

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک ملکولی محصولات باغبانی

توالی یابی و همسانه سازی دو ژن دخیل در بیوسنتز امگا-۳ در گیاه

کلزا

رضا مشتاقی

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر بی بی فاطمه کلالی نیا

تیر ۱۳۹۶

شماره: ۱۸۸۴
تاریخ: ۱۱۶۱-۷

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای رضا مشتاقی با شماره دانشجویی ۹۲۱۳۱۴۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی تحت عنوان توالی یابی و همسانه سازی دو ژن دخیل در بیوسنتز امگا-۳ که در تاریخ ۹۶/۴/۲۶ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با امتیاز $\frac{1}{10}$ درجه) مردود

نوع تحقیق: نظری عملی

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر ناصر فرخی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر بی بی فاطمه کلالی نیا	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر پرویز حیدری	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تشکر و قدردانی

با تشکر از راهنمایی‌ها و دلسوزی‌های استاد گرامی، جناب آقای دکتر ناصر فرخی و هم‌چنین قدردانی از راهنمایی‌ها و مساعدت‌های بی‌دریغ استاد گرامی و ارجمند، سرکار خانم دکتر بی‌بی فاطمه کلالی‌نیا و با تشکر و قدردانی از همکاری‌ها و مساعدت‌های سرکار خانم مهندس عرب‌زاده و سرکار خانم مهندس گنجعلی.

رضا مشتاقی

تابستان ۹۶

تعهدنامه:

اینجانب رضا مشتاقی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **توالی یابی و همسانه سازی دو ژن دخیل در بیوسنتز امگا-۳** تحت راهنمایی آقای دکتر ناصر فرخی و خانم دکتر بی بی فاطمه کلالی نیا متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصلیت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

امضای دانشجو:

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

گیاهان می‌توانند به‌عنوان منبعی برای تولید اسیدهای چرب امگا-۳ مورد استفاده قرار گیرند و این فرآیند تولیدی با مهندسی گیاهان برای داشتن ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز میسر خواهد شد. گیاه کلزا با توجه به میزان درصد بالای روغن موجود در بذر و همچنین میزان مناسب ذاتی اسیدهای چرب امگا-۳ به اسیدهای چرب امگا-۶ در محتوای روغنی، می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت انجام تحقیقات در زمینه‌ی تولید گیاهی این دسته از اسیدهای چرب باشد.

این تحقیق با هدف ایجاد داده‌های ژنتیکی به‌منظور تولید امگا-۳ در کلزا از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک، انجام شد. با توجه به اینکه مسیر دلتا-۶ دسچوراز مسیر رایج تولید اسیدهای چرب امگا-۳ در جانداران مختلف است، در ابتدا محتوای روغنی یک نمونه از بذر کلزا استخراج و با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی، نوع و مقدار اسیدهای چرب مختلف موجود در محتوای روغن کلزا مشخص شد، بعلاوه با انجام مطالعات بیوانفورماتیکی و از طریق مقایسه توالی‌های کدکننده ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در قلمرو گیاهی با ژنوم کلزا، وجود توالی‌های مشابه در ژنوم کلزا مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه و با توجه به نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی انجام‌شده که باعث شد تا هیچ توالی مشابهی با توالی کدکننده ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در ژنوم کلزا یافت نشود، وجود ژن‌های کدکننده مسیر دلتا-۹ الانگاز برای تولید اسیدهای چرب امگا-۳، در ژنوم کلزا مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه توالی‌های کدکننده ژن‌های دلتا-۹ الانگاز و دلتا-۸ دسچوراز موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی با ژنوم کلزا، باعث یافتن یک سری توالی دارای شباهت به توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز گردید. در نتیجه با تطابق توالی‌های مختلف کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان، نقاط حفاظت‌شده توالی این ژن شناسایی و با استفاده از این نقاط به طراحی پرایمرهای غیراختصاصی اقدام شد. در ادامه از بافت‌های برگ و بذر کلزا RNA استخراج شد و پس از سنتز cDNA و با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده توالی کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز در ژنوم کلزا، تکثیر شد. توالی تکثیرشده پس از انجام الکتروفورز و تایید طول مورد انتظار، از ژل آگارز استخراج و در وکتور TA همسانه سازی گردید. سپس این وکتور تراریخت به سوش DH5a باکتری *E.coli* انتقال یافت و پس از انجام مشاهده کلنی‌های آبی-سفید و تایید موفقیت‌آمیز همسانه‌سازی، توالی تکثیرشده مورد توالی‌یابی قرار گرفت. در آخر توالی بدست آمده با سایر توالی‌های کدکننده دلتا-۸ دسچوراز مقایسه گردید و در نتیجه به‌عنوان یک توالی منحصر به فرد شناسایی شد.

کلمات کلیدی: امگا-۳، کلزا، دلتا-۶ دسچوراز، دلتا-۶ الانگاز، دلتا-۹ الانگاز، دلتا-۸ دسچوراز

فهرست

۱.....	فصل اول (مقدمه)
۳.....	اسیدهای چرب ضروری
۵.....	اسیدهای چرب بلند زنجیره
۷.....	اثرات مفید اسیدهای چرب امگا-۳ بر سلامت
۹.....	منابع تولید اسیدهای چرب امگا-۳
۱۲.....	مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب امگا-۳
۱۶.....	آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب امگا-۳
۱۸.....	محتوای روغنی کانولا و مقایسه آن با سایر گیاهان روغنی
۱۹.....	معرفی کانولا
۲۱.....	فصل دوم (مرور منابع)
۲۵.....	فصل سوم (مواد و روش‌ها)
۲۶.....	مواد
۲۶.....	تجهیزات آزمایشگاهی
۲۷.....	تهیه بذر کلزا
۲۷.....	کشت بذور کلزا
۲۷.....	استخراج روغن از بذر کلزا
۲۷.....	استخراج RNA
۲۸.....	استخراج DNA
۲۹.....	تهیه ژل الکتروفورز

۳۰	تعیین کیفیت و کمیت RNA و DNA استخراجی
۳۰	طراحی پرایمر های غیر اختصاصی
۳۱	انجام واکنش Onestep RT-PCR
۳۲	انجام واکنش زنجیره ای PCR
۳۲	استخراج باندهای تکثیر شده از ژل
۳۳	همسانه سازی قطعه تکثیر شده توسط واکنش زنجیره ای PCR در وکتور کلونینگ TA
۳۴	توالی یابی قطعه تکثیر شده توسط فرآیند PCR
۳۴	مطالعات بیوانفورماتیکی
۳۷	فصل چهارم (نتایج و بحث)
۳۸	ارزیابی نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن بذر کلزا
۴۰	سنتز cDNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز
۴۱	طراحی پرایمر های غیر اختصاصی
۴۲	ارزیابی نتایج حاصل از انجام RT-PCR و PCR
۴۴	ارزیابی نتایج حاصل از استخراج باندهای با طول مورد نظر از ژل الکتروفورز
۴۴	ارزیابی نتایج حاصل از کلونینگ توالی مورد نظر در وکتور TA
۴۵	آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی بدست آمده
۵۵	نتیجه گیری
۵۷	پیوست ها
۶۳	منابع

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

اسیدهای چرب و به‌ویژه اسیدهای چرب چندگانه^۱ برای رشد و کارایی عادی تمام موجودات و سلامت انسان، ضروری هستند (Huang et al. 2004). به دلیل فقدان آنزیم‌های دسچوراز^۲ موردنیاز برای تولید اسیدهای چرب لینولئیک اسید^۳ و آلفا-لینولئیک اسید^۴ در انسان، این اسیدهای چرب به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری^۵ مطرح هستند، که باید از طریق مصرف مواد غذایی تأمین شوند (Vrinten et al. 2007). اسیدهای چرب ضروری به‌عنوان پیش‌سازهای تولید اسیدهای چرب بلند زنجیره چند سیرنشده امگا-۳ و امگا-۶^۶ به حساب می‌آیند (Alabdulkarim et al. 2012) و بدن انسان می‌تواند با استفاده از این اسیدهای چرب، از طریق یک سری واکنش‌های غیراشباع‌سازی^۸ و طول‌سازی^۹ به تولید اسیدهای چرب چند اشباع‌نشده بلند زنجیره بپردازد. در حالت عادی بیشترین میزان اسیدهای چرب لینولئیک و آلفا لینولئیک جذب‌شده از طریق مواد غذایی برای تأمین انرژی تحت فرآیند اکسیداسیون بتا^{۱۰} فرارگرفته و تنها میزان کمی از آن (به ترتیب ۳ و ۱/۵ درصد) به اسیدهای چرب بلند زنجیره چند سیرنشده تبدیل می‌شوند (Huang et al. 2004).

با توجه به اثرات مفید اسیدهای چرب امگا-۳ در حفظ سلامت بینایی، ذهنی، قلبی و عروقی و اینکه تأثیرات مفید این اسیدهای چرب در عموم موارد ناشی از مصرف اسیدهای چرب Eicosapentaenoic acid (EPA) و Docosahexaenoic acid (DHA) است (Arterburn et al. 2006)، و بعلاوه این اسیدهای چرب به مقدار بسیار کمی در بدن ذخیره می‌شوند (Vrinten et al. 2007)، مصرف مداوم این اسیدهای چرب ضروری بوده و سازمان سلامت جهانی^{۱۱} مصرف ۰/۲۵ گرم در روز ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید را برای افراد، توصیه کرده است (Alabdulkarim et al. 2012).

ماهی و تولیدات دریایی منبع اصلی تأمین اسیدهای چرب امگا-۳، ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید هستند و فرم گیاهی این اسیدهای چرب عموماً لینولئیک‌اسید می‌باشد (Parker et al. 2006). با این وجود مصرف ماهی و تولیدات دریایی به دلیل آلودگی محیط‌های دریایی با مواد سرطان‌زا، از قبیل Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) و مواد غیر سرطان‌زا مانند

1 Poly unsaturated fatty acid

2 Desaturase

3 Linoleic acid

4 Alpha- linolenic acid

5 Essential fatty acid

6 ω3 fatty acid

7 ω6 fatty acid

8 Desaturation

9 Elongation

10 βoxidation 0

11 World Health Organization 1

متیل مرکوری، باعث ایجاد نگرانی‌هایی شده است. بعلاوه افزایش تقاضای جهانی برای تولیدات دریایی، ایجاد فشار بر این منابع را به دنبال داشته است و همچنین قیمت بالای تولید اسیدهای چرب امگا-۳ از تولیدات دریایی باعث ایجاد تمایل برای یافتن منابع دیگر تولید امگا-۳ و بخصوص تولید گیاهی این اسیدهای چرب، شده است (Vrinten et al. 2007).

تحقیقات جدید انجام شده در زمینه‌ی شناسایی و کلونینگ ژن‌های کد کننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب امگا-۳ در موجودات مختلف باعث ایجاد پتانسیلی در جهت تولید تراریخته این ترکیبات شده است. با این وجود هنوز مسائلی در زمینه‌ی سازگاری ژن‌های یافته شده از موجودات مختلف و تجمع مواد حد واسط ناخواسته در مسیر تراریزش تولید امگا-۳ وجود دارد. با این حال تولید موفق تراریخته این اسیدهای چرب می‌تواند باعث تولید یک منبع اقتصادی و جایگزین برای تأمین نیازهای دارویی، صنعتی و خوراکی امگا-۳ شود (Huang et al. 2004).

کلزا بانام علمی *Brassica napus* (AACC, 2n=38) گیاهی آلپلوئید است که از هیبریداسیون طبیعی بین *Brassica oleracea* (CC, 2n=18) و *Brassica rapa* (AA, 2n=20) (Fu et al. 2015) و یکی از ۴ گیاه اصلی روغنی جهان محسوب می‌شود (Khalil et al. 2015). با توجه به میزان بالای تولید روغن و همچنین نسبت ذاتی مناسب تولید اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ (Dick et al. 2003) می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی جهت مطالعه در زمینه‌ی تولید امگا-۳ در نظر گرفته شود.

اسیدهای چرب ضروری

انسان به دلیل فقدان آنزیم‌های دلتا-۱۲ و دلتا-۱۵ دسچوراز، قادر به تولید اسیدهای چرب لینولئیک‌اسید و آلفا-لینولنیک‌اسید نیست (Huang et al. 2004) و در نتیجه این اسیدهای چرب باید از طریق منابع غذایی تأمین شوند و به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری به‌حساب می‌آیند (Vrinten et al. 2007). به‌علاوه بدن انسان حتی با دریافت لینولئیک‌اسید و آلفا-لینولنیک‌اسید از منابع غذایی و استفاده از این اسیدهای چرب به‌عنوان پیش‌ساز، از طریق یک‌سری واکنش‌های طویل‌سازی^۵ و ایجاد باند دوگانه که به ترتیب توسط آنزیم‌های الانگاز و دسچوراز انجام می‌شود، با بازده بسیار پایین قادر به تولید سایر اسیدهای چرب چند اشباع‌نشده بلند زنجیره است. همچنین در حالت عادی بیشترین میزان

-
- 1 Methylmercury
 - 2 Omega-3
 - 3 Δ12 desaturase
 - 4 Δ15 desaturase
 - 5 Elongation
 - 6 Desaturation

اسیدهای چرب ضروری دریافتی بدن برای تأمین انرژی بکار می‌رود و تنها مقدار کمی از این اسیدهای چرب برای ساخت اسیدهای چرب بلند زنجیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Huang et al. 2004).

ایکوزاپنتائونئیک‌اسید و دوکوزاهگزانئوئیک‌اسید به‌عنوان مشتقات آلفا-لینولنیک‌اسید و شکل کاربردی اسیدهای چرب امگا-۳ در جیره غذایی به‌حساب می‌آیند. با این وجود تنها میزان اندکی از این اسیدهای چرب در بافت چربی بدن ذخیره می‌شود که در نتیجه باعث نیاز به مصرف مداوم این اسیدهای چرب می‌شود. به‌علاوه به دلیل کارایی پایین بدن (بازده ۱۰ تا ۱۵ درصد) در تولید اسیدهای چرب ایکوزاپنتائونئیک‌اسید و دوکوزاهگزانئوئیک‌اسید از آلفا-لینولنیک‌اسید، افزایش معنی‌دار میزان ایکوزاپنتائونئیک‌اسید و دوکوزاهگزانئوئیک‌اسید در پلاسمای بدن از طریق مصرف خود این اسیدهای چرب انجام می‌شود (Arterburn et al. 2006). در نتیجه بعضی از منابع به‌طور کلی اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ را به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری برشمرده‌اند.

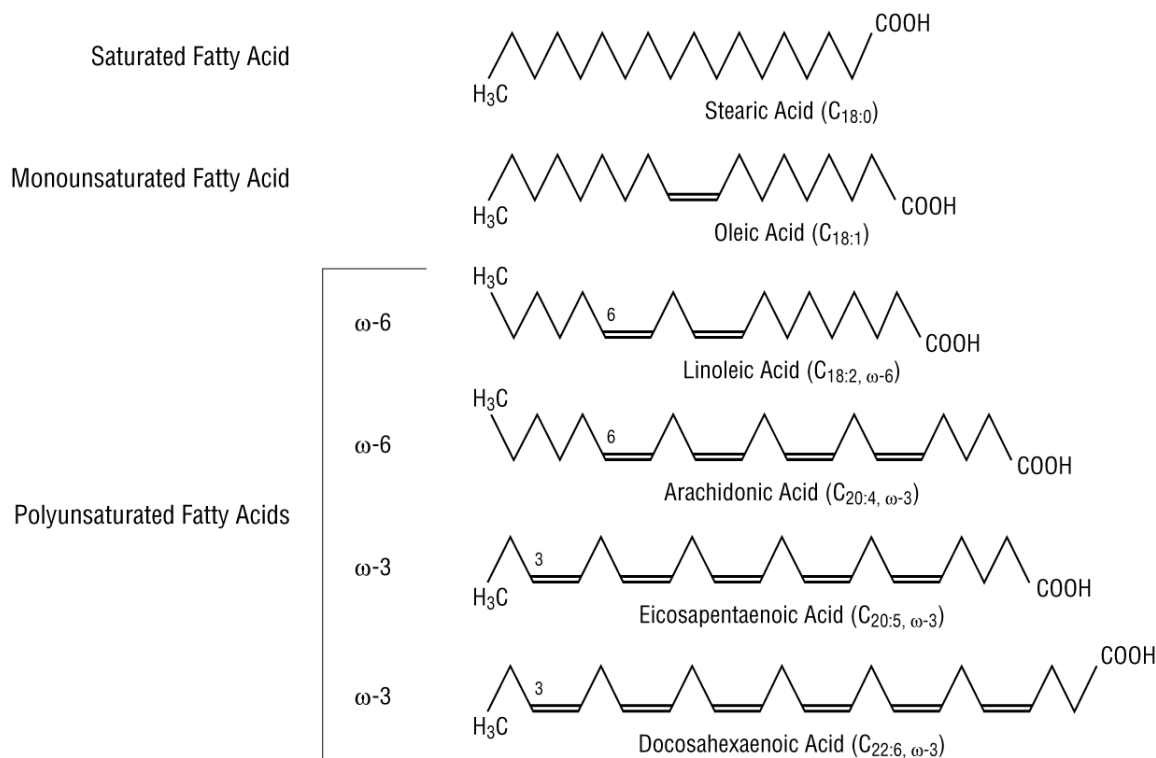
اسیدهای چرب امگا-۳ در غشای سلولی و به‌صورت ترکیب با فسفولیپیدها^۱ از جمله اسفنگولیپیدها^۲ حضور دارند. این اسیدهای چرب قادر هستند بر خصوصیات بیوفیزیکی غشاها از قبیل سیالیت، ضخامت و تغییر شکل تأثیر بگذارند و در نتیجه می‌توانند بر فعالیت پروتئین‌های غشایی نیز مؤثر باشند. دوکوزاهگزانئوئیک‌اسید بیشترین میزان را در میان اسیدهای چرب سیرنشده غشایی تشکیل می‌دهد و انعطاف‌پذیری بالایی در داخل غشاء را باعث می‌شود، به ویژه بر فعالیت تغییرات انتقالی وابسته به پروتئین‌های غشایی مؤثر است. به‌علاوه این اسید چرب برای گیرنده‌های هسته‌ای از جمله گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پراکسی‌زومها^۳ و گیرنده‌های X رتینوئیدها^۴ به‌عنوان تسهیل‌کننده جهت اتصال لیگاند^۵ عمل می‌کنند و بنابراین می‌توانند در تنظیم بیان ژن تأثیر بگذارند. به این ترتیب ترکیب کلی اسیدهای چرب غشایی می‌تواند تأثیر بزرگی در کارایی سلول‌ها، ارگان‌ها و طیف وسیعی از پروسه‌های بیولوژیکی داشته باشد (Arterburn et al. 2006).

اسیدهای چرب امگا-۳ نیز به‌عنوان پیش‌سازهای ترکیبات ۲۰ و ۲۲ کربنی مانند پروستاگلاندینها^۶، لکوتورینها^۷، ریسالوینها^۸ و اندوکانبینوئیدها^۹ به‌کار می‌روند (Breivik 2007).

-
- 1 Phospholipid
 - 2 Sphingolipid
 - 3 Peroxisome
 - 4 Retinoid
 - 5 Ligand
 - 6 Prostaglandin
 - 7 Leukotriene
 - 8 Resolvin
 - 9 Endocannabinoid

اسیدهای چرب بلند زنجیره

اسیدهای چرب دارای حداقل ۱۸ اتم کربن و دو باند دوگانه متیلن^۱ در وضعیت سیس^۲، به عنوان اسیدهای چرب بلند زنجیره چند سیرنشده محسوب می‌شوند (شکل ۱-۱). می‌توان این دسته از اسیدهای چرب را بر اساس محل قرارگیری اولین پیوند دوگانه از سمت انتهای متیل اسید چرب به دو خانواده اصلی اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶، تقسیم‌بندی کرد. به طوری که اولین پیوند دوگانه در اسیدهای چرب امگا-۳ بین کربن سوم و چهارم از سمت انتهای متیل اسید چرب قرار گرفته است و اولین پیوند دوگانه در اسیدهای چرب امگا-۶ در محل کربن شماره شش و هفت از سمت پایانه متیل، قرار گرفته است (Huang et al. 2004).

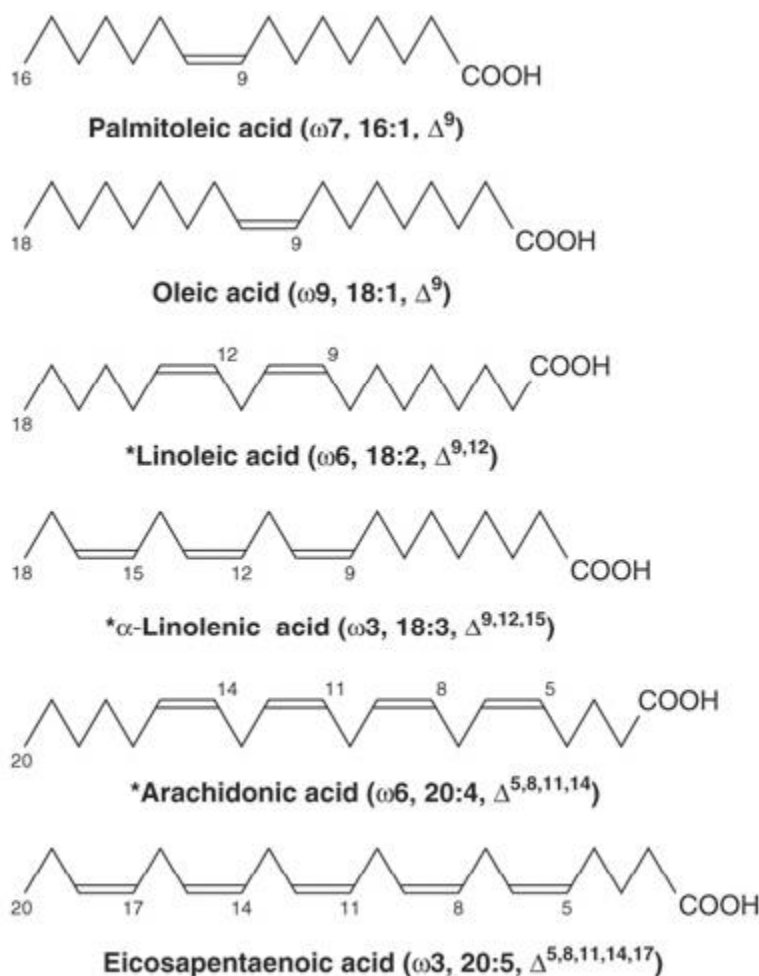


شکل ۱-۱: انواع مختلف اسیدهای چرب و نامگذاری آنها (Harper et al. 2001)

- 1 Methylene
- 2 S configuration

۳ نامگذاری اسیدهای چرب

در استفاده از سیستم نامگذاری X:Y اسیدهای چرب، X نشان‌دهنده تعداد اتم‌های کربن و Y نشانگر تعداد پیوندهای دوگانه می‌باشد. بعلاوه علامت دلتا قرار گرفته پس از Y محل قرارگیری پیوندهای دوگانه را از سمت انتهای کربوکسیل اسید چرب، مشخص می‌کند.



شکل ۱-۲: انواع مختلف اسیدهای چرب و نامگذاری آنها (Breivik 2007)

می‌کند (شکل ۱-۲). به‌علاوه آنزیم‌های دسچوراز تولیدکننده اسیدهای چرب را نیز با این سیستم می‌توان نام‌گذاری کرد. به‌طور مثال آنزیم دسچوراز اسید چربی که باعث ایجاد باند دوگانه بین کربن شماره ۶ و ۷ از انتهای کربوکسیلی اسید چرب می‌شود را دلتا ۶ دسچوراز نام‌گذاری می‌کنند. همچنین می‌توان بر اساس محل قرارگیری اولین پیوند دوگانه از سمت انتهای متیلی (انتهای امگا) نیز به نام‌گذاری اسیدهای چرب پرداخت (شکل ۱-۱). بر این اساس در اسیدهای چرب امگا-۳ اولین پیوند دوگانه از سمت انتهای متیلی بین کربن‌های شماره ۳ و ۴ قرار گرفته است. آنزیم‌های دسچوراز اسیدهای چرب نیز با این شیوه قابل نام‌گذاری هستند بطوریکه دسچوراز های امگا-۳ باعث ایجاد پیوند دوگانه بین کربن‌های ۳ و ۴ از انتهای متیلی اسید چرب می‌شوند.

اسیدهای چرب را بر اساس تعداد پیوندهای دوگانه موجود در ملکول نیز می‌توان به اسیدهای چرب سیرشده (مثل پالمیتیک اسید و استئاریک اسید) که فاقد پیوند دوگانه هستند، اسیدهای چرب تک سیرنشده (مثل اولئیک اسید) که تنها دارای یک پیوند دوگانه هستند و اسیدهای چرب چند سیرنشده (مثل LA و ALA) که حداقل دارای دو پیوند دوگانه‌اند، تقسیم کرد. همین‌طور می‌توان بر اساس طول زنجیره کربنی اسیدهای چرب را به دسته‌های اسیدهای چرب بلند زنجیره که دارای بیش از ۱۲ اتم کربن و اسیدهای چرب بسیار بلند زنجیره که حداقل ۲۰ اتم کربن در زنجیره کربنی دارند، تقسیم کرد (شکل ۱-۱).

اثرات مفید اسیدهای چرب امگا-۳ بر سلامت

اولین بار اثرات مثبت اسیدهای چرب امگا-۳ در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی^۱ بر اساس مشاهدات انجام‌شده بر روی جامعه اسکیموهای گرینلند مورد بحث قرار گرفت. تحقیقات انجام شده بر روی جامعه اسکیموها تعداد کمی از مرگ‌ومیر بر اثر بیماری‌های قلبی و عروقی را با وجود استفاده از جیره غذایی پرچرب نشان می‌داد (Din et al. 2004). در سال ۱۹۷۹، بنگ و دایربرگ پیشنهاد دادند که این موضوع می‌تواند ناشی از نسبت بالای امگا-۳ موجود در جیره غذایی اسکیموها به دلیل مصرف مقدار زیاد ماهی و نهنگ باشد (Dyerberg et al. 1975).

اسیدهای چرب ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و آراشیدونیک‌اسید^۲ پیش‌سازهای خانواده متابولیت‌های ایکوزانوئید^۳ هستند که شامل پروستاگلاندین‌ها، لکوتروئین‌ها و ترومبوکسان‌ها^۴ می‌باشند. این ملکول‌ها کاربرد و تنظیم یک سری از متابولیت‌های کلیدی در بدن از قبیل پاسخ‌های التهابی، القای لخته شدن خون و فشارخون را عهده دار هستند. بالانس ایکوزانوئیدهای مشتق از آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید باعث تعدیل پاسخ‌های التهابی می‌شود. بطوری‌که ایکوزانوئیدهای مشتق شده از آراشیدونیک‌اسید باعث القای پاسخ التهابی قوی و ایکوزانوئیدهای مشتق از ایکوزاپنتائوئیک‌اسید باعث ضعیف شدن این پاسخ‌ها می‌شوند. به دلیل اینکه تولید ایکوزانوئیدهای مشتق از آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید توسط آنزیم یکسان COX-2 (cyclooxygenase-2) آغاز می‌گردد، فعالیت ضدالتهابی ایکوزانوئیدهای مشتق از امگا-۳ را می‌توان به رقابت محدودکننده آراشیدونیک‌اسید توسط ایکوزاپنتائوئیک‌اسید برای آنزیم COX-2 نسبت داد (Kinney 2008).

نسبت سلامت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ در جیره غذایی انسان بین ۱:۱ تا ۴:۱ است. ولی به دلیل استفاده زیاد از روغن‌های گیاهی در زنجیره غذایی انسان که غنی از لینولئیک‌اسید هستند و کاهش مصرف محصولات دریایی این نسبت در حال حاضر بسیار بالاتر می‌باشد. لینولئیک‌اسید و آلفا-لینولنیک‌اسید برای تبدیل به آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید توسط یک آنزیم یکسان، رقابت می‌کنند. در نتیجه نسبت میان لینولئیک‌اسید و آلفا-لینولنیک‌اسید تا حدی می‌تواند باعث تعیین میزان در دسترس بودن محصولات فعال بیولوژیکی آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید شود. آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید نیز برای یک آنزیم یکسان جهت سنتز ایکوزانوئیدها، رقابت می‌کنند در نتیجه نسبت بین آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید می‌تواند بر لخته شدن خون، تمرکز ماهیچه‌های صاف، التهاب و پاسخ‌های ایمنی تأثیرگذار باشد (Alabdulkarim et al. 2012).

- 1 Cardiovascular disease
- 2 Arachidonic acid
- 3 Eicosanoids
- 4 Thromboxane

در اغلب اوقات اسیدهای چرب امگا-۶ جذب شده توسط بدن نسبت به اسیدهای چرب امگا-۳ غالب هستند که این عامل با افزایش مرگومیر ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی، در ارتباط است. در سال ۲۰۰۸ سازمان جهانی سلامت حداقل مصرف روزانه ۲۵۰ میلی‌گرم ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید را برای افراد سالم توصیه کرد. میزان توصیه شده برای افراد با سابقه بیماری‌های قلبی و عروقی بین ۱ تا ۲ گرم در روز و برای افراد بالغ دارای سطح بالای تری‌گلیسرید در خون، تا ۴ گرم مصرف روزانه ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید توصیه شده است. سازمان جهانی سلامت و سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی^۱ تأکید کرده است که مصرف روزانه ۲۵۰ میلی‌گرم تا ۲ گرم در روز از اسیدهای چرب ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید باعث مهار بیماری‌های قلبی و عروقی و سایر بیماری‌های مرتبط با افزایش سن و کاهش ریسک مرگومیر ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود (Martins et al. 2013).

مصرف ۸۵۰ میلی‌گرم تا ۴ گرم ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید به صورت روزانه و در یک دوره ۱۲ تا ۴۲ ماهه در افراد با سابقه بیماری‌های قلبی و عروقی و یا انفارکتوس میوکارد باعث کاهش معنی‌دار مرگومیر و مرگ ناگهانی (۲۰ تا ۵۰ درصد) شد. باید توجه داشت که مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ در یک دوره محدود اثرات محدودتری را نسبت به مصرف آن‌ها در یک دوره طولانی نشان می‌دهد (Martins et al. 2013). به علاوه تحقیقات انجام شده در زمینه‌های مختلف درمانی، فواید مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ درمان شرایط روانی و اختلالات عصبی را نشان داده است. به علاوه مطالعات انجام شده در زمینه‌ی سرطان پتانسیل این اسیدهای چرب را در مورد پیشگیری، خاصیت ضد توموری^۲، کمک به عملکرد داروهای ضد توموری و کاهش اثرات حاشیه‌ای^۳ درمان سرطان را نشان داده است. تحقیقات دیگری تمرکز رشد عصبی در دوران رشد جنینی و توسعه فعالیت شناختی و بینایی نوزادان را در اثر مصرف دوکوزاهگزانوئیک‌اسید نشان داده است. این اسیدهای چرب همچنین می‌توانند باعث ایجاد اثر پلیوتروپی در موارد رئولوژی خون^۴، عملکرد گلبول سفید^۵، فعال شدن پلاکت‌ها^۶، متابولیسم لیپوپروتئین‌ها، همچنین مکانیسم‌های فیزیولوژیکی مانند التهاب^۷، فشارخون، درد و تب شوند. ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید به علاوه می‌توانند باعث ایجاد اثراتی از قبیل اثرات

1 Food and Agriculture Organization of the United Nations

2 Anti-tumor

3 Side effect

4 Blood rheology

5 Leukocyte function

6 Platelet activation

7 Inflammation

ضدالتهاپی؛ خواص ضد آریتمی؛^۲ ضد ترومبوز؛^۳ ضد آترواسکلروتیک^۴، بهبود عملکرد اندوتلیال؛^۵ نشان دادن اثرات کاهش فشارخون، و کمک به کاهش کلسترول خون و سطوح تری‌اسیل‌گلیسرول و همچنین اثرات کاهنده قند خون را نشان می‌دهند (Martins et al. 2013).

این یافته‌ها باعث ایجاد تمایل عمومی و صنایع به سمت این اسیدهای چرب شده است که در سال‌های اخیر افزایش چشمگیر تقاضا برای اسیدهای چرب امگا-۳ را به دنبال داشته است (Huang et al. 2004). به‌علاوه هزینه‌های تولید تجاری اسیدهای چرب امگا-۳ از منابع موجود بسیار بالاست. به‌طور مثال هزینه‌های بالای مراحل پردازش،^۶ تصفیه^۷ و پایدارسازی^۸ روغن ماهی و کاهش محصولات دریایی به دلیل صید بی‌رویه به‌طور مداوم باعث افزایش هزینه روغن ماهی و مشتقات آن، شده است. یافته‌های جدید در مورد مواد شیمیایی سمی موجود در روغن ماهی، باعث ایجاد نگرانی‌هایی در زمینه‌ی سلامت مصرف روغن ماهی و مشتقات آن شده است (Huang et al. 2004).

به‌علاوه هزینه‌های مربوط به تولید اسیدهای چرب امگا-۳ از منابع تک‌سلولی، از قبیل تخمیر و استخراج،^۹ بسیار بالا است. هرچند که بهینه‌سازی کشت می‌تواند باعث افزایش تولید امگا-۳ از منابع تک‌سلولی گردد، با این وجود این پروسه زمان‌بر می‌باشد. موارد گفته‌شده باعث شده تا تمایل برای یافتن منابع اقتصادی و مناسب‌تر دیگر امگا-۳ افزایش یابد. یکی از ایده‌های جذاب برای تولید منبع جدید این اسیدهای چرب، تولید گیاهان روغنی تراریخته مانند سویا و کانولای قادر به سنتز اسیدهای چرب بلند زنجیره چند سیرنشده امگا-۳ از جمله ایکوزاپنتائوئیک اسید و دوکوزاپنتائوئیک اسید است (Huang et al. 2004).

منابع تولید اسیدهای چرب امگا-۳

آلفا-لینولنیک اسید (alpha-linolenic acid)

تنها ۳ نوع از روغن‌های تجاری گیاهی موجود دارای سطح معنی‌داری از آلفا-لینولنیک‌اسید می‌باشند که شامل روغن سویا^۱ (۸ درصد آلفا-لینولنیک‌اسید)، روغن کانولا^۲ (۱۰ درصد آلفا-لینولنیک‌اسید)

1	Anti-inflammatory effects	
2	Antiarrhythmic	
3	Antithrombotic	
4	Antiatherosclerotic	
5	Endothelial function	
6	Processing	
7	Refining	
8	Stabilization	
9	Fermentation	
1	Extraction	0
1	Soybean	1
1	Canola	2

و روغن کتان^۱ (تقریباً ۵۰ درصد آلفا-لینولنیک اسید) می‌باشند. روغن کتان عموماً برای اهداف صنعتی استفاده می‌شود و تنها مقدار اندکی از آن و عموماً به شکل مصرف بذر کتان به مصارف غذایی انسان می‌رسد. باین حال روغن‌های کانولا و سویا به‌عنوان منابع اصلی تأمین آلفا-لینولنیک اسید مطرح هستند. براساس داده‌های منتشره توسط ریویک (Breivik, 2007) صنعت کشاورزی توان تولید ۳/۵ میلیون تن آلفا-لینولنیک اسید را داشت که از این میزان ۱/۹ میلیون تن از سویا و ۱/۴ میلیون تن از این مقدار از کشت کانولا تأمین شد. به‌علاوه یک‌سری منابع روغنی از گیاهان با کشت محدود را نیز می‌توان از منابع تولید آلفا-لینولنیک اسید، از جمله کاملینا^۲ (۳۰-۴۰ درصد)، شاهدانه^۳ (۱۵-۲۵ درصد)، کیوی^۴ (۶۳ درصد)، برل^۵ (۶۴-۵۷ درصد)، گل رز^۶ (۳۲ درصد)، گردو (۱۵-۱۳ درصد) و جوانه گندم (۵ درصد)، به‌حساب آورد. این اسید چرب جز معنی‌دار لیپیدهای موجود در بافت سبز برگ می‌باشد به‌طوری‌که ریویک (Breivik, 2007) میزان میلی‌گرم آلفا-لینولنیک اسید در ۱۰۰ گرم برگ یک سری گونه را به این شرح اعلام کرده‌اند: شاهی آبی^۷ ۱۸۰ میلی‌گرم، اسفناج^۸ ۱۲۹ میلی‌گرم، کلم بروکلی ۱۱۰ میلی‌گرم، کلم بروکسل ۹۸ میلی‌گرم، و کاهو ۹۴ میلی‌گرم که نشان می‌دهد به‌طور تقریبی ۱/۰ درصد از وزن برگ تازه را آلفا-لینولنیک اسید تشکیل می‌دهد، هرچند که مقدار استفاده از لیپیدهای این بافت محدود است (Breivik 2007).

استئاریدونیک اسید (Stearidonic acid)

استئاریدونیک اسید اولین متابولیت درزمینه تبدیل آلفا-لینولنیک اسید به ایکوزاپنتائونوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشد (شکل ۳-۱). تنها تعداد اندکی از روغن‌های گیاهی دارای این فرم از امگا-۳ هستند و گل‌گاوزبان^۹ به‌عنوان منبع این اسید چرب امگا-۳ به‌شمار می‌آید. منبع در دسترس دیگر این اسید چرب روغن انگور ریز^{۱۰} می‌باشد که حاوی ۲/۵ تا ۳ درصد استئاریدونیک اسید است (Breivik 2007). باین‌وجود کشت این گیاهان مشکل است و محصول تولیدی کم است (Vrinten et al. 2007).

1 Flaxseed

2 Rivik

3 Camelina

4 Hemp

5 Kiwi

6 Rilla

7 Wiercross

8 Spinach

9 *Ethium plantagineum*

1 Blackcurrant

ایکوزاپنتائنوئیک اسید (Eicosapentaenoic acid) و دوکوزاهگزانوئیک اسید
(Docosahexaenoic acid)

در حال حاضر مهم‌ترین منبع تولید اسیدهای چرب ایکوزاپنتائنوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید روغن استخراج شده از ماهی‌های خال‌مخالی^۱، شاه‌ماهی^۲، آزاد^۳ و ساردین^۴ است. این ماهی‌ها با تغذیه از ریز جلبک‌ها^۵ و فیتوپلانکتون‌های غنی از ایکوزاپنتائنوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید و تجمع این اسیدهای چرب، به‌عنوان منبع تأمین امگا-۳ مطرح هستند. بعلاوه روغن ماهی به شکل کپسول‌های ژلاتینی که حاوی ۲۰ تا ۳۰ درصد ایکوزاپنتائنوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشند نیز امروزه به‌صورت تجاری در دسترس قرار دارند. همچنین می‌توان این اسیدهای چرب را از منابع تک‌سلولی از قبیل ریز جلبک‌ها و قارچ‌ها نیز تأمین نمود. دیاتوم‌هایی^۶ از قبیل *Nitzschia* به‌عنوان تولیدکننده ایکوزاپنتائنوئیک اسید و دینوفلاژلات‌هایی^۸ از قبیل *Cryptocodinium cohnii* نیز به‌منظور تولید تجاری دوکوزاهگزانوئیک اسید استفاده می‌شوند (جدول ۱-۱). آغازیان دریایی از قبیل *Thraustochytrids* نیز مقدار بالایی از دوکوزاهگزانوئیک اسید تولید می‌کند (Huang et al. 2004).

-
- 1 Mackerel
 - 2 Herring
 - 3 Salmon
 - 4 Sardines
 - 5 Microalgae
 - 6 Phytoplankton
 - 7 Diatoms
 - 8 Dinoflagellates

جدول ۱-۱: نسبت تولید EPA و DHA در گونه های ریز جلبک مختلف (Martins et al. 2013)

نسبت DHA تولیدی به تمام محتوای اسید چرب	نام علمی	نسبت EPA تولیدی به تمام محتوای اسید چرب	نام علمی
31-41	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	38-39	<i>Nannochloropsis sp.</i>
25-35	<i>Schizochytrium limacinum</i>	31	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>
32-37	<i>Thraustochytrium aureum</i>	25-33	<i>Nitzschia laevis</i>
37	<i>Thraustochytrium striatum</i>	25	<i>Porphyridium cruentum</i>
10-23	<i>Ulkenia sp.</i>	26	<i>Odontella aurita</i>
40	<i>Aurantiochytrium sp.</i>	18-23	<i>Pavlova lutheri</i>
19-34	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	17-23	<i>Cyclotella cryptica</i>

مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب امگا-۳

سنتز اسیدهای چرب در گیاهان در پلاستیدها و از طریق کمپلکس‌های دارای چند زیر واحد سازنده اسید چرب صورت می‌گیرد. محصول نهایی تولیدی این کمپلکس‌ها پروتئین‌های حامل اسیل‌های $16:0^2$ و $18:0$ می‌باشد. عموماً $18:0$ -ACP تولیدی، از طریق فعالیت یک دسچوراز محلول $stearoyl$ -ACP به $18:1\Delta^9$ -ACP تبدیل می‌شود. در این مرحله اسیل ترانسفرازها^۳ می‌توانند اسیل را از ACP به گلیسرول منتقل کنند تا به سمت تولید گلیسرولیپیدهای پلاستییدی پیش برود، اما اکثر اسیدهای چرب توسط یک $acyl$ -ACP تیواستراز از ACP جدا شده، پلاستید را ترک می‌کنند و از طریق استری شدن به

1 Fatty acid synthase
2 Ayl carrier protein
3 Ayl-transferase

کوآنزیم آ (CoA) به acyl-CoA تبدیل می‌شوند. از طریق یک سری واکنش، بخش acyl می‌تواند به فسفاتیدیل کولین (PC) استری شده و تحت دسچوریشن از طریق عملکرد آنزیم‌های دلتا ۱۲ و دلتا-۱۵ دسچوراز قرار بگیرد و لینولئیک اسید (LA; 18:2Δ9,12) و آلفا لینولئیک اسید (ALA; 18:3Δ9,12,15) را تشکیل دهد (Vrinten et al. 2007).

دو مسیر همگرا در ارگانسیم‌های تولیدکننده ایکوزاپنتائوئیک‌اسید و آراشیدونیک‌اسید برای تولید این اسیده‌های چرب ارائه شده است (شکل ۱-۳ و ۱-۴). در هر دو مسیر لینولئیک‌اسید و آلفا لینولئیک‌اسید به‌عنوان پیش‌ساز عمل می‌کنند. در اولین مسیر که به مسیر دلتا-۶ معروف است و مسیر غالب بیوسنتز اسیده‌های چرب امگا-۳ در یوکاریوت‌ها محسوب می‌شود، لینولئیک‌اسید و آلفا-لینولئیک‌اسید تحت عمل آنزیم دلتا-۶ دسچوراز به ترتیب به گامالینولئیک‌اسید^۲ (GLA, 18:3 [6, 9, 12]) و استئاریدونیک‌اسید (STA, 18:4 [6, 9, 12, 15]) تبدیل می‌شود. سپس این اسیده‌های چرب به‌اندازه دو اتم کربن و از طریق فعالیت یک کمپلکس تطویل میکروزومی، تطویل‌تر شده و به اسیده‌های چرب با ۲۰ کربن تبدیل می‌شوند. این تطویل‌سازی از طریق عمل یک آنزیم دلتا-۶ بتا-کتواسیل-کوآنزیم انجام می‌گیرد. ترکیبات ۲۰ کربنی حاصله توسط کمپلکس الانگیشن، کاهش‌یافته، دهیدراته شده و به‌طور مجدد کاهش می‌یابد و به‌ترتیب دی‌هومو-گاما-لینولئیک‌اسید^۳ (DGLA, 20:3 [8, 11, 14]) و ایکوزاتترائوئیک‌اسید^۴ (ETA, 20:4 [8, 11, 14, 17]) را تولید می‌کند. سپس این اسیده‌های چرب نیز با فعالیت یک آنزیم دلتا-۵ دسچوراز به ترتیب به آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید تبدیل می‌شوند (Kinney 2007).

در مسیر دوم که به مسیر دلتا-۹ معروف است (شکل‌های ۱-۳ و ۱-۴)، لینولئیک‌اسید و آلفا لینولئیک‌اسید توسط یک دلتا-۹ الانگاز ویژه به‌ترتیب به ایکوزادینوئیک‌اسید^۵ (EDA, 20:2 [11, 14]) و ایکوزاترینوئیک‌اسید^۶ (ERA, 20:3 [11, 14, 17]) تبدیل می‌شوند. سپس تحت اثر آنزیم دلتا-۸ دسچوراز به ترتیب به دی‌هومو-گاما-لینولئیک‌اسید و ایکوزاتترائوئیک‌اسید تبدیل می‌شوند. اسیده‌های چرب تولیدی همانند مسیر دلتا-۶ تحت عمل غیراشباع‌سازی دلتا-۵ دسچوراز به آراشیدونیک‌اسید و ایکوزاپنتائوئیک‌اسید تبدیل می‌شوند. در اکثر ارگانسیم‌ها، تبدیل ایکوزاپنتائوئیک‌اسید به دوکوزاهگزانوئیک‌اسید از طریق تطویل‌سازی آنزیم دلتا-۵ الانگاز ویژه اسیده‌های چرب ۲۰ کربنه، باعث تولید دوکوزاپنتائوئیک‌اسید (DPA, 20:5 [7, 10, 13, 16, 19]) شده و محصول تولیدی نیز تحت عمل آنزیم دلتا-۴ دسچوراز به دوکوزاهگزانوئیک‌اسید تبدیل می‌شود (Kinney 2007). با این‌وجود در

1 Phosphatidylcholine

2 Gamma linoleic acid

3 Homo-gamma-linoleic acid

4 Eicosatetraenoic acid

5 Eicosadienoic acid

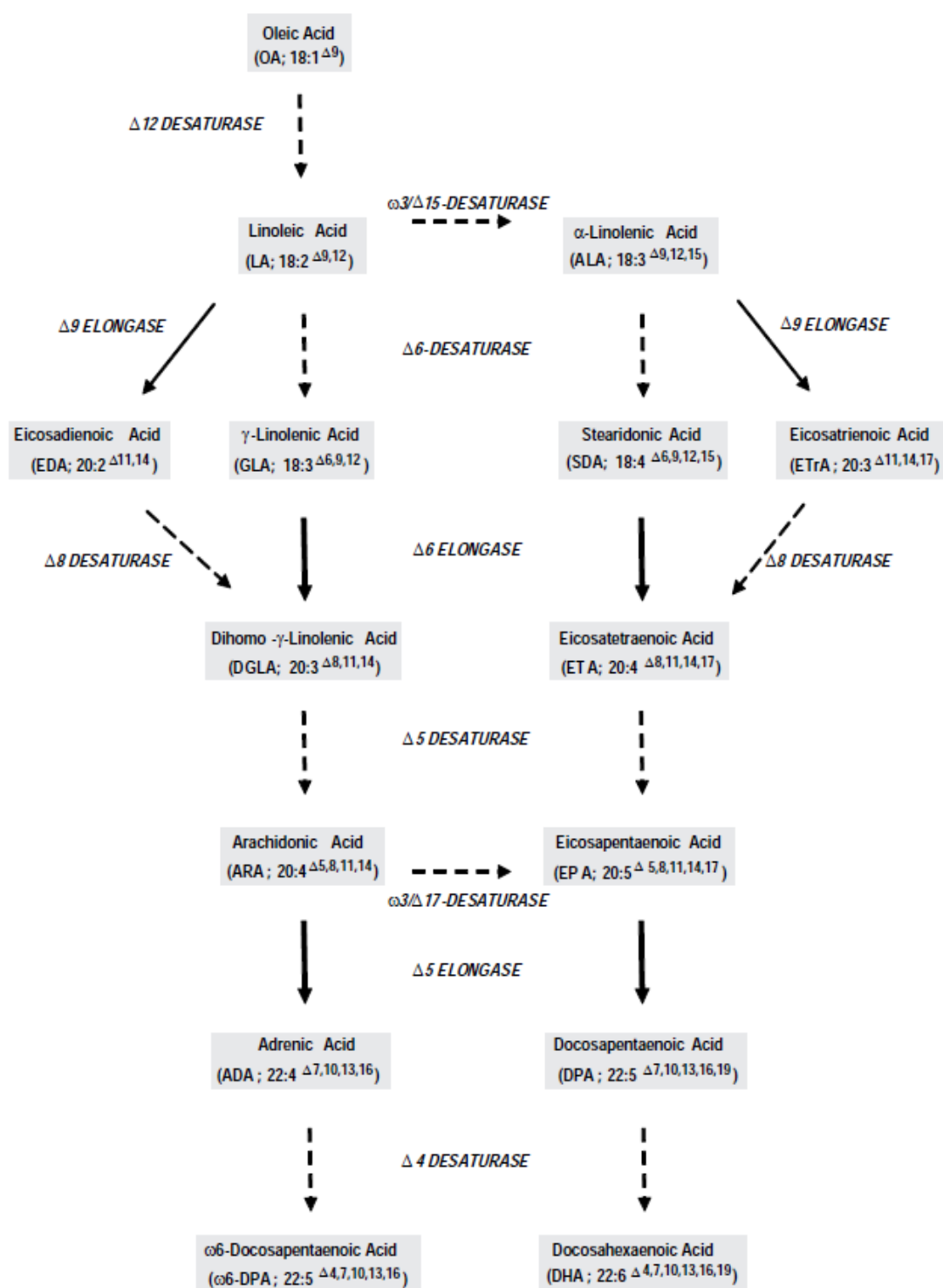
6 Eicosatrienoic acid

پستانداران ایکوزاپنتائوئیک اسید تحت دو مرحله تطویل و یک مرحله دلتا-۶ دسچوریشن قرار گرفته با تولید اسید چرب ۲۴ کربنی تتراکوزاهگزانوئیک اسید^۱ (THA; 24:6Δ6,9,12,15,18,21)، که نهایتاً تحت عمل اکسیداسیون بتا^۲ به دوکوزاهگزانوئیک اسید تبدیل می شود (Vrinten et al. 2007).

مسیر بیوسنتزی پلی کتید

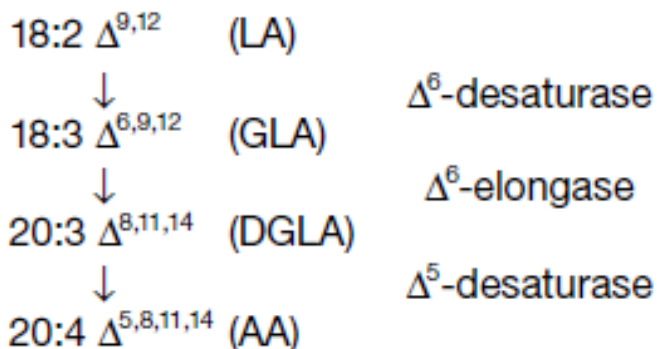
پلی کتیدها طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که عموماً از طریق متد سنتزشان تعریف می شوند. اضافه شدن تکراری کربن به زنجیره در حال رشد acyl-ACP از طریق یک کمپلکس آنزیمی به نام پلی کتید سنتاز (PKS)^۳، باعث تولید این متابولیت‌ها می شود. این کمپلکس‌های PKS فعالیت‌های مشابهی با متابولیسم اسید چرب را کاتالیز می کنند، با این تفاوت که کمپلکس‌های اسید چرب سنتاز هوازی در اثر فعالیت بیش از ۳۰ آنزیم جداگانه تشکیل شده‌اند ولی پلی کتید سنتازها از یک آنزیم دارای چند دومین با اجزا تشکیل دهنده کد شونده توسط ۳ یا ۴ ORF در ژنوم موجودات تولیدکننده پلی کتید تشکیل شده است. در بعضی موارد یک موجود می تواند به طور همزمان دارای مسیرهای پلی کتید و اسید چرب سنتاز^۴ برای تولید ایکوزاپنتائوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید باشد. به طور مثال تعدادی از گونه‌های *Thraustochytid* دارای هر دو نوع مسیرهای PKS و اسید چرب سنتاز برای تولید ایکوزاپنتائوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می باشد (Kinney 2007).

-
- 1 **T**etracosahexaenoic acid
 - 2 **B**eta-oxidation
 - 3 **P**olyketide synthase
 - 4 **F**atty acid synthase



شکل ۱-۳: مسیرهای بیوسنتزی دلتا-۶ و دلتا-۸ اسیدهای چرب امگا-۳ (Vrinten et al. 2007).

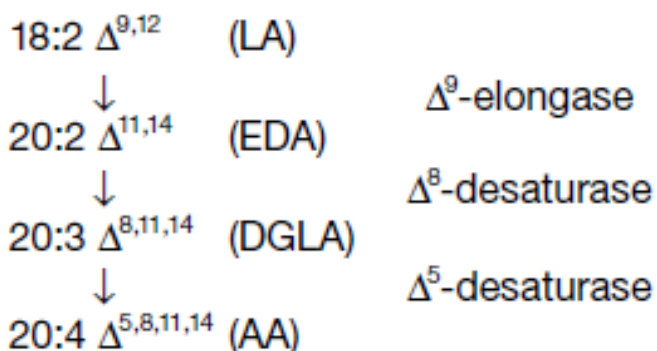
$\omega 6 \Delta^6$ pathway



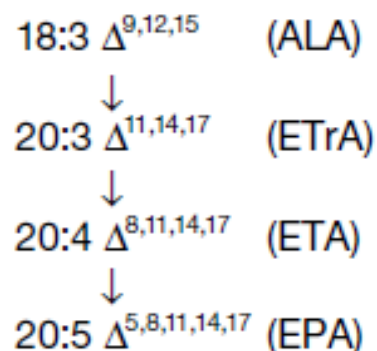
$\omega 3 \Delta^6$ pathway



$\omega 6 \Delta^8$ pathway



$\omega 3 \Delta^8$ pathway



شکل ۱-۴: آنزیم‌های دخیل در مسیرهای مختلف بیوسنتز اسیدهای چرب امگا-۳ (Baoxiu 2004)

ALA, alpha-linolenic acid; STA, stearidonic acid; ETA, eicosatetraenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; ETrA, eicosatrienoic acid; LA, linoleic acid; GLA, gamma-linoleic acid; DGLA, dihomogamma-linoleic acid; AA, arachidonic acid; EDA, eicosadienoic acid.

آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب امگا-۳

آنزیم‌های دسچوراز اسید چرب (شکل ۱-۳ و ۱-۴) یک‌سری از آنزیم‌ها هستند که با ایجاد باندهای دوگانه باعث تولید اسیدهای چرب سیرنشده یا چند سیرنشده می‌شوند. این آنزیم‌ها در حال حاضر به‌عنوان یکی از اهداف دست‌ورزی به‌منظور تولید گیاهان روغنی تراریخته، مطرح هستند. هر آنزیم دسچوراز باعث ایجاد یک باند دوگانه در یک محل ویژه در زنجیره اسیل اسید چرب می‌شود. بسیاری از دسچورازها باند دوگانه القایی را از سمت انتهای کربوکسیلی ملکول ایجاد می‌کنند. در بین این دسته از

دسچورازها کلاس ناهمگون دلتا-۹ دسچورازها، که به اصطلاح دسچورازهای 'front-end' از قبیل اسیل-لیپید دسچورازهای دلتا-۶، دلتا-۵ و دلتا-۴، وجود دارد. برخلاف این دسته از آنزیمها، دسچورازهای امگا-۳، عمل القای باند دوگانه را از سمت انتهای متیلی انجام می دهند. سومین دسته از آنزیمهای دسچوراز با شمارش ۳ کربن از محل باند دوگانه موجود به سمت انتهای متیلی عمل می کنند. این دسته از دسچورازها شامل دلتا-۱۲ دسچوراز است که به عنوان دسچورازهای امگا-۶ نیز معروف هستند (López Alonso et al. 2003).

همچنین می توان دسچورازها را بر اساس محل فعالیت به دو دسته اصلی تقسیم کرد که شامل دسچورازهای محلول^۱ و دسچورازهای متصل به غشا^۲ هستند که هر دو دسته از جمله آنزیمهای diiron-oxo می باشند. دسچورازهای محلول، دسچورازهای حامل پروتئین acyl-acyl (ACP) هستند که به صورت stearyl-ACP دسچوراز دیده می شوند و از طریق انجام غیراشباع سازی بر روی stearyl-ACP باعث ایجاد اولئیک اسید (۱۸:۱) متصل به ACP می شود. دسچورازهای غشایی باعث القای باند دوگانه به اسید چربی که به صورت acyl-CoA استری شده و یا به بخش گلیسرول گلیسرولیپیدها متصل شده است، می شود. دسچورازهای محلول دارای دو موتیف هیستیدین^۳ حفاظت شده هستند درحالیکه دسچورازهای متصل به غشا دارای ۳ هیستیدین-باکس^۴ جداگانه و ۴ دومین غشایی می باشند. همچنین دسچورازهای محلول به گیاهان عالی محدود هستند و به لحاظ تکاملی با دسچورازهای غشایی که پراکندگی بیشتری دارند، رابطه ای ندارند (López Alonso et al. 2003).

گیاهان نسبتاً دارای مقدار کمی از اسیدهای چرب تک سیرنشده و سیرنشده بلند زنجیره با تعداد اتم کربن بیش از ۲۰ عدد هستند. درحالیکه کمپلکس تطویل شامل در سنتز این اسیدهای چرب از ۴ جز، آنزیم متراکم کننده/الانگاز (3-ketoacyl-CoA synthase)، 3-ketoacyl-CoA reductase، و enoyl-CoA dehydratase و hydroxyacyl-CoA reductase تشکیل شده است که در آن آنزیم متراکم^۵ کننده باعث تعیین اختصاصیت سوبسترا می شود. در گیاهان آنزیم متراکم کننده اسیدهای چرب بلند زنجیره توسط یک خانواده از ژنهای وابسته کد می شود که به ژنهای fatty acid elongase-like (FAE) معروف هستند. آنزیمهای متراکم کننده اسیدهای چرب بلند زنجیره در مخمر که توسط ژنهای الانگاز ELO، ELO2 و ELO3 کد می شوند به لحاظ توالی با پروتئینهای FAE گیاهی ارتباطی ندارند. در حیوانات و یوکاریوتهای پست، آنزیمهای متراکم کننده درگیر در سنتز اسیدهای چرب چند سیرنشده بلند زنجیره، به پروتئینهای ELO-like ها شباهت بیشتری نسبت به FAE-like ها نشان

1 Soluble desaturase

2 Membrane bound desaturase

3 Histidin motif

4 Histidin-box

5 Condensing enzyme

می دهند. با این وجود سه بخش دیگر کمپلکس الانگاز مخمر با فاکتورهای گیاهی قابل تعویض بوده و به همین ترتیب اجزای کمپلکس الانگاز گیاهی می توانند با آنزیم‌های متراکم کننده ELO-like کار کنند (Vrinten et al. 2007).

آنزیم‌های دلتا-۸ دسچوراز تنها در گیاهان عالی وجود دارند و نسبت به آنزیم‌های دلتا-۶ دسچوراز از پراکندگی بیشتری در گیاهان برخوردارند. بر اساس این واقعیت، می توان برداشت کرد که دلتا-۸ دسچورازها باید نیای^۱ دلتا-۶ و دلتا-۵ دسچورازها باشند. با این وجود در صورتی که محدوده بررسی را به سایر قلمروهای^۲ حیات گسترش دهیم، نتیجه گیری کاملاً عکس خواهد بود، در حالی که دلتا-۸ دسچورازها تنها به گیاهان عالی محدودند آنزیم‌های دلتا-۶ و دلتا-۵ دسچوراز دارای پراکندگی بیشتری در طبیعت هستند. در نتیجه می توان این طور بیان کرد که دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان از ژن دلتا-۶ دسچوراز مشتق شده است و ژن دلتا-۶ دسچوراز به این دلیل که دسچوراز امگا-۳ قادر به انجام نقش آن بوده است، به تدریج در گیاهان حذف شده است (López Alonso et al. 2003).

با در نظر گرفتن اختصاصیت عمل آنزیم‌های دسچوراز گفته شده در بالا (Sayanova et al. 2003) به منظور استفاده از این آنزیم‌ها جهت تراریخت کردن گیاهان در جهت تولید اسیدهای چرب امگا-۳ باید تلاش شود تا توالی‌های کدکننده این آنزیم‌ها با ترجیح سوبسترای بر اسیدهای چرب امگا-۳ از جانداران مختلف یافته شود.

محتوای روغنی کلزا و مقایسه آن با سایر گیاهان روغنی

امروزه بیش از ۲۷۰ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی به کشت ۴ گیاه روغنی اصلی جهان (روغن نخل، سویا، کانولا و آفتابگردان) اختصاص دارد که تولیدی معادل ۱۷۰ میلیون تن در سال را به دنبال دارد و این میزان معادل ۷۵ درصد از تولیدات روغنی جهان را شامل می شود (Khalil et al. 2015).

منبع اصلی روغن‌ها و چربی‌ها در جیره غذایی انسان را گیاهان روغنی به ویژه سویا، کانولا، نخل روغنی، بادام زمینی و آفتابگردان تشکیل می دهد. بسیاری از روغن‌های گیاهی سرشار از اسیدهای چرب ۱۸ کربنه امگا-۶ هستند (جدول ۱ پیوست) (Kinney 2007). به علاوه مطالعات نشان داده اند که مصرف زیاد اسیدهای چرب امگا-۶ باعث تخلیه امگا-۳ از بافت‌های بدن می شود و اثرات مضر بر سلامت در پی دارد (Kinney 2008).

1 Acestor
2 Kingdom

معرفی کلزا

کلزا با نام علمی *Brassica napus* (AACC, $2n = 38$) گیاهی آلپلوئید است که از هیبریداسیون طبیعی بین *B. rapa* (AA, $2n = 20$) و *B. oleracea* (CC, $2n = 18$) به وجود آمده است. به دلیل اینکه تاکنون فرم‌های وحشی این گونه شناسایی نشده‌اند انتظار می‌رود که پیدایش این گونه در گذشته نزدیک و زمانی که گونه‌های والدی این گیاه در مناطق مجاور کشت شده‌اند، انجام گرفته باشد. این گیاه دارای واریته‌های بهاره و زمستانه می‌باشد که عموماً انواع زمستانه این گیاه در اروپا و آسیا، و انواع بهاره آن در استرالیا، کانادا و شمال اروپا کشت می‌شود (Vollmann et al. 2009). انتقال ژن به کلزا معمولاً به کمک اگروباکتريوم^۱ صورت می‌گیرد (Amir Hossein et al. 2012).

روغن کلزا از میزان اسیدهای چرب اشباع پائینی در بین روغن‌های گیاهی برخوردار است، به علاوه سطح متعادلی از اسیدهای چرب غیراشباع را شامل می‌شود و فاقد کلسترول می‌باشد که در نتیجه از کیفیت تغذیه‌ای برخوردار است (Amir Hossein et al. 2012). به علاوه این گیاه به صورت ذاتی سطح بالایی از آلفا-لینولئیک‌اسید را نسبت به سایر گیاهان روغنی تولید می‌کند (Logan 2003). همین‌طور میزان بالای محتوی روغنی بذر این گیاه (۳۶ تا ۵۰ درصد) باعث شده‌است تا به‌عنوان گیاه روغنی مناسبی در تولید روغن تلقی گردد (Vollmann et al. 2009). عوامل ذکر شده باعث شده‌است تا کلزا به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید گیاهی اسیدهای چرب امگا-۳ مطرح شود، به طوری که در صورت تولید ۱۲ درصد دوکوزاهگزانوئیک‌اسید در محتوای روغنی بذور این گیاه، به‌طور میانگین مقدار امگا-۳ تولیدی از یک هکتار کشت این گیاه با میزان استخراج‌شده از ۱۰۰۰۰ قطعه ماهی برابر خواهد بود (Petrie et al. 2012).

با توجه به خصوصیات منحصربه‌فرد کلزا که پیش‌تر مورد بحث قرار گرفت، در این تحقیق سعی شده است تا اولاً از بین مسیرهای رایج برای سنتز اسیدهای چرب امگا-۳، مسیر مناسب و ژن‌های موجود در مسیر شناسایی شده، با استفاده از متدلوژی مبتنی بر PCR^۲ جداسازی شده و پس از کلونینگ در وکتور TA، توالی‌یابی شوند. نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان بستری برای فعالیت‌های مهندسی ژنتیک و انتقال ژن در جهت تولید اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید در کلزا مورد استفاده قرار گیرد.

1 *Agrobacterium tumefaciens*

2 Polymerase chain reaction

فصل دوم

مرور منابع

جداسازی و تشخیص خصوصیات ژن دلتا-۸ دسچوراز از گیاهان مختلف

جداسازی اولین توالی کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز اسید چرب توسط والیس و بروز (۱۹۹۹) از آغازی *Euglena gracilis* و به منظور مطالعه مسیر متناوب سنتز اسیدهای چرب بلند زنجیره، انجام شد. در این مطالعه پس از استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام PCR با استفاده از پرایمرهای غیراختصاصی طراحی شده بر اساس نواحی حفاظت شده دسچورازهای میکروزومی و بهره‌گیری از تکنیک RACE توالی کامل این ژن تکثیر شد. توالی پروتئینی پیش‌بینی شده کدشونده توسط ژن تکثیرشده هومولوژی بالایی با آنزیم‌های دلتا-۵ و دلتا-۶ دسچوراز *Caenorhabditis elegans* نشان داد. همچنین با بیان cDNA بدست‌آمده در *Saccharomyces cerevisiae* عملکرد این آنزیم در ایجاد باند دوگانه در محل کربن شماره ۸ اسیدهای چرب ۲۰ کربنه، بررسی شد. بعلاوه ترجیح عملکردی این آنزیم بر روی سوبستراهای 20:2 Δ 11,14 و 20:3 Δ 11,14,17 مشخص گردید (Wallis et al. 1999).

همچنین اسپرلینگ و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از شباهت توالی‌های دلتا-۱۲ و دلتا-۱۵ دسچوراز اسیدچرب به طراحی پرایمرهای غیراختصاصی پرداخته و از پرایمرهای طراحی شده برای انجام PCR بر روی cDNA حاصل از RNA استخراج شده از بذور گل‌گاوزبان استفاده کردند. سپس با غربالگری کتابخانه cDNA بذور گل‌گاوزبان توسط توالی تکثیری PCR یک cDNA کدکننده توالی ۴۴۶ آمینواسیدی را جداسازی نمودند. بیان open reading frame (ORF) حاصله در *Saccharomyces cerevisiae* به تائید فعالیت دلتا-۸ دسچورازی توالی بدست آمده منتهی شد (Sperling et al. 2001).

بعلاوه میکائیلسون و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای اتصال به نقاط حفاظت شده histidine box دسچورازهای میکروزومی، موفق به تکثیر و جداسازی توالی کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز از *Aquilegia vulgaris* شدند. در ادامه نیز عملکرد توالی تکثیرشده از طریق بیان در *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه باعث تجمع محصولات فعالیت ژن دلتا-۸ دسچوراز در مخمر گردید (Michaelson 2002).

در تحقیق دیگری گارسیا-ماروتو و همکاران (۲۰۰۷) بر اساس نواحی حفاظت شده توالی پروتئینی دلتا-۶ دسچوراز در *Borago* و *Echium* به طراحی پرایمر اقدام کردند. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، DNA استخراجی از برگ *Nicotiana tabacum* به‌عنوان الگو و توسط واکنش PCR به تکثیر یک توالی پرداختند. هرچند بررسی الگوی بیان توالی بدست‌آمده در بافت‌های مختلف با الگوی مورد انتظار برای فعالیت دلتا-۶ دسچوراز یکسان بود ولی آنالیز عملکرد این توالی در مخمر باعث تایید فعالیت دلتا-۸ دسچورازی توالی تکثیر شده گردید.

در پژوهش دیگری چی و همکاران (۲۰۱۱) بر اساس نواحی حفاظت شده توالی دلتا-۸ دسچوراز در سایر گیاهان به طراحی پرایمر پرداختند و با استفاده از واکنش زنجیره ای PCR سعی کردند تا با استفاده از cDNA حاصل از RNA استخراجی از بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و بذور نارس *Arachis hypogaea* . L توالی دلتا-۸ دسچوراز در این گیاه را تکثیر نمایند. در نتیجه چهار توالی با طول های ۱۲۲۱، ۱۱۵۲، ۱۳۲۹ و ۱۳۴۷ باز در این پژوهش بدست آمد. توالی‌های پروتئینی پیش‌بینی شده کدشونده توسط این توالی identity بالایی با توالی دلتا-۸ دسچوراز در *Arabidopsis thaliana* نشان دادند. به‌علاوه بیان توالی‌های تکثیر شده در مخمر باعث تایید فعالیت دلتا-۸ دسچورازی این توالی‌ها شد. همچنین آنالیز کمی Real-time PCR برای این توالی‌ها نشان‌دهنده بیشترین میزان بیان برای دو توالی در بذر نسبت به سایر بافت‌های مورد مطالعه بود. از طرفی دو توالی دیگر نیز بیشترین میزان بیان را در بافت برگ نسبت به سایر بافت‌های مطالعه نشان دادند.

در پژوهش دیگری مورنو پرز و همکاران (۲۰۱۱) بر اساس هم‌ردیف سازی توالی آمینواسیدی آنزیم دلتا-۸ دسچوراز با توالی ژنوم آفتابگردان توسط نرم‌افزار ClustalX اقدام به طراحی پرایمر بر اساس نواحی حفاظت شده توالی‌های مشابه یافته شده کردند. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به تکثیر دو توالی اقدام شد که پس از بیان توالی‌های تکثیر شده در *Saccharomyces cerevisiae* فعالیت دلتا-۸ دسچورازی این ژن مشخص شد (Moreno-Pérez et al. 2011).

لی و همکاران (۲۰۱۲) با توجه به عدم وجود اینترون در غالب توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز، با انجام PCR با استفاده از DNA ژنومی *Brassica rapa* و پرایمرهای طراحی شده بر اساس نتایج BLAST توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز آرابیدوپسیس و ژنوم *B.rapa* به تکثیر ۴ توالی پرداختند. شناسایی عملکرد توالی‌های تکثیری با بیان توالی تکثیر شده در *Saccharomyces cerevisiae* انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان‌دهنده فعالیت دلتا-۸ دسچورازی تمامی توالی‌ها بود. با این وجود توالی‌های مختلف نسبت متفاوتی از محصولات را تولید می‌کرد. به‌علاوه توالی‌های بدست آمده دارای شباهت بالایی بودند و محل فعالیت-شان شبکه آندوپلاسمی تعیین شد (Li et al. 2012).

مطالعه دیگری توسط لی و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد. در این مطالعه DNA از برگ‌های جوان *Ricinus*، *Triticum aestivum*، *Sorghum bicolor*، *Borago officinalis*، *Aquilegia vulgaris* و *Cucumis sativus*، *Populus tomentosa*، *Glycine max*، *Vitis vinifera*، *communis* و *Brachypodium distachyon* استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس بخش‌های مشابه در توالی کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان مختلف، توسط واکنش زنجیره‌ای PCR به تکثیر توالی‌هایی پرداختند. سپس توالی‌های بدست آمده در *Saccharomyces cerevisiae* بیان شد و با بررسی محصول تولید شده توسط هر توالی و همچنین بررسی مقاومت به دز بالای آلومینیوم

در محیط کشت، فعالیت دلتا-۸ دسچورازی توالی‌های تکثیرشده مورد بررسی قرار گرفت (Li et al. 2016).

با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه جداسازی ژن‌های دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان مختلف و ضرورت یافتن توالی‌های جدید کد کننده دلتا-۸ دسچوراز، لذا هدف این تحقیق طراحی پرایمرهای غیراختصاصی بر اساس توالی‌های حفاظت‌شده ژن کد کننده دلتا-۸ دسچوراز در سایر گیاهان و استفاده از این پرایمرها در جهت جداسازی توالی جدیدی برای ژن دلتا-۸ دسچوراز با روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای PCR، همسانه سازی توالی بدست آمده در وکتور کلونینگ TA و توالی یابی قطعه تکثیرشده می‌باشد تا در آینده بتوان با بررسی بیانی این توالی در جهت بررسی عملکرد این توالی اقدام کرد.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، دستورالعمل و نحوه انجام استخراج روغن از بذور کلزا، کشت بذور کلزا، استخراج RNA از بافت‌های برگ و بذر کلزا، طراحی پرایمرها بر اساس توالی‌های همولوگ، تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، انجام فرآیند One step RT-PCR، مشاهده محصول فرآیند PCR بر روی ژل الکتروفورز، استخراج باندهای مورد نظر از ژل آگارز، انجام همسانه‌سازی توالی بدست آمده در وکتور TA، توالی‌یابی قطعه مورد نظر و انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی در جهت بررسی توالی بدست آمده، است که در ادامه به توضیح مراحل بالا پرداخته می‌شود.

مواد

متانول، اتانول، اسید کلریدریک، سدیم هیدروکسید، تریس، بوریک اسید، انیلین دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA)، ایزوپروپانول، تریپتون و کلروفرم از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد. کیت استخراج RNA، کیت استخراج از ژل و آب مقطر RNase free از شرکت دنازیست آسیا (مشهد، ایران) خریداری شد. کیت Onestep RT-PCR از شرکت Qiagen (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد. پرایمرهای طراحی شده از شرکت آراین ژن گستر (تهران، ایران) تهیه شد. آگارز از شرکت Sigma (امریکا) خریداری شد. لودینگ دای و لدر از شرکت Fermentas (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد. اتیدیوم بروماید از شرکت سیناژن (تهران، ایران) خریداری شد. عصاره مخمر از شرکت Lifechem (میلان، ایتالیا) خریداری شد. کیت کلونینگ TA از شرکت بایرپل فناور (تهران، ایران) خریداری گردید. همچنین سوش DH5a باکتری *E. coli* از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) تهیه شد.

تجهیزات آزمایشگاهی

ورتکس از شرکت Dena medical industry (تهران، ایران)، سمپلرهای ۱۰۰ μl، ۱۰ μl و ۱۰۰۰ μl Eppendorf (هامبورگ، آلمان) هاون چینی نوین تجهیز (تهران، ایران) سانتریفیوژ یخچال دار از شرکت Zentrifugen (فرانکفورت، آلمان) تانک الکتروفورز افقی و دستگاه ترانس پایا پژوهش (تهران، ایران) نانودراپ thermo fisher (نیویورک، امریکا) ژل داگ cleaver scientific (لندن، انگلیس) حمام آبگرم پارس آزما (تهران، ایران) ترازو SARTORIUS (گوتینگن، آلمان) پی‌اچ‌متر jenway (لندن، انگلیس) ماکروویو LG (سئول، کره جنوبی) اتوکلاو TOMY (فرانکفورت، آلمان) هات پلیت heidolph (نورنبرگ، آلمان) فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران) هود شیمیایی farapajoh (تهران، ایران) شیکرانکوباتور فن‌آزمگستر (تهران، ایران) و دستگاه ترموسایکلر گرادیانت takara (اتسو، ژاپن) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه بذر کلزا

بذر کلزا رقم Neptune که یکی از رقم‌های توصیه شده توسط مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی جهت کشت در مزارع خراسان است از مرکز تحقیقات کشاورزی مشهد تهیه شد.

کشت بذور کلزا

کشت بذور کلزا در خاک زراعی و در گلدان‌هایی با ابعاد ۵۰ در ۳۰ سانتیمتر انجام گرفت. گلدان‌ها هر سه روز یک‌مرتبه آبیاری شدند و طول روز ۱۸ ساعت در نظر گرفته شد. برگ‌های گیاهچه‌های ۱۰ روزه به‌منظور استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج روغن از بذر کلزا

برای استخراج روغن از روش بلای و دایر (Bligh et al. 1959) استفاده شد که طی آن ابتدا ۱۰۰ گرم بذر توسط ترازو توزین شد. بذور در هاون چینی به‌صورت کامل خرد شد و مخلوط به‌دست‌آمده به یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول به مخلوط داخل بشر اضافه گردید، سپس مخلوط بدست آمده به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. مجدداً ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم به مخلوط در حال ورتکس شدن اضافه گردید و پس از ۳۰ ثانیه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و مخلوط به مدت ۳۰ ثانیه دیگر ورتکس گردید. مخلوط بدست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر گردید. مخلوط صاف‌شده داخل فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتر به مدت ۱۰ دقیقه و در سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. تمام حجم فاز بالا به‌طور کامل تخلیه گردید. محتوای الکلی موجود در فاز ته‌نشین تحت فشار گاز نیتروژن تبخیر گردید و در نهایت محتوای خالص روغنی بذور کلزا بدست آمد. محتوای روغنی استخراج‌شده برای انجام آنالیز کروماتوگرافی گازی^۱ به آزمایشگاه شرکت مهندسی مشاور واستریوش ساری فرستاده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از بافت‌های برگ و بذر کلزا و با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا و بر طبق دستورالعمل مربوطه انجام گرفت (شکل ۱-۳). بر طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های برگ و بذر توسط ترازو توزین شد. نمونه‌های توزین شده به‌صورت جداگانه به داخل هاون چینی انتقال یافت و پس از اضافه کردن حدود ۱۰ میلی‌لیتر ازت مایع و تبخیر آن، نمونه به‌صورت کامل توسط دسته‌هاون خرد شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول DR1 موجود در کیت به نمونه‌های خردشده اضافه گردید و با پیپت کردن مخلوطی همگن بدست آمد. مخلوط

1 Gas chromatography

بدست آمده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به میکروتیوب های ۲ میلی لیتر منتقل شد. میکروتیوب حاوی محلول بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه، سرعت ۱۰/۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رانشین بدست آمده به میکروتیوب جدید انتقال یافت. به محلول رانشین بدست آمده ۲۰۰ µl کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. محلول حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۱۲/۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی توسط سمپلر ۱۰۰ µl و با اجتناب از مخلوط شدن با فاز فنلی برداشت شد و به میکروتیوب جدید منتقل شد. به میزان نصف حجم فاز بالایی برداشت شده، اتانول مطلق به محلول اضافه شد و به منظور مخلوط شدن، تیوب محتوی محلول چندین مرتبه برگردانده شد. محلول بدست آمده به ستون های تهیه شده توسط کیت منتقل شد و به مدت ۱ دقیقه در سرعت rpm ۱۰/۰۰۰ و دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول جمع شده در تیوب زیرستون، دور ریخته شد و ۷۰۰ µl از محلول DR2 به ستون اضافه شد و مجدداً به مدت ۱ دقیقه در سرعت rpm ۱۰/۰۰۰ و دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول تجمع پیدا کرده در تیوب زیرستون، بیرون ریخته شد و بدون اضافه کردن هیچ ماده ای، ستون به مدت ۳ دقیقه، سرعت rpm ۱۳/۰۰۰ و دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. سپس ستون به تیوب جدیدی منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DR3 موجود در کیت، به مرکز ستون اضافه شد. ستون پس از ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۲ دقیقه و در سرعت rpm ۱۰/۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول تجمع یافته در کف میکروتیوب مجدداً به مرکز تیوب برگردانده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت ستون به مدت ۲ دقیقه با سرعت rpm ۱۳/۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول تجمع پیدا کرده در کف تیوب زیرستون، محتوی RNA استخراج شده از بافت های مورد استفاده بود و پس از برچسب گذاری، تعیین کیفیت، کمیت و یکپارچگی در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA از بافت برگ گیاه کلزا و با استفاده از روش CTAB^۱ انجام شد. برای این منظور، ۲۰ میلی گرم از بافت برگ کلزا در مجاورت ازت مایع کوبیده شد. در ادامه بافر CTAB ۲٪ (حاوی CTAB ۲ درصد از ۴۰ PVP ۱ درصد، Tris-HCL ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی مولار و NaCl ۱/۴ مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر SDS ۱٪^۲، ۲ میکرولیتر β-مرکاپتواتانول^۳ و ۲ میکرولیتر RNase به بافت برگ کوبیده شده اضافه شد و میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد. پس از انکوبه کردن در حمام آب ۶۵ درجه

1 Cetyl trimethyl ammonium bromid (CTAB)

2 Sodium dodosil sulfate (SDS)

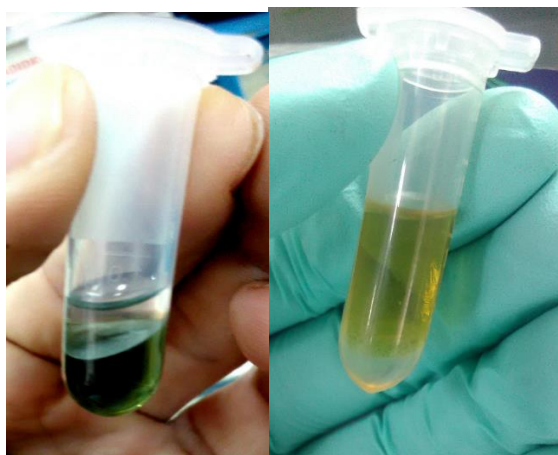
3 βMercaptoethanol

سانتی‌گراد و حذف ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها (با استفاده از ترکیب فنل^۱، کلروفرم^۲ و ایزوآمیل‌الکل^۳ به نسبت ۱:۲۴:۲۵) با سانتریفیوژ با سرعت ۱۰/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، به‌منظور رسوب DNA از ایزوپروپانول سرد استفاده شد و ۱۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ (۱۰/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه)، رسوب سفیدرنگی در جداره و انتهای تیوب مشاهده شد. دو بار شستشو به ترتیب با الکل ۷۰ و ۹۶ درصد و سانتریفیوژ با سرعت ۱۲/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سبب از بین رفتن ناخالصی‌های احتمالی شد. پس از وارونه کردن تیوب به مدت ۲۰ دقیقه، رسوب سفیدرنگ در مجاورت هوای آزاد خشک شد. به رسوب DNA مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد. برای مشاهده کیفیت DNA استخراجی الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE(0.5×) انجام شد.

تهیه ژل الکتروفورز

برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر ژل آگارز ۱ درصد، ۰/۵ گرم آگارز توزین و سپس با اضافه کردن بافر TAE(1×) به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ماده ناهمگن بدست آمده به‌منظور حل شدن تا زمان جوشیدن توسط ماکروویو حرارت داده شد. سپس محلول بدست آمده برای خنک شدن تا دمای تقریبی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در دمای اتاق نگهداری گردیده و پس از رسیدن به دمای ذکرشده یک قطره از استوک اتیدیوم بروماید به محلول اضافه و مخلوط شد. سپس محلول در سینی الکتروفورز که قبلاً دو سمت آن با چسب نواری بسته‌شده و شانه آن در فاصله تقریباً یک سانتیمتری از یک انتهای سینی قرار گرفته بود، ریخته شد و ۳۰ دقیقه برای بسته شدن ژل در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از بسته شدن کامل ژل، چسب‌های دو سمت سینی و شانه برداشته شد.

-
- 1 Phenol
 - 2 Chloroform
 - 3 Isoamyl alchole



شکل ۳-۱: مراحل مختلف استخراج RNA از بافت برگ کلزا

تعیین کیفیت و کمیت RNA و DNA استخراجی

تعیین کیفیت RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز ژل آگارز و نانودراپ تعیین شد. برای این منظور برای تعیین یکپارچگی RNA استخراج شده از آزمون یکپارچگی RNA استفاده شد. در این روش ۱ میکرولیتر از RNA استخراجی که با ۱ میکرولیتر لودینگ دای (6×) مخلوط شده بود بر روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار نرده بان ژنی، به مدت ۳۰ دقیقه و ولتاژ ۷۰ ولت ران شد. پس از اتمام زمان ران، باندهای شکل گرفته بر روی ژل، تحت نور ماورای بنفش و در دستگاه ژل داک آشکارسازی و تصویربرداری گردید.

تعیین کمیت RNA نیز توسط دستگاه نانودراپ صورت گرفت. در این روش مقدار غلظت RNA موجود در نمونه‌ها با توجه به اینکه حداکثر جذب نوری RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام می‌شود و هر واحد جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر معادل غلظت ۴۰ µg/ml در نظر گرفته می‌شود.

همچنین تعیین کیفیت و یکپارچگی DNA استخراجی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE(0/5×) انجام شد. به علاوه تعیین غلظت DNA استخراجی نیز توسط نانودراپ صورت گرفت.

طراحی پرایمرهای غیر اختصاصی

با استفاده از بخش‌های حفاظت شده توالی‌های کدکننده مربوط به ژن دلتا-۶ دسچوراز در *Ostreococcus tauri*، *Lobosphaera incisa*، *Ribes mandshuricum*، *Chlamydomonas sp.*، *Nonea caspica*، *Echium amoenum*، *Ribes nigrum*، *Echium sabulicola*، *Borago officinalis*، *Echium plantagineum* و *Primula vialii*، *Primula farinose*، *Ostreococcus lucimarinus* دلتا-۶ لانگاز در *Pyramimonas cordata* و *Lobosphaera incisa* و دلتا-۸ دسچوراز در *Arachis hypogaea*، *Primula farinosa*، *Vernicia fordii*، *Stylosanthes hamata*، *Nicotiana tabacum*، *Primula nivalis*، *Aquilegia vulgaris*، *Primula vialii*، *Ribes nigrum*، *Arabidopsis thaliana*

Anemone Ribes mandshuricum Primula auricula Helianthus annuus Crepis alpina Cucumis Prunus persica Glycine max Brassica rapa Ricinus communis Jevillei Borago Populus tomentosa Vitis vinifera Sorghum bicolor Triticum aestivum sativus و *Jatropha curcas officinalis* برای طراحی پرایمر اقدام شد (پیوست های ۳، ۴ و ۵). برای این منظور توالی کامل کدکننده ژن های دلتا-۶ دسچوراز، دلتا-۶ الانگاز و دلتا-۸ دسچوراز گیاهی از پایگاه داده ای NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد. سپس توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) تحت انجام آنالیز همردیف سازی توالی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده و شناسایی مناطق حفاظت شده توالی ژن های گفته شده اقدام به طراحی پرایمر شد. سپس پرایمر های طراحی شده توسط نرم افزار Oligo (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>) analyzer در زمینه درصد محتوای بازهای گوانین و سیتوزین، دمای ذوب، ایجاد ساختار سنجاق سری، هم چسبی و دگر چسبی مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات لازم در توالی پرایمر های طراحی شده اعمال انجام شد. سپس توالی های اصلاح شده با استفاده از نرم افزار Primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) علیه ژنوم کلزا BLASTN شد تا از مکمل بودن پرایمر های طراحی شده با بخشی از ژنوم کلزا اطمینان حاصل شود.

انجام واکنش One-step RT-PCR

در این مرحله پس از انتخاب بهترین نمونه های RNA استخراج شده از بافت های برگ و بذر با استفاده از کیت One-step RT-PCR شرکت Qiagen به تکثیر توالی های مورد نظر پرداخته شد. مواد مورد نیاز برای تکثیر توالی مورد نظر برای هر واکنش با حجم $50 \mu\text{l}$ شامل $5 \times$ $2 \mu\text{l}$ dNTP Mix (10 mM)، پرایمر OneStep RT-PCR Buffer $10 \mu\text{l}$ ، QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix $2 \mu\text{l}$ ، پرایمر های Forward (10mM) $3 \mu\text{l}$ ، Reverse (10 mM) $3 \mu\text{l}$ ، RNA الگو $1 \mu\text{gr}$ و $28 \mu\text{l}$ ddH₂O مورد استفاده قرار گرفت. بعلاوه پروتکل حرارتی PCR با دمای 50 درجه سانتی گراد: 30 دقیقه و سپس 95 درجه سانتی گراد: 15 دقیقه، آغاز گردید؛ و 35 سیکل (94 درجه سانتی گراد: 1 دقیقه، $68-50$ درجه سانتی گراد: 1 دقیقه و 72 درجه سانتی گراد: 1 دقیقه) و 72 درجه سانتی گراد: 10 دقیقه ادامه یافت.

با اتمام فرآیند One-step-PCR، $5 \mu\text{l}$ از محصول هر واکنش های به همراه $1 \mu\text{l}$ محلول لودینگ دای ($6 \times$) مختلف برای بررسی تکثیر توالی مورد نظر در الکتروفورز افقی مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت باندهای تکثیری پرایمر های مختلف بر روی ژل آگارز 1 درصد بررسی شد و بر اساس مقایسه باندهای مشاهده شده با خط کش ژنی طول تقریبی قطعات تکثیر شده مشخص شد.

انجام واکنش زنجیره ای PCR

پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی از بافت بذر کلزا، با استفاده از مسترمیکس آماده شرکت تکاپوزیست به تکثیر توالی دلتا-۸ دسچوراز پرداخته شد. مواد موردنیاز برای تکثیر توالی موردنظر برای هر واکنش با حجم ۵۰ میکرولیتر شامل Taq master mix 2× ۲۵ میکرولیتر، ۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر های forward (10 mM) و reverse (10 mM)، ۲۰ نانوگرم از DNA الگو و ۱۶ میکرولیتر PCR grade water مورد استفاده قرار گرفت. به علاوه پروتکل حرارتی PCR با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه آغاز شد و با ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۶۸-۵۰ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه ادامه یافت.

با اتمام فرآیند PCR، با توجه به اینکه مسترمیکس استفاده شده به طور مستقیم و بدون استفاده از محلول لودینگ‌دای قابل استفاده جهت الکتروفورز بود، ۵ μl از محصول هر واکنش برای بررسی تکثیر توالی موردنظر در الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE (0.5×) استفاده شد.

استخراج باندهای تکثیر شده از ژل

استخراج باندهای تکثیر شده از ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت دنایست آسیا و بر اساس دستورالعمل آن انجام شد. از بافر TAE برای الکتروفورز باندهای موردنظر استفاده شد تا بتوان پس از استخراج این قطعات از ژل، به انجام فرآیند همسانه سازی در وکتور کلونینگ TA و توالی یابی پرداخت. برای این منظور محصول واکنش PCR و Onestep RT-PCR بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد و با استفاده از الکتروفورز بافر TAE (0.5×) اجرا شد. سپس ژل با استفاده از دستگاه ترانس ایلومینیتور تحت تابش نور ماورا بنفش قرار داده و باندهای موردنظر از ژل جدا و وزن شدند. در ادامه سه برابر حجم ژل جدا شده از محلول GR1، تهیه شده توسط کیت، به تیوب محتوی قطعات ژل اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبگرم ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از حل شدن ژل و بدست آمدن یک محلول همگن، ایزوپروپانول به مقدار مساوی حجم ژل موجود در هر میکروتیوب اضافه و مخلوط شد. محلول حاصله به ستون‌های استخراج تهیه شده توسط کیت، منتقل و با سرعت ۱۰/۰۰۰ rpm و مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۷۰۰ μl از بافر GR2، تهیه شده توسط کیت، به مرکز ستون اضافه و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مجدداً ستون با سرعت ۸/۰۰۰ rpm و مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از دور ریختن محلول تجمع یافته در تیوب زیرستون، بدون اضافه کردن هیچ ماده‌ای دوباره با سرعت ۱۴/۰۰۰ rpm و زمان ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ستون به تیوب جدیدی منتقل شد و ۵۰ μl از بافر GR3 که قبلاً در حمام آبگرم به دمای ۶۰ درجه رسیده بود به مرکز ستون اضافه گردید. پس از انکوباسیون به مدت دو دقیقه و در دمای اتاق، ستون دو دقیقه با سرعت ۸/۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول تجمع یافته در کف میکروتیوب به مرکز ستون بازگردانده و ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در آخر ستون دو دقیقه و با سرعت ۱۳/۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول تجمع یافته در کف میکروتیوب

زیرستون، محتوی نوکلئیک اسید خالص شده بود و پس از تعیین کمیت و کیفیت به ترتیب با استفاده از نانودراپ و ران کردن مجدد بر روی ژل آگارز و مقایسه ساینز باند حاصل، با خط کش ژنی و برچسب گذاری در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

همسانه سازی قطعه تکثیر شده توسط واکنش زنجیره ای PCR در وکتور کلونینگ TA

با توجه به استفاده از آنزیم Taq polymerase در فرآیند PCR برای تکثیر توالی مورد نظر و در نظر گرفتن اینکه این آنزیم در انتهای رشته تکثیر شده دنباله poly A ایجاد می کند، همسانه سازی در وکتور TA که دارای دنباله poly T است و باعث اتصال آسان رشته مورد نظر به توالی وکتور می گردد، انجام شد. برای این منظور از کیت TA cloning vector شرکت بایرپل فناور استفاده شد.

محیط LB broth با استفاده از ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم پودر عصاره مخمر، ۵ گرم NaCl و آب مقطر دیونیزه به حجم نهایی ۱ لیتر و pH=۵ تهیه شد. سپس محیط LB agar، با استفاده از ۵۰۰ میلی لیتر از محیط LB broth تهیه شده و ۷/۵ گرم آگار تهیه شد. محیط های تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه، دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر اتوکلاو شد. در نهایت به هر کدام از محیط ها ۵۰۰ μ l آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ mg/mL) اضافه شد.

تهیه مخلوط اتصال دهنده، به منظور ایجاد اتصال پیوند فسفودی استر بین نوکلئوتید های انتهای وکتور و قطعه تکثیر شده توسط فرآیند PCR، با مخلوط کردن ۳ μ l از وکتور PTZ، ۶ μ l از بافر اتصال $\times 5$ ، ۵ μ l از محصول واکنش PCR، ۲ μ l از T4 DNA ligase و با اضافه کردن ۱۶ μ l آب مقطر nuclease-free و رساندن حجم نهایی به ۳۰ μ l انجام شد. سپس مخلوط بدست آمده ۱۶ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

باکتری *E.coli* سوش DH5a روی محیط LB agar کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. یک کلونی از باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر محیط LB broth کشت و ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۵۰ rpm نگهداری شد. در روز بعد ۱۵۰ μ l از باکتری های سویه DH5a به یک میکروتیوب منتقل و ۱/۵ میلی لیتر از محیط BP-Medium به آن اضافه شد و ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰ rpm در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. سپس میکروتیوب به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۵/۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. به میکروتیوب روی یخ ۱ μ l از ۳۰۰ BP-solution اضافه شد و با پیپت کردن پلت را به طور کامل حل شد. در ادامه تیوب ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۵/۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد. دوباره پلت حاصله در ۱۲۰ μ l از محلول BP-solution حل شد و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از آن ۱ μ l

۲/۵ از محلول اتصال دهنده به میکروتیوب های جدید منتقل شد و ۲ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس ۵۰ µl از سلول های DH5a به میکروتیوب حاوی محلول اتصال دهنده اضافه شد و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در آخر ۳۰ µl از محتویات تیوب بر روی محیط های LB agar که از ۲۰ دقیقه قبل ۴۰ µl از محلول های IPTG و X-Gal در سطح آن پخش شده بود، ریخته و به صورت یکسان در تمام سطح پخش شد. پلیت های کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. با توجه به اینکه کلونی های سفیدرنگ دارای کلون نو ترکیب و کلونی های آبی فاقد پلاسمید نو ترکیب هستند، تشکیل کلنی های آبی و سفیدرنگ در سطح محیط های کشت بررسی شد.

توالی یابی قطعه تکثیر شده توسط فرآیند PCR و RT-PCR

پس از تشخیص کلنی های ترنسفرم شده توسط وکتور نو ترکیب، استخراج پلاسمید از نمونه باکتری های این کلنی ها انجام شد. سپس توالی یابی قطعه تکثیر شده با سه تکرار توسط شرکت توپاززن کاوش تهران و به روش توالی یابی Sanger انجام شد.

مطالعات بیوانفورماتیکی

با توجه به اینکه در هر یک از تکرار های توالی یابی یک سری از نوکلئوتید های حاضر در رشته در فرآیند توالی یابی مشخص نشده بودند، با هم ردیف سازی سه توالی حاصل از تکرار های مختلف توسط نرم افزار [CLUSTALW \(http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw\)](http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) توالی کامل قطعه تکثیر شده توسط فرآیند PCR مشخص گردید.

با استفاده از نرم افزار [BLASTN \(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) توالی بدست آمده با توالی ژنوم کلزا مورد مقایسه قرار گرفت تا منحصربه فرد بودن و یا تکراری بودن توالی بدست آمده نسبت به توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI بررسی شود.

به منظور تعیین و تشخیص دومین های احتمالی موجود در توالی بدست آمده، با استفاده از نرم افزار CD [SEARCH \(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) و تنظیمات پیش فرض، توالی بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور رسم درختچه فیلوژنتیک برای توالی بدست آمده در ابتدا تمامی توالی های کد کننده ژن دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان *Vernicia* *Stylosanthes hamata* *Nicotiana tabacum* *Arachis hypogaea* *Aquilegia* *Primula vialii* *Ribes nigrum* *Arabidopsis thaliana* *Primula farinosa* *fordii* *Ribes* *Primula auricula* *Helianthus annuus* *Crepis alpina* *Primula nivalis* *vulgaris* *Glycine max* *Brassica rapa* *Ricinus communis* *Anemone leveillei* *mandshuricum* *Vitis vinifera* *Sorghum bicolor* *Triticum aestivum* *Cucumis sativus* *Prunus persica*

توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز به همراه توالی قطعه تکثیرشده توسط PCR، با استفاده از نرم‌افزار NCBI استخراج شد. سپس توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز به همراه توالی قطعه تکثیرشده توسط PCR، با استفاده از نرم‌افزار CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) هم‌ردیف شد. در ادامه با استفاده از همین نرم‌افزار و الگوریتم UPGMA درختچه فیلوژنتیک برای توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز و توالی بدست آمده در این تحقیق رسم شد.

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

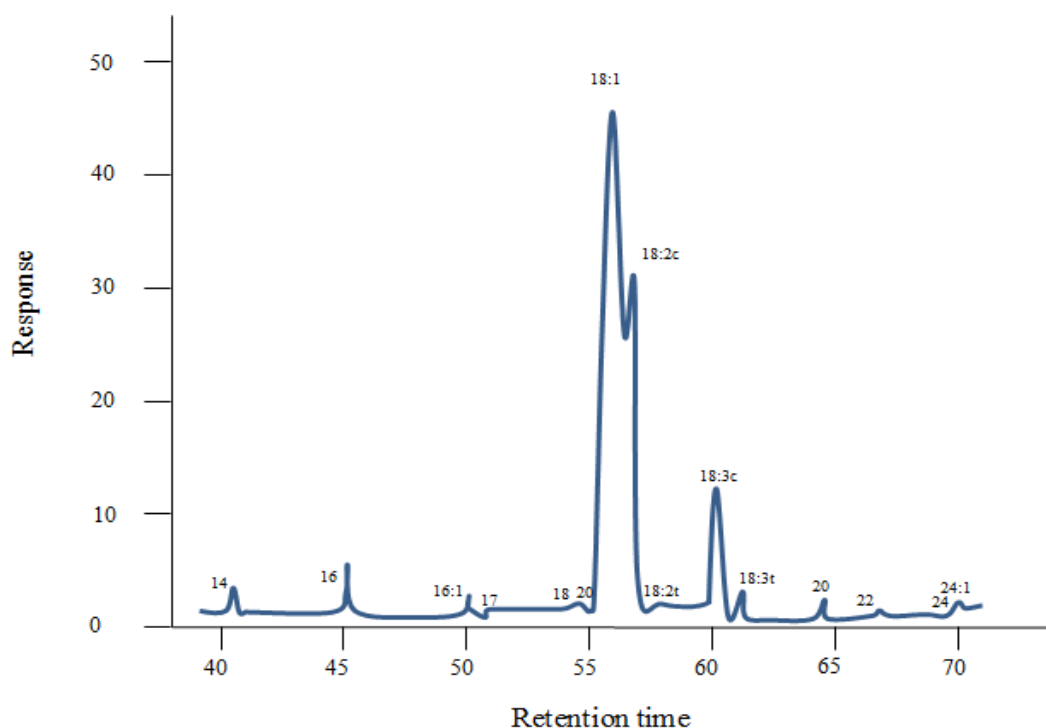
در این فصل به ارائه نتایج حاصل از این تحقیق در دو بخش پرداخته شده است. در بخش اول نتایج مربوط به بررسی های ملکولی و در بخش دوم نتایج مربوط به آنالیزهای بیوانفورماتیکی داده های حاصل از بررسی های ملکولی و توالی یابی آورده شده است.

ارزیابی نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن بذر کلزا

نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی روغن استخراج شده از بذر کلزا در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۴-۱: نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن بذر کلزا

اسیدهای چرب	پاسخ	زمان پاسخ (دقیقه)
C14:0	0/03	41/23
C16:0	3/24	46/52
C16:1	0/16	49/92
C17:0	0/02	52/30
C18:0	1/56	54/64
C18:1c9	48/86	55/84
C18:2c	27/09	56/03
C18:2t	3/61	56/78
C18:3c	12/36	59/38
C18:3t	1/81	60/52
C20:0	0/57	56/47
C22:0	0/31	61/61
C22:1	0/09	63/44
C24:0	0/18	68/57
C24:1	0/11	69/06



شکل ۴-۱: طیف آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن بذر کلزا

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن استخراج شده از بذر کلزا و مقایسه انواع مختلف اسیدهای چرب موجود در پروفیل اسید چرب بذر کلزا با اسیدهای چرب امگا-۳، مشخص شد که از بین انواع مختلف اسیدهای چرب امگا-۳ گیاه کلزا تنها دارای آلفا-لینولنیک اسید است و سایر اسیدهای چرب امگا-۳ در محتوای روغنی بذر این گیاه مشاهده نمی‌شود که این یافته برخلاف نتایج بدست آمده توسط دیک و همکاران (۲۰۱۴) بود. در نتیجه می‌توان استنباط نمود که حداقل فعالیت آنزیم‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۹ الانگاز که به ترتیب باعث تبدیل آلفا-لینولنیک اسید به استئاریدونیک اسید و ایکوزاتریئوئیک اسید می‌شود، در بذر این گیاه وجود ندارد. نتایج بدست آمده با توجه به اینکه تاکنون هیچ توالی کدکننده ای برای دلتا-۹ الانگاز در گیاهان یافت نشده است مطابقت دارد و نشان‌دهنده آن است که در کلزا نیز همچون سایر گیاهان استفاده از مسیر دلتا-۹ برای بیوسنتز امگا-۳ وجود ندارد. از طرفی همان‌طور که نتایج آنالیز کروماتوگرافی روغن کلزا نشان می‌دهد با در نظر گرفتن عدم فعالیت آنزیم دلتا-۶ دسچوراز در کلزا می‌توان بیان کرد که سنتز اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیره‌تر از آلفا-لینولنیک اسید در کلزا مورد انتظار نیست.

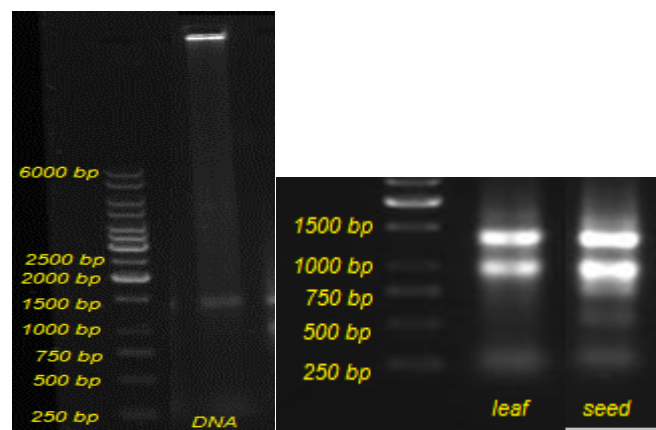
به‌علاوه با توجه به میزان بالای اولئیک اسید (۱۸:۱)، لینولئیک اسید (۱۸:۲) و آلفا-لینولنیک اسید (۱۸:۳) موجود در روغن کلزا، که پیش‌سازهای تولید ایکوزاپنتائوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید هستند،

می‌توان این گیاه را به‌عنوان کاندیدای مناسبی جهت انجام پروژه‌های انتقال ژن در جهت ساخت کامل مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب امگا-۳ و تولید همه اسیدهای چرب امگا-۳ با منشأ گیاهی در نظر گرفت.

سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پس از استخراج RNA از نمونه‌های مختلف برگ و بذر کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده برای استخراج‌شده از نمونه بذر نشانگر غلظت $304/3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ، نسبت میزان جذب در طول موج 260 nm به 280 nm نانومتر $2/08$ و میزان جذب در طول موج 260 nm به 230 nm نانومتر نیز برای این نمونه $1/57$ اندازه‌گیری شد. به‌علاوه میزان غلظت RNA استخراج‌شده از نمونه برگ $185/9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ، میزان نسبت جذب در طول موج 260 nm به 280 nm نانومتر $2/09$ و نسبت جذب در طول موج 260 nm به 230 nm نانومتر برای این نمونه $1/57$ بدست آمد. همچنین میزان غلظت DNA استخراجی $3300 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ، میزان جذب در طول موج 260 nm به 280 nm نانومتر 2 و نسبت جذب در طول موج 260 nm به 230 nm نانومتر برای این نمونه $2/1$ اندازه‌گیری شد. در نتیجه نمونه‌های استخراج‌شده به لحاظ عدم آلودگی فنلی، پروتئینی و غلظت، مناسب استفاده برای فرآیندهای بعدی تحقیق بود.

بررسی یکپارچگی RNA و DNA استخراج‌شده توسط الکتروفورز ژل آگارز 1% در بافر $TBE(0.5\times)$ و مشاهده باندهای تفکیک‌شده بر روی ژل با استفاده از دستگاه Gel doc باعث مشاهده باندهای واضح 18s rRNA و 28s rRNA با شدت تقریباً دو برابر برای باند 28s rRNA نسبت به باند 18s rRNA بود. در نتیجه یکپارچگی RNA استخراج‌شده تأیید شد. به‌علاوه باند مربوط به DNA استخراجی نیز از محل تزریق در چاهک جایجا نشده بود که نشان‌دهنده عدم شکستگی DNA در طول مراحل استخراج است.



(ب)

(الف)

شکل ۴-۲: (الف) تصویر ژل آگارز 1% DNA استخراجی از بافت برگ

(ب) تصویر ژل الکتروفورز آگارز 1% RNA استخراج‌شده از نمونه‌های مختلف برگ و بذر

طراحی پرایمرهای غیراختصاصی

همان‌طور که در فصل سوم گفته شد، پس از طراحی پرایمرهای غیراختصاصی مختلف برای ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز، دلتا-۶ الانگاز و دلتا-۸ دسچوراز (پیوست‌های ۳، ۴ و ۵) اقدام به انجام BLAST پرایمرهای طراحی‌شده علیه ژنوم کلزا شد. در نتیجه این آنالیز هیچ قطعه‌ای از بخش توالی‌یابی شده ژنوم کلزا مکمل با جفت پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر توالی دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز یافت نشد و در نتیجه پرایمرهای طراحی‌شده با استفاده از توالی‌های همولوگ ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در سایر گیاهان قادر به اتصال و تکثیر قسمتی از بخش توالی‌یابی شده ژنوم کلزا نبود. البته این نتایج مطابق داده‌های بدست آمده حاصل از کروماتوگرافی گازی روغن بذر کلزا بود که فعالیت دلتا-۶ دسچوراز و یا دلتا-۶ الانگاز بر روی اسیدهای چرب موجود در محتوای روغنی کلزا قابل مشاهده نبود و تا حدودی باعث روشن‌تر شدن مسیر ادامه پژوهش گردید. با این وجود با توجه به اینکه تنها بخشی از ژنوم کلزا توالی‌یابی شده است و این امکان وجود دارد که توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز توسط بخش‌های توالی‌یابی نشده ژنوم کلزا کد شوند نیاز بود تا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای PCR و پرایمرهای طراحی‌شده بر اساس توالی‌های همولوگ در سایر گیاهان، نسبت به بررسی وجود توالی‌های کدکننده دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در ژنوم کلزا اقدام شود. به‌علاوه با کاهش احتمال وجود ژن‌های مسیر دلتا-۶ دسچوراز در ژنوم کلزا، همچنین در نظر گرفتن اینکه تاکنون هیچ توالی کدکننده‌ای برای ژن دلتا-۹ الانگاز در گیاهان یافت نشده است و مطابقت آن با اینکه در پروفیل به‌دست‌آمده از اسیدهای چرب موجود در روغن بذر کلزای مورد مطالعه، اسید چرب ایکوزاتریئوئیک اسید به‌عنوان فرآورده عمل دلتا-۹ الانگاز بر روی سوبسترای آلفا-لینولنیک اسید مشاهده نشد، تلاش شد تا وجود ژن دلتا-۸ دسچوراز در ژنوم کلزا و طراحی پرایمر برای این ژن انجام بگیرد؛ که در نتیجه آن و با استفاده از توالی‌های همولوگ موجود در پایگاه‌های داده و بر اساس بخش‌های حفاظت‌شده آن، برای ژن دلتا-۸ دسچوراز، اقدام به طراحی پرایمرهای غیراختصاصی گردید. جفت پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر توالی ژن دلتا-۸ دسچوراز نیز با استفاده از نرم‌افزار Primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) علیه ژنوم کلزا BLAST شد. در نتیجه پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر توالی ژن دلتا-۸ دسچوراز قادر به اتصال به ژنوم کلزا و تکثیر بخشی از ژنوم بود. نکته جالب در انجام BLAST توالی‌های کدکننده دلتا-۶ دسچوراز در سایر گیاهان علیه ژنوم کلزا، تطابق نسبی با توالی‌های پیش‌بینی‌شده جهت اتصال پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر توالی دلتا-۸ دسچوراز در ژنوم کلزا بود که این یافته مطابق نتایج بدست آمده توسط گارسیا-ماروتو و همکاران (۲۰۰۷) بود (شکل ۴-۷). به‌علاوه با توجه به عدم وجود ژن دلتا-۹ الانگاز در گیاهان همچنین عدم مشاهده ایکوزاتریئوئیک اسید به‌عنوان فرآورده عمل دلتا-۹ الانگاز در پروفیل اسید چرب کلزا، حتی در صورت وجود توالی کدکننده دلتا-۸ دسچوراز در ژنوم کلزا و بیان آن با توجه به عدم وجود

سوبسترای این آنزیم در محتوای اسید چرب کلزا، فعالیت متابولیکی و وجود ایکوزاتترائونوئیک اسید به‌عنوان فرآورده عمل این آنزیم (همان‌طور که در پروفیل اسید چرب بذر کلزا مشاهده می‌شود) در گیاه کلزا مورد انتظار نیست.

ارزیابی نتایج حاصل از انجام RT-PCR و PCR

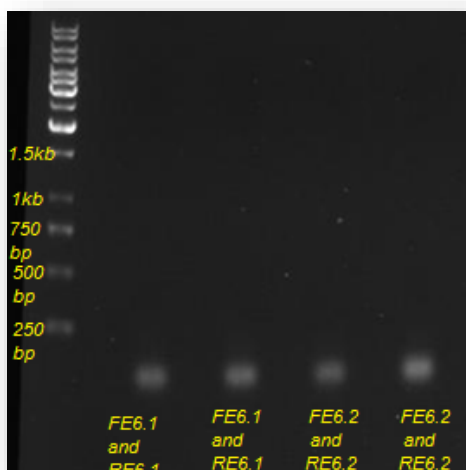
استفاده از جفت پرایمرهای طراحی‌شده بر اساس بخش‌های حفاظت‌شده توالی کدکننده دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در سایر گیاهان، در فرآیند onestep RT-PCR تحت شرایط مختلف با استفاده از RNA استخراج‌شده از بافت برگ و بذر گیاه کلزا به‌عنوان الگو منجر به تکثیر هیچ توالی نشد. نتیجه بدست آمده تأییدکننده نتایج BLAST توالی‌های پرایمر طراحی‌شده علیه ژنوم کلزا است. همان‌طور که نتایج آنالیز BLAST منجر به یافتن هیچ توالی مشابهی با پرایمرهای طراحی‌شده با ژنوم کلزا نشد، نتایج بدست آمده از انجام فرآیند onestep RT-PCR نیز نشان‌دهنده عدم اتصال پرایمرهای طراحی‌شده به cDNA حاصل از RNA استخراج‌شده از بافت‌های بذر و برگ کلزا و عدم تکثیر توالی می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت رونوشت ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در محتوای RNA گیاه کلزا وجود ندارد (شکل ۴-۳).

همچنین در صورت عدم وجود رونوشت این ژن‌ها در محتوای RNA کلزا به‌طور مسلم انتظار وجود آنزیم‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز و فعالیت در گیاه کلزا مورد انتظار نیست بنابراین نتیجه بدست آمده تأییدکننده داده‌های بدست آمده از پروفیل اسید چرب بذر کلزا می‌باشد که در آن به ترتیب استئاریدونیک اسید و ایکوزاتترائونوئیک اسید به‌عنوان فرآورده عمل آنزیم‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز مشاهده نشد و با توجه به عدم وجود رونوشت ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز در محتوای RNA این گیاه، آنزیم‌های حاصل از ترجمه این رونوشت‌ها نیز در گیاه کلزا وجود ندارد.

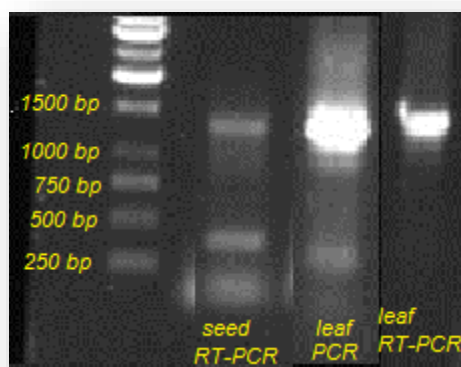
با توجه به استفاده از کیت Onestep RT-PCR، سنتز cDNA و انجام واکنش زنجیره‌ای PCR به‌صورت توأم و در یک میکروتیوب انجام شد و محصول این واکنش به همراه محصول واکنش PCR با استفاده از DNA به‌عنوان الگو برای تکثیر توالی دلتا-۸ دسچوراز، توسط الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۳). نتایج آشکارسازی باندهای تفکیک‌شده بر روی ژل آگارز توسط تابش نور ماورای بنفش نشانگر تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۱۰۰ bp و مطابق با نتایج حاصل از BLAST پرایمرهای طراحی‌شده برای توالی دلتا-۸ دسچوراز علیه ژنوم کلزا بود. بررسی میزان شدت باندهای تفکیک‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بیشتر بودن بیان این ژن در نمونه‌های برگ نسبت به نمونه‌های بذر را نشان دادند که این یافته مطابق نتایج بدست آمده توسط چی و همکاران (۲۰۱۰) بود (شکل ۴-۳).



الف



ج



ب

شکل ۳-۴: الف) تصویر حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن دلتا-۶ دسچوراز

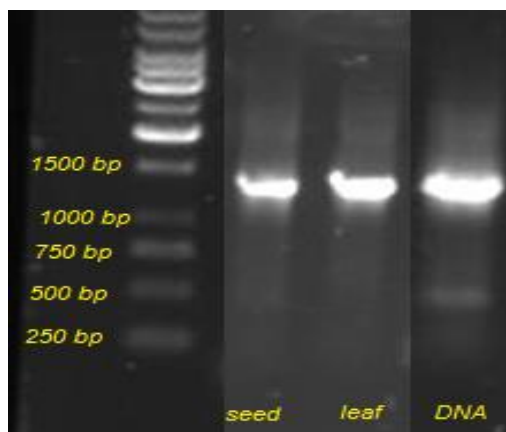
ب) تصویر حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن دلتا-۶ لانگاز

ج) تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR و RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن دلتا-۸ دسچوراز

ارزیابی نتایج حاصل از استخراج باندهای با طول موردنظر از ژل الکتروفورز

باندهای تکثیرشده با طول مورد انتظار برای توالی ژن دلتا-۸ دسچوراز، پس از آشکارسازی و با روشی که در فصل قبل گفته شد از ژل آگارز استخراج شد. سپس با استفاده از Nanodrop کیفیت و کمیت میزان DNA استخراج شده از ژل اندازه گیری شد. بر این اساس میزان غلظت DNA خالص شده برای باند مربوط به نمونه برگ $3273/9 \text{ ng}/\mu\text{L}$ و نسبت میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر برای این نمونه ۱/۶۱ اندازه گیری شد. به علاوه غلظت میزان DNA استخراج شده برای باند مربوط به نمونه بذر $2189/5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ و نسبت میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر نیز ۱/۴۳ بدست آمد؛ که با توجه به مقادیر بدست آمده برای میزان غلظت و خلوص، DNA استخراج شده قابلیت استفاده جهت پروسه های پایین دستی از قبیل کلونینگ و توالی یابی را داشت.

همچنین با انجام PCR با استفاده از DNA خالص شده از ژل و پرایمر های ژن دلتا-۸ دسچوراز، یکپارچگی و عدم شکستگی DNA در زمان استخراج بررسی شد که طی آن پس از انجام الکتروفورز محصول PCR باندهایی با طول حدود 1100 bp بدست آمد (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴: نتایج الکتروفورز محصول انجام PCR با استفاده از DNA خالص شده از ژل و پرایمر های دلتا-۸ دسچوراز

ارزیابی نتایج حاصل از کلونینگ توالی موردنظر در وکتور TA

با توجه به اینکه وکتور مورد استفاده جهت انجام فرآیند کلونینگ دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بود، با استفاده از آنتی بیوتیک آمپی سیلین در حضور IPTG و X-Gal در محیط های کشت باکتریایی، غربالگری سلول های DH5a ترانسفرم شده از سلول های ترانسفرم نشده انجام شد. در نتیجه با مشاهده و تفکیک کلنی های سفید از کلنی های آبی تشکیل شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و در نظر گرفتن اینکه هر کلنی ناشی از رشد و تقسیم یک سلول باکتری بر روی محیط کشت است، سلول های ترانسفرم شده توسط وکتور نوترکیب از سلول های غیر ترانسفرم شده توسط وکتور و یا سلول های ترانسفرم شده توسط وکتور غیر نوترکیب، تفکیک شدند. استخراج پلاسمید

از کلنی‌های حاصل از باکتری‌های ترنسفرم شده توسط وکتور، انجام گرفت و برای توالی‌یابی به شرکت توپازژن کاوش-تهران ارسال شد و پس از انجام چندین نوبت توالی‌یابی (پیوست ۲)، بخشی از توالی دلتا-۸ دسچوراز بدست آمد که در زیر آمده است و جهت بدست آوردن توالی کامل این ژن می‌توان از طریق فرآیندهای genome walking استفاده کرد.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی بدست آمده

در ابتدا تکرارهای مختلف از توالی بدست آمده (پیوست ۲) مورد هم‌ردیف‌سازی چندگانه قرار گرفت و با انطباق تکرارهای مختلف، توالی بخش تکثیرشده دلتا-۸ دسچوراز (D8DES) توسط واکنش زنجیره‌ای onestep RT-PCR و PCR با طول ۱۱۱۷ جفت باز بدست آمد. سپس این توالی بدست آمده تحت آنالیزهای بیوانفورماتیکی قرار گرفت.

>D8DES

```
AGGAAGGAGACTCTGGCTGATCCAGGCAAGTCTGGGTAAATCCTGGCACAG
TTGGCCTAAACGGCGCAAACGCGTTCAAAGCTTCCACCCCGGAACCGCGT
GGCACCACCTCGACAACCTCTTACCGCGCTACCACGTCAGCGACTTCCAAA
AGTGCCTCCGAAGTCTCCC GCGATTACCGCCGCATGGCCGCCGAGTTTCGCA
AACTCGGCCTATTCGAAAACAAAGGCCACGTCACTCTCTACACCTTATCCTT
CGTCGCCTGCCATGTTTCGCCGCCGTTCTCATAACGGCGTTCTCGCCTGTACTTC
GCTCCTCGCTCACCAGATCGCGGCCGCGATACTCGGACTGTTATGGATCCAG
AGCGCGTACATCGGCCACGACTCTGGACATTACGTCATCATGACGAACAAA
TCTTATAACAGATTTCGCTCACCTTCTCTCCGTAACGCTAACGGGAATCT
CGATCGCGTGGTGGAAATGGA CTACAACGCGCATCACCTCGCGTGTAACA
GCCTCGATTACGATCCCGATCTGCAGCACATCCCCGTGTTTGAGTCTCCGC
CAAGTTCTTCAACTCCATGACGTCGCGGTTCTACGATAGGAAACTCGCTTTC
GATCCCTTGGCGAGGCTCTTGATCAGTTACCAGCACTTCACTTACTACCCGG
TCATGTGCTTCGGGAGAATCAACCTGTTTGTGCAAACGCTCCTCCTCCTCTT
CTCCAAGCGCGAGGTTCCGGATCGCGCGCTAAACTTCGCCGGAATCTTTGGT
GTCTCTGGACTTGGTTCCTGTTTTCCTGCTTACCGACTTGACCGGA
GAGATTCTTCTTTCGTTCTTCACTAGCTTCCACTGTTACGGCGCTTCAGCATAT
ACAAATTCACGCTTAACCATTTCTGTGCTGATGTGTACGTGGGCCCCGCCAC
CGGGGGGAGACTTGGTTCGAGAAGCAGGCGGGGGGAACGTTGGAAATCTC
GGGTAGTCTATATGGAATGGGTCTTCGGTGGGGTTGCGTTTTCACTCA
AGCACCATTTGGTTCGAAGCTGGCCGCGTGGCCATTTTAGGCGAAATAGG
CTTCCGGGGGGTCAGGAAGCTTTGCAAGA
```

اولین نتیجه بدست آمده حاصل از انطباق تکرارهای مختلف توالی‌یابی قطعات تکثیرشده توسط فرآیندهای PCR و RT-PCR که به ترتیب از DNA و cDNA به‌عنوان الگو جهت تکثیر توالی موردنظر استفاده می‌کردند، عدم وجود تفاوت در توالی‌های تکثیرشده توسط فرآیندهای PCR و RT-PCR بود که نشانگر عدم وجود اینترون در این توالی می‌باشد. این نتیجه مطابق یافته‌های لی و همکاران (۲۰۱۲) در مورد عدم وجود اینترون در توالی‌های دلتا-۸ دسچوراز است.

در نتیجه انجام BLAST توالی D8DES علیه ژنوم کلزا، چهار ناحیه مشابه با کدهای دسترسی XM_013792994.1، XM_013846743.1، XM_013808441.1 و XM_013886464.1 که به ترتیب دارای میزان تطابق‌های ۹۵، ۹۰، ۸۳ و ۸۱ درصد و میزان query cover ۹۳ درصد برای هر چهار توالی با توالی D8DES است به ترتیب در کروموزوم‌های A9، C6، A9 و A4 یافته شد (جدول ۴-۲). با این وجود با توجه به اینکه ژنوم کلزا به‌طور کامل توالی‌یابی نشده است این امکان وجود دارد که توالی بدست آمده توسط بخشی از ژنوم کلزا که تا به حال توالی‌یابی نشده است کد شده باشد.

جدول ۴-۲: مشخصات توالی‌های مشابه با توالی D8DES

	Length(bp)	Identity	Query cover	Location
XM_013792994.1	۱۸۴۰	%۹۵	%۹۳	A9
XM_013846743.1	۱۶۶۲	۹۰%	۹۳%	C6
XM_013808441.1	۱۶۵۲	۸۳%	۹۳%	A9
XM_013886464.1	۱۶۱۶	۸۱%	۹۳%	A4

بعلاوه توالی نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از (<http://web.expasy.org/translate/>) translate به ۶ حالت خوانش ممکن به توالی‌های اسیدآمینو ترجمه شد. سپس هر کدام از ۶ توالی اسیدآمینو بدست آمده به‌صورت جداگانه علیه توالی‌های آمینواسیدی کد شده توسط ژنوم کلزا BLAST شد، که در نتیجه توالی آمینواسیدی بدست آمده از فریم دوم نحوه خوانش در جهت ۵' به ۳' بیشترین میزان query cover را در مقایسه با سایر نحوه‌های خوانش با توالی‌های آمینواسیدی کد شده توسط ژنوم کلزا را نشان داد.

با توجه به نتایج آنالیز BLASTP توالی آمینواسیدی بدست آمده (D8AA) حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی D8DES با ۸ توالی آمینواسیدی کد شده توسط ژنوم کلزا مشابهت نشان داد (جدول ۳-۴).

جدول (۳-۴) مشخصات توالی‌های آمینواسیدی مشابه کد شده توسط ژنوم کلزا با توالی D8AA

	Length(aa)	Identity	Query cover	Reference sequence
XP_013648448.1	۴۴۹	٪۷۳	٪۹۲	XM_013792994.1
XP_013702197.1	۴۴۹	۶۹٪	۹۳٪	XM_013846743.1
XP_013692727.1	۴۴۹	۶۶٪	۹۱٪	XM_013837273.1
XP_013741918.1	۴۴۹	۶۶٪	۹۱٪	XM_013886464.1
XP_013711705.1	۴۵۰	۶۴٪	۹۲٪	XM_013856251.1
XP_013663895.1	۴۴۷	۶۴٪	۹۳٪	XM_013808441.1
XP_013690985.1	۴۵۳	۶۲٪	۸۸٪	XM_013835531.1
NP_001302507.1	۴۴۹	۶۲٪	۸۸٪	NM_001315578.1

با توجه به نتایج حاصل از BLAST توالی نوکلئوتیدی D8DES علیه ژنوم کلزا و همچنین BLAST توالی پروتئینی D8AA علیه پروتئین‌های پیش‌بینی شده کدشونده توسط ژنوم کلزا توالی نوکلئوتیدی XM_013792994.1 که از طریق محاسبات بیوانفورماتیکی کدکننده توالی آمینواسیدی XP_013648448.1 پیش‌بینی شده است، دارای بیشترین شباهت به توالی بدست آمده در این پژوهش می‌باشد. از طرفی با توجه به اینکه توالی نوکلئوتیدی D8DES بدست آمده در این پژوهش توالی کامل کدکننده دلتا-۸ دسچوراز نیست و به‌عنوان توالی partial به حساب می‌آید و در نتیجه بررسی خصوصیات توالی آمینواسیدی کدشونده توسط آن ممکن نیست. بنابراین با وجود این احتمال که ممکن است توالی D8DES توسط قسمتی از بخش توالی‌یابی نشده ژنوم کلزا کدشود که مشابهت بالایی با توالی XM_013792994.1 دارد، به‌منظور بررسی بیوانفورماتیکی خصوصیات و ویژگی‌های پروتئین کدشونده توسط توالی D8DES از توالی آمینواسیدی XP_013648448.1 به‌عنوان شبیه‌ترین توالی ممکن، استفاده شد.

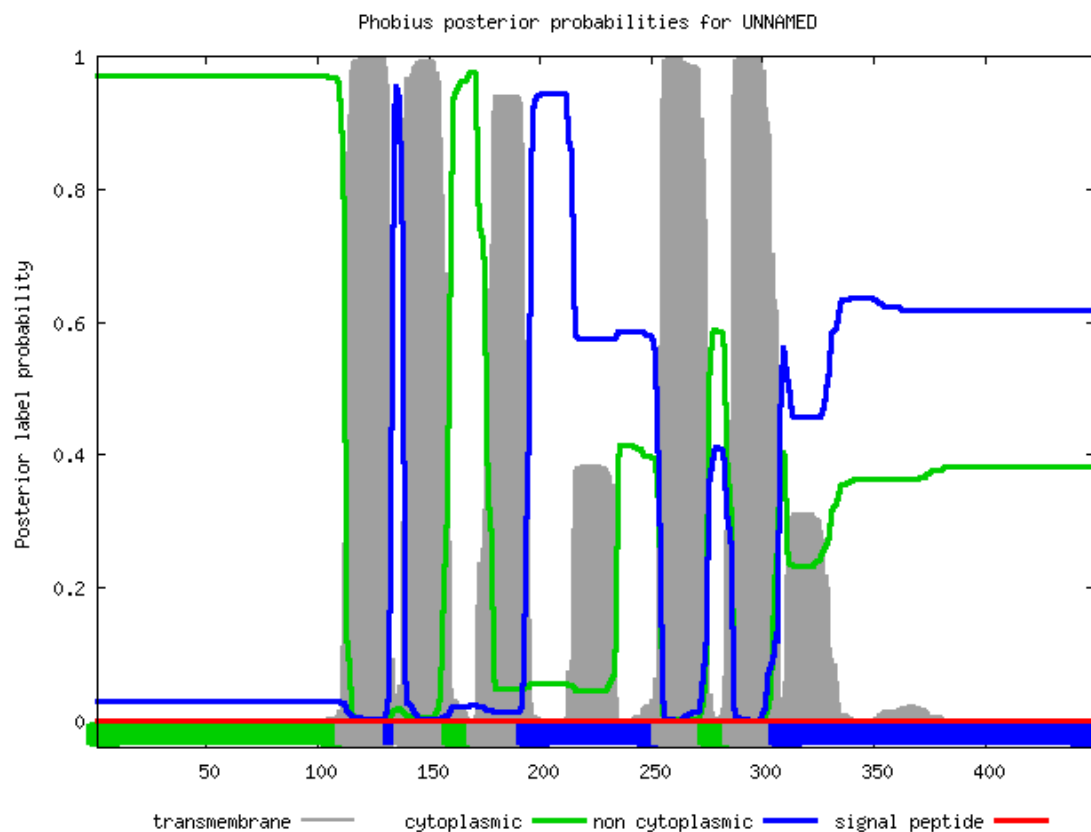
با استفاده از نرم‌افزار (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) protparam با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین D8AA مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده از این نرم‌افزار وزن ملکولی پروتئین D8AA، ۵۱۳۴۱،۰۶ گرم بر مول، فرمول ملکولی آن $C_{2384}H_{3546}N_{620}O_{623}S_{15}$ ، میزان PI محاسباتی آن ۸،۵۰ و تعداد دنباله اسید آمینه با بار منفی و مثبت در این توالی به ترتیب ۳۴ و ۳۸ محاسبه شده است (جدول ۴-۴). همچنین میزان جذب ۰،۱ درصد از محلول این پروتئین در آب در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشانگر غلظت ۱ گرم بر لیتر خواهد بود. بعلاوه میزان شاخص ناپایداری برای این پروتئین ۳۴،۶۷ محاسبه شده است و در نتیجه این پروتئین جزو پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی می‌شود. میزان شاخص آلیفاتیک برای این پروتئین نیز ۹۰۶۲ بدست آمده است.

جدول (۴-۴) میزان و نوع اسیدهای آمینه موجود تشکیل دهنده توالی D8AA

اسید آمینه	تعداد در توالی آمینواسیدی	درصد
Ala	۴۳	٪۹/۶
Arg	۱۸	٪۴
Asn	۲۱	٪۴/۷
Asp	۲۱	٪۴/۷
Cys	۸	٪۱/۸
Gln	۱۶	٪۳/۶
Glu	۱۳	٪۲/۹
Gly	۲۴	٪۵/۳
His	۲۲	٪۴/۹
Ile	۲۰	٪۴/۵
Leu	۵۱	٪۱۱/۴
Lys	۲۰	٪۴/۵
Met	۷	٪۱/۶
Phe	۳۳	٪۷/۳
Pro	۱۸	۴
Ser	۲۶	۵/۱۸
Thr	۲۴	٪۵/۳
Trp	۱۶	٪۳/۶
Tyr	۱۸	٪۴
Val	۳۰	٪۶/۷
Pyl	۰	۰
Sec	۰	۰

نتایج آنالیز توالی آمینواسیدی XP_013648448.1 توسط نرم‌افزارهای TMHMM و Phobius (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) و (<http://phobius.sbc.su.se/index.html>) به‌منظور بررسی نحوه قرارگیری پروتئین نسبت به غشاء باعث مشخص شدن ۴ بخش transmembrane با احتمال ۱۰۰ درصد و یک transmembrane با احتمال ۹۰ درصد برای این توالی گردید. با توجه به داده‌های بدست آمده بازه ۱ تا ۱۱۱ توالی آمینواسیدی این پروتئین داخل سلول، ۱۱۲ تا ۱۳۴ داخل غشاء، ۱۳۵ تا ۱۳۷ خارج از سلول ۱۳۸ تا ۱۶۰ داخل غشاء، ۱۶۱ تا ۱۷۲ داخل سلول، ۱۷۳ تا ۱۹۵ داخل غشاء، ۱۹۶ تا ۲۵۲ خارج از سلول، ۲۵۳ تا ۲۷۵ داخل غشاء، ۲۷۶ تا ۲۸۶ داخل سلول، ۲۸۷ تا ۳۰۹ داخل غشاء و ۳۱۰ تا ۴۴۹ در خارج از سلول قرار می‌گیرد (شکل ۴-۵). با این وجود همان‌طور که در فصل اول گفته شد در ساختار دسچوراز های غشایی ۴ بخش transmembrane وجود دارد و در نتیجه انتظار بر این است که در ساختار D8AA نیز تنها ۴ بخش transmembrane پیش‌بینی شده با احتمال ۱۰۰ درصد وجود داشته باشد. همچنین در توالی آمینواسیدی این پروتئین هیچ بخش signal peptide یافت نشد. در نتیجه و بنا بر اطلاعات بدست آمده پروتئین D8AA یک پروتئین غشایی و فاقد فعالیت پیام‌رسان می‌باشد.

شکل (۴-۵) نحوه قرارگیری پروتئین XP_013648448.1 نسبت به غشاء سلول



همچنین انجام CD SEARCH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) برای توالی XP_013648448.1 به یافتن ۲ دومین اختصاصی (Delta6-FADS-like و Cyt-b5) و ۸ دومین غیراختصاصی منجر شد (جدول ۴-۵).

جدول (۴-۵) دومین‌های موجود در توالی XP_013648448.1

Domain name	Accession	Description	Interval
Delta6-FADS-like	cd03506	The Delta6 Fatty Acid Desaturase (Delta6-FADS)-like CD includes the integral-membrane enzymes	۱۴۳-۴۰۴
Cyt-b5	pfam00173	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain	۱۱-۸۲
PLN03199	PLN03199	delta6-acyl-lipid desaturase-like protein	۱۰-۴۲۶
PLN03198	PLN03198	delta6-acyl-lipid desaturase	۱۸-۴۲۹
FA_desaturase	pfam00487	Fatty acid desaturase	۱۴۰-۴۱۰
CYB5	COG5274	Cytochrome b involved in lipid metabolism	۳-۹۱
DesA	COG3239	Fatty acid desaturase [Lipid transport and metabolism]	۱۱۷-۴۲۰
PLN02252	PLN02252	nitrate reductase [NADPH]	۱-۹۱
Membrane-FADS-like	cd01060	The membrane fatty acid desaturase (Membrane_FADS)-like CD	۱۴۳-۲۱۶
Delta12-FADS-like	cd03507	The Delta12 Fatty Acid Desaturase (Delta12-FADS)-like CD	۱۲۳-۳۸۸

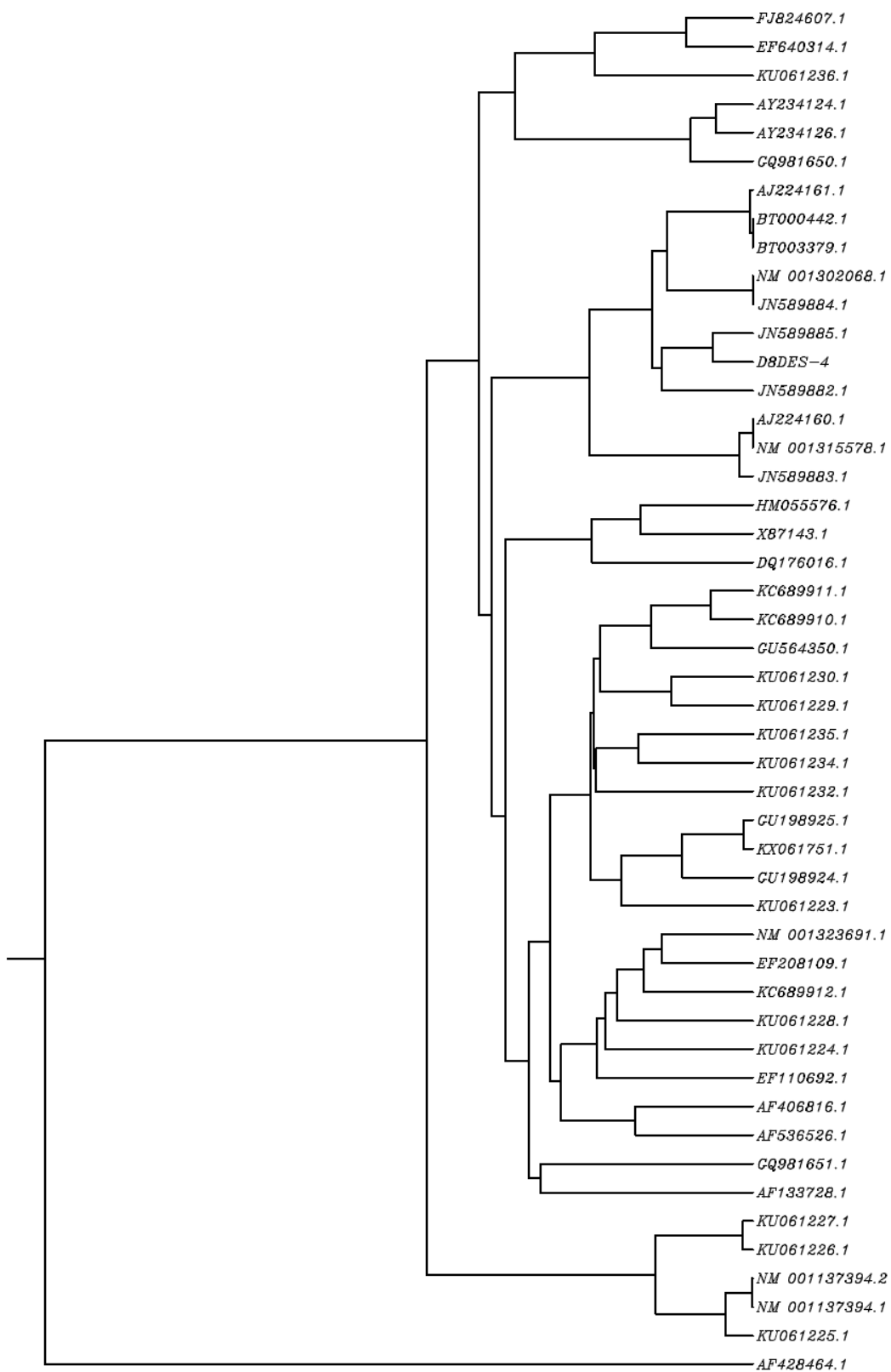
با توجه به نتایج بدست آمده حاصل از انجام CD SEARCH و دومین‌های مشخص شده برای توالی پروتئینی، همچنین نتایج TMHMM و Phobius می‌توان پروتئین D8AA را یک پروتئین غشایی دانست. همچنین با توجه به وجود ۷ دومین desaturase در این توالی، با احتمال بالایی انتظار فعالیت دسپورازی برای XP_013648448.1 متصور است. بعلاوه بنا بر وجود ۳ دومین delta-6 desaturase در

این توالی، امکان عملکرد دلتا-۶ دسچورازی بجای فعالیت دلتا-۸ دسچورازی و یا فعالیت توأم delta-6 desaturase و delta-8 desaturase برای این توالی پیش‌بینی می‌شود.

همچنین دو محل اتصال یون آهن در محل اسیدهای آمینه ۴۲ و ۶۵ در دومین cytochrome b-5 به‌عنوان محل فعال آنزیم، توسط نرم‌افزار (<http://prosite.expasy.org/>) prosite در این توالی پروتئینی تشخیص داده شد.

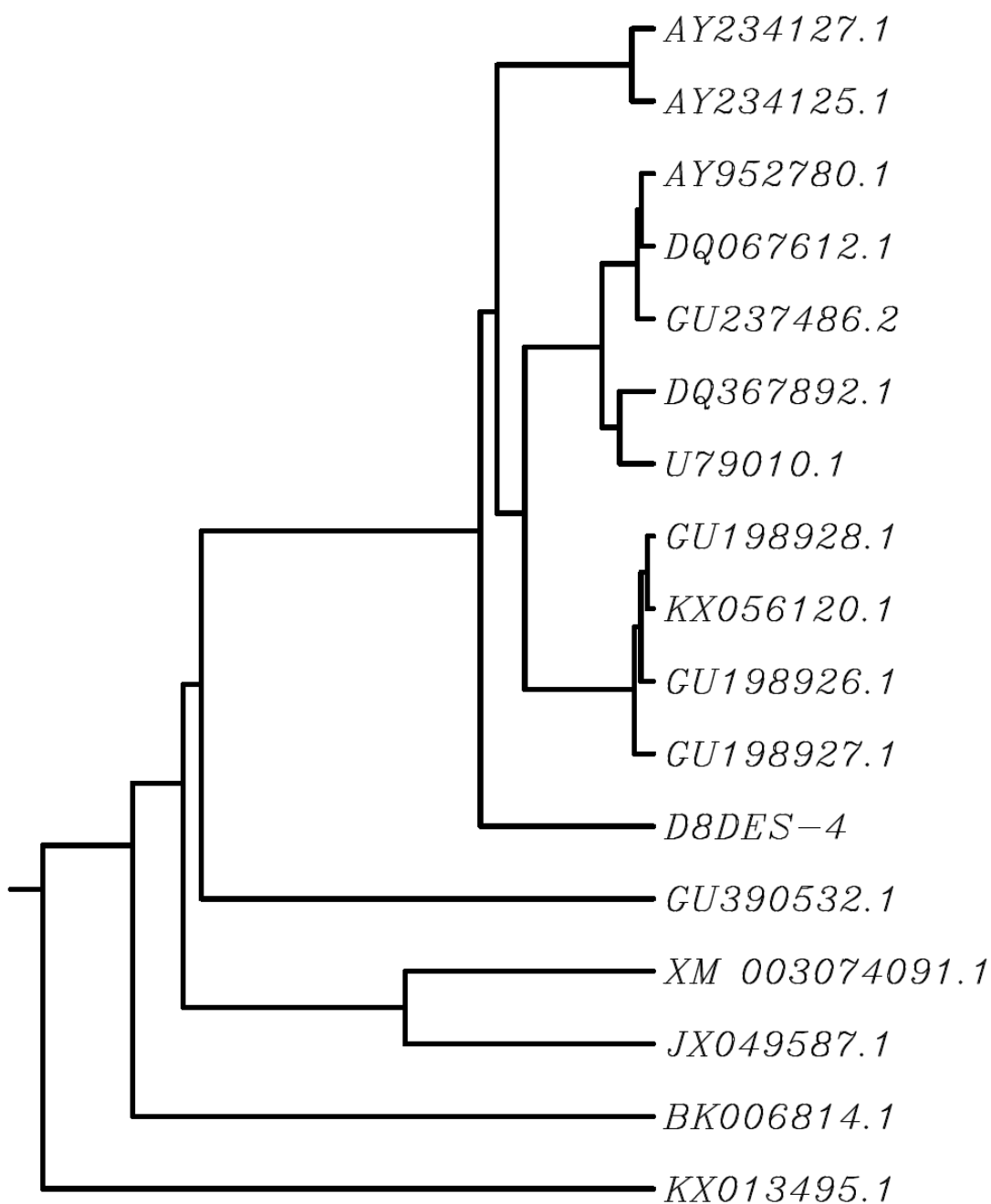
هم‌ردیف‌سازی ۴۷ توالی کدکننده آنزیم دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان *Nicotiana* *Arachis hypogaea* *Arabidopsis thaliana* *Primula farinosa* *Vernicia fordii* *Stylosanthes hamata* *tabacum* *Crepis alpina* *Primula nivalis* *Aquilegia vulgaris* *Primula vialii* *Ribes nigrum* *Ricinus* *Anemone leveillei* *Ribes mandshuricum* *Primula auricula* *Helianthus annuus* *Triticum* *Cucumis sativus* *Prunus persica* *Glycine max* *Brassica rapa communis* و *Borago officinalis* *Populus tomentosa* *Vitis vinifera* *Sorghum bicolor aestivum* *Jatropha curcas* با توالی D8DES و رسم درختچه فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) با استفاده از این توالی‌ها به رسم درختچه زیر منتهی شد (شکل ۵-۴). با توجه به درختچه رسم شده نزدیک‌ترین توالی از لحاظ فیلوژنتیک به توالی بدست آمده در این تحقیق، توالی JN589885.1 در *Brassica rapa* است. به‌علاوه پس از توالی JN589885.1 به ترتیب توالی‌های JN589882.1، JN589884.1 و NM_001302068.1 در *Brassica rapa* توالی‌های BT003379.1، BT000442.1 و AJ224161.1 در *Arabidopsis thaliana* توالی‌های AJ224160.1 و NM_001315578.1 در *Brassica napus* و توالی JN589883.1 در *Brassica rapa* بیشترین میزان نزدیکی فیلوژنتیک را به توالی D8DES نشان دادند. همچنین دورترین توالی با توالی D8DES به لحاظ فیلوژنتیک، توالی AF428464.1 در *Arabidopsis thaliana* است و پس از آن توالی KU061225.1 در *Sorghum bicolor*، توالی‌های NM_001137394.1 و NM_001137394.2 در *Zea mays* و توالی‌های KU061226.1 و KU061227.1 در *Triticum aestivum* دورترین توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه NCBI از لحاظ فیلوژنتیک نسبت به توالی D8DES است (شکل ۴-۶).

با توجه به اینکه *Brassica napus* از هیبریداسیون *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* به‌وجود آمده است و همچنین به لحاظ ژنتیکی شباهت زیادی با *Arabidopsis thaliana* دارد، نزدیکی فیلوژنتیک توالی‌های JN589885.1، JN589882.1، JN589884.1، NM_001302068.1، BT003379.1، BT000442.1، AJ224161.1، AJ224160.1، NM_001315578.1 و JN589883.1 به‌عنوان توالی‌های کدکننده ژن دلتا-۸ دسچوراز در *Brassica rapa* و *Arabidopsis thaliana* با توالی D8DES در *Brassica napus* به‌سادگی قابل توجیه است.



شکل ۴-۶: درختچه فیلوژنتیک برای توالی‌های ثبت‌شده ژن دلتا-۸ دسچوراز در گیاهان مختلف و توالی D8DES

همچنین توالی D8DES با توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز ثبت‌شده در پایگاه ncbi نیز مورد هم‌ردیف‌سازی چندگانه قرار گرفت و درختچه فیلوژنتیک بر اساس شباهت این توالی و توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز ثبت‌شده نیز رسم گردید (شکل ۴-۷). نتیجه جالب بدست آمده حاصل از رسم این درختچه نیز شباهت بالای توالی D8DES با توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز ثبت‌شده بود. در نتیجه با در نظر گرفتن نتایج حاصل از رسم درختچه فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز و همچنین وجود چندین دومین دلتا-۶ دسچوراز در این توالی احتمال فعالیت دلتا-۶ دسچورازی برای این توالی را بالا می‌برد.



شکل ۴-۷: درختچه فیلوژنتیک رسم شده بر اساس شباهت توالی‌های کدکننده دلتا-۶ دسچوراز در گیاهان و ریز جلبک‌ها با توالی D8DES

(KX013495.1, *Chlamydomonas* sp.; KX056120.1, *Ribes mandshuricum*; GU390532.1, *Lobosphaera incise*; XM_003074091.1, *Ostreococcus tauri*; U79010.1, *Borago officinalis*; DQ067612.1, *Echium sabulicola*; GU198926.1, *Ribes nigrum*; GU198927.1, *Ribes nigrum*; GU198928.1, *Ribes nigrum*; JX049587.1, *Chlamydomonas* sp.; DQ367892.1, *Nonea caspica*; GU237486.2, *Echium amoenum*; BK006814.1, *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901; AY234125.1, *Primula farinose*; AY234127.1, *Primula vialii*; AY952780.1, *Echium plantagineum*)

نتیجه گیری

با توجه به داده‌های بدست آمده حاصل از BLAST توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز سایر گیاهان علیه ژنوم کلزا که هیچ توالی مشابهی در ژنوم کلزا با این توالی‌ها یافت نشد. همچنین نتایج حاصل از BLAST پرایمرهای طراحی شده بر اساس نواحی حفاظت شده توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز علیه ژنوم کلزا که قادر به تکثیر هیچ ناحیه‌ای از ژنوم کلزا نبودند. به علاوه داده‌های بدست آمده از آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن بذور کلزا که نشانگر عدم وجود اسیدهای چرب STA و ETA در محتوای روغنی بذر کلزا بود، و در نهایت عدم تکثیر توالی طی فرآیند زنجیره‌ای PCR توسط پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر توالی‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز، می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز توسط ژنوم این گیاه کد نمی‌شوند و استفاده از مسیر دلتا-۶ دسچوراز برای تولید اسیدهای چرب امگا-۳ در گیاه کلزا وجود ندارد.

از طرفی با توجه به این پیش فرض که تاکنون هیچ توالی کدکننده دلتا-۹ الانگاز در گیاهان یافت نشده است و همچنین با استناد به نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی روغن کلزا که در آن اسید چرب n-20:3 که فرآورده عمل آنزیم دلتا-۹ الانگاز بر روی آلفا-لینولنیک اسید است، مشاهده نشد می‌توان استنباط کرد آنزیم دلتا-۹ الانگاز نیز همانند آنزیم‌های دلتا-۶ دسچوراز و دلتا-۶ الانگاز توسط ژنوم کلزا کد نمی‌شود.

در نهایت با توجه به تکثیر باند با طول مورد انتظار توسط پرایمرهای طراحی شده بر اساس نواحی حفاظت شده توالی دلتا-۸ دسچوراز در سایر گیاهان و نتایج توالی‌یابی قطعه بدست آمده و مقایسه آن با توالی‌های موجود از ژنوم کلزا در پایگاه NCBI می‌توان ادعا کرد که ژن دلتا-۸ دسچوراز در ژنوم کلزا وجود دارد و بیان می‌شود. همچنین با توجه به اینکه انجام واکنش زنجیره‌ای PCR با استفاده از هر دو نمونه‌ی cDNA تولید شده بر اساس RNA استخراجی و DNA استخراجی از کلزا، به عنوان الگو قادر به تکثیر توالی با طول ۱۱۰۰ باز بودند. همچنین توالی‌یابی قطعات تکثیر شده حاصل از DNA و cDNA به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای PCR نشانگر تکثیر توالی بود. در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که همان‌طور که در فصل اول ذکر شد توالی دلتا-۸ دسچوراز فاقد اینترون می‌باشد.

پیوست‌ها

جدول ۱ پیوست: میزان و نوع اسیدهای چرب موجود در محتوای روغنی نخل، کلزا، کتان، آفتابگردان، زیتون، سویا و گل‌گاوزبان (Matthew R. Miller et al. 2008)

	Palm oil*	Rapeseed oil†	Linseed oil‡	Sunflower-seed oil§	Olive oil	Soya oil¶	Echium oil
SFA	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total SFA	46.7	4.7	6.3	6.4	10.8	9.7	7.5
C12:0	5.2	2.1	5.1	4.1	3.3	3.5	3.6
Other SFA	0.3	0.6	0.0	1.5	0.6	0.2	0.0
Total SFA	53.5	7.4	11.4	12.0	14.6	13.4	11.2
C18:1n-7c	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.0
C18:1n-9c	33.8	58.3	18.3	25.3	75.4	22.5	17.2
C18:1n-7c	1.3	4.3	1.3	2.0	2.5	1.8	1.0
C18:1n-9	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
Other MUFA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
Total MUFA	35.1	63.7	19.6	27.2	78.6	25.0	19.9
C18:3n-3	0.0	7.3	53.3	0.0	0.0	6.4	28.1
C18:4n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.4
C18:4n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:5n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:5n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:6n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Other n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total n-3	0.0	7.3	53.3	0.0	0.0	6.4	39.6
C18:2n-6	11.4	21.6	15.7	60.7	6.8	55.2	19.5
C18:3n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.8
C18:3n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:5n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Other n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total n-6	11.4	21.6	15.7	60.7	6.8	55.2	29.3
C18:3n-6	0.0	0.3	3.4	0.0	0.0	0.1	1.3

پیوست ۲: تکرارهای مختلف از توالی تکثیرشده توسط PCR

<D8D1_6156_D8Des

ANGNANGNNACTCTGGCTGANCCAGGCAAGTCGGNTAAATCCTGGCACAGT
TGGCCAANCGNCGCAAACNCGTTCAAAGCTTCCACCCCGGAACCGCGTGG
CACCACCTCGACNACCTCTTACCCGGCTACCACGTCAGCGACTTCCAAGCCT
CCGAAGTCTCCCGCGATTACCGCCGCATGGCCGCCGAGTTTCGCAAACCTCG
GCCTATTCGAAAACAAAGGCCNCGTCACTCTCTACACCTTATCCTTCGTTCGC
CGCCATGTTCCGCCCGCTTCTCTACGGCGTTCCTCGCCTGTACTTCGCTCCTCG
CTCACANATCGCGGCCGCNATACTCGGACTGNTATGGATCCANAGCGCGT
ACATCGGCCACGACTCTGGACATTACGTCNTCATGACNAACAAATCTTATA
ACAGATTCNCTCACCTTCTCTCCGGTAACTGCCTAACGGGAATCTCGATCGC
GTGGTGGAAATGGACTCACAACGCGCATCNCCTCNGTGTAACAGCCTCGA
TTACNATCCCGATCTGCANCACATCCCCNTGTTTGCAGNCTCCGCCAAGTTC
TTCAACTCCATGACGTCGCGGTTCTACNATAGGAACTCGCTTTCNATCNCT
TGGCGAGGCTCTTGATCNCTTNCAGCACTTCACTTACTACCCGGTTCNTGTG
CTTCGGGAGAANCANCTGTTTGTGCAAACGCTCCTCCTCCTCTTCNCCAGC
GCGAGGTTCCNGATCGCGCGCTAAACTTCNNCNGAATCTTGNNGTCTGGA
CTTGNNTCCCGTTCGTNTTTCCTGCTTACNGACATGNCCGGAGAGATTCTTC
TTCGTCTTACNANCCTTCANTGNTACGGCGCTTCAGNATATANAATTCACG
CTTAACCATTTTCNNTGCTGATGNGTACGNGGGCCCGCCACCGGGGGGAGA
CTGGNTTCGAGAAGNAGGCGGGGNGAACGTTGGATATCTCNGGTAGTTTCGA
NATGGNATGGGTTCTTCNGTGNNGTTGCNNTTTCANCTCAAGCACCNTTTT
GTTCCGAAGCTGCCGCGTTGNCATTTGCGAAANGGGCNCNGGGGGNTCAG
GAAGCTTNGCAAGANCNATAACCTTNCNAAAAGAAGTTAAT

D8D2_6156_D8Des<

CNNANGNNGACTCTGGCTGATCAGGCAAGTCTGGGTAAATCCTGGCAAAGT
TGACNTAAANCGNNGGAAACGCGACCAAAGCTTTCCTCCCCGGAACCGNGTG
GCANCACCTCGACAACCTCTTACCCGGCTACCACGTCAGCGACTTCCAAGCC
TCCGAAGTCNCCCGCGATTACCGCCGCATGGNCGCCNAATTCNCAAACCTC
GGCCTATTCGAAAACAAAGGCCACGTCACCTCTCTACACCTTATCCTTCGTTCN
CCGCCATGTTCCGCCCGCTTCTCTACGGCGTTCCTCGCCTGTACTTCGCTCCTC
GCTCACAGATCGCGGCCGCGATACTCGGACTGTTATGGATCCAGAGCGCG
TACATCGGCCACGACTCTGGACATTACGTCATCATGACGAACAAATCTTATA
ACAGATTCGCTCAGCTTCTCTCCNGTAACTGCCTAACGGGAATCTCGATNGC
GTGNTGGAAATGGACTCACAACGCGCATCACCTCGCGTGTAACAGCCTCGA
TTACNATCCCGATCTGCANCACATCCCCGTGTTTGCAGTCTCCGCCAAGTTC
TTCNACTCCATGACGTCGCGGTTCTACGATAGGAACTCGCTTTCNATCCCT
TGGCGAGGCTCTTGATCAGTTACCAGCACTTCACTTACTANCCGGTCATGTG
CTTCGGGAGAATCAACCTGTTTGTGCAAACGCTCCTCCTCCTCTTCTCCAAG
CGCGAGGTTCCGGATCGCGCGCTAAACTCGCCGGAATCTTGGTGTTCGAC
TTGGTTCCCGCTCTTGGTTTTCTGCTTACCGACTTGNCCNGAGAGATTCTTC
TTTCGTCTTCANTANCTTCNTGTTACGGCGCTTCANCATATANAATTCACGC
TTAATCATTTTCNNTGCTGATGNGACGTGGGGCCGCCACNGGGGGGAGACT
TGGTTCGANAAGCAGGCGCGGGACGTTGGAAATNNCGGNAGTCGTATAGG
NTTGGGTTCTTCGGGGGTTGCGTTTCACTCGAGCACCNNTTGTTCCTCAAGGC
TGGCCGCGTGNNCATTTCGCGGAANANGGTTCCG

D8D3_6156_D8Des<

CGGACNNTNTGTCTCTCTTNNNNGNGGCCAGCGTCGGTCGCGCTGGCGTCT
GGTGTATTCATAGTGGATTGGTTCTTTGGTGGGTTAGCGTTTCGGCTCAAGC
ATCATTTGTTCCCTACGCTGCCACGTTGCCATCACANGAAAGTGTCTCCTGT
GGTTCAAGAGCTTTGCAAGAAGCATACTCTTAANTATANGAGTCTTTCCTGG
TGGGAGGCTAATGTGTGGACCATTANGACTTTGAANAAAGCTGCTTATCAA
GCTAGAGATGCTGCTAATCCTGTGGTTAAGAACTTGGTTTGGGAAGCTTTGA
ATACTCATGGCTAAAATACTCNGCCTCCTCTGGATGCAGAGCGCGTACATTG
GCCATGACTCGGGGCATTACGTCATCATGAAGAACAAGTCGTACAACAAGT
TCGCTCANCTTCTCTCCGGCAACTGCATCACCGGGATCTCCATCGCGNGNTG
GAAGTGGACCCNCAACGCTCATCACCTCTCTTGNAACAGCCTCNACTACGA
TCCCGACGTGCAGCACATCCCTGTCTTCGCCGTGTCCTCCAAGTTCTTTAACT
CCATGACGTCACGTTTCTANGATCGGAAGCTCACGTTTGATCCGCTCGCGAG
GTTTTTNNTAAGCTACCANCATTTTACTTATTACCCGGTGATGTGTTTCGNG
AGGATCANCCTTTTTATCCAAACNTTCTTCTCCTCTTCTCNAAGCGTGAGTT
CCCCGACCGNGCTCTCAACTTANCTGGATCTTTGGTGTCTCTGGACGTGGTN
CCNGNTCTTGGTCTATTGTCCTCCCATCTTGACTGAGAGAATCNTTCTTCTC
TTGACGAGCTNCACNGTCACGGCGCTTCCACATATTCAATTCANNCTTTACC
ATTTATGCGNTGAAGNCTACNTGGATCCACCNACGGGCAACNANTGGTTTCG
AGAACCAACCGCCGGGACGCTNNGANATCTNTGTACTTCCTACATGGAATG
GGTTCTTGGTGNGTTACTGTTTCANTCNANCATCATNNGGTTCTAAGGCNG
CCNNTTGNCCANCTTAGNNAANTAGTCCTCCTGGNGGTNTCAGACNCTTG
T

پیوست ۳: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی کد کننده دلتا-۶ دسچوراز

توالی پرایمر	نام پرایمر
GGCAAAGACGCCACGGACGTT	FDes1
CTGGTGGGAAGAGCAAGCACAACGC	NFDes1
GCTTGTGGCACAGCTCCATGATGG	RDes1
GGGTGGTCAAGACGTTACAGATGC	FDes2
GGCACTATCGTGACAGGTTCTCTA	NFDes2
CCTCAGCCATAGGTGTTGACAGCT	RDes2
GGACCTATGGATCTCGGTTTCAGGG	FDes3
GATAGCTCACTCCTGAATCTGGGT	NFDes3
TGCTCTAGTTGGAAGTGCAGTGC	RDes3

پیوست ۴: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی کد کننده دلتا-۶ لانگاز

توالی پرایمر	نام پرایمر
CGTGCTGGCCTATCTGCTGATTGT	FE6.1
CCATGTACACCACCAGCAGCTGGG	RE6.1
ATGGCATTGACGGCGGCCTG	FE6.2
GTACGTGTACATGCACACGTGCACC	RE6.2

پیوست ۵: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی کد کننده دلتا-۸ دسچوراز

توالی پرایمر	نام پرایمر
GGCGGAGAAGAAGAAGTAC	FD8.1
TGGGTATTCAAAGCTTCCC	RD8.1
GCGATCCAAGGCAAAGTCTAC	FD8.2
TTAGCCATGAGTATTCAAAGC	RD8.2

پیوست ۶: توالی های دلتا-۸ دسچوراز استفاده شده جهت رسم درختچه فیلوژنتیک (شکل ۴-۵)

گیاه یا ریز جلبک دارای ژن	کد دسترسی
<i>Arachis hypogaea</i>	FJ824607.1
<i>Stylosanthes hamata</i>	EF640314.1
<i>Glycine max</i>	KU061236.1
<i>Primula farinose</i>	AY234124.1
<i>Primula vialii</i>	AY234126.1
<i>Primula nivalis</i>	GQ981650.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ224161.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BT000442.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BT003379.1

<i>Brassica rapa</i>	NM_001302068.1
<i>Brassica rapa</i>	JN589884.1
<i>Brassica rapa</i>	JN589885.1
<i>Brassica rapa</i>	JN589882.1
<i>Brassica napus</i>	AJ224160.1
<i>Brassica napus</i>	NM_001315578.1
<i>Brassica rapa</i>	JN589883.1
<i>Helianthus annuus</i>	HM055576.1
<i>Helianthus annuus</i>	X87143.1
<i>Crepis alpina</i>	DQ176016.1
<i>Populus tomentosa</i>	KC689911.1
<i>Populus tomentosa</i>	KC689910.1
<i>Vernicia fordii</i>	GU564350.1
<i>Prunus persica</i>	KU061230.1
<i>Prunus persica</i>	KU061229.1
<i>Glycine max</i>	KU061235.1
<i>Glycine max</i>	KU061234.1
<i>Cucumis sativus</i>	KU061232.1
<i>Ribes nigrum</i>	GU198925.1
<i>Ribes mandshuricum</i>	KX061751.1
<i>Ribes nigrum</i>	GU198924.1
<i>Vitis vinifera</i>	KU061223.1
<i>Ricinus communis</i>	NM_001323691.1
<i>Jatropha curcas</i>	EF208109.1
<i>Populus tomentosa</i>	KC689912.1

<i>Prunus persica</i>	KU061228.1
<i>Vitis vinifera</i>	KU061224.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	EF110692.1
<i>Aquilegia vulgaris</i>	AF406816.1
<i>Anemone leveillei</i>	AF536526.1
<i>Borago officinalis</i>	AF133728.1
<i>Triticum aestivum</i>	KU061227.1
<i>Triticum aestivum</i>	KU061226.1
<i>Zea mays</i>	NM_001137394.1
<i>Zea mays</i>	NM_001137394.2
<i>Sorghum bicolor</i>	KU061225.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF428464.1

Alabdulkarim, B., Z. A. N. Bakeet and S. Arzoo (2012). "Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health." *Journal of King Saud University - Science* 24(4): 319-329.

Amir Hossein, S. R. and Z. Peiman (2012). "Comparison of Winter and Spring Rapeseed Cultivars Considering Their Oil Content and Fatty Acid Composition." *American-Eurasian J. Agric. & Environ* 12(6): 775-780.

Antonio J. Moreno-Pérez, E. M.-F., Rafael Garcés, Joaquín J. Salas (2011). "Sphingolipid base modifying enzymes in sunflower (*Helianthus annuus*): Cloning and characterization of a C4-hydroxylase gene and a new analogous delta 8-desaturase gene." *Journal of Plant Physiology* 168: 831–839.

Arterburn, L. M., E. B. Hall and H. Oken (2006). "Distribution, interconversion ,and dose response of n-3 fatty acids in humans." *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl): 1467s–1476s.

Baoxiu Qi, T. F., Sam Mugford, Gary Dobson, Olga Sayanova, Justine Butler, Johnathan A Napier, A Keith Stobart & Colin M Lazarus (2004). "Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants." *NATURE BIOTECHNOLOGY* 22: 739-745.

Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.

Breivik, H. (2007). *Long-chain Omega-3 Specialty Oils*, Oily Press.

Dick, M. F., J. Hurford, S. Lei, A. M. Mustonen, P. Nieminen and K. Rouvinen-Watt (2014). "High feeding intensity increases the severity of fatty liver in the American mink (*Neovison vison*) with potential ameliorating role for long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids " *Acta Vet Scand* 56: 5.

Din, J. N., D. E. Newby and A. D. Flapan (2004). "Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment." *BMJ* 328(7430): 30-35.

Dyerberg, J., H .O. Bang and N. Hjerne (1975). "Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos." *Am J Clin Nutr* 28(9): 958-966.

Fu, Y., K. Lu, L. Qian, J. Mei, D. Wei, X. Peng, X. Xu, J. Li, M. Frauen, F. Dreyer, R. J. Snowdon and W. Qian (2015). "Development of genic cleavage markers in association with seed glucosinolate content in canola." *Theor Appl Genet* 128(6): 1029-1037.

Harper, C. R. and T. A. Jacobson (2001). "The fats of life: The role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease." *Archives of Internal Medicine* 161(18): 2185-2192.

Huang, Y. S., S. L. Pereira and A. E. Leonard (2004). "Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids." *Biochimie* 86(11): 793-798.

- Shaimaa R. M. Khalil, Basita A. Hussein, Ebtissam H. A. Hussein, Mohamed S. Tawfik (2015). "Establishment of effective regeneration system in Egyptian-dapted canola var. pactol." *Journal of Biotech Research* 6: 35-42.
- Kinney, H. G. D. A. J. (2007). "Engineering oilseed plants for a sustainable, land-based source of long chain polyunsaturated fatty acids." *Lipids* 42(3): 179-185.
- Kinney, H. G. D. A. J. (2008). "Engineering oilseeds to produce nutritional fatty acids." *Physiol Plant* 132(1): 1-10.
- Li, S. F., L. Y. Song, W. B. Yin, Y. H. Chen, L. Chen, J. L. Li, R. R. Wang and Z. M. Hu (2012). "Isolation and functional characterisation of the genes encoding delta(8)-sphingolipid desaturase from *Brassica rapa*." *J Genet Genomics* 39(1): 47-59.
- Logan, A. C. (2003). "Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression." *Altern Med Rev* 8(4): 410-425.
- López Alonso, D., F. García-Maroto, J. Rodríguez-Ruiz, J. A. Garrido and M. A. Vilches (2003). "Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases." *Biochemical Systematics and Ecology* 31(10): 1111-1124.
- Martins, D. A., L. Custodio, L. Barreira, H. Pereira, R. Ben-Hamadou, J. Varela and K. M. Abu-Salah (2013). "Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae." *Mar Drugs* 11(7): 2259-2281.
- Matthew R. Miller, P. D. N. a. C. G. C. (2008). "n-3 Oil sources for use in aquaculture – alternatives to the unsustainable harvest of wild fish." *Nutrition Research Reviews* 21: 85-96.
- Michaelson, L. V., Longman, A.J., Sayanova, O., Stobart, A.K., Napier, J.A., (2002). "Isolation and characterization of a cDNA encoding a D8 sphingolipid desaturase from *Aquilegia vulgaris*." *Biochemical Society Transactions* 30: 1073-1075.
- Parker, G., N. A. Gibson, H. Brotchie, G. Heruc, A. M. Rees and D. Hadzi-Pavlovic (2006). "Omega-3 fatty acids and mood disorders." *Am J Psychiatry* 163(6): 969-978.
- Petrie, J. R., P. Shrestha, X. R. Zhou, M. P. Mansour, Q. Liu, S. Belide, P. D. Nichols and S. P. Singh (2012). "Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA." *PLoS One* 7(11): e49165.
- Shu-Fen Li, G. J. Z., Xue-Jin Zhang, Jin-Hong Yuan, Chuan-Liang Deng, Zan-Min Hu, Wu-Jun Gao (2016). "Genes encoding Δ 8-sphingolipid desaturase from various plants: identification, biochemical functions, and evolution." *J Plant Res* 129: 979–987.
- Sperling, P., B. Libisch, U. Zähringer, J. A. Napier and E. Heinz (2001). "Functional Identification of a Δ 8-Sphingolipid Desaturase from *Borago officinalis*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 388(2): 293-298.
- Vollmann, J. and I. Rajcan (2009). *Oil Crops*, Springer New York.
- Vrinten, P., G. Wu, M. Truksa and X. Qiu (2007). "Production of Polyunsaturated Fatty Acids in Transgenic Plants." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 24(1): 263-280.

Wallis ,J. G. and J. Browse (1999). "The Δ 8-Desaturase of *Euglena gracilis*: An Alternate Pathway for Synthesis of 20-Carbon Polyunsaturated Fatty Acids." Archives of Biochemistry and Biophysics 365(2): 307-316.

Abstract

Plants can be used as sources for the production of omega-3 fatty acids, and this process is possible by genetic engineering of plant to have genes that encoding this biosynthetic pathway enzymes. Rapeseed can be a good candidate for research on the vegetable production of omega-3 fatty acids, given the high percentage of oil present in the seed, as well as the natural level of omega-3 fatty acids to omega-6 fatty acids in oil.

Despit that the common pathway for production of omega-3 is delta-6 desaturase pathway, this research with the goal of generating genetic data about enzymes that might be use for the production of omega-3 in canola was done. At first, Oil samples of rapeseed were extracted and using the method of gas chromatography, the type and amount of different fatty acids found in rapeseed oil were determined, then bioinformatics studies was done by comparing the sequences encoding the delta-6 desaturase and delta -6 elongase genes in other plant with the sequence of rapeseed genome. Subsequently, according to the results of bioinformatics studies, which resulted in no similar sequences encoding the delta-6 desaturase and delta-6 elongase genes in the rapeseed genome, the existence of genes encoding the delta-9 elongase pathway for the production of fatty acids omega-3 was examined in the rapeseed genome. Comparison of sequences encoding delta-9 elongase and delta-8 desaturase genes in databases with rapeseed genome resulted in detect of a series of sequences with similarity to delta-8 desaturase. consequently, with the comparison of different sequences encoding the delta-8 desaturase gene in plants, protected gene sequences of this gene were identified and used to design non-specific primers. RNA were extracted from leaf and seed tissues of rape and after cDNA synthesis, using the designed primers, Delta-8 desaturase sequence in the rapeseed genome were amplified. after electrophoresis and confirmation of expected length the amplified sequence were extracted from agarose gel and cloned in TA vector. Then, this transgenic vector was transferred to *E. coli* DH5a strain and after blue-white screening and successfully confirming the cloning sequencing was confirmed. At the end, the obtained sequence was compared with other delta-8 desaturase encoding sequences and thus was identified as a unique sequence.

Keywords: omega-3, canola, delta-6 desaturase, delta-6 elongase, delta-9 elongase, delta-8 desaturase



Shahrood University of Technology

Faculty of Agricultural

**M.sc. Thesis in Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural
Products**

**Sequencing and cloning of two genes involved in the biosynthesis of
Omega-3 in Rape**

By: Reza moshtaghi

Supervisors:

Naser farokhi- Bibi-fatemeh kalalinia

July 2017