

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

گروه زراعت

شناسایی و کلونینگ ژن  $\Delta 6$  Desaturase برای تولید اسید چرب غیر اشباع

استئاریدونیک اسید (SDA; C18:4)

عصمت اشعار قدیم

استاد راهنما:

دکتر شاهرخ قرنچیک

پایان نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

شهریور ۱۳۹۴

دانشگاه شاهرود

دانشکده: کشاورزی

گروه: زراعت

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم عصمت اشعارقدیم

تحت عنوان: "شناسایی و همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز ( $\Delta 6$  Desaturase) جهت تولید اسیدچرب غیراشباع استئاریدونیک اسید (SDA; C18:4)"

در تاریخ ..... توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه ..... مورد پذیرش قرار گرفت.

اساتید راهنما	امضاء	اساتید مشاور	امضاء
نام و نام خانوادگی : دکتر شاهرخ قرنجیک		نام و نام خانوادگی : -	

اساتید داور	امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء
نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :	
نام و نام خانوادگی :			
نام و نام خانوادگی :			

## تقدیم اثر

ماحصل آموختہ ہایم را تقدیم می‌کنم بہ ذات اقدسش، خدایی کہ آفرید جہان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را و آموخت مراتبایا موزم،

و بہ کسانی کہ عشقشان را در وجودم دمید. خانوادہ عزیزم، مہربان فرشتگانی کہ محظیات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربہ ہای یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آہناست و ہرچہ بگو شم قطرہ ای از دریای بیکران مہربانیشان را پاس نتوانم گفت.

## شکر و قدردانی

به امید آن روز که در آغاز هر کاری ایمان بیاوریم که اگر علم را بیا یاد او بیاموزیم، دوست را بیا یاد او دوست بداریم، هر سز و وجود خود را بیا یاد او متجلی سازیم، و بالاخره بیا یاد او زندگی کنیم،

آنوقت است که دل آرام می‌گیرد، انسان خدایی می‌شود که می‌تواند خلق کند، می‌تواند هر در بسته‌ای را بگشاید و هر چه ناممکن است را ممکن سازد:

زیرا اوست که می‌گوید برای آن کس که ایمان دارد، ناممکن وجود ندارد.

حال که تلاش دو ساله ام را در تحقیق و نگارش این پایان نامه به پایان رسانده‌ام، جادار و مراتب سپاس خود را از حمایت‌های جناب آقای دکتر شاهرخ قریبیک تقدیم کنم. همچنین از سرکار خانم دکتر زیبا قیسی حق و جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلویی که این تلاش کوچک را به داوری نشستند، سپاسگزارم. از مساعدت‌های بی‌دریغ مسئولین محترم آزمایشگاه جناب آقای مهندس ساگری، مهندس محمد ابراهیم حسین پور، خانم عبداللہی، خصوصاً مسئول محترم آزمایشگاه زراعت و بیوتکنولوژی جناب آقای مهندس حسین مطهری نژاد به خاطر همکاری‌هایشان قدردانی می‌نمایم. از همدلی و همراهی تمامی دوستان خوبم، خصوصاً سرکار خانم آناهیتا سحبی که حضورشان در ابتدای راه مایه دلگرمی بود، سپاسگزارم.

اشعار قدیم - پائیز ۱۳۹۴

## تعهدنامه

اینجانب اشعارقدیم دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه "شناسایی و همسانه سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز ( $\Delta 6$  Desaturase) جهت تولید اسیدچرب غیراشباع استئاریدونیک اسید" تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک "متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام گردیده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه شاهرود» و یا «University of Shahrood» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند، در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت گردیده است.

امضاء دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

گرایش به استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع در زمینه‌های گوناگون، به همراه اهمیت آن‌ها در سلامتی، باعث جستجوی منابع دیگر تامین این اسیدهای چرب مانند منابع میکروبی و گیاهی گردیده است. در این تحقیق با هدف همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، پس از استخراج RNA و سنتز cDNA از قارچ *Mortierella alpina*، این ژن توسط آغازگرهای اختصاصی حاوی توالی کوزاک تکثیر گردید. قطعه تکثیر شده در ناقل همسانه‌سازی pBluescript KS(+) حاوی پروموتور ناپین همسانه‌سازی و پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E.coli* سویه DH5 $\alpha$  ترانسفورم شد. پس از تأیید صحت همسانه‌سازی با استفاده از تکنیک PCR توسط آغازگرهای اختصاصی، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی (*HindIII-SacI*) و توالی‌یابی، قطعه حاوی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل دوگانه pBI121 الحاق و توسط روش ذوب و انجماد به آگروباکتریوم تومیفسینس سویه LBA4404 منتقل شد. بر اساس نتایج توالی‌یابی نوکلئوتیدی، توالی کدکننده این ژن مشتمل بر ۱۳۷۴ نوکلئوتید کدکننده ۴۵۷ اسید آمینه می‌باشد. آنالیز توالی آمینواسیدی، وجود دومین‌های سیتوکروم b5 حامل موتیف (HPGG)، دو دومین گذرنده از غشاء و سه موتیف هیستیدین باکس را تأیید نمود. خواص پروتئینی، ساختار دوم و شکل فضایی توالی پروتئینی مطابق با گزارش‌های متناظر از این گونه قارچی تشخیص داده شد. سازه ژنی حاصل با استفاده از روش مبتنی بر آگروباکتریوم و ریزنمونه‌های برگ، به گیاه توتون انتقال، و گیاهان باززا شده و تراریخته احتمالی در محیط انتقال حاوی ۱۰۰ mg/l کانامایسین گزینش شدند. حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ژنوم گیاهان با استفاده از PCR تأیید، استخراج RNA و سنتز cDNA از برگ گیاهان توتون تراریخته انجام شد. عدم بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز در بافت برگ، عملکرد صحیح پروموتور اختصاصی بذر ناپین و عدم بیان آن در بافت‌های غیراختصاصی را تأیید نمود.

**کلمات کلیدی:** همسانه‌سازی، ژن دلتا ۶ دسچوراز، اسیدهای چرب غیراشباع، *Mortierella alpina*

## لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

تخلیص و همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز از قارچ *Mortierella alpina* جهت تولید اسیدچرب غیراشباع استئاریدونیک اسید در گیاهان.

اولین همایش بین المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

عصمت اشعارقدیم، شاهرخ قرنچیک. ۳-۵ خرداد ۱۳۹۴، دانشگاه شهید بهشتی تهران.



۱- فصل اول.....	۱
۱- اسیدهای چرب .....	۲
۱-۱- اسیدهای چرب اشباع شده (SFA).....	۳
۲-۱- اسیدهای چرب غیراشباع (USFA).....	۳
۱-۲-۱- اسیدهای چرب تک غیراشباعی (MUFA).....	۴
۲-۲-۱- اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA).....	۴
۳-۱- گروه بندی اسیدهای چرب بر اساس موقعیت پیوند دوگانه.....	۴
۱-۳-۱- اسیدهای چرب امگا ۹ (n-9).....	۴
۲-۳-۱- اسیدهای چرب امگا ۶ (n-6).....	۵
۳-۳-۱- اسیدهای چرب امگا ۳ (n-3).....	۶
۴-۱- ارزش تغذیه ای اسیدهای چرب.....	۷
۵-۱- اهمیت تعادل بین اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶.....	۸
۶-۱- منابع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع و جایگزین آن ها.....	۱۰
۷-۱- روغن تک یاخته (SCO).....	۱۱
۱-۷-۱- مزایا و معایب SCO.....	۱۲

- ۸-۱- اسیدهای چرب غیراشباع در گیاهان ..... ۱۳
- ۱-۸-۱- کاربرد روغن‌های تولیدی از گیاهان ..... ۱۵
- ۹-۱- بیوسنتز اسیدهای چرب ..... ۱۵
- ۱-۹-۱- بیوسنتز اسیدهای چرب در گیاهان ..... ۱۶
- ۱۰-۱- آنزیم‌های غیراشباع‌کننده و طویل‌کننده اسیدهای چرب ..... ۲۰
- ۱-۱۰-۱- آنزیم‌های دسچوراز ..... ۲۰
- ۲-۱۰-۱- آنزیم‌های الانگاز ..... ۲۲
- ۱-۱۱- آنزیم‌های دسچوراز، محدودکننده سنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر ..... ۲۲
- ۱-۱۲- گیاهان تراریخته با قابلیت تولید گامالینولیک و استئاریوونیک‌اسید ..... ۲۳
- ۱-۱۳- معرفی قارچ *Mortierella alpina* ..... ۲۳
- ۱-۱۳-۱- سابقه تحقیقاتی بر روی قارچ *Mortierella alpina* ..... ۲۴
- ۱-۱۴- همسانه‌سازی ژن ..... ۲۵
- ۱-۱۴-۱- ناقل‌های ژنتیکی ..... ۲۶
- ۲-۱۴-۱- آنزیم‌های برشی ..... ۲۷
- ۳-۱۴-۱- خالص‌سازی mRNA جهت همسانه‌سازی cDNA ..... ۲۸
- ۱-۱۵- پروموتور ..... ۲۹
- ۱-۱۶- الزام الحاق پروموتورها در بیان گیاهی .. ۳۰
- ۱-۱۶-۱- پروموتورهای اختصاصی نسبت به بافت ..... ۳۰

- ۱۷-۱- توالی کوزاک ..... ۳۱
- ۱۸-۱- سیستم‌های انتقال ژن در گیاهان ..... ۳۱
- ۱-۱۸-۱- تولید گیاهان تراریخته ..... ۳۳
- ۱۹-۱- پذیرش عمومی محصولات تراریخته حاوی اسیدهای چرب بلندزنجیر امگا ۳ ..... ۳۴
- ۲- مهندسی متابولیک اسیدهای چرب بلندزنجیر ..... ۳۸
- ۱-۲- اثر پروموتور بر روی میزان سنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر ..... ۴۱
- ۲-۲- اثر میزان بر روی درصد اسیدهای چرب تولیدی ..... ۴۲
- ۳-۲- اثر بیان هم‌زمان ژن‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب بر روی میزان بیان ..... ۴۵
- ۴-۲- خالص‌سازی و بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز ..... ۴۶
- ۳- مواد ..... ۵۰
- ۱-۳- مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها ..... ۵۰
- ۲-۳- تجهیزات مورد استفاده ..... ۵۰
- روش‌ها ..... ۵۱
- ۳-۳- تهیه و نگهداری میکروارگانیسم‌ها ..... ۵۱
- ۴-۳- استخراج DNA ..... ۵۲
- ۱-۴-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی ..... ۵۳
- ۲-۴-۳- استفاده از RNase جهت حذف RNA ..... ۵۴

- ۵۵..... ۵-۳- انجام واکنش PCR
- ۵۶..... ۱-۵-۳- شرایط بهینه انجام واکنش PCR
- ۵۶..... ۶-۳- استخراج RNA کل از قارچ
- ۵۷..... ۱-۶-۳- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی
- ۵۸..... ۲-۶-۳- افزودن DNase
- ۵۸..... ۷-۳- سنتز cDNA
- ۵۸..... ۱-۷-۳- بررسی صحت سنتز cDNA
- ۵۹..... ۸-۳- انجام واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز
- ۶۰..... ۱-۸-۳- الکتروفورز محصول PCR
- ۶۱..... ۹-۳- استخراج از ژل محصول PCR توسط Gel Recovery Kit
- ۶۱..... ۱-۹-۳- اجزاء تشکیل دهنده کیت
- ۶۱..... ۲-۹-۳- روش کار
- ۶۲..... ۱۰-۳- استخراج پلاسمید
- ۶۳..... ۱-۱۰-۳- کشت باکتری
- ۶۴..... ۲-۱۰-۳- کشت مایع باکتری جهت استخراج پلاسمید
- ۶۶..... ۳-۱۰-۳- الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید
- ۶۶..... ۱۱-۳- هضم آنزیمی پلاسمید و ژن دلتا ۶ دسچوراز جهت همسانه‌سازی
- ۶۷..... ۱۲-۳- اتصال

- ۳-۱۳- تهیه سلول‌های مستعد ..... ۶۷
- ۳-۱۴- انتقال پلاسمید نو ترکیب به میزبان باکتریایی ..... ۶۸
- ۳-۱۵- غربال‌گری کلونی‌های به دست آمده ..... ۶۹
- ۳-۱۵-۱- Colony- PCR ..... ۶۹
- ۳-۱۵-۲- هضم آنزیمی ..... ۶۹
- ۳-۱۶- تعیین توالی ..... ۷۰
- ۳-۱۶-۱- بلاست توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ..... ۷۰
- ۳-۱۶-۲- شناسایی دومین‌های احتمالی با استفاده از توالی پروتئینی ..... ۷۰
- ۳-۱۶-۳- بررسی ساختار ثانویه پروتئین توسط Psipred ..... ۷۱
- ۳-۱۶-۴- پیش‌بینی هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور TMHMM ..... ۷۱
- ۳-۱۶-۵- تعیین میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی توالی آمینواسیدی توسط سایت Expasy ..... ۷۱
- ۳-۱۶-۶- تعیین نقشه پپتیدی پروتئین ..... ۷۱
- ۳-۱۶-۷- هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی با استفاده از Clustalw ..... ۷۲
- ۳-۱۶-۸- رسم درختچه فیلوژنتیکی ..... ۷۲
- ۳-۱۶-۹- تعیین خواص بیوشیمیایی پروتئین توسط سرور Protparam ..... ۷۲
- ۳-۱۷- هم‌سازسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین ..... ۷۲
- ۳-۱۷-۱- غربالگری کلونی‌های به دست آمده توسط آزمون Clony- PCR ..... ۷۳

- ۳-۱۷-۲- هضم آنزیمی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز..... ۷۴
- ۳-۱۸-۱- همسانه‌سازی قطعه حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین در ناقل دوگانه..... ۷۴
- ۳-۱۸-۱- هضم آنزیمی پلاسمیدهای pBI121 و pKS- Napin- D6 Desaturase..... ۷۵
- ۳-۱۸-۲- خالص‌سازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، اتصال و ترانسفورماسیون باکتری..... ۷۵
- ۳-۱۹-۱- انتقال سازه نو ترکیب به آگروباکتریوم..... ۷۶
- ۳-۱۹-۱- تهیه سلول‌های مستعد آگروباکتریوم..... ۷۶
- ۳-۱۹-۲- ترانسفورماسیون..... ۷۷
- ۳-۲۰-۲- انتقال ژن و کشت بافت گیاهی..... ۷۷
- ۳-۲۰-۱- تهیه محلول مادر عناصر پرمصرف، کم‌مصرف، آهن و ویتامین..... ۷۷
- ۳-۲۰-۲- محیط MS حاوی هورمون‌های مورد استفاده..... ۷۸
- ۳-۲۰-۳- آماده‌سازی مواد گیاهی..... ۷۹
- ۳-۲۰-۴- بررسی مولکولی گیاهان تراریخته..... ۸۱
- ۴- نتایج..... ۸۳
- ۴-۱- نتایج حاصل از کشت قارچ *Mortierella alpina*..... ۸۴
- ۴-۲- بررسی کمیت DNA توسط اسپکتروفوتومتری..... ۸۴
- ۴-۳- بررسی کیفیت DNA توسط الکتروفورز..... ۸۴
- ۴-۴- بررسی کمیت RNA توسط روش اسپکتروفوتومتری..... ۸۵
- ۴-۵- بررسی کیفیت RNA توسط الکتروفورز..... ۸۵

- ۶-۴- تکثیر طول کامل ژن دلتا ۶ دسچوراز، با استفاده از cDNA سنتز شده ..... ۸۶
- ۷-۴- همسانه‌سازی قطعه حاصل از PCR در ناقل pSK ..... ۸۷
- ۱-۷-۴- تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pSK از طریق کلونی PCR ..... ۸۸
- ۲-۷-۴- نتیجه هضم آنزیمی ناقل pSK توسط آنزیم‌های برشی *SacI* و *XbaI* ..... ۸۸
- ۸-۴- همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پرموتور ناپین ..... ۸۹
- ۱-۸-۴- تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پرموتور ناپین ..... ۹۰
- ۲-۸-۴- هضم آنزیمی ..... ۹۰
- ۹-۴- نتایج همسانه‌سازی سازه پرموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل بیانی ..... ۹۱
- ۱-۹-۴- کلونی PCR و هضم آنزیمی ..... ۹۱
- ۱۰-۴- نتایج حاصل از انتقال آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی در گیاه توتون ..... ۹۳
- ۱-۱۰-۴- نتایج حاصل از انتقال و باززایی گیاه توتون ..... ۹۳
- ۲-۱۰-۴- تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آزمون PCR ..... ۹۴
- ۱۱-۴- آنالیز بیوانفورماتیکی ژن همسانه‌سازی شده دلتا ۶ دسچوراز ..... ۹۵
- ۱۲-۴- بلاست توالی نوکلئوتیدی ..... ۹۵
- ۱۳-۴- ترجمه توالی نوکلئوتیدی به پروتئین و بلاست ..... ۹۶
- ۱-۱۳-۴- بلاست توالی پروتئینی ..... ۹۸
- ۲-۱۳-۴- بررسی دومین‌های احتمالی توسط سرور Interpro و CDD ..... ۹۹

- ۱۴-۴- پیش‌بینی هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور TMHMM..... ۱۰۳
- ۱۵-۴- تعیین میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی توالی آمینواسیدی توسط سایت Expasy..... ۱۰۴
- ۱۶-۴- تعیین نقشه پپتیدی پروتئین..... ۱۰۵
- ۱۷-۴- هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی با استفاده از Clustalw..... ۱۰۵
- ۱۸-۴- رسم درختچه فیلوژنتیکی..... ۱۰۷
- ۱۹-۴- تعیین خواص بیوشیمیایی پروتئین توسط سرور Protparam..... ۱۰۸
- ۲۰-۴- بحث..... ۱۱۲



- شکل ۱-۱: نامگذاری اسیدهای چرب بر حسب انتهای متیلی و کربوکسیلی ..... ۲
- شکل ۲-۱: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۹ ..... ۵
- شکل ۳-۱: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۶ ..... ۵
- شکل ۴-۱: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۳ ..... ۶
- شکل ۵-۱: مسیر هوازی بیوسنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر ..... ۱۹
- شکل ۱-۳: نقشه پلاسمید pBluescriptSK(+). ..... ۶۲
- شکل ۲-۳: نقشه پلاسمید pBI121 ..... ۶۳
- شکل ۳-۳: تصویر شماتیک ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین ..... ۷۳
- شکل ۴-۳: تصویر شماتیک ناقل بیانی pBI121 ..... ۷۵
- شکل ۵-۳: تصویر شماتیک ناقل بیانی pBI121 به همراه الحاق پروموتور و ژن دلتا ۶ دسچوراز. ۷۵
- شکل ۱-۴: کشت مایع قارچ *M. alpina* ..... ۸۴
- شکل ۲-۴: محصول استخراج DNA قارچ *M. alpina* ..... ۸۵
- شکل ۳-۴: الگوی الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده از قارچ *M. alpina* ..... ۸۶
- شکل ۴-۴: محصول PCR ژن دلتا ۶ دسچوراز با استفاده از واکنش RT-PCR ..... ۸۷
- شکل ۵-۴: کلونی‌های حاوی ژن دلتا ۶ در ناقل pSK بر روی محیط AIX ..... ۸۷
- شکل ۶-۴: تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pSK توسط کلونی PCR ..... ۸۸
- شکل ۷-۴: نتایج حاصل از هضم آنزیمی pSK نو ترکیب ..... ۸۹
- شکل ۸-۴: رشد کلونی‌های نو ترکیب حاوی سازه ژنی pKS- napin- Delta 6 Desaturase ..... ۸۹

- شکل ۹-۴: محصول PCR آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز. ۸۹.....
- شکل ۱۰-۴: محصول کلونی PCR ژن دلتا ۶ دسچوراز توسط آغازگرهای اختصاصی. ۹۰.....
- شکل ۱۱-۴: محصول هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن دلتا ۶ و پروموتور ناپین. ۹۱.....
- شکل ۱۲-۴: محصول کلونی PCR توسط پرایمر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز. ۹۲.....
- شکل ۱۳-۴: محصول PCR آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز. ۹۲.....
- شکل ۱۴-۴: محصول هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 حاوی پروموتور ناپین و دلتا ۶ دسچوراز. ۹۲.....
- شکل ۱۵-۴: مراحل انتقال ژن و باززایی مستقیم گیاه توتون. ۹۳.....
- شکل ۱۶-۴: گیاه توتون تراریخت در محیط ریشه‌زایی بدون هورمون. ۹۴.....
- شکل ۱۷-۴: محصول PCR گیاهان توتون تراریخته با استفاده از پرایمر داخلی. ۹۴.....
- شکل ۱۸-۴: نتیجه الکتروفورز محصول PCR حاصل از cDNA گیاهان ترانسفورم شده. ۹۵.....
- شکل ۱۹-۴: ترجمه توالی نوکلئوتیدی به پروتئین توسط سایت [expasy/tools/translator](http://expasy/tools/translator). ۹۸.....
- شکل ۲۰-۴: دومین‌های شناسایی شده توسط سرور Interpro. ۹۹.....
- شکل ۲۱-۴: دومین‌های شناسایی شده توسط پایگاه CDD. ۱۰۰.....
- شکل ۲۲-۴: نتایج حاصل از بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی با استفاده از سرور Psipred. ۱۰۱.....
- شکل ۲۳-۴: تعیین ساختارهای دوم توالی پروتئینی توسط سایت Psipred. ۱۰۱.....
- شکل ۲۴-۴: تعیین نقشه هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور Psipred. ۱۰۲.....
- شکل ۲۵-۴: بررسی ساختار دوم پروتئین توسط سرور Predict Protein. ۱۰۳.....
- شکل ۲۶-۴: بررسی ساختار دوم پروتئین و تعیین مناطق ترانس‌ممبران توسط TMHMM. ۱۰۴.....
- شکل ۲۷-۴: نمودار هیدروپاتی ژن دلتا ۶ دسچوراز توسط نرم‌افزار TopPred. ۱۰۴.....
- شکل ۲۸-۴: تعیین نقشه پپتیدی با استفاده از Peptidmass. ۱۰۵.....
- شکل ۲۹-۴: نمایش تغییرات آمینواسیدی با استفاده از نرم‌افزار Clustal W. ۱۰۶.....

شکل ۳۰-۴: رسم درختچه فیلوژنتیکی ..... ۱۰۷

جدول ۱-۱: اسیدهای چرب امگا ۹.....	۵.....
جدول ۲-۱: اسیدهای چرب امگا ۶.....	۶.....
جدول ۳-۱: اسیدهای چرب امگا ۳.....	۷.....
جدول ۴-۱: ترکیب اسیدهای چرب در برخی گیاهان دانه روغنی مهم.....	۱۴.....
جدول ۱-۳: آغازگرهای داخلی طراحی شده جهت ژن دلتا ۶ دسچوراز.....	۵۵.....
جدول ۲-۳: غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR.....	۵۶.....
جدول ۳-۳: پروفایل دمایی مورد استفاده در واکنش PCR.....	۵۶.....
جدول ۴-۳: توالی آغازگرهای عمومی اکتین.....	۵۹.....
جدول ۵-۳: توالی ژن دلتا ۶ دسچوراز قارچ <i>M. alpina</i> .....	۶۰.....
جدول ۶-۳: توالی آغازگرهای ژن دلتا ۶ دسچوراز به همراه توالی کوزاک و سایت‌های برشی.....	۶۰.....
جدول ۷-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ میلی لیتر محلول I استخراج پلاسمید.....	۶۵.....
جدول ۸-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱ میلی لیتر از محلول II جهت استخراج پلاسمید.....	۶۵.....
جدول ۹-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از محلول III جهت استخراج پلاسمید.....	۶۵.....
جدول ۱۰-۳: مقادیر مورد نیاز جهت هضم آنزیمی پلاسمید و قطعه ژن مورد نظر.....	۶۶.....
جدول ۱۱-۳: مقدار و مواد مورد نیاز جهت اتصال دو قطعه توسط آنزیم T4 DNA ligase.....	۶۷.....
جدول ۱۲-۳: آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز.....	۷۳.....
جدول ۱۳-۳: جدول ترکیبات محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS).....	۷۸.....
جدول ۱۴-۳: محیط کشت‌های مورد استفاده جهت انتقال ژن به توتون.....	۸۱.....
جدول ۱-۴: بلاست نوکلئوتیدی قطعه همسانه‌سازی شده با دیگر ژن‌های دلتا ۶ دسچوراز.....	۹۶.....

جدول ۲-۴: نتیجه بلاست توالی پروتئینی ..... ۹۹

جدول ۳-۴: تعیین موقعیت مناطق درون غشائی، خارج غشائی و بین غشائی ..... ۱۰۴



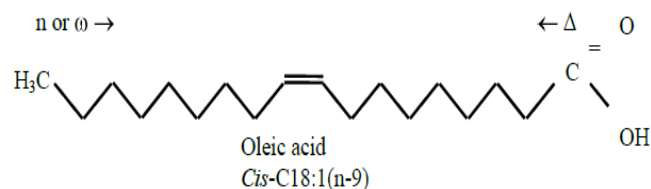
# فصل اول

## مقدمه و کلیات

## ۱- اسیدهای چرب

بدن انسان برای برطرف کردن نیازهای خود، به مواد غذایی از جمله اسیدهای چرب و پروتئین نیازمند است. اسیدهای چرب از اجزاء تشکیل دهنده چربی‌ها هستند، که بدن قادر به تولید برخی از انواع ضروری آن نیست و باید از طریق مواد غذایی تأمین گردد. ۹۹٪ روغن‌ها و چربی‌های خوراکی از تری‌گلیسیریدها تشکیل گردیده‌اند (Sikorski and Kolakowska., 2003).

گروه بندی اسیدهای چرب می‌توانند بر اساس تعداد پیوندهای دوگانه آن‌ها باشد. اسیدهای چرب اشباع<sup>۱</sup> (SFA) فاقد پیوند دوگانه می‌باشند، در حالی که اسیدهای چرب تک‌غیراشباعی<sup>۲</sup> (MUFA) یک پیوند دوگانه و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه<sup>۳</sup> (PUFA) دو یا چند پیوند دوگانه دارند. موقعیت پیوند دوگانه می‌تواند در طول زنجیره کربنی تغییر کند. زمانی که شماره‌گذاری از گروه کربوکسیل انتهایی (COOH) زنجیره باشد، اصطلاح  $\Delta^x$  یا  $n-x$  و زمانی که شماره‌گذاری از سمت متیل انتهایی (CH<sub>3</sub>) باشد، اصطلاح  $\omega^x$  بکار برده می‌شود. بنابراین امگا ۹ به این معنی است که پیوند دوگانه در موقعیت کربن نهم متیل انتهایی قرار دارد. به‌عنوان مثال ساختار اولئیک‌اسید در شکل ۱-۱ نمایش داده شده است (EFSA, N. 2010).



شکل ۱-۱: نام‌گذاری اسیدهای چرب برحسب انتهای متیلی و کربوکسیلی (EFSA, N. 2010).

- 1 - Saturated fatty acid
- 2- Monounsaturated Fatty Acids
- 3 - Polyunsaturated Fatty Acids
- 4 - Delta
- 5 - Omega



## ۱-۱- اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)

از نظر شیمیایی چربی‌های اشباع متشکل از زنجیره‌ای از اتم‌های کربن می‌باشند که از طریق پیوندهای یگانه به هم متصل شده‌اند. در واقع، در این حالت حداکثر تعداد اتم‌های هیدروژن به اتم‌های کربن متصل می‌باشند. این اسیدهای چرب ساختارهایی با زنجیره مستقیم و عموماً از دسته اسیداستیک<sup>۱</sup> می‌باشند. تعداد اتم کربن این اسیدهای چرب بین ۲۰-۴ می‌باشد و بسته به تعداد اتم کربن به اسیدهای چرب اشباع کوتاه‌زنجیر<sup>۲</sup> (SCFA) با تعداد اتم کربن کمتر از ۶، اسیدهای چرب با طول متوسط<sup>۳</sup> (MCFA) با تعداد اتم کربن بین ۱۰-۶، و اسیدهای چرب بلندزنجیر با تعداد اتم کربن بین ۱۸-۱۲ تقسیم می‌گردند. البته این تقسیم‌بندی مطلق نبوده و به‌عنوان مثال لوریک‌اسید با ۱۲ اتم کربن، گاهی در گروه MCFA قرار می‌گیرد. اسیدهای چرب SFA اصلی عبارتند از اسیدلوریک<sup>۴</sup> (12:0)، اسیدمریستیک<sup>۵</sup> (14:0)، اسیدپالمیتیک<sup>۶</sup> (16:0)، و اسیداستئاریک<sup>۷</sup> (18:0). بدن انسان قادر به سنتز این اسیدهای چرب - هرچند به مقدار کم- می‌باشد (EFSA, N. 2010).

## ۱-۲- اسیدهای چرب غیراشباع (USFA)

در صورتی که در یک اسیدچرب، پیوند دوگانه کربن-کربن (C=C) در طول زنجیره کربنی وجود داشته باشد، اسیدچرب غیراشباع نامیده می‌شود. دلیل نامگذاری این اسیدهای چرب به دلیل امکان افزودن اتم‌های هیدروژن بیشتر، از لحاظ شیمیایی می‌باشد. اسیدهای چرب غیراشباع دمای ذوب پائین‌تری نسبت به چربی‌های اشباع داشته و در نتیجه معمولاً مایعند. این اسیدهای چرب بر حسب تعداد پیوندهای دوگانه به انواع تک غیراشباعی و غیراشباع چندگانه تقسیم می‌گردند.

- 
- 1 - Acetic acid
  - 2 - Short chain saturated fatty acids
  - 3 - Long chain saturated fatty acids
  - 4 - Lauric acid
  - 5 - Myristic acid
  - 6 - Palmitic acid
  - 7 - Stearic acid

### ۱-۲-۱- اسیدهای چرب تک غیراشباعی (MUFA)

این اسیدهای چرب از زنجیره‌ای از اتم‌های کربن، با یک پیوند دوگانه تشکیل گردیده‌اند. مهمترین اسید چرب این گروه در رژیم غذایی اسید اولئیک<sup>۱</sup> (18:1, n-9) با یک پیوند دوگانه در موقعیت n-9 می‌باشد. بدن قادر به سنتز این اسیدهای چرب می‌باشد و بنابراین وجود آن‌ها در رژیم غذایی ضروری نیست (EFSA, N. 2010).

### ۱-۲-۲- اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA)

این اسیدهای چرب در زنجیره کربنی خود ۶-۲ پیوند دوگانه دارند. انسان فاقد آنزیم‌های دلتا ۱۲ و دلتا ۱۵ که پیوندهای دوگانه را به ترتیب در موقعیت‌های n-6 و n-3 ایجاد می‌کنند می‌باشد. بنابراین دو اسید چرب آلفا لینولنیک اسید (18:3, n-3) از گروه امگا ۳، و لینولئیک اسید (18:2, n-6) از اسیدهای چرب امگا ۶، جزء اسیدهای چرب ضروری بوده و باید در رژیم غذایی وجود داشته باشند. PUFA با تعداد ۲۰ اتم کربن و بیشتر در گروه LC-PUFA<sup>۲</sup> قرار می‌گیرند. PUFA و LC-PUFA های ضروری نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی در موجودات برعهده دارند (EFSA, N. 2010).

### ۱-۳-۱- گروه بندی اسیدهای چرب بر اساس موقعیت پیوند دوگانه

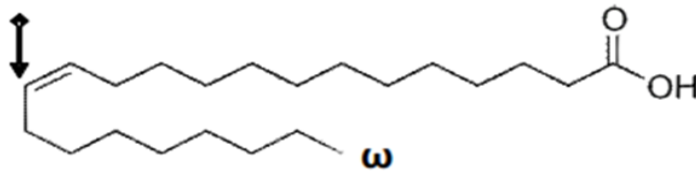
در تقسیم بندی دیگر، اسیدهای چرب بر اساس موقعیت اولین پیوند دوگانه به سه گروه تقسیم می‌گردند:

#### ۱-۳-۱-۱- اسیدهای چرب امگا ۹ (n-9)

اسیدهای چرب امگا ۹ یک پیوند دوگانه کربن- کربن در موقعیت نهم از آخرین متیل زنجیره دارند (شکل ۱-۲).

---

1 - Oleic acid  
2 - Long chain poly unsaturated acids



شکل ۱-۲: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۹، اروسیک اسید با اولین پیوند دوگانه در موقعیت بین کربن-های ۹-۱۰ از سمت متیل انتهایی (Nisha.A 2009)

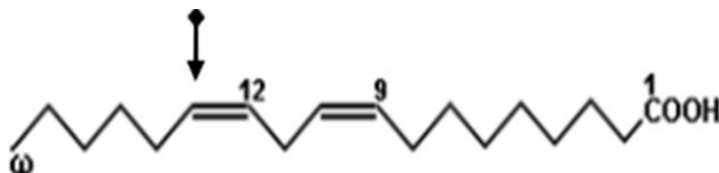
گروهی از این اسیدهای چرب، ترکیب عمومی چربی حیوانات و روغن سبزیجات می باشند. دو اسید چرب امگا ۹ مهم در صنعت اولئیک اسید (18:1) و اروسیک اسید<sup>۱</sup> (22:1) می باشد. اولئیک اسید یک ترکیب مهم از روغن زیتون و دیگر چربی های تک غیراشباعی است (Nisha.A 2009).

جدول ۱-۱: اسیدهای چرب امگا ۹

اسید چرب	پیوند دوگانه	نام شیمیایی
Oleic acid	18:1	9- octadecenoic acid
Eicosenoic acid	20:1	11- eicosenoic acid
Mead acid	20:3	5,8,11- eicosatrienoic acid
Erucic acid	22:1	13- docosenoic acid
Nervonic acid	24:1	15- tetracosenoic acid

### ۱-۳-۲- اسیدهای چرب امگا ۶ (n-6)

اسیدهای چرب امگا ۶ یک پیوند دوگانه کربن- کربن در موقعیت ششم از آخرین متیل زنجیره دارند (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۶، لینولئیک اسید با موقعیت قرارگیری اولین پیوند دوگانه بین کربن های ۶-۷ از سمت متیل انتهایی (Nisha.A 2009)

1- Erucic acid

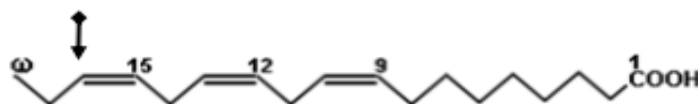
اسیدهای چرب عمده این گروه شامل لینولئیک اسید<sup>۱</sup> (LA 18:2 Δ9,12)، گامالینولئیک اسید<sup>۲</sup> (GLA 18:3 Δ6,9,12)، دی گامالینولئیک اسید<sup>۳</sup> (DGLA 20:3 Δ8,11,14) و آراشیدونیک-اسید<sup>۴</sup> (ARA 20:4 Δ5,8,11,14) می باشند (جدول ۱-۲). منابع عمده اسیدهای چرب امگا ۶ تخم مرغ، ماکیان، سبزیجات، غلات، مغزها، روغن ذرت، آفتابگردان و سویا است. دانه گیاهانی مانند کشمش سیاه، کتان، کدوتنبل و آووکادو شامل مقادیر زیادی از این اسیدهای چرب می باشند (Nisha., 2009).

جدول ۱-۲: اسیدهای چرب امگا ۶

اسید چرب	پیوند دوگانه	نام شیمیایی
Linoleic acid	18:2	9,12- octadecadienoic acid
Gamma- linoleic acid	18:3	6,9,12- octadecatrienoic acid
Eicosadienoic acid	20:2	11,14- eicosadienoic acid
Dihomo gamma- linolenic acid	20:3	8,11,14- eicosatrienoic acid
Arachidonic acid	20:4	5,8,11,14- eicosatetraenoic acid
Docosadienoic acid	22:2	13,16- docosadienoic acid
Adrenic acid	22:4	7,10,13,16- docosatetraenoic acid
Docosapentaenoic acid	22:5	4,7,10,13,16- docosapentaenoic acid

### ۱-۳-۳- اسیدهای چرب امگا ۳ (n-3)

اسیدهای چرب امگا ۳ یک پیوند دوگانه کربن- کربن در موقعیت سوم از آخرین متیل زنجیره دارند (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴: ساختار کلی اسیدهای چرب امگا ۳، آلفالینولئیک اسید با موقعیت قرارگیری اولین پیوند دوگانه بین کربنهای ۳-۴ از سمت متیل انتهایی (Nisha.A 2009)

- 1- Linoleic acid
- 2- gamma-Linolenic acid
- 3 - Dihomo-gamma-linolenic acid
- 4- Arachidonic acid

مهمترین اسیدهای چرب این گروه شامل آلفالینولنیک اسید<sup>۱</sup> (ALA 18:3 Δ9,12,15)، اکزاینونوئیک اسید<sup>۲</sup> (EPA 20:3)، دکزاینونوئیک اسید<sup>۳</sup> (DPA 22:5 Δ4,7,10,13,16)، دکزاهگزانوئیک اسید<sup>۴</sup> (DHA 22:6 Δ4,7,10,13,16,19) می باشد. منبع عمده اسیدهای چرب امگا ۳، ماهی، تخم مرغ، سبزیجات روغنی، سبزیجات برگ سبز مانند اسفناج و خرفه، دانه کتان و بزرک، گردو، زردآلو، شاهدانه و ... می باشد (Nisha.A 2009).

جدول ۱-۳: اسیدهای چرب امگا ۳

اسید چرب	پیوند دوگانه	نام شیمیایی
Hexadecatrienoic acid	16:3	all-cis-7,10,13-hexadecatrienoic acid
α- Linolenic acid	18:3	all-cis-9,12,15- octadecatrienoic acid
Stearidonic acid	18:4	all-cis-6,9,12,15- octadecatetraenoic acid
Eicosatrienoic acid	20:3	all-cis-11,14,17- eicosatrienoic acid
Eicosatetraenoic acid	20:4	all-cis-8,11,14,17- eicosatetraenoic acid
Eicosapentaenoic acid	20:5	all-cis-5,8,11,14,17- eicosapentaenoic acid
Docosapentaenoic acid	22:5	all-cis-7,10,13,16,19- docosapentaenoic acid
Docosahexaenoic acid	22:6	all-cis-4,7,10,13,16,19- docosahexaenoic acid
Tetracosapentaenoic acid	24:5	all-cis-9,12,15,18,21- docosahexaenoic acid
Tetracosahexaenoic acid	24:6	all-cis-6,9,12,15,18,21- tetracosenoic acid

#### ۱-۴- ارزش تغذیه‌ای اسیدهای چرب

امروزه نقش اسیدهای چرب اشباع در گسترش بیماری‌های قلبی- عروقی به اثبات رسیده است. در حالی که اسیدهای چرب غیراشباع، از اجزاء اصلی تشکیل دهنده غشاهای زیستی در موجودات زنده بوده و به همین دلیل خصوصیات ویژه‌ای به آن می‌بخشند. آن‌ها باعث قابلیت انعطاف، سیالیت و نفوذپذیری انتخابی غشاءها می‌گردند (Ward and Singh, 2005). این اسیدهای چرب در انتقال پیام سلولی نقش دارند (Needleman et al., 1986, Sakuradani et al., 1999). همچنین به‌عنوان عوامل بازدارنده بیماری شناخته می‌شوند (Mesa et al., 2004). آن‌ها تاثیر مستقیم زیادی در رویدادهای

- 
- 1- Alpha Lipoic Acid
  - 2 - Eicosapentaenoic acid
  - 3- Docosapentaenoic acid
  - 4 - Docosahexaenoic acid

مولکولی بیان ژن‌ها دارند. اسیدهای چرب غیراشباع، در فعالیت یا فراوانی ۴ گروه از فاکتورهای رونویسی که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب، تری‌گلیسیرید و کلسترول کبد موثر می‌باشند، نقش دارند (Jump, 2002; Clarke et al., 2002; Jump and Clarke 1999). در واقع بسیاری از اثرات پیشگیرانه اسیدهای چرب غیراشباع بر پیشرفت بیماری‌های قلبی-عروقی با تنظیم بیان ژن‌ها در طی مرحله رونویسی و از طریق کنترل غلظت و فعالیت فاکتورهای رونویسی حاصل می‌گردد (Sampath et al., 2004; Clarke 2001).

### ۱-۵- اهمیت تعادل بین اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶

هر دو نوع اسیدچرب امگا ۳ و امگا ۶ جزء اسیدهای چرب ضروری می‌باشند، ولی علی‌رغم ضروری بودن آن‌ها برای حیات و سلامت، انسان خود قادر به سنتز آن‌ها نیست. از سوی دیگر این مواد را نمی‌توان حذف یا با مواد دیگر جایگزین کرد و هر دو بایستی به میزان مناسب و متعادلی در رژیم غذایی وجود داشته باشند. اسیدهای چرب امگا ۶ به وفور در روغن‌های مایع مانند روغن دانه آفتابگردان، روغن ذرت و روغن‌هایی که برای تهیه غذاهای بسته‌بندی شده و آماده استفاده می‌شود، وجود دارد. به همین دلیل میزان مصرف این روغن در عامه مردم بیشتر از حد مطلوب است. حال آنکه اسیدهای چرب امگا ۳ که در ماهی‌ها و مکمل‌های روغن ماهی و به مقدار کمتر در گوشت گاو و ماکیان یافت می‌شود، به مقدار بسیار کمتری از حد مطلوب مصرف می‌گردد. به عبارت دیگر، برای ایجاد شرایط مطلوب جهت انجام اعمال حیاتی بدن، باید نسبت خاص بین این دو اسیدچرب برقرار باشد.

تعادل بین امگا ۶ و امگا ۳ در رژیم غذایی برای هموستازی<sup>۱</sup> پاسخ‌های اینفلاماتوری<sup>۲</sup> (التهابی)، که می‌توانند از ایجاد بیماری MS، دیابت، پوکی استخوان، فشار خون، سرطان، نقرس، آرتریت روماتوئید، آسم، پیری زودرس، سفید شدن مو و ... جلوگیری کند، ضروری است (Pereira et al., 2004). نسبت امگا ۶ به امگا ۳ در رژیم غذایی مدرن تقریباً ۱:۱۵ یا بیشتر است. پژوهشگران اظهار

۱ - ثابت نگه داشتن مواد موجود در محیط داخلی بدن

2 - inflammatory

می‌دارند درحالی‌که نسبت ۲:۱ تا ۴:۱ باعث جلوگیری از چندین بیماری مزمن می‌گردد، سطوح بالای نسبت امگا ۶ به امگا ۳ ممکن است احتمال برخی از بیماری‌ها و افسردگی را افزایش دهد (Okuyama et al., 2007; Hibbeln, 2006). همچنین عدم تعادل بین متابولیسم این اسیدهای چرب منجر به بیماری‌های آرتریت روماتوئید، اختلالات خودایمنی و سرطان می‌گردد (Simopoulos, 1999). این فرضیه نیز مطرح گردیده است که افزایش اسیدهای چرب امگا ۶ به امگا ۳ در رژیم غذایی در افزایش بیماری‌های آسم و دیگر بیماری‌های آلرژیک نقش دارد (Devereux, 2006).

نقش اسیدهای چرب امگا ۳ در رشد و سلامتی و ممانعت از بیماری‌ها، یکی از گسترده‌ترین زمینه‌های تحقیق در علم تغذیه است. این گروه از اسیدهای چرب در ممانعت از ضخیم شدن دیواره عروق در اثر رسوب چربی، بهبود بیماران دیابتی، بهبود بی‌نظمی‌های ضربان قلب و پیشرفت بینایی و ادراک نوزادان نقش فراوانی دارند. این اسیدهای چرب از عناصر ساختاری غشای سلولی و اپیدرم پوست هستند. آن‌ها قادرند فشار خون را کاهش داده و سطح تری‌گلیسرید خون را تنظیم کنند. این گروه نقش فراوانی در سلامت استخوان‌ها و مغز دارند. همچنین به تازگی اثرات ضد سرطانی اسیدهای چرب این گروه، به اثبات رسیده است (Gill and Valivety, 1997).

به‌دنبال مصرف اسیدهای چرب امگا ۳، آن‌ها در غشاهای سلولی تمام بافت‌های بدن وارد می‌شوند. غشاهای سلولی برخی از بافت‌ها (مانند شبکه‌ی، مغز) غنی از این اسیدهای چرب می‌باشند. به‌عنوان مثال، حدود ۳۰٪ از اسیدهای چرب بخش بیرونی غشاء گیرنده‌های نوری شبکه‌ی، اسیدهای چرب امگا ۳ هستند. این حقیقت که این سلول‌ها و سایر سلول‌ها ساختار سلولی خاصی را پیدا کرده‌اند تا ترجیحاً این اجزای اندک موجود در رژیم غذایی را در غشاهای خود به کار برند، بدین معنی است که این اسیدهای چرب در کارکرد صحیح سلول نقش دارند. در حقیقت، بیشتر غشاهای سلولی، اسیدهای-چرب امگا ۳ را بیشتر از نسبت آن‌ها در محتوای رژیم غذایی در خود ذخیره می‌کنند. محتوای این اسیدهای چرب در غشاهای بافتی نشانگر میانگین دریافت روزانه ما است (Surette, M. E. 2008).

کانال‌های یونی، مثال دیگری از پروتئین‌های مرتبط با غشاء هستند که فعالیت آن‌ها توسط اسیدهای چرب امگا ۳ تنظیم می‌گردد. کانال‌های سدیم و کلسیم، به ترتیب جریان‌های وابسته به ولتاژ سدیم و کلسیم را تنظیم می‌نمایند. این جریان‌ها جهت تحریک سلول‌ها و انقباض قلب بسیار حیاتی می‌باشند. اسیدهای چرب امگا ۳ فعالیت شماری از پروتئین‌های کانال‌های یونی قلب را مهار می‌کنند و عنوان شده که این امر تاحدی توجیه‌کننده خصوصیات ضدآریتمی آن‌هاست. اگرچه به نظر می‌رسد که این مکانیسم تنها روش تاثیر اسیدهای چرب امگا ۳ بر روی آریتمی نباشد، چنین مکانیسم‌هایی ممکن است توجیه‌کننده شروع سریع اثرات محافظتی بر روی میزان مرگ بیماری‌های کرونری باشند (Surette, M. E. 2008).

با توجه به این مطالب باید مصرف روغن‌های مایع مانند روغن ذرت مایع کنار گذاشته شده و برای تامین این دو اسید چرب ضروری، به میزان مورد نیاز و نسبت مناسب، به منابع غذایی حاوی میزان بیشتر اسیدهای چرب امگا ۳، روی آورد.

## ۱-۶- منابع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع و جایگزین آن‌ها

در حال حاضر منابع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در رژیم غذایی، ماهی یا کپسول روغن ماهی و دیگر غذاهای دریایی است. اما در مدت زمان طولانی، این منابع به دلیل بهره‌برداری بیش از اندازه از ذخایر، پاسخگوی نیاز رشد جمعیتی نخواهند بود (Meyer et al., 2003). پرورش این ماهی‌ها نیز قادر به جبران این کمبود نیست (Naylor et al., 2000). از طرف دیگر، با توجه به این که ماهی‌ها نیز مانند انسان قادر به ذخیره این اسیدهای چرب توسط رژیم غذایی بوده و خود سنتز کننده این اسیدهای چرب نیستند، صنعت پرورش ماهی مناسب نمی‌باشد (Petrie and Singh, 2011).

همچنین این نگرانی و تردید از مدت‌ها پیش وجود داشته و هنوز هم هست که استفاده از روغن ماهی به عنوان مکمل غذایی بدلیل آلودگی‌های محیطی ایجاد شده توسط انسان، مانند دیوکسین‌ها و فلزات سنگین مانند جیوه که می‌توانند توسط ماهی‌ها جذب گردیده و در کبد و سایر



اندام‌های آن‌ها تجمع یابند، خطر ساز باشد. در حقیقت در بعضی از کشورها مانند ایالات متحده استفاده از روغن ماهی در فرمول غذای نوزادان و جوانان کم‌سال، منع قانونی دارد (Ratledge C., 2005). مجموعه این عوامل سبب جستجوی دیگر منابع امگا ۳ گردیده است که به برخی از آن‌ها اشاره خواهد شد.

## ۱-۷- روغن تک‌یاخته (SCO)

با وجود آنکه تمام ارگانیزم‌های زنده باید حداقل مقداری چربی برای غشاء و دیگر نقش‌های کاربردی تولیدکنند، اما تنها تعداد نسبتاً کمی از میکروارگانیزم‌ها توانایی تجمع چربی بالاتر از ۲۰٪ را در توده سلولی دارند، که این چربی به عنوان ماده ذخیره عمل می‌کند. تجمع چربی در برخی از مخمرها، قارچ‌ها و تعدادی از جلبک‌ها مشاهده شده است. این میکروارگانیزم‌ها، گونه‌های روغنی<sup>۱</sup> و روغن حاصله از آن‌ها، روغن تک‌یاخته (SCO) نامیده می‌شود. چربی موجود در گونه‌های روغنی اغلب به شکل تری‌آسیل‌گلیسرول می‌باشد، که مانند ترکیبات آسیل‌چرب در روغن‌های گیاهی است (Shahidi, 2005).

سیر تجمع چربی در سلول به این صورت است که میکروارگانیزم باید در محیط کشت حاوی مقادیر اضافی سوبسترای کربنی و مقادیر محدود نیتروژن رشد کند. با رشد ارگانیزم به سرعت منبع نیتروژن مصرف شده و با اتمام آن رشد سلول متوقف می‌گردد، اما سوبسترای کربنی به طور مداوم برای سنتز چربی جذب می‌گردد. چربی حاصله تجمع یافته و بخش قابل توجهی از حجم سلول را به خود اختصاص می‌دهد (Shahidi, 2005; Ratledge et al., 2005).

اولین تحقیق جهت تولید روغن تک‌یاخته، با هدف تولید گامالیونولیک‌اسید در کشورهای انگلیس و ژاپن توسط قارچ *Mucor circinelliodes* صورت گرفت. پس از آن مطالعات زیادی برای

---

1 - Single Cell Oil  
2 - Oleaginous Species

تولید اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه مختلف، با هدف تولید کارآمد انجام پذیرفته است. به عنوان مثال آراشیدونیک اسید و دی هموگامالینولنیک اسید توسط قارچ *Mortierella* و دکزاهگزانوئیک اسید و اکزاپنتانوئیک اسید توسط ریزجلبکها و باکتریها تولید گردیده اند (Berkeley, 1996; Kyle, 1996; Cheng, 1999).

### ۱-۷-۱- مزایا و معایب SCO

روغنهای میکروبی نسبت به منابع حیوانی یا گیاهی دارای مزایایی می باشند، از جمله این که کمیت و کیفیت SCO می تواند هر ساله تضمین گردد. این تضمین در مورد روغنهای گیاهی و حیوانی با توجه به اثر هوا، رژیم غذایی (در روغنهای حیوانی) و آلودگی محیطی (علفکشها، آفت-کشها، موادشیمیایی ضد قارچ در محصولات کشاورزی)، در کیفیت روغنهای حاصله غیرممکن است. میکروارگانیزمها نه تنها انواع مختلفی از PUFA را تولید می کنند، بلکه برخی از گونهها مقادیر زیادی از یک اسیدچرب را در چربیهای سلولی ذخیره می کنند، که فرآوری روغن را آسان می سازد. همچنین رشد میکروارگانیزمها در مقایسه با محصولات کشاورزی و منابع حیوانی بسیار سریع است و معمولاً زمان تخمیر ۱۰-۴ روز می باشد، بنابراین SCO می تواند به راحتی با نیاز بازار هماهنگ شود (Branen et al., 2002; Shimada et al., 1998).

اما مهمترین عیب SCO، هزینه بالای تولید آن می باشد، زیرا هزینه سرمایه شامل ساخت فرمنتورهای بزرگ، ماشین آلات مربوطه و همچنین هزینه عملیات زیاد بوده و برای بهره برداری تجارتي از آن، محصول نهایی باید قیمت بالایی داشته باشد (Ratledge et al., 2005). با وجود این که این روش به مدت طولانی ادامه نیافت، اما امکان بهره برداری از منابع میکروبی برای تولید روغن را تأیید کرد (Shahidi, 2005). بنابراین، با توجه به مناسب نبودن جایگزینی تکنولوژی تخمیر برای کشاورزی، فاز بعدی تولید PUFA به سمت استفاده از گیاهان تراریخته<sup>۱</sup> و محصولات حیوانی سوق داده شد و امکان دستکاری ترکیب اسیدهای چرب در بافتهای گیاه مورد توجه قرار گرفته است.

---

1 - Transgenic Plants

## ۸-۱ - اسیدهای چرب غیراشباع در گیاهان

در گیاهان سنتز اسیدهای چرب غیراشباع در پلاستیدها و در خلال یکسری از واکنش‌های تغلیظ شروع گردیده، در شبکه آندوپلاسمی<sup>۱</sup> (ER) ادامه یافته و در نهایت منجر به تجمع این اسیدهای چرب می‌گردد (Kinney, 1994). بیشتر گیاهان عالی، سنتز اسیدهای چرب را به صورت یک زنجیره‌ی بلند ۱۸ کربنه به پایان می‌رسانند، بنابراین تمام اسیدهای چرب کلروپلاستی آن‌ها ۱۶ یا ۱۸ کربنه هستند. به عبارت دیگر در بیشتر گیاهان اسیدچرب اشباع عمده اسیدپالمیتیک و اسیدچرب غیراشباع اصلی نیز شامل اولئیک، لینولئیک و آلفالینولنیک اسید می‌باشد (Hong et al., 2002 Qi et al., 2004).

آلفالینولنیک اسید، اسیدچرب زنجیر کوتاه امگا ۳ معمول در دانه‌های روغنی کتان، سویا و گردو می‌باشد (Petrie and Singh, 2011). استئاریدونیک اسید<sup>۲</sup> (SDA; 18:4 Δ6,9,12,15)، دیگر اسیدچرب غیراشباع زنجیر کوتاه امگا ۳، و گامالینولنیک اسید جزء گروه امگا ۶ عمومیت کمتری در روغن‌های گیاهی دارند. این اسیدهای چرب در گونه‌هایی مانند گل مغربی (*Evening primrose*) - گل - گاوزبان اروپائی (*Borage*)، توت‌سیاه (*Black Currant*) و گونه‌های مختلف جنس *Echium* تولید می‌شود (Garcia Maroto et al., 2002). بنابراین گیاهان می‌توانند در مهندسی متابولیک تولید اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر مورد استفاده قرار گیرند. به عبارتی این گیاهان راه‌حل مناسبی جهت افزایش سطح روغن‌هایی با پایه دریایی ایجاد می‌کنند.

---

1 - Endoplasmic reticulum

2 - Stearidonic acid

جدول ۱-۴: ترکیب اسیدهای چرب در برخی گیاهان دانه روغنی مهم

گیاه	درصد اسیدهای چرب				
	پالمیتیک اسید	استئاریک اسید	اولئیک اسید	لینولئیک اسید	لینولنیک اسید
دانه‌های آراییدوپسیس تالیانا	۹	۴	۱۹	۲۷	۲۰
نارگیل ( <i>Cocos nucifera</i> )	۹	۳	۶	۲	<۱
نخل روغنی ( <i>Elaeis guineensis</i> )	۹	۳	۱۲	۲	<۱
پالم ( <i>Elaeis guineensis</i> )	۴۶	۴	۳۸	۱۰	<۱
زیتون ( <i>Olea europaea</i> )	۱۱	۲	۷۶	۸	۱
کلزا ( <i>Brassica napus</i> )	۴	۲	۵۹	۲۱	۱۰
بادام زمینی ( <i>Arachis hypogea</i> )	۱۰	۲	۴۸	۳۴	<۱
کنجد ( <i>Sesamum spp</i> )	۷	۴	۴۱	۴۳	<۱
ذرت ( <i>Zea mays</i> )	۱۱	۲	۲۵	۶۱	۱
سویا ( <i>Glycine max</i> )	۱۱	۴	۲۴	۵۴	۷
آفتابگردان ( <i>Helianthus annuus</i> )	۷	۳	۲۱	۶۹	<۱
پنبه ( <i>Carthamus tinctorius</i> )	۲۴	۲	۱۸	۵۴	<۱
بذرک ( <i>Linum usitatissimum</i> )	۵	۵	۲۶	۱۸	۴۶
مریم‌گلی ( <i>Salvia hispanica</i> )	۷	۳	۷	۲۱	۶۱

محصولات دانه‌های روغنی با ظرفیت تولیدی و ارزش نسبی پایین، می‌توانند منابع عالی جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر امگا ۳ باشند. برای مثال محاسبات جهت تعیین نیاز مصرف-کنندگان جهانی این روغن‌ها انجام پذیرفته و نیاز روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم جهت تامین سلامتی توصیه گردید. با توجه به این که جمعیت جهانی در سال ۲۰۲۵ به حدود ۸ میلیارد خواهد رسید، و با فرض اینکه ماهی شامل ۳/۵٪ - ۰/۲ اسیدچرب در ۱۰۰ گرم باشد، تخمین زده می‌شود که صید جهانی ماهی کمتر از این مقدار باشد. از طرف دیگر تقریباً ۲/۵ میلیون هکتار از محصولات دانه‌های روغنی (حدود ۲٪ کل مساحت کشت این محصولات) شامل ۱۵-۱۰٪ از دکزاهگزانوئیک‌اسید و

اکزپانتانویک اسید در روغن آنها، می تواند جایگزین روغن ماهی متداول مورد استفاده جهانی گردد (Petrie and Singh, 2011).

### ۱-۸-۱- کاربرد روغن های تولیدی از گیاهان

روغن های تولیدی از گیاهان می توانند کاربردهای زیادی داشته باشند. مثلا به عنوان یکی از اجزاء غذاهای پرورش ماهی، به عنوان غذای حیوانات جهت تولید گوشت های غنی از اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا ۳ و فرآورده های دیگری مانند تخم مرغ، به عنوان مکمل غذایی در نان، گوشت و شیر یا مستقیما به عنوان یک مکمل غذایی، مانند کپسول روغن ماهی از آنها بهره برداری گردد. همچنین منابع دانه های روغنی می توانند برای گیاه خواری نیز استفاده گردیده، و بنابراین بخش عمده ای از بازار جهانی را تامین کنند (Petrie and Singh, 2011).

### ۱-۹- بیوسنتز اسیدهای چرب

بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر در طبیعت به صورت هوازی و غیرهوازی صورت می گیرد. سنتز غیرهوازی این اسیدهای چرب توسط مسیر پلی کتید<sup>۱</sup> (PKS) انجام می گیرد، که چرخه ای با کمپلکس چند آنزیمی تکراری انجام دهنده یکسری فرآیند غیراشباع سازی و طولی سازی<sup>۲</sup> کربنه توسط مالونیل کوآنزیم<sup>۳</sup> A<sup>۲</sup> و استیل کوآنزیم<sup>۳</sup> A<sup>۲</sup> به عنوان منبع کربن است. از سوی دیگر مسیر هوازی شامل یکسری مراحل غیراشباع سازی و طولی سازی مشخص شامل ژن هایی برای هر آنزیم می باشد (Metz et al., 2001; Metz et al., 2006; Metz et al., 2009). در این پایان نامه تمرکز بر روی مهندسی متابولیک گیاهان توسط مسیر هوازی است.

---

1 - Polyketide  
2 - Malonyl-CoA  
3 - Acetyl-CoA

## ۱-۹-۱- بیوسنتز اسیدهای چرب در گیاهان

سنتز اسیدهای چرب در گیاهان در پلاستیدها توسط کمپلکس سنتز اسید چرب<sup>۱</sup> (FAS) کاتالیز می‌گردد. آخرین محصول FAS در گیاهان، ACP<sup>۲</sup> ۱۸:۰ - ۱۶:۰ است. عموماً ACP ۱۸:۰ دستخوش غیراشباع‌سازی توسط استریول ACP دسچوراز قرار گرفته و به ACP  $\Delta^9$  ۱۸:۱ تبدیل می‌گردد (Voelker and Kinney, 2001). در این مرحله اسیل ترانسفراز ممکن است اسیل را از ACP به گلیسرول انتقال داده و منجر به تجمع گلیسرولیپید در پلاستید گردد. اما نیمی از اسیدهای چرب توسط اسیل ACP تیواستراز، از ACP هیدرولیز و به کوآنزیم A برای تشکیل اسیل - کوآنزیم A استری می‌گردند (Ohlrogge and Jaworski, 1997).

تولید هوازی اسیدهای چرب بلندزنجیر در زمینه مهندسی متابولیک گیاهان با اولئیک‌اسید آغاز می‌گردد. این اسید چرب ابتدا توسط دلتا ۱۲ به لینولئیک‌اسید (LA; 18:2 $\Delta$ 9,12) تبدیل می‌گردد، که می‌تواند توسط امگا ۳ دسچوراز به آلفالینولنیک‌اسید (ALA; 18:3 $\Delta$ 9,12,15) تبدیل گردد. لینولئیک‌اسید و آلفالینولنیک‌اسید به ترتیب سوبسترات مسیره‌های امگا ۶ و امگا ۳ اسیدهای چرب بلندزنجیر هستند، که اولین مرحله در هر دو مسیر با یک دلتا ۶ دسچوراز برای تولید گاما-لینولنیک‌اسید (GLA; 18:3 $\Delta$ 6,9,12) که یک اسید چرب امگا ۶ می‌باشد و یا استئاریودونیک‌اسید (SDA; 18:4 $\Delta$ 6,9,12,15) از اسیدهای چرب امگا ۳ آغاز می‌گردد.

سپس اسیدهای چرب ۱۸ کربنه گامالینولنیک‌اسید و استئاریودونیک‌اسید توسط آنزیم الانگاز، به ترتیب برای تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر دی‌گامالینولنیک‌اسید (DGLA; 20:3  $\Delta$ 8,11,14) و اکزاتراونوئیک‌اسید<sup>۳</sup> (ETA; 20:4 $\Delta$  8,11,14,17) به کار می‌رود. محصولات حاصل توسط دلتا ۵ دسچوراز، جهت تولید آراشیدونیک‌اسید (ARA, C20:4  $\Delta$ 5,8,11,14) امگا ۶ و اکزاینونوئیک‌اسید<sup>۴</sup>

---

1 - Fatty acid synthase  
2 - Acyl carrier protein  
3- Eicosatetraenoic acid  
4 - Eicosapentaenoic acid

اراشیدونیک‌اسید معمولا علامت پایان مسیر سنتز امگا ۳، کاربرد دارد. (EPA; 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17) اسیدهای چرب بلندزنجیر امگا ۶ می‌باشد، اگرچه می‌تواند توسط دلتا ۵ الانگاز به دکزاترانوئیک‌اسید<sup>۱</sup> (DTA; 22:4 $\Delta$ 7,10,13,16) و سپس توسط دلتا ۴ دسچوراز به دکزاپنتانوئیک‌اسید (DPA; 22:5 $\Delta$ 4,7,10,13,16) تبدیل گردد. EPA (امگا ۳) می‌تواند توسط دلتا ۵ الانگاز به اکزاپنتانوئیک‌اسید (EPA; 20:5 $\Delta$ 7,10,13,16,19) تبدیل گردد (Petrie and Singh, 2011). مرحله آخر مسیر بین موجودات مختلف متفاوت است (Qiu, 2003). در بیشتر یوکاریوت‌های پست از دکزاهگزانوئیک‌اسید توسط دلتا ۴ دسچوراز دکزاهگزانوئیک‌اسید (DHA; 22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19) تولید می‌گردد. درحالی‌که در پستانداران اکزاپنتانوئیک‌اسید برای تولید اسیدچرب ۲۴ کربنه تتراهگزانوئیک‌اسید<sup>۲</sup> (THA; 24:6 $\Delta$ 6,9,12,15,18,21) در معرض دو مرحله طویل‌سازی و سپس غیراشباع‌سازی قرار گرفته و سپس توسط بتا اکسیداسیون به دکزاهگزانوئیک‌اسید تبدیل می‌گردد (Vrinten et al., 2007).

این مسیر، معمولترین مسیر هوازی یافت شده است، اگرچه مسیر دلتا ۸ نیز موجود می‌باشد. در این مسیر LA و ALA توسط دلتا ۹ الانگاز به ترتیب به اکزادی‌انوئیک‌اسید<sup>۳</sup> (EDA; 20:2 $\Delta$ 11,14) و اکزاتری‌انوئیک‌اسید<sup>۴</sup> (ETrA; 20:3 $\Delta$ 11,14,17) تبدیل و سپس توسط دلتا ۸ دسچوراز برای تولید دی‌هموگامالینولیک‌اسید و اکزاترانوئیک‌اسید دو مسیر دلتا ۸ و دلتا ۶ با هم ادغام می‌گردند (Petrie and Singh, 2011).

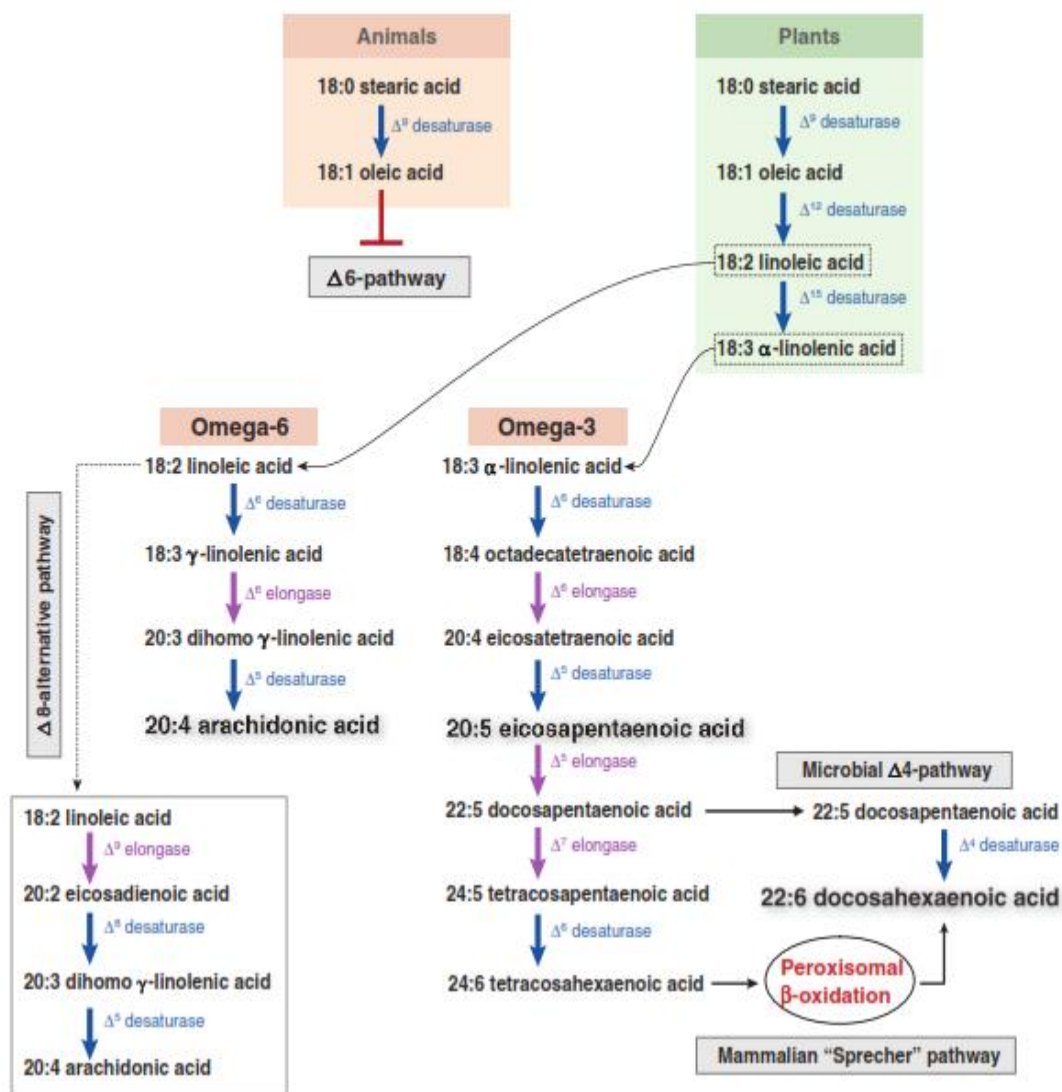
مسیرهای امگا ۳ و امگا ۶ مسیرهای موازی درهم‌پیچیده‌ای هستند که یک ژن در هر دو شاخه به‌طور عمومی عمل می‌کند. به‌عنوان مثال در مسیر دلتا ۶، دلتا ۶ دسچوراز اولین گام تولید هر دو اسیدچرب بلندزنجیر امگا ۳ و امگا ۶ بوده و می‌تواند هر دو لینولئیک‌اسید و آلفالینولیک‌اسید را

---

1 - Docosatetraenoic acid  
2 - Tetracosahexaenoic acid  
3 - Eicosadienoic acid  
4 - Eicosatrienoic acid

غیراشباع سازد. غیراشباع‌سازی لینولئیک‌اسید منجر به تولید گامالینولنیک‌اسید می‌گردد، اما کارآمدی تولید آلفالینولنیک‌اسید کاهش می‌یابد، چراکه لینولئیک‌اسید سوبسترای فعالیت دلتا ۱۵ دسچوراز نیز می‌باشد که آلفالینولنیک‌اسید را تولید می‌کند. یک راه‌حل جهت افزایش تولید آلفالینولنیک‌اسید افزایش فعالیت دلتا ۱۵ دسچوراز است. اما موفقیت این روش می‌تواند توسط این واقعیت که رقابت بین دلتا ۱۵ و دلتا ۶ دسچوراز برای لینولئیک‌اسید باقیمانده وجود دارد، محدود گردد. این عمل در صورتی امکان‌پذیر است که امگا ۳ دسچورازهای زیادی نه تنها لینولئیک‌اسید را به آلفالینولنیک‌اسید توسط دلتا ۱۵ دسچوراز تبدیل کنند، بلکه اسیدهای چرب امگا ۶، گامالینولنیک‌اسید، دی-هموگامالینولنیک‌اسید و آراشیدونیک‌اسید را نیز به‌همتای امگا ۳ آن‌ها تبدیل کند. شکل ۱-۵ شمایی از مسیر سنتز اسیدهای چرب را نمایش می‌دهد (Petrie and Singh, 2011).





شکل ۱-۵: مسیر هوازی بیوسنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر. مسیرهای گوناگون سنتز اسیدهای چرب ARA, EPA, DHA, به واسطه فعالیت دسچورازها و الانگازها. دو مسیر سنتز DHA در گیاهان و جانوران نشان داده شده است. (Napier JA., 2007)

## ۱-۱۰- آنزیم‌های غیراشباع‌کننده<sup>۱</sup> و طویل‌کننده اسیدهای چرب<sup>۲</sup>

### ۱-۱۰-۱- آنزیم‌های دسچوراز

چربی‌ها ابتدا به صورت اسیدهای چرب اشباع سنتز گردیده و پیوندهای دوگانه پس از سنتز توسط آنزیم‌های وابسته به اکسیژن، که به‌عنوان دسچوراز شناخته می‌شوند، با حذف هیدروژن از گروه متیلن ایجاد می‌گردند. دسچورازها آنزیم‌هایی غیرهمی شامل دو اتم آهن هستند که در گیاهان، جانوران و به‌طور پراکنده بین یوباکتری‌ها یافت می‌گردند. این آنزیم‌ها به دو شکل محلول و یا درون غشائی دیده می‌شوند، که در گیاهان هر دو فرم وجود دارد. انواع مختلفی از دسچورازها با نواحی انتخابی متفاوت یافت شده‌اند، که مسیر اسیدهای چرب را برای ایجاد پیوندهای دوگانه در موقعیت‌های مختلف زنجیره اسیل‌چرب‌های متفاوت تغییر داده و در انتها انواع مختلف اسیدهای چرب را ایجاد می‌کنند (Parker et al., 2000). دسچورازهای acyl-ACP، آنزیم‌های محلولی می‌باشند که در پلاستید گیاهان عالی یافت می‌گردند، درحالی‌که بخش گسترده‌ای از دسچورازهای acyl-CoA درون غشائی در سیستم درون غشائی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌گردند (Shanklin and Cahoon., 1998). اگرچه دو جایگاه فعال آهن در دسچورازهای غشائی وجود دارد، اما هیچ رابطه‌ای با دسچورازهای محلول نداشته و عقیده براین است که بطور مستقل تکامل یافته‌اند (Parker et al., 1991; Shanklin and Somerville 2000). ساختار کریستالی دسچورازهای محلول کرچک و هدراراه را برای مهندسی انواع فعالیت‌های کاتالیزوری و اختصاصی جدید هموار ساخته است (Shanklin et al., 1998; Whittle et al., 2008). اما اطلاعات ما از ارتباط ساختار و عمل دسچورازهای غشائی محدود و پراکنده است. در نتیجه مهندسی این دسته از آنزیم‌ها نسبت به دسچورازهای محلول محدود گردیده است.

دسچورازهای غشائی شامل آنزیم‌هایی با ناحیه انتخابی کربن ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ می‌باشند. تعیین

---

1 - Elongation enzymes

2 - Desaturation enzyme

ساختمان، جهت آگاهی از ارتباط ساختار با عمل این گروه از آنزیم‌ها اهمیت زیادی دارد (Chen YQ., 2007). با این حال پیشرفت بسیار کمی با توجه به تنوع کاتالیزوری قابل توجه و طیف گسترده سوبستراهای ویژه این گروه از آنزیم‌ها، در تعیین ساختار بلوری گردیده است.

سه نوع اصلی دسچوراز بر اساس ناحیه انتخابی مشخص گردیده‌اند (Shanklin and Cahoon., 1998; Meesapyodsuk et al., 2000). دسچورازهای با ناحیه انتخابی  $\Delta x$  اولین پیوند دوگانه را در اتم‌های کربن انتهایی کربوکسیلی ایجاد می‌کنند. گروه دوم شامل  $\omega y$ - دسچورازها هستند، که یک پیوند دوگانه را در موقعیت  $y$  انتهایی متیلی ایجاد می‌کنند.  $v+z$  دسچورازها نیاز به یک پیوند دوگانه از قبل ایجاد شده به‌عنوان نقطه مرجع  $v$  و تولید باند جدید بر روی اتم‌های کربن  $z$  در طول زنجیره آسیل دارند (Hoffmann et al., 2007; Zhang et al., 2007).

در تقسیم‌بندی دیگر، این آنزیم‌ها به دو دسته آنزیم‌های دسچوراز امگا و دلتا تقسیم می‌گردند، که هر دو پروتئین‌های غشائی بوده و پیوند دوگانه را در مکان‌های ثابتی از انتهایی کربوکسیل اسیدهای چرب ایجاد می‌کنند. این واکنش نیازمند اکسیژن، NADPH، یک سیستم انتقال‌دهنده الکترون (فرودوکسین - NADPH ردوکتاز و سیتوکروم b5) و یک خاتمه‌دهنده دسچوراز می‌باشد (Sperling., 2003). دسچورازهای غشائی در غشاء تیلاکوئید و اسیل‌کوآنزیم A دسچورازها در شبکه آندوپلاسمی گیاهان قرار دارند. دسچورازهای اسیل‌چرب در سیانوباکتری‌ها و پلاستید گیاهان، گروه‌های استئاریک (18:0) و اولئیک (18:1) را غیراشباع می‌کنند. گروه‌های دیگر اسیل COA دسچوراز در شبکه آندوپلاسمی یافت می‌گردند که از اسیل COA به‌عنوان سوبسترات استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها در جانوران، حشرات، نماتودها و قارچ‌ها یافت می‌شوند. گزارش‌های زیادی از همسانه‌سازی و شناسایی ژن‌های دسچوراز موجود می‌باشد. کار بر روی آنزیم‌های دسچوراز به دلیل مشکل در خالص‌سازی آن‌ها سخت است. بجز دلتا ۹، بقیه دسچورازها متصل به غشاء بوده و انحلال آن‌ها مشکل‌ساز می‌باشد، بنابراین این پروتئین‌ها به میزان کمی تعیین ساختار گردیده‌اند (Tocher DR 1998).

## ۱-۱۰-۲ - آنزیم‌های الانگاز

الانگازها جزء دیگر مسیر تبدیل اسیدهای چرب هستند. این آنزیم‌ها عهده‌دار افزودن سیستماتیک دو واحد کربن به انتهای زنجیره اسیدهای چرب می‌باشند. آنزیم‌های الانگاز، در موجودات مختلف دارای سیستم‌های طویل‌سازی متفاوتی دارای سوبسترات ویژه، وابسته به طول و درجه غیراشباعی زنجیره اسیدچرب یافت شده‌اند.

در گیاهان و جانوران سیستم‌های الانگاز از ۴ آنزیم تشکیل یافته‌اند: یک آنزیم بتا-کتواسیل COA سنتتاز<sup>۱</sup> (KCS)، بتا-کتواسیل COA ردوکتاز<sup>۲</sup>، بتاهیدروکسیل COA دهیدراتاز<sup>۳</sup> و یک ترانس انویل ردوکتاز<sup>۴</sup> (Huang YS, et al., 2004). به طور کلی سیستم طویل‌سازی اسیدهای چرب در جانوران و گیاهان در سیستم سنتزی اسیدهای چرب آن‌ها با یکدیگر تفاوت دارند. مهم‌ترین آنزیم این گروه دلتا ۶ الانگاز می‌باشد که پس از تولید اسیدهای چرب ۱۸ کربنه گامالینولیک‌اسید و استئاریودونیک‌اسید توسط آنزیم دلتا ۶ دسچوراز، به ترتیب منجر به تولید اسیدهای چرب ۲۰ کربنه دی‌گامالینولیک‌اسید و اکزاترانوئیک‌اسید می‌گردد.

## ۱-۱۱ - آنزیم‌های دسچوراز، محدودکننده سنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر

از آنجایی که مراحل غیراشباع‌سازی محدودکننده بیوسنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر شناخته شده‌اند، بسیاری از مطالعات روی جداسازی و شناسایی ژن‌های کدکننده این دسچورازها متمرکز گردیده است. ژن‌های کدکننده انواع مختلف دسچورازها از موجودات زنده مختلف جداسازی و همسانه‌سازی گردیده‌اند.

در این بین دلتا ۶ دسچوراز یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع مانند آراشیدونیک‌اسید، اکزاینونوئیک‌اسید و دکزاهگزانوئیک‌اسید می‌باشد. آراشیدونیک‌اسید، متابولیت

---

1 - Beta-Ketoacyl-COA synthase  
2 - Beta ketoacyl-COA reductase  
3 - Beta Hidrocxil-COA hidratase  
4 - Trans-2- enoyle reductase

اصلی مسیر امگا ۶ و دکزاهگزانوئیک اسید محصول اصلی مسیر امگا ۳، به طویل سازی دلتا ۶ از لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید وابسته هستند. به عبارت دیگر می توان گفت که دلتا ۶ دسچوراز به عنوان دروازه ای برای اسیدهای چرب، جهت ورود به مراحل بعدی غیراشباع سازی و طویل سازی می باشد. اولین جداسازی دلتا ۶ دسچوراز ویژه اسیدهای چرب، ابتدا از سیانوباکتریوم *Synechocystis sp.* سویه PCC-6803 صورت پذیرفت که توسط کلون کتابخانه ژنومی *Synechocystis sp.* در *Anabaena sp.* سویه PCC-7120، یک سیانوباکتریوم فاقد آنزیم دلتا ۶ دسچوراز، سبب افزایش عملکرد آن گردید (Reddy et al., 1993). متعاقبا اولین گیاه حاوی دلتا ۶ دسچوراز که شناخته شد، گل گاوزبان بود. زمانی که این ژن در گیاه توتون بیان گردید، در گیاهان تراریخته گامالینولنیک اسید و استئاریودونیک اسید حدود ۲۰٪ از کل اسیدهای چرب تولیدی را تشکیل داد.

#### ۱-۱۲- گیاهان تراریخته با قابلیت تولید گامالینولنیک و استئاریودونیک اسید

گامالینولنیک اسید و استئاریودونیک اسید هر دو به طور طبیعی تنها در گیاهان خاصی تولید می گردند. گامالینولنیک اسید در گیاه گل گاوزبان و دانه های پامچال یافت می شود، در صورتی که بذر شاهدانه و توت سیاه شامل گامالینولنیک اسید و استئاریودونیک اسید می باشد. اما کشت این گیاهان مشکل بوده و محصول نسبتا کمی می دهند. در نتیجه علاقه فراوانی به تولید گامالینولنیک اسید و استئاریودونیک اسید در محصولات با دانه های روغنی وجود دارد، چراکه دانه های روغنی به طور معمول حاوی مقادیر قابل توجهی از لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید به عنوان پیش ساز می باشند. بنابراین تولید گامالینولنیک اسید یا استئاریودونیک اسید تنها به بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز نیاز دارد (Pereira et al., 2004).

## ۱-۱۳- معرفی قارچ *Mortierella alpina*

*Mortierella alpina* قارچی از خانواده Mortierellaceae، راسته Mortierellales می‌باشد. اکثر گونه‌های *Mortierella* سرمادوست بوده و به سرعت در محیط‌های فقیر رشد می‌کنند (Webster and Weber, 2007). ریشه‌های *Mortierella alpina* منشعب بوده و قطرات روغن در بین ریشه‌ها به فراوانی دیده می‌شود. بنابراین قارچی است روغنی و حدود ۵۰٪ وزن خشک آن لیپید به صورت تری‌اسیل‌گلیسرول می‌باشد که منبع غنی برای تولید اسیدچرب غیراشباع آراشیدونیک‌اسید می‌باشد (Liu J. et al., 2011) و به همین دلیل مورد توجه فراوان بشر قرار گرفته است. سویه‌های این گونه قارچی اغلب غیر بیماری‌زا بوده و اسپوره‌های آلرژی‌زا تولید نمی‌نمایند. با این وجود گزارشات نه چندان معتبری در مورد دخالت این قارچ در ایجاد بیماری و واکنش‌های آلرژی‌زا وجود دارد. در محیط خاک، سویه‌های این گونه فعالیت ضد میکروبی را علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان داده‌اند، اما در محیط‌های مایع که جهت تولید آراشیدونیک‌اسید مورد استفاده قرار می‌گیرند، فعالیت آنتی‌بیوتیکی قابل ملاحظه‌ای یافت نشده است (Streekstra, H., 1997). *Mortierella alpina* دارای یک دلتا ۵، دو دلتا ۶، سه دلتا ۹، یک دلتا ۱۲ و یک دلتا ۱۵ دسچوراز می‌باشد، با توجه به این که دسچورازهای غشائی شامل آنزیم‌هایی با ناحیه انتخابی کربن ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ می‌باشند، بنابراین آنزیم‌های این قارچ در گروه دسچورازهای غشائی قرار می‌گیرند.

## ۱-۱۳-۱- سابقه تحقیقاتی بر روی قارچ *Mortierella alpina*

اولین بار همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز از *Mortierella alpina* توسط ساکورادانی<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام پذیرفت. طول کامل cDNA تحت کنترل پرموتور *amyB* در قارچ آسپرژیلوس بیان گردید و منجر به انباشت ۲۵٪ گامالینولیک‌اسید از کل اسیدهای چرب گردید. لیو<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۱ با بیان این ژن در کلزا مقدار قابل توجه گامالینولیک‌اسید در این گیاه

1 - Sakuradani

2 - Liu

تولید کردند. ژن دلتا ۶ دسچوراز *Mortierella isabellina* توسط لیو و همکاران در سال ۲۰۰۱، هانگ<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۹، لاوتنج<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۰، لی<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۹ همسانه‌سازی گردید. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ این ژن را در مخمر *Pichia pastoris* بیان و سطح گامالینولنیک‌اسید را ۶/۳٪ از کل اسیدهای چرب برآورد کردند. این نتایج بیانگر این است که قارچ *Mortirella alpina* زمینه‌ای برای تولید اقتصادی گامالینولنیک‌اسید می‌باشد.

بنابراین با توجه به اهمیت ژن دلتا ۶ دسچوراز در مسیر تولید اسیدهای چرب غیراشباع و با توجه به این که این ژن در قارچ *Mortirella alpina* دارای فعالیت بالایی می‌باشد، هدف از این تحقیق تکثیر و همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، از این قارچ و بررسی صحت توالی همسانه‌سازی بوده است.

## ۱-۱۴ - همسانه‌سازی<sup>۴</sup> ژن

برای مطالعه یک ژن و تعیین خصوصیات مولکولی فرآورده‌های حاصل، تعیین توالی DNA، تکثیر یک ژن و یا قطعه‌ای از DNA جهت انتقال به یک ژنوم جدید و ایجاد گیاهان تراریخته و اهداف متعدد دیگر، لازم است که DNA موردنظر تکثیر گردد. در برخی شرایط، PCR امکاناتی را فراهم می‌آورد تا قطعه موردنظر به سهولت و سرعت تکثیر گردد. روش دیگر تکثیر DNA، از طریق همسانه‌سازی است. محدود بودن DNA موجود در اندام موجودات، کند بودن سرعت تکثیر سلول‌های یوکاریوت و عدم تکثیر این سلول‌ها در محیط مصنوعی، تکثیر DNA خارج از سیستم موجود زنده توسط روش‌های مهندسی ژنتیک را توجیه‌پذیر می‌کند (محمدپور، م ۱۳۸۱).

سلول‌های باکتریایی به سهولت در محیط مصنوعی قابلیت تکثیر دارند و سلول‌هایی مانند *E.Coli* هر ۲۰ دقیقه یک‌بار تکثیر می‌گردند. از سوی دیگر، در هر نسل می‌توان از طریق یک

---

1 - Huang  
2 - Laoteng  
3- Li  
4 - Cloning

پلاسمید نوترکیب، صدها نسخه از DNA موردنظر را به دست آورد. بنابراین، در عرض ۲۴ ساعت می-توان میلیون‌ها نسخه از ژن بخصوص را تولید کرد. جداسازی قطعه DNA موردنظر، با این‌که از نظر کمی بسیار کوچکتر از ژنوم باکتریایی است، ولی به دلیل قرارگیری در محل خاصی از پلاسمید، به-سهولت امکان‌پذیر است (محمدپور، م ۱۳۸۱).

ابزار کار مهندسی ژنتیک در آزمایشگاه شامل باکتری به‌عنوان میزبان، پلاسمید (یا ناقلین دیگر) به‌عنوان حامل<sup>۱</sup> ژن، آنزیم‌های برشی<sup>۲</sup> و اتصال‌دهنده قطعات DNA به یکدیگر می‌باشد. کلید اصلی برای همسانه‌سازی یک قطعه DNA، اتصال آن به مولکول DNA حامل است که می‌تواند درون سلول میزبان تکثیر یابد. پس از این‌که مولکول DNA نوترکیب، شامل یک حامل به‌همراه یک قطعه DNA نوترکیب، به سلول میزبان عرضه می‌گردد، DNA اضافه‌شده درون حامل نوترکیب همانندسازی می‌گردد (Lodish et al., 2008).

### ۱-۱۴-۱- ناقل‌های ژنتیکی

برای انتقال یک DNA خارجی به داخل سلول میزبان، در اکثر موارد نیاز به استفاده از یک ناقل وجود دارد. ناقل‌ها مولکول‌های DNA هستند که ژن را به سلول میزبان (میکروب، گیاه، جانور) انتقال می‌دهند. انتخاب ناقل مورد نظر بر اساس نوع سلول میزبان و هدف آزمایش صورت می‌گیرد. ناقلین مورد استفاده برای سلول‌های باکتریایی شامل پلاسمیدها، باکتروفاژ<sup>۳</sup>، λ، M13 و فاژمیدها می‌باشند. پلاسمیدها مولکول‌های DNA حلقوی دورشته‌ای می‌باشند، که از DNA کروموزومی سلول مجزا می‌باشند. همانند DNA کروموزومی سلول میزبان، DNA پلاسمیدی نیز قبل از هر تقسیم سلولی، همانندسازی می‌کند. طی تقسیم سلول، نسخه‌های DNA پلاسمیدی بین سلول‌های دختر تقسیم می‌شوند. پلاسمیدهایی که به‌طور معمول در تکنولوژی DNA نوترکیب به‌کار می‌روند، درون

---

1 - Vector  
2 - Restriction Enzyme  
3 - Landa



*E. Coli* تکثیر می‌یابند. این پلاسمیدها به‌گونه‌ای از نظر ژنتیکی تغییر داده شده‌اند که به بهترین شیوه به‌عنوان حامل در همسانه‌سازی DNA استفاده گردند (Lodish et al., 2008).

حذف بخش‌های غیرضروری از پلاسمیدهای طبیعی *E. Coli* سبب ایجاد حامل‌های پلاسمیدی می‌گردد، که حاوی سه بخش ضروری برای همسانه‌سازی DNA می‌باشند: یک نقطه آغاز همانندسازی<sup>۱</sup> (ORI)، یک نشانگر<sup>۲</sup> که اجازه انتخاب باکتری حاوی پلاسمید را می‌دهد و معمولاً یک ژن مقاومت دارویی می‌باشد و منطقه‌ای که در آن قطعات خارجی DNA را می‌توان وارد کرد. آنزیم-های سلول میزبان، همانندسازی پلاسمید را از نقطه آغاز همانندسازی، شروع می‌کنند. بنابراین همانندسازی بدون در نظر گرفتن توالی نوکلئوتیدی در تمام مسیر حلقوی پلاسمید ادامه می‌یابد، و در نتیجه هر توالی DNA که به‌درون چنین پلاسمیدی وارد شده باشد، همراه سایر بخش‌های DNA پلاسمیدی همانندسازی خواهد شد (Lodish et al., 2008).

پس از آن که حامل‌های پلاسمیدی به‌همراه سلول‌های *E. Coli* انکوبه گردیدند، سلول‌های حاوی پلاسمید، می‌توانند به‌راحتی از میان تعداد زیاد سلول‌ها انتخاب گردند. به‌عنوان مثال، زمانی که پلاسمید حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک باشد، سلول‌های ترانسفورم‌شده را می‌توان با رشد آن‌ها در محیط کشت حاوی آن آنتی‌بیوتیک خالص‌سازی کرد (Lodish et al., 2008).

## ۱-۱۴-۲- آنزیم‌های برشی

بسیاری از پیشرفت‌های شگرف در زیست‌شناسی مولکولی به دلیل کشف آنزیم‌هایی است که DNA دو رشته‌ای را به‌صورت قطعات ویژه برش می‌دهند. این آنزیم‌ها پروتئین‌های پروکاریوتی می‌باشند که احتمالاً به‌عنوان مقاومت در برابر آلودگی ویروس‌های باکتریایی عمل می‌کنند. آنزیم‌های برشی به‌طور معمول توالی‌های ۸-۴ جفت‌بازی ویژه‌ای را شناسایی کرده و هر دو رشته DNA را در

---

1 - Origin of replication

2 - Marker

این منطقه می‌برند. این مناطق معمولاً توالی‌های پالیندرومی<sup>۱</sup> هستند، به این معنی که توالی منطقه برشی روی هر رشته DNA در صورتی که از جهت ۵' به ۳' خوانده شود، یکسان خواهد بود. این آنزیم‌ها بر اساس گونه‌ای که از آن استخراج شده‌اند، نامگذاری می‌گردند. باکتری برای هر آنزیم برش دهنده، یک آنزیم اصلاح‌کننده نیز تولید می‌کند که با تغییر DNA باکتری در محل یا نزدیکی قطعه مورد نظر، از هضم DNA خود جلوگیری می‌کند. این آنزیم یک گروه متیل را به یک یا دو باز در منطقه برش اضافه می‌کند و در نتیجه آندونوکلئاز از بریدن DNA در این ناحیه ناتوان خواهد بود. در حالی که DNA خارجی وارد شده به باکتری که فاقد این متیلاسیون می‌باشد، توسط آنزیم برشی تجزیه می‌گردد. پس از تکثیر در حدود ۲۰ سیکل توالی هدف، برش توسط آنزیم‌های برشی مناسب، تولید انتهاهای چسبنده‌ای می‌کند که سبب اتصال قطعه به حامل پلاسمیدی می‌گردد که با آنزیم‌های برشی مشابهی در جایگاه برشی چندگانه<sup>۲</sup> بریده شده است. قطعات DNA چه با انتهاهای چسبنده<sup>۳</sup> و یا صاف<sup>۴</sup> می‌توانند با کمک DNA لیگازها<sup>۵</sup> درون یک DNA حامل قرار گیرند. (Lodish et al., 2008).

### ۱-۱۴-۳- خالص سازی mRNA جهت همسانه سازی cDNA

ژن‌های یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر معمولاً حاوی توالی‌های اینترونی زائد بوده، و بنابراین بزرگ‌تر از آن می‌باشند که به‌طور دست نخورده وارد حامل‌های پلاسمیدی گردند. با تغییر روش PCR می‌توان یک توالی ویژه DNA را از روی mRNA<sup>۶</sup> سلولی بدست آورد. این روش RT-PCR<sup>۷</sup> نامیده می‌شود. در این روش یک آغازگر oligo-dT که با انتهای پلی A<sup>۳</sup> در mRNA هیبرید می‌گردد، به‌عنوان آغازگر برای سنتز اولین رشته cDNA<sup>۸</sup> توسط رونویسی معکوس استفاده می‌گردد.

- 
- 1 - Palindromic sequence
  - 2 - Multiple cloning site
  - 3 - Sticky end
  - 4 - Blunt end
  - 5 - DNA ligase
  - 6 - Messenger RNA
  - 7 - reverse transcriptase- PCR
  - 8 - Complementary DNA

سپس می‌توان یک cDNA ویژه را از مخلوط پیچیده cDNAها توسط PCR با استفاده از دو آغازگر طراحی شده براساس انتهای ۵' و ۳' mRNA مربوطه جداسازی کرد (Lodish et al., 2008).

## ۱-۱۵- پروموتور

توالی نوکلئوتیدی هر ژن دارای ۳ ناحیه اصلی پروموتور، ناحیه کدکننده و ترمیناتور می‌باشد. پروموتورها به‌عنوان ناحیه تنظیم‌کننده سطح بیان ژن عمل می‌کنند. ناحیه کدکننده، حاوی اطلاعات سنتز mRNA است که به‌نوبه خود باعث تولید پروتئین ویژه می‌گردد و ترمیناتورها باعث اتمام خاتمه رونویسی می‌گردند.

پروموتور ناحیه‌ای از DNA می‌باشد که باعث آغاز رونویسی از ژن می‌گردد. این توالی‌ها نزدیک جایگاه رونویسی ژن‌ها در رشته بالایی DNA بر روی رشته sense قرار گرفته و اغلب طولی در حدود ۱۰۰-۱۰۰۰ bp دارند. پروموتورها شامل اطلاعات نظارتی در مورد چگونگی و زمان بیان ژن می‌باشند. این ناحیه از DNA به RNA پلی‌مراز متصل گردیده و با استفاده از تنظیم میزان تولید mRNA، سطح بیان ژن را تنظیم می‌کنند (Roa-Rodriguez, C., 2003).

فاکتورهای متصل‌شونده به پروموتورها به سیگنال‌ها پاسخ می‌دهند. منبع و نوع سیگنال‌ها، انواع پروموتورهای فعال را تعیین می‌کنند. ۳ نوع پروموتور عمده بسته به سطح بیان ژن و ویژگی‌های آن وجود دارد: پروموتورهای ساختاری که بیان ژن‌ها را در تمام بافت‌ها، بدون اثر عوامل محیطی و مرحله رشدی ارگانسیم، تسهیل می‌کنند. چنین پروموتورهایی در تمام طول حیات سلول‌های ارگانسیم فعال می‌باشند. پروموتورهای ویژه بافت یا پروموتورهای مرحله رشدی که در بافت خاص و یا در محدوده زمانی خاصی از بافت بیان می‌گردند. در گیاهان، چنین پروموتورهایی ممکن است بیان ژن‌ها را در بافت ریشه، میوه یا دانه تحت تاثیر قرار دهند. بنابراین، اگر بیان یک ژن خاص در بافت ویژه موردنظر باشد، پروموتورهای ویژه بافت در سازه ژنی گنجانده می‌شوند. پروموتورهای القائی که

توسط عوامل خارجی کنترل می‌گردند. این فاکتورها ممکن است گرما، شوری، مواد شیمیایی و یا پاتوژن‌ها باشند. پروموتورهایی که به عوامل غیرزنده واکنش نشان می‌دهند، به دلیل دستکاری راحت-تر، غالباً در مهندسی ژنتیک استفاده می‌گردند. چنین پروموتورهایی به ترکیبات شیمیایی مانند آنتی-بیوتیک‌ها، تغییر درجه حرارت و یا نور پاسخ می‌دهند (Roa-Rodriguez, C., 2003)

## ۱-۱۶- الزام الحاق پروموتورها در بیان گیاهی

یکی از چالش‌های عمده مهندسی ژنتیک گیاهی، طراحی سازه‌هایی است که قابلیت کنترل دقیق فعالیت ژن را داشته باشند. انتخاب پروموتور با قابلیت کنترل بیان مکانی یا زمانی، از عوامل کلیدی مورد استفاده در برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژی گیاهی است. در سال‌های اخیر، طیف گسترده‌ای از پروموتورهای مختلف، با منشاء گیاهی، ویروسی و باکتریایی شناسایی و در کنترل سیستم‌های بیان ژن در سلول‌های گیاهی استفاده گردیده‌اند (Venter, M., 2007).

### ۱-۱۶-۱ پروموتورهای اختصاصی نسبت به بافت

پروموتورهای ویژه دانه، اغلب در زمینه مهندسی ویژه دانه جهت افزایش بیان، و محدود کردن اصلاح متابولیت‌ها در دانه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله پروموتورهای پرکاربرد در گیاهان دولپه‌ای، پروموتور بذر اختصاصی مربوط به پروتئین ذخیره‌ای بذر ناپین جداسازی شده از کلزا می‌باشد (Scofield & Crouch, 1987). ژن ناپین بطور گسترده‌ای در بذرهای توسعه‌یافته بیان می‌گردد و همچنین پروموتور آن می‌تواند بیان ژن‌های بیگانه‌ی دیگر را در جنین گیاهان تراریخت افزایش دهد. همچنین، باتوجه به این‌که اسیدهای چرب بخشی از غشاء سلولی بوده و در فرآیندهای غشایی تاثیرگذار می‌باشند، استفاده از پروموتورهایی مانند پروموتور ناپین، که یک پروموتور اختصاصی دانه می‌باشد، در مسیر تولید اسیدهای چرب باعث می‌گردد که بیان آن‌ها به بخش‌های خاصی از گیاه محدود گردیده و علاوه بر این‌که مانع از تاثیر بر فرآیندهای غشایی گردد، استحصال روغن نیز از بذر با سهولت بیشتری صورت پذیرد (Petrie et al., 2011).

## ۱-۱۷- توالی کوزاک

توالی کوزاک از جمله توالی‌های شناخته شده تنظیمی و از ویژگی‌های ساختاری مولکول‌های mRNA در اکثر یوکاریوت‌های پرسلولی است، که توسط ریبوزوم به‌عنوان جایگاه آغاز ترجمه شناخته می‌شود و هرچه مشابهت آن با توالی مورد توافق بیشتر باشد، سیگنال قوی‌تری برای ترجمه است. این توالی که از بررسی توالی‌های قبل از کدون آغاز در ژن‌های با بیان بالا در گیاهان بدست آمده است، جهت افزایش بیان ژن استفاده می‌گردد. ماریلین کوزاک این توالی را به‌صورت ACCAUGG تعیین کرد (Lodish et al., 2008). AUG مهمترین نوکلئوتیدهای این توالی است که به‌عنوان کدون کدکننده اسیدآمینو متیونین در پایانه N ترمینال پروتئین قرار دارد. نوکلئوتید A از AUG به‌عنوان نوکلئوتید شماره ۱ نامگذاری می‌گردد. نوکلئوتیدهای موقعیت +۴ (G) و -۳ (A یا G) برای افزایش کارایی ضروری هستند. حضور یکی از این نوکلئوتیدها باعث افزایش بیان و عدم حضور هیچ‌یک باعث کاهش کارایی می‌گردد. CC در موقعیت -۱ و -۲ حفاظت‌شده نیستند، اما در کارآمدی توالی موثر می‌باشند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که جهش‌های نقطه‌ای در توالی مجاور کدون شروع بر کارایی ترجمه موثر است که این موضوع بیانگر اهمیت توالی کوزاک می‌باشد. مکانیزم عمل این توالی در بالا بردن کارایی ترجمه، نتیجه بالا بردن صحت کدون انتخابی به‌عنوان کدون شروع ترجمه است. با توجه به این مطالب، توالی کوزاک قابلیت افزایش بیان پروتئین‌های نو ترکیب را دارا می‌باشد (Kozak M., 1986).

## ۱-۱۸- سیستم‌های انتقال ژن در گیاهان

با پیشرفت فنون بیوتکنولوژی، انتقال ژن در گیاهان امکان‌پذیر شده است. برای اجتناب از پروژه‌های کلاسیک اصلاح‌نیات که معمولاً با صرف سال‌های طولانی انجام می‌شوند، روش‌های

جدیدی ابداع شده‌اند. گیاهان به‌دست آمده از طریق انتقال ژن به گیاهان تراریخته<sup>۱</sup> موسوم هستند. از مزیت‌های عمده تکنولوژی انتقال ژن به گیاهان، علاوه بر سرعت عمل در ایجاد گیاهان تراریخته این است که در استفاده از ژن‌های به‌دست آمده از منابع مختلف محدودیتی وجود ندارد. حتی ژن‌های به‌دست آمده از باکتری‌ها را در صورت مفید بودن می‌توان به گیاهان منتقل نمود. در متدهای اولیه انتقال ژن به گیاهان تاکید زیادی در استفاده از ویروس‌های گیاهی برای انتقال ژن به گیاهان می‌شد، که به دلیل معایب مختلف از جمله اختصاصی بودن برای میزبان‌های محدود و ظرفیت محدود حمل DNA موفق نبودند. متری‌ترین روش‌های انتقال ژن در گیاهان شامل استفاده از باکتری آگروباکتریوم و تفنگ ژنی می‌باشد. در این بین آگروباکتریوم رایج‌ترین روش تولید گیاهان تراریخته از نظر ژنتیکی می‌باشد (محمدپور، م ۱۳۸۱).

اطلاعات ژنتیکی مربوط به انتقال ژن که رشد، تکثیر و آلودگی موضعی آگروباکتریوم را ممکن می‌سازد، توسط یک پلاسمید بزرگ 200kb~ موسوم به پلاسمید گال<sup>۲</sup> یا Ti- plasmid تامین می‌شود. این پلاسمید که در گونه بیماری‌زای این باکتری وجود دارد، حاوی ژن‌های متعددی است که هر کدام نقش ویژه‌ای را در بیولوژی و آلودگی باکتری ایفا می‌کنند. بخش مهم پلاسمید Ti، ناحیه‌ای موسوم به DNA منتقل شونده<sup>۳</sup> T-DNA می‌باشد که قابلیت برانگیختن گال را دارد. این قطعه در سلول‌های گیاهی به‌صورت پایدار حفظ و به‌صورت بخشی از کروموزوم به سلول‌های دختری منتقل می‌شود. لذا دانشمندان سویه‌هایی از آگروباکتریوم را به وجود آورده‌اند که با حذف قسمت T-DNA به پلاسمید غیرمسلح<sup>۴</sup> موسوم می‌باشند. در عوض ناحیه T-DNA برای طراحی پلاسمیدهای کوچک دیگری استفاده شده است که با پلاسمید غیرمسلح دارای نواحی مکمل می‌باشند. قطعه DNA موردنظر به ناحیه MCS وکتور دومیزبانه منتقل می‌گردد. به محض قرارگیری وکتور دومیزبانه در آگروباکتریوم و تلقیح میزبان گیاهی با سلول‌های انتقال یافته، با استفاده از فرآورده‌های ژن‌های موجود در پلاسمید

---

1 - Transgenic Plant  
2 - Tumor Inducing Plasmid  
3 - Transfer DNA  
4- Disarmed Plasmid

غیرمسلح، DNA قرار گرفته در میان نواحی مرزی وکتور دومیزبانه به سلول‌های گیاهی منتقل می‌شود (محمدپور، م ۱۳۸۱).

### ۱-۱۸-۱- تولید گیاهان تراریخته

گام اصلی در تولید گیاهان تراریخته، ایجاد سازه‌های ژنتیکی و انتقال آن‌ها به سلول‌های آگروباکتریوم می‌باشد. برای ایجاد این گیاهان، لازم است T-DNA حاوی سازه ژنتیکی که شامل قطعه DNA موردنظر، پروموتور مناسب و مارکر گزینش<sup>۱</sup> می‌باشد، به سلول‌های گیاهی منتقل نمود. سلول‌های انتقال نیافته گیاهی در مقابل آنتی‌بیوتیک کانامایسین<sup>۲</sup> که از ژن *nptII*<sup>۳</sup> تولید می‌شود حساس بوده و در حضور آن قادر به رشد نیستند. این ژن به عنوان مارکر گزینشگر به همراه ژن مورد نظر به گیاهان تراریخته وارد می‌گردد. سلول‌های نوترکیب آگروباکتریوم تکثیرشده معلق در محیط کشت مایع، برای تلقیح اندام‌های جوان گیاهی به کار برده می‌شوند. عمل تلقیح و آلودگی باکتری توسط ایجاد زخم‌های ظریف در سطح برگ‌های جوان یا میان‌گره‌های انتهایی انجام می‌گیرد. برای گزینش سلول‌های گیاهی انتقال یافته و ایجاد گیاهان تراریخته از طریق این سلول‌ها، یک تا دو روز بعد از تلقیح، قطعات کوچک دیسک مانند از محل و مجاورت جایگاه تلقیح تهیه و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین نگهداری می‌شوند. دیسک‌های انتقال نیافته که قادر نیستند در حضور این آنتی‌بیوتیک زنده بمانند، نهایتاً نکروزه شده و پلاسیده می‌شوند. دیسک‌های حاوی سلول‌های انتقال یافته به واسطه تولید mRNA جدید و تجلی ژن *nptII* در حضور کانامایسین پایدار بوده و به صورت طبیعی باقی می‌مانند. انتقال این دیسک‌ها به محیط کشت‌های مختلف ریشه‌زایی<sup>۴</sup>، ساقه‌زایی<sup>۵</sup> و تکثیر<sup>۶</sup> در نهایت باعث ایجاد گیاهچه‌های کوچکی موسوم به گیاهان تراریخته می‌شود (محمدپور، م ۱۳۸۱).

- 
- 1 - Selection Marker
  - 2 - Kanamicin
  - 3 - Neophosphotransferase II
  - 4 - Rooting Media
  - 5 - Shooting Media
  - 6 - Multiplication Media

## ۱-۱۹- پذیرش عمومی محصولات تراریخته حاوی اسیدهای چرب بلندزنجیر امگا ۳

مهندسی متابولیک عمل بهینه‌سازی فرآیندهای ژنتیکی و نظارتی در داخل سلول‌ها جهت افزایش تولید یک ماده خاص است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی و علوم محاسباتی منجر به افزایش علاقه‌مندی به استفاده از مهندسی متابولیک در جهت اهداف پزشکی و صنعتی شده است. در حقیقت مهندسی متابولیک، بهبود تولیدات سلولی به منظور تغییر واکنش‌های بیوشیمیایی ویژه یا تولید سلولی یک ماده خاص با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب می‌باشد (Stephanopoulos, 1999). مهندسی متابولیک دانه‌های روغنی جهت تولید مقادیر با بهره کافی از اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیر در این راستاست.

منبع اصلی اسیدهای چرب بلندزنجیر ذخیره ماهی است و متأسفانه این منبع به‌طور گسترده-ای در حال کاهش است (Myers RA, Worm B 2003). از سوی دیگر به دلیل این‌که ماهی تنها از طریق رژیم غذایی قادر به انباشت این اسیدهای چرب می‌باشد، صنعت پرورش ماهی نمی‌تواند جایگزین مناسبی باشد. از سوی دیگر این نگرانی و تردید وجود دارد که استفاده از روغن ماهی به-عنوان مکمل غذایی بدلیل آلودگی‌های محیطی مانند دیوکسین‌ها و فلزات سنگین مانند جیوه که توسط ماهی‌ها جذب شده و در کبد و سایر اندام‌های آن‌ها تجمع یافته‌اند، خطرناک باشد. محصولات دانه روغنی با ظرفیت تولیدی و ارزش نسبی پایین، می‌توانند منابع عالی جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر باشند. برای مثال محاسبات انجام شده جهت تعیین نیاز مصرف کنندگان جهانی این روغن-ها، استفاده روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم از این اسیدهای چرب را جهت تامین سلامتی توصیه می‌کنند. از طرفی طبق آمار، جمعیت جهانی در سال ۲۰۲۵ به ۸ میلیارد نفر بالغ خواهد شد، و با فرض این‌که ماهی شامل ۰/۲-۳/۵ امگا ۳ در ۱۰۰ g روغن باشد، تخمین زده می‌شود که تولید جهانی، کمتر از میزان تقاضا باشد. با توجه به این‌که تقریباً ۲/۵ میلیون هکتار از محصولات دانه روغنی (حدود ۰/۲٪ کل مساحت کشت این محصولات) شامل ۱۵-۱۰٪ از EPA و DHA در روغن آن‌ها، می‌تواند جایگزین



روغن ماهی متداول مورد استفاده جهانی گردد، بنابراین مهندسی متابولیک این اسیدهای چرب در گیاهان می‌تواند راه حل مناسبی جهت افزایش سطح روغن‌های با پایه دریایی باشد. چنین روغن‌هایی می‌توانند به‌عنوان غذای حیوانات جهت تولید گوشت و تخم‌مرغ غنی از اسیدهای چرب بلندزنجیر استفاده گردند. یا به‌عنوان مکمل غذایی در نان، گوشت، شیر و یا مستقیماً به‌عنوان مکمل مانند کپسول روغن ماهی کاربرد داشته باشند.

موانع تکنیکی و علمی تولید، تنها بخشی از مشکلات در زمینه مهندسی متابولیک تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر می‌باشد. تولید محصولاتی بر پایه امگا ۳، نیازمند قبول این تکنولوژی توسط جوامع جهانی است. اصلاح ژنتیکی این محصولات به‌دلیل نقشی که در کاهش فشار برروی میزان ارگانسیم‌های دریایی و خصوصاً ماهی‌ها دارد، ارزش بسیار بالایی خواهد داشت. بعلاوه چنین محصولاتی سلامت مصرف‌کنندگان و همچنین آگاهی مجامع عمومی را در مورد اهمیت اسیدهای-چرب بلند زنجیر امگا ۳ افزایش می‌دهد. این فاکتورها نقش مهمی در افزایش پذیرش عمومی مصرف-کنندگان بازی می‌کند.

در برخی کشورها سطح بالای مخالفت با تکنولوژی تراریخته به‌دلیل مشاهده خطرات آن است. برای مثال در یک مطالعه در آمریکا نشان داده شد که ۹۹٪ مصرف‌کنندگان بیشتر نگران بهداشت و بیماری‌های غذایی ایجادشده توسط بیوتکنولوژی می‌باشند. با این‌وجود، بازبینی گرایش مصرف‌کنندگان در خصوص اسیدهای چرب بلندزنجیر امگا ۳ و همچنین تولید آن در دانه‌های روغنی تراریخته، که توسط کاکس<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام پذیرفت، نشان داد درحالی‌که اقلیت مردم نگران استفاده از تکنولوژی تراریخته می‌باشند، اکثریت شرکت‌کنندگان در نظرسنجی نظر مثبتی در مورد استفاده از دانه‌های روغنی حاوی اسیدهای چرب بلندزنجیر دارند. جالب‌توجه این‌که مصرف-کنندگان بیشتر گرایش به مصرف دانه‌های روغنی حاوی اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا ۳ دارند تا

---

1 - Cox

منابع روغنی ترکیب شده در نان، شیر یا مکمل های روغن ماهی و جلبک (Cox et al., 2011).



# فصل دوم

مروری بر منابع



## ۲- مهندسی متابولیک اسیدهای چرب بلندزنجیر

بیوسنتز امگا ۳ LC-PUFA در گیاهان خشکی‌زی اولین بار در سال ۲۰۰۴ با توصیف دو مسیر دلتا ۶ و دلتا ۸ معرفی گردید. کیو<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ تولید ۳٪ اکزپنتانوئیک‌اسید و ۶/۶٪ آراشیدونیک‌اسید را توسط مسیر دلتا ۸ مرکب از دلتا ۹ الانگاز جلبک *Isochrysis galbana* دلتا ۸ دسچوراز قارچ *Euglena gracilis* و دلتا ۵ دسچوراز قارچ *Mortierella alpina* با پروموتور<sup>۲</sup> (CaMV) 35S را در بافت برگ گیاه *Arabidopsis thaliana* اثبات کردند. این تحقیق تولید اسیدهای چرب بلند زنجیر در گیاهان خشکی‌زی را در بافت برگ، اثبات کرد (Qi et al., 2004).

به‌فاصله کوتاهی پس از آن آبادی<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر در دانه‌های توتون و بذر کتان، توسط مسیر دلتا ۶ را گزارش کردند. در این مسیر ۱۱/۴٪ SDA و ۱۶/۸٪ GLA در بذر کتان تولید گردید. اما طویل‌سازی دلتا ۶ اسیدهای چرب به‌طور موثر صورت نگرفت و تنها ۰/۸٪ EPA و ۱/۰٪ ARA تولید گردید. این تحقیقات دلایل محکمی بودند مبنی براین‌که تولید اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا ۳ در گیاهان خشکی‌زی امکان‌پذیر است (Abbadi et al., 2004).

این دو پژوهش همچنین نشان دادند که مسیرهای امگا ۳ و امگا ۶، مسیرهای موازی در هم-پیچیده‌ای هستند، که یک ژن منفرد می‌تواند در هر دو شاخه به‌طور عمومی عمل می‌کند. به‌عنوان مثال دلتا ۶ دسچوراز اولین گام تولید هر دو امگا ۳ و امگا ۶ اسیدهای چرب بلندزنجیر بوده و می‌تواند غیراشباع‌سازی را بر روی لینولئیک‌اسید و آلفالینولئیک‌اسید انجام دهد. غیراشباع‌سازی دلتا ۶ لینولئیک‌اسید منجر به تولید گامالینولئیک‌اسید می‌گردد، اما کارآمدی با تولید آلفالینولئیک‌اسید کاهش می‌یابد. چراکه لینولئیک‌اسید سوبسترات فعالیت دلتا ۱۵، که آلفالینولئیک‌اسید را تولید می‌-

1 - Qi

2 - Cauliflower Mosaic Virus

3- Abbadi

کند نیز می‌باشد. یک راه‌حل افزایش تولید آلفالینولنیک‌اسید، افزایش بهره‌وری دلتا ۱۵ دسچوراز است. اما موفقیت این کار به دلیل رقابتی که بین دلتا ۱۵ و دلتا ۶ دسچوراز، برای لینولئیک‌اسید باقیمانده وجود دارد، محدود می‌گردد. این مشکل می‌تواند با افزایش فعالیت امگا ۳ دسچورازی و تبدیل محصولات امگا ۶ به امگا ۳، توسط دلتا ۱۵ دسچوراز حل گردد. این آنزیم نه تنها لینولئیک‌اسید را به آلفالینولنیک‌اسید تبدیل می‌کند، بلکه اسیدهای چرب آراشیدونیک‌اسید، دی‌گامالینولنیک‌اسید و گامالینولنیک‌اسید مسیر دلتا ۶ را به سمت معادل‌های امگا ۳ آن‌ها می‌کشانند (Petrie et al., 2011).

کی‌نی<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ توانستند محصولات امگا ۶ را به معادل امگا ۳ آن‌ها تبدیل کنند. دلتا ۶ دسچوراز، دلتا ۶ الانگاز و دلتا ۵ دسچوراز قارچ *M. alpina* و دلتا ۱۷ دسچوراز قارچ *Saprolegnia diclina* تحت کنترل پروموتور اختصاصی دانه، در گیاه سویا بیان گردیدند که باعث تولید حدود ۲۰٪ EPA با انباشت مقادیر بسیار کم ARA گردید. این امر تائیدی بر فعالیت امگا ۳ دسچوراز - دلتا ۱۷ دسچوراز - می‌باشد که باعث تبدیل آلفالینولنیک‌اسید به اکزاپنتانوئیک‌اسید می‌گردد (Kinney et al., 2004). وو<sup>۲</sup> و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، با بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز قارچ *Pythium irregulare*، دلتا ۵ دسچوراز قارچ *Thraustochytrium. sp* به‌همراه دلتا ۱۷ مخمر *P. patens*، که هر سه تحت کنترل پروموتور ناپین بودند، به تولید بیشتر از ۱۵٪ اکزاپنتانوئیک‌اسید در دانه‌های کلزا دست یافتند (Wu et al., 2005).

اکرت<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۶ توانستند تولید استئاریودونیک‌اسید را در گیاه سویا با استفاده از بیان همزمان دلتا ۶ دسچوراز گل‌گاوزبان، تحت کنترل پروموتور ویژه دانه و دلتا ۱۵ دسچوراز گیاه آرابیدوپسیس به بیشتر از ۳۰٪ برسانند (Eckert et al., 2006). با استفاده از ژن دلتا ۶ دسچوراز قارچ *Saprolegnia diclina* تحت پروموتور ناپین در دانه‌های آفتابگردان میزان

---

1 - Kinney

2- WU

3- Eckert

گامالینولنیک‌اسید و استئاریودونیک‌اسید به بیشتر از ۷۳٪ رسید (Knauf et al., 2006). چنج<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۰ با همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز مخمر *P. irregular*، دلتا ۵ دسچوراز قارچ *Thraustochytrium. sp* و دلتا ۵ الانگاز قارچ *Thalassiosira pseudonana* که هر سه تحت کنترل پروموتور ناپین بودند، در گیاه کلزا به تولید ۲۶/۹٪ گامالینولنیک‌اسید و ۵/۴٪ استئاریودونیک‌اسید از کل اسیدهای چرب دست یافتند (Cheng et al., 2010).

روش دیگر کاهش تولید اسیدهای چرب امگا ۶، استفاده از یک آنزیم دلتا ۶ دسچوراز با اولویت استفاده از سوبسترات آلفالینولنیک‌اسید می‌باشد که منجر به تولید بیشتر اسیدهای چرب امگا ۳ می‌گردد. به‌عنوان مثال، بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز استخراج شده از قارچ *Saprolegnia diclina* در گیاه *Carthamus tinctorius* که گونه‌ای با مقدار بالای لینولئیک‌اسید امگا ۶ می‌باشد باعث تولید ۷۰٪ گامالینولنیک‌اسید گردید (Nykiforuk et al., 2012). به همین صورت با استفاده از ژن دلتا ۶ دسچوراز گیاه *Primula vialii* که به‌طور اختصاصی از آلفالینولنیک‌اسید به عنوان سوبسترات استفاده می‌کند و بیان آن در گیاه آرابیدوپسیس، بیشتر از ۱۳٪ استئاریودونیک‌اسید بدون تولید هیچ گامالینولنیک‌اسیدی تولید شد. این میزان تولید استئاریودونیک‌اسید، قابل مقایسه با میزان تولید این اسید چرب در گیاه گل‌گاوزبان است (Ruiz-López, N, et al., 2009).

تولید گامالینولنیک‌اسید و استئاریودونیک‌اسید در دانه‌های روغنی دست‌آوردهای قابل توجهی داشته است، اما جهت تولید اکزاینونوئیک‌اسید، هنوز نیاز به تولید مقادیر بیشتر استئاریودونیک‌اسید می‌باشد (Miles et al. 2004). بعلاوه استئاریودونیک‌اسید در بدن قابلیت تبدیل به اکزاینونوئیک‌اسید را ندارد.

چنج و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثبات کردند که انتخاب درست گونه میزبان و پروموتور و الحاق همزمان ژن‌های افزایش‌دهنده مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیر، تاثیر بسیار



زیادی بر میزان تولید اکزپانتانویکاسید در گیاهان دارد (Cheng et al., 2010).

## ۲-۱- اثر پروموتور بر روی میزان سنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر

پروموتورهای ویژه دانه، اغلب در زمینه مهندسی دانه برای افزایش بیان و همچنین اصلاح متابولیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این نکته خصوصا در مهندسی غیرمعمول مسیره‌های روغنی مهم است، چراکه حضور این اسیدهای چرب در بافت سبز می‌تواند به ساختمان و عمل غشاء آسیب برساند (Petrie et al., 2011). تولید بیش از اندازه این اسیدهای چرب در بافت سبز می‌تواند بر روی رشد گیاهان تراریخته اثر گذاشته و باعث رشد غیرطبیعی و حتی مرگ این گیاهان گردد (Millar, et al., 1998). توماس<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۷، ژن دلتا ۶ دسچوراز گل‌گاوزبان را خالص‌سازی کرده و تحت کنترل دو پروموتور ویژه دانه و پروموتور ۳۵S در گیاهان بیان کردند. بیان cDNA تحت پروموتور ۳۵S در کتان منجر به ذخیره مقدار مشابهی از گامالینولنیک‌اسید و استتاریودونیک‌اسید (بیش از ۲۰٪ کل اسیدهای چرب) با مقادیر مشاهده شده در بافت سبز گیاه توتون گردید. اما سطح این اسیدهای چرب در دانه، به دلیل عدم ذخیره اسیدهای چرب غیرمعمول در دانه با استفاده از پروموتور ۳۵S، کمتر از ۲٪ کل اسیدهای چرب بود. گیاه کتان مقدار زیادی آلفالینولنیک‌اسید آندوژن دارد و بنابراین پتانسیل خوبی برای تولید استتاریودونیک‌اسید ملاحظه گردید. کیو و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که گیاهان کتان حامل دسچوراز گل‌گاوزبان تحت کنترل پروموتور ناپین تقریبا ۱۰٪ استتاریودونیک‌اسید بیشتری نسبت به گامالینولنیک‌اسید در دانه ذخیره کردند. اما کل گامالینولنیک‌اسید و استتاریودونیک‌اسید تنها ۱-۲٪ از اسیدهای چرب را شامل گردید که این کاهش کارایی احتمالا مربوط به پروموتور ناپین کلزا در کتان بوده است. استفاده از پروموتور ناپین در *Brassica juncea* منجر به انباشت ۱۰٪ گامالینولنیک‌اسید و ۳٪ استتاریودونیک‌اسید بیشتر در دانه-های تراریخته گردید. دلتا ۹ الانگاز جلبک *Isochrysis galbana*، دلتا ۸ دسچوراز جلبک *Euglena*

1 - Thomas

*gracilis* و دلتا ۵ دسچوراز قارچ *M. alpina* تحت کنترل پروموتور ۳۵S در آرابیدوپسیس بیان گردیدند، که منجر به ذخیره ۶/۶٪ آراشیدونیکاسید و ۳/۰٪ اکزاینٹانویٹیکاسید از کل اسیدهای چرب در بافت برگ گردید (Qi et al., 2004).

واهلروس<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴، وانگ<sup>۲</sup> و همکاران و وو<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۵، اثر بسیار بالای پروموتور، بر روی بیان ویژه در بذر گونه‌های مختلف کلزا را تأیید کردند. پروموتورهای دیگر موجود در سازه، جهت هماهنگی بین ژن‌های دیگر سازه در بیان اختصاصی دانه گیاهان کاربرد دارند (Wahlroos et al., 2004; Wang et al., 2005; Wu et al., 2005).

چن<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۷ ژن‌های کدکننده دلتا ۶ دسچوراز، دلتا ۶ الانگاز و دلتا ۵ دسچوراز قارچ *M. alpina* تحت کنترل پروموتور ویژه دانه سویا  $\beta$ -conglycinin، به همراه دلتا ۱۵ دسچوراز آندوژن را در دانه‌های سویا بیان کردند، که منجر به تولید اسیدهای چرب گامالینولیکاسید، دی‌هموگامالینولیکاسید و آراشیدونیکاسید گردید، که در میزبان گیاهی وجود نداشت. اما به دلیل وجود ژن دلتا ۱۵ دسچوراز، میزان گامالینولیکاسید از ۹/۳٪ به ۱/۹٪ کاهش یافت (Chen et al., 2007).

## ۲-۲- اثر میزبان بر روی درصد اسیدهای چرب تولیدی

مسیر دلتا ۶ دسچوراز - الانگاز در گونه‌های مختلف گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز استخراج شده از قارچ *M. alpina* در کلزا (*Brassica napus*) منجر به تولید مقدار قابل توجه گامالینولیکاسید گردید، اما به سطح *B. juncea* نرسید، مانند زمانی که سوبسترای آندوژن کمی در دسترس باشد. در حالی که *Brassica juncea* غیر ترانسفورم شده تقریباً ۴۰٪ LA تولید کرد، *Brassica napus* ترانسفورم شده دارای ۱۹/۹٪ لینولئیکاسید بود (Liu et al., 2001b).

---

1 - Wahlroos  
2 - Wang  
3 - Wu  
4 - Chen

آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۴ در دانه‌های کتان تراریخته شامل دلتا ۶ و دلتا ۵ دسچوراز و دلتا ۶ الانگاز تنها ۱/۵٪ آراشیدونیک‌اسید و ۱/۰٪ اکزپنتانوئیک‌اسید گزارش کردند. اما در سویا، دلتا ۶ و دلتا ۵ دسچوراز و دلتا ۶ الانگاز *M. alpina* به همراه دلتا ۱۵ گیاه آرابیدوپسیس و دلتا ۱۷ دسچوراز قارچ *Saprolegnia diclina*، تحت کنترل پروموتورهای ویژه دانه منجر به تولید بیش از ۱۳٪ اکزپنتانوئیک‌اسید در جنین‌های سوماتیک و ۲۰٪ در دانه گردید. عدم تولید آراشیدونیک‌اسید به دلیل کارایی بالای دلتا ۱۷ دسچوراز استفاده شده بود، چرا که بدون بیان این ژن بیشتر از ۲۶٪ آراشیدونیک‌اسید حاصل شد (Kinney et al. 2004). اسیدهای چرب امگا ۶ لینولنیک‌اسید، گامالینولنیک‌اسید، دی‌هموگامالینولنیک‌اسید و آراشیدونیک‌اسید به ترتیب سوبسترات آنزیم دلتا ۱۵ دسچوراز می‌باشند. زمانی که دلتا ۱۵ دسچوراز قارچ *Fusarium* به همراه سازه حاوی آنزیم‌های این مسیر بیان گردید، منجر به افزایش محتوی امگا ۳ دانه‌های سویا به بیشتر از ۵۷٪ با تولید بیشتر از ۱۶٪ اکزپنتانوئیک‌اسید گردید (Damude et al. 2006).

در سویا، لینولنیک‌اسید و آلفالینولنیک‌اسید به ترتیب حدود ۵۵٪ و ۱۰٪ از کل اسیدهای چرب ذخیره‌شده در دانه را شامل می‌گردد. در این محصول نیز مانند کلزا، استفاده از دلتا ۶ دسچوراز به-تنبهایی اجازه تولید مقادیر قابل توجهی از گامالینولنیک‌اسید را می‌دهد. با جداسازی لاین‌های حامل دلتا ۶ دسچوراز گل‌گاوزبان تحت کنترل پروموتور  $\beta$ -conglycin ویژه دانه، سطح گامالینولنیک‌اسید در نسل T<sub>1</sub> به‌طور متوسط از ۳/۴٪ به ۲۸/۷٪ رسید، درحالی‌که سطح استتاریودونیک‌اسید از ۰/۶٪ به ۴/۲٪ افزایش یافت. این مقادیر به‌طور قابل توجهی از نتایج مشاهده شده در کلزا بهتر بودند. این تأکیدی دوباره است براین‌که نه‌تنها دسچوراز، بلکه سطح سوبسترات آندوژن گیاه میزبان و همچنین پروموتورهای استفاده شده بر روی مقدار محصول بدست آمده موثر می‌باشند (Sato et al., 2004).

وو و همکاران در سال ۲۰۰۵ از گونه کلزا (*Brassica juncea*) به‌عنوان میزبان جهت بیوسنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر استفاده کردند که تولید سطحی بیشتر از ۲۵٪ آراشیدونیک‌اسید و ۱۵٪

اکزپانتانویکاسید در دانه‌های تراریخته مشاهده گردید (Wu et al., 2005). رابرت و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از سازه شامل دلتا ۶ و دلتا ۵ دسچوراز که بر روی سوبسترات اسیل COA- عمل می‌کند، تولید ۳/۲٪ اکزپانتانویکاسید و ۱/۶٪ آراشیدونیکاسید را در آرابیدوپسیس تراریخته گزارش کردند. در کنارهم قرار دادن این نتایج اشاره بر این نکته دارد که هر دو ترکیبات ژنی مورد استفاده و انتخاب گیاه میزبان جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر تاثیرگذار می‌باشند.

همچنین وو و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که گونه‌های کلزا گونه *Brassica juncea* حاوی صفر٪ اروسیکاسید میزبان مناسبی جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر می‌باشند، چراکه روغن دانه‌های آن‌ها شامل سطوح بالایی از لینولنیکاسید (۴۰٪) و آلفالینولیکاسید (۱۵٪) می‌باشد (Wu et al., 2005). تحقیقات چنج و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز نشان داد که کلزا گونه *Brassica carinata* با یوراسیکاسید سطح صفر٪ در مقایسه با لاین‌های حاوی اروسیکاسید بالا درصد اسیدهای چرب بلندزنجیر بیشتری تولید می‌کند. دانه‌های کلزا گونه *Brassica carinata* حاوی مقادیر قابل توجهی اسیدچرب لینولیکاسید (۱۶/۵٪) و آلفالینولیکاسید (۱۶٪) می‌باشد، که برای تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر موردنیاز می‌باشند. اگرچه تقریباً ۳۵٪ نیز اروسیک دارند. با تولید کلزای گونه *Brassica carinata* فاقد یوراسیکاسید در مرکز تحقیقاتی - کشاورزی Saskatoon در کانادا، و مقایسه بین این رقم با *Brassica carinata* حاوی اروسیکاسید بالا و *Brassica juncea* با اروسیکاسید سطح صفر٪، نشان داده‌شد که *Brassica carinata* فاقد اروسیکاسید، با تولید اکزپانتانویکاسید بیشتر از ۲۵٪ از کل اسیدهای چرب، پتانسیل خوبی جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر به‌عنوان گونه میزبان دارد. این امر ممکن است تحت تاثیر چندین فاکتور باشد. در لاین اروسیکاسید سطح صفر٪، امگا ۹:۱ ۱۸:۱ طولی نگردیده، بنابراین سطح بالایی از امگا ۶:۲ ۱۸:۲ و امگا ۳:۱ ۱۸:۳ تولید و می‌تواند به‌عنوان سوبسترات جهت تولید اسیدهای چرب بلندزنجیر استفاده گردد. علاوه بر این در *Brassica carinata* با اروسیکاسید سطح صفر٪، آنزیم الانگازی که عهده‌دار تولید

اروسیکاسید می‌باشد وجود نداشته یا غیرفعال است، اما دیگر آنزیم‌های طویل‌سازی وجود دارند. این آنزیم‌ها احتمالاً برای طویل‌سازی تراریخته نیز استفاده می‌شوند، و عدم وجود الانگاز داخلی ممکن است کارایی آن‌ها را افزایش دهد (Cheng et al., 2010).

## ۲-۳- اثر بیان همزمان ژن‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب بر روی میزان بیان

آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۴، تولید تنها ۱/۵٪ آراشیدونیک‌اسید و ۱/۰٪ اکزپنتانوئیک-اسید را در دانه‌های تراریخته شامل ژن‌های دلتا ۶ دسچوراز، دلتا ۵ دسچوراز و دلتا ۶ الانگاز گزارش کردند (Abadi et al., 2004). درحالی‌که کی‌نی و همکاران در همان سال در سویا با بیان همزمان دلتا ۶ و دلتا ۵ دسچوراز به همراه دلتا ۶ الانگاز قارچ *M. alpina* و دلتا ۱۵ و دلتا ۱۷ دسچوراز قارچ *Saprolegnia diclina*، تحت کنترل پروموتور اختصاصی دانه، در گیاه سویا تولید بیش از ۲۰٪ اکزپنتانوئیک‌اسید را در جنین‌های سوماتیک گزارش کردند (Kinney et al., 2004).

توسط بیان همزمان دلتا ۶ و دلتا ۱۲ دسچوراز *Mortierella alpina* لی‌یو<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۱ توانستند سطح گامالینولنیک‌اسید را به ۴۴/۷٪ افزایش داده و همچنین تولید (۱۸:۲) دلتا ۶ و دلتا ۹ را که در بیان به‌تنهایی دلتا ۶ دسچوراز منجر به انباشت مقدار قابل‌توجهی (۴/۵٪) می‌گردد، را حذف کنند (Liu et al., 2001b). زمانی که سازه دلتا ۶ و دلتا ۱۲ دسچوراز *M. alpina* قارچ با لاین‌های تراریخته حامل دلتا ۱۵ دسچوراز *B. napus* همراه گردیدند، استئاریودونیک‌اسید امگا ۳ حدود ۲۳٪ از کل اسیدهای چرب را شامل گردید، اما زمانی که هر سه ژن با هم در یک وکتور قرار گرفتند، سطح استئاریودونیک‌اسید به ۱۶٪ رسید (Ursin et al., 2003).

پتری<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۱ ژن دلتا ۶ دسچوراز استخراج شده از جلبک *Micromonas pusilla* را تحت کنترل پروموتور ۳۵S در گیاه آرابیدوپسیس بیان کردند. بررسی نتایج، تولید ۲۶٪

---

1- Liu

2- Petrie

اکزپانتانویک اسید را تأیید کرد (Petrie et al., 2011).

پتری و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بیان همزمان ژن‌های دلتا ۱۲ دسچوراز قارچ *Lachancea Kluyveri*، دلتا ۱۵ دسچوراز مخمر *Pichia pastoris*، دلتا ۶ دسچوراز جلبک *Micromona pussila* دلتا ۶ و دلتا ۵ دسچوراز جلبک *Pyramimonas cordata*، دلتا ۵ و دلتا ۴ دسچوراز جلبک *Pavlova salina* تحت کنترل پروموتور FAE1 آرابیدوپسیس تالیانا و ناپین کلزا در گیاه آرابیدوپسیس، تولید اکزپانتانویک اسید و دکزاهگزانویک اسید در دانه‌های این گیاه را تأیید کردند. میزان تولید دکزاهگزانویک اسید ۱۵٪ اسیدهای چرب تولیدی محاسبه گردید، که بیشتر از میزان تولید این اسیدهای چرب (۱۲٪) در روغن ماهی بود (Petrie et al., 2012).

در حال حاضر شرکت‌های بیوتکنولوژی Monsanto و Solae گیاهان سویای تراریخته با محتوی ۵-۸٪ گامالینولیک اسید و ۳۰-۱۵٪ استئاریوونیک اسید را تولید می‌کنند. این سویای تراریخته پس از تعیین سلامت به صورت تجاری تولید می‌گردد (Xie, et al., 2014).

تولید گیاهان تراریخته حاوی اکزپانتانویک اسید و دکزاهگزانویک اسید توسط گروه‌های مختلف پژوهشی، با استفاده از راه‌های متفاوت در حال اجراست. با این حال سطح اسیدهای چرب غیراشباع تولیدی به اندازه سطوح روغن حاصل از ماهی نمی‌باشد. ادامه تحقیقات این مسیر جهت افزایش محتوی این اسیدهای چرب در گیاهان بایستی در راستای بهبود تعیین بهترین آنزیم‌های دسچوراز، برقرار نگه‌داشتن جریان مداوم سوبسترات‌های مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع بدون اثر منفی بر روی تری اسیل‌گلیسیروول و بیان همزمان ترانس‌ژن‌ها باشد (Xie, et al., 2014).

## ۴-۲- خالص‌سازی و بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز

ردی<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۳ برای اولین بار ژن دلتا ۶ دسچوراز را از باکتری

---

1- Reddy

cyanobacterium *Synechocystis* خالص‌سازی کرده و در cyanobacterium (*Anabaena*) فاقد این ژن همسانه‌سازی کردند که منجر به تولید گامالینولنیک‌اسید گردید (Reddy et al., 1993). ردی و توماس در سال ۱۹۹۶ این ژن را تحت کنترل پروموتور ۳۵S در گیاه توتون بیان کردند که منجر به تولید حدود ۱٪ گامالینولنیک‌اسید و ۳-۱٪ استئاریودونیک‌اسید از اسیدهای چرب گردید. اما هیچ گامالینولنیک‌اسید یا استئاریودونیک‌اسیدی در دانه گیاهان تراریخته یافت نگردید. که دلیل آن شاید به‌خاطر بیان سطح کمی از این ژن تحت کنترل پروموتور ۳۵S بوده باشد (Reddy et al., 1993). سایوناوا و همکاران در سال ۱۹۹۹ با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده برپایه نواحی حفاظت‌شده پروتئین‌های وابسته، cDNA ژن دلتا ۶ دسچوراز گل‌گاوزبان را خالص کردند. بیان این cDNA در گیاه توتون، تحت کنترل پروموتور، منجر به انباشت تقریباً ۱۳٪ GLA و ۱۰٪ SDA در بافت برگ گردید. درمقابل سطح پایینی از گامالینولنیک‌اسید (تنها حدود ۲٪) در دانه بالغ تجمع پیدا کرد (Sayanova et al., 1999).

چن<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ ژن دلتا ۱۵ و دلتا ۶ دسچوراز را از باکتری *Synechocystis* *sp.* خالص‌سازی کرده و تحت کنترل پروموتور *psbA2*<sup>۲</sup> بیان کردند که ۸/۹ میلی‌گرم بر لیتر آلفالینولنیک‌اسید و ۴/۱ میلی‌گرم بر لیتر استئاریودونیک‌اسید تولید گردید (Chen et al., 2014).

لویی و زو<sup>۳</sup> در سال ۲۰۱۵ ژن دلتا ۶ دسچوراز را از قارچ *Rhizopus oryzae* خالص‌سازی کرده و طول کامل cDNA را در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بیان کردند که منجر به تولید گامالینولنیک‌اسید در این مخمر گردید (Lu, H., & Zhu, Y. 2015).

اولین خالص‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز از قارچ *M. alpina* توسط ساکوردانی و همکاران در

---

1- Chen  
2 - photosystem II D1 protein  
3 - Lu & Zhu

سال ۱۹۹۹ انجام پذیرفت که تحت کنترل پروموتور *amyB*<sup>۱</sup> در قارچ آسپرژیلوس بیان گردید و منجر به تولید ۲۵٪ گامالینولیک اسید گردید (Sakuradani, et al., 1999). این قارچ دارای دو ژن دلتا ۶ دسچوراز می باشد. ژن دوم دلتا ۶ دسچوراز این قارچ نیز در سال ۲۰۰۳ توسط ساکوردانی و همکاران خالص سازی و در قارچ آسپرژیلوس بیان گردید که منجر به تولید ۳۷٪ گامالینولیک اسید از کل اسیدهای چرب شد (Sakuradani, et al., 2003).

در سال ۲۰۱۱ لیو<sup>۲</sup> و همکاران ناحیه ORF ژن دلتا ۶ دسچوراز قارچ *M. alpina* را به همراه توالی افزایش دهنده بیان گیاهی کوزاک همسانه سازی کرده و آن را در مخمر *P.pastoris* بیان کردند. با بررسی درصد گامالینولیک اسید تولیدی، مشخص گردید که این اسیدچرب به میزان ۶/۳٪ تولید گردید (Liu J, et al., 2011).

---

1 - Amylase promoter  
2 - Liu



فصل سوم

مواد و روش ها

## ۳- مواد

### ۳-۱- مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها

مواد شیمیایی شامل IsoAmyl Alcohol, NaCl, PVP, CTAB,  $\beta$ - Mercaptoethanol, Chloroform و Isopropanole, Ethanol, Loading, EDTA, (فرانکفورت، آلمان)، Merck از شرکت (تهرانی، ایران)، Sinaclon، مواد محیط کشت جهت کشت نمونه قارچی و باکتری‌ها شامل Pepton، Decstrose, Glucose و Yeast extract از شرکت سپاهان‌طب (اصفهان، ایران)، آگارز از شرکت Invitrogen (آلمان)، محیط کشت آماده MS، پلنت‌آگار، آنتی‌بیوتیک‌ها شامل آمپی‌سیلین، کانامایسین، ریفامپسین و سفاتوکسیم از شرکت Duchefa (هارلم، هلند) خریداری گردید.

آنزیم‌ها شامل Taq DNA Polymerase به همراه باقی مواد PCR شامل 10x PCR Buffer،  $T_4$  DNA Ligas, M-MuLV Reverse Transcriptas, DNaseI, Ribonuclease A, dNTP,  $MgCl_2$  و آنزیم‌های برشی *SacI*, *XbaI*, *HindIII* از شرکت فرمنتاز (کانادا) تهیه گردید. کیت استخراج از ژل و آغازگرها از شرکت بایونیر (آلمان) تهیه شد.

### ۳-۲- تجهیزات مورد استفاده

شیکرانکوباتور Labnet (کره جنوبی)، اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، سانتریفیوژ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، ترازو Sartorius (فرانسه)، سمپلر ۱۰۰ $\mu$ l، ۱۰۰۰ $\mu$ l و ۱۰۰۰۰ $\mu$ l Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (اتسو، ژاپن)، pH متر Hanna (مجارستان)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، میکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل‌داک Quantum ST4 (فرانسه)، ترانس ایلومینیتور (تهران، ایران)، هات‌پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، یخچال - فریزر ۲۰- پارس و ژرمیناتور (تهران، ایران)

## میکروارگانیزم‌ها

در این تحقیق از دو باکتری *Esherichia coli* نژاد DH5 $\alpha$  (شامل سویه فاقد پلاسمید، سویه حاوی پلاسمید (+) pBluescript SK، سویه حاوی پلاسمید pBI121 تهیه شده از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، سویه حاوی پلاسمید pBluescript KS – Napin از دانشگاه رازی کرمانشاه، سویه *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 تهیه شده از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری و قارچ *Mortierella alpina* تهیه شده از دانشگاه تربیت مدرس استفاده گردید.

## روش‌ها

### ۳-۳- تهیه و نگهداری میکروارگانیزم

برای جداسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، در این تحقیق از قارچ *Mortierella alpina* استفاده گردید. نمونه به صورت کشت جامد از دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. کشت در محیط YPD<sup>1</sup> حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون و ۲۰ گرم دکستروز صورت گرفت. این مواد در یک لیتر آب مقطر حل و pH آن بر روی ۶ تنظیم گردید. برای محیط جامد از ۱۵ گرم بر لیتر آگار استفاده شد. محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو و سپس در پتری‌دیش استریل توزیع گردید. قطعه حدود نیم سانتی متری از محیط کشت جامد حاوی قارچ برداشته شده و بر روی محیط جدید قرار گرفت و در درجه حرارت ۲۶°C، به مدت ۵ روز انکوبه و پس از مشاهده رشد میسلیوم‌های قارچ بر روی محیط کشت، در دمای ۴°C نگهداری گردید.

از روش تعلیق میسلیومی جهت کشت‌های استخراج استفاده گردید. بدین صورت که بخشی از میسلیوم قارچ از محیط کشت جامد، در محیط YPD مایع تلقیح و به مدت دو شبانه روز در درجه حرارت

---

1 - Yeast Extract-Peptone-Dextrose media

۲۶°C و ۱۵۰rpm<sup>۱</sup> در شیکر انکوباتور قرار گرفت.

## ۲-۴- استخراج DNA

ابتدا جداسازی ۱۰۰-۵۰ میلی گرم توده قارچی توسط کاغذ صافی واتمن صورت پذیرفت و بعد از چند مرتبه شستشوی توده توسط آب مقطر استریل، جهت خارج شدن محیط کشت، اجازه داده شد تا توده خشک گردیده و آب اضافی خارج گردد.

استخراج DNA به روش CTAB<sup>۲</sup> (Doyle et al., 1987) صورت پذیرفت. نمونه قارچی در ازت مایع درون هاون چینی که قبلا در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو گردیده بود، پودر گردید. پودر حاصل به میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل گردید. ۱ میلی لیتر بافر استخراج CTAB حاوی ۰.۲٪ پودر CTAB، Tris-base ۱ مولار، NaCl ۵ مولار و EDTA ۰/۵ مولار با pH=۸ به نمونه اضافه گردیده و کاملا ورتکس شد تا همگن گردید. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵°C قرار گرفت. ۲/۵ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به میکروتیوب افزوده گردیده و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C و با دور ۱۲۰۰۰rpm صورت پذیرفت. فاز رویی به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و ۸۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل با نسبت ۱:۲۴ به آن افزوده و چند مرتبه به آرامی معکوس گردید، تا کلروفرم کاملا مخلوط گردد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. در این مرحله ۳ فاز تشکیل شد (فاز رویی شامل محلول DNA- RNA، فاز میانی شامل پروتئین و کربوهیدراتها و فاز زیری شامل کلروفرم). فاز رویی به آرامی برداشته شد و به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. شستشو با کلروفرم-ایزوامیل الکل برای جلوگیری از آلودگی احتمالی تکرار شد. جهت رسوب DNA، ۳۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۷/۵ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول کاملا سرد افزوده شد، مخلوط حاصل به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰°C- قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در

1 - Revolutions per minute

2 - cetyltrimethylammonium bromide

۱۲۰۰۰rpm، رسوب DNA در انتهای میکروتیوب تشکیل گردید. فاز رویی کشیده شد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به رسوب افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm تکرار شد. مایع رویی برداشته شد و شستشوی مجدد این بار با الکل ۷۰٪ صورت پذیرفت. سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm صورت گرفت. فاز رویی کاملاً خارج شد و میکروتیوب به مدت نیم ساعت به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی استریل قرار گرفت تا پلیت کاملاً خشک شود. پس از اطمینان از تبخیر کامل الکل، ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه به پلیت افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد و سپس به فریزر ۲۰°C منتقل گردید.

### ۳-۴-۱- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید.

### ۳-۴-۱-۱- بررسی کمیت DNA توسط اسپکتروفتومتری

در این روش، غلظت و خلوص DNA به صورت کمی با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می گردد. ابتدا دستگاه با استفاده از حلال DNA - آب مقطر - کالیبره گردید. در این روش از رقت ۱ به ۱۰۰ نمونه DNA در آب مقطر استفاده می شود. مقدار اشعه ماوراء بنفش جذب شده توسط محلول با مقدار DNA موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می شود. در این طول موج یک واحد جذب، معادل ۵۰ میکروگرم DNA دورشته ای در هر میلی لیتر است. از اسپکتروفتومتر جهت بررسی خلوص DNA هم می توان استفاده کرد. در نمونه DNA خالص، نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱/۸ می باشد. میزان جذب نور ۲ میکرولیتر از نمونه DNA در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ محاسبه گردید. کمیت نمونه DNA با استفاده از رابطه محاسبه شد:

$$\text{ضریب رقت}/260 \text{ OD} \times 50 = (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \text{ غلظت DNA}$$

### ۳-۴-۲- الکتروفورز

جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی و تعیین میزان آلودگی از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده می‌گردد. هرچه میزان اسمیر کمتر باشد، نشانگر کیفیت بالای استخراج است. همچنین وجود آلودگی در نمونه استخراجی، باعث ایجاد خطا در کارهای مولکولی می‌گردد. لذا تعیین کیفیت از اهمیت بالایی برخوردار است. ۵ میکروگرم از نمونه DNA به همراه نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp بر روی ژل آگارز ۱٪، در جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ DNA safe stain صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس‌برداری از ژل، DNA مورد نظر از نظر شکستگی بررسی گردید.

برای تهیه بافر الکتروفورز (بافر TBE) که به صورت استوک ۵X تهیه و نگهداری می‌گردد، ۵۴ گرم Tris base، ۲۷/۵ گرم اسید بوریک و ۲۰ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار با pH=۸، مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. pH محلول روی ۸ تنظیم گردید. سپس با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. (این استوک به صورت ۱X مصرف می‌گردد).

برای تهیه ژل آگارز ۱ درصد، ۱ گرم آگارز به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE اضافه و برای ذوب شدن در ماکروویو قرار داده شد. پس از شستن شانه و سینی ژل با استفاده از آب مقطر استریل و بستن دو سمت آزاد سینی، آگارز ذوب شده به قطر نیم سانتی‌متر ریخته شد. پس از بستن کامل ژل، شانه به آرامی کشیده شد و ژل درون تانک حاوی بافر TBE به گونه‌ای قرار داده شد که بافر حدود یک میلی‌متر سطح ژل را بپوشاند. ۵ میکرولیتر نمونه با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری<sup>۱</sup> مخلوط و درون چاهک ژل بارگذاری گردید.

### ۳-۴-۲- استفاده از RNase جهت حذف RNA

برای حذف RNA از DNA استخراجی، از RNase استفاده گردید. ۳ میکرولیتر RNase به

---

1 - Loading dye

میکروتیوب حاوی DNA افزوده گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰°C در حمام آب گرم قرار گرفت. در نهایت برای غیر فعال سازی آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شد.

### ۳-۵- انجام واکنش PCR

DNA استخراجی جهت اطمینان از وجود ژن دلتا ۶ دسچوراز در گونه فارچی، قبل از مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA استفاده گردید. بنابراین ابتدا یک جفت آغازگر داخلی بر اساس این ژن طراحی و واکنش PCR انجام گرفت (جدول ۱-۳).

جدول ۱-۳: آغازگرهای داخلی طراحی شده جهت ژن دلتا ۶ دسچوراز

ژن	آغازگر	توالی آغازگر	%GC	TM	سایز قطعه تکثیری
D6 Desaturase (Internal primer)	Forward	5'- GCTACTACGACTCATCCAAGG -3'	52/4%	54/5	701 bp
	Reverse	5 GAACACAATCGCTAACAGG -3'	47/4%	51/2	

آغازگرهای توالی داخلی بر اساس توالی این ژن در سایت NCBI طراحی و تهیه گردیدند. برای انجام واکنش PCR، از دستورالعمل ویلیامز<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۹۰) استفاده گردید. جهت تهیه ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰X (که شامل ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCL ۱X دارای اسیدیته ۸/۳، ۵۰۰ میلی مولار کلریدپتاسیم، ۱۵ میلی مولار کلرید منیزیم و ۰/۰۱٪ (حجمی/وزنی) ژلاتین می باشد)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۵ μunit/ μl و ۱۳ میکرولیتر  $H_2O$  دوبار تقطیر استفاده گردید (جدول ۲-۳).

جدول ۳-۲: غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR (حجم ۲۰ میکرولیتر)

نام ماده	مقادیر (میکرولیتر)
10× PCR buffer	2/5 μl
MgCl <sub>2</sub> (50 mμ)	1/5 μl
dNTP (10 mμ)	0/5 μl
Forward Primer	1 μl
Reverse Primer	1 μl
DNA	1 μl
Taq DNA Polymerase	0/5 μl
ddH <sub>2</sub> O	12 μl

### ۳-۵-۱- شرایط بهینه انجام واکنش PCR

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۲۵ سیکل (واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴°C، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۴°C و بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲°C) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳: پروفایل دمایی مورد استفاده در واکنش PCR

مرحله	مرحله واکنش	دما (°C)	زمان (دقیقه)
مرحله اول	واسرشت‌سازی اولیه	۹۴	۵
	واسرشت‌سازی	۹۴	۱
مرحله دوم	اتصال	۵۵	۱
	بسط	۷۲	۱
مرحله سوم	بسط نهایی	۷۲	۵

### ۳-۶- استخراج RNA کل از قارچ

جهت جلوگیری از آلودگی RNA با RNase دو روز قبل از استخراج تمام وسایل شامل میکروتیوب‌ها، سرسمپلرها و هاون در آب<sup>۱</sup> DEPC قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت وسایل دومرتبه اتوکلاو گردیدند. سپس استخراج به روش RNX- Plus به شرح زیر انجام پذیرفت.

1 - Diethyl pyrocarbonate



ابتدا ۱۰۰-۵۰ میلی گرم توده میسیلیومی رشد کرده در محیط YPD چند مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد، در ازت مایع پودر گردیده و به میکروتیوب ۲ میکرولیتری منتقل گردید. ۱ میلی لیتر، RNX- Plus به میکروتیوب اضافه شد، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط حاصل اضافه، ۱۵ ثانیه به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ گردید. مایع رویی به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل گردید و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده شده، به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ گردید. در این مرحله پلیت تشکیل گردید. مایع رویی حاوی ایزوپروپانول دور ریخته شد. پلیت با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و به آرامی ورتکس گردید، تا پلیت از میکروتیوب جدا شده و در محلول شناور گردد. مجدداً به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی خارج شد و میکروتیوب به مدت نیم ساعت به صورت وارونه در دمای اتاق قرار داده شد، تا کاملاً خشک گردد. رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب حل و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۵۵°C قرار داده شد.

### ۳-۶-۱- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی

#### ۳-۶-۱-۱- بررسی کمیت RNA توسط روش اسپکتروفوتومتری

همانند DNA در این روش، غلظت و خلوص RNA بصورت کمی با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می گردد. ابتدا دستگاه با استفاده از حلال RNA - آب مقطر - کالیبره گردید. ۲ میکرولیتر از نمونه RNA در ۱۹۸ میکرولیتر آب مقطر درون کووت کوارتز ریخته شد. میزان جذب نور ابتدا در طول موج ۲۶۰ و سپس ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

$$\text{ضریب رقت} / ۲۶۰ \text{ OD} \times ۴۰ = \text{غلظت DNA}$$

### ۳-۶-۲- بررسی کیفیت RNA توسط الکتروفورز

در الکتروفورز جهت بررسی کیفیت RNA استخراجی در یک نمونه سالم قارچی دو باند باید تشکیل گردد که مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s می‌باشد. برای این کار از ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید.

### ۳-۶-۲- افزودن DNase

جهت حذف DNA از RNA استخراجی، ابتدا ۵ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر  $MgCl_2$  و ۰/۵ میکرولیتر DNase به میکروتیوب اضافه گردید. حجم با افزودن ۳/۵ میکرولیتر آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و ۳۰ دقیقه در دمای  $۳۷^{\circ}C$  انکوبه گردید. جهت غیرفعال‌سازی آنزیم ۱ میکرولیتر EDTA افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $۶۵^{\circ}C$  قرار داده شد.

### ۳-۷- سنتز cDNA

به ۱۰ میکرولیتر RNA حاصل از افزودن DNase، ۱ میکرولیتر Oligo dT افزوده و حجم با افزودن ۱/۵ میکرولیتر آب DEPC به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. ۱۵ ثانیه در  $۱۳۰۰۰rpm$  سانتریفوژ گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای  $۶۵^{\circ}C$  قرار داده شد. میکروتیوب بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید. ۲ میکرولیتر Reaction buffer، ۲ میکرولیتر dNTP Mix و ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase اضافه شد و حجم نهایی با افزودن ۲/۵ میکرولیتر به ۲۰ رسانده شد. ۱۵ ثانیه در  $۱۳۰۰۰rpm$  سانتریفوژ گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $۴۲^{\circ}C$  انکوبه گردید. با ۱۰ دقیقه قرار دادن در دمای  $۷۰^{\circ}C$  واکنش خاتمه یافت. cDNA سنتز شده برای انجام واکنش PCR در دمای  $۲۰^{\circ}C$  نگهداری گردید.

### ۳-۷-۱- بررسی صحت سنتز cDNA

قبل از انجام واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی، جهت اطمینان از صحت سنتز

cDNA، نیاز به یک ژن همیشه بیان می‌باشد. در این تحقیق از آغازگر عمومی اکتین جهت این بررسی استفاده گردید. دمای اتصال ۵۴°C بدست آمد (جدول ۳-۲).

جدول ۳-۴: توالی آغازگرهای عمومی اکتین

ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگر	%GC	TM	سایز قطعه تکثیری
Actin	Forward	5'- TGGGAACAGTGTGGGTGA -3'	55/6%	56/3	200 bp
	Reverse	5'- CGAGTTGCGTGTCGCC -3'	68/8%	57/3	

### ۳-۸- انجام واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز

پس از اطمینان از صحت سنتز cDNA توسط آغازگرهای عمومی اکتین، واکنش PCR جهت خالص‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز انجام پذیرفت. آغازگرهای ژن دلتا ۶ دسچوراز، بر اساس طول کامل ژن موردنظر در قارچ *Mortierella alpina* از سایت NCBI، و توسط نرم‌افزار Oligo analyzer طراحی گردیدند (جدول ۳-۵). در آغازگر رفت توالی افزایش‌دهنده بیان گیاهی کوزاک به‌صورت هم-پوشان با جایگاه برشی *XbaI* و کدون آغاز در نظر گرفته شد. در آغازگر برگشت سایت برشی *SacI* اضافه شد. در طراحی آغازگرها اصول استاندارد شامل طول آغازگر، دمای اتصال، درصد GC، ایجاد دایمر آغازگر و ایجاد لوپ در نظر گرفته شد. نقشه محدودالایژن، توسط نرم‌افزار NEB Cutter آنالیز گردید. دو توالی اضافی به‌عنوان لنگرگاه آنزیم، جهت افزایش کارایی برش آنزیم‌های برشی و همچنین نرمال‌سازی تعداد بازهای پورین و پیریمیدین به ابتدای آغازگرها افزوده گردید. دمای اتصال این آغازگر با استفاده از سایت Oligo analyzer، ۶۲°C بدست آمد (جدول ۳-۳).

**جدول ۳-۵:** توالی ژن دلتا ۶ دسچوراز قارچ *M. alpina* با شماره دسترسی AF110510 با طول ۱۶۱۷ bp. ناحیه CDS از نوکلئوتید ۱۴۴۴...۷۱ به صورت زیرخطدار مشخص گردیده است.

```

1 cgacactcct tccttcttct caccgctcct agtccccttc aacccccctc tttgacaaaag
61 acaacaaacc atggctgctg ctcccagtgt gaggacgttt actcgggccg aggttttgaa
121 tgccgaggct ctgaatgagg gcaagaagga tgccgaggca cccttcttga tgatcatcga
181 caacaagggtg tacgatgtcc gcgagtctgt ccctgatcat cccgggtggaa gtgtgattct
241 cacgcacggt ggcaaggacg gcaactgact ctttgacact tttcaccccc aggctgcttg
301 ggagactcct gccaaactttt acgttgggtga tattgacgag agcgaccgcg atatcaagaa
361 tgatgacttt gcggccgagg tccgcaagct gcgtaccttg ttccagtctc ttggttacta
421 cgattcttcc aaggcatact acgccttcaa ggtctcgttc aacctctgca tctgggggtt
481 gtcgacggtc attgtggcca agtggggcca gacctcgacc ctcgccaacg tctctctggc
541 tgcgcttttg ggtctgttct ggcagcagtg cggatgggtg gctcacgact ttttgcacga
601 ccaggctctc caggaccgtt tctgggggtga tcttttcggc gccttcttgg gagggtctctg
661 ccaggctctc tctcctcgt ggtggaagga caagcacaac actcaccacg ccgcccccaa
721 cgtccacggc gaggatcccg acattgacac ccaccctctg ttgacctgga gtgagcatgc
781 gttggagatg ttctcggatg tcccagatga ggagctgacc cgcatgtggt cgcgtttcat
841 ggtcctgaac cagacctggt tttacttccc cattctctctg tttgcccgtc tctcctggtg
901 cctccagtcc attctctttg tgctgcctaa cggtcaggcc cacaagccct cgggocgocg
961 tgtgcccatc tcgttggctg agcagctgtc gcttgcgatg cactggacct ggtacctcgc
1021 caccatgttc ctgttcatca aggatcccg caacatgctg gtgtactttt tgggtgtcga
1081 ggcgggtgtc ggaaacttgt tggcgatcgt gttctcgtc aaccacaacg gtatgcctgt
1141 gatctcgaag gaggaggcgg tcgatatgga tttcttcacg aagcagatca tcacgggtcg
1201 tgatgtccac ccgggtctat ttgccaactg gttcacgggt ggattgaact atcagatcga
1261 gcaccacttg ttcccttcca tgccctcgcca caacttttca aagatccagc ctgctgtcga
1321 gaccctgtgc aaaaagtaca atgtccgata ccacaccacc ggtatgatcg agggaactcg
1381 agaggctctt agccgtctga acgaggcttc caaggetgce tccaagatgg gtaaggcgca
1441 gtaaaaaaaa aaacaaggac gttttttttc gccagtgcct gtgctctgtc ctgcttccct
1501 tgtcaagtgc agcgtttctg gaaaggatcg ttcagtgcag tatcatcatt ctctttttac
1561 cccccgctca tatctcattc atttctctta ttaaacaact tgttcccccc ttcaccg

```

**جدول ۳-۶:** توالی آغازگرهای ژن دلتا ۶ دسچوراز به همراه توالی کوزاک و سایت‌های برشی

ژن	آغازگر	توالی آغازگر	%GC	TM	سایز قطعه تکثیری
Δ6 Desaturase	Forward	5'-AATCTAGACCACCATGGCTGCTGCTCCCAG-3'	56.7%	66.2	1412 bp
	Reverse	5'-GCGAGCTCTTACTGCGCCTTACCCATCTTG-3'	56.7%	65.6	

### ۳-۸-۱- الکتروفورز محصول PCR

الکتروفورز محصول PCR، به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ صورت گرفت. از نشانگر وزن

مولکولی ۱۰۰ bp برای شناسایی و اطمینان از صحت تکثیر قطعه موردنظر استفاده گردید.

### ۳-۹- استخراج از ژل محصول PCR توسط Gel Recovery Kit

استخراج از ژل توسط کیت استخراج انجام پذیرفت. بدین صورت که ابتدا محصول PCR به- همراه نشانگر مولکولی بر روی ژل برده شد. برای تفکیک کامل باندها از یکدیگر ولتاژ به ۹۰ کاهش و زمان الکتروفورز به ۴۰ دقیقه افزایش یافت. سپس قطعه موردنظر از روی ژل برش یافت و استخراج براساس پروتکل کیت انجام پذیرفت.

#### ۳-۹-۱- اجزاء تشکیل دهنده کیت

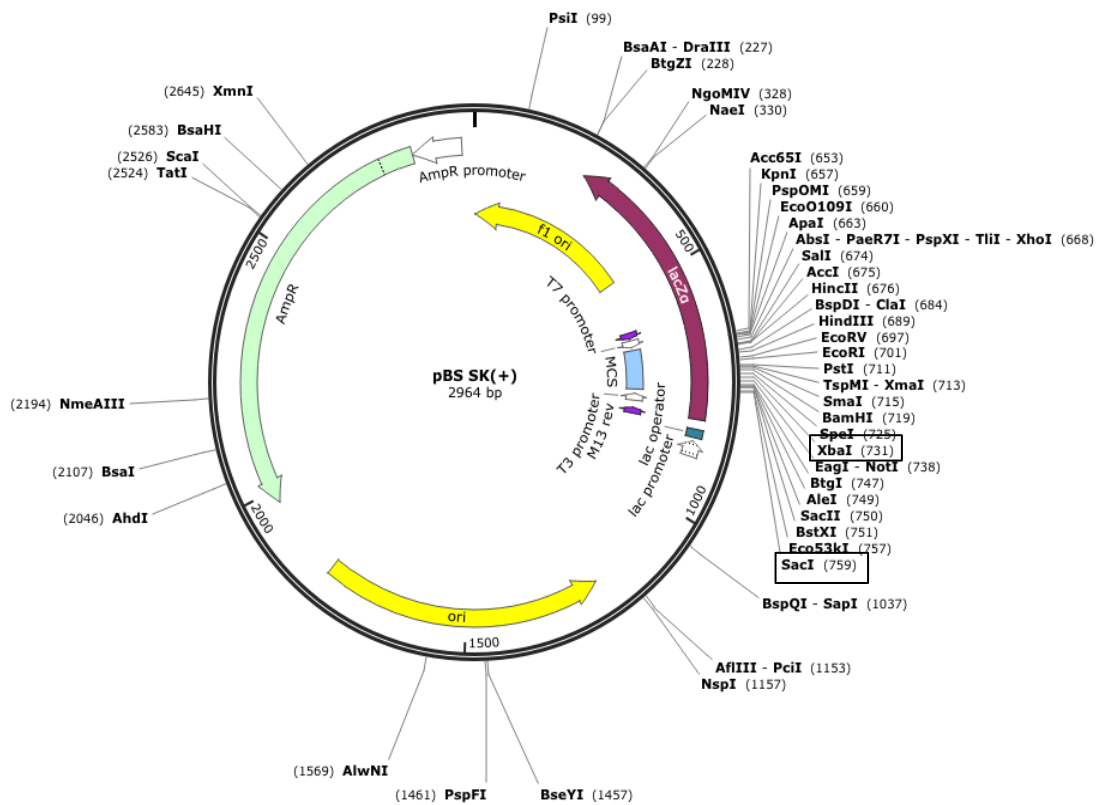
کیت شامل ۳ بافر، بافر شماره ۱ (Gel Binding Buffer)، بافر شماره ۲ (Washing Buffer)، بافر شماره ۳ (Elution Buffer) و میکروتیوب‌های ستون‌دار جهت استخراج بود.

#### ۳-۹-۲- روش کار

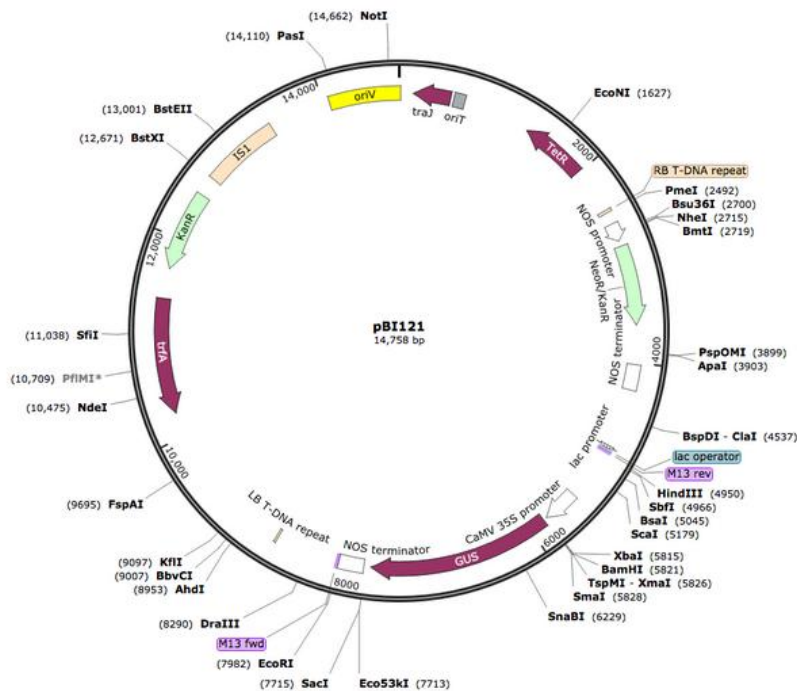
ابتدا برش قطعه موردنظر از روی ژل انجام پذیرفت و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۱ اضافه و در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از ۱۰ دقیقه ژل کاملاً حل و محلول به ستون منتقل شد و به مدت ۱ دقیقه در دور  $13000\text{rpm}$  سانتریفوژ شد. ستون خارج شد و به میکروتیوب ۲ میکرولیتری منتقل گردید. به اندازه ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ اضافه و ۱ دقیقه با دور  $13000\text{rpm}$  سانتریفوژ شد. دوباره ستون خارج و در یک میکروتیوب ۲ میکرولیتری قرار داده شد. مراحل افزودن بافر شماره ۲ و سانتریفوژ تکرار گردید، تا ناخالصی‌ها از ستون خارج گردد. برای خشک کردن اتانول، ستون برداشته شده و در میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری قرار داده شد و ۱ دقیقه با دور  $13000\text{rpm}$  سانتریفوژ شد. از بافر شماره ۳ به میزان ۳۰ میکرولیتر در مرکز ستون ریخته شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس با دور  $13000\text{rpm}$  سانتریفوژ گردید. جهت اطمینان از صحت اندازه قطعه استخراچی و خلوص آن ۴ میکرولیتر از محصول استخراچی بر روی ژل برده شد.

### ۳-۱۰- استخراج پلاسمید

در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  حاوی پلاسمیدهای pSK جهت توالی‌یابی، pKS- napin جهت الحاق پروموتور به ابتدای ژن دلتا ۶ دسچوراز و pBI121 به عنوان ناقل دوگانه جهت انتقال به گیاه و بررسی بیان ژن استفاده گردید. (شکل ۳-۱ و ۳-۲)



شکل ۳-۱: نقشه پلاسمید pBluescriptSK(+) با طول ۲۹۵۸ bp حاوی نشانگر آمپی‌سیلین و ژن  $\beta$  گالاکتوزیداز که امکان غربالگری کلونی‌های آبی-سفید را فراهم می‌کند. این پلاسمید همچنین حاوی پرایمرهای T3 و T7 جهت توالی‌یابی ژن الحاقی می‌باشد. سایت‌های برشی مورد استفاده جهت همسانه‌سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز (*XbaI-SacI*) مشخص گردیده‌اند.



شکل ۳-۲: نقشه پلاسمید pBI121 با طول ۱۴۷۵۸ bp حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین، تحت کنترل راه انداز CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS که موجب بیان ژن در سلول‌های موجودات پرسلولی می‌شود. این پلاسمید دارای مناطق مرزی چپ و راست موجود در پلاسمید Ti است، که در انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی نقش دارند.

### ۳-۱۰-۱- کشت باکتری

به منظور کشت باکتری *E. coli* سویه DH5α در طول انجام مراحل همسانه‌سازی، از محیط کشت‌های LB<sup>۱</sup> مایع و LB-آگار دار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی آمپی‌سیلین و کانامایسین (برحسب وکتور موردنظر) استفاده گردید. برای تهیه ۱ لیتر محیط LB، ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم کلرید سدیم و ۱۰ گرم پودر آگار حل و توسط آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. جهت استریل کردن از اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ بار استفاده گردید. پس از اتوکلاو و رسیدن دمای محلول به حدود ۴۵°C محیط کشت در زیر هود توزیع گردید. در ازاء هر لیتر از L-Agar، ۱ میلی‌لیتر از هریک از استوک‌های آمپی‌سیلین، IPTG، X-Gal به محیط کشت افزوده شد. با استفاده از چند مرتبه وارونه کردن شیشه محیط یک‌دست گردیده و در پتری‌های استریل ریخته شد

1- Luria-Bertani medium

و اجازه داده شد تا محیط کاملا ببندد. جهت اطمینان از عدم آلودگی، پلیت‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق قرار داده شدند.

### ۳-۱۰-۱- تهیه استوک 3% X-Gal<sup>۱</sup>

جهت تهیه استوک، ۰/۰۳ گرم X-Gal در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید حل گردید. این محلول نیازی به فیلتر شدن ندارد، اما جهت حفاظت از نور توسط فویل پوشانده شده و در فریزر ۲۰°C- نگهداری گردید.

### ۳-۱۰-۲- تهیه استوک ۱۰۰ میلی‌مولار IPTG<sup>۲</sup>

به میزان ۰/۱ گرم IPTG در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل و توسط فیلتر کردن استریل و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

### ۳-۱۰-۳- کشت مایع باکتری جهت استخراج پلاسمید

پس از کشت باکتری در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی یک تک کلون برداشته شده و در محیط LB- مایع حاوی آنتی‌بیوتیک به منظور استخراج پلاسمید کشت شبانه گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع باکتری به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۸ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی خارج شده و میکروتیوب به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار داده شد تا رطوبت آن گرفته شود. از محلول سرد شماره ۱، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب‌ها اضافه گردید (جدول ۳-۷) و پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. از محلول شماره ۲، که به صورت تازه تهیه شده بود (جدول ۳-۸) ۳۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب‌ها افزوده گردید و چند مرتبه مخلوط گردید. مجدداً میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. مقدار ۴۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۳ (جدول ۳-۹) به صورت کاملاً سرد، به مخلوط داخل

1 - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

2 - Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside



میکروتیوب‌ها اضافه و پس از چند مرتبه مخلوط شدن، دوباره به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از این مرحله ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴°C صورت پذیرفت. در انتها حدود ۹۰۰ میکرولیتر محلول شناور در میکروتیوب‌ها باقی ماند. این محلول به دو میکروتیوب جدید منتقل، دو برابر حجم ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰°C قرار داده شد. پس از ۱ ساعت، ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ و محلول رویی خارج شد. رسوب با یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. اتانول بطور کامل خارج گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند. در انتها ۲۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به رسوب باقیمانده افزوده شد.

**جدول ۳-۷:** مواد مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ میلی لیتر محلول I استخراج پلاسمید (GET buffer)

مقادیر (گرم)	غلظت (میلی مولار)	مواد مورد نیاز
۸/۵۵۷	۵۰	Glucose
۱/۸۶	۱۰	EDTA
۱/۹۴	۲۵	(pH=۸)Tris-HCl

**جدول ۳-۸:** مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱ میلی لیتر از محلول II جهت استخراج پلاسمید (Lyses buffer)

مقادیر (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۴۰	هیدروکسید سدیم ۵ نرمال
۱۰۰	SDS ۱۰ درصد
۸۶۰	آب دیونیزه

**جدول ۳-۹:** مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از محلول III جهت استخراج پلاسمید

مقادیر (میلی لیتر)	مواد مورد نیاز
۶۰	استات پتاسیم ۵ مولار
۱۱/۵	اسید استیک
۲۸/۵	آب دیونیزه

### ۳-۱۰-۳- الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید

جهت بررسی کمیت و کیفیت پلاسمید استخراجی از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ با ولتاژ ۸۰ میلی‌ولت به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. در شرایط ایده‌آل الگوی سه باندهای مربوط به اشکال مختلف پلاسمید مانند سوپرکویل<sup>۱</sup>، خطی<sup>۲</sup> و حلقوی<sup>۳</sup> مشاهده می‌گردد.

### ۳-۱۱- هضم آنزیمی پلاسمید و ژن دلتا ۶ دسچوراز جهت همسانه‌سازی

جهت همسانه‌سازی ژن مورد نظر، پلاسمید pSK توسط آنزیم‌های برشی *XbaI*- *SacI* با نسبت‌های زیر برش داده شد. ۸/۲ میکرولیتر آب، ۸ میکرولیتر پلاسمید، ۲ میکرولیتر بافر تانگو، ۰/۸ میکرولیتر آنزیم *XbaI* و ۱ میکرولیتر آنزیم *SacI* (به دلیل فعالیت کمتر این آنزیم نسبت به *XbaI*)، به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۳-۲/۵ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های برشی از دمای ۶۵°C به مدت ۲۰ دقیقه استفاده گردید. ژن دلتا ۶ دسچوراز نیز به همین ترتیب مورد هضم قرار گرفت. فقط به جای پلاسمید از محصول استخراج از ژل این ژن استفاده گردید (جدول ۳-۱۰).

جدول ۳-۱۰: مقادیر مورد نیاز جهت هضم آنزیمی پلاسمید و قطعه ژن مورد نظر

مقادیر (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۸ $\mu$ l	قطعه DNA یا پلاسمید
۲ $\mu$ l	بافر تانگو
۰/۸ $\mu$ l	آنزیم <i>XbaI</i>
۱ $\mu$ l	آنزیم <i>SacI</i>
۸/۲ $\mu$ l	آب دیونیزه

- 1 - Supercoiled
- 2 - Nicked
- 3 - Open Circle

### ۳-۱۲-اتصال<sup>۱</sup>

قطعه ژن دلتا ۶ دسچوراز پس از هضم آنزیمی، با استفاده از دستور کیت استخراج، از روی ژل خالص سازی گردید. جهت اتصال این قطعه به پلاسمید pSK، از نسبت ۳ به ۱ استفاده گردید. بنابراین جهت تهیه محلول اتصال ۱۲ میکرولیتر DNA و ۴ میکرولیتر پلاسمید برش یافته، ۲ میکرولیتر بافر اتصال، ۱/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و در انتها ۰/۵ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase اضافه و پس از مخلوط کردن مواد واکنش، ۱ ساعت در دمای ۱۶°C انکوبه گردید (جدول ۳-۱۱).

جدول ۳-۱۱: مقدار و مواد مورد نیاز جهت اتصال دو قطعه وسط آنزیم T4 DNA ligase

مقادیر (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۱ µl	بافر آنزیم
۳ µl	ناقل
۱۲ µl	محصول PCR
۰/۵ µl	آنزیم T4 DNA ligase
۳/۵ µl	آب دیونیزه

### ۳-۱۳-تهیه سلول های مستعد<sup>۲</sup>

جهت تهیه سلول های مستعد باکتری *E. coli*، از استوک باکتری *E. coli* سویه DH5α به داخل ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع (اتوکلاو شده در داخل فالكون) تلقیح انجام، و به صورت کشت شبانه در داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C با دور ۱۸۰rpm قرار گرفت. پس از گذشت ۱۶ ساعت باکتری های کشت داده شده با نسبت ۱ به ۴۹ در محیط LB اتوکلاو شده در زیر هود، رقیق شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور با دور ۲۰۰rpm انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر محلول به میکروتیوب های ۱/۵ منتقل گردیده و سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه بر

1 - Ligation  
2 - Competent Cells

روی یخ قرار گرفتند. در مرحله بعد باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm رسوب داده شدند. سپس مایع روئی دور ریخته شد و به باکتری‌های رسوب داده شده مقدار ۱ میلی‌لیتر کلرید منیزیم ۱۰۰ میلی‌مولار کاملاً سرد اضافه گردید و به آرامی محیط یکنواخت گردید. دوباره عمل سانتریفیوژ همانند مرحله قبل اجرا گردید. پس از دور ریختن مایع روئی مقدار ۱ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (سرد) به رسوب اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت بر روی یخ قرار داده شدند.

پس از گذشت مدت زمان موردنظر نمونه‌ها همانند مرحله قبل سانتریفیوژ شده و در کنار شعله، مایع روئی به نحوی خارج گردید که در حدود ۱۰۰ میکرولیتر از مایع روی رسوب باقی ماند. در این مرحله سلول‌ها آماده دریافت DNA خارجی می‌باشند. جهت حفاظت باکتری‌ها از انجماد، به نمونه‌ها ۴۰ میکرولیتر گلیسرول مایع اتوکلاو شده اضافه و پس از مخلوط کردن آرام، در فریزر ۲۰°C- نگهداری گردید. این نمونه‌ها به مدت ۱ ماه در این دما قابل نگهداری هستند.

### ۳-۱۴- انتقال پلاسمید نو ترکیب به میزبان باکتریایی

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال در زیر هود به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* اضافه گردید و پس از زدن چند ضربه آرام انگشت به تیوب (به منظور مخلوط شدن) میکروتیوب‌ها به مدت ۴۰ دقیقه مجدداً بر روی یخ قرار گرفتند. در مرحله بعد به منظور ایجاد شوک حرارتی میکروتیوب ۲ دقیقه داخل حمام آب گرم با دمای ۴۲°C قرار داده شده و بلافاصله پس از گذشت زمان مورد نظر به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول استریل شده LB در کنار شعله به میکروتیوب افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. پس از ۱ ساعت نگهداری، ۸ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد. مایع روئی در کنار شعله به نحوی خارج شد، که ۴۰۰ میکرولیتر بر روی رسوب باقی ماند. رسوب حاصله به آرامی یک‌دست گردید. در مرحله بعد، از نمونه ترانسفورم شده ۵۰ میکرولیتر در محیط کشت LB جامد

حاوی X-Gal و Amp- IPTG پخش گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید.

### ۳-۱۵- غربالگری کلونی‌های به دست آمده

سویه باکتری *E. coli* DH5α یک باکتری لاکتوز منفی است و ناقل pSK علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، امکان غربالگری کلونی‌های آبی- سفید را نیز فراهم می‌کند. این ناقل دارای یک منطقه lacZ می‌باشد که زیر واحد آلفا برای آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌باشد. همچنین قسمت MCS این پلاسمید نیز در همین ناحیه قرار داده شده است. در ترانسفورم باکتری *E. coli* سه حالت ممکن است ایجاد گردد: باکتری‌های فاقد پلاسمید به علت عدم مقاومت به آمپی‌سیلین بر روی محیط کشت انتخابی رشد نمی‌کنند. باکتری‌های با پلاسمید خالی به آمپی‌سیلین مقاوم بوده و چون زیر واحد آلفا توسط قسمت lacZ ناقل بیان می‌شود، لذا در محیط کشت انتخابی رشد کرده و در حضور IPTG و X-Gal اپران لاکتوز روشن شده، با شکستن X-Gal کلونی این باکتری‌ها رنگ آبی به خود می‌گیرد. باکتری‌هایی با پلاسمید نوترکیب، در محیط کشت انتخابی رشد کرده ولی به دلیل تخریب lacZ پلاسمید با وارد شدن قطعه DNA خارجی X-Gal نشکسته، لذا کلونی به رنگ سفید مشاهده خواهد شد.

پس از ۱۶ ساعت کلونی‌های حاصل جهت اطمینان از انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز مورد بررسی قرار گرفتند. چند کلونی سفید انتخاب و صحت عمل همسانه‌سازی توسط آزمون‌های Colony- PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی<sup>۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت.

### ۳-۱۵-۱ Colony- PCR

قبل از استخراج پلاسمید، به منظور تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pSK، ۶ کلونی سفید انتخاب و واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن انجام پذیرفت.

---

1 - Sequencing

### ۳-۱۵-۲- هضم آنزیمی

جهت اطمینان از انتقال ژن دلتا ۶ دسچوراز، پلاسمید استخراجی توسط سایت برشی ابتدا (*XbaI*) و انتهای ژن (*SacI*)، برش داده شدند. انتظار بر این بود که در هضم، قطعات حدود ۲۹۰۰ bp پلاسمید و ۱۳۷۰ bp ژن دلتا ۶ دسچوراز حاصل آید.

### ۳-۱۶-۱- تعیین توالی

یکی از راه‌های اطمینان از صحیح بودن سازه، قرارگیری ژن در جایگاه مناسب وصحت نوکلئوتیدها در قطعه مورد نظر هنگام تکثیر با آنزیم Taq DNA polymerase، انجام توالی‌یابی است. بدین‌منظور از یکی از کلونی‌های تأیید شده توسط هضم آنزیمی و Colony-PCR، استخراج پلاسمید انجام و جهت توالی‌یابی به شرکت فزایوتک ارسال گردید. این قطعه توسط آغازگرهای عمومی T3 و T7 که داخل پلاسمید pSK قرار دارند، توالی‌یابی گردید. نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با توالی ژن بدست آمده از پایگاه اینترنتی NCBI مقایسه شد.

### ۳-۱۶-۱- بلاست توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی

با بلاست توالی نوکلئوتیدی در بانک اطلاعاتی NCBI توالی‌های دارای همولوژی با این قطعه مشخص گردید. توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده، در سایت Expasy به پروتئین ترجمه و بلاست گردید.

### ۳-۱۶-۲- شناسایی دومین‌های احتمالی با استفاده از توالی پروتئینی

#### ۳-۱۶-۲-۱- بررسی دومین‌های احتمالی توسط سرور Interpro و CDD

توالی پروتئینی توسط ([www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)) جهت تشخیص دومین‌های احتمالی بررسی گردید. این سرور نوعی بلاست بر روی توالی مورد نظر، با خانواده‌های دومینی شناسایی شده انجام و در صورت وجود چنین شباهتی دومین‌های شناسایی شده در توالی مورد درخواست را معرفی

می‌کند. همچنین از پایگاه CDD (Conserved domain database) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd)) در سایت NCBI نیز جهت آنالیز دومین‌ها استفاده گردید.

### ۳-۱۶-۳- بررسی ساختار ثانویه پروتئین توسط Psipred

اطلاعات بیشتر در مورد ساختار ثانویه پروتئین توسط سرور protein structure psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>) پیش‌بینی گردید. در این آنالیز محل آمینواسیدهایی که در ساختار مارپیچ آلفا، صفحات بتا و یا لوپ (کوئل) شرکت می‌کنند، مشخص می‌گردد. لوپ‌ها مناطقی از ساختار پروتئینی می‌باشند که هیچ‌یک از ساختارهای منظم آلفا و بتا را نداشته و به‌صورت پیچش‌های نامنظم باقی می‌مانند.

### ۴-۱۶-۳- پیش‌بینی هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور TMHMM

پس از تخمین ساختار ثانویه، توالی پروتئینی جهت شناسایی محل احتمالی هلیکس‌های ترانس‌ممبران<sup>۱</sup>، مناطق درون غشائی<sup>۲</sup> و خارج غشائی<sup>۳</sup> توسط سرور TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)، آنالیز گردید.

### ۵-۱۶-۳- تعیین میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی توالی آمینواسیدی توسط سایت Expasy

توسط سایت ([www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools)) در قسمت topology میزان آب‌دوستی یا آب‌گریزی این توالی آمینواسیدی مورد بررسی قرار گرفت و نمودار هیدروفوبیستی آن در طول کل پپتید ترسیم گردید.

### ۶-۱۶-۳- تعیین نقشه پپتیدی پروتئین

نقشه پپتیدی پروتئین به‌صورت فرضی و تئوری توسط پایگاه [expasy/peptidemass](http://expasy.org/peptidemass) تعیین

---

1 - Helical transmembrane regions

2 - Inside of membrane

3- Outside of membrane

گردید. نقشه پیتیدی از این لحاظ حائز اهمیت است که در شناسایی پروتئین و تعیین تغییرات پس از ترجمه کاربرد دارد. در روش تجربی پروتئین موردنظر از ژل جدا گردیده و تحت تاثیر آنزیم‌های هضم-کننده، یا مواد شیمیایی خاصی قرار می‌گیرد. حاصل این کار تشکیل قطعات پیتیدی با طول‌های متفاوت است. سپس جرم پپتیدها توسط اسپکترومتر جرمی تعیین می‌گردد، که به صورت پیک‌هایی ثبت می‌گردد. در روش تئوری این کار توسط برخی نرم‌افزارها یا پایگاه‌های اینترنتی انجام می‌گیرد.

### ۳-۱۶-۷- هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی با استفاده از Clustalw

با استفاده از سرور (xpsasy/tools/multiple alignment/clustalw) توالی آمینواسیدی ۴ گونه هم‌ردیف گردید. هم‌ردیفی تفاوت توالی‌های آمینواسیدی بین این ۴ گونه را مشخص کرد.

### ۳-۱۶-۸- رسم درختچه فیلوژنتیکی

جهت تعیین میزان قرابت توالی پروتئینی ژن دلتا ۶ دسچوراز گونه *M. alpina* با توالی این ژن در گونه‌های دیگر، با استفاده از سایت NCBI درختچه فیلوژنتیکی رسم گردید. به دلیل این که دلتا ۶ و ۸ اسفنگولیپید در یک خانواده قرار گرفته و گاهی بسیار شبیه هم می‌باشند، بنابراین علاوه بر دلتا ۶، از توالی پروتئینی چند ژن دلتا ۸ اسفنگولیپید نیز در رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده گردید.

### ۳-۱۶-۹- تعیین خواص بیوشیمیایی پروتئین توسط سرور Protparam

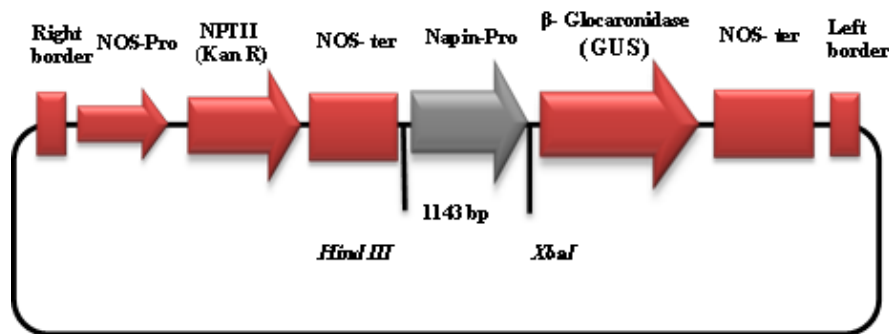
خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین حاصل، توسط (<http://expasy.chl/tools/protparam.html/>) تعیین گردید.

### ۳-۱۷- هم‌سانسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین

با توجه به این که هدف از هم‌سانسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، بیان آن در گیاهان دانه روغنی مانند کلزا می‌باشد، استفاده از پروموتوری مانند ناپین که به میزان زیادی در بذره‌های توسعه یافته بیان می‌گردد، باعث محدود شدن بیان پایدار این ژن در بخش‌های خاصی از گیاه مانند دانه می‌گردد.



بنابراین پس از اطمینان از صحت قطعه همسانه‌سازی شده، این ژن در ناقل حاوی پروموتور ناپین همسانه‌سازی شد. همانند همسانه‌سازی در pSK ژن دلتا ۶ دسچوراز و پلاسمید pKS حاوی پروموتور ناپین، هر دو توسط آنزیم‌های برشی *SacI* و *XbaI* برش داده شده، از روی ژل خالص‌سازی شده و مراحل ترانسفورم به باکتری *E.coli* صورت پذیرفت.



شکل ۳-۳: تصویر شماتیک ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین به همراه سایت‌های برشی مورد استفاده جهت همسانه‌سازی

### ۳-۱۷-۱- غربالگری کلونی‌های بدست آمده توسط آزمون Clony-PCR

جهت اطمینان از انتقال ژن دلتا ۶ دسچوراز چند کلونی انتخاب و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن واکنش PCR انجام پذیرفت. همچنین جهت اطمینان از صحت جهت قرارگیری پروموتور ناپین در ابتدای ژن، آغازگر داخلی این ژن به همراه ژن دسچوراز طراحی (جدول ۳-۱۲) و PCR گذاشته شد. طول قطعه تکثیر یافته بر صحت جهت قرارگیری پروموتور و ژن می‌باشد.

جدول ۳-۱۲: آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز

ژن	آغازگر	توالی آغازگر	%GC	TM	سایز قطعه
Promotor Napin	Forward	5'-AGTAAGGATGACCTACCC-3'	50%	49.9°C	830 bp
Delta6 Desaturase	Reverse	5'-AGAACATCTCCAACGCA-3'	47.1%	51.0°C	

### ۳-۱۷-۲- هضم آنزیمی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز

هضم آنزیمی توام پروموتور ناپین به همراه ژن دسچوراز جهت اطمینان از صحت همسانه-سازی توسط آنزیم‌های برشی ابتدای پروموتور (*HindIII*) و انتهای ژن (*SacI*) انجام پذیرفت. انتظار بر این است که قطعه ۲۵۱۴ bp پروموتور و ژن دلتا ۶ دسچوراز به همراه قطعه ۲۹۰۰ bp پلاسمید حاصل گردد.

### ۳-۱۸- همسانه‌سازی قطعه حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین در ناقل

#### دوگانه pBI121

ناقل‌های ترانسفورماسیون گیاهی پلاسمیدهایی هستند که به منظور تولید گیاهان تراریخته طراحی شده‌اند. رایج‌ترین ناقل‌هایی که به منظور ترانسفورماسیون گیاهی استفاده می‌شوند، ناقل‌های دوگانه هستند که قابلیت همانندسازی در باکتری *E. coli* و *Agrobacterium tumefaciens* را دارند.

از معمولترین وکتورهای مورد استفاده جهت ترانسفورم گیاهان، وکتور دوگانه pBI121 می‌باشد. این ناقل طول ۱۴۷۵۸ bp دارد (شماره دسترسی AF485783). ناحیه<sup>۱</sup> T-DNA (۶۱۹۳ bp) شامل ژن<sup>۲</sup> nptII2 به‌عنوان نشانگر (مقاومت به خانواده آنتی‌بیوتیک نئومایسین) ژن<sup>۳</sup> GUS به‌عنوان ژن گزارشگر می‌باشد. دو توالی با دو راه‌انداز یوکاریوتی<sup>۴</sup> (NOS) و راه‌انداز پروکاریوتی، به‌ترتیب در دو ناحیه داخل T-DNA و خارج از آن قرار گرفته است (Chen, P. Y, et al., 2003).

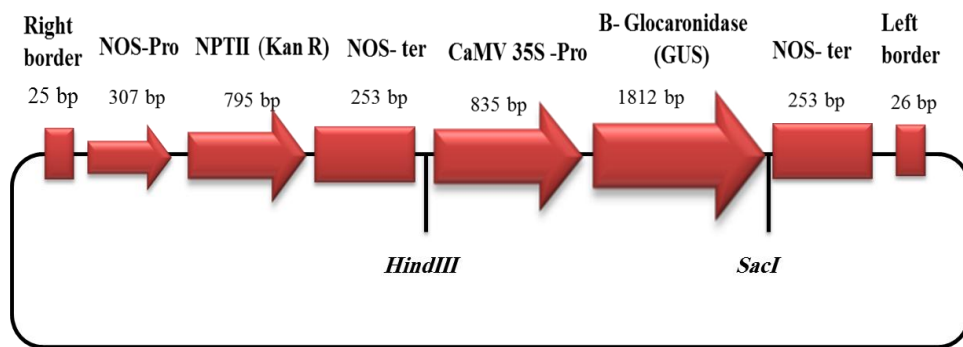
---

1- Transfer DNA

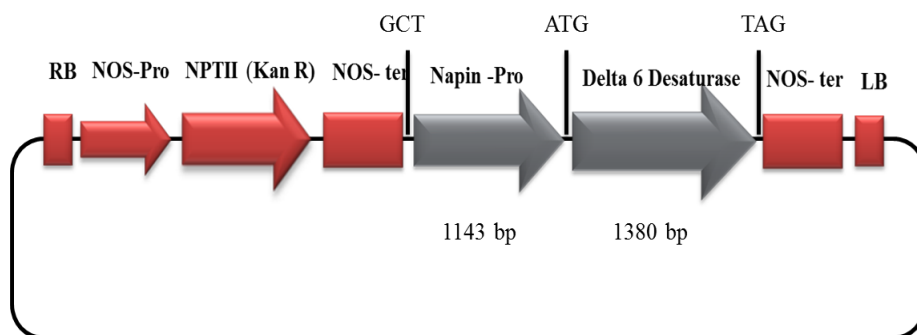
2 - Neomycin phosphotransferase II

3-  $\beta$ -glucuronidase

4 - Nopaline Synthase



شکل ۳-۴: تصویر شماتیک ناقل بیانی pBI121 به همراه سایت‌های برشی مورد استفاده جهت همسانه‌سازی پرموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز



شکل ۳-۵: تصویر شماتیک ناقل بیانی pBI121 به همراه الحاق پرموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز

### ۳-۱۸-۱- هضم آنزیمی پلاسمیدهای pBI121 و pKS- Napin- D6 Desaturase توسط

#### آنزیم‌های برشی *HindIII* و *SacI*

پلاسمید pKS حاوی پرموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز، جهت جداسازی قطعه پرموتور و ژن توسط آنزیم‌های ابتدا و انتها برش داده شد. پلاسمید pBI121 نیز جهت الحاق این قطعه توسط همین دو آنزیم براساس روش بیان شده، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

### ۳-۱۸-۲- خالص سازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، اتصال و ترانسفورماسیون باکتری

با توجه به این که در اثر هضم آنزیمی پلاسمید pKS- Napin- D6 Desaturase دو قطعه به طول ۲۶۹۷ bp و ۲۸۹۶ bp، و از هضم آنزیمی pBI121 قطعات ۲۷۶۵ bp و ۱۱۹۹۳ bp حاصل

گردید، جهت افزایش احتمال اتصال صحیح، قطعات مورد نظر از روی ژل خالص گردیدند. بنابراین دو قطعه ۲۶۹۷ bp حاوی ژن و پروموتور و ۱۱۹۹۳ bp ناقل از روی ژل برش داده شده، توسط آنزیم T4 DNA لیگاز به یکدیگر متصل و به باکتری *E. coli* ترانسفورم گردیدند. باکتری‌های ترانسفورم‌شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت و صحت عمل همسانه‌سازی توسط آزمون‌های PCR-clony و هضم آنزیمی تأیید گردید.

### ۳-۱۹- انتقال سازه نو ترکیب به آگروباکتریوم

جهت انتقال ژن به گیاه توتون از روش آگروباکتریوم استفاده گردید، که امروزه به طور گسترده‌ای جهت تراریختی گیاهان خصوصاً دو لپه‌ای‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تراریختی توتون این روش مزایای متعددی نسبت به سایر روش‌ها دارد. گیاه توتون به تلقیح به نژاد آگروباکتریوم سویه LBA4404 فوق العاده حساس است. گیاهچه‌ها مستقیماً و بدون نیاز به تشکیل کالوس، باززا می‌شوند. گیاهچه‌ها به آسانی از محل لبه‌های بریده شده ریز نمونه برگ‌ی پس از تلقیح به وسیله آگروباکتریوم حاوی ناقل، رشد می‌کنند و کارایی باززایی از بافت‌های گیاهی از این طریق نسبت به سایر روش‌ها بسیار بالا است (fisher et al., 2004).

### ۳-۱۹-۱- تهیه سلول‌های مستعد آگروباکتریوم

جهت تهیه سلول‌های مستعد، یک کلونی از کشت جامد آگروباکتریوم سویه LBA4404 در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۲۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در دمای ۲۸°C در دور ۱۵۰ rpm به مدت دو شبانه‌روز کشت گردید. به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از این کشت در ۶ میکرولیتر محیط کشت به مدت ۲-۳ ساعت در شیکر انکوباتور رشد داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. محیط سرد شده در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی خارج و رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۲۰ mM سرد حل شد.

### ۳-۱۹-۲- ترانسفورماسیون

جهت ترانسفورم کردن آگروباکتریوم، ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب، زیر هود به سلول-های مستعد اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ و ۵ دقیقه در ازت مایع قرار داده شده و بلافاصله به دمای  $37^{\circ}\text{C}$  منتقل گردید. ۰/۵ میکرولیتر محیط کشت LB به باکتری‌ها افزوده شد و ۳-۴ ساعت در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  در دور ۱۵۰ rpm در شیکر قرار داده شد. باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین و کانامایسین منتقل و به مدت دو روز در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. غربالگری کلونی‌های نوترکیب حاصل با استفاده از هضم آنزیمی و کلونی PCR انجام گرفت.

### ۳-۲۰- انتقال ژن و کشت بافت گیاهی

در این تحقیق، جهت کشت بذر و کشت بافت گیاه توتون، محیط کشت گیاهی پایه MS (Murashing and Skoog, 1962) مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت، از متداولترین محیط کشت‌های مورد استفاده در کشت بافت گیاهی است، چرا که دارای مواد غذایی لازم جهت ادامه رشد بافت‌ها و سلول‌ها می‌باشد. این محیط شامل چهار دسته مواد اصلی عناصر پرمصرف<sup>۱</sup>، عناصر کم-مصرف<sup>۲</sup>، ویتامین‌ها و آهن است. تهیه محیط MS با استفاده از محلول‌های مادری<sup>۳</sup> انجام پذیرفت.

### ۳-۲۰-۱- تهیه محلول مادر عناصر پرمصرف، کم‌مصرف، آهن و ویتامین

عناصر پرمصرف به صورت (۱۰×)، کم‌مصرف (۱۰۰×)، محلول مادر آهن (۲۰۰×) و محلول مادر ویتامین‌ها به صورت (۱۰۰×) تهیه گردید. بدین صورت که مقادیر ذکر شده از هر یک از مواد جدول ۳-۱۳ وزن شده و به حجم موردنظر رسانیده شد.

1 - Macronutrients

2 - Micronutrients

3- Stock solution

جدول ۳-۱۳: جدول ترکیبات محیط کشت موراشیک و اسکوک (MS)

مواد تشکیل دهنده	نسبت در محیط MS (mg/l)	نسبت در محلول استوک (mg/l)	حجم هر لیتر محیط کشت (ml)
<b>Macronutrient</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16500	100
KNO <sub>3</sub>	1900	19000	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	3700	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	4400	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1700	
<b>Micronutrient</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620	10
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	2230	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	860	
KI	0.83	83	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	25	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
<b>Fe.EDTA-Na salt</b>	40	Add fresh	
<b>Vitamins</b>			
Nicotinic acid	0.5	50mg/100ml	1
Thiamine HCl	0.1	50mg/100ml	0.2
Pyridoxin HCl	0.5	50mg/100ml	1
Myo-inositol	100	Add fresh	
Sucarose	30000	Add fresh	
Agar	8000	Add fresh	
<b>pH</b>	5.8		

### ۳-۲۰-۲- محیط MS حاوی هورمون‌های مورد استفاده

هورمون‌های مورد استفاده در این تحقیق، شامل بنزیل آمینوپورین (BAP)<sup>۱</sup> به عنوان سیتوکنین و نفتالن استیک اسید (NAA)<sup>۲</sup> از گروه اکسین‌ها بودند. جهت تهیه محلول ذخیره، این هورمون‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر محلول یک نرمال سود به طور کامل حل شده و سپس به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. جهت باززایی گیاه توتون از غلظت ۳ mg/l بنزیل آمینوپورین و ۰/۱ mg/l نفتالن استیک اسید استفاده گردید.

1 - Benzylaminopurine

2 - Naphthaleneacetic Acid

در این تحقیق از دو آنتی‌بیوتیک کانامایسین و سفاتوکسیم<sup>۱</sup> استفاده گردید. کانامایسین به- عنوان نشانگر انتخابی پلاسمید pBI121 و سفاتوکسیم جهت کنترل رشد آگروباکتریوم استفاده می- گردد. آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم در غلظت ۵۰۰ mg/l و کانامایسین در غلظت ۵۰ mg/l تهیه گردید. جهت تهیه استوک کانامایسین ۵۰ mg از این آنتی‌بیوتیک در ۱ ml آب مقطر حل و فیلتر شد و در دمای ۲۰°C - نگهداری گردید. برای تهیه استوک سفاتوکسیم ۵۰۰ mg از آنتی‌بیوتیک در ۱ ml آب مقطر حل گردید.

### ۳-۲۰-۳- آماده‌سازی مواد گیاهی

در این تحقیق از گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) جهت انتقال سازه مورد بررسی استفاده گردید. به منظور تهیه ریزنمونه جهت تراریختی، بذور توتون پس از شستشوی سطحی، با استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شد. سپس دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. بذرها توسط محلول وایتکس ۲۰٪ (حاوی ۵٪ هیپوکلریت سدیم) به مدت ۱۵ دقیقه، بر روی هم‌زن استریل گردیدند و سه مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو شده، بر روی کاغذ صافی استریل منتقل گردیدند. بذور پس از خشک شدن، بر روی محیط کشت MS بدون هورمون، کشت گردیدند و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵°C به مدت حدود ۳۰ روز نگهداری گردیدند.

### ۳-۲۰-۳-۱- تهیه ریزنمونه<sup>۲</sup> جهت انتقال ژن

از ریز نمونه برگ گیاه توتون، جهت انتقال ژن استفاده شد. برگ‌های سبز و کاملاً سالم گیاهان جوان با اندازه تقریبی ۴ سانتی‌متر انتخاب و به اندازه تقریبی ۱ سانتی‌متر برش زده شد. ابتدا به رگبرگ اصلی یک خراش طولی داده شد، حاشیه‌های برگ حذف و ریزنمونه‌ها به چند قسمت

1 - Cefotaxime

2 - Explant

تقریباً ۱ سانتی متری تقسیم گردید.

### ۳-۲۰-۳-۲- آماده سازی آگروباکتریوم جهت هم‌کشتی<sup>۱</sup>

یک تک کلونی از آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 همسانه‌سازی شده با ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین، در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین و کانامایسین در دمای ۲۸°C و در شیکر انکوباتور با ۱۵۰ دور کشت شبانه گردیدند. سوسپانسیون حاصل توسط سانتریفیوژ با سرعت ۲۵۰۰rpm در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. فاز رویی باکتری خارج گردیده و به رسوب حاصل، به همان میزان محیط سوسپانسیون تلقیح (محیط ۱/۲MS) اضافه شد. این محلول به مدت ۰/۵ تا ۱ ساعت در شیکر قرار داده شد تا باکتری به محیط کشت عادت کرده و OD به ۰/۶ - ۰/۸ برسد. قطعات برگ‌ی برش‌یافته به فاکون ۵۰ میکرولیتری حاوی سوسپانسیون باکتری منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در این محیط انکوبه گردیدند. با قرار دادن قطعات برگ‌ی بر روی کاغذصافی، باقی‌مانده سوسپانسیون آگروباکتریوم حذف گردید. ریزنمونه‌ها بر روی محیط هم‌کشتی جامد منتقل گردیدند و به مدت دو روز در تاریکی و در دمای ۲۵± قرار داده شدند تا آلودگی آگروباکتریوم به‌طور کامل صورت پذیرد. ریزنمونه‌های شاهد بدون تلقیح با باکتری بر روی محیط کشت قرار گرفت. پس از دو روز هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها بر روی محیط جامد حاوی ۵۰۰mg/l سفاتوکسیم منتقل شدند. ریزنمونه‌های فاقد باکتری بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل گردیدند. هر دو هفته یکبار عمل واکشت نمونه‌ها بر روی محیط باززایی انتخابی دارای آنتی-بیوتیک سفاتوکسیم به میزان ۲۵۰mg/l صورت گرفت. غلظت کانامایسین در هفته‌های متوالی به ترتیب با نسبت‌های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵ افزایش یافت. هورمون BAP با نسبت ۳mg/l و هورمون NAA با نسبت ۰/۱ mg/l استفاده شد. بعد از هشت هفته گیاهان باززا شده در محیط انتخابی، به محیط ۵۰mg/l کانامایسین بدون هورمون، جهت ریشه‌زایی انتقال یافتند (جدول ۳-۱۴).



جدول ۳-۱۴: محیط کشت‌های مورد استفاده جهت انتقال ژن به توتون

مرحله رشدی	محیط کشت	آنتی‌بیوتیک	هورمون
<b>Cocultivation and Regeneration</b>	MS	-	3 mg/l BAP 0/1 mg/l NAA
<b>Selective regeneration</b>	MS	500 mg/l Cefotaxime 25-100 mg/l Kanamycin	3 mg/l BAP 0/1 mg/l NAA
<b>Selective Rooting</b>	MS	50 mg/l Kanamycin	-

### ۳-۲۰-۴- بررسی مولکولی گیاهان تراریخته

#### ۳-۲۰-۴-۱- استخراج DNA ژنومی به روش CTAB

جهت اثبات تراریخت بودن گیاهان ترانسفورم شده و حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین، DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه توتون تراریخت و شاهد غیرتراریخت با استفاده از روش CTAB (طبق پروتکل DNA ذکر شده در بخش ۴-۳) استخراج گردید. کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی گردید.

#### ۳-۲۰-۴-۲- استخراج RNA

استخراج RNA از برگ گیاهان توتون تراریخته با استفاده از روش RNX- Plus و سنتز cDNA طبق پروتکل ارائه شده در بخش ۶-۳ و ۷-۳ انجام پذیرفت.

#### ۳-۲۰-۴-۳- انجام واکنش PCR با استفاده از DNA و cDNA گیاهان تراریخته

##### احتمالی توسط سازه حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین

با استفاده از آغازگرهای داخلی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین ذکر شده در جدول ۱۳-۳ واکنش PCR بر روی DNA استخراجی از گیاهان تراریخته احتمالی صورت گرفت. این آغازگر قطعه‌ای به طول ۸۳۰ bp را تکثیر می‌کند. پس از این مرحله، جهت اطمینان از صحت عملکرد

پروموتور ناپین، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز بر روی cDNA سنتز شده از گیاهان تراریخته، واکنش PCR انجام گرفت.

## فصل چہارم

## نتیجہ و بحث

## ۴- نتایج

### ۴-۱- نتایج حاصل از کشت قارچ *Mortierella alpina*

پس از سه روز تعلیق میسلیومها در محیط YPD، قارچ کاملا رشد کرده و برای استخراج

DNA و RNA مناسب بود (شکل ۴-۱).



شکل ۴-۱: کشت مایع قارچ *M. alpina*

### ۴-۲- بررسی کمیت DNA توسط اسپکتروفتومتری

مقدار اشعه ماوراء بنفش جذب شده توسط مقدار DNA موجود در نمونه و نسبت جذب ۲۶۰

به ۲۸۰ نانومتر نشانگر خلوص آن است. این نسبت باید بین ۱/۸ تا ۲ باشد. عدد کوچکتر نشانگر

آلودگی DNA با پروتئین یا فنل و بیشتر به دلیل آلودگی RNA می باشد. در استخراج DNA از نمونه

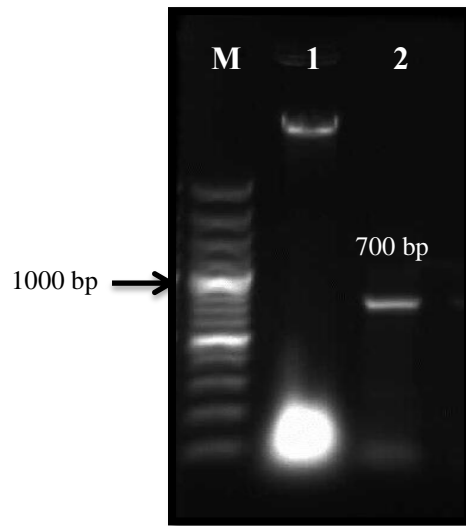
قارچی عدد ۱/۸ حاصل گردید.

### ۴-۳- بررسی کیفیت DNA توسط الکتروفورز

برای نمونه DNA، از ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید. مشاهده باند بدون اسمیر و شکستگی

نشان دهنده کیفیت خوب DNA استخراجی بود. از آغازگرهای داخلی، جهت اطمینان از وجود ژن

دلته ۶ دسچوراز در نمونه قارچی استفاده گردید (شکل ۴-۲).



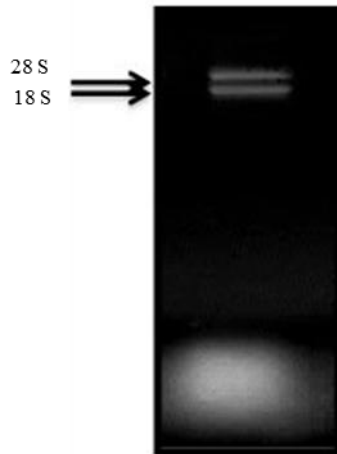
شکل ۴-۲: محصول استخراج DNA قارچ *M. alpina*. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، 1: الگوی الکتروفورز محصول استخراج DNA، 2: تکثیر قطعه ۷۰۰ جفت بازی آغازگر داخلی ژن دلته ۶ دسچوراز بر روی DNA استخراج شده

#### ۴-۴- بررسی کمیت RNA توسط روش اسپکتروفتومتری

نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای RNA، بین ۲-۱/۸ میکروگرم بر میلی-لیتر نشانگر کیفیت خوب DNA استخراجی است. عدد بیشتر نشان دهنده آلودگی با پروتئین یا پلی-ساکارید و کمتر، آلودگی با فنل می باشد. در استخراج از نمونه قارچی عدد ۲/۰۴ بدست آمد که نشان-گر کیفیت خوب RNA استخراجی بود.

#### ۴-۵- بررسی کیفیت RNA توسط الکتروفورز

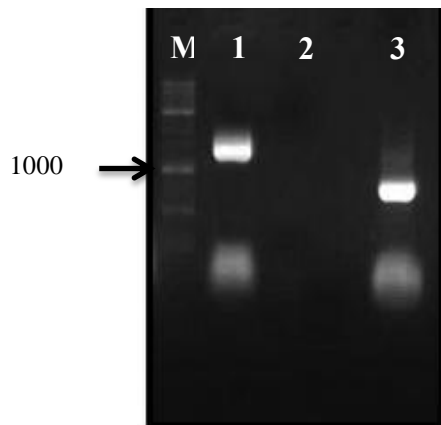
جهت تعیین کیفیت RNA، از ژل آگارز ۱/۲٪ با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. ایجاد دو باند ۲۸srRNA و ۱۸srRNA نشانگر کیفیت خوب RNA استخراجی است (شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳: الگوی الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده از قارچ *M. alpina*

#### ۴-۶- تکثیر طول کامل ژن دلتا ۶ دسچوراز، با استفاده از cDNA سنتز شده

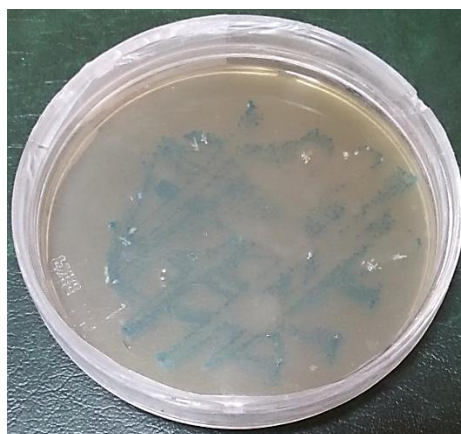
جهت جداسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، از cDNA قارچ *M. alpina* استفاده گردید. این ژن در توالی خود دارای نواحی اینترونی می‌باشد، بنابراین با استفاده از cDNA، تنها قسمت‌های کارکردی ژن تکثیر گردید. طول کامل ژن ۱۶۱۷ جفت باز و طول ناحیه ترجمه شده ۱۳۷۴ جفت باز می‌باشد. آغازگر رفت دقیقاً قبل از نقطه شروع ترجمه، و آغازگر برگشت دقیقاً پس از نقطه پایان ترجمه قرار داده شد. با توجه به الحاق توالی کوزاک و سایت‌های برشی طول کامل قطعه تکثیری ۱۳۹۵ جفت باز به دست آمد. سنتز آغازگرها توسط شرکت بایونیر داجون کره جنوبی صورت پذیرفت. واکنش RT-PCR ژن دلتا ۶ دسچوراز توسط آغازگرهای طراحی شده، تکثیر باندی با طول کامل قطعه مورد نظر را نشان داد که نشانگر رونویسی و بیان ژن دلتا ۶ دسچوراز در سطح RNA در قارچ موردنظر بود (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴: محصول PCR ژن دلتا ۶ دسچوراز با استفاده از واکنش RT-PCR. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، 1: نتیجه الکتروفورز ژن دلتا ۶ دسچوراز، 2: کنترل منفی با استفاده از RT- به جای cDNA، 3: کنترل مثبت با استفاده از آغازگر عمومی اکتین.

#### ۴-۷- همسانه‌سازی قطعه حاصل از PCR در ناقل pSK

قطعه تکثیرشده و ناقل pSK، پس از خالص‌سازی، توسط آنزیم‌های برشی ابتدا و انتهای ژن برش داده شده، درون ناقل الحاق و سپس به باکتری *E. coli* ترانسفورم گردید. با رشد باکتری‌ها بر روی محیط حاوی IPTG, X-gal و آنتی‌بیوتیک کانامایسین دو نوع کلونی آبی و سفید ظاهر گردید. حضور کلنی‌های سفید نشانگر نوترکیب بودن این کلونی‌ها می‌باشد (شکل ۴-۵).

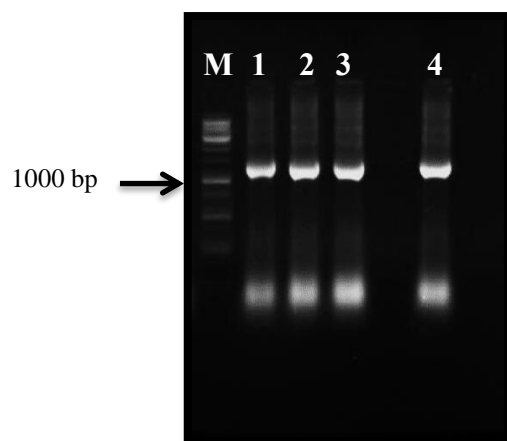


شکل ۴-۵: کلنی‌های حاوی ژن دلتا ۶ در ناقل pSK بر روی محیط AIX.

کلنی‌های سفید نشانگر نوترکیب بودن این باکتری‌هاست.

#### ۴-۷-۱- تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pSK از طریق کلونی PCR

تکثیر طول کامل ژن با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز، از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید رشد کرده بر روی محیط آمپی‌سیلین دار تأییدی بر حضور این ژن در باکتری‌های نو ترکیب بود (شکل ۴-۶).

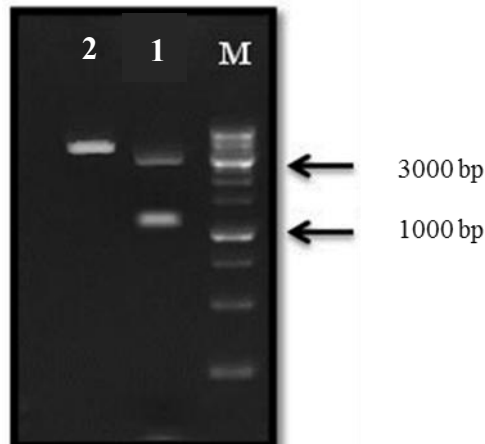


شکل ۴-۶: تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pSK توسط کلونی PCR. M نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، کلونی‌های 1، 2، 3 به واسطه حضور قطعه ۱۳۹۰ جفت بازی از طریق PCR تأیید گردیدند. 4: کنترل مثبت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن بر روی cDNA استخراجی از قارچ.

#### ۴-۷-۲- نتیجه هضم آنزیمی ناقل pSK توسط آنزیم‌های برشی *SacI* و *XbaI*

اگرچه باند قطعه مورد نظر در کلونی PCR بر روی ژل مشاهده گردید، اما برای تأیید قطعی درباره حضور قطعه مورد نظر در ناقل، از همان آنزیم‌های استفاده شده جهت انتقال به ناقل، هضم گذاشته شد. وجود دو قطعه به طول‌های ۲۹۳۸ و ۱۳۹۰ جفت باز، که به ترتیب معادل طول ناقل هضم شده و ژن دلتا ۶ دسچوراز می‌باشد، تأیید دیگری بر صحت انجام همسانه‌سازی بود (شکل ۴-۷).

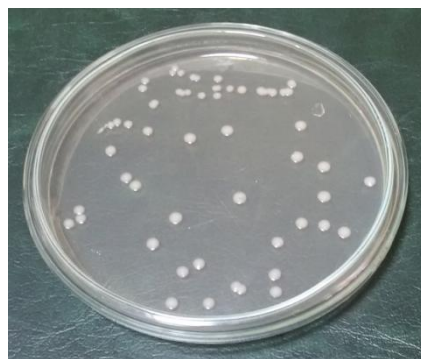




شکل ۴-۷: نتایج حاصل از هضم آنزیمی pSK نو ترکیب. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، 1: ایجاد دو باند به طول تقریبی ۲۹۰۰ و ۱۳۹۴ جفت باز. 2: کنترل مثبت توسط وکتور نو ترکیب با طول تقریبی ۴۳۰۰ bp.

#### ۴-۸ - همسانه سازی ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین

پس از اطمینان از صحت توالی ژن، این قطعه به همان صورت که در ناقل pSK کلون گردیده بود، توسط دو آنزیم *XbaI* و *SacI* برش داده شد. پروموتور ناپین در ناقل pKS در جایگاهی قبل از این دو سایت برشی الحاق گردیده بود و با برش این ناقل توسط دو آنزیم فوق ژن دلتا ۶ دسچوراز بعد از این پروموتور قرار گرفت. بعد از اتصال ناقل و قطعه مورد نظر توسط آنزیم لیگاز، ترانسفورم به باکتری *E.coli* انجام پذیرفت و باکتری‌ها بر روی محیط آمپی سیلین دار کشت گردیدند (شکل ۴-۸).

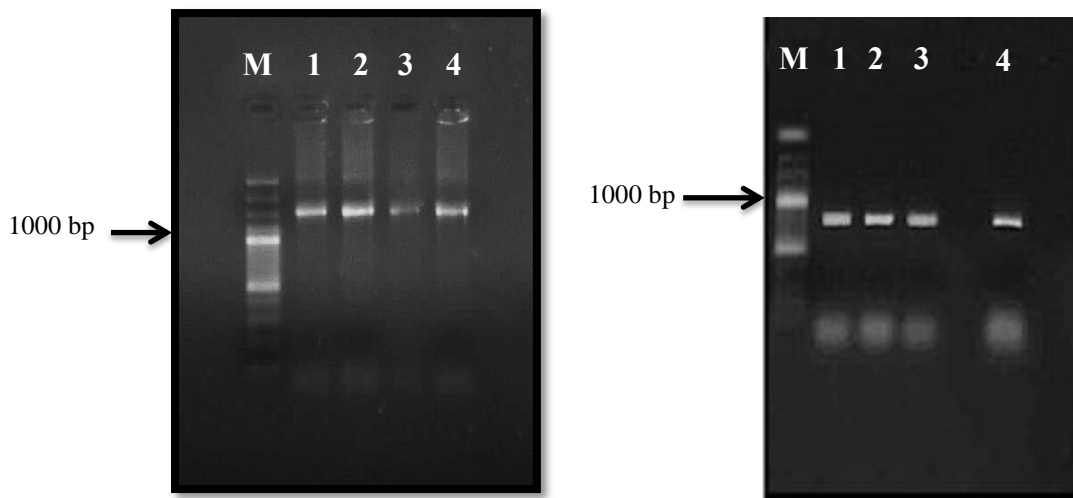


شکل ۴-۸: رشد کلونی‌های نو ترکیب حاوی سازه ژنی *psk-napin-Delta 6 Desaturase* بر روی محیط انتخابی آنتی بیوتیک آمپی سیلین

#### ۴-۸-۱- تأیید حضور ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل pKS حاوی پروموتور ناپین از طریق کلونی

##### PCR

جهت تأیید همسانه‌سازی، چند کلونی انتخاب و با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز تکثیر گردید. تکثیر قطعه ۸۳۰bp آغازگرهای داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز، تأییدی بر الحاق این ژن در امتداد پروموتور ناپین بود (شکل‌های ۴-۹ و ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰: محصول کلونی PCR

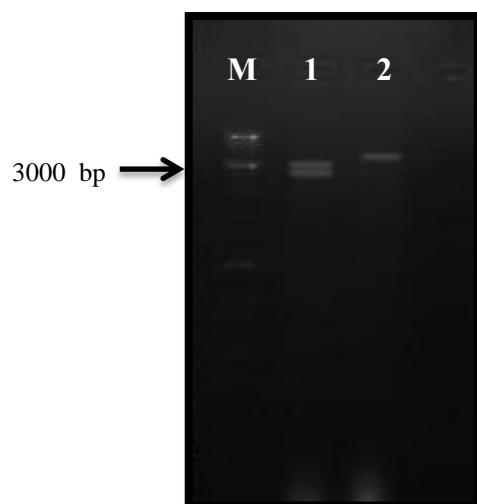
ژن دلتا ۶ دسچوراز توسط آغازگرهای اختصاصی. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، تأیید کلونی‌های ۱، ۲، ۳ توسط تکثیر طول کامل ۱۳۹۰ bp. D: کنترل مثبت با استفاده از کلونی‌های نو ترکیب وکتور pSK.

شکل ۴-۹: محصول PCR آغازگر

داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، تکثیر طول ۸۰۰ در کلونی‌های ۱، ۲، ۳: کنترل مثبت با استفاده از کلونی‌های نو ترکیب pSK.

#### ۴-۸-۲- هضم آنزیمی

با هضم آنزیمی طول کامل قطعه کلون شده شامل ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین، توسط آنزیم‌های برشی *HindIII* و *SacI*، طول ۲۵۳۹ bp قطعه پروموتور و ژن دلتا ۶ دسچوراز و ۲۸۹۶ bp پلاسمید حاصل گردید (شکل ۴-۱۱).

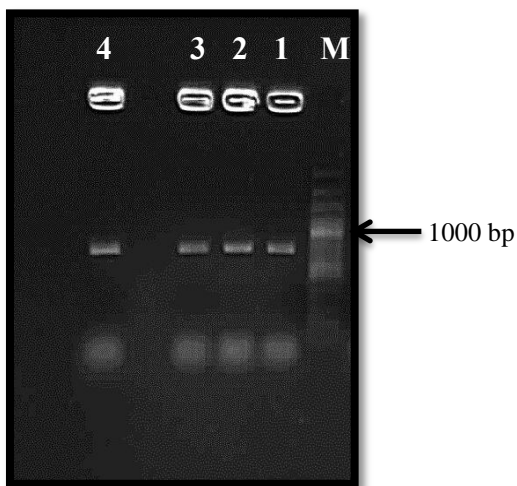


شکل ۱۱-۴: محصول هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین. M: نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰۰، 1: ایجاد قطعات به طول تقریبی bp ۲۵۳۹ قطعه پروموتور و ژن bp ۲۸۹۶ پلاسمید. 2: کلونی نوترکیب حاوی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین.

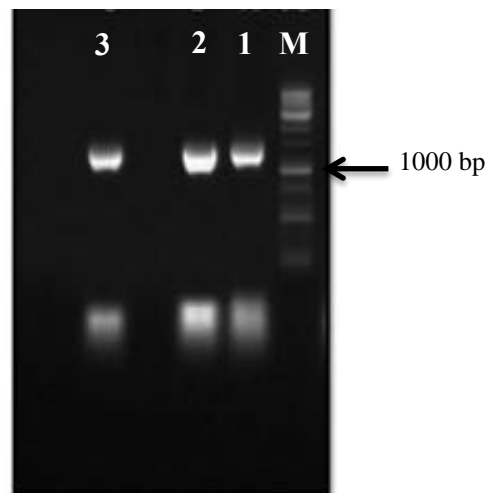
#### ۹-۴- نتایج همسانه‌سازی سازه پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز در ناقل بیانی

##### ۹-۴-۱- کلونی PCR و هضم آنزیمی

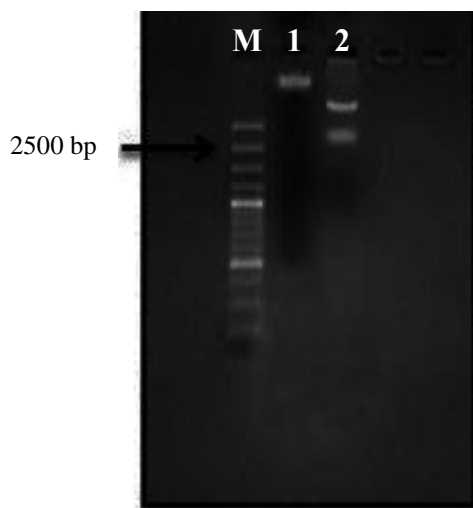
نتیجه PCR چند کلونی انتخابی حاوی سازه ژنی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز که بر روی محیط انتخابی کانامایسین رشد کرده بودند، تأییدی بر صحت انجام همسانه‌سازی بود. همچنین با هضم آنزیمی ابتدای پروموتور و انتهای ژن، قطعاتی به طول تقریبی bp ۱۱۹۹۳ ناقل و bp ۲۵۳۹ پروموتور و ژن حاصل گردید (شکل‌های ۴-۱۲، ۴-۱۳، ۴-۱۴).



شکل ۴-۱۳: محصول PCR آغازگر داخلی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، ۲، ۱، ۳ تکثیر قطعه ۸۰۰ bp. ۴: کنترل مثبت توسط کلونی نو ترکیب pKS- Napin- D6Desaturase



شکل ۴-۱۲: محصول کلونی PCR توسط پرایمر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، ۲، ۱ تکثیر طول کامل ژن دلتا ۶ دسچوراز. C: کنترل مثبت توسط کلونی نو ترکیب pKS- Napin- D6Desaturase



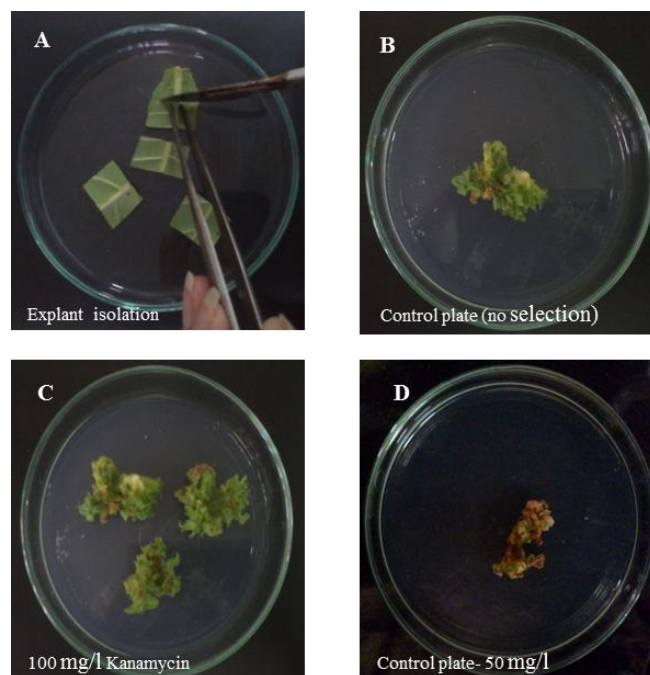
شکل ۴-۱۴: محصول هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 حاوی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶ دسچوراز. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، ۱: پلاسمید حاوی قطعات پروموتور و ژن. ۲: محصول هضم آنزیمی و ایجاد قطعات ۱۱۹۹۳ وکتور و ۲۵۳۹ ژن و پروموتور.

## ۴-۱۰-۱- نتایج حاصل از انتقال آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی پروموتور ناپین و ژن دلتا ۶

### دسچوراز در گیاه توتون

#### ۴-۱۰-۱-۱- نتایج حاصل از انتقال و باززایی گیاه توتون

انتقال ژن به گیاه توتون با استفاده از باززایی مستقیم ریز نمونه‌های گیاهی توسط کشت بافت در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم صورت گرفت. از آنتی‌بیوتیک کانامایسین، جهت گزینش گیاهان تراریخته احتمالی و از سفوتاکسیم به دلیل ایجاد محدودیت در رشد آگروباکتریوم، در محیط انتخابی استفاده شد. در این محیط ریزنمونه‌های تلقیح شده تولید گیاهچه کردند. در حالی که گیاهان باززاشده بدون تلقیح، در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین نکروزه شده و از بین رفتند (شکل ۴-۱۵). گیاهان تراریخت احتمالی زمانی که به طول ۴-۵ سانتی‌متر رسیدند به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (شکل ۴-۱۶).



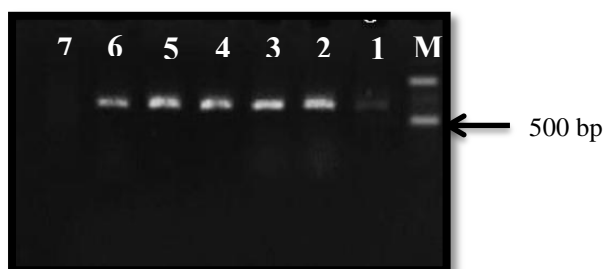
شکل ۴-۱۵: مراحل انتقال ژن و باززایی مستقیم گیاه توتون. A: برش ریزنمونه‌ای برگ‌گی در قطعات ۱ سانتی‌متری، B: باززایی گیاه شاهد بدون تلقیح با آگروباکتریوم، C: باززایی گیاهان تراریخته در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ۱۰۰ mg/l کانامایسین و ۵۰۰ mg/l سفوتاکسیم، D: کنترل منفی. واکشت ریزنمونه شاهد بدون تلقیح با آگروباکتریوم در محیط ۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک کانامایسین



شکل ۴-۱۶: گیاه توتون تراریخت در محیط ریشه‌زایی بدون هورمون حاوی ۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک کانامایسن

#### ۴-۱۰-۲- تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آزمون PCR

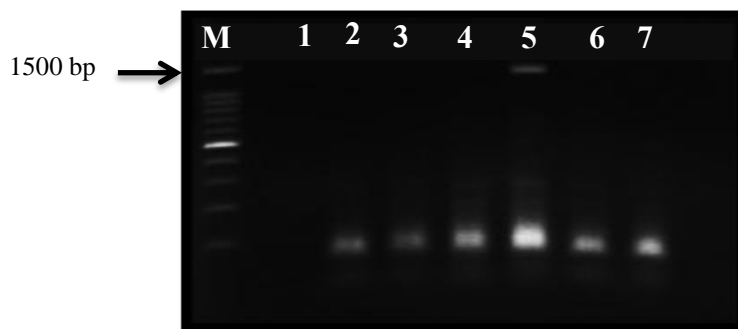
جهت تأیید تراریختی گیاهان توتون به روش مولکولی، پس از استخراج DNA از برگ گیاهان توتون تراریخته احتمالی و شاهد، با استفاده از آغازگرهای داخلی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پروموتور ناپین، آزمون PCR انجام شد. تکثیر قطعه ۸۳۰ bp آغازگر داخلی نشانگر انتقال قطعه حاوی ژن و پروموتور به درون ژنوم گیاه توتون می‌باشد (شکل ۴-۱۷).



شکل ۴-۱۷: محصول PCR گیاهان توتون تراریخته با استفاده از پرایمر داخلی ژن دلتا ۶

دسچوراز و پروموتور ناپین. A: کنترل منفی با استفاده از گیاه شاهد. B, C, D, E, F, G: گیاهان تراریخته، تکثیر قطعه ۸۳۰ bp پرایمر داخلی. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp

جهت اطمینان از صحت عملکرد پروموتور و عدم بیان آن در بافت برگ، از برگ گیاه توتون تراریخته استخراج RNA و سپس سنتز cDNA انجام شد. توسط آغازگرهای اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز آزمون PCR صورت گرفت. عدم تکثیر ژن دلتا ۶ دسچوراز را می‌توان تأییدی بر عملکرد صحیح پروموتور قلمداد کرد (شکل ۴-۱۸).



شکل ۴-۱۸: نتیجه الکتروفورز محصول PCR حاصل از cDNA گیاهان ترانسفورم شده با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp. 1, 2, 3, 4, 6, 7: گیاهان ترانسفورم شده با عدم تکثیر ژن دلتا ۶ دسچوراز. 5: کنترل مثبت با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن دلتا ۶ دسچوراز بر روی cDNA قارچ *M. alpina*.

#### ۴-۱۱- آنالیز بیوانفورماتیکی ژن همسانه‌سازی شده دلتا ۶ دسچوراز

ژن همسانه‌سازی شده توسط آغازگرهای M13F و M13R پلاسمید pBluescript SK توالی - یابی گردید. حدود ۸۰۰ جفت باز توسط هر یک از آغازگرهای M13F و M13R تعیین توالی گردید. با توجه به طول ۱۳۷۴ جفت بازی ژن دلتا ۶ دسچوراز، قطعات توالی‌یابی شده حاصل از دو آغازگر در حدود ۲۵۰ جفت باز با یکدیگر همپوشانی داشتند. بنابراین ابتدا با استفاده از بلاست توالی‌های R و F در سایت NCBI، نواحی همپوشان انتهایی مشخص گردید. با افزودن ابتدا و انتهای توالی‌های R و F به یکدیگر، توالی کامل حاصل گردید. با مشخص کردن توالی مربوط به آغازگرها و جایگاه‌های برشی *SacI* و *XbaI*، قطعه مابین این دو آنزیم به عنوان cDNA کلون شده مشخص گردید.

#### ۴-۱۲- بلاست توالی نوکلئوتیدی

نتایج بلاست توالی نوکلئوتیدی در بانک اطلاعاتی NCBI و درصد همسانی در (جدول شماره ۴-۱) ارائه گردیده است. با هم‌ردیفی قطعه همسانه‌سازی شده با توالی‌های AB020032.1، EF413024.1 و AF465282.1 و بررسی نتایج مشخص گردید که این قطعه در ۱۹ نوکلئوتید با ۴ گونه مورد بررسی کاملاً تفاوت دارد.

جدول ۴-۱: بلاست نوکلئوتیدی قطعه همسانه‌سازی شده با دیگر ژن‌های دلتا ۶ دسچوراز در سطح DNA

شماره دسترسی	توضیحات	بالاترین رتبه	رتبه کل	درصد هم‌پوشانی	ارزش	شباهت
AB020032.1	Mortierella alpina mRNA for delta-6 fatty acid desaturase, complete cds	2433	2433	100%	0.0	99%
EF413024.1	Mortierella alpina delta-6 fatty acid desaturase (des3) mRNA, complete cds	2410	2410	100%	0.0	98%
AF465282.1	Mortierella isabellina delta 6 fatty acid desaturase (GLD6D) gene, complete cds	2128	2128	100%	0.0	95%
AF465281.1	Mortierella alpina delta 6 fatty acid desaturase (GLD6D) gene, complete cds	2106	2106	100%	0.0	94%
AF306634.1	Mortierella isabellina delta6-fatty acid desaturase mRNA, complete cds	2106	2106	100%	0.0	94%
GU593326.1	Mortierella alpina strain CBS 608.70 delta-6 desaturase mRNA, complete cds	2100	2100	100%	0.0	94%
AF307940.1	Mortierella alpina clone pTMACL-3 delta 6-fatty acid desaturase mRNA, complete cds	2100	2100	100%	0.0	94%
AB070557.1	Mortierella alpina des6I gene for delta6 fatty acid desaturase, complete cds	2084	2401	98%	0.0	98%
EF413025.1	Mortierella alpina delta-6 fatty acid desaturase (des3) gene, complete cds	2067	2384	98%	0.0	98%
AM411537.1	Mortierella alpina partial mRNA for delta6 fatty acid desaturase (d6DS gene), strain 1S-4	2056	2056	84%	0.0	99%
AF110510.1	Mortierella alpina delta-6 fatty acid desaturase mRNA, complete cds	2017	2017	100%	0.0	93%
KJ890362.1	Mortierellales sp. AGED delta-6 desturase mRNA, partial cds	1951	1951	92%	0.0	94%

#### ۴-۱۳- ترجمه توالی نوکلئوتیدی به پروتئین و بلاست

توالی نوکلئوتیدی بدست آمده، در سایت Expasy به پروتئین ترجمه گردید و مشخص

گردید توالی همسانه‌سازی شده پپتیدی با طول ۴۵۷ اسیدآمینه را کد می‌کند (شکل ۴-۱۹).

نتایج بیانگر این است که در ۱۹ تفاوت در سطح نوکلئوتید، ۷ تغییر منجر به تغییر اسیدآمینه

در توالی پپتیدی گردیده است و در باقی موارد تغییر نوکلئوتید تنها منجر به جایگزینی یک رمز

آمینواسید به رمز دیگر آن گردیده است. بررسی ۷ نقطه‌ای که تغییر نوکلئوتید آن باعث تغییر

اسیدآمینه گردیده است به شرح ذیل می‌باشد:

- نوکلئوتیدهای شماره ۷۴ و ۷۵: بازهای TT جایگزین AG گردیده‌اند. در نتیجه کدون

ژنتیکی از aag (لیزین) به att (ایزولوسین) است، تغییر یافته است. لیزین یک اسیدآمینه بازی قطبی و



آب‌دوست می‌باشد در حالی که ایزولوسین یک اسیدآمینه آب‌گریز و غیرقطبی می‌باشد.

- نوکلئوتید شماره ۱۷۸: باز T جایگزین G گردیده است. لذا کدون ژنتیکی از gtt (والین) به ttt (فنیل‌آلانین) تغییر یافته است. هر دو این اسیدهای آمینه غیرقطبی و آب‌گریز می‌باشند، اما فنیل-آلانین زنجیره جانبی حلقوی دارد.

- نوکلئوتید شماره ۲۸۷: باز T جایگزین G گردیده است. لذا کدون ژنتیکی از aag (لیزین) به aat (آسپارژین) تغییر یافته است. هر دو این اسیدهای آمینه قطبی و آب‌دوست می‌باشند، اما از نظر زنجیره جانبی متفاوتند.

- نوکلئوتید ۴۶۸: باز A جایگزین C گردیده است. لذا رمز ژنتیکی از gat (آسپارات) به gct (آلانین) تغییر یافته است. آسپارات یک اسیدآمینه بازی آب‌دوست و قطبی می‌باشد، آلانین یک اسیدآمینه آب‌گریز و غیرقطبی می‌باشد.

- نوکلئوتیدهای ۸۸۱ و ۸۸۲: بازهای TC جایگزین CT گردیده‌اند. لذا رمز ژنتیکی از tct (سرین) به ttc (فنیل‌آلانین) تغییر یافته است. سرین یک اسیدآمینه آب‌دوست و قطبی می‌باشد ولی فنیل‌آلانین آب‌گریز و غیرقطبی است.

- نوکلئوتیدهای ۹۲۷: باز G جایگزین C گردیده است. لذا رمز ژنتیکی از gct (آلانین) به ggt (گلايسين) تغییر یافته است. آلانین اسیدآمینه آب‌گریز غیرقطبی می‌باشد، درحالی‌که گلايسين قطبی و آب‌دوست می‌باشد.

- نوکلئوتید ۱۳۱۱: باز G جایگزین C گردیده است. لذا رمز ژنتیکی از gca (آلانین) به cca (پرولين) تغییر یافته است. آلانین یک اسیدآمینه آب‌گریز و غیرقطبی می‌باشد درحالی‌که پرولين قطبی و آب‌دوست می‌باشد.

```

1 atggetgctgctcccagtggtgaggacggtttactcgggcccagattttgaaatgcccaggcc
1 M A A A P S V R T F T R A E I L N A E A
2 ctgaatgagggcattaaggatgcccaggccaccctttctgatgatcattgacaacaagggtg
2 L N E G I K D A E A P F L M I I D N K V
3 tacgatgtcccgcgagtttgcctcctgatcatcccgggtggaagtgtgattctcaagcacttt
3 Y D V R E F V P D H P G G S V I L T H F
4 ggcaaggacggcactgacgtctttgacactttccaccccaggctgcttgggagactctt
4 G K D G T D V F D T F H P E A A W E T L
5 gcccaacttttacgttggcgatattgatgagagcgatcgtgccatcaataatgatgacttt
5 A N F Y V G D I D E S D R A I N N D D F
6 gggcccgagggttcgcaagctgcgcaccttgttccagtcctcctggctactacgactcctcc
6 A A E V R K L R T L F Q S L G Y Y D S S
7 aaggcatactatgccttcaaggctcctgcttcaacctctgcactctggggcttctgactttc
7 K A Y A F K V S F N L C I W G L S T F
8 attggtgccaagtggggccagacctgcaccctcgcacaagctgctcctcggatgctccttg
8 I V A K W G Q T S T L A N V L S D A L L
9 ggtctcttctggcagcagtgccggatgggttggcgccagcactttttgcaccacccaggctctt
9 G L F W Q Q C G W L A H D F L H H Q V F
10 caggaccgtttctgggggatctttctgggccttctctgggaggtgtctgccagggtttc
10 Q D R F W G D L F G A F L G G V C Q G F
11 tctgctcctcctgggtggaaggacaaagccacaactcaccaccccgctcccaacgctccacggc
11 S S S W W K D K H N T H H A A P N V H G
12 gaggatcccagacattgacactcaccctctgttgacctggagtgagcatgctctggagatg
12 E D P D I D T H P L L T W S E H A L E M
13 ttctcggatggtcctgacgaggagctgaccctgatgtggtcgcgcttccatggctcctcaac
13 F S D V P D E E L T R M W S R F M V L N
14 cagacctgggttctacttccccattctatcgtttgcccctctgtcctcctgggtgacctccagtc
14 Q T W F Y F P I L S F A R L S W C L Q S
15 attatggtttgttctgcccacgggtcaggcccaacaagcccttcggagcgcgtgtgcccatt
15 I M F V L P N G Q A H K P F G A R V P I
16 tctgttggtcagcagctgtctctcgggtatgcaactggacctggctacctcgcaccacatgctt
16 S L V E Q L S L G M H W T W Y L A T M F
17 ttgttcattaaggatcccgtcaacatgattgtgtactttttgggtgctcagcagctgtttgc
17 L F I K D P V N M I V Y F L V S Q A V C
18 ggcaactgttggcgatgtgttctcgtcacaaccacaacggcatgcctgtgatatccaag
18 G N L L A I V F S L N H N G M P V I S K
19 gaggaagcgggttgatgtgatttctcaccacaagcagatcaccgggtcgtgatgttccac
19 E E A V D M D F F T K Q I I T G R D V H
20 cctgggtctgtttgcccaactgggttccactgggtggattgaattacccagattgagcaccacttg
20 P G L F A N W F T G G L N Y Q I E H H L
21 ttcccctcctgatccccccgcaacaacttttcaaatgacccagcctcctgctgagactttgtgc
21 F P S M P R H N F S K I Q P A V E T L C
22 aaaaagtcaggtgtccgataccataccactgggtatgatcaggggtactccagaggtcttt
22 K K Y G V R Y H T T G M I E G T P E V F
23 agccgtttgaaacaggtctcccaaggcggcctcccaagatgggcaaggccacagtaa
23 S R L N E V S K A A S K M G R A Q - (Stop codon)

```

شکل ۴-۱۹: ترجمه توالی نوکلئیدی به پروتئین توسط سایت [expasy/tools/translator](http://expasy/tools/translator)

#### ۴-۱۳-۱ - بلاست توالی پروتئینی

با بلاست توالی پپتیدی بدست آمده مشخص گردید که این پروتئین بیشترین همولوژی را به

میزان ۹۸٪ با دلتا ۶ دسچوراز *Mortierella alpina* با شماره دسترسی BAA85588.1 دارد (جدول

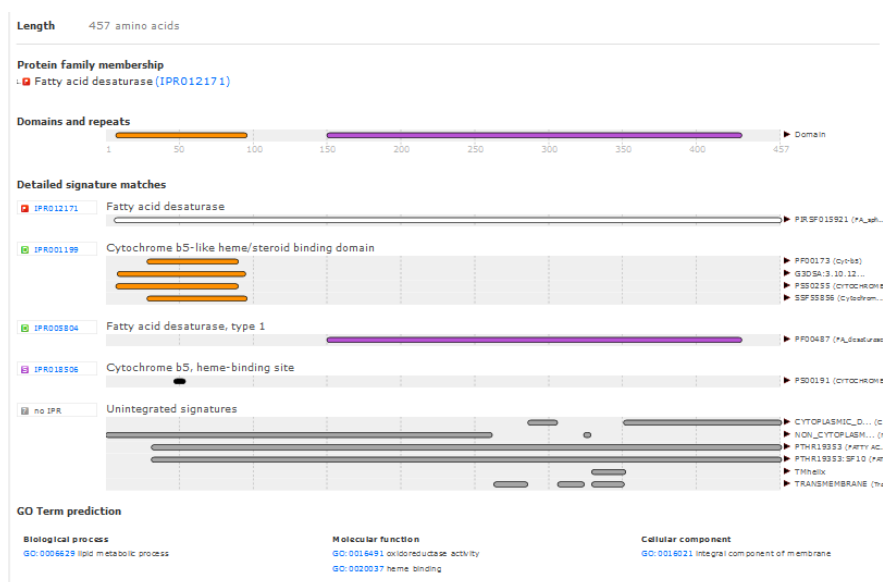
۴-۲).

جدول ۴-۲: نتیجه بلاست توالی پروتئینی

شماره دسترسی	توضیحات	بالترین درجه شباهت
BAA85588.1	delta-6 fatty acid desaturase [Mortierella alpine]	98%
ABN69090.1	delta-6 fatty acid desaturase [Mortierella alpine]	98%
ABN69091.1	delta-6 fatty acid desaturase [Mortierella alpine]	98%
AAL73948.1	delta-6 fatty acid desaturase [Umbelopsis isabellina]	98%

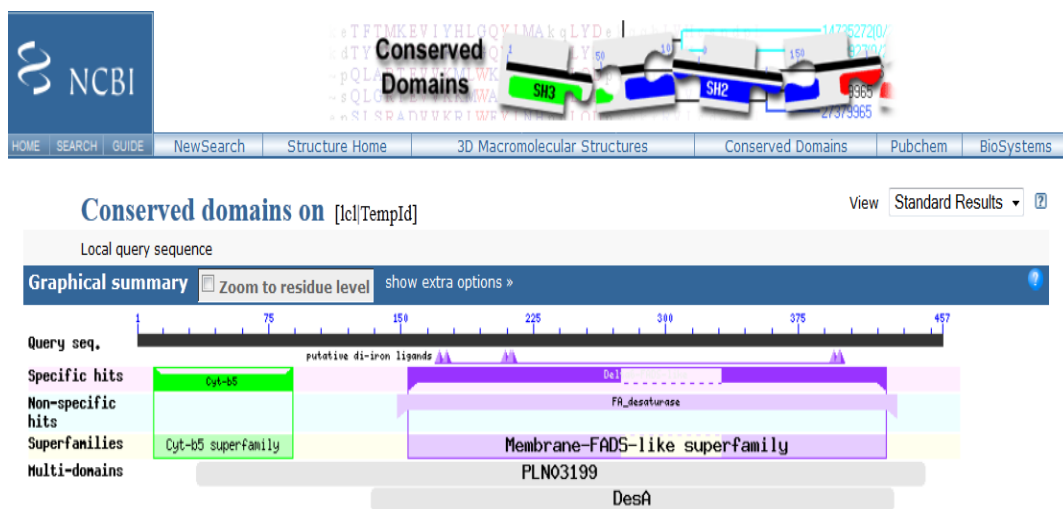
#### ۴-۱۳-۲- بررسی دومین‌های احتمالی توسط سرور Interpro و CDD

توالی پروتئینی توسط ([www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)) جهت تشخیص دومین‌های احتمالی بررسی گردید. این سرور نوعی بلاست بر روی توالی موردنظر، با خانواده‌های دومینی شناسایی شده انجام می‌دهد و در صورت وجود چنین شباهتی دومین‌های شناسایی شده در توالی مورد درخواست را معرفی می‌کند. با توجه به آنالیزهای قبلی صورت گرفته بر روی این ژن دومین‌های سیتوکروم b5 و اسیدچرب دسچوراز شناسایی گردیدند (شکل ۴-۲۰).



شکل ۴-۲۰: دومین‌های شناسایی شده توسط سرور Interpro. دومین اسیدچرب دسچوراز و سیتوکروم b5 نتایج حاصل از آنالیز در پایگاه CDD وجود دومین‌های ذکرشده را در توالی ترجمه‌شده تأیید

کرد. همچنین آنزیم‌های دسچوراز غشائی دارای سه موتیف حفاظت‌شده غنی از هیستیدین شامل Q/HxxHH, HxxxH, Hxx(x)H می‌باشند. این موتیف‌ها از نظر کاتالیتیکی ضروری می‌باشند و به-عنوان لیگاندهایی برای اتم آهن عمل می‌کنند. در واقع این موتیف‌ها برای دسترسی به یون‌های آهن و تشکیل بخش فعال در حدفاصل غشاء و سیتوپلاسم، بعد از اتصال به غشاء (توسط خاصیت اختصاصی نواحی ترانس‌ممبران) ضروری می‌باشند. محل این موتیف‌ها در آنالیز در پایگاه CDD به‌عنوان putative di-iron ligands تعیین گردیده‌است، که در شکل به‌صورت علائم مثلی مشخص گردیده است. اولین موتیف غنی از هیستیدین، از آمینواسید ۱۷۱ تا ۱۷۵، دومین موتیف از آمینواسید ۲۰۸ تا ۲۱۲ و سومین موتیف در جایگاه ۳۹۶ تا ۳۹۹ قرار گرفته است (شکل ۴-۲۱).

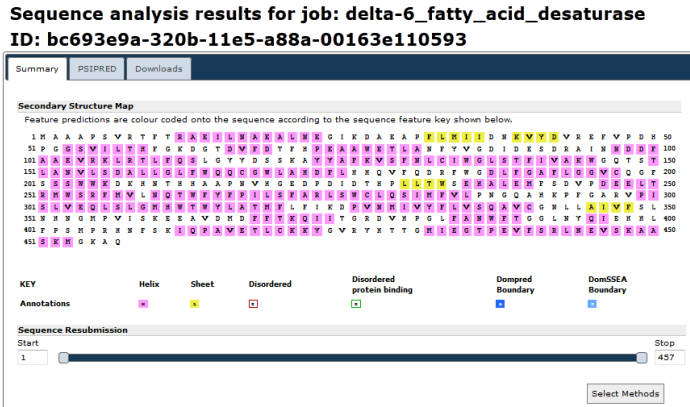


شکل ۴-۲۱: دومین‌های شناسایی شده توسط پایگاه CDD و تعیین موتیف‌های حفاظت‌شده هیستیدین

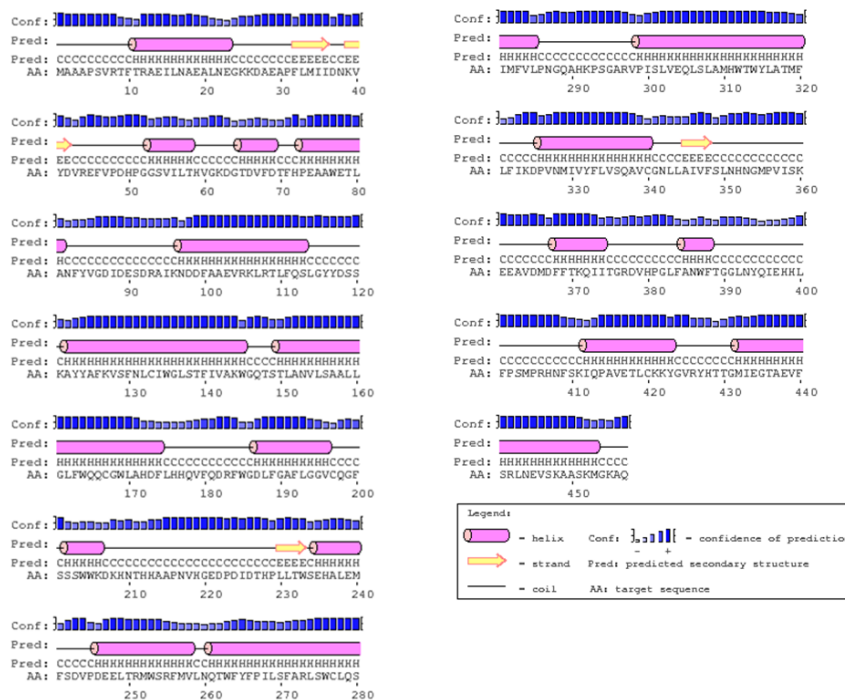
در زیر محل دومین سیتوکروم b5 و جعبه‌های غنی از هیستیدین در توالی پروتئین مشخص گردیده است.

MAAAPSVR**TFTRAEILNAEALNEG**IKDAEAPFLMIIDNKVYDVREFVDPDHPGGSVIL**THFGKDGTDVFDTF**  
**HPEAAWETLANFYVG**DI**DES**DRAINNDFAAEVRKLR**TLFQSLGYYDSSKAYYAFKVSFNLCI**WGLSTFIV  
 AKWGQ**TSTLANVLS**DALLGLFWQ**QC**GWLA**HDFLHH**QVFQDRFWGDLFGAFLGGVCQGFSSSWWKDK**HNTHH**  
 AAPNVHG**EDPDID**THPLLTWSEHALEMFS**DVPDEEL**TRMWSRFMVLNQTWFYFPILSFARLSWCLQ**SIMFV**  
 LPNGQAHK**PFGARVPI**SLVEQ**LSLGMHWTWY**LATMFL**FIKDPVNMIVYFLVSQAVCGNLLAIVFSLNHN**GM  
 PVISKEEAVDMDF**FTKQII**TGRDVHPGLFANW**FTGGLNYQIEHH**LFPSMPRHNFSKI**QPAVETLCKKYGVR**  
 YHTTGMIEGTPEVFSRLNEVSKAASKMGKAQ

نتایج حاصل از بررسی ساختار ثانویه پروتئین توسط سرور Psipred نشان داد که ساختار این پروتئین دارای ۱۸  $\alpha$ -helices و بیشتر از ۱۵ عدد سوپرکویل می‌باشد. طول ۵ عدد از  $\alpha$ -helices ها بیشتر از ۲۰ آمینواسید است، بنابراین دلتا ۶ دسچوراز در درجه اول از  $\alpha$ -helices تشکیل یافته است که از مشخصات پروتئین‌های غشائی می‌باشد (شکل ۴-۲۲، ۴-۲۳، ۴-۲۴).

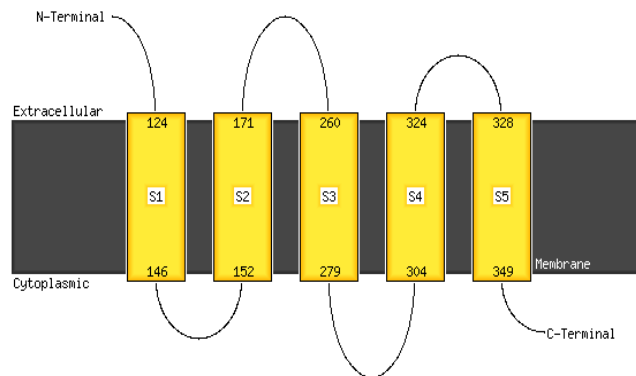


شکل ۴-۲۲: نتایج حاصل از بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی با استفاده از سرور psipred

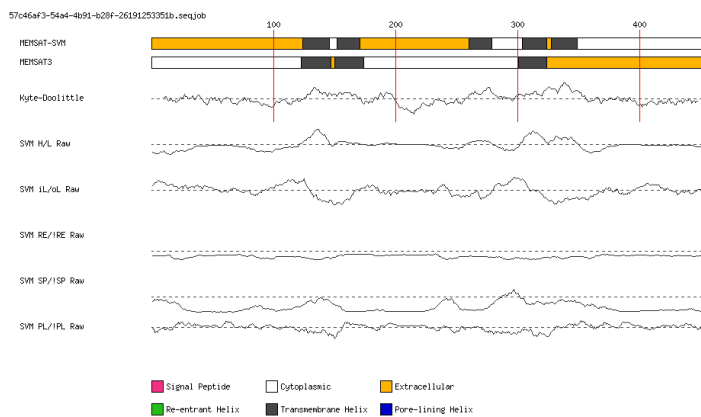
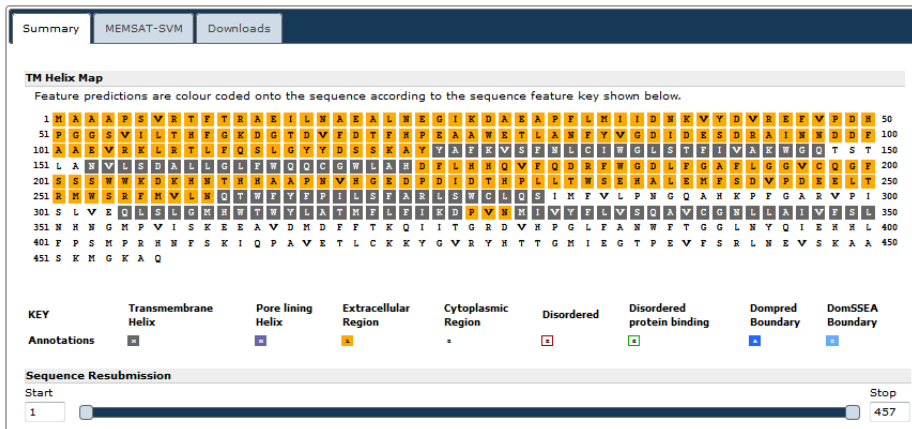


شکل ۴-۲۳: تعیین ساختارهای دوم توالی پروتئینی (Supercoil و Strand  $\alpha$ -helices) توسط سایت psipred

با توجه به آنالیزهای صورت گرفته، این پروتئین هیچ سیگنال پتیدی ندارد. ناحیه N-ترمینال آن در خارج سلول و C-ترمینال به سمت سیتوپلاسم قرار گرفته است (شکل ۴-۱۹).

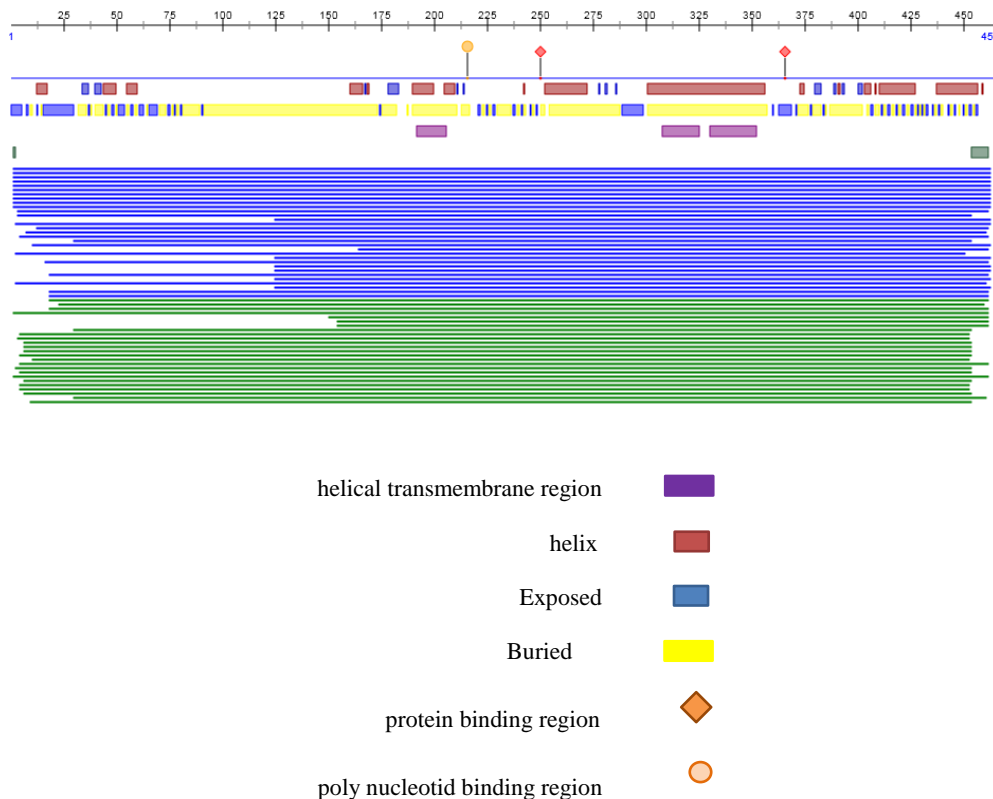


### Sequence analysis results for job: delta-6\_fatty\_acid\_desaturase ID: c49207ac-3218-11e5-b118-00163e110593



شکل ۴-۲۴: تعیین نقشه هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور Psipred

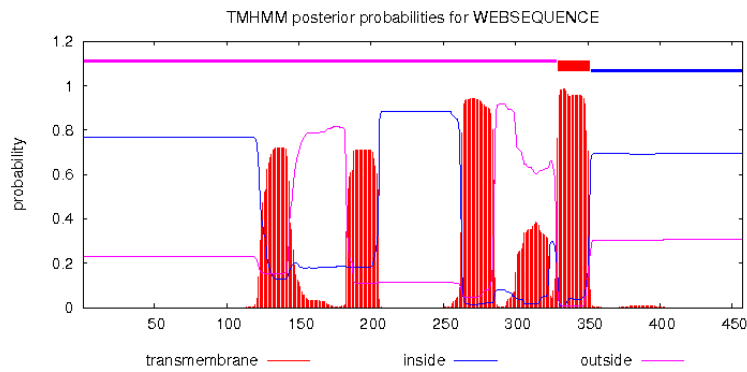
با توجه به آنالیز ساختار دوم توسط Predict Protein، ۳ ناحیه گذرنده از غشاء وجود دارد. هلیکس‌های گذرنده از غشاء در پروتئین‌های کروی زمانی که هیچ سیگنال پپتیدی وجود ندارد، حدود ۱۱٪ و در غیر این صورت بسته به ارگانیزم ۱۷-۳۹٪ را تشکیل می‌دهند (شکل ۴-۲۵).



شکل ۴-۲۵: بررسی ساختار دوم پروتئین توسط سرور Predict Protein

#### ۴-۱۴- پیش‌بینی هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور TMHMM

در بررسی توالی پروتئینی جهت شناسایی محل احتمالی هلیکس‌های ترانس‌ممبران توسط سرور TMHMM در پنج ناحیه هلیکس‌های ترانس‌ممبران مشخص گردید (شکل ۴-۲۶).



شکل ۴-۲۶: بررسی ساختار دوم پروتئین و تعیین مناطق ترانس ممبران توسط سرور TMHMM

جدول ۴-۳: تعیین موقعیت مناطق درون غشائی، خارج غشائی و بین غشائی

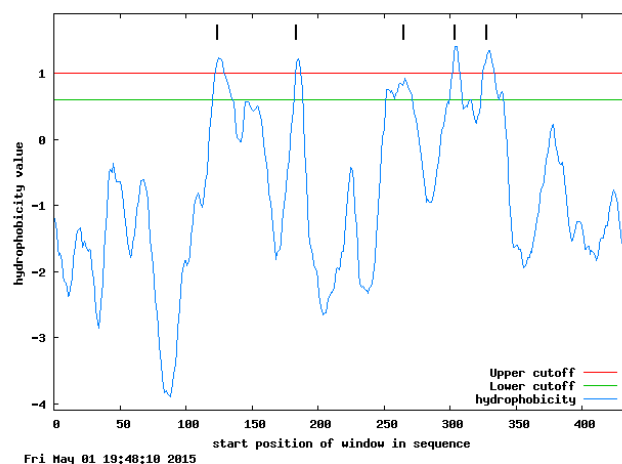
موقعیت	منطقه
1-328	Outside
329-351	helical transmembrane
352-457	Inside

#### ۴-۱۵- تعیین میزان آب دوستی و آب گریزی توالی آمینواسیدی توسط سایت Expasy

بر اساس داده‌های حاصل از سایت Expasy میزان آب گریزی این پروتئین بالاست و بیشترین

میزان آن در فاصله ناحیه هلیکس ترانس ممبران قرار دارد. پلات آب گریزی دو ناحیه حفاظت شده آب-

گریز، جهت تشکیل دو ناحیه پوشاننده غشاء در شبکه آندوپلاسمی، را مشخص کرد (شکل ۴-۲۷).



شکل ۴-۲۷: نمودار هیدروپاتی ژن دلتا ۶ دسچوراز توسط نرم افزار TopPred. ۵ قطعه گذرا از غشا در

موقعیت‌های ۱۲۵-۱۴۵ aa، ۱۸۵-۲۰۵ aa، ۲۶۶-۲۸۶ aa، ۳۰۵-۳۲۵ aa، ۳۲۹-۳۴۹ aa.



#### ۴-۱۶- تعیین نقشه پپتیدی پروتئین

نقشه پپتیدی پروتئین توسط پایگاه Peptidemass تعیین گردید. الگوی ارائه شده براساس

برش پروتئین توسط آنزیم تریپسین می باشد (شکل ۴-۲۸).

peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pt: 5.69 / Mw (average mass): 51969.29 / Mw (monoisotopic mass): 51935.64]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
4910.2498	209-251	0		HNTTHAAPNVHGEDPDIDTH PLLTWSEHALEMFSQVDPDEE LTR
4538.2250	145-183	0		WGGTSTLANVLSDALLLGLFW QCGWLAHDFLHHQVFDQR
3903.0369	325-360	0		DPVNMIVYFLVSQAVCGNLL AIVSLNHNHGMPIVSK
3532.5451	63-93	0		DGTDVFDTFHPEAAWETLAN FYVGDIDESDR
3380.6421	378-406	0		DVHPGLFANWFTGGLNYQIE HHLFSPMPR
3223.7086	298-324	0		VPISLVEQLSLGMHWTVYLA TMFLFIK
2700.3901	274-297	0		LSWCLQSMFVLPNGQAHKP FGAR
2582.1961	184-206	0		FWGDLFGAFLGGVCCQGFSSS WWK
2280.1674	256-273	0		FMVLNQTWYFYFPLSFAR
1936.9915	45-62	0		EFVDPHPGGSVILTHFGK
1898.0244	128-144	0		VSFNLCIWGLSTFVAK
1842.8149	427-442	0		YHTTGMMEGTPEVFSR
1508.7267	109-121	0		TLFQSLGYDSSK
1484.7954	13-26	0		AEILNAEALNEGK
1476.7402	27-39	0		DAEAPFLMIDNK
1334.6335	94-105	0		AINDDFAAEVR
1331.5824	361-371	0		EEAVDMDFTK
1101.5972	412-421	0		IQPAVELCK
802.4240	1-8	0		MAAAPSVR
762.3821	122-127	0		AYYAFK
689.3828	443-448	0		LNEVSK
687.4148	372-377	0		QITGR
651.3460	40-44	0		VYDVR
632.3151	407-411	0		HNFSK
579.2708	252-255	0		MWSR
524.2827	9-12	0		TFTR

شکل ۴-۲۸: تعیین نقشه پپتیدی با استفاده از Peptidemass

#### ۴-۱۷- هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی با استفاده از Clustalw

هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی ۴ گونه با استفاده از clustalw وضعیت یکسانی<sup>۱</sup> و مشابهت<sup>۲</sup> را

در نقاطی که اختلاف وجود دارد، مشخص ساخت. در این شکل علامت \* به مفهوم یکسانی کامل

اسیدهای آمینه آن محل، علامت (:): به مفهوم هم‌گروه بودن اسیدهای آمینه این نقاط از لحاظ

بیوشیمیایی، علامت (.) نشانگر نزدیک بودن گروه‌های بیوشیمیایی اسیدهای آمینه این نقاط و علامت

( ) نشانگر دور بودن آن‌ها از لحاظ گروه‌های بیوشیمیایی می باشد (شکل ۴-۲۹).

1 - Identity  
2 - Similarity

```

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      -MAAAPSVRTFTRAEILNAEALNEGKDAEAPFLMIIDNKVYDVREFVDP
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      -MAAAPSVRTFTRAEILNAEALNEGKDAEAPFLMIIDNKVYDVREFVDP
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  -MAAAPSVRTFTRAEILNAEALNEGKDAEAPFLMIIDNKVYDVREFVDP
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      MTTSDPSVRAFTRSEVLHADALNEGKKNAAEAPFLMIIDNKVYDVREFIPD
      *:****:****:****:****:****:****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      HPGGSSVILTHVGKDGTDVFDTFHPEAAWETLANFYVGDIDESDRAINND
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      HPGGSSVILTHVGKDGTDVFDTFHPEAAWETLANFYVGDIDESDRAINND
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  HPGGSSVILTHVGKDGTDVFDTFHPEAAWETLANFYVGDIDESDRAINND
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      HPGGSSVILTHVGKDGTDVFETFHPEAAWETLANFYVGDIVESDRAIENDE
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      FAAEVRKLRTRLFQSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWGQTS
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      FAAEVRKLRTRLFQSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWGQTS
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  FAAEVRKLRTRLFQSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWGQTS
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      FAAEVRKLRTRLFYSLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSAFIVAKWGQTS
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      TLANVLSDALGLFWQCCGWLADHDFLHHQVDFQDRFWGDLFGAFLGGVCQG
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      TLANVLSAALLGLFWQCCGWLADHDFLHHQVDFQDRFWGDLFGAFLGGVCQG
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  TLANVLSAALLGLFWQCCGWLADHDFLHHQVDFQDRFWGDLFGAFLGGVCQG
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      TLANVISASLLGVFWQCCGWLADHDFLHHQVDFHDFRFWGDLFGAFLGGVCQG
      *****:****:****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      FSSSWWKDKHNTTHHAAPNVHGEDPDDIDTHPLLTWSEHALEMFSVDPDEEL
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      FSSSWWKDKHNTTHHAAPNVHGEDPDDIDTHPLLTWSEHALEMFSVDPDEEL
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  FSSSWWKDKHNTTHHAAPNVHGEDPDDIDTHPLLTWSEHALEMFSVDPDEEL
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      FSSSWWKDKHNTTHHAAPNVHGEDPDDIDTHPLLTWSEHALEMFSVDPDEEL
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      TRMWSRFMVLNQTWFYFPILSFARLSWCLQSIMFVLPNGQAHKPFGARVP
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      TRMWSRFMVLNQTWFYFPILSFARLSWCLQSIMFVLPNGQAHKPSGARVP
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  TRMWSRFMVLNQTWFYFPILSFARLSWCLQSIMFVLPNGQAHKPSGARVP
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      TQMWSRFMVLNQAWFYFPILSFARLSWCIQSIMFVLPNGQAHKPGARVP
      *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      ISLVEQLSLGMHWTWYLATMFLFIKDPVNMIVYFLVSQAVCGNLLAIVFS
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      ISLVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNMIVYFLVSQAVCGNLLAIVFS
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  ISLVEQLSLAVHWTWYLATMFLFIKDPVNMIVYFLVSQAVCGNLLAIVFS
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      ISLVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNMIVYFLVSQAVCGNLLAIVFS
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      LNHNGMPVISKEEAVDMDFFTKQIIITGRDVHPGLFANWFTGGLNYQIEHH
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      LNHNGMPVISKEEAVDMDFFTKQIIITGRDVHPGLFANWFTGGLNYQIEHH
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  LNHNGMPVISKEEAVDMDFFTKQIIITGRDVHPGLFANWFTGGLNYQIEHH
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      LNHNGMPVISQEEAVEMDFFTKQIIITGRDVYPGWFADWFTGGLNYQIEHH
      *****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      LFPSMPRHNFSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTGMIEGTAEVFSRLNEVSKA
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      LFPSMPRHNFSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTGMIEGTAEVFSRLNEVSKA
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  LFPSMPRHNFSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTGMIEGTAEVFSRLNEVSKA
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      LFPSMPRHNFSKIQPAVESLCKKYGVRYHTTGMIAGTAEVFSRLNEVSKA
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:****
      *

gi|6070341|dbj|BAA85589.1|      ASKMGKAQ
gi|6070340|dbj|BAA85588.1|      ASKMGKAQ
gi|18483177|gb|AAL73948.1|AF46  ASKMGKAQ
gi|34221930|dbj|BAC82359.1|      ASKLGKSA
      ***:***:

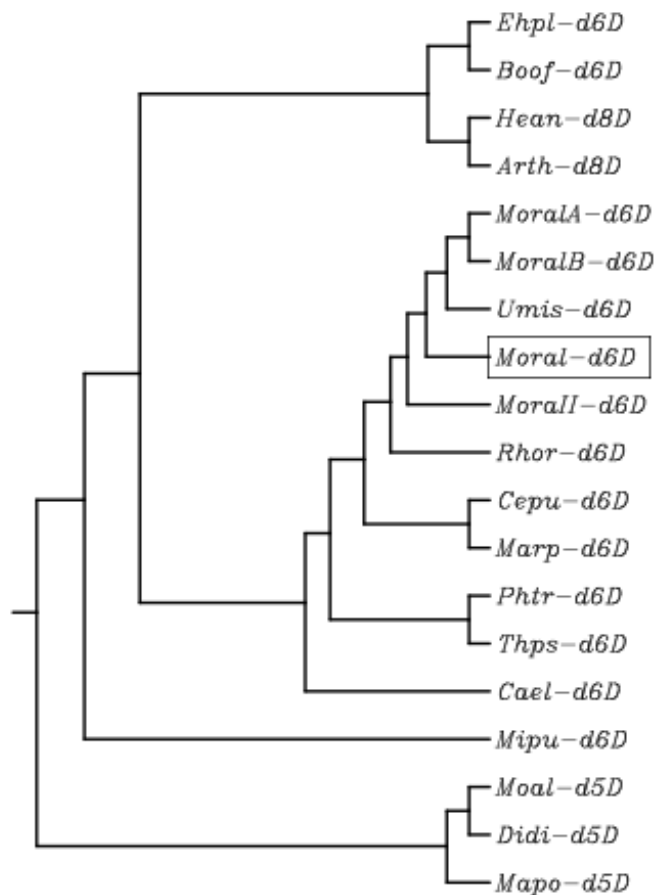
```

شکل ۴-۲۹: نمایش تغییرات آمینواسیدی با استفاده از نرم افزار Clustal W

BAA85589.1 (پروتئین توالی یابی شده)، BAA85588.1 (delta-6D *Mortierella alpina*)، AAL73948.1 (delta-6D *Umbelopsis isabellina*)، BAC82359.1 (delta6- D *Mortierella alpina*)

#### ۴-۱۸- رسم درختچه فیلوژنتیکی

میزان قرابت توالی پروتئینی با توالی این ژن در گونه‌های دیگر، با استفاده رسم درخت فیلوژنتیکی تعیین گردید. به دلیل این که دلتا ۶ و ۸ اسفنگولیپید در یک خانواده قرار گرفته و گاهی بسیار شبیه هم می‌باشند، بنابراین علاوه بر دلتا ۶، از توالی پروتئینی چند ژن دلتا ۸ اسفنگولیپید نیز در رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده گردید. بررسی نتایج نشان داد که توالی پروتئینی ژن موردنظر هم‌گروه سایر توالی‌های ژن دلتا ۶ دسچوراز *M. alpina* گزارش شده قرار می‌گیرد، در حالی که با دلتا ۸ اسفنگولیپید هم‌گروه نیست. این نتایج نشان دهنده حفاظت بالای ژن در این قارچ می‌باشد (شکل ۴-۳۰).



شکل ۴-۳۰: رسم درختچه فیلوژنتیکی

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

#### ۴-۱۹- تعیین خواص بیوشیمیایی پروتئین توسط سرور Protparam

در تعیین خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین حاصل توسط سرور Protparam، وزن مولکولی توالی پروتئینی توسط فرمول مولکولی  $C_{2385}H_{3538}N_{614}O_{612}S_{21}$ ،  $51969/2$  دالتون و نقطه ایزوالکتریک (IP) آن  $5/69$  محاسبه گردید. نقطه ایزوالکتریک حالتی است که پروتئین از نظر بار الکتریکی خنثی است و اگر در میدان الکتریکی قرار گیرد، نمی‌تواند حرکت کند. شاخص ناپایداری پروتئین جهت تعیین پایداری پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در لوله آزمایش کاربرد دارد. اگر این شاخص کمتر از ۴۰ باشد، در گروه پروتئین‌های پایدار دسته‌بندی می‌گردد. این شاخص برای پروتئین دلتا ۶،  $30/68$  محاسبه گردید، اما با توجه به وجود توالی متیونین در N-ترمینال این پروتئین نیمه‌عمر برآوردی در شرایط آزمایشگاهی ۳۰ ساعت می‌باشد، که بیانگر پایداری این پروتئین می‌باشد. شاخص آب‌گریزی  $81/31$  محاسبه گردید، که نشان‌دهنده آب‌گریزی این پروتئین است. از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۳۴ اسید آمینه دارای بار مثبت (شامل آرژنین و لیزین) و ۴۹ اسید آمینه دارای بار منفی (شامل آسپاراتات و گلوتامات) می‌باشند.

ایجاد پیوند دوگانه در زنجیره آسپیل‌چرب توسط غیراشباع‌سازی، به واسطه دهنده اکسیژن و الکترون کاتالیز می‌گردد (Heinz, 1993; Shanklin and Cahoon, 1998). سریع‌ترین دهنده الکترون

برای بسیاری از دسچورازهای میکروزومال سیتوکروم b5 (Lederer, 1994) - یک هموپروتئین کوچک کاتالیزگر تعدادی از واکنش‌های اکسیداسیون و کاهش در گیاهان - شامل NADH وابسته به گروه آسیل دسچوراسیون می‌باشد (Smith et al., 1998). سیتوکروم b5 همچنین در هیدروکسیلاسیون اسیدهای چرب در گیاهان عالی دخالت دارد. به غیر از فرم میکروزومال آزاد این پروتئین، دومین سیتوکروم b5 یا شکل فولدشده آن در تعدادی از پروتئین‌های غیرمرتبط، مانند نیترات ردوکتاز، سولفیت اکسیداز و لاکتات‌دهیدروژناز یافت شده است. این دومین‌ها دارای مشخصات موتیف سیتوکروم b5 (هیستیدین - پرولین - گلايسين - گلايسين) (HPGG) می‌باشند، که هسته دومین متصل به گروه هم را تشکیل می‌دهد. مشخص گردیده است که سیتوکروم ردوکتازها<sup>1</sup> از دومین متصل به فلاوین آدنین دی- نوکلئوتید (FAD)-binding و دومین اتصال NADH تشکیل شده است که دو دومین توسط ساختار  $\beta$ -sheet به یکدیگر متصل شده‌اند. مقایسه ساختاری دومین  $\beta$ -barrel متصل به فلاوین در سیتوکروم اکسیداز و دیگر ردوکتازهای وابسته به فلاوین (فردوکسین NADP ردوکتاز) و نیترات ردوکتاز نشان دهنده این است که بطور کلی الگوی فولدینگ همه مشابه بوده و ترتیب ویژه سه آمینواسید (آرژنین، تیروزین و سرین یا ترئونین) جهت اتصال فلاوین ضروری است (Lederer, 1994).

دومین سیتوکروم ردوکتاز در *M. alpina* مونومری از ۲۹۸ آمینواسید می‌باشد که مطابق با طول دیگر سیتوکروم اکسیدازها می‌باشد. دومین FAD در N-ترمینال و دومین NADH در C-ترمینال نشانگر شباهت بالای توالی با دیگر سیتوکروم اکسیدازها می‌باشد. ترتیب ویژه ۳ اسیدآمینو (آرژنین، تیروزین و سرین یا ترئونین) که برای اتصال فلاوین در آنزیم‌های دیگر ضروری شناخته شده است، در سیتوکروم اکسیدازها *M. alpina* مشاهده می‌گردد. مجموعه‌ای از توالی آمینواسیدها در N-ترمینال آب‌گریزی بالایی نشان می‌دهند و بنابراین ممکن است به غشاء شبکه آندوپلاسمی اتصال

---

1 - Cytochrome-b5 reductase

یابند. با این حال، در سیتوکروم اکسیداز *M. alpina*، هیچ ساختار  $\beta$ -sheet وجود ندارد، در حالی که این ساختار، دومین FAD و NADH را در سیتوکروم اکسیداز پستانداران به یکدیگر اتصال می‌دهد.

سایوناوا و همکاران در سال ۱۹۹۹ جهت تعیین نقش عملکردی دومین سیتوکروم b5 از دو روش مکمل حذف انتهای N-ترمینال و جهش‌زایی استفاده کردند. بنابراین دو شکل از فرم کوتاه‌شده N-ترمینال دلتا ۶ دسچوراز ایجاد گردید. همچنین یک شکل از جهش نقطه‌ای که در آن هیستیدین حفاظت‌شده (His-41) در موتیف HPGG متصل به گروه هم، با یک آلانین جایگزین گردید. این سه شکل موتانت دسچورازها در آرآبیدوپسیس تراریخته بیان گردیدند و چگونگی عملکرد با بیان طول کامل دلتا ۶ دسچوراز گونه‌وحشی در گل‌گاوزبان مقایسه گردید. کروماتوگرافی اسیدهای چرب نشان داد که هیچ GLA یا <sup>1</sup>OTA (Octadecatetraenoic acid) در برگ‌های ترانسفورم‌شده یا در گیاهان تراریخته با فرم‌های کوتاه‌شده این توالی، در مقایسه با گیاهان تراریخته با طول کامل سیتوکروم b5 در دلتا ۶ دسچوراز یافت نگردید. آنالیز نورترن‌بلات نشان داد که اشکال کوتاه‌شده دلتا ۶ دسچوراز گل-گاوزبان در لاین‌های آرآبیدوپسیس تراریخت بیان گردیده‌است. این آنالیزها نشان داد که اشکال کوتاه‌شده و با توالی کامل دسچوراز گل‌گاوزبان کاهش سطح در میزان نسخه‌برداری داشتند. خصوصاً رونوشت‌های با حذف N-ترمینال بزرگتر پایداری کمتری داشتند (Sayanova et al., 1999).

این امکان وجود دارد که عدم شناسایی ژن دلتا ۶ دسچوراز در گیاهان تراریخته شده با این ژن، اما بدون تظاهر بیانی، به دلیل تغییر در پردازش mRNA یا ترجمه متفاوت این ژن‌ها بجای از دست دادن فعالیت آنزیم باشد. همچنین میشل و مارتین<sup>۲</sup> در سال ۱۹۹۵ با مطالعه بر روی OLE1 (D9 -desaturase gene) دسچوراز نشان دادند که در بین روش‌های مختلف مطالعه نقش دومین سیتوکروم b5، جهش‌زایی جایگاه‌ها، ابزار دقیق‌تری برای تعیین نقش اسیدهای آمینه در پروتئین بوده و مانند جهش‌زایی بر روی پایداری mRNA و بازده ترجمه اثر ندارد (Mitchell AG, Martin CE.,

---

1- Octadecatetraenoic acid

2 - Mitchell and Martin

(1995). بنابراین سایوناوا و همکاران در سال ۱۹۹۹ یکبار دیگر در نواحی با حفاظت بالا از دومین اتصال هم HPGG در انتهای N- ترمینال سیتوکروم b5 جهش اعمال کردند. این باقی مانده هیستیدینی جهت عمل سیتوکروم b5 بدلیل فعالیت به عنوان لیگاند هم ضروری است. His-41 توسط جهش در توالی کدکننده دسچورازها به آلانین تبدیل گردید. آلانین بدین دلیل به عنوان جایگزین انتخاب گردیده است که هیدروفوبیک و غیرقطبی (unchargh) بوده و در نتیجه نمی تواند در هم فعال باشد (Sayanova et al., 1999).

آنالیز کروماتوگرافی گازی گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس هیچ انباشت GLA و OTA در مقایسه با بیان حدود ۱۵٪ اسیدهای چرب دلتا ۶ دسچوراز تیپ وحشی نشان نداد. اگرچه آنالیز نوردن بلات سطوح mRNA برابری با گیاهانی که تیپ وحشی آنزیم گل گاوزبان در آنها بیان شده بود، نشان داد. این نتایج نشان می دهد که باقیمانده His-41 دومین اتصال HPGG به احتمال زیاد جهت فعالیت آنزیماتیک دلتا ۶ دسچوراز ضروری است و به منظور هماهنگی محور اتصال هم مرکزی در این دومین کاربرد دارد. همچنین این نتایج نشان می دهد که دومین سیتوکروم b5 در دسچورازهای front-end (آنزیمهایی که غیراشباع سازی را بین پیوند دوگانه موجود و گروه کربوکسیل ایجاد می کنند)، به عنوان بخش جدایی ناپذیر مکانیسم های واکنش این گروه از آنزیم ها می باشد.

## ۴-۲۰- بحث

در سال‌های اخیر، مهندسی متابولیک مسیر بیوسنتزی دانه، جهت ایجاد تنوع و بهبود کیفیت محصولات تولیدی از جمله طرح‌هایی است که علاقه‌مندان زیادی دارد. در این میان علاقه‌مندی زیادی به تولید اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در گیاهان دانه روغنی وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که کمبود این اسیدهای چرب احتمال بیماری‌های قلبی-عروقی، التهابی و افسردگی را افزایش می‌دهد و چون بدن انسان قادر به سنتز این اسیدهای چرب نمی‌باشد، می‌بایستی از طریق رژیم غذایی تامین گردند (Napier JA 2007). در حال حاضر منابع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در رژیم غذایی، ماهی یا کپسول روغن ماهی و دیگر غذاهای دریایی است که در مدت زمان طولانی، پاسخگوی نیاز رشد جمعیتی نخواهند بود (Meyer and Worm, 2003). گیاهان دارای دانه‌های روغنی قادر به سنتز این اسیدهای چرب نمی‌باشند، اما مهندسی متابولیک این گیاهان راه‌حل مناسبی جهت افزایش سطح روغن‌های با پایه دریایی می‌باشد. با توجه به این‌که مراحل غیراشباع‌سازی محدودکننده بیوسنتز اسیدهای چرب بلندزنجیر شناخته شده‌اند، بسیاری از مطالعات روی جداسازی و شناسایی ژن‌های کدکننده این دسچورازها متمرکز گردیده است. سنتز این اسیدهای چرب توسط آنزیم دلتا ۶ دسچوراز، به صورت یک پیوند دوگانه بین کربن‌های ۶ و ۷ در لینولئیک‌اسید و آلفا لینولنیک‌اسید، آغاز می‌گردد که به ترتیب منجر به تولید اسیدهای چرب گامالینولنیک‌اسید و استئاریودونیک‌اسید می‌گردد. بنابراین می‌توان گفت دلتا ۶ دسچوراز به‌عنوان دروازه‌ای برای اسیدهای چرب، جهت ورود به مراحل بعدی غیراشباع‌سازی و طویل‌سازی می‌باشد. در این تحقیق، ژن دلتا ۶ دسچوراز به‌عنوان آغازگر سنتز این اسیدهای چرب از قارچ *Mortierella alpina* که از قارچ‌های تولیدکننده اسید چرب گامالینولنیک‌اسید می‌باشد، جهت همسانه‌سازی انتخاب گردید.

هر ژنی که قرار است در گیاه تراریخت بیان گردد، باید دارای یک پروموتور فعال در بافت گیاهی باشد، تا باعث بیان صحیح آن در گیاه گردد. از جمله پروموتورهای پرکاربرد در گیاهان دولپه-



ای، پروموتور بذر اختصاصی مربوط به پروتئین ذخیره‌ای بذر ناپین جداسازی شده از کلزا می‌باشد (Scofield and Crouch, 1987; Kridle et al., 1991). استفاده از پروموتورهای اختصاصی دانه در مسیر تولید اسیدهای چرب سبب افزایش بیان و اصلاح متابولیت‌ها در دانه می‌گردد. این نکته خصوصاً در مهندسی مسیرهای روغنی که حضور این اسیدهای چرب در بافت سبزیجات به ساختمان و عمل غشاء آسیب می‌رساند، مهم است. با استفاده از این پروموتورها بیان آن‌ها به بخش‌های خاصی از گیاه محدود گردیده و علاوه بر این که مانع از تاثیر بر فرآیندهای غشائی می‌گردد، استحصال روغن نیز از این بافت‌ها با سهولت بیشتری صورت می‌پذیرد (Petrie et al. 2010).

ساکوردانی و همکاران در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار ژن دلتا ۶ دسچوراز را از قارچ *M. alpina* استخراج و تحت کنترل پروموتور *amyB* در قارچ اسپرژیلوس بیان کردند که منجر به تولید ۲۵٪ گامالینولنیک‌اسید گردید (Sakuradani, et al., 1999). ژن دوم دلتا ۶ دسچوراز این قارچ نیز در سال ۲۰۰۳ توسط ساکوردانی و همکاران خالص‌سازی و در قارچ اسپرژیلوس بیان گردید که منجر به تولید ۳۷٪ اسیدچرب گامالینولنیک‌اسید از کل اسیدهای چرب شد (Sakuradani, et al., 2003). لیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ ناحیه ORF این ژن به همراه توالی افزایش دهنده بیان گیاهی کوزاک همسانه‌سازی کرده و آن را در مخمر *P.pastoris* بیان کردند. با بررسی درصد گامالینولئیک‌اسید تولیدی، مشخص گردید که این اسیدچرب به میزان ۶/۳٪ تولید گردید (Liu J, et al., 2011).

در این تحقیق پس از کشت قارچ، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام پذیرفت. در ابتدای آغازگر فوروارد، توالی کوزاک جهت افزایش هرچه بیشتر بیان در سیستم گیاهی الحاق و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن دلتا ۶ دسچوراز خالص‌سازی شد. با توجه به اثر منفی این اسیدهای چرب در غشاء سلولی، قطعه حاصل در پایین‌دست پروموتور ناپین در وکتور بیانی pBI121 همسانه‌سازی گردید، تا تولید این اسیدهای چرب به بافت دانه محدود گردد.

نتایج حاصل از آنالیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نشان داد که ژن استخراج شده، با دلتا ۶ دسچوراز پروکاریوت‌ها، گیاهان و جانوران هم‌خانواده می‌باشد. به عبارت دیگر، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی آن بسیار حفاظت شده می‌باشد. نتیجه هم‌ردیفی در سطح نوکلئوتید و پروتئین، هیچ 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 توجه به این- که این ژن، یک دسچوراز غشائی است، کریستالوگرافی آن بسیار مشکل بوده و هنوز ساختار سوم آن تعیین نگردیده است.

از روش دیسک برگی، جهت انتقال ژن به گیاه توتون و بررسی بیان استفاده گردید. تایید انتقال ژن ابتدا توسط بیان ژن NPT II در گیاهان تراریخته که در مجاورت آنتی بیوتیک کانامایسین قرار گرفته بودند انجام شد. با توجه به امکان فرار گیاهچه‌های غیر تراریخته جهت تأیید قطعی تری از واکنش PCR با استفاده از آغازگر داخلی ژن دلتا ۶ دسچوراز و پرموتور ناپین استفاده شد. نتایج حاصل، تکثیر قطعه انتقال یافته در DNA گیاهان تراریخته تأییدی بر انتقال آن بر روی DNA ژنومی گیاه توتون بود. عدم تکثیر قطعه موردنظر بر روی cDNA سنتز شده از روی RNA استخراجی از برگ گیاه توتون، تأییدی بر صحت عملکرد پرموتور ناپین بود.

## پشهادات:

با توجه به وجود اختلافات نوکلئوتیدی در قطعه همسانه‌سازی شده، انتقال این ژن به ناقل بیانی و بررسی بیان در مخمر راهی جهت اطمینان از عملکرد صحیح ژن می‌باشد.

همچنین به دلیل حضور پروموتور ناپین در سازه، انتقال سازه به گیاه دانه روغنی مانند کلزا و بررسی عملکرد صحیح پروموتور، بررسی کارکرد ژن در سطح آنزیمی و تولید محصول اسیدچرب تائیدی بر صحت عمل همسانه‌سازی می‌باشد.

با توجه به هدف نهایی از ساخت سازه که تولید اسیدهای چرب امگا ۳ می‌باشد، بیان همزمان آنزیم‌هایی مانند دلتا ۱۵ دسچوراز در سازه می‌تواند مسیر تولید اسیدهای چرب را به سمت تولید اسیدهای چرب با اولویت امگا ۳ بیشتر هدایت کند.



منابع

Abbadi A, Domergue F, Bauer J, Napier J, Weltri R, Zähringer U, Cirpus P, Heinz E. (2004). "Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation". **The Plant Cell** 16, 2734-48.

Berkeley, W. (1996). "Method for arachidonic acid production". **Japanese Patent**. H8-214893.

Branen A, L., Davidson, P, M., Salminen, S., & Thorngate, J, H. (2002). "Food Addictives.second edition" .**Marcel Dekker**, Inc. 296-302.

Chen, P. Y., Wang, C. K., Soong, S. C., & To, K. Y. (2003). "Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants". **Molecular breeding**, 11(4), 287-293.

Chen, G., Qu, S., Wang, Q., Bian, F., Peng, Z., Zhang, Y., Ge, H., Yu, J., Xuan, N., Bi, Y., & He, Q. (2014). "Transgenic expression of delta-6 and delta-15 fatty acid desaturases enhances omega-3 polyunsaturated fatty acid accumulation in *Synechocystis* sp. PCC6803". **Biotechnology for biofuels**, 7(1), 1-10.

Chen, Y, Q., Edwards, I, J., Kridel, S, J., Thornburg, T., & Berquin, I, M. (2007). "Dietary fat-gene interactions in cancer". **Cancer Metastasis Rev**, 26, 535–551.

Cheng B, Wu G., Vrinten P., Falk K, Bauer J., Qiu X. (2010). "Towards the production of high levels of eicosapentaenoic acid in transgenic plants: the effects of different host species, genes and promoters". **Transgenic Research**, 19, 221–229.

Cheng, M. H., Walker, T. H., Hulbert, G. J. and Raman, D. R. (1999). "Fungal production of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from industrial waste streams and crude soybean oil". **Bioresource Technology**. 67, 101-110.

Clarke SD. (2001). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome". **J Nutr.** 131:1129.

Clarke SD, Gasperikova D, Nelson C, Lapillonne A, Hierd Wc. (2002). "Fatty acids regulation of gene expression a genomic explanation for the benefits of Mediterranean diet". **Annual of the New York Academy of sciences.** 967, 283- 298.

Cox D, Evans G, Lease H. (2011). "The influence of product attributes, consumer attitudes and characteristics on the acceptance of: (1) Novel bread and milk, and dietary supplements and (2) fish and novel meats as dietary vehicles of long chain omega 3 fatty acids". **Food Quality and Preference.** 22, 205-212.

Damude HG, Zhang H, Farrall L, Ripp, KG Tomb J-F, Hollerbach D, Yadav NS. (2006). "Identification of bifunctional D12/o3 fatty acid desaturases for improving the ratio of o3n to o6 fatty acids in microbes and plants". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 103, 9446–9451.

Devereux G. (2006). "The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought". **Nature Reviews Immunology.** 6, 869- 874

Doyle, J. J. (1987). "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". **Phytochem bull,** 19, 11-15.

Eckert H, LaVallee B, Schweiger BJ, Kinney AJ, Cahoon EB, Clemente T. (2006). "Coexpression of the borage D6 desaturase and the Arabidopsis D15 desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean", **Planta.** 224: 1050–1057.

EFSA, N. (2010). Panel: Scientific "opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol". **EFSA J,** 8, 1461.

Garcia-Maroto, F., Garrido-Cardenas, J.A., Rodriguez-Ruiz,J., Vilches-Ferron, M., Adam, A.C., Polaina, J. and Alonso, D.L. (2002). "Cloning and molecular

characterization of the D6 desaturase from two *Echium* plant species: production of GLA by heterologous expression in yeast and tobacco”. **Lipids**. 37, 417–426.

Gill, I. and Valivety, R. (1997). “Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurance, biological activities and applications”. **Trends in Biotechnology**. 15(10), 401-409.

Heinz E (1993). **Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids**. In TS Moore, Jr, ed, Lipid Metabolism in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 33–89.

Hibbeln JR. (2006). “Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acid: estimations considering world wide diversity”. **American Journal of Clinical Nutrition**. 83(S), 1483- 1493.

Hoffmann, M., Hornung, E., Busch, S., Kassner, N., Ternes, P., Braus, G. H., and Feussner, I. (2007). “A Small Membrane-peripheral Region Close to the Active Center Determines Regioselectivity of Membrane-bound Fatty Acid Desaturases from *Aspergillus nidulans*”. **J. Biol. Chem**. 282, 26666–26674.

Hong, H., Datla, N., Reed, D.W., Covello, P.S., MacKenzie, S.L. and Qiu, X. (2002). “High-level production of  $\gamma$  -linolenic acid in *Brassica juncea* using a D6 desaturase from *Pythium irregular*”, **Plant Physiology**, 129, 354–362.

Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM et al., (1999). “Cloning of  $\Delta$ 12 and  $\Delta$ 6 desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of c-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*”. **Lipids**, 34, 649–659.

Huang YS, Pereira SL, Leonard AE. (2004). “Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids”. **Biochimie**. 86,793–8.

Jianmin Liu, Dianrong Li, Yongtai Yin, Hao Wang, Maoteng Li, Longjiang Yu. (2011). “D6-Desaturase from *Mortierella alpina*: cDNA cloning, expression, and phylogenetic analysis”. **Biotechnol Lett**. 33, 1985–1991.

Jump DB. (2002). “Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription”. **Current opinion in lipidology**. 13, 155- 164.



Jump DB, Clarke SD. (1999). "Regulation of gene expression by dietary fat". **Annual Review of Nutrition**, 19, 63-90.

Kinney, J.A. (1994). "Genetic modification of the storage lipids of plants". **Current Opinion in Biotechnology**. 5, 144–151.

Kinney AJ, Cahoon EB, Damude HG, Hitz WD, Kolar CW, Liu ZB. (2004). "Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants". **Patent**, WO, /071467 A2.

Knauf VC, Shewmaker C, Flider FJ, Emlay D, Ray E. (2006). "Safflower With Elevated  $\gamma$ -Linolenic Acid". **International Patent Publication**, WO 2006127789.

Kolakowska, A., & Sikorski, Z. E. (2003). **The role of lipids in food quality. Chemical and functional properties of food lipids**. CRC Press, New York, 3-4.

Kozak M. (1986). "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes". **Cell**, 44 (2), 283–92.

Kyle, D. J. (1996). "Arachidonic acid and methods for the production and use thereof". **PCT Patent**, WO96/21037.

Laoteng K, Mannontarat R, Tanticharoen M. et al., (2000). "Delta- 6-desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant delta-6-desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*". **Biochem Biophys Res Commun**, 279, 17–22.

Lederer F (1994). "The cytochrome b5-fold: an adaptable molecule". **Biochimie**. 76, 974–992.

Li YT, Li MT, Fu CH, et al., (2009). "Improvement of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid production by increasing the copy number of the genes encoding

fatty acid desaturase and elongase into *Pichia pastoris*". **Biotechnol Lett.** 31, 1011–1017.

Liu L, Li MC, Hu GW, et al., (2001a). "Expression of delta 6 fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* in *Saccharomyces cerevisiae*". **Chin J Biotechnol**, 17, 161–164.

Liu, J.-W., Huang, Y.-S., Demichele, S., Bergana, M., Bohik, E., Hasilow, C., Chuang, L.T., Mukerji, P. and Knutzon, D. (2001b). Evaluation of the seed oils from a canola plant genetically transformed to produce high levels of  $\gamma$ -linolenic acid. In *GammaLinolenic Acid: Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications. International symposium on GLA*, pp 61-71, AOCS Press. ND.

Liu J, Li D, Yin Y, Wang H, Li M, Yu L. (2011). "D6-Desaturase from *Mortierella alpina*: cDNA cloning, expression, and phylogenetic analysis". **Biotechnol Lett.** 33, 1985–1991.

Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira. (2008). **Molecular cell Biology**. Vol, 1, A. Sotoudeniya M.D, H. Mohabati M.D, P. Saadat S. Mazaheri, SH. Shamsai, UK. 1, pp. 269- 274-286.

Lu, H., & Zhu, Y. (2015). "Screening and molecular identification of overproducing  $\gamma$ -linolenic acid fungi and cloning the delta 6-desaturase gene". **Biotechnology and applied biochemistry**.

Malmberg, R. L. (1979). "Regeneration of whole plants from callus culture of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L". **Planta**, 146(2), 243-244.

Meesapyodsuk, D., Reed, D. W., Savile, C. K., Buist, P. H., Ambrose, S. J., and Covello, P. S. (2000). "Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a *Caenorhabditis elegans* fatty acid desaturase (FAT-1) expressed in *Saccharomyces cerevisiae*". **Biochemistry**, 39, 11948–11954.

- Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. (2004). “Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of lowdensity lipoprotein”. **Atherosclerosis**. 175:333-343.
- Metz J, Flatt J, Kuner J. (2006). “PUFA polyketide synthases and uses thereof”. **Patent**, WO 13, 58-66.
- Metz J, Kuner J, Rosenzweig B, Lippmeier JC, Roessler P, Zirkle R. (2009). “Biochemical characterization of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Schizochytrium*: release of the products as free fatty acids”. **Plant Physiology and Biochemistry**. 47, 472-8.
- Metz J, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A. (2001). “Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes”. **Science**, 293- 290.
- Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR. (2003). “Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids”. **Lipids**, 38, 391-8.
- Myers RA, Worm B. (2003). “Rapid worldwide depletion of predatory fish communities”. **Nature**. 423, 280–283.
- Millar, M. Wrischer, L. Kunst. (1998). “Accumulation of very long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology”, **Plant Cell**. 10, 1889–1902.
- Miles EA, Banerjee T, Maaik MB, Dooper MM, M'Rabet L, Graus YMF, Calder PC. (2004). “The influence of different combinations of g-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects”. **Br. J. Nutr.** 9, 893–903.
- Mitchell AG, Martin CE (1995). “A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta$ -9 fatty acid desaturase”. **J Biol Chem** 270: 29766–29772

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. (2000). “Effect of aquaculture on world fish supplies”. **Nature**. 405, 1017–1024.

Needleman, P., Turk, J., Jackshik, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B. (1986). “Arachidonic acid metabolism”, **Annual Review of Biochemistry**. 55, 69–102.

Nisha. A., (2009), PHD Thesis: “Biotechnological studies for the production of Arachidonic acid from *Mortierella alpina*”. University of Mysore.

Nykiforuk, C. L., Shewmaker, C., Harry, I., Yurchenko, O. P., Zhang, M., Reed, C., Oinam, G.S., Zaplachinski, S., Fidantsef, A., Boothe, J. G & Moloney, M. M. (2012). “High level accumulation of gamma linolenic acid (C18: 3 $\Delta$ 6, 9, 12 cis) in transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds”. **Transgenic research**, 21(2), 367-381.

Okuyama H, Ichikawa Y, Sun Y, Hamazaki T, Lands W EM. (2007). “ $\omega$ 3 fatty acid effectively prevent coronary heart disease and other late-onset diseases: excessive linoleic acid syndrome”. **World Review of Nutritional Dietetics**. 96, 83- 103.

Ohlrogge, J.B. and Jaworski, J.G. (1997). “Regulation of fatty acid synthesis”. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 48, 109-136.

Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, Leonard AE, Thurmond JM, Chuang L, et al. (2000). “Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid”. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97, 8284–9.

Pereira SL, Leonard AE, Huang YS, Chuang LT, Mukerji P. (2004). “Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega 3- fatty acid, eicosapentanoic acid (EPA), to docosahexaenoic acid (DHA)”. **Biochemical Journal**. 384, 357- 366.

Petrie JR, Shrestha P, Qing Liu Q, Mansour MP, Craig C Wood CC. (2011). “Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production”. **Plant Methods**. 6:8.

Petrie, J. R., Shrestha, P., Zhou, X. R., Mansour, M. P., Liu, Q., Belide, S., Nichols, P.D., Singh, S. P. (2012). “Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA”.

Qiu, X. (2003). “Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*”, 68, 181-186.

Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.K. and Lazarus, C.M. (2004). “Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants”, **Nature Biotechnology**, 22, 739–745.

Ratledge C. (2005). “Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production”. **Biochimie**. 86, 807-815.

Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M. and Thomas, T.L. (1993). “Isolation of a  $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120”. **Plant Molecular Biology**, 27, 293-300.

Roa-Rodriguez, C. (2003). “Promoters used to regulate gene expression”. CAMBIA.

Ruiz-López, N., Haslam, R. P., Venegas-Calderón, M., Larson, T. R., Graham, I. A., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2009). “The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of ‘heart-healthy’ omega-3 fatty acids”. **Plant biotechnology journal**, 7(7), 704-716.

Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. and Shimizu, S. (1999). “Identification of D12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*”. **European Journal of Biochemistry**, 261: 812–820.

Sakuradani, E., & Shimizu, S. (2003). “Gene cloning and functional analysis of a second  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus”. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 67(4), 704-711.

Sampath H, Ntambi JM. (2004). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression". **Nutr Rev.** 62, 333-339.

Sato, S., Xing, A., Ye, X., Schweiger, B., Kinney, A., Graef, G., & Clemente, T. (2004). "Production of  $\gamma$ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean". **Crop science**, 44(2), 646-652.

Sayanova, O., Napier, J. A., & Shewry, P. R. (1999). " $\Delta$  6-Unsaturated fatty acids in species and tissues of the Primulaceae". **Phytochemistry**, 52(3), 419-422.

Scofield, S. R., & Crouch, M. L (1987). "Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from Brassica napus". **Journal of Biological Chemistry**. 262(25), 12202-12208.

Shahidi F. (2005). "Bailey's industrial oil and fat products.sixth edition, John Wiley & Sons", **Inc.** 3, 121-149.

Shanklin J, Cahoon EB. (1998). "Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids<sup>1</sup>". **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** 49, 611–641.

Shanklin J, Somerville C. (1991). "Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs". **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88, 2510–2514.

Shimada Y., K.Maruyama,A.Sugihara, T.baba,S.Komemushi,S.Moriyama and Y.Tominaga. (1998). "Purification of etyl docosahexaenoate by selective alcoholysis of fatty acid ethyl esters with immobilized rhizomucor miehei lipase". **JAOCS.** 75, 1565-1571.

Simopoulos AP. (1999). "Essential fatty acid in health and chronic disease". **American Journal of Clinical Nutrition.** 70(S), 560- 569.

Sperling, P., & Heinz, E. (2003). "Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions". **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1632(1), 1-15.

Stephanopoulos, G. (1999). "Metabolic fluxes and metabolic engineering". **Metabolic**

**engineering**, 1(1), 1-11.

Streekstra, H. (1997). "On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients such as arachidonic acid". **Journal of Biotechnology**. 56, 153-165.

Surette, M. E. (2008). The science behind dietary omega-3 f19.

Thomas, T.L., Reddy, A.S., Nuccio, M., Nunberg, A.N. and Freyssinet, G. (1997). "Production of gamma linolenic acid by a delta-6 desaturase". **USPTO Patent No.** 5,614,393.

Tocher DR, Leaver MJ and Hodgson PA (1998). "Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases.Prog". **Lipid Res.** 37, 73–117.

URSIN, V.M. (2003). "Modification of plant lipids for human health: development functional land-based omega-3 fatty acids". **Journal of Nutrition**. 133, 4271-4274.

Venter, M. (2007). "Synthetic promoters: genetic control through cis engineering". **Trends in Plant Science**, 12(3), 118-124.

Voelker, T. and Kinney, A.J. (2001). "Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids". **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 52, 335-361.

Vrinten, P. Wu, G. Truksa, M and Qiu, X. (2007). "Production of Polyunsaturated Fatty Acid in Transgenic Plants". **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. 24, 263-280.

Wahlroos T, Susi P, Solovyev A, Dorokhov Y, Morozov S, Atabekov J, Korpela T. (2004). "Increase of histidine content in *Brassica rapa* subsp. *oleifera* by over-expression of histidine-rich fusion proteins". **Mol Breed**. 14, 455–462.

Wang YP, Sonntag K, Rudloff E, Han J. (2005). "Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts". **Plant Breed**. 124, 1–4.

Ward OP, Singh A. (2005). "Omega 3/6 fattyacid: alternative sources of production". **Process Biochemistry**. 40, 3627- 3652.

Webster, J., Weber, R. (2007). "**Introduction to Fungi**", Third Edition. Cambridge University Press, P. 817.

Whittle, E. J., Tremblay, A. E., Buist, P. H., and Shanklin, J. (2008). "Revealing the catalytic potential of an acyl-ACP desaturase: Tandem selective oxidation of saturated fatty acids Proc". **Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105, 14738–14743.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". **Nucleic acids research**, 18(22), 6531-6535.

Wu G, Truksa M, Datla N, Vrinten P, Bauer J, Zank T, Cirpus P, Heinz E, Qiu X. (2005). "Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants". **Nat Biotechnol**. 23, 1013–1017.

Yancheva, S. D., Golubowicz, S., Fisher, E., Lev-Yadun, S., & Flaishman, M. A. (2003). "Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple". **Plant Science**, 165(2), 299-309.

Zhang, S., Sakuradani, E., Ito, K., and Shimizu, S. (2007). "Identification of a novel bifunctional  $\Delta 12/\Delta 15$  fatty acid desaturase from a basidiomycete", **Coprinus cinereus TD# 822-2 FEBS Lett**. 581, 315–319.





## Abstract

Orientation to use unsaturated fatty acids in various fields as well as its importance in health, the cause to search for other sources of these fatty acids. In this present research, after extraction of total RNA and synthesis cDNA from *Mortierella alpina*, PCR amplification has been done using gene specific primers contents cozack sequence. The amplified fragment was cloned into the vector pBluescript KS (+) containing the promoter *napin*. Then the recombination vector was transformed into *E.coli* DH5a. After confirmation of the positive recombinants using specific primers and Enzyme digestion (*HindIII*- *SacI*), designed recombinant vector Containing was cloned into the binary vector pBI121 by freezing and thawing Method, and transfered to *Agrobacterium tumefaciencie* LBA4404.

Sequenced analyses showed The cloned CDS include 1374 nucleotides coding for 457 amino acids.  $\Delta 6$ Ds contain the amino-terminal cytochrome b5 domain carrying motif His-Pro-Gly-Gly (HPGG).  $\Delta 6$ Ds also have two membrane-spanning domains and three His-box motifs that are characteristic of membrane-anchored desaturases. Tools such as TMHMM, ProtParam and TargetP were used to predict the protein properties such as molecular mass, pI, signal peptide, transmembrane and conserved domains, secondary and spatial structures. then recombinant vector was used to integrate into the disc leaves genomic of tobacco plant. The transgenic plants were selected under selector condition which cotents 100 mg/l of *kanamycin*. The presence of delta-6 Desaturase gene was confirmed in the genome plants using PCR Techniques. RNA extraction and cDNA synthesis was performed of leaves tobacco. Loss of expression of delta-6 Desaturase gene was confirmed the proper functioning of the *napin* promoter and lack of expression in nonspecific tissues.

Key wordes: Cloning, Delta 6 Desaturase, unsaturated fatty acides, *Mortierella alpina*.





**University Of Shahrood**  
**Faculty Of Agriculture**  
**Department Agronomy**

**Identification and cloning of the Delta 6 Desaturase gene to produce  
unsaturated fatty acid SDA; C18:4**

**Esmat Ashaar ghadim**

**Supervisor:**

**Dr. Shahrokh Gharanjik**

September 2015



