

جداسازی و همسانه‌سازی ژن ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم A ردوکتاز از گیاه رازیانه (*Foeniculum Vulgar*)

Isolation and cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductase gene a from fennel (*F. Vulgar*)

کزوان ساعد موچشی^۱، علی ایزدی دربندی^{۱*}، حسین رامشینی^۱

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته، دانشیاران، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Saed Mocheshi K¹, Izadi-Darbandi A^{*1}, Ramshini H¹

1- Graduate Student, Associate professors, Department of Agronomy and Plant
Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aizady@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

در گیاهان ترکیبات ایزوپرنوئیدی توسط دو مسیر مستقل، شامل مسیر موالونات (MVA) و مسیر ۲-C-متیل-D-اریترول ۴-فسفات (MEP) سنتز می‌شوند. این فرآورده‌ها برای رشد و نمو طبیعی گیاه و واکنش آن‌ها در برابر تنش‌های زیست‌محیطی مورد نیاز است. اولین مرحله در مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدهای گیاهی، تبدیل ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم^A (HMG-CoA) به موالونات است؛ که توسط آنزیم ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم^A ردوکتاز (*HMGR*) انجام می‌شود. در این تحقیق پس از تعیین نواحی حفاظتی ژن‌های هم‌خانواده آن، آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این ژن طراحی شد. ژن *HMGR* از اکوتیپ ساری گیاه رازیانه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌دست آمد و فرآورده حاصل از طریق همسانه‌سازی *TA* تکثیر شد. تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتید (*BLASTn*) توالی تکثیرشده، نشان داد که این فرآورده مشابهت زیادی با سایر *HMGR* های گیاهی، به‌خصوص ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم^A ردوکتاز گیاه آب‌قاشقی دارد. توالی تکثیرشده ژن *HMGR* در گیاه رازیانه دارای طولی برابر با ۱۶۶۱ جفت‌باز است و ناحیه رمزکننده‌ای به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز (دارای دو دمین‌گذرنده و یک دمین‌کاتالیزوری) را شامل می‌شود. ناحیه *ORF* این توالی، رمزکننده قطعه پروتئینی به طول ۵۵۳ اسیدآمین به جرم مولکولی حدود ۵۹/۸۱۶ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/۴۰ بود. مدل‌سازی مولکولی توالی با استفاده از سرور *Swiss Model* نشان داد که توالی تکثیر شده، یک نوع جدید *HMGR* است که دارای یک ساختار فضایی شبیه به دیگر *HMGR* های گیاهی است و دارای تمامی دمین‌های ساختاری و کارکردی می‌باشد. با دسترسی به توالی این ژن در رازیانه، امکان بررسی الگوی بیان آن در اندام‌های مختلف، تعیین پلی‌مورفیسم آن در جمعیت‌های این گیاه و تولید سازه بیانی جهت انتقال ژن وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

همسانه‌سازی
ژن ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم
A ردوکتاز
ایزوپرنوئید
رازیانه

مقدمه

دو گروه اساسی از متابولیت‌ها در گیاهان شامل متابولیت‌های اولیه^۱ و متابولیت‌های ثانویه^۲ می‌باشد (Hartmann 1996). متابولیت‌های اولیه در واکنش‌ها و فرآیندهای اصلی شرکت می‌کنند اما متابولیت‌های ثانویه در برهمکنش بین گیاهان و محیط‌زیست دخالت دارند (Croteau et al. 2000). ایزوپرنوئیدها، ترکیباتی هستند که در تنفس و فتوسنتز، تبادل سیگنال بین گیاهان و محیط زیست، دفاع در برابر پاتوژن، تقسیم سلولی و تنظیم رشد، کارکرد غشاء و بیوسنتز غشاء نقش دارند (Caelles et al. 1989; Bach 1995). ترکیبات ایزوپرنوئیدی (حدود ۳۰,۰۰۰ ترکیب شناخته‌شده) و مشتقات پنج‌کربنی آن‌ها (ایزوپنتیل فسفات^۳ و ایزومر آن دی‌متیل‌آلیل فسفات^۴) به‌منظور سازگاری با محیط و زنده ماندن گیاهان در شرایط محیطی ضروری است (Wang et al. 2010; Bouvier et al. 2005; Nicotra et al. 2000). مسير موالونات (MVA) اولین بار در سال ۱۹۵۰ کشف شد که در باکتری‌ها، گیاهان، حیوانات و قارچ‌ها به‌عنوان پیش‌سازی برای واحد ایزوپرن پنج‌کربنی و همچنین تولید ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها مورد نیاز است (Newman and Chappell 1999). مسير متیل اریترول فسفات (MEP) تولیدکننده ماده ۲-C-متیل-D-اریتریتول-۴-فسفات در پلاستیدهاست که به‌عنوان یک منبع تولید مواد اولیه مونوترپن، دی‌ترپن و تتراترپن‌ها هستند (Bestoso et al. 2006; Roberts 2007). مسير MVA مختص یوکاریوت‌ها و مسير MEP مربوط به پروکاریوت‌ها است اما با این وجود در گیاهان و برخی از باکتری‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس اورئوس^۵ و لاکتوباسیلوس پلانتاروم^۶) هر دو مسير فعال هستند. ۳-هیدروکسی-۳-متیل‌گلوٲاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR) به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسير بیوسنتز موالونات مطرح است که از پیش‌ماده HMG-CoA های موجود در میتوکندری‌ها، پلاستیدها و سیتوپلاسم‌ها (در آرکوباکتری^۷، باکتری‌ها، قارچ‌ها

و حیوان‌ها) تولید می‌شود. HMGR ها در حیوان‌ها توسط یک ژن اما در گیاهان توسط یک خانواده چندژنی رمزگذاری می‌شوند که در گیاهان ایزوآنزیم‌های مختلف در طول رشد و یا در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی دارای بیان متفاوت هستند (Croteau et al. 2000). مناطق کاتالیزوری HMGR از سه حوزه تشکیل شده است: (۱) یک دامنه N-ترمینال شامل دو تا هفت مارپیچ آلفای عبورکننده از غشاء (در پستانداران، حشرات و قارچ‌ها هفت عدد و در گیاهان دو عدد) است، (۲) دامنه بزرگ و مرکزی L که شامل یک موتیف^۸ اتصال (EMPVGYV QIP) و یک موتیف اتصال به NADPH (TTEGCLVA) و HMG-CoA (GTVGGGT) است و (۳) دامنه کوچک مارپیچ S شامل یک منطقه کاتالیزوری C-ترمینال (دارای توالی حفظ شده در بین گونه‌ها) با حدود ۴۰۰ اسیدآمینو است که یک جایگاه اتصال به NADP(H) شامل یک موتیف با توالی DAMGMNM در آن جای گرفته است (Wright et al. 2002; Ruiz-Albert et al. 1988). در گیاهان، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش بهره‌وری ایزوپرنوئیدها انجام شده‌است. با توجه به‌اینکه مطالعات گذشته ارتباط متقابل بین مسير MVA و MEP را نشان داده است از این رو یک راهکار مشترک برای مهندسی سنتز ایزوپرنوئیدها، تمرکز بر افزایش جریان ماده و انرژی با استفاده از جداسازی ژن HMGR و مطالعه پیش بیان آن به‌منظور افزایش پیش‌ساز ایزوپنتیل‌پیروفسفات و دی‌متیل‌آلیل‌پیروفسفات است (Kanehisa et al. 2000; Hey et al. 2006; Munoz-Bertomeu et al. 2007). جداسازی و همسانه‌سازی توالی ژن HMGR از گیاه دارویی رازیانه، یک راهبرد ضروری در مهندسی فرایند تولید متابولیت‌های ثانویه مهم حاصل از این گیاه مانند آنتول، فنچون و لیمون هستند.

مواد و روش‌ها

با توجه به اینکه بیش‌ترین تولید اسانس رازیانه و متابولیت‌های ثانویه در مرحله زایشی است (Bahmani et al. 2015) از این رو به‌منظور استحصال بیش‌ترین مقدار mRNA از بافت گیاه، تهیه

^۸ Motif^۱ First metabolites^۲ Secondary metabolites^۳ Isopentenyl pyrophosphate^۴ Dimethylallyl phosphate^۵ Staphylococcus aureus^۶ Lactobacillus plantarum^۷ Arcobacter

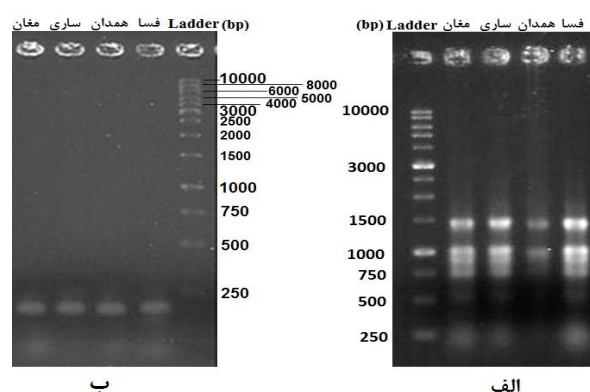
همچنین کیفیت mRNA توسط رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید^۵ و الکتروفورز^۶ در ژل آگارز^۷ ۱ درصد در بافر تریس بورات EDTA (TBE)^۸ با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت (قسمت الف شکل ۱).

با توجه به اینکه هیچ گزارشی از توالی ژن *HMGR* رازیانه در بانک‌های اطلاعاتی وجود نداشت. بنابراین جهت تعیین نواحی حفاظت‌شده، هم‌ردیفی^۹ توالی‌های mRNA ژن *HMGR* برگ قاشقی، جینسنگ آمریکایی^{۱۰}، سنجی جینسنگ (جینسنگ کاذب)^{۱۱} و جینسنگ چینی^{۱۲} موجود در بانک اطلاعاتی NCBI^{۱۳} (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov)، توسط برنامه آنالین ClustalW (Clustal Omega Multiple Sequence Alignment) به آدرس اینترنتی <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo> انجام شد. در نهایت نقاط با بیش‌ترین میزان هم‌ردیفی به برنامه Primer3 به‌منظور طراحی آغازگر داده شد و سپس آغازگر برگشت با توالی 5'CCAAGTAGGTTTCAGGCATGC3' (TM = ۵۸/۹ °C) و آغازگر رفت با توالی 5'ACTAACTGTCCCTCCCTCCT3' (TM = ۵۸/۹ °C) طراحی شدند.

ساخت رشته اول cDNA از RNA استخراجی، با استفاده از آغازگرهای رفت و الیگو dt₁₈A(T/C/G) و از طریق واکنش رونویسی معکوس^{۱۴} طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (ساخت شرکت سیناکلون ایران) انجام شد. جهت تایید تولید رشته اول cDNA از تکثیر ژن اکتین توسط آغازگرهای رفت (5'GGTCGCACAACCTGGTATTGTATTG3') و برگشت (5'CTCAGCAGAGGTGGTGAACA3') استفاده شد (قسمت ب شکل ۱). تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگرهای طراحی‌شده (بر اساس نتایج هم‌ردیفی برای تکثیر ژن *HMGR* در سطح رونوشت) بر روی cDNA اکوتیپ ساری انجام شد (قسمت الف

نمونه از بافت‌های گل‌آذین و برگ‌های گیاهان رازیانه موجود در مزرعه آزمایشی و در تیرماه (هم‌زمان با دوره گلدهی گیاه) صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ و گل‌آذین اکوتیپ^۱ دیررس (اکوتیپ ساری)، میان‌رس (اکوتیپ مغان) و زودرس (اکوتیپ‌های فسا و همدان) گیاه رازیانه کشت‌شده در مزرعه پژوهشی سه ساله گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد (Izadi-Darbandi et al. 2013). پس از نمونه‌برداری، بافت‌ها توسط ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منجمد شده و سپس به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

به‌منظور استخراج RNA، ابتدا مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱ گرم از بافت برگ و گل‌آذین هر کدام از نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و سپس mRNA موجود در آن با استفاده از یک میلی‌لیتر عامل ترایزول^۲ و طبق دستورالعمل کیت ترایزول (شرکت Invitrogen آمریکا) استخراج شد. قبل از استخراج RNA، همه شیشه‌آلات و اتوکلاو شده) تحت تیمار قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA معرف‌های مورد استفاده با استفاده از DEPC^۳ ۰/۱ درصد (از قبل استخراجی با استفاده از اندازه‌گیری جذب نور UV در ۲۶۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر^۴ (PerkinElmer Lamda 25) مشخص شد.



شکل ۱- الف: تعیین کیفیت RNAهای استخراجی با ژل آگارز ۱ درصد برای چهار لاین به‌ترتیب از راست به چپ فسا، همدان، ساری، مغان. ب: تأیید ساخته‌شدن cDNA توسط آغازگرهای اکتین برای چهار لاین به‌ترتیب از راست به چپ فسا، همدان، ساری، مغان.

^۱ Ecotype

^۲ Trizol

^۳ Diethylpyrocarbonate

^۴ Spectrophotometer

^۵ Ethidium bromide

^۶ Electrophoresis

^۷ Agarose gel

^۸ Tris/Borate/EDTA

^۹ Alignment

^{۱۰} *Panax quinquefolius* (KT869137.1)

^{۱۱} *Panax notoginseng* (KJ804166.1)

^{۱۲} *Panax ginseng* (JX648390.1)

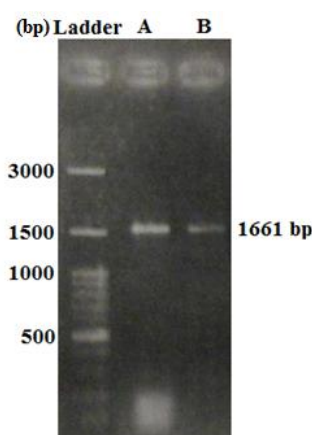
^{۱۳} National Center for Biotechnology Information

^{۱۴} Reverse transcription

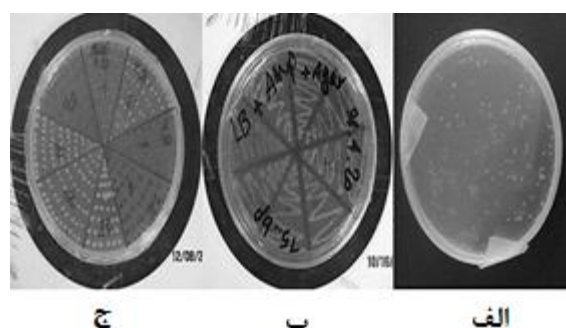
PCR ابتدا از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز به ناقل PTG-19 وارد شد و سپس به سلول‌های مستعد از باکتری اشرشیاکلی^۱ سویه DH5 α (قبلا توسط CaCl₂ تیمار شده) انتقال داده شد.

پس از انجام تراریختی^۲ باکتری، همسانه‌های تراریخته^۳ با کشت بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین^۴ مشاهده شدند (قسمت الف شکل ۳). سپس هر کدام از تک کلون‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین واکشت شدند (قسمت ب شکل ۳). تک کلون‌های واکشت شده، بر روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، X-gal^۵ و IPTG^۶ کشت شد. یکی از ویژگی‌های ناقل، دارا بودن یک جایگاه چندگانه همسانه‌سازی در وسط ژن *Lac Z* است که باعث می‌شود در صورت ورود قطعه خارجی به درون جایگاه ژن *Lac Z*، ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز^۷ غیرفعال شود. بنابراین غربالگری سلول‌های حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آن‌ها در ساخت آنزیم بتا گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد و در نتیجه کلونی‌های باکتریایی تراریخته به رنگ سفید و سلول‌های باکتری غیرتراریخته به صورت آبی ظاهر می‌شوند. (قسمت ج شکل ۳). بعد از اینکه استخراج پلاسمید^۸ از تک کلونی‌های سفید انجام شد، نتیجه این استخراج بر روی ژل آگارز به صورت سه باند DNA سوپرکویل^۹، شکسته و دو رشته‌ای مشخص شد (قسمت الف شکل ۴). به منظور تایید تکمیلی حضور قطعه مورد نظر درون پلاسمید نوترکیب از واکنش هضمی به کمک آنزیم *BamH I* استفاده شد. با توجه به این‌که آنزیم *BamH I* علاوه بر دو مکان برشی بر روی پلاسمید PTG-19 همچنین دارای یک مکان برشی درون ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان است، احتمال ایجاد یک باند پلاسمید خطی (bp) ۲۸۸۰ و دو باند از ژن کلون‌شده (bp ۶۳۲ و bp ۱۰۲۹) قابل پیش‌بینی بود (قسمت ب شکل ۴). پس از تایید فراورده

شکل ۲). قطعه تکثیرشده مابین آغازگرهای رفت و برگشتی در حدود ۱۶۶۱ نوکلئوتید بود که در نهایت طبق دستورالعمل کیت Silica Bead DNA Gel Extraction (شرکت Thermo scientific آمریکا) از ژل آگارز یک درصد استخراج شد که به منظور تأیید استخراج ژن از ژل، بار دیگر توسط ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (قسمت ب شکل ۲).



شکل ۲- A: تکثیر ژن *HMGR* به طول ۱۶۶۱ جفت‌باز بر روی cDNA اکوتیپ ساری ساخته شده‌است. B: استخراج ژن تکثیر شده از ژل آگارز ۱ درصد به وسیله کیت Silica Bead DNA Gel Ext.



شکل ۳- الف: ظهور تک کلون‌های تراریخته از باکتری ب: تکثیر تک کلون‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ج: کشت تک کلون‌ها بر روی محیط انتخابی سفید-آبی حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal.

ابتدا ژن تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و سپس برای توالی‌یابی ارسال شد. نمونه ارسالی دارای غلظت مناسب تعیین توالی نبود، بنابراین به منظور افزایش غلظت نمونه ارسالی و تسهیل توالی‌یابی (توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت پلاسمید تکثیری) از روش همسانه‌سازی TA استفاده شد. به منظور همسانه‌سازی فراورده تکثیر شده حاصل از RT-

¹ E.coli

² Transformation

³ Transgenic

⁴ Ampicillin

⁵ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

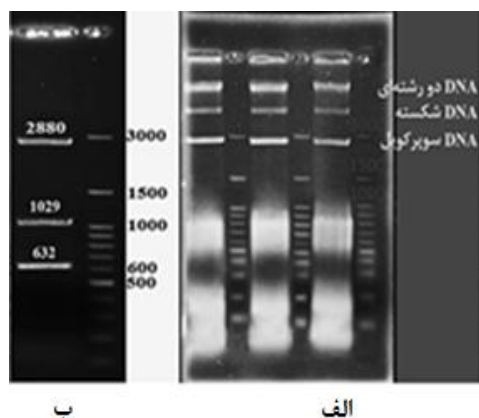
⁶ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

⁷ β -galactosidase

⁸ Plasmid

⁹ Supercoiled DNA

اگرچه انتهای 3'-OH توالی به طور ناقص تکثیر شده است اما تمامی توالی دمین‌های ساختاری و کارکردی قطعه تکثیر شده کامل توالی یابی شده است. ناحیه ORF این توالی، رمزکننده قطعه پروتئینی به طول ۵۵۳ اسید آمینه است.



شکل ۴- الف: استخراج پلاسمید از کلون‌های نوترکیب سفید رنگ ب: برش پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *BamH I* که تولید سه باند کرده است، باند اول پلاسمید خطی شده، باند دوم و سوم ژن مورد نظر که توسط برش داخلی آنزیم ایجاد شده است.

Alignments						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ <i>Panax quinquefolius</i>	2364	2364	100%	0.0	92%	FJ755158.2
☐ <i>Panax notoginseng</i>	2303	2303	100%	0.0	92%	KJ804166.1
☐ <i>Panax ginseng</i>	2242	2242	95%	0.0	92%	JX648390.1
☒ <i>Centella asiatica</i>	1380	1380	51%	0.0	96%	KF925529.1
☐ <i>Morus alba</i>	315	315	62%	3e-81	72%	KX387385.1
☐ <i>Gossypium barbadense</i>	198	198	26%	3e-46	75%	DQ350143.1
☐ <i>Theobroma cacao</i>	69.4	69.4	4%	3e-07	85%	LT594795.1
☐ <i>Nilaparvata lugens</i>	60.2	60.2	2%	2e-04	95%	KC437300.1
☐ <i>Caenorhabditis elegans</i>	52.8	52.8	2%	0.028	92%	LK927698.1

شکل ۵- نتایج بلاست نوکلئوتید قطعه تکثیر شده ژن *HMGR* گیاه رازیانه.

با استفاده از نرم‌افزار Edit Seq (version 6.0) درصد هر کدام از اسیدهای آمینه توالی پروتئینی ناحیه ORF ژن *HMGR* گیاه رازیانه در جدول ۱ مشخص شده است. این ناحیه دارای جرم مولکولی در حدود ۵۹/۸۱۶ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک برابر با ۴/۰ (PI= 8.40) است. دو اسید آمینه هیستیدین (۲/۲۶ درصد) در ساختار ژن‌های *HMGR* به صورت حفظ شده است. یکی از این هیستیدین‌ها در بازه زمانی تبدیل HMG-CoA به موالونات پروتونه می‌شود (Liscum et al. 1985). اسید آمینه گلايسین

همسان‌سازی شده بر اساس نقشه هضمی آن، یکی از پلاسمیدها انتخاب شد و به منظور توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. از توالی آغازگر M13 رفت و برگشت خود پلاسمید به منظور توالی‌یابی استفاده شد. نتیجه توالی‌یابی در شکل ۶ نشان داده شده است.

توالی تکثیر شده از ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط نرم‌افزارهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور طراحی آغازگر از برنامه آنالین (version 0.4.0) Primer3 استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن *HMGR* گیاه رازیانه و همچنین تعیین جرم و نقطه ایزوالکتریک پروتئین حاصل از آن، توسط نرم‌افزار Edit Seq (version 6.0) (تحت برنامه DNASTAR) انجام شد. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط دو نرم‌افزار NCBI BLASTn و ClustalW انجام شد. ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط برنامه آنالین ClustalW با سایر توالی‌های ژن *HMGR* موجود در سایت GenBank هم‌ردیف شد و سپس درخت فیلوژنتیکی آن به دست آمد. نواحی گذرنده از غشا و دمین‌های درون‌غشایی موجود در ساختار ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط نرم‌افزار TMHMM سرور PSORTb v2.0 و TMPred تعیین شد. از نرم‌افزار Prosit motif (تحت برنامه Expasy) به منظور تعیین نقاط حفظ شده کارکردی استفاده شد. در نهایت به منظور رسم ساختار سه‌بعدی پروتئین از نرم‌افزار Swiss Model تحت برنامه آنالین (Expasy) استفاده شد.

نتایج و بحث

با استفاده از نواحی حفظ شده ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان، دو آغازگر دژنره رفت و برگشت برای تکثیر قسمتی از ژن *HMGR* گیاه رازیانه استفاده شد. ناحیه تکثیر شده دارای طولی برابر با ۱۶۶۱ جفت‌باز بود که شامل ناحیه بالادست کدون شروع به طول ۷۲ جفت‌باز و همچنین ناحیه رمز کننده (ORF) به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز است. ناحیه ORF این توالی به صورت ناقص توالی‌یابی شده است و حدود ۱۸۱ جفت‌باز از انتهای ناحیه 3'-OH آن به نسبت طول کامل cDNA دیگر توالی‌های *HMGR* در سایر گیاهان خانواده چتریان، توالی‌یابی نشده است (Liu et al. 2015).

چهار مکان N- گلیکوزیلاسیون در محدوده ۳۹۹-۳۹۴ (GNYCSD)، ۴۵۳-۴۴۸ (GSAMAG)، ۴۶۱-۴۵۶ (GGFNAH)، ۴۷۹-۴۷۴ (GQDPAQ) یافت شد. هم‌ردیفی توالی پروتئینی مربوط به قطعه توالی‌یابی شده HMGR گیاه رازیانه با سه توالی پروتئینی HMGR گیاهان جنس *Panax* مانند جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*) توسط نرم‌افزار ClustalW انجام شد و در نهایت مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C، مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II، مکان N- گلیکوزیلاسیون، موتیف اتصال NADP(H) و هم‌چنین موتیف اتصال HMG-CoA بر روی آن مشخص شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت پروتئین HMGR گیاه رازیانه ممکن است توسط فسفوریلاسیون تنظیم شود.

تجزیه و تحلیل‌های TMHMM توسط سرور PSORTb v2.0 (<http://www.psорт.org/psортb/index.html>) نشان داد که پروتئین حاصل از ژن HMGR گیاه رازیانه از دو مارپیچ درون غشایی (در اسیدهای آمینه ۳۵-۵۷ و ۷۸-۱۰۰ از توالی پروتئین) تشکیل شده‌است (شکل ۹). بررسی توالی پروتئینی با نرم‌افزار TMPred نشان داد که نواحی 38-57، 81-97 و ۲۵۷-۲۴۰ امکان عبور از غشای سلولی را دارند (قسمت الف شکل ۱۰). همانند سایر پروتئین‌های HMGR گیاهی، پروفایل هیدروفوبی پروتئین HMGR گیاه رازیانه نشان داد که پایانه آمینوی این پروتئین نیز دارای دمین‌های درون غشایی است که توسط لوپ‌های آبدوست (به‌عنوان لنگر آنزیم در غشای پلاسمایی) از همدیگر جدا شده‌اند (Ruiz-Albert et al. 2002).

(۷/۷۵ درصد) نقش مهمی در پایداری ساختار دوم پروتئین HMGR دارد. از آنجا که ژن HMGR نیاز به غلظت بالایی از عوامل احیاء کننده تیول دارد؛ از این رو اسید آمینه سیستئین (۳/۰۲ درصد) در مکان فعال آنزیم دارای نقش مهمی است (Liscum et al. 1985). اسیدآمینه آسپارژین (۲/۶۴ درصد) در جایگاه گلیکوزیلاسیون اجتماع می‌یابد. درصد هر کدام از اسیدهای آمینه با بار مثبت (K, R) ۱۰/۲ درصد، اسیدهای آمینه با بار منفی (D, E) ۸/۸۸ درصد، اسیدهای آمینه آبگریز (A, I, L, N, C, Q, S) ۳۸/۳۷ درصد و اسیدهای آمینه آبدوست (T, Y) ۲۴/۹۵ درصد است. با توجه به اینکه آنزیم HMGR کار سنتز مولونات از HMG-CoA را به‌وسیله دو احیاء پی‌درپی از HMG-CoA ها و با استفاده از دو مولکول NADPH (به‌عنوان کوفاکتور)^۱ انجام می‌دهد، از این رو با انجام هم‌ردیفی با سایر توالی‌های پروتئین HMGR گیاهی، موقعیت موتیف‌هایی با توالی اسیدآمینه حفظ‌شده مکان‌یابی شد. سه موتیف در دامنه بزرگ و مرکزی L شامل دو موتیف اتصال HMG-CoA (دارای توالی اسیدآمینه‌ای EMPVGYV QIP و TTEGCLVA) و یک موتیف اتصال NADP(H) (دارای توالی اسیدآمینه GTVGGGT) است و هم‌چنین در دامنه کوچک و مارپیچ S یک موتیف اتصال به (H) NADP (دارای توالی DAMGMNM) وجود دارد که بر روی توالی ژن HMGR گیاه رازیانه مکان‌یابی شده‌است (شکل ۶). با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی پروتئین حاصل توسط نرم‌افزار Prosit motif، نواحی حفظ شده شامل یک مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C در محدوده ۳۹۸-۴۰۰ (SDK)، یک مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II در محدوده ۴۷۳-۴۷۶ (TGQD)،

¹ Cofactor

جدول ۱- نسبت هر کدام از اسیدهای آمینه در توالی قطعه تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه

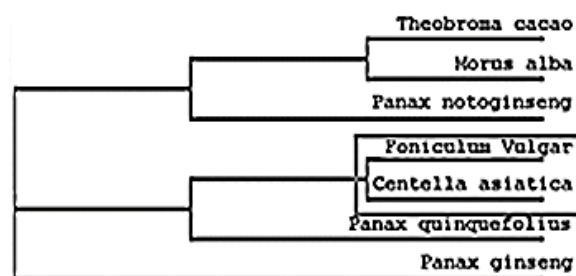
Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol
Gln (Q)	3.78	(M) Met	2.83	(R) Arg	6.8	(I) Ile	5.48
Leu (L)	10.58	(T) Thr	4.72	(H) His	2.26	(D) Asp	3.4
Ala (A)	10.77	(G) Gly	7.75	(Y) Tyr	2.45	(V) Val	8.31
Glu (E)	5.48	(F) Phe	2.26	(N) Asn	2.64	(C) Cys	3.02
(K) Lys	3.4	(W) Trp	0.94	(P) Pro	4.72	(S) Ser	8.31

شکل ۶- نتیجه توالی‌یابی در شرکت Bioneer و دمین‌ها و نواحی اتصال آغازگر رفت و برگشت بر روی آن. A: دمین مرکزی L (EMPVGYY) B: دمین مرکزی L (TTEGCLVA)، C: ناحیه برشی توسط آنزیم *BamH I*، D: دمین حلزونی S (DAMGMNM)، E: دمین مرکزی L (GTVGGGT)، F: محل اتصال آغازگر رفت R: محل اتصال آغازگر برگشت.

شکل ۷- انجام هم‌ردیفی پروتئین برای توالی تکثیر شده در مقایسه با سه توالی پروتئینی HMGR از گیاهان خانواده Panax توسط نرم‌افزار Clustal W و مشخص کردن جایگاه دمین و نواحی حفظ شده کارکردی بر روی آن. (gi 1: *Foniculum Vulgar*، gi 2: *Panax*، gi 3: *Panax notoginseng*، gi 4: *Panax ginseng*، *quinquefolius*)، A: موتیف اتصال HMG- CoA (دمین مرکزی L)، B: موتیف اتصال HMG- CoA (دمین مرکزی L)، C: موتیف اتصال NADP(H) (دمین حلزونی D، S)، D: موتیف اتصال NADP(H) (دمین مرکزی L)، E: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون، F: جایگاه فسفریلاسیون پروتئین کیناز C، G: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون، H: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون، I: جایگاه فسفوزیلاسیون کازوئین، II: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون.



شکل ۱۱- ساختار سه‌بعدی پروتئین از توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه.

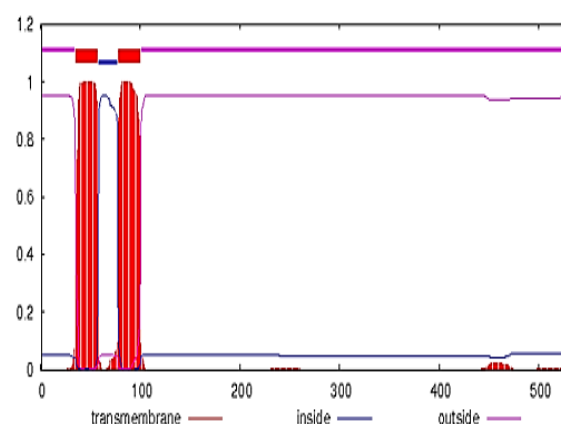


شکل ۸- تعیین درخت فیلوژنتیکی توسط هم‌ردیفی توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه با توالی‌های ژن HMGR از گیاهان *Panax ginseng*, *Centella asiatica*, *Panax notoginseng*, *Panax quinquefolius*, *Morus alba*, *Theobroma cacao*.

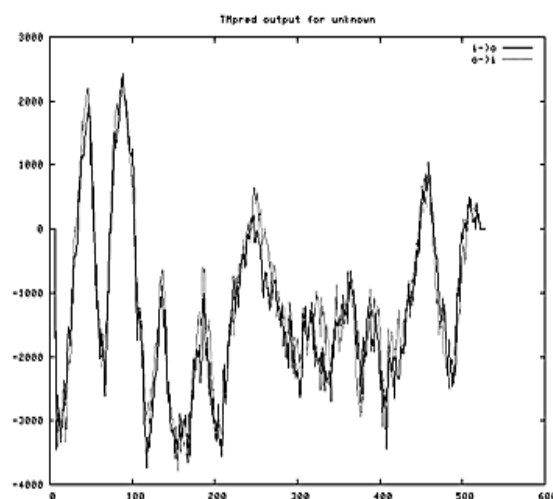
این دمین‌های درون غشایی شامل دو ماریپچ آلفا گذرنده از غشاء است (Shen et al. 2006; Wang et al. 2007) که تعداد حقیقی آن‌ها در ساختار پروتئین HMGR گیاه رازیانه باید توسط آزمایشات بعدی مشخص شود.

نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتید توالی تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه نشان داد که توالی مرجع با توالی ژن HMGR در چهار گیاه جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و آب‌قاشقی (*Centella asiatica*) دارای درصد تشابه (Identical)، ارزش مورد انتظار (E-value)، میزان همپوشانی (QueryCover) بسیار بالایی برخوردار بود (شکل ۵). میزان همپوشانی توالی مرجع با این چهار توالی به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۵ درصد، ۵۱ درصد و میزان تشابه توالی مرجع با این چهار توالی به ترتیب ۹۲ درصد، ۹۲ درصد، ۹۲ درصد، ۹۶ درصد بود. توالی تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه بیش‌ترین تشابه را با ژن HMGR گیاه آب قاشقی (*Centella asiatica*) داشت که دارای درصد تشابه ۹۶ درصد بود.

هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن HMGR گیاه رازیانه با توالی نوکلئوتیدی ژن HMGR از گیاهان جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و آب‌قاشقی (*Centella asiatica*)، گیاه کاکائو (*Theobroma cacao*) و توت سفید (*Morus alba*) توسط نرم‌افزار ClustalW انجام شد و سپس با



شکل ۹- پیش‌بینی ماریپچ درون غشایی (ماریپچ درون غشایی توسط خط قرمز، ماریپچ قرار گرفته در قسمت داخلی سلول توسط خط آبی و ماریپچ قرار گرفته در قسمت خارجی سلول توسط خط صورتی) مشخص شده‌است.



شکل ۱۰- نمودار شاخص آبرگریزی اسیدهای آمینه توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه محور عمودی توسط مقیاس‌هایی با فاصله ۱۰۰۰ تقسیم‌بندی شده‌است که مقیاس مثبت نشان‌دهنده نواحی آبرگریز است.

با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیک و تعیین توالی قطعه تکثیر شده به‌عنوان cDNA جداسازی این قطعه بیانی از گیاه دارویی رازیانه برای اولین بار انجام شد. نتایج هم‌ردیفی نشان داد که ژن *HMGR* تکثیر شده در سطح رونوشت بیش‌ترین تشابه را با گیاه آب قاشقی (*Centella asiatica*) دارد. با توجه به حضور تمامی دمین‌های کارکردی و طول مناسب قطعه حاصل می‌توان قطعه همسانه‌سازی شده را در ناقل بیانی مناسب جهت مطالعات انتقال ژن یا بررسی‌های خاموشی ژن به‌منظور دریافت کارکرد آن به‌کار برد.

رسم درخت فیلوژنتیکی مربوط به آن‌ها مشخص شد که این توالی نوکلئوتیدی بیش‌ترین تشابه را با گیاه *Centella asiatica* و کم‌ترین تشابه را با گیاه کاکائو (*Theobroma cacao*) دارد (شکل ۸).

به‌منظور رسم ساختار سه‌بعدی پروتئین از برنامه SwissModel استفاده شد. در این برنامه با وارد کردن توالی پروتئینی قسمت ORF (چهارچوب خواندن) ژن *HMGR* گیاه رازیانه (به‌عنوان داده‌های ورودی)، در نهایت ساختار سه‌بعدی پروتئین توالی مذکور (به‌عنوان خروجی) مشخص شد (شکل ۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

منابع

- Bach TJ (1995) some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. *Plant Lipid Metabolism* 321-334.
- Bahmani K, Darbandi AI, Ramshini HA, Moradi N, Akbari A (2015) Agro-morphological and phytochemical diversity of various Iranian fennel landraces. *Industrial Crops and Products* 77:282-294.
- Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B, Miele M (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnology* 6:45.
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44:357-429.
- Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG, Boronat A (1989) Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Molecular Biology* 13:627-638.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* 24:1250-1319.
- Hartmann T (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis Applicata* 80:177-188.
- Hey SJ, Powers SJ, Beale MH, Hawkins ND, Ward JL, Halford NG (2006) Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. *Plant Biotechnology Journal* 4:219-229.
- Izadi-Darbandi A, Bahmani K, Ramshini H, Moradia N (2013) Heritability estimates of agronomic traits and essential oil content in Iranian fennels. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15:1275-1283.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 28:27-30.
- Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 260:522-530.
- Liu MH, Yang BR, Cheung WF, Yang KY, Zhou HF, Kwok JS, Liu GC, Li XF, Zhong S, Lee SM, Tsui SK (2015) Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in Ginsenoside and alkaloid biosynthesis. *BMC Genomics* 16:265.
- Muñoz-Bertomeu J, Sales E, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2007) Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnology Journal* 5:746-758.
- Newman JD, Chappell J (1999) Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34:95-106.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* 15:684-692.
- Roberts SC (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 3:387-395.
- Ruiz-Albert J, Cerdá-Olmedo E, Corrochano L (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Molecular Genetics and Genomics* 266:768-777.
- Shen G, Pang Y, Wu W, Liao Z, Zhao L, Sun X, Tang K (2006) Cloning and characterization of a root-specific expressing gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Ginkgo biloba*. *Molecular Biology Reports* 33:117-127.
- Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W (2000) Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic

fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193:249-253.

Wang Y, Guo B, Zhang F, Yao H, Miao Z, Tang K (2007) Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

reductase from hazel (*Corylus avellana* L. Gasaway). BMB Reports 40:861-869.

Wright R, Basson M, D'Ari L, Rine J (1988) Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. The Journal of Cell Biology 107:101-114.