ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٦١٦ - ٦٠٧

جداسازی و همسانه‌سازی ژن ۳-هیدروکسی۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیم A ردوکتاز از گیاه رازیانه (*Foniculum Vulgar*)

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

کژوان ساعد موچشی[۱]، علی ایزدی دربندی*[۱]، حسین رامشینی[۱]

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

Saed Mocheshi K[1], Izadi-Darbandi A*[1], Ramshini H[1]

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/٦/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۱۲/۱۳)

چکیده

در گیاهان ترکیبات ایزوپرنوئیدی توسط دو مسیر مستقل، شامل مسیر موالونات (MVA) و مسیر ۲-C-متیل-D-اریترول ٤-فسفات (MEP) سنتز می‌شوند. این فرآورده‌ها برای رشد و نمو طبیعی گیاه و واکنش آن‌ها در برابر تنش‌های زیست‌محیطی مورد نیاز است. اولین مرحله در مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدهای گیاهی، تبدیل ۳-هیدروکسی۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیم^{A} (HMG-COA) به موالونات است؛ که توسط آنزیم ۳-هیدروکسی۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیمA ردوکتاز (*HMGR*) انجام می‌شود. در این تحقیق پس از تعیین نواحی حفاظتی ژن‌های هم‌خانواده آن،آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این ژن طراحی شد. ژن *HMGR* از اکوتیپ ساری گیاه رازیانه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌دست آمد و فراورده حاصل از طریق همسانه سازی TA تکثیر شد. تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتید (BLASTn) توالی تکثیرشده، نشان داد که این فرآورده مشابهت زیادی با سایر *HMGR* های گیاهی، به‌خصوص ۳-هیدروکسی۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیمA ردوکتاز گیاه آب قاشقی دارد. توالی تکثیرشده ژن *HMGR* در گیاه رازیانه دارای طولی برابر با ١٦٦١ جفت‌باز است و ناحیه رمز کننده‌ای به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز (دارای دو دمین گذرنده و یک دمین کاتالیزوری) را شامل می‌شود. ناحیه ORF این توالی، رمزکننده‌ی قطعه پروتئینی به طول ۵۵۳ اسیدآمینه با جرم مولکولی حدود ۵۹/۸۱٦ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/٤۰ بود. مدل‌سازی مولکولی توالی با استفاده از سرور Swiss Model نشان داد که توالی تکثیر شده، یک نوع جدید *HMGR* است که دارای یک ساختار فضایی شبیه به دیگر *HMGR*های گیاهی است و دارای تمامی دمین‌های ساختاری و کارکردی می‌باشد. با دسترسی به توالی این ژن در رازیانه، امکان بررسی الگوی بیان آن در اندام‌های مختلف، تعیین پلی مورفیسم آن در جمعیت‌های این گیاه و تولید سازه بیانی جهت انتقال ژن وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

همسانه‌سازی
ژن ۳-هیدروکسی۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز
ایزوپرنوئید
رازیانه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

مقدمه

دو گروه اساسی از متابولیت‌ها در گیاهان شامل متابولیت‌های اولیه[1] و متابولیت‌های ثانویه[2] می‌باشد (Hartmann 1996). متابولیت‌های اولیه در واکنش‌ها و فرآیندهای اصلی شرکت می‌کنند اما متابولیت‌های ثانویه در برهمکنش بین گیاهان و محیط‌زیست دخالت دارند (Croteau et al. 2000). ایزوپرنوئیدها، ترکیباتی هستند که در تنفس و فتوسنتز، تبادل سیگنال بین گیاهان و محیط زیست، دفاع در برابر پاتوژن، تقسیم سلولی و تنظیم رشد، کارکرد غشاء و بیوسنتز غشاء نقش دارند (Caelles et al. 1989; Bach 1995). ترکیبات ایزوپرنوئیدی (حدود ۳۰،۰۰۰ ترکیب شناخته‌شده) و مشتقات پنج‌کربنی آن‌ها (ایزوپنتیل‌فسفات[3] و ایزومر آن دی‌متیل‌آلیل‌فسفات[4]) به‌منظور سازگاری با محیط و زنده‌ماندن گیاهان در شرایط محیطی ضروری است (Wang et al. 2000; Bouvier et al. 2005; Nicotra et al. 2010). مسیر موالونات (MVA) اولین بار در سال ۱۹۵۰ کشف شد که در باکتری‌ها، گیاهان، حیوان‌ها و قارچ‌ها به‌عنوان پیش‌سازی برای واحد ایزوپرن پنج‌کربنی و همچنین تولید ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها مورد نیاز است (Newman and Chappell 1999). مسیر متیل اریترول فسفات (MEP)) تولیدکننده ماده ۲-C-متیل-D-اریتریتول-۴- فسفات در پلاستیدهاست که به‌عنوان یک منبع تولید مواد اولیه مونوترپن، دی‌ترپن و تتراترپن‌ها هستند (Bestoso et al. 2006; Roberts 2007). مسیر MVA مختص یوکاریوت‌ها و مسیر MEP مربوط به پروکاریوت‌ها است اما با این وجود در گیاهان و برخی از باکتری‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس‌اورئوس[5] و لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم[6]) هر دو مسیر فعال هستند. ۳-هیدروکسی۳-متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR) به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز موالونات مطرح است که از پیش‌ماده HMG-COAهای موجود در میتوکندری‌ها، پلاستیدها و سیتوپلاسم‌ها (در آرکوباکتری[7]ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوان‌ها) تولید می‌شود. HMGRها در حیوان‌ها توسط یک ژن اما در گیاهان توسط یک خانواده چندژنی رمزگذاری می‌شوند که در گیاهان ایزوآنزیم‌های مختلف در طول رشد و یا در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی دارای بیان متفاوت هستند (Croteau et al. 2000). مناطق کاتالیزوری HMGR از سه حوزه تشکیل شده است: (۱) یک دامنه N–ترمینال شامل دو تا هفت مارپیچ آلفای عبورکننده از غشاء (در پستانداران، حشرات و قارچ‌ها هفت عدد و در گیاهان دو عدد) است، (۲) دامنه بزرگ و مرکزی L که شامل یک موتیف[8] اتصال (EMPVGYV QIP HMG-COA(,TTEGCLVA و یک موتیف اتصال به NADPH (GTVGGGT) است و (۳) دامنه کوچک مارپیچ S شامل یک منطقه کاتالیزوری C-ترمینال (دارای توالی حفظ شده در بین گونه‌ها) با حدود ۴۰۰ اسیدآمینه است که یک جایگاه اتصال به NADP(H) شامل یک موتیف با توالی DAMGMNM در آن جای گرفته است (Ruiz-Albert et al. 2002 ;Wright et al. 1988). در گیاهان، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش بهره‌وری ایزوپرنوئیدها انجام شده‌است. با توجه به‌اینکه مطالعات گذشته ارتباط متقابل بین مسیر MVA و MEP را نشان داده است از این رو یک راهکار مشترک برای مهندسی سنتز ایزوپرنوئیدها، تمرکز بر افزایش جریان ماده و انرژی با استفاده از جداسازی ژن *HMGR* و مطالعه پیش بیان آن به‌منظور افزایش پیش‌ساز ایزوپنتیل‌پیروفسفات و دی‌متیل‌آلیل پیروفسفات است (Kanehisa et al. 2000; Hey et al. 2006; Munoz-Bertomeu et al. 2007). جداسازی و همسانه‌سازی توالی ژن *HMGR* از گیاه دارویی رازیانه، یک راهبرد ضروری در مهندسی فرایند تولید متابولیت‌های ثانویه مهم حاصل از این گیاه مانند آنتول، فنچون و لیمونن هستند.

مواد و روش‌ها

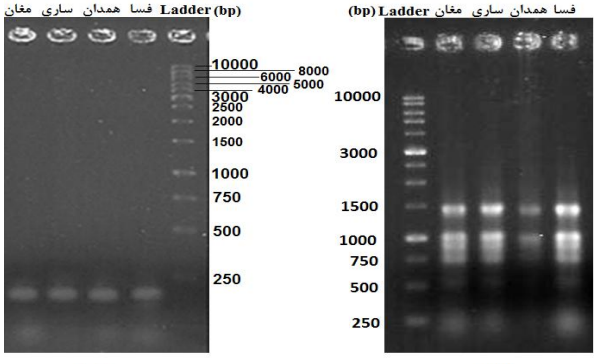
با توجه به اینکه بیش‌ترین تولید اسانس رازیانه و متابولیت‌های ثانویه در مرحله زایشی است (Bahmani et al. 2015) از این رو به‌منظور استحصال بیش‌ترین مقدار mRNA از بافت گیاه، تهیه

[1] First metabolites
[2] Secondary metabolites
[3] Isopentenyl pyrophosphate
[4] Dimethylallyl phosphate
[5] Staphylococcus aureus
[6] Lactobacillus plantarum
[7] Arcobacter
[8] *Motif*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

نمونه از بافت‌های گل‌آذین و برگ‌های گیاهان رازیانه موجود در مزرعه آزمایشی و در تیرماه (هم‌زمان با دوره گلدهی گیاه) صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ و گل‌آذین اکوتیپ[1] دیررس (اکوتیپ ساری)، میان‌رس (اکوتیپ مغان) و زودرس (اکوتیپ‌های فسا و همدان) گیاه رازیانه کشت‌شده در مزرعه پژوهشی سه ساله گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد (Izadi-Darbandi et al. 2013). پس از نمونه‌برداری، بافت‌ها توسط ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منجمد شده و سپس به فریزر ۷۰ - درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

به‌منظور استخراج RNA، ابتدا مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱ گرم از بافت برگ و گل‌آذین هر کدام از نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و سپس mRNA موجود در آن با استفاده از یک میلی‌لیتر عامل ترایزول[2] و طبق دستورالعمل کیت ترایزول (شرکت Invitrogen آمریکا) استخراج شد. قبل از استخراج RNA، همه شیشه‌آلات و معرف‌های مورد استفاده با استفاده از DEPC[3] ۰/۱ درصد (از قبل اتوکلاو شده) تحت تیمار قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اندازه‌گیری جذب نور UV در ۲۶۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر[4] (PerkinElmer Lamda 25) مشخص شد.



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

[1] *Ecotype*
[2] *Trizol*
[3] *Diethylpyrocarbonate*
[4] *Spectrophotometer*

هم‌چنین کیفیت mRNA توسط رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید[5] و الکتروفورز[6] در ژل آگارز[7] ۱ درصد در بافر تریس‌بورات EDTA (TBE[8]) با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت (قسمت الف شکل ۱).

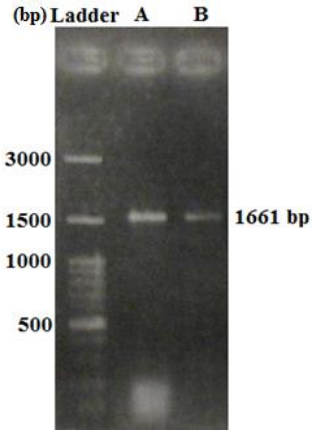
با توجه به اینکه هیچ گزارشی از توالی ژن *HMGR* رازیانه در بانک‌های اطلاعاتی وجود نداشت. بنابراین جهت تعیین نواحی حفاظت‌شده، هم‌ردیفی[9] توالی‌های mRNA ژن *HMGR* برگ قاشقی، جینسنگ آمریکایی[10]، سَنچی جینسینگ (جینسینگ کاذب)[11] و جینسنگ چینی[12] موجود در بانک اطلاعاتی NCBI[13] (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov)، توسط برنامه آنلاین ClustalW (Clustal Omega Multiple Sequence Alignment) به آدرس اینترنتی http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo انجام شد. در نهایت نقاط با بیش‌ترین میزان هم‌ردیفی به برنامه Primer3 به‌منظور طراحی آغازگر داده شد و سپس آغازگر برگشت با توالی ′5′CCAAGTAGGTTCAGGCATGC3 (TM = ۵۸/۹ °C) و آغازگر رفت با توالی ′5′ACTAACTGTCCCTCCCTCCT3 (TM = ۵۸/۹°C) طراحی شدند.

ساخت رشته اول cDNA از RNA استخراجی، با استفاده از آغازگرهای رفت و الیگو $dt_{18}A(T/C/G)$ و از طریق واکنش رونویسی معکوس[14] طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (ساخت شرکت سیناکلون ایران) انجام شد. جهت تایید تولید رشته اول cDNA از تکثیر ژن اکتین توسط آغازگرهای رفت (′5′GGTCGCACAACTGGTATTGTATTG3) و برگشت (′5′CTCAGCAGAGGTGGTGAACA3) استفاده شد (قسمت ب شکل ۱). تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگرهای طراحی‌شده (بر اساس نتایج هم‌ردیفی برای تکثیر ژن *HMGR* در سطح رونوشت) بر روی cDNA اکوتیپ ساری انجام شد (قسمت الف

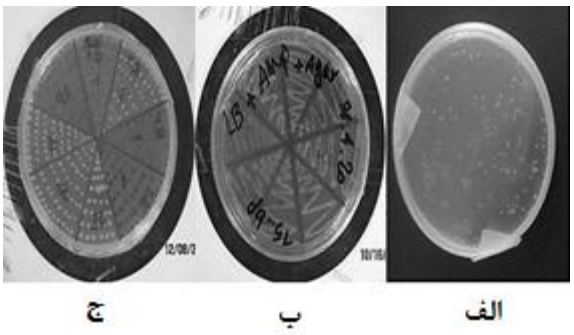
[5] *Ethidium bromide*
[6] *Electrophoresis*
[7] *Agarose gel*
[8] *Tris/Borate/EDTA*
[9] Alignment
[10] *Panax quinquefolius* (KT869137.1)
[11] *Panax notoginseng* (KJ804166.1)
[12] *Panax ginseng* (JX648390.1)
[13] National Center for Biotechnology Information
[14] Reverse transcription

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

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



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



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

ابتدا ژن تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و سپس برای توالی‌یابی ارسال شد. نمونه ارسالی دارای غلظت مناسب تعیین توالی نبود، بنابراین به‌منظور افزایش غلظت نمونه ارسالی و تسهیل توالی‌یابی (توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت پلاسمید تکثیری) از روش همسانه‌سازی TA استفاده شد. به‌منظور همسانه‌سازی فراورده تکثیر شده حاصل از RT-PCR ابتدا از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز به ناقل PTG-19 وارد شد و سپس به سلول‌های مستعد از باکتری اشرشیاکلی[1] سویه DH5α (قبلا توسط $CaCl_2$ تیمار شده) انتقال داده شد.

پس از انجام تراریختی[2] باکتری، همسانه‌های تراریخته[3] با کشت بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین[4] مشاهده شدند (قسمت الف شکل ۳). سپس هر کدام از تک کلون‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین واکشت شدند (قسمت ب شکل ۳). تک‌کلون‌های واکشت شده، بر روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، X-gal[5] و IPTG[6] کشت شد. یکی از ویژگی‌های ناقل، دارا بودن یک جایگاه چندگانه همسانه‌سازی در وسط ژن *Lac Z* است که باعث می‌شود در صورت ورود قطعه خارجی به درون جایگاه ژن *Lac Z*، ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز[7] غیرفعال شود. بنابراین غربالگری سلول‌های حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آن‌ها در ساخت آنزیم بتا گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد و درنتیجه کلونی‌های باکتریایی تراریخته به رنگ سفید و سلول‌های باکتری غیرتراریخته به‌صورت آبی ظاهر می‌شوند. (قسمت ج شکل ۳). بعد از اینکه استخراج پلاسمید[8] از تک کلونی‌های سفید انجام شد، نتیجه این استخراج بر روی ژل آگارز به صورت سه باند DNA سوپرکویل[9]، شکسته و دو رشته‌ای مشخص شد (قسمت الف شکل ٤). به‌منظور تایید تکمیلی حضور قطعه مورد نظر درون پلاسمید نوترکیب از واکنش هضمی به کمک آنزیم *BamH I* استفاده شد. با توجه به این‌که آنزیم *BamH I* علاوه بر دو مکان برشی بر روی پلاسمید PTG-19 هم‌چنین دارای یک مکان برشی درون ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان است، احتمال ایجاد یک باند پلاسمید خطی (۲۸۸۰ bp) و دو باند از ژن کلون‌شده (۶۳۲ bp و ۱۰۲۹ bp) قابل پیش‌بینی بود (قسمت ب شکل ٤). پس از تایید فراورده

[1] E.coli
[2] Transformation
[3] Transgenic
[4] Ampicillin
[5] 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
[6] Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
[7] *β-galactosidase*
[8] Plasmid
[9] Supercoiled DNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

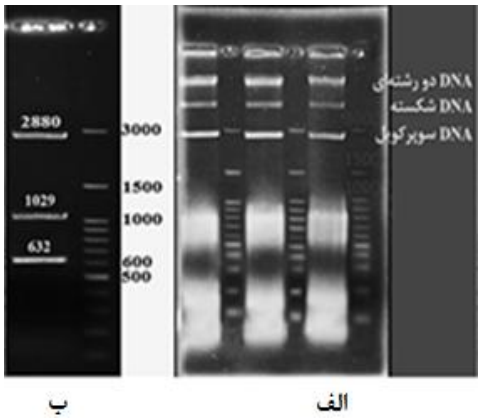
همسان‌سازی شده بر اساس نقشه هضمی آن، یکی از پلاسمیدها انتخاب شد و به‌منظور توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. از توالی آغازگر M13 رفت و برگشت خود پلاسمید به‌منظور توالی‌یابی استفاده شد. نتیجه توالی یابی در شکل ٦ نشان داده شده‌است.

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

نتایج و بحث

با استفاده از نواحی حفظ‌شده ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان، دو آغازگر دژنره رفت و برگشت برای تکثیر قسمتی از ژن *HMGR* گیاه رازیانه استفاده شد. ناحیه تکثیرشده دارای طولی برابر با ١٦٦١ جفت‌باز بود که شامل ناحیه بالادست کدون شروع به طول ۷۲ جفت‌باز و همچنین ناحیه رمز کننده (ORF) به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز است. ناحیه ORF این توالی به‌صورت ناقص توالی‌یابی شده‌است و حدود ۱۸۱ جفت‌باز از انتهای ناحیه 3′-OH آن به نسبت طول کامل cDNA دیگر توالی‌های HMGR در سایر گیاهان خانواده چتریان، توالی‌یابی نشده‌است (Liu et al. 2015).

اگرچه انتهای 3′-OH توالی به‌طور ناقص تکثیر شده‌است اما تمامی توالی دمین‌های ساختاری و کارکردی قطعه تکثیر شده کامل توالی یابی شده‌است. ناحیه ORF این توالی، رمزکننده قطعه پروتئینی به‌طول ۵۵۳ اسیدآمینه است.



شکل ٤- الف: استخراج پلاسمید از کلون‌های نوترکیب سفید رنگ ب: برش پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *BamH I* که تولید سه باند کرده است، باند اول پلاسمید خطی شده، باند دوم و سوم ژن مورد نظر که توسط برش داخلی آنزیم ایجاد شده‌است.

Alignments

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

شکل ٥- نتایج بلاست نوکلئوتید قطعه تکثیر شده ژن *HMGR* گیاه رازیانه.

با استفاده از نرم‌افزار Edit Seq (version 6.0) درصد هر کدام از اسیدهای آمینه توالی پروتئینی ناحیه ORF ژن *HMGR* گیاه رازیانه در جدول ۱ مشخص شده‌است. این ناحیه دارای جرم مولکولی در حدود ٥٩/٨١٦ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک برابر با ٨/٤٠ (PI= 8.40) است. دو اسیدآمینه هیستیدین (٢/٢٦ درصد) در ساختار ژن‌های *HMGR* به‌صورت حفظ شده‌است. یکی از این هیستیدین‌ها در بازه زمانی تبدیل HMG-CoA به موالونات پروتونه می‌شود (Liscum et al. 1985). اسیدآمینه گلایسین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

(۷/۷۵ درصد) نقش مهمی در پایداری ساختار دوم پروتئین HMGR دارد. ازآنجا که ژن *HMGR* نیاز به غلظت بالایی از عوامل احیاء کننده تیول دارد؛ از این رو اسید آمینه سیستئین (۳/۰۲ درصد) در مکان فعال آنزیم دارای نقش مهمی است (Liscum et al. 1985). اسیدآمینه آسپارژین (۲/٦٤ درصد) در جایگاه گلیکوزیلاسیون اجتماع می‌یابد. درصد هر کدام از اسیدهای آمینه با بار مثبت (K, R) ۱۰/۲ درصد، اسیدهای آمینه با بار منفی (D, E) ۸/۸۸ درصد، اسیدهای آمینه آبگریز (A, I, L, F, W, V) ۳۸/۳۷ درصد و اسیدهای آمینه آبدوست (N, C, Q, S, T, Y) ۲٤/۹۵ درصد است. با توجه به‌اینکه آنزیم *HMGR* کار سنتز موالونات از HMG-CoA را به‌وسیله دو احیاء پی‌درپی از HMG-COAها و با استفاده از دو مولکول NADPH (به‌عنوان کوفاکتور)[1] انجام می‌دهد، از این رو با انجام هم‌ردیفی با سایر توالی‌های پروتئین HMGR گیاهی، موقعیت موتیف‌هایی با توالی اسیدآمینه حفظ‌شده مکان‌یابی شد. سه موتیف در دامنه بزرگ و مرکزی L شامل دو موتیف اتصال HMG-COA (دارای توالی اسیدآمینه‌ای EMPVGYV QIP و TTEGCLVA) و یک موتیف اتصال NADP(H) (دارای توالی اسیدآمینه GTVGGGT) است و هم‌چنین در دامنه کوچک و مارپیچ S یک موتیف اتصال به (H) NADP (دارای توالی DAMGMNM) وجود دارد که بر روی توالی ژن *HMGR* گیاه رازیانه مکان‌یابی شده‌است (شکل ٦). با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی پروتئین حاصل توسط نرم‌افزار Prosit motif، نواحی حفظ شده شامل یک مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C در محدوده ۳۹۸–٤۰۰ (SDK)، یک مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II در محدوده ٤۷۳–٤۷٦ (TGQD)، چهار مکان N– گلیکوزیلاسیون در محدوده ۳۹٤–۳۹۹ (GNYCSD)، ٤٤۸–٤٥۳ (GSAMAG)، ٤٥٦–٤٦۱ (GGFNAH)، ٤۷٤–٤۷۹ (GQDPAQ) یافت شد. هم‌ردیفی توالی پروتئینی مربوط به قطعه توالی‌یابی‌شده HMGR گیاه رازیانه با سه توالی پروتئینی HMGR گیاهان جنس Panax مانند جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*) توسط نرم‌افزار ClustalW انجام شد و در نهایت مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C، مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II، مکان N– گلیکوزیلاسیون، موتیف اتصال NADP(H) و هم‌چنین موتیف اتصال HMG-COA بر روی آن مشخص شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت پروتئین HMGR گیاه رازیانه ممکن است توسط فسفوریلاسیون تنظیم شود.

تجزیه و تحلیل‌های TMHMM توسط سرور PSORTb v2.0 (http://www.psort.org/psortb/index.html) نشان داد که پروتئین حاصل از ژن *HMGR* گیاه رازیانه از دو مارپیچ درون غشایی (در اسیدهای آمینه ۳۵ –۵۷ و ۷۸ –۱۰۰ از توالی پروتئین) تشکیل شده‌است (شکل ۹). بررسی توالی پروتئینی با نرم‌افزار TMPred نشان داد که نواحی 38-57، 81-97 و ۲۵۷–۲٤۰ امکان عبور از غشای سلولی را دارند (قسمت الف شکل ۱۰). همانند سایر پروتئین‌های HMGR گیاهی، پروفایل هیدروفوبی پروتئین HMGR گیاه رازیانه نشان داد که پایانه آمینوی این پروتئین نیز دارای دمین‌های درون غشایی است که توسط لوپ‌های آبدوست (به‌عنوان لنگر آنزیم در غشای پلاسمایی) از همدیگر جدا شده‌اند (Ruiz-Albert et al. 2002).

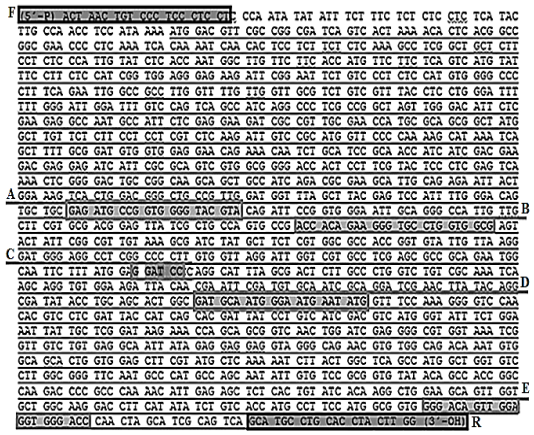
[1] Cofactor

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

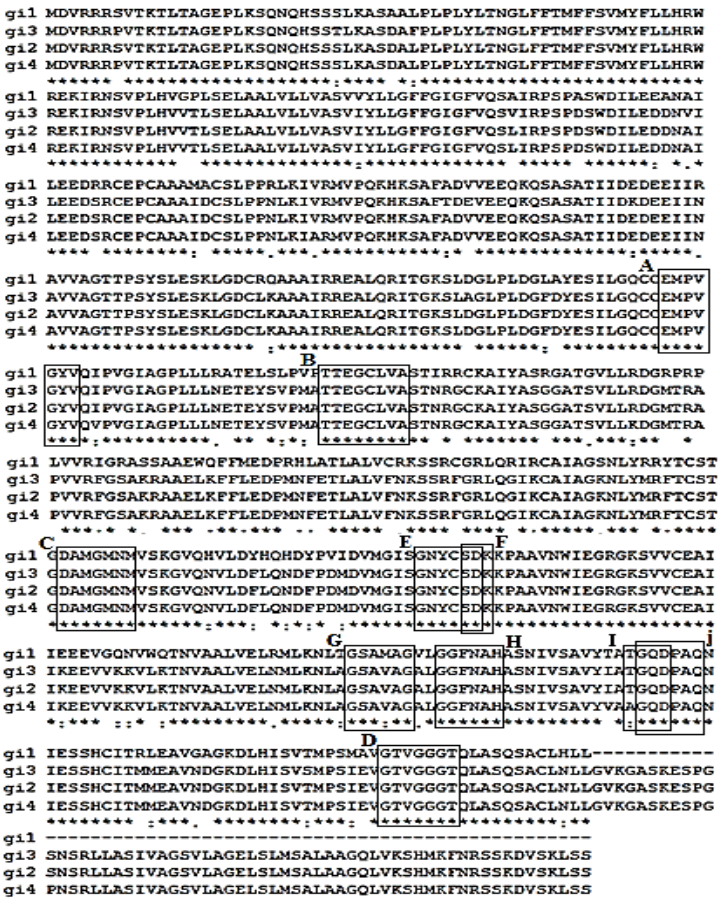
Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol
Gln (Q)	3.78	(M) Met	2.83	(R) Arg	6.8	(I) Ile	5.48
Leu (L)	10.58	(T) Thr	4.72	(H) His	2.26	(D) Asp	3.4
Ala (A)	10.77	(G) Gly	7.75	(Y) Tyr	2.45	(V) Val	8.31
Glu (E)	5.48	(F) Phe	2.26	(N) Asn	2.64	(C) Cys	3.02
(K) Lys	3.4	(W) Trp	0.94	(P)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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]



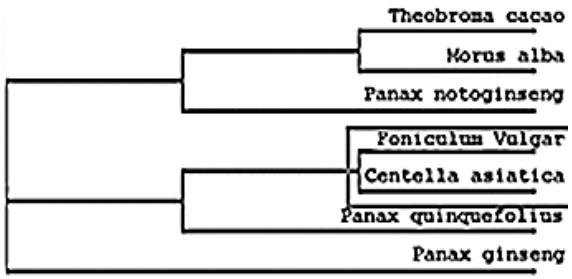
شکل ٦- نتیجه توالی‌یابی در شرکت Bioneer و دمین‌ها و نواحی اتصال آغازگر رفت و برگشت بر روی آن. A: دمین مرکزی L (EMPVGYV) B: دمین مرکزی L (TTEGCLVA)، C: ناحیه برشی توسط آنزیم *BamH I*، D: دمین حلزونی S (DAMGMNM)، E: دمین مرکزی L (GTVGGGT)، F: محل اتصال آغازگر رفت R: محل اتصال آغازگر برگشت.



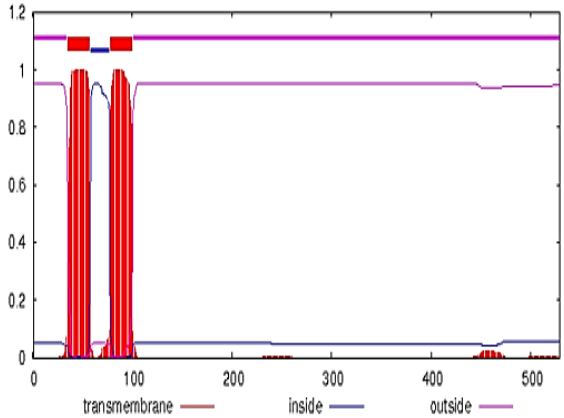
شکل ۷- انجام هم‌ردیفی پروتئین برای توالی تکثیر شده در مقایسه با سه توالی پروتئینی HMGR از گیاهان خانواده Panax توسط نرم‌افزار Clustal W و مشخص کردن جایگاه دُمین و نواحی حفظ شده کارکردی بر روی آن. (gi 1: *Foniculum Vulgar*، gi 2*: Panax quinquefolius*، gi 3: *Panax notoginseng*، gi 4: *Panax ginseng*)،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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

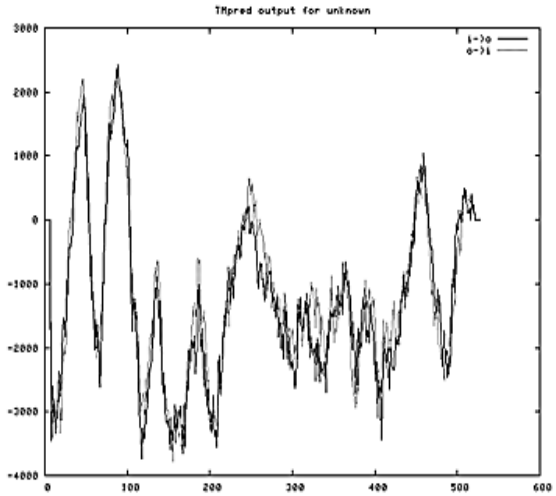
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]



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



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



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



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

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

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

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

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

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

نتیجه‌گیری کلی

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

منابع

Bach TJ (1995) some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. Plant Lipid Metabolism 321-334.

Bahmani K, Darbandi AI, Ramshini HA, Moradi N, Akbari A (2015) Agro-morphological and phytochemical diversity of various Iranian fennel landraces. Industrial Crops and Products 77:282-294.

Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B, Miele M (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. BMC Biotechnology 6:45.

Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Progress in Lipid Research 44:357-429.

Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG, Boronat A (1989) Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Molecular Biology 13:627-638.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants 24:1250-1319.

Hartmann T (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. Entomologia Experimentalis Applicata 80:177-188.

Hey SJ, Powers SJ, Beale MH, Hawkins ND, Ward JL, Halford NG (2006) Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. Plant Biotechnology Journal 4:219-229.

Izadi-Darbandi A, Bahmani K, Ramshini H, Moradia N (2013) Heritability estimates of agronomic traits and essential oil content in Iranian fennels. Journal of Agricultural Science and Technology 15:1275-1283.

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Research 28:27-30.

Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. Journal of Biological Chemistry 260:522-530.

Liu MH, Yang BR, Cheung WF, Yang KY, Zhou HF, Kwok JS, Liu GC, Li XF, Zhong S, Lee SM, Tsui SK (2015) Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in Ginsenoside and alkaloid biosynthesis. BMC Genomics 16:265.

Muñoz-Bertomeu J, Sales E, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2007) Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. Plant Biotechnology Journal 5:746-758.

Newman JD, Chappell J (1999) Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 34:95-106.

Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. Trends in Plant Science 15:684-692.

Roberts SC (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. Nature Chemical Biology 3:387-395.

Ruiz-Albert J, Cerdá-Olmedo E, Corrochano L (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in Phycomyces. Molecular Genetics and Genomics 266:768-777.

Shen G, Pang Y, Wu W, Liao Z, Zhao L, Sun X, Tang K (2006) Cloning and characterization of a root-specific expressing gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Ginkgo biloba*. Molecular Biology Reports 33:117-127.

Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W (2000) Taxol from Tubercularia sp. strain TF5, an endophytic

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]

fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193:249-253.
Wang Y, Guo B, Zhang F, Yao H, Miao Z, Tang K (2007) Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from hazel (*Corylus avellana L. Gasaway*). BMB Reports 40:861-869.
Wright R, Basson M, D'Ari L, Rine J (1988) Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. The Journal of Cell Biology 107:101-114.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.12.8]