

توالی یابی بخشی از ژن فنیلآلانین آمونیالیاز (*pal₂*) در مسیر سنتز آنتی اکسیدان‌ها و استفاده از آن در فیلوژنی جنس‌های مهم زیرخانواده *Anthemideae*

Sequencing part of phenylalanin ammonia lyase (*pal₂*) gene involved in antioxidant synthesis pathway to use in phylogeny of important genera belong to *Anthemideae* subfamily

احمد یامچی^{۱*}، منیره صادقی دستجردی^۲، مهدی رحیم ملک^۲، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی^۲

۱- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار، استاد، دانشگاه صنعتی اصفهان

Yamchi A^{*1}, Sadeghi Dastjerdi M², Rahimmalek M², Sayed Tabatabaei BE²

1. Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan,
Iran

2. Graduated MSc Student, Assistant professor, Professors, Isfahan University of Technology, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: yamchi@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

بومادران، درمنه، باونه، داودی و مخلصه از جمله مهم‌ترین جنس‌هایی زیرخانواده *Anthemideae* هستند که به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدانی کاربردهای قابل توجهی در داروسازی دارند. فلاونوئیدها ترکیبات فنلی هستند که جزو آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی طبقه‌بندی می‌شوند. فنیلآلانین آمونیا لیاز (PAL) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فلاونوئیدها می‌باشد. برای شناسایی و تعیین توالی ژن *pal₂* ابتدا براساس هم‌دیف‌سازی چندتاپی توالی‌های جستجو شده برای گیاه مدل آراییدوپسیس و سایر گیاهان در پایگاه داده‌های باتک ژن (NCBI)، انجام شد. آغازگرهای اختصاصی به صورت هرز براساس نواحی حفاظت شده در ناحیه ژنی و همچنین ناحیه فعل دومین پروتئین PAL₂ طراحی شد. آغازگرهای ذکور ناحیه‌ای به طول ۷۰۰ چفت نوکلئوتید را تکثیر و سپس محصول PCR کلون و در ادامه تعیین توالی و در باتک ژن (NCBI) ثبت شدند. به منظور بررسی تنوع ژن *pal₂* بر اساس توالی نوکلئوتیدها (جایگزینی‌های هم‌جنس Transition و ناهم‌جنس Transversion نوکلئوتیدها) در بین جنس‌های ذکر شده از نرم افزار Mega ver 5.0 استفاده و درصد تنوع محاسبه شد. نتایج بیوانفورماتیک بررسی تنوع نشان دادند جنس‌های ذکر شده از نظر ژن *pal₂* به خوبی حفاظت شده می‌باشد و *Achillea* sp. و *Matricaria* sp. نزدیکترین جنس‌ها به یکدیگر و جنس‌های *Artemisia* sp. و *Chrysanthemum* sp. دورترین جنس‌ها از یکدیگر محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی

نوع

ژن *pal₂*

Anthemideae

DNA

طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام واکنش PCR به منظور طراحی آغازگر برای ژن موردنظر *pal2* ابتدا با مراجعه به پایگاه داده‌های بانک ژن در NCBI (http://www.NCBI.nlm.nih.gov) توالی نوکلئوتیدی و توالی آمینواسیدی ژن موردنظر برای گیاه مدل آرابیدوپسیس جستجو شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی BLAST موجود در پایگاه داده‌های NCBI، توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ژن در سایر گیاهان نیز بدست آمد. همردیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با استفاده از نرمافزار MEGA ver 5.0 به صورت جداگانه برای توالی‌های نوکلئوتیدی و توالی‌های آمینواسیدی صورت گرفت. نواحی حفاظت شده آمینواسیدی (Activ site) برای EXPASY (http://www.expasy.org) از سایت PAL پروتئین (http://www.expasy.org) جستجو شد و پس از مشخص کردن این نواحی بر روی توالی-های همردیف شده پروتئینی، ناحیه متناظر با آن روی توالی‌های نوکلئوتیدی نیز شناسایی شد و سپس از این نواحی حفاظت شده آغازگر رفت با استفاده از نرمافزار OLIGO ver 5.0 طراحی شد. آغازگر پسرو نیز در فاصله ۷۰۰ جفت بازی از ناحیه طراحی آغازگر رفت و در ناحیه اگرون سوم طراحی شد. آغازگرها به صورت هرز طراحی شدند تا انعطاف‌پذیری برای جنس‌های موردنظر را داشته باشند توالی آغازگر پسرو و پسرو به ترتیب *R-pal₂*, *F-pal₂*, ۵'-AHTCMGCMACRMGAGCVGC-3' و 3'-GGDGTYCCYTGGAAGTTACCACCRT-5' می‌باشد.

واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر غلاظت، دو میلی‌مولاრ کلرید مینزیم، یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز، ۰/۲ میلی‌مولاار dNTPs، ۰/۳ میکرومولاار از هر آغازگر و ۲۰ نانوگرم DNA (طبق برنامه + ۳۴ x ۹۴°C / ۱' + ۵۵°C / ۱' + ۷۲°C / ۱' + ۷۲°C / ۱' + ۱ x ۹۵°C / ۵' انجام شد.

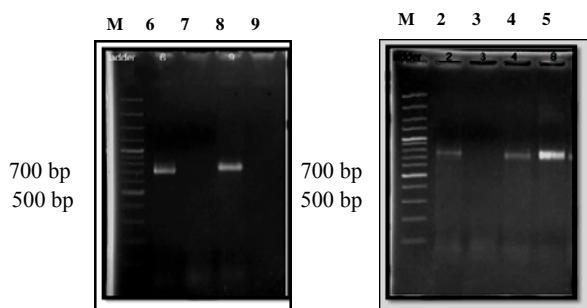
همسانه‌سازی و توالی یابی قطعات تکثیر شده به منظور توالی یابی قطعات موردنظر، الحاق محصولات حاصله از واکنش PCR به پلاسمید pTZ57R/T تهیه شده از کیت InsTAcclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل باکتری *E. coli* MC1061 منتقل شدند. پس از کشت

پلی‌فنول‌ها آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهی هستند. این مواد شامل فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگن‌ها هستند که از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و این واکنش ناشی از فعالیت یک آنزیم کلیدی به نام فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) است که یک نقطه ارتباطی مهم بین متابولیسم‌های اولیه (مسیر شیکیمات) و متابولیسم‌های ثانویه (مسیر فنیل پروپانوئیدها) در گیاهان محسوب می‌شود (Lewis and Yamamoto 1990; Rice-Evans 2004). آنزیم PAL استخراج شده از گیاهان مختلف دارای یک ساختار تترامر با وزن مولکولی ۲۲۵ کیلو Dalton می‌باشد (Fritz et al. 1976; Veveridis et al. 2007). در گیاه آرابیدوپسیس خانواده ژنی *pal* دارای چهار ایزوفرم می‌باشد. بیان ژن *pal* در گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) گزارش شده است (Song and wang 2009) یکی از زیرخانواده‌های Anthemideae. مهم کاسنی است و جنس‌های موجود در این زیرخانواده به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فراوان منابع مناسبی برای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شوند. از جمله مهمترین جنس‌های این زیرخانواده می‌توان به جنس‌های *Matricaria* sp., *Tanacetum* sp., *Chrysanthemum* sp. (بابونه)، (*داودی*), *Achilleamillefolium* (ملخله)، *Artemisia* sp. (درمنه)، (*Santolina* sp. (سانتولینا)) اشاره کرد. تاکنون هیچ یک از اعضای خانواده‌های ژنی *pal* در گیاهان دارویی زیرخانواده Anthemideae شناسایی و توالی یابی نشده‌اند و هیچ گونه مطالعه‌ای در این زمینه گزارش نشده است. به همین منظور در این پژوهش ردیابی و توالی یابی ژن *pal* در جنس‌های مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

تهیه نمونه‌های گیاهی و استخراج DNA به منظور تهیه نمونه‌های گیاهی، بذر نمونه‌های مذکور از سازمان جنگل و مرتع تهیه و در گلستان‌هایی حاوی خاک مخلوط با ماسه کشت شدند. پس از گذشت دو الی سه ماه از تاریخ کشت از جنس‌های مختلف نمونه‌های برگی تهیه شده و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی با روش Murry and Thompson (1984) تغییر یافته انجام گرفت. پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل آگاراز ۰/۷ درصد و اسپکتروفوتومتر (IMPLEN) بررسی شد.

سایت Expasy نواحی فعال پروتئینی (Activ site) برای هر کدام از توالی‌های آمینواسیدی به صورت جداگانه جستجو شد.

Matricaria sp. و *R-pal₂* و *F-pal₂* در جنس‌های *Chrysanthemum* sp. و *Achillea* sp. و *Arthemisia* sp. ناحیه‌ای به طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز را به خوبی تکثیر کردند (شکل ۱).



شکل ۱) نتایج حاصل از PCR با استفاده از آغازگرهای *pal2* چاهک ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب مربوط با تکثیر ژن *pal2* در جنس‌های *Matricaria* sp. و *Chrysanthemum* sp. و *Achillea* sp. و *Arthemisia* sp. می‌باشد.

توالی‌های به دست آمده از ژن *pal2* در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* به خوبی توانستند با یکدیگر و نیز با توالی ژن‌های همتای خود در سایر گیاهان موجود در پایگاه NCBI هم‌دیف شوند که این امر به خوبی صحت توالی‌های به دست آمده را تایید کرد. علاوه بر این بررسی توالی‌های آمینواسیدی حاصل از ترجمه قطعات به دست آمده در ژن‌های مذکور و هم‌دیف‌سازی مناسب آن‌ها با توالی آمینواسیدی پروتئین‌های PAL2 در سایر گیاهان و دارا بودن ناحیه فعال پروتئینی در این جنس‌ها، تایید دیگری بر صحت نتایج حاصله از BLAST داشت. در نهایت توالی‌های بدست آمده از ژن *pal2* در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* در پایگاه NCBI ثبت شد (جدول ۱). نتایج حاصل از محاسبه میانگین کل Pairwise-distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance و نیز درصد تنوع برای ژن *pal2* بیانگر وجود بیشترین درصد تنوع و فاصله ژنتیکی بین جنس‌های زیرخانواده - *Anthemideae* با جنس آراییدوپسیس و وجود بیشترین شباهت A. *annua* بودند (جدول ۱).

کلون‌ها روی محیط‌های LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و رشد آن‌ها، به منظور تشخیص و تایید همسانه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از سه روش ۱) غربالگری سریع؛ ۲) انجام واکنش Colony PCR و ۳) استخراج پلاسمید از همسانه‌ها و هضم آنزیمی استفاده شد. پس از انجام این مرحله، همسانه‌هایی که حاوی قطعه مورد نظر بودند توالی یابی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در ابتدا با شناسایی توالی مربوط به پلاسمید و هم‌دیف‌سازی آن با توالی‌های به دست آمده، ناحیه مربوط به پلاسمید جداسازی و توالی‌ها خالص‌سازی شدند. سپس با استفاده از ابزار BLAST موجود در پایگاه داده‌های NCBI صحت توالی‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین هم‌دیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با یکدیگر و نیز با توالی‌های مربوط به گیاهان دیگر در پایگاه داده‌های Multalin و Mega ver5.0 و NCBI با استفاده از نرم‌افزارهای *pal2*- صورت گرفت. محاسبه درصد تنوع ژن *pal2* با استفاده از نرم- افزار ARLEQUIN ver 3.1 انجام شد و تعداد جایگزینی‌های هم‌جنس و ناهم‌جنس محاسبه شد و پس از آن تعداد کل جایگزینی، حذف و اضافه به تعداد کل نوکلئوتیدها تقسیم شده و درصد تنوع برای ژن *pal2* به دست آمد. همچنین میانگین pairwise distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 به دست آمد. در این مقاله تمام فاصله‌های ژنتیکی محاسبه شده بر اساس میانگین Pairwise distance صورت گرفت و این به دلیل عدم تساوی نمونه‌های موجود بود. هم چنین به منظور بررسی رابطه فیلوزنی جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن‌های *pal2* با استفاده از نرم- افزار MEGA ver 5.0 تجزیه و تحلیل‌های فیلوزنی‌کی داده‌ها با استفاده از ضریب حداقل صرفه‌جویی صورت گرفت و نمودارهای خوش‌های رسم شد. به منظور مقایسه تنوع جنس‌های مهم زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن *pal2* درصد شباهت با استفاده از ابزار جستجوی شباهتها در سایت (http://www.ebi.ac.uk) به دست آمد. همچنین برای بررسی توالی‌های آمینواسیدی، توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 به توالی‌های آمینواسیدی تبدیل شد و سپس با استفاده ابزار ScanProsite در

جدول ۱- بررسی سه پارامتر میانگین کل pairwise distance براساس دو مدل K2P و P-distance و درصد تنوع در ژن *pal*₂ بین جنس‌های *Achilleamillefolium* با یکدیگر، بین جنس‌های مذکور با آرابیدوپسیس، بین جنس‌های مذکور با *Artemisia annua* و نیز بین جنس‌های مذکور با جنس‌های مختلف از خانواده Asteraceae

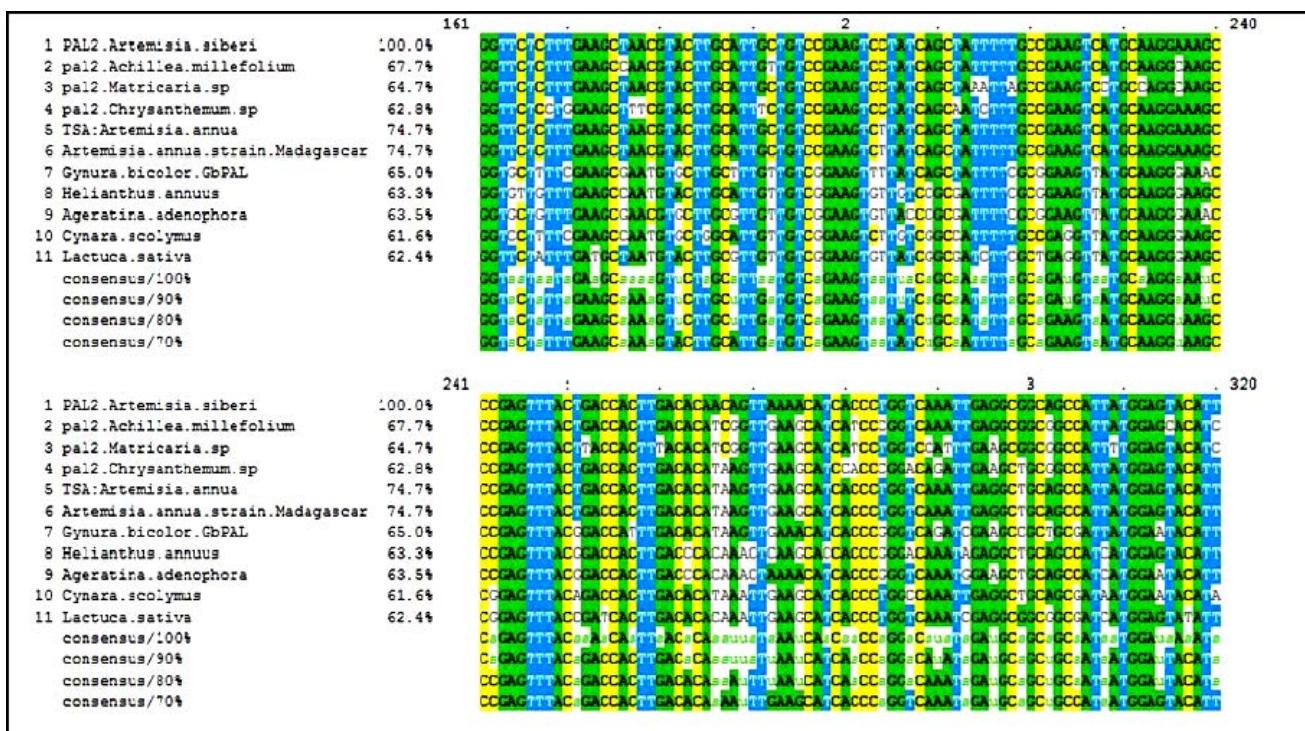
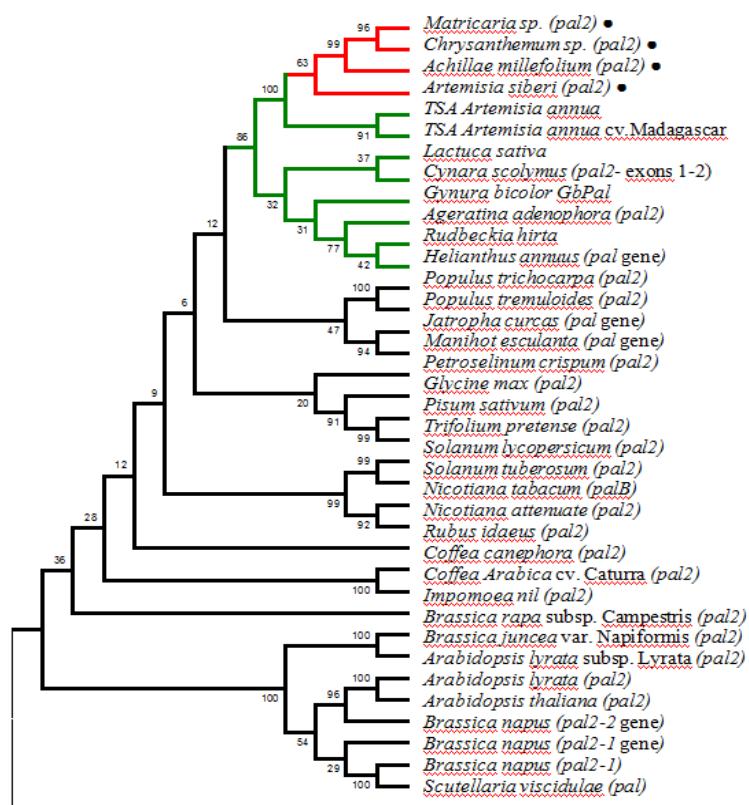
| جنس یا گونه گیاهی | شماره ثبت جدید | میانگین کل pairwise distance بر اساس مدل K2P | میانگین کل pairwise distance بر اساس مدل P-distance | در صد تنوع براساس جایگزینی های همجنس و ناهمجنس |
|----------------------------------|----------------|--|---|--|
| <i>Artemisia siberi</i> | KF585042 | ۰/۱۷۷ | ۰/۱۵۶ | %۳۰/۲ |
| <i>Matricaria chamomilla</i> | KF585044 | - | ۰/۳۲۸ | %۵۲ |
| <i>Chrysanthemum sp</i> | KF585045 | - | ۰/۱۲۳ | %۳۲ |
| <i>Achillea millefolium</i> | KF585043 | - | ۰/۱۹۷ | %۳۵ |
| <i>With Arabidopsis thaliana</i> | - | - | ۰/۲۰۶ | %۳۳/۴ |
| <i>With Artemisia annua</i> | - | - | ۰/۲۴۷ | |
| <i>With Lactuca sativa</i> | - | - | | |
| <i>Lactuca sativa</i> | - | - | | |
| <i>Ageratina adenophora</i> | - | - | | |
| <i>Gynura bicolor</i> | - | - | | |
| <i>Helianthus annuus</i> | - | - | | |

به منظور توجیه تنوع به دست آمده، میانگین کل Pairwise-distance براساس مدل K2P و P-distance براساس جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس برای سایر خانواده‌های گیاهی که توالی ژن‌های *pal*₂ برای برخی از جنس‌های آنان در پایگاه داده‌های NCBI موجود بود محاسبه شد (داده‌های حاصله در این مقاله نمایش داده نشده است) و نتایج برای هر ژن به صورت جداگانه با نتایج به دست آمده در جنس‌های مورد مطالعه زیرخانواده‌های *Anthemideae* مقایسه شد که داده‌های بدست آمده از سایر خانواده‌های گیاهی با نتایج به دست آمده در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* کاملاً تطابق داشت و به خوبی میزان تنوع به دست آمده در مورد ژن‌های مذکور را در گیاهان زیرخانواده *Anthemideae* توجیه کرد. علت استفاده از میانگین Pairwise-distance عدم تساوی نمونه‌های موجود در سایر خانواده‌های گیاهی بود.

محاسبه میانگین Pairwise-distance نیز برای مقایسه دو به دو جنس‌ها با یکدیگر برای ژن *pal*₂ صورت گرفت (داده‌ها نمایش داده نشده است)، که نتایج حاصل از محاسبه این پارامتر در ژن *pal*₂ با نتایج به دست آمده بر اساس نشانگرهای مولکولی ITS و ژن کلروپلاستی *ndhf* همسو بودند (Watson et al. 2000; Himmelreich et al. 2008). به گونه‌ای که در مورد هر دو ژن *Achillea millefolium* و *ndhf* مشاهده شد که گونه‌های *pal*₂

تر بوده است (شکل ۲).

(شکل ۳).

توالی یابی بخشی از ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (*pal2*) ...شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی درصد شباهت بین جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* با سایر جنس‌های خانواده *Asteraceae* در ژن *pal2*شکل ۳- نمودار خوشباهی مربوط به روابط ژنتیکی گونه‌های مهم زیرخانواده *Anthemideae* و جایگاه آنان در ارتباط با گونه‌هایی از سایر جنس‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI بر اساس ژن *pal2*، با استفاده از ضریب Maximum parsimony. جنس‌های مذکور زیرخانواده *Anthemideae* با علامت • مشخص شده است.

تنش‌های زنده و غیرزنده بررسی شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه به خوبی نشان داد که روش جستجوی شباهت‌ها به خوبی توانست توالی ژن *pal*² را در جنس‌هایی که تاکنون هیچ توالی مشابهی برای از آن‌ها در دسترس نبوده، شناسایی کند. در ادامه این تحقیق بررسی بیان این ژن تحت تاثیر هورمون‌های گیاهی در حال انجام است و افزایش بیان این ژن‌ها راه را برای تولید هرچه بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی جهت افزایش کیفیت گیاهان دارویی هموار می‌سازد و در ادامه استخراج مواد موثره را مقرنون به صرفه می‌کند.

منابع

- Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW (1976) Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 251: 4646-4650.
- Himmelreich S, Kllersj M, Eldens P, Oberprieler C (2008) Phylogeny of southern hemisphere Compositae Anthemideae based on nrDNA ITS and cpDNA *ndhF* sequence information. *Plant Systematics and Evolution* 272: 131-153.
- Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Biology* 41: 455-496.
- Murry M, Thompson WF (1984) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Rice-Evans C (2004) Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 827-828.

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها مطالعات و بررسی‌ها در رابطه با این ژن‌ها رو به افزایش است ولی در زمینه ژن مذکور مطالعات مشابهی در جنس‌های زیر خانواده *Anthemideae* وجود ندارد و بیشتر مطالعات صورت گرفته روی بیان این ژن‌ها در برخی از گیاهان بوده است. از محدود مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می‌توان به بررسی آنزیم‌های GPX، CAT و APX (Yang et al. 2010) در گیاه دارویی جینسینگ (Panax ginseng), اشاره کرد. در مطالعه مذکور بر اساس توالی‌های بدست آمده در آنزیم‌های مذکور، بیان ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها در شرایط

- Song J, Wang Z (2009). Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia lyase gene (smPAL) from *Salvia miltiorrhiza*. *Molecular Biology Report* 36: 939-952.
- Veheridis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenyl propanoid- driven natural products. *Biotechnology Journal* 2: 1235-1249.
- Watson LE, Evans TM, Bluarte T (2000) Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhf*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 59-69.
- Yang DC, Sathiyaraj G, Lee OR, Parvin S, Khorolragchaa AJ, Kim Y (2010) Transcript profiling of antioxidant genes during biotic and abiotic stresses. *Molecular Biology Report* 10: 458-4668.