنیک 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 آلفالینولنیک به شمار می‌آیند ولی محتوای اسیدآلفالینولنیک دانه‌های روغنی عمده، نظیر سویا و کلزا نسبتا کم می‌باشد. هدف از این پژوهش همسانه‌سازی ژن دلتا۱۵دسچوراز به منظور افزایش تولید اسیدآلفالینولنیک 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 توالی یابی در وکتور PTZ57R/T همسانه سازی شد. قطعه نوترکیب پس از تایید توالی از وکتور TA جدا و به وکتور pBluescript KS(+) حاوی پروموتر 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 TMHMM, TopPred، ProtParam و SOPMA بررسی گردید. نتایج واکنش PCR و تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲٤٦ bp صحت همسانه‌سازی این ژن را تایید کرد. همچنین تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲۱۰ bp توسط پرایمرهای داخلی پروموتر ناپین و ژن دلتا ۱۵دسچوراز، و نیز ایجاد قطعه ۲۱٤۵ bp در هضم آنزیمی، تاییدی بر الحاق صحیح این ژن در امتداد پروموتر ناپین بود. نتایج توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان داد که توالی کد کننده این آنزیم مشتمل بر ۱۲٤٦ نوکلئوتید و کد کننده ٤۱۵ 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، اسیدآلفالینولنیک، دلتا۱۵ 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[1] 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 بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان‌ها دارند [۲]. در حال حاضر، روغن ماهی منبع اصلی و تجاری اسیدهای چرب غیر اشباع در رژیم غذایی انسان‌ها محسوب می‌شود، اما بدلیل آلودگی دریاها با فلزات سنگین، جیوه و دی‌اکسین‌ها، نیاز به یافتن منابع جدید حاوی این اسیدهای چرب ضروری به نظر می‌رسد [۳]. اسیدآلفالینولنیک[2]($\Delta^{9,12,15}$ 18:3 ALA)، یک اسید چرب ضروری از خانواده امگا۳ است که بدن قادر به سنتز آن نیست و باید از طریق رژیم غذایی وارد بدن شود. اسید آلفالینولنیک به عنوان سوبسترا توسط یک سری از آنزیم‌های دسچوراز به اسیدهای چرب امگا۳ با زنجیره بلندتر شامل اسید ایکوزاپنتانوئیک ($\Delta^{5,8,11,14,17}$ 20:5 EPA)[3] و اسید دوکوزاهگزانوئیک ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ 22:6 DHA)[4] تبدیل می‌شوند [٤]. روغن برخی از دانه‌های روغنی و نیز برخی گیاهان از اصلی‌ترین منابع حاوی اسید آلفالینولنیک به شمار می‌آیند ولی محتوای اسید آلفالینولنیک دانه‌های روغنی عمده، نظیر سویا و کلزا نسبتا کم می‌باشد.آنزیمی که اسیدآلفالینولنیک را تولید می‌کند دلتا۱۵دسچوراز[5] نام دارد. این آنزیم با اضافه کردن یک باند دوگانه به اسید لینولئیک، اسید آلفالینولنیک را تولید می‌کند. مخمر *پیکیا پاستوریس*[6] گونه مخمری متیلوتروف است که بیشترین مقدار اسیدهای چرب آن از اسیداولئیک و اسیدآلفالینولنیک تشکیل شده است. آنزیم دلتا۱۵دسچوراز 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 امگا٦ به عنوان سوبسترای اولیه برای تولید اسیدآلفالینولنیک و دیگر اسیدهای چرب امگا ۳ می‌باشد [۵]. هدف از این پژوهش جداسازی و همسانه‌سازی ژن دلتا۱۵دسچوراز 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 اسیدآلفالینولنیک در گیاهان دانه روغنی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

به منظور استخراج RNA و تکثیر ژن مورد نظر، از مخمر *پیکیا پاستوریس* سویه GS115 (انیستیتو پاستور، تهران، ایران) استفاده گردید. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل *اشریشاکلی*[7] سویه DH5α و *آگروباکتریوم تومیفاسینس*[8] سویه LBA4404 بودند(دانشگاه رازی، کرمانشاه). باکتری ایکولای به‌عنوان میزبان جهت نگهداری و تکثیر سازه‌های ساخته شده و آگروباکتریوم جهت انتقال بعدی ژن موردنظر به گیاه استفاده گردید. ناقل‌های مورد استفاده شامل PTZ57R/T (شرکت اینویتروژن[9]، آمریکا) جهت همسانه‌سازی اولیه و ارسال جهت توالی‌یابی، pBlueScript KS(+) حاوی پروموتر *ناپین* و وکتور دوگانه pBI121 به عنوان ناقل بیانی استفاده شد.

۲-۱- استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه مخمری در محیط YPD[10] (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پپتون و ۲٪ دکستروز) (MERCK، آلمان) کشت و در شیکر انکوباتور به مدت ١٦ ساعت با سرعت ۱۵۰rpm 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. Δ15Desaturase (Δ15d)
6. *Pichia Pastoris*
7. *Escherichia coli*
8. *Agrobacterium tumefaciens*
9. Invitrogen
10. Yeast extract Peptone Dextrose

جهت رشد قرار داده شد. RNA کل با استفاده از روش فنل گرم استخراج شد[٦]. 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 $Oligo\ (dt)_{18}$ و آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV Revers transcriptas (شرکت سیناژن،تهران، ایران) استفاده شد. جهت شناسایی و اطمینان از حضور ژن دلتا۱۵دسچوراز در سطح DNA ژنومی، استخراج DNA به روش CTAB[1] (ستیل‌تری‌متیل آمونیوم بروماید) انجام و به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای داخلی استفاده گردید.

۲-۲- طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(RT-PCR)

طراحی آغازگرهای ژن دلتا۱۵دسچوراز، 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[2] سایت برشی *XbaI* به همراه توالی افزایش دهنده بیان، ژن کوزاک، و در آغازگر برگشت[3] سایت برشی *SacI* اضافه گردید. سنتز آغازگرها به سفارش شرکت تکاپوزیست، توسط شرکت بایونیر[4] (کره جنوبی) صورت گرفت (جدول ۱).

cDNA سنتز شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن، توسط آنزیم تک پلی‌مراز[5] (شرکت سیناژن) مورد استفاده قرار گرفت. شرایط بهینه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل (واسرشت‌سازی[6] یک دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال[7] یک دقیقه در دمای٦٥ درجه سانتی‌گراد، بسط[8] یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت بسط نهایی[9] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه به‌دست آمد. صحت قطعه تکثیری حاصل بیان ژن دلتا۱۵دسچوراز 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[10] و انجام توالی‌یابی

پس از خالص سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن دلتا۱۵دسچوراز از ژل آگارز، در پلاسمید pTZ57R/T (شرکت اینویتروژن، آمریکا) به کمک آنزیم T4 لیگاز، مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده به وکتور متصل گردید. برای تهیه باکتری‌های مستعد ایکولای سویه DH5α و انتقال پلاسمید نوترکیب به آن به‌ترتیب از روش کلریدکلسیم سرد و شوک حرارتی استفاده گردید [۷]. باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط LB جامد حاوی ۵۰μ g/ml آمپی‌سیلین، کشت داده شدند. جهت بررسی صحت همسانه‌سازی، چند کلونی بصورت تصادفی انتخاب و پس از تائید 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 همسانه-سازی و تائید نهایی توالی ژن مورد نظر، توالی‌یابی با استفاده از آغازگر T7 به سفارش شرکت فزابیوتک[11] انجام گرفت.

1. Cetyl tri methyl ammonium bromide
2. Forward primer
3 . Reverse primer
4. Bioneer
5. Taq DNA Polymerase
6. Denaturation
7. link
8. Extension
9.Final extension
10. TA cloning vector
11. Faza Biotech

Table 1 The primers used in this study

Primer	Sequence	Product (bp)	TM
D15-F	5′-ggcTCTAGA**gccaccatg**tcaaaagtcactgtttcggg-3′	1246 bp	65°C
D15-R	5′- gccGAGCTCttaggtatccttaggtttaacacc-3′		
Pro. *N*–F	5′-AAACCGTTCGGCTCCTATCC-3′	1210 bp	57°C
Δ15d- R	5′- ACCAGTAGCATTCGTGGCAA-3′		

۲-٤- ساب کلونینگ ژن در وکتور (+) pBluescript II KS حاوی پروموتر *ناپین*

پس از اطمینان از صحت قطعه همسانه‌سازی شده، جهت همسانه سازی در وکتور(+) pBluescript II KS حاوی پروموتر *ناپین*[1]، هر دو وکتور PTZ57R/T و (+) pBluescript II KS، با استفاده از دو آنزیم *SacI* و *XbaI* مورد هضم دو گانه قرار گرفتند و پس از خالص سازی از روی ژل، اتصال نواحی انتهای چسبنده ایجاد شده به کمک آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. مراحل همسانه‌سازی و انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعد باکتری *E.coli* طبق مراحل قبل انجام گرفت و باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک ۵۰ µ g/ml آمپی‌سیلین به صورت شبانه کشت گردیدند. کلونی‌های رشد یافته به عنوان کلون‌های واجد و احتمالا 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 ازصحت قرارگیری پروموتر *ناپین* در ابتدای ژن، RT-PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی پروموتر *ناپین* (آغازگررفت) و ژن دلتا۱۵دسچوراز (آغازگر برگشت) طراحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت (جدول۱).

۲-۵- همسانه‌سازی در ناقل دوگانه pBI121

جهت همسانه‌سازی سازه در ناقل دوگانه pBI121، پلاسمید نوترکیب توسط جایگاه‌های برشی ابتدای پروموتر و انتهای ژن (*HindIII* و *SacI*) برش داده شد. هضم دوگانه ناقل pBI121 توسط این آنزیم‌ها موجب حذف ژن بتا گلوکورونیداز (GUS) گردید. جهت افزایش احتمال اتصال صحیح قطعات مورد نظر، قطعه حاوی پروموتر *ناپین*- ژن دلتا۱۵دسچوراز و پلاسمید برش یافته pBI121، از روی ژل خالص‌سازی شده و سپس انتهاهای چسبنده ایجاد شده توسط آنزیم T4 لیگاز به هم متصل شدند (شکل۱). سلول‌های مستعد آگروباکتریوم تهیه و انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به روش ذوب و انجماد صورت گرفت. باکتری ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی مقادیر مناسبی از ۵۰µg/ml کانامایسین و ۵۰µg/ml ریفامپسین به صورت شبانه کشت داده شدند. کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، با استفاده از کلونیPCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

۲-٦- بررسی های بیوانفورماتیکی

توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ناحیه کد کننده ژن دلتا۱۵دسچوراز، در سایت (http://web.expasy.org/translate/ء) به پروتئین ترجمه گردید. خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده توسط برنامه Protparam (http://expasy.chl/tools/protparam.html/) تعیین شد. آنالیز و وجود دومین‌های هیدروپاتی توسط سرورTMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) تائید شد. برای پیش‌بینی ساختار دوم از سایت SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) استفاده شد. دومین پروتئینی *Δ15de* از بانک اطلاعاتی Pfam با آدرس اینترنتی (http://pfam.xfam.org/search/sequence) مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل هیدروپاتی توالی توسط ابزارTopPred (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html) رسم گردید. جهت تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن دلتا۱۵دسچوراز

1. Napin gene promotor

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

به دلیل شباهت بالای دلتا۱۵دسچوراز و دلتا ۱۲ دسچوراز به هم، از توالی پروتئینی چند ژن دلتا ۱۲ دسچوراز نیز، در رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده گردید.

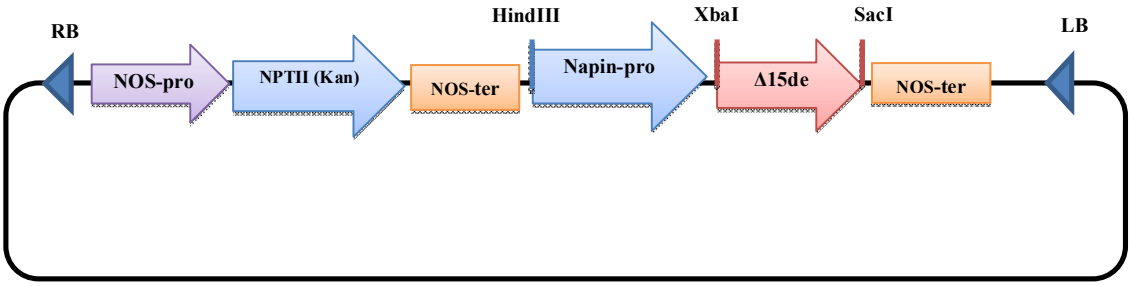

Fig 1 schematic feature of recombinant vector pBI121: Nap + Δ15de, containing Napin promoter and Delta 15 Desaturase gene construct.

۳- نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای داخلی، و تکثیر قطعه ای به طول ۳۲۲ bp ، وجود ژن دلتا۱۵دسچوراز را بر روی DNA ژنومی مخمر *P.pastoris* اثبات کرد (شکل۲).

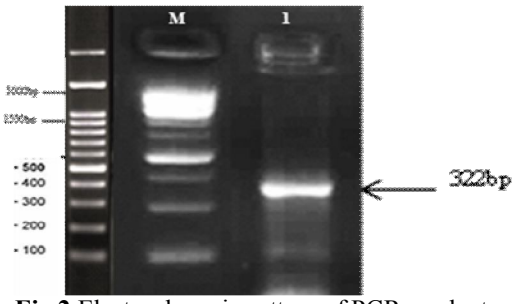

Fig 2 Electrophoresis pattern of PCR product using Delta 15 Desaturase internal primers. M: 100 bp Ladder, lanes 1: amplified expected 322 bp fragment.

انجام واکنش RT-PCR برای cDNA سنتز شده تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۲٤٦ bp را به همراه داشت که معادل طول کامل منطقه کد کننده ژن دلتا۱۵دسچوراز می‌باشد (شکل۳). از آغازگرهای ژن اکتین[1] از ژنوم مخمر پیکیا *پاستوریس* به عنوان کنترل مثبت در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده گردید، که طول قطعه تکثیری این آغازگرها 148bp 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.

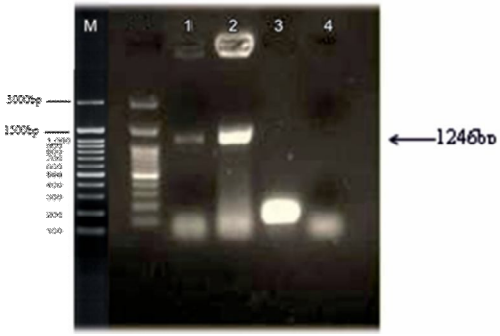

Fig 3 Electrophoresis pattern of RT-PCR products on a 1% agarose gel. M: 100 bp Ladder, lanes 1 and 2: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene specific primers. Lane 3: PCR positive control using yeast actin gene (148 bp), lane 4: negative control (without template).

واکنش کلونی-PCR بر روی کلونی های انتخابی با پرایمر های اختصاصی ژن دلتا۱۵دسچوراز به منظور تایید وجود ژن انجام گرفت که طول کامل ژن در پلاسمید نوترکیب بدست آمد (شکل٤).

پس از استخراج پلاسمیدهای نوترکیب، نتایج هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی و ایجاد قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۲٤٦bp صحت همسانه‌سازی در پلاسمید مورد نظر را تایید نمود. نتایج حاصل از توالی‌یابی که جهت تایید نهایی و بدست آوردن توالی ژن دلتا۱۵دسچوراز با استفاده از آغازگر T7 انجام گرفت، همسانه‌سازی ژن مورد نظر به طول ۱۲٤٦ bp را تایید نمود.

1. Actin

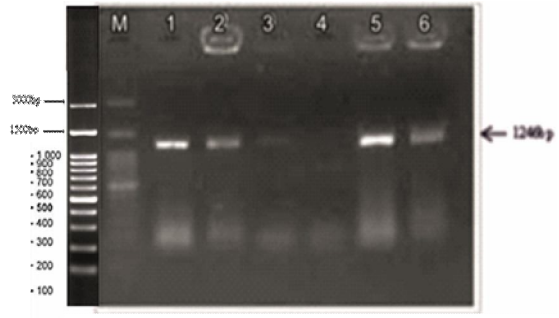

Fig 4 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on recombinant pTZ57R/T vector. M: 100 bp Ladder, lanes 1,2,3,5,6 : amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane4: negative control (non recombinant plasmid).

پس از اطمینان از صحت ژن تکثیری، این قطعه در ناحیه MCS وکتور pBluescript KS(+) از طریق برش در جایگاه‌های *XbaI* و *SacI* در پایین دست پروموتور ناپین همسانه‌سازی گردید. پس از ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب حاصل در باکتری E.coli ، کلونی-PCR بر روی کلونی‌ها با آغازگرهای اختصاصی، صحت همسانه‌سازی و تکثیر طول کامل ژن به طول ۱۲٤٦bp توالی ژن مورد نظر را تائید کرد و تکثیر قطعه ۱۲۱۰bp با استفاده از آغازگرهای داخلی پروموتر و ژن دلتا۱۵دسچوراز، جهت قرارگیری این ژن در امتداد ناپین را تایید کرد (شکل۵).

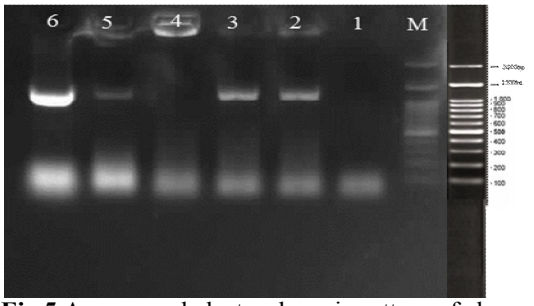

Fig 5 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on recombinant pBluescript KS(+) vector. M: 100 bp Ladder, lanes 2,3,5: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane 6: amplified 1210bp using internal primer of napin promoter and Delta 15 desaturase primer, Lane 1, 4: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

هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های برشی ابتدای پروموتر و انتهای ژن (*SacI* , *HindIII*) قطعاتی به طول تقریبی ۲۱٤۵ bp مربوط به پروموتر و ژن و ۲۸۹٦ bp پلاسمید حاصل گردید (شکل٦).

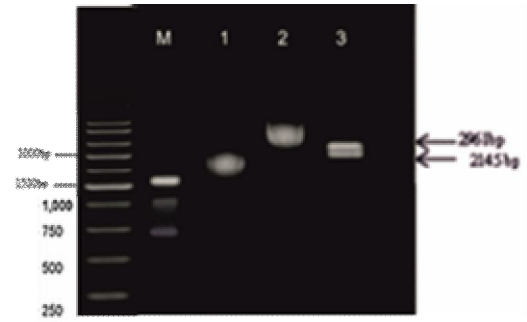

Fig 6 Agarose gel electrophoresis pattern of double digestion of recombinant pBluescript KS(+) vector using *Sac*I and *HindIII* restriction enzymes. M: 100 bp Ladder, lane 1: non-recombinant plasmid. Lane 2: recombinant plasmid harboring napin promoter and Delta 15 desaturase gene, Lane 3: double digested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

پس از همسانه‌سازی سازه حاوی پروموتر ناپین و ژن دلتا۱۵دسچوراز در ناقل دوگانه pBI121 و انتقال آن به اگروباکتریوم LBA4404، صحت همسانه‌سازی با استفاده آغازگرهای اختصاصی ژن دلتا۱۵دسچوراز و آغازگرهای داخلی ناپین- دلتا۱۵دسچوراز انجام گرفت که نتیجه آن به ترتیب تکثیر قطعاتی به طول تقریبی ۱۲٤٦ bp توالی ژن و ۱۲۱۰ bp نواحی داخلی پروموتر و ژن بود (شکل ۷).

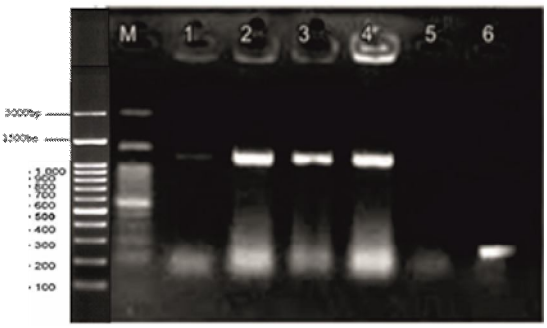

Fig 7 Agarose gel electrophoresis pattern of clony-PCR on Agribacterium containing recombinant pBI121 vector. M: 100 bp Ladder, lanes 1,2,3: amplified 1246 bp fragments using Delta 15 Desaturase gene primers. Lane 4: amplified 1210bp using internal primer of napin promoter and Delta 15 desaturase primer, 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 ۱۲٤٦ نوکلئوتیدی بوده و پروتئینی به طول ٤۱۵ اسیدآمینه را کد می‌کند. این

پروتئین بیشترین شباهت را به میزان ۹۹٪ با پروتئین حاصل از بیان ژن دلتا ۱۵دسچوراز *P. pastoris* سویه GS115 با شماره دسترسی EF116884.1 داشت که نشان دهنده حفاظت بالای ژن در این مخمر می‌باشد(شکل۸).

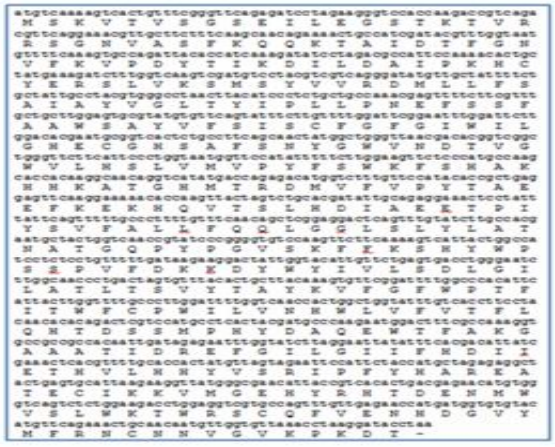

Fig 8 The nucleotide and amino acid sequences of the Delta 15 desaturase gene. (http://web.expasy.org/translate/)

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 دلتا۱۵دسچوراز موجود در مخمر *P.pastoris* دارای شاخص ناپایداری ۳۵/۷۵ می‌باشد که جزء پروتئین‌های پایدار محسوب می‌شود. شاخص آلیفاتیک 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 اسیدآمینه (آرژنین و لیزین) دارای بار مثبت و ۳۶ اسیدآمینه (آسپارتات 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٪ از سوپرکویل می‌باشد. دومین پروتئینی دلتا۱۵دسچوراز از بانک اطلاعاتی Pfam مورد بررسی قرار گرفت. این سایت دومین‌های پروتئینی توالی مورد نظر را نشان می‌دهد. ژن دلتا۱۵دسچوراز دارای دو دومین شامل یک دومین FA desaturase و یک دومین با کارکرد ناشناخته[1] (DUF3474) بود (شکل۹).

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 دسچورازها دارای هلیکس‌های ترانس‌ممبرانی می‌باشند. نتایج حاصل از سایت TMHMM نشان داد که پروتئین دلتا۱۵دسچوراز نیز جزو پروتئین‌های غشائی طبقه‌بندی می‌شود که دارای ۵ هلیکس تراغشایی[2] می‌باشد (شکل۱۰).

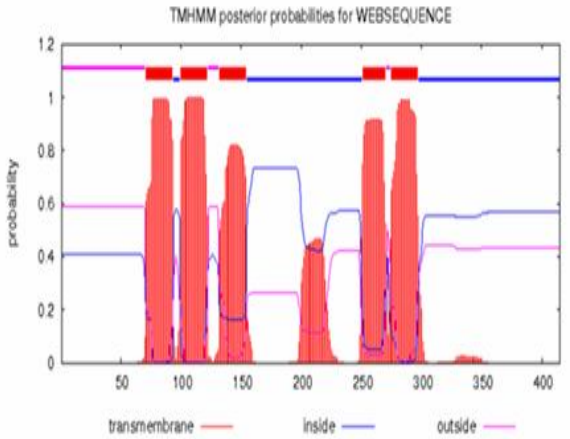

Fig 10 Prediction of trans-membrane regions of the Delta 15 desaturase enzyme using TMHMM server.

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 ۹۵-۷۵ ، ۱۲۲-۱۰۲ ، ۱۵۷-۱۳۷ ، ۲۱۹-۱۹۹ ، ۲۹۲-۲۷۲ ، میزان هیدروفوبی بالامی‌باشد. نواحی هیدروفوب، مارپیچ‌های تراغشائی می‌باشند که در اکثر دسچورازهای غشائی موجود بوده و به‌عنوان

1. Domains of unknown function
2. Transmembrane helix

دومین‌های حفاظت‌شده بین تمام هومولوگ‌های این ژن بیان گردیده‌اند (شکل۱۱).

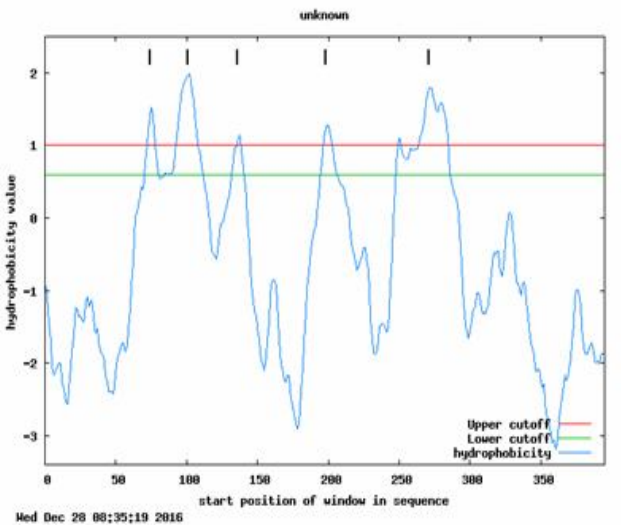

Fig 11 Hydrophobicity graph of the Delta 15 desaturase enzyme using TopPred software.

جهت تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن دلتا۱۵دسچوراز 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 ۱٤ گونه که دارای میزان تشابه بالای ٦۰٪ با این ژن بودند را انتخاب کردیم. بر طبق نتایج بدست آمده در درخت فیلوژنتیکی حاضر ٤ کلاستر اصلی مشاهده می‌شود که در کلاستر اول ژن دلتا۱۵دسچوراز در گونه *Pichia pastoris* با ژن دسچوراز در گونه *Komagataella pastoris* در یک کلاستر قرارگرفته است که نشانگر غرابت بسیار نزدیک با ژن دلتا۱۵دسچوراز 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.

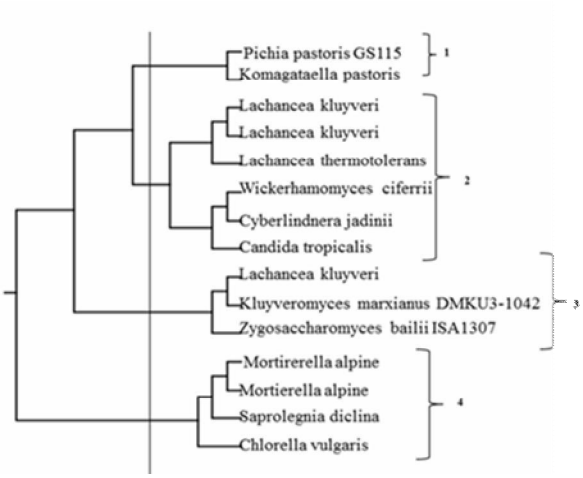

Fig 12 Phylogenetic trees using ClustalW software, to determine the proximity of the delta 15 desaturase protein in yeast *P. pastoris* with other species. The accession No. of proteins is: *Pichia pastoris GS115*:(VIRT26852) , *Komagataella pastoris* :(ABL63813) , *Lachancea kluyveri*: (ADE06664), *Lachancea kluyveri* : (BAD11952) , *Lachancea thermotolerans*: (XP-002553950), *Wickerhamomyces ciferrii*: (XP_011275445), *Cyberlindnera jadinii*: (BAJ78984),*Candida tropicalis*: (ADN42964), *Lachancea kluyveri*:(BAD08375), *Kluyveromycesmarxianus:*(BAO38850), *Zygosaccharomyces*:(CDH15170) , *Mortirerella alpine*:(BAA81754) , *Mortierella lpine*: (BAD91495), *Saprolegnia diclina*: (AAR20443), *Chlorella vulgaris*: (BAB78716)

۵- بحث

کمبود اسیدهای چرب غیر اشباع در رژیم غذایی، یکی از شایع‌ترین مشکلات تغذیه‌ای در جهان به شمار می رود. به دلیل کاهش استفاده از منابع دریایی در غذای مصرفی انسان و نیز کمبود اسیدهای چرب امگا۳ در روغن‌های گیاهی، توسعه یک منبع غذایی غنی، حاوی اسیدهای چرب امگا۳ 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 امگا۳ ، در گیاهان دانه روغنی، ژن دلتا۱۵دسچوراز از مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115 جداسازی و پس از تعیین توالی، به همراه پروموتور ناپین در ناقل بیانی pBI121 همسانه‌سازی شد. ژن دلتا۱۵دسچوراز با اضافه کردن یک باند دوگانه به لینولئیک اسید، اسیدآلفالینولنیک را تولید می‌کند. این عمل غیراشباع سازی[1] اسیدهای چرب طبق فرایندی

1. Desaturation

صورت می‌گیرد که در طی آن، باندهای دوگانه (C=C) در نقاط ویژه‌ای به زنجیره‌های اسیل‌آلیفاتیک اضافه می‌گردد [۱۰و ۱۱]. علاوه بر این آنزیم‌ها، آنزیم‌های دیگری به نام الانگاز[1] وجود دارند که باعث طویل شدن، طول زنجیرهای کربنی اسید چرب می‌شوند. فرآیندهای غیراشباع کردن و طویل‌سازی‌های متعدد و پی‌درپی که روی سوبستراهای 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 اسیدآلفالینولنیک در حال انجام می باشد [۱۶-۱۲]. در تحقیقی بیان ژن دلتا۱۵دسچوراز در گیاه سویا به تنهایی باعث افزایش سطوح اسیدآلفالینولنیک در دانه‌ها از حدود ۱۰٪ به بیشتر از ۵۳٪ و بیان همزمان این ژن به همراه ژن دلتا٦ دسچوراز، منجر به افزایش سطح اسید چرب غیراشباع استئاریدونیک اسید(SDA) به بیشتر از ۵/۲۹٪ شده است [۱۷]. در تحقیق دیگری ژن دلتا۱۵دسچوراز را از سویا به برنج منتقل کردند که در گیاهان تراریخته حاصل، مقدار اسیدآلفالینولنیک از ۲/۲٪ به ٤۰٪ 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 دانه های گیاه محدود کرده و علاوه بر ممانعت از تاثیر 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، bp ۱۲٤٦ بدست آمد که پروتئینی با ٤۱۵ اسید آمینه را رمز می‌کند. در بررسی درصد همسانی و مشابهت قطعه همسانه‌سازی شده با سایر توالی‌های GenBank در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی، بیشترین همسانی توالی نوکلئوتیدی به میزان ۹۹٪ با ژن دلتا۱۵دسچوراز *Pichia pastoris*، با شماره دسترسی EF116884 و در سطح پروتئینی نیز به میزان۹۷٪ با پروتئینی با شماره دسترسی ABL63813 بدست آمد. نتایج هم ردیفی[2] 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 تائید حضور دومین‌های کارکردی، می‌توان پیش‌بینی کرد که توالی همسانه‌سازی شده از این مخمر دارای فعالیت آنزیمی موردنظر باشد. تائید 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 اسیدآلفالینولنیک 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.

٦- 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.

1. Elangase

2. Alignment

[5] Zhang X., Li M., Wei D., and Xing L. 2008. Identification and characterization of a novel yeast ω3- 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. 3era. 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-Caleron 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 J M, Chaung L T, 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 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 Δ6desaturase and the Arabidopsis Δ15desaturase 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

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:2017/0603)

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 DH5α. 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 Desaturas, *Pichia pastoris*.

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