

همسانه سازی، مطالعه بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن سکوالن سینتاز ۱ در شیرین بیان بومی ایران

Cloning, bioinformatics study and gene expression evaluation of *Squalene synthase 1* in Iranian native licorice

زهرا شیرازی^۱، علی اعلمی^{۲*}، مسعود توحیدفر^۳، محمد مهدی سوهانی^۲

Zahra Shirazi¹, Ali Aalami^{2*}, Masoud Tohidfar³, Mohammad Mehdi Sohani²

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم
کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و زیست فناوری، دانشگاه شهید بهشتی، ایران

1- Ph.D. student 2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of
Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran

3- Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Science and
Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_aalami@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، یکی از مهم ترین گیاهان دارویی است که دارای ترکیبات فعال زیستی مانند ساپونین تری ترپنوئیدها (گلیسیریزین) و فیتواسترول ها است. سکوالن سینتاز (*Squalene Synthase*)، آنزیم (EC 2.5.1.21) متصل به غشا است که دو مولکول فارنسیل دی-فسفات را به سکوالن تبدیل می کند. سکوالن پیش ماده اصلی بیوسنتز تری ترپن ها و استرول ها است. در این مطالعه توالی بیان کننده سکوالن سینتاز ۱ شیرین بیان بومی ایران در وکتور pTZ57R/T همسانه سازی و ویژگی های بیوانفورماتیکی پلی پپتید با استفاده از نرم افزارها پیش بینی شد. cDNA سکوالن سینتاز ۱، ۱۲۴۲ جفت باز دارد و یک پلی پپتید ۴۱۳ آمینواسیدی را بیان می کند. بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که پلی پپتید سکوالن سینتاز ۱ شیرین بیان، بیشترین شباهت را با سکوالن سینتاز ۱ جنس *Glycyrrhiza* دارد. بررسی جایگاه درون سلولی نشان داد که فعالیت پروتئین در ارتباط با شبکه آندوپلاسمی است. وزن مولکولی پروتئین ۴۷/۳ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۱۸ است. در توالی آمینواسیدی دو ناحیه فراغشایی و دو بخش حفاظت شده مشخص شد. ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از نرم افزار I-TASSER پیشگویی شد. در ساختار پروتئین پیشگویی شده، مارپیچ فراغشایی، آمینواسیدهای آب گریز، توالی حفاظت شده و آمینواسیدهای سطح پروتئین با نرم افزار Chimera مشخص شد. الگوی بیان ژن سکوالن سینتاز ۱ نشان داد که بیشترین و کمترین بیان به ترتیب مربوط به ریشه و اندام سبز گیاه است.

واژه های کلیدی

ترپنوئید،
RT-PCR
کمی،
فیتواسترول
پلی پپتید
Glycyrrhiza

مقدمه

شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. گیاهی چندساله از خانواده بقولات (Fabaceae) و یکی از مهم ترین گیاهان دارویی بومی ایران است که مقدار زیادی از ریشه آن سالیانه به کشورهای مختلف صادر می شود (Amani et al. 2005; Bi et al. 2010; Khanahmadi et al. 2013; Tian et al. 2008). ریشه شیرین بیان دارای ترکیبات مختلفی از جمله تری ترپن ساپونین ها (گلیسیریزین، سویا ساپونین)، فلاونوئیدها، ایزوفلاون، هیدروکسی کومارین، استرول، رزین، روغن های فرار، ساکارز (۲-۱ درصد)، نشاسته، پلی ساکارید (۳۰-۲ درصد) و به مقدار جزئی اسانس است (Asl and Hosseinzadeh 2008; Hajimehdipoor et al. 2008; Wittschier et al. 2009). ریشه شیرین بیان حاوی یکی از مهم ترین ترکیبات دارویی خام دنیا با نام گلیسیریزین (۲-۸ درصد وزن خشک) است (Asl and Hosseinzadeh 2008; Ibanoglu and Ibanoglu, 2000; Shibata, 2000). یک نوع اولئان تری ترپنوئید ساپونین و حدود ۵۰ بار شیرین تر از شکر است و به عنوان شیرین کننده و طعم دهنده در صنایع غذایی استفاده می شود (Chin et al. 2007). شیرین بیان در اختلالات کبدی حاد، هپاتیت B و C مزمن، هپاتیت عفونی، عفونت HIV و بیماری های سیستم ایمنی مؤثر است و مانع همانندسازی ویروس HIV در بیماران مبتلا به ایدز می شود و اثر محافظتی گیاه در بیماری های کبدی، التهاب و زخم های معده مربوط به ماده مؤثره گلیسیریزین است (Haraguchi et al. 1998; Li et al. 2011; Sato et al. 1996). گلیسیریزین اثر ضد ویروسی در برابر عفونت ناشی از ویروس آنفلوآنزا نیز دارد (Lehtihet and Nygren 2000; Utsunomiya et al. 1997). بررسی های آزمایشگاهی، اثر ضد - سرطانی و فعالیت ضد ویروسی قوی گلیسیریزین در برابر سندروم حاد تنفسی (سارس) را نشان داده اند (Cinatl et al. 1995; Wang et al. 2003). بیوستز ترپنوئیدها در شیرین بیان با تبدیل دو مولکول فارنسیل دی فسفات (FDP) به وسیله آنزیم سکوالن سینتاز (squalene synthase) به سکوالن شروع می شود (Jennings et al. 1991; Robinson et al. 1993). آنزیم سکوالن سینتاز با اتصال دو مولکول فارنسیل دی فسفات ترکیب ۳۰ کربنه سکوالن را تولید می کند و این واکنش را در دو مرحله انجام

می دهد. در مرحله اول اتصال دو مولکول FDP را تسریع کرده و پری سکوالن پیرو سولفات (PSPP) را تولید می کند. در مرحله بعدی PSPP در حضور NADPH و Mg^{2+} به سکوالن تبدیل می شود (Tansey and Shechter, 2000). در گیاهان، آنزیم SQS نقش مهمی در تنظیم بیوستز فیتواسترول ها و تری ترپنوئیدها دارد (Lee et al. 2004; Seo et al. 2005; Suzuki et al. 2002; Wentzinger et al. 2002; Zhao et al. 2017). ژن SQS از گیاهانی مانند شیرین بیان (Hayashi et al. 1999)، تنباکو (Devarenne et al. 2002)، جینسینگ (Lee et al. 2004)، آرابیدوپسیس (Kribii et al. 1997)، فلفل زیتنی (Lee et al. 2002)، یونجه (Suzuki et al. 2002)، سویا (Nguyen et al. 2013) و سایر گیاهان گزارش شده است. Zhao و همکاران (۲۰۱۷) ناحیه بیان کننده ژن SQS را از گیاه *Siraitia grosvenorii* با تکنیک RACE جداسازی نمودند و ویژگی بیوانفورماتیکی و بیان ژن را در اندام های مختلف بررسی کردند (Zhao et al. 2017). Filiz و همکاران (۲۰۱۶) در دو گیاه صنوبر و افرا ویژگی پروتئین بیان شونده SQS را با نرم افزارها بررسی نمودند. Zhang و همکاران (۲۰۱۶) طول کامل ژن SQS گیاه توس سفید را همسانه سازی کردند و بیان ژن را در ریشه، ساقه و برگ های گیاه ۴ هفته ای بررسی کردند و گزارش نمودند که ژن SQS در تولید ترپنوئیدها نقش دارد (Zhang et al. 2016). بررسی متابولیکی اندام های مختلف شیرین بیان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) نشان داد که گلیسیریزین فقط در ریشه های ضخیم گیاه تولید می شود. در قسمت های هوایی، ریشه های فرعی و گره های ریشه ای گلیسیریزین مشاهده نگردید (Hayashi, 2009). از طرفی شیرازی و همکاران، تولید گلیسیریزین در ریشه موین *G. glabra* ایرانی را گزارش کردند که تا قبل از آن، عدم تولید گلیسیریزین درکشت ریشه موین و سوسپانسیون این گونه گزارش شده بود (Shirazi et al. 2012). تنوع ژنتیکی درون گونه و تنوع محیطی از عوامل مؤثر در سنتز گلیسیریزین است و برای مطالعات مسیر بیوستز گلیسیریزین بهتر است از واریته ای استفاده شود که گلیسیریزین بیشتری تولید می کند (Kojoma et al. 2011). در پژوهش ها، شیرین بیان بومی ایران دارای بیشترین مقدار

5'AAAGAGCTCCTCCTAATTATCTTGGCGTT توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، یک میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ pmol) و ۰/۵ واحد از آنزیم Long PCR Enzyme Mix شرکت Thermo Fisher Scientific در حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتری استفاده شد. برنامه حرارتی واکنش PCR شامل ۴ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه دمایی شامل یک دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه ۶۰ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت قطعه تکثیرشده از روی ژل و با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Thermo Fisher Scientific خالص‌سازی شد.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی DNA

واکنش اتصال بین محصول PCR و ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T با آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد. همسانه‌سازی با استفاده از باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α و کیت The TaClone PCR Cloning شرکت Thermo Scientific انجام شد. سلول‌های تراریخته در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک گزینش شدند. به‌منظور تأیید ورود ژن به باکتری از سه روش غربالگری سریع، Colony PCR و واکنش برش آنزیمی استفاده شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت Thermo Fisher Scientific انجام گرفت و سپس برش آنزیمی دوگانه DNA پلاسمیدی با دو آنزیم *Bam*HI و *Xba*I انجام شد و محصول روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. تأیید نهایی درستی توالی همسانه‌سازی شده از طریق توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای M13 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد.

ویژگی‌های بیوانفورماتیکی SQS1

بررسی توالی نوکلئوتیدی

پس از دریافت توالی، کروماتوگرام نمونه با نرم‌افزار chromas ver 2.4 و DNA Baser ver 4.20 بررسی شد و پس از اطمینان از کیفیت مناسب توالی، به‌منظور یافتن توالی‌های مشابه در

گلیسریریزین گزارش شده است (Douglas et al. 2004). بدین منظور در این مطالعه توالی کامل cDNA بیان‌کننده این ژن از گونه *glabra* بومی ایران جداسازی و همسانه‌سازی می‌شود. مقایسه توالی پروتئینی به‌دست‌آمده با توالی SQS سایر گیاهان انجام و برخی ویژگی‌های بیوانفورماتیکی توالی پروتئینی نیز بررسی می‌شود. همچنین بیان این ژن با روش (Real-Time PCR) (qPCR) در اندام‌های مختلف بررسی می‌شود. دو ژن بیان‌کننده SQS در جنس *Glycyrrhiza* شناسایی شده است که با بررسی بیان SQS1 در اندام‌های مختلف شیرین‌بیان، ارتباط این ژن با نوع متابولیت تری‌ترپنوئیدی را می‌توان مشخص کرد.

مواد و روش‌ها

همسانه‌سازی ژن SQS1

مواد گیاهی و سنتز cDNA

بذرهای گیاه شیرین‌بیان گونه *glabra* واریته *glabra* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها به‌منظور خراش‌دهی به مدت ۲۰ دقیقه در اسیدسولفوریک ۹۸ درصد قرار گرفتند و سپس در گلدان کشت شدند. از ریشه گیاهچه‌های به‌دست‌آمده RNA کلی با محلول RNX-plus شرکت سیناکلون با کمی تغییرات استخراج شد. کیفیت RNA کلی با استفاده از دستگاه الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن با دستگاه نانودراپ تعیین شد. برای سنتز رشته cDNA از آغازگر تصادفی هگزامر و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (RevertAID™ M-MuLV) شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد.

طراحی آغازگرها و تکثیر ناحیه بیان‌کننده SQS1

جهت طراحی آغازگرها از توالی نوکلئوتیدی ناحیه بیان‌کننده SQS1 جنس *Glycyrrhiza* موجود در بانک داده NCBI با شماره دسترسی AM182329.1، D86409.1 و AM182331.1 استفاده شد و یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر ناحیه بیان‌کننده این ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه هفت طراحی شد. توالی آغازگرها شامل آغازگرهای رفت - 5'AAGGAGGATCCTATGGGGAGTTTGG و برگشت -

پایگاه داده NCBI با استفاده از برنامه BLAST مورد جستجو قرار گرفت.

بررسی پروتئین پیش‌گویی شده

توالی نوکلئوتیدی به توالی اسیدآمینه‌ای ترجمه شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی اسیدآمینه‌ای و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با SQS سایر گیاهان با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه پنجم انجام گرفت. سپس با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، ویژگی‌های پروتئین بیان شونده بررسی شد. ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین با نرم‌افزار ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)، پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین بیان شونده با (<https://npsapraibi.ibcp.fr>) SOPMA، پیش‌بینی توالی حفاظت شده با نرم‌افزارهای Scan Prosite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) و Pfam (<http://pfam.xfam.org>)، بررسی جایگاه درون‌سلولی با Softberry (<http://www.softberry.com>)، الگوی آب‌گریزی-آبدوستی با ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>)، ناحیه فراغشایی با نرم‌افزار TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)، پیش‌بینی ساختار سوم با برنامه I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>) و مطالعه ساختار سوم با برنامه Chimera بررسی شد.

بررسی بیان ژن SQS1 در اندام‌های مختلف

مواد گیاهی و سنتز cDNA

گیاهچه‌های شیرین‌بیان در محیط هیدروپونیک کشت شدند. برای تولید ریشه موئین از برگ گیاهچه‌های سه‌هفته‌ای کشت‌شده در محیط MS نیمه‌جامد استفاده شد که با باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ATCC15834 تلقیح شده و بعد از ظهور ریشه موئین برای حذف باکتری واکشت ریشه‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انجام شد. بعد از اطمینان از حذف باکتری، برای تأیید مولکولی ریشه‌های موئین استخراج DNA از ریشه‌ها انجام گرفت. (Shirazi et al. 2012). تأیید تراپختی ریشه موئین با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* موجود در ناحیه T-DNA باکتری انجام شد. توالی آغازگرهای

اختصاصی ژن *rolB* شامل آغازگرهای رفت
5'TTAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-

برگشت 5'TTAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. بعد از تأیید وجود ژن *rolB* در ریشه‌های موئین، ریشه‌ها به محیط مایع منتقل شدند. بعد از گذشت یک ماه از ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های کشت‌شده در محیط هیدروپونیک و همچنین ریشه موئین یک‌ماهه رشد کرده در محیط مایع MS، استخراج RNA انجام گرفت. برای سنتز رشته cDNA از آغازگر تصادفی هگزامر و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (RevertAIDTM M-MuLV) شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد.

روش qRT-PCR

مقایسه کمی بیان ژن *SQS1* با استفاده از روش RT-PCR کمی با آغازگرهای اختصاصی ژن همسانه‌سازی شده و ژن کنترل داخلی 18s rRNA انجام شد (جدول ۱). از مخلوط واکنش RealQ-PCR 2x Master Mix Kit شرکت Ampliqon استفاده شد. مقدار بیان کمی ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl, 2001).

نتایج

همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *SQS1*

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز استخراج RNA نشان داد که RNA کیفیت خوبی دارد. در PCR با استفاده از cDNA بیان کننده ژن، تنها یک باند به طول تقریبی ۱۲۴۲ bp تشکیل شد که مطابق با طول قطعه مورد انتظار (شکل ۱، الف) و نشان‌دهنده اختصاصی بودن آغازگرها بود. آزمون غربالگری سریع از بین همسانه‌های رشد کرده در محیط حاوی آمپی‌سیلین انجام شد. همسانه‌هایی که نتیجه غربالگری سریع آن‌ها مثبت بوده و بالاتر از ناقل خالی قرار داشتند، با استفاده از Colony PCR برای ورود ژن *SQS1* نیز تأیید شدند. برش آنزیمی دوگانه DNA پلاسمیدی با دو آنزیم *BamHI* و *XbaI* نیز باند ۱۲۴۲ bp را نشان داد (شکل ۱، ب).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن *SQS1*Table 1. The primers used in the study of *SQS1* gene expression

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
<i>SQS1</i> -Forward	5'-GGTTCCTTCGAGCCCTTGACA	۵۸
<i>SQS1</i> -Reverse	5'-CCATTCCTGCACCCATCCTT	
18s rRNA- Forward	5'-GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC	۵۸
18s rRNA- Reverse	5'-CTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGG	



شکل ۱- الف: الکتروفورز محصول PCR برای ژن *SQS1*. ۱- ناحیه بیان کننده ژن *SQS1* - نشانگر ۱۰۰۰ جفت بازی. ب: الکتروفورز واکنش برش آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T دارای ژن *SQS1* با آنزیمهای *Bam*HI و *Xba*I. ۱- PCR ژن *SQS1*. ۲- برش دوگانه با آنزیمهای *Bam*HI و *Xba*I. ۳- پلاسمید pTZ57R/T - نشانگر ۱۰۰۰ جفت بازی

Figure 1. (A) Electrophoresis of PCR product for *SQS1* gene. 1- Coding region of *SQS1* gene. M-1000 bp ladder (B) - Electrophoresis reaction for enzyme digestion of the pTZ57R/T plasmid containing *SQS1* gene with *Bam*HI and *Xba*I. 1-PCR for *SQS1* gene. 2- Double digestion with *Bam*HI and *Xba*I enzyme. 3- pTZ57R/T plasmid. M-1000 bp ladder

بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین *SQS1*

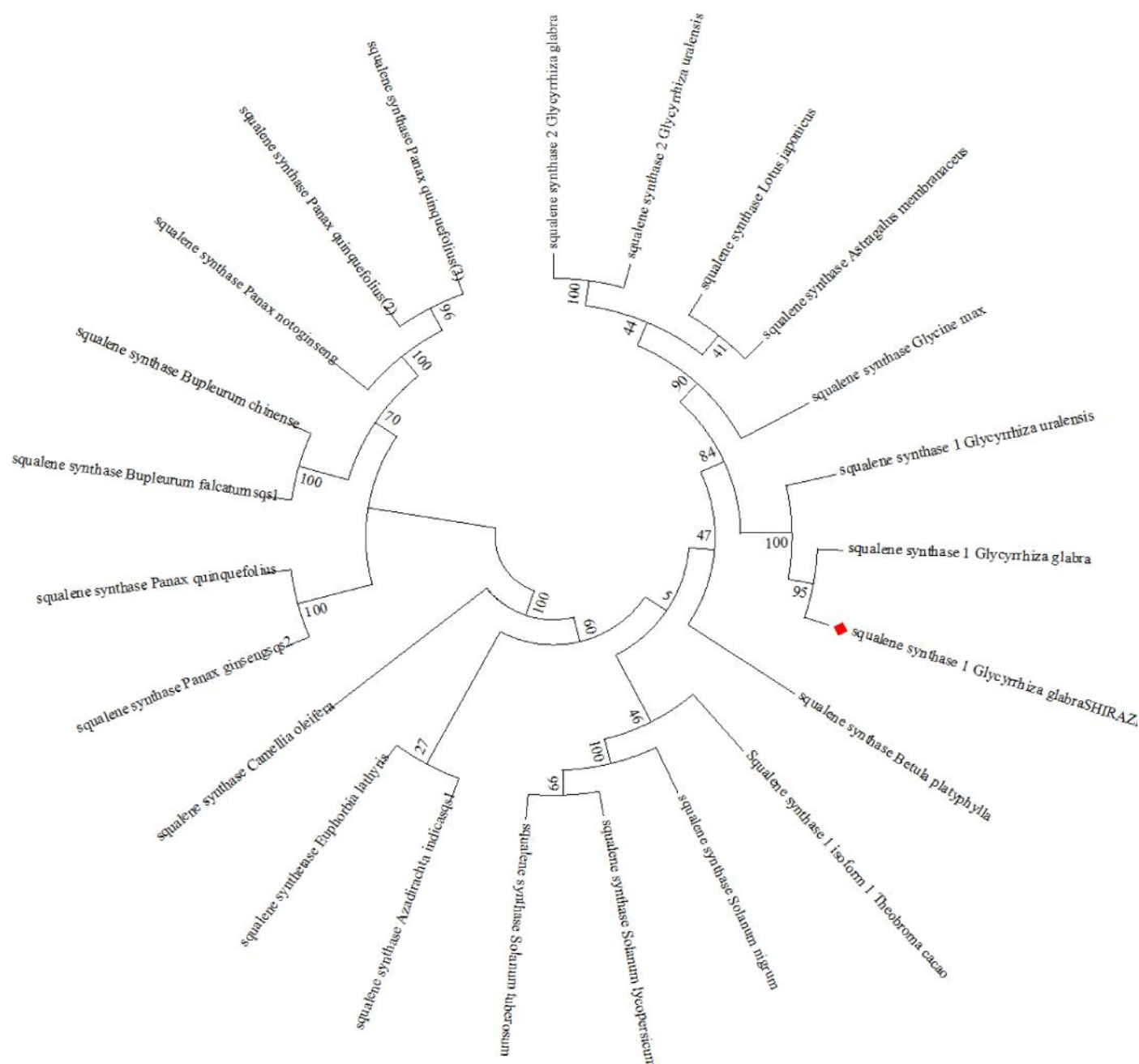
نتایج تجزیه با نرم افزار ProtParam نشان داد فرمول مولکولی توالی پروتئینی *SQS1*، $C_{2117}H_{3359}N_{567}O_{602}S_{27}$ است. وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده این توالی به ترتیب ۴۷/۳ کیلودالتون و ۸/۱۸ است. شاخص ناپایداری پروتئین ۴۳/۲۰ محاسبه شد که جزء پروتئین های ناپایدار است (شاخص پروتئین هایی پایدار کمتر از ۴۰ است) و ممکن است پروتئین برای پایداری نیاز به پردازش بعد از ترجمه داشته باشد. شاخص آلفاتیک، به عنوان یک عامل مهم در ارزیابی مقاومت پروتئین در برابر حرارت، ۹۷/۷۷ محاسبه شد. متوسط میزان آبدوستی-آبگریزی ۰/۰۶۷- است. از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۴۸ اسیدآمینه بار منفی (Asp + Glu) و ۵۱ اسیدآمینه بار مثبت (Arg + Lys) دارند. الگوی آبگریزی-آبدوستی با نرم افزار

نتایج توالی یابی قطعه همسازسازی شده نشان داد، cDNA

بیان کننده ژن *SQS1* به طور کامل جداسازی شده است. توالی با کدون ATG آغاز شده و با کدون TAG خاتمه یافته و یک پروتئین ۴۱۳ اسیدآمینه ای را بیان می کند. یافته های کامل این توالی در بانک داده NCBI ثبت و با شماره دسترسی KT987235.1 در دسترس است. این ژن ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به سکوالن سینتاز گونه *glabra* ثبت شده در NCBI به شماره دسترسی BAA13083.1 و D86409.1 دارد. نتایج هم ردیف سازی چندگانه توالی اسیدآمینه ای و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با *SQS* سایر گیاهان با استفاده از نرم افزار MEGA5 با روش neighbor joining انجام شد و نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان داد که بیشترین تشابه را با *SQS1* جنس *Glycyrrhiza* دارد (شکل ۲).

نشان داد که این پروتئین دارای ۲۸۲ مارپیچ α (۶۸/۲۸ درصد)، ۳۱ رشته قابل تعمیم (۷/۵۱ درصد)، ۱۹ پیچ β (۴/۶۰ درصد) و ۸۱ پیچ تصادفی (۱۹/۶۱ درصد) است. بررسی جایگاه درون-سلولی با نرم افزار Softberry، نشان داد که محل فعالیت پروتئین در ارتباط با شبکه آندوپلاسمی است. برنامه SignalP نسخه چهار وجود سیگنال پپتیدی در پروتئین را مشخص نکرد.

ProtScale به روش (Kyte and Doolittle, 1982) نشان داد که کمترین امتیاز ۲/۴۷۸- در موقعیت ۳۵۱ (پرولین) و بیشترین امتیاز ۳/۹۱۱ در موقعیت ۳۹۵ (لوسین) زنجیره پلی پتیدی است. دمین های آب گریز در بالا و دمین های آب دوست در زیر خط صفر قرار دارند (شکل ۳، الف). الگوی آب گریزی-آبدوستی نقش مهمی در پیش بینی ساختار دوم و تقسیم نواحی عملکردی پروتئین دارد. بررسی ساختار دوم پروتئین با نرم افزار SOPMA

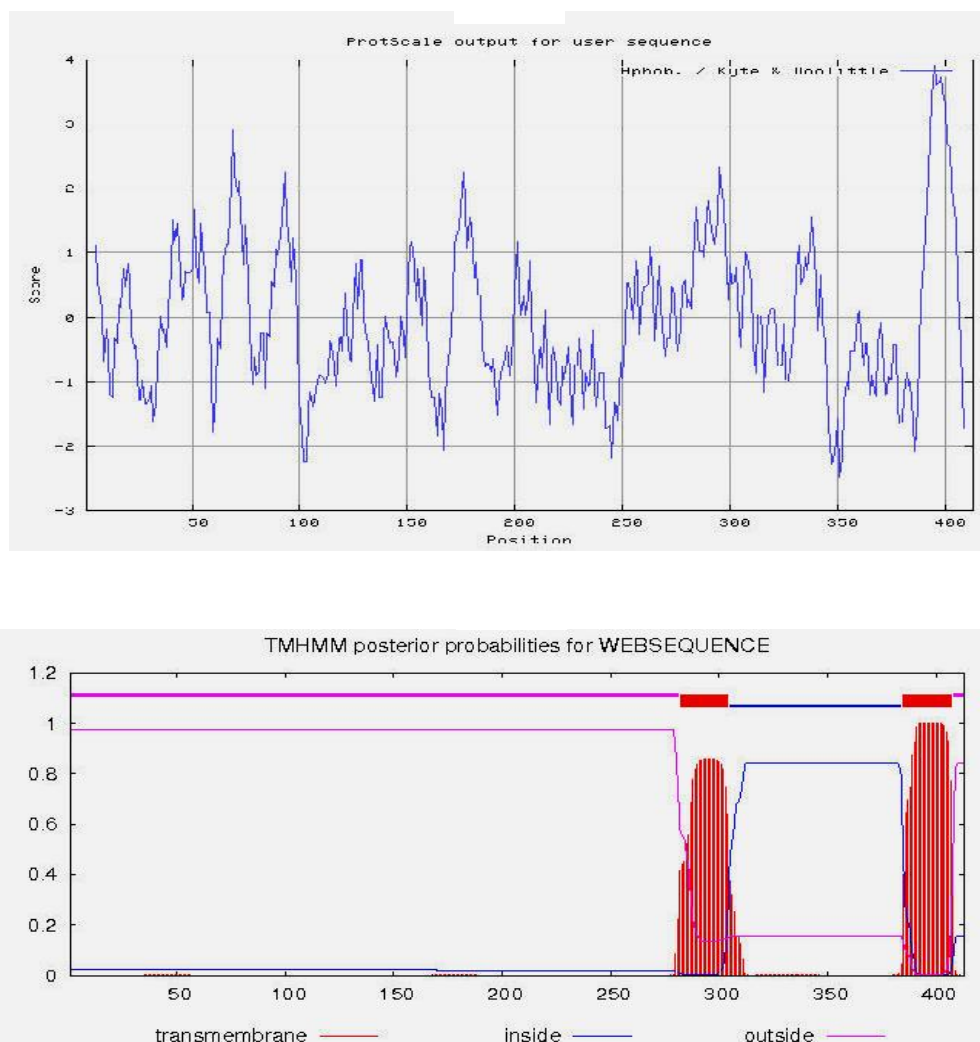


شکل ۲-درخت فیلوژنتیکی توالی اسید آمینه ای SQS1 با SQS سایر گیاهان

Figure 2. Phylogenetic trees for the amino acid sequence of SQS1 with other plants SQS

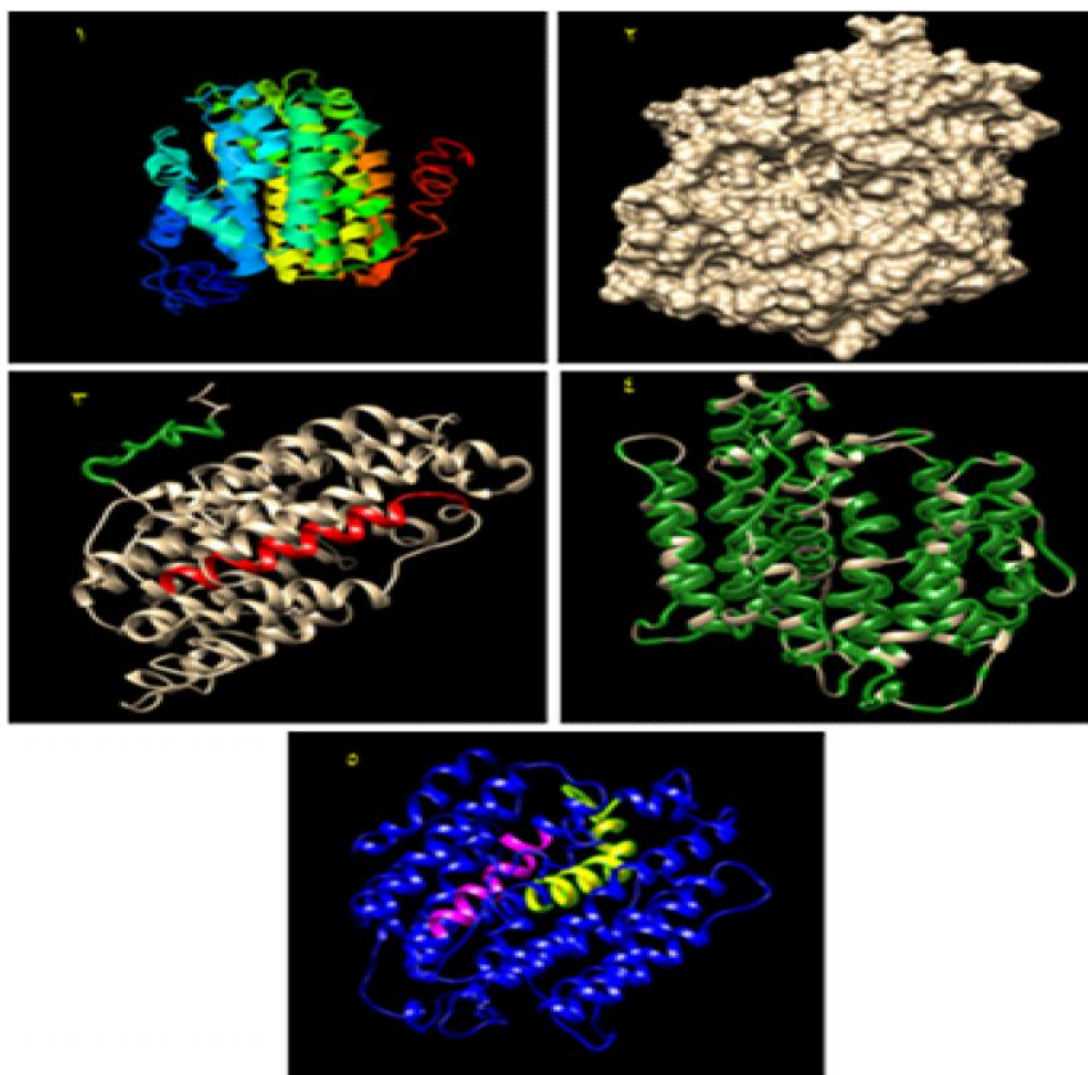
پروتئین مشخص کرد که این موتیف‌ها با استفاده از برنامه Scan و Prosite در موقعیت ۱۸۳-۱۶۸ توالی پروتئین شامل اسیدآمینوهای YChyVAGLVGlgLskL و موقعیت ۲۰۱-۲۲۹ شامل اسیدآمینوهای MGIflQktNIiRDYleDineipksRmFwP می‌باشند. پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین با برنامه I-TASSER و تجزیه و تحلیل آن با نرم‌افزار Chimera انجام گرفت. ساختار فراغشایی، اسیدآمینوهای آب‌گریز، ساختار سطحی و موتیف حفاظت‌شده در مدل پروتئینی پیش‌بینی‌شده، مشخص شد (شکل ۴).

بررسی بخش‌های فراغشایی با استفاده از برنامه TMHMM نسخه دو مشخص شد که دو مارپیچ فراغشایی در موقعیت اسیدآمینوهای ۲۸۲-۳۰۴ و اسیدآمینوهای ۴۰۷-۳۸۵ قرار دارد و اسیدآمینوهای ۲۸۱-۱ به سمت خارج، ۳۰۴-۲۸۲ فراغشایی، ۳۸۴-۳۰۵ داخلی، ۴۰۷-۳۸۵ فراغشایی و ۴۱۳-۴۰۸ به سمت خارج قرار دارند (شکل ۳، ب). بررسی توالی حفاظت‌شده پروتئین SQS1 با برنامه Prosite دو توالی Y-[CSAM]-x(2)-[VSG]-A-[GSA]-[LIVM]-G- و [LIVAT]-[IV]-G-x(2)-[LMSC]-x(2)-[LIV]-x(3)-Q-x(2,3)-[ND]-[IFL]-x-[RE]-D-[LIVMFY]-x(2)-[DE]-x(4,7)-R-x-[FY]-x-P را به عنوان الگوی حفاظت‌شده



شکل ۳- بالا: الگوی آب‌گریزی-آبدوستی پروتئین SQS1. پایین: بررسی ناحیه فراغشایی پروتئین SQS1 توسط برنامه TMHMM

Figure 3. (A) Hydrophobic-hydrophilic pattern of SQS1 protein. (B) Study of protein transmembrane domains by TMHMM program



شکل ۴ - نمایش ساختار سه بعدی پروتئین با برنامه I-TASSER و بررسی آن با نرم افزار Chimera. ۱- ساختار سه بعدی روبان. ۲- سطح پروتئین. ۳- بخش های فراغشایی. ۴- اسید آمینه های آب گریز. ۵- توالی حفاظت شده پروتئین: توالی YChyVAGLVGlgLskL (رنگ صورتی) و توالی MGlfIQktNIIRDYleDineipksRmFwP (رنگ زرد)

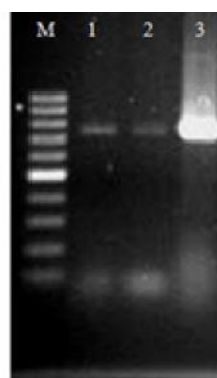
Figure 4. Displaying the three-dimensional structure of protein by I-TASSER program and survey it using Chimera. 1- Ribbon three-dimensional structure. 2- Surface of the protein. 3- Transmembrane domains. 4- Hydrophobic amino acids. 5- conserved sequence of the protein: YChyVAGLVGlgLskL sequence (pink) and MGlfIQktNIIRDYleDineipksRmFwP sequence (yellow).

بررسی بیان ژن *SQS1* در اندام های مختلف گیاه شیرین بیان

بعد از تلقیح برگ گیاهچه های شیرین بیان و ظهور ریشه های موئین برای تایید تراریختی ریشه های موئین و ورود ناحیه T-DNA به ژنوم ریشه ها از تکثیر ژن *rolB* موجود در ناحیه T-DNA استفاده شد. تکثیر DNA ریشه موئین با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB*، قطعه ۷۸۰ جفت بازی را نشان داد (شکل ۵) که نشان دهنده

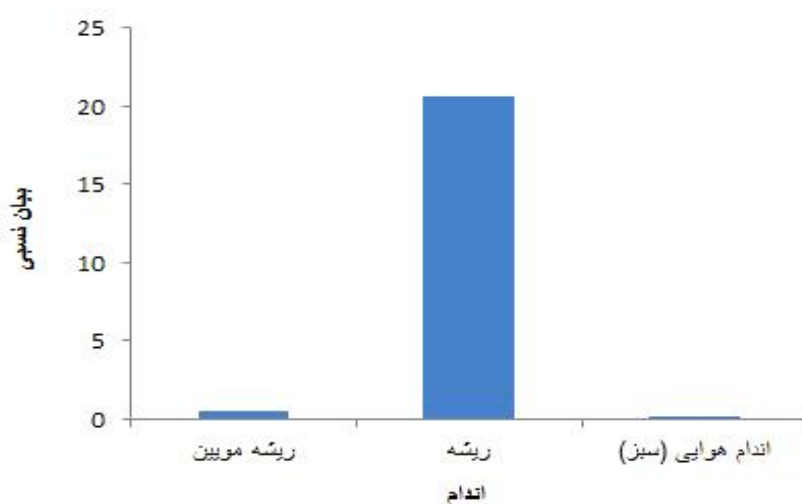
تراریخته بودن ریشه های به دست آمده و انتقال ژن *rolB* به ژنوم ریشه ها است.

بیان ژن *SQS1* در اندام های ریشه، اندام هوایی (سبز) و ریشه موئین با روش RT-PCR کمی انجام شد. بیشترین بیان ژن در ریشه معمولی و کمترین بیان ژن در اندام سبز گیاه مشاهده شد (نمودار ۱).



شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR برای ژن *rolB*. ۱-۲- تکثیر قطعه ۷۸۰ جفت بازی در ریشه‌های موئین. ۳- پلاسمید آگروباکتریوم ریزوژنز (کنترل مثبت). M- نشانگر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 5. Electrophoresis of PCR product for *rolB* gene. 1-2 Amplification of 780 bp region in hairy roots. 3-Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* (positive control). M- 100 bp ladder



نمودار ۱- بررسی بیان ژن *SQS1* در اندام‌های مختلف با روش RT-PCR کمی

Chart 1. Study of *SQS1* gene expression in various organs using qRT-PCR

بحث

کلیدی را در مسیر ایزوپرن‌ها و بردن جریان کربنی به سمت بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترپنوئیدها دارد (Abe *et al.* 1993; Piironen *et al.* 2000; Wittschier *et al.* 2009). ویژگی‌های بیوانفورماتیکی پروتئین SQS در ۹ گونه گیاه جنسینگ نشان داد، در ساختار دوم پروتئین SQS مارپیچ α و پیچ تصادفی بیشترین اجزا ساختار را تشکیل می‌دهند. در این پژوهش

سکوالن سینتاز (SQS: EC 2.5.1.21)، آنزیم متصل به شبکه آندوپلاسمی است که تولید سکوالن را با اتصال دو مولکول فارنسیل دی‌فسفات تسریع می‌کند. فارنسیل دی‌فسفات علاوه بر سنتز ترکیبات استروئیدی و تری‌ترپنوئیدی در ساخت ترکیبات ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات، سزکویی ترپن‌ها، یوبی کوئینون، هم و پلی‌پرنول نقش دارد. بنابراین آنزیم SQS با تولید سکوالن، نقش

دو بخش فراغشایی در ساختار پروتئین مشخص شد که در ناحیه C-terminal قرار گرفته است و با توجه به الگوی آبدوستی-آب-گریزی این دو بخش بیشتر شامل اسیدآمینه‌های آب‌گریز است و پروتئین SQS1 از طریق این دو بخش به شبکه آندوپلاسمی متصل می‌شود. دو توالی حفاظت شده در پروتئین SQS1 مشخص شد که در بررسی با برنامه TMHMM موقعیت آن‌ها در بخش سیتوپلاسم است و در ناحیه N-terminal پروتئین قرار دارند. مقایسه توالی اسیدآمینه به دست آمده در این پژوهش با توالی ثبت شده، تشابه کامل ندارد ولی تفاوت‌ها در توالی حفاظت شده پروتئین نیست. Zhao و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی‌های بیوانفورماتیکی روی پروتئین SQS در گیاه *Siraitia grosvenorii* مشخص کردند که پروتئین بیان شونده این ژن دارای دو ماریچ فراغشایی در ناحیه C-terminal است و همچنین سیگنال پپتیدی در پروتئین مشخص نشد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (Zhao et al. 2017). ژن SQS جزء خانواده چندژنی است. در گیاهان سرخدار (Huang et al. 2007)، افوریا (Uchida et al. 2009) و برنج (Hata et al. 1997) یک ژن SQS و در آرابدوپسیس (Kribii et al. 1997) و شیرین بیان، دو ژن SQS شناسایی شده است (Hayashi et al. 2003). درکشت سلولی شیرین بیان، آنزیم SQS در مرحله رشد لگاریتمی بیشتر از مرحله رشد ساکن گزارش شد (Hayashi et al. 1999). انتقال ژن SQS1 تحت پیشبر قوی در ریشه‌های رویشی جینسینگ تراریخته، بیان ژن‌های پایین دست مثل سکوالن اپوکسیداز، دامارندیول سیتاز، بتاآمرین سیتاز و سیکلوآرتنول سیتاز را افزایش داد (Lee et al. 2004) در پژوهش دیگری تیمار متیل جاسمونات در گیاه جینسینگ، افزایش بیان میزان رونوشت‌های ژن SQS در ریشه‌های رویشی را نشان داد (Kim et al. 2010). این پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ژن SQS در اندام‌هایی که تکثیر سلول‌ها در آن‌ها فعال است به شدت بیان می‌شوند (Lambert et al. 2011). با توجه به اینکه استرول مهم‌ترین ترکیب غشای سلولی است، ایجاد و گسترش غشای سلولی در اندام‌هایی با تکثیر بالا نیاز به استرول بیشتری دارد (Uchida et al. 2009). در گیاه یونجه فقط یک ژن SQS روی کروموزوم ۴ مشخص شده که با تیمار متیل جاسمونات بعد از ۲۴ ساعت، به میزان ۴/۵ برابر بیشتر القاء شد

(Naoumkina et al. 2010). انتقال ژن SQS1 تحت پیشبر قوی به آرابدوپسیس، افزایش بیان رونوشت SQS1 و افزایش ترکیبات فیتواستروئول را نشان داد (Nguyen et al. 2013). مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین SQS1 آنزیم کلیدی در بیوسنتز ساپونین تری‌ترپنویید و فیتواستروئول است. در سرخدار بیان ژن SQS در اندام‌های ریشه، ساقه و برگ با روش RT-PCR، بررسی شد و بیان بالای SQS در ریشه نسبت به سایر اندام‌ها گزارش شد (Huang et al. 2007). در گیاه سویا بیان دو ژن SQS در ریشه، ساقه، برگ، گل و بذرها با روش qRT-PCR (real-time PCR) بررسی شد. هر دو ژن در همه بافت‌های مورد بررسی، بیان شدند، هرچند الگوی بیان آن‌ها تفاوت داشت. ژن SQS1 در بافت ریشه بیان بیشتری نسبت به سایر بافت‌ها داشت (Nguyen et al. 2013). Young-Jun و همکاران (۲۰۱۶) ژن SQS را از گیاه تاج-خروس جداسازی و همسانه‌سازی کردند و در بررسی بیان ژن در اندام‌های مختلف، بیشترین بیان ژن را در بافت ریشه و ساقه گزارش نمودند (Young-Jun et al. 2016). Kim و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه جینسینگ سه ژن SQS را شناسایی نمودند که بیان متفاوتی داشته ولی آنزیم‌های بیان شونده هر سه ژن SQS در تولید سکوالن نقش داشت و مشاهده نمودند که آنزیم SQS1 در همه اندام‌ها بیان بالایی دارد ولی بیان SQS2 و SQS3 وابسته به بافت است. همچنین گزارش نمودند که بیان هر سه ژن با تیمار متیل جاسمونات افزایش می‌یابد هرچند الگوی بیان متفاوتی را نشان می‌دهند. (Kim et al. 2010). بیان بالای ژن SQS در ریشه گیاهان خانواده Fabaceae با انباشته شدن مقدار زیادی از استرول‌ها و ساپونین تری‌ترپن‌ها در ریشه این گیاهان همخوانی دارد (Akamine et al. 2003; Suzuki et al. 2002). Hayashi (۲۰۰۹) گزارش نمود که متابولیت ثانویه گلیسیریزین در ریشه‌های گیاه شیرین بیان تولید می‌گردد و در بخش‌های سبز گیاه گلیسیریزین مشاهده نشده است (Hayashi, 2009). در بررسی بیان ژن در این مطالعه، SQS1 در بافت ریشه و ریشه مویین بیان بالاتری نسبت به بخش سبز گیاه داشت که با داده‌های گزارش شده از تولید متابولیت گلیسیریزین همخوانی دارد. تاکنون ژن SQS1 از گونه شیرین بیان بومی ایران گزارش نشده است. نتایج این مطالعه بیان بیشتر SQS1 در بافت ریشه را نشان می‌دهد

سپاسگزاری

از گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و کلیه کسانی که در انجام این تحقیق همکاری کردند، صمیمانه تشکر و قدرانی می‌شود.

یعنی در اندامی که ساپونین تری‌ترپنوئید گلیسیریزین تولید می‌شود. انتظار می‌رود، استفاده از این ژن در مهندسی متابولیک مسیر تولید گلیسیریزین نیز همراه با موفقیت باشد.



- Abe I, Rohmer M, Prestwich GD. 1993.** Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews* 93: 2189-2206.
- Akamine S, Nakamori K, Chechetka SA, Banba M, Umehara Y, Kouchi H, Izui K, Hata S. 2003.** cDNA cloning, mRNA expression, and mutational analysis of the squalene synthase gene of *Lotus japonicus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1626: 97-101.
- Amani M, Hosein RS, Kashani AM. 2005.** Optimal Extraction of Glycyrrhetic Acid From Licorice Root. *Journal of Food Technology* 3: 576-580.
- Asl MN, Hosseinzadeh H. 2008.** Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research* 22: 709-724. (In Farsi with English abstract).
- Bi W, Tian M, Row KH. 2010.** Solid phase extraction of liquiritin and glycyrrhizin from licorice using porous alkyl-pyridinium polymer sorbent. *Phytochemical Analysis* 21: 496-501.
- Chin YW, Jung HA, Liu Y, Su BN, Castoro JA, Keller WJ, Pereira MA, Kinghorn AD. 2007.** Anti oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4691-4697.
- Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr H. 2003.** Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet* 361: 2045-2046.
- Devarenne TP, Ghosh A, Chappell J. 2002.** Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiology* 129: 1095-1106.
- Ding C, Zhao CL, Chen ZJ, Wei FG, Song DG, Miao KR. 2015.** Bioinformatics analysis of the squalene synthase gene and the amino acid sequence in *ginseng* species. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 118-128.
- Douglas J, Douglas M, Lauren D, Martin R, Deo B. 2004.** Effect of plant density and depth of harvest on the production and quality of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root harvested over 3 years. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 32: 363-373.
- Filiz E, Ozyigit II, Vatansever R. 2016.** Comparative analyses of squalene synthase (SQS) proteins in poplar and pine by using bioinformatics tools. *Tree Genetics and Genomes* 12: 1-11.
- Hajimehdipoor H, Amanzadeh Y, Hasanloo T, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M. 2008.** Investigating on the quality of wild licorice roots collected from different regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants* 3: 106-114. (In Farsi with English abstract).
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. 1998.** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 48: 125-129.
- Hata S, Sanmiya K, Kouchi H, Matsuoka M, Yamamoto N, Izui K. 1997.** cDNA cloning of squalene synthase genes from mono- and dicotyledonous plants, and expression of the gene in rice. *Plant and Cell Physiology* 38: 1409-1413.
- Hayashi H, Hirota A, Hiraoka N, Ikeshiro Y. 1999.** Molecular cloning and characterization of two cDNAs for *Glycyrrhiza glabra* squalene synthase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22: 947-950.
- Hayashi H, Huang P, Inoue K. 2003.** Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant and Cell Physiology* 44: 404-411.
- Hayashi H. 2009.** Recent advances in plant biotechnology. Springer, New York, USA, 89-103.
- Huang Z, Jiang K, Pi Y, Hou R, Liao Z, Cao Y, Han X, Wang Q, Sun X, Tang K. 2007.** Molecular cloning and characterization of the yew gene encoding squalene synthase from *Taxus cuspidata*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40: 625-635.
- Ibanoglu E, Ibanoglu S. 2000.** Foaming behaviour of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. *Food Chemistry* 70: 333-336.
- Jennings SM, Tsay YH, Fisch TM, Robinson GW. 1991.** Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 6038-6042.
- Khanahmadi M, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, KhalighiSigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, Hajiaghache R. 2013.** A Review on Medicinal Plant of *Glycyrrhiza glabra* L. *Journal of Medicinal Plants* 2: 1-12. (In Farsi with English abstract).

- Kim OT, Kim SH, Ohyama K, Muranaka T, Choi YE, Lee HY, Kim MY, Hwang B. 2010. Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase. *Plant Cell Reports* 29: 403-411.
- Kojoma M, Hayashi S, Shibata T, Yamamoto Y, Sekizaki H. 2011. Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34: 1334-1337.
- Kribii R, Arro M, Arco A, Gonzalez V, Balcells L, Delourme D, Ferrer A, Karst F, Boronat A. 1997. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase. *European Journal of Biochemistry* 249: 61-69.
- Kyte J, Doolittle R. 1982. Simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Lambert E, Faizal A, Geelen D. 2011. Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164: 220-237.
- Lee JH, Yoon YH, Kim HY, Shin DH, Kim DU, Lee IJ, Kim KU. 2002. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and cells* 13: 436-443.
- Lee MH, Jeong JH, Seo JW, Shin CG, Kim YS, In JG, Yang DC, Yi JS, Choi YE. 2004. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant and Cell Physiology* 45: 976-984.
- Lehtihet M, Nygren A. 2000. Licorice an old drug and currently a candy with metabolic effects. *Lakartidningen* 97: 3892-3894.
- Li YJ, Chen J, Li Y, Li Q, Zheng YF, Fu Y, Li P. 2011. Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 8181-8191.
- Naoumkina MA, Modolo LV, Huhman DV, Urbanczyk-Wochniak E, Tang Y, Sumner LW, Dixon RA. 2010. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 22: 850-866.
- Nguyen HT, Neelakadan AK, Quach TN, Valliyodan B, Kumar R, Zhang Z, Nguyen HT. 2013. Molecular characterization of *Glycine max* squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 73: 23-32.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 145-148.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 939-966.
- Robinson GW, Tsay Y, Kienzle BK, Smith-Monroy CA, Bishop RW. 1993. Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation. *Molecular and Cellular Biology* 13: 2706-2717.
- Sato H, Goto W, Yamamura Ji, Kurokawa M, Kageyama S, Takahara T, Watanabe A, Shiraki K. 1996. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. *Antiviral Research* 30: 171-177.
- Seo JW, Jeong JH, Shin CG, Lo SC, Han SS, Yu KW, Harada E, Han JY, Choi YE. 2005. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry* 66: 869-877.
- Shibata S. 2000. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 120: 849-862.
- Shirazi Z, Piri K, Asl AM, Hasanloo T. 2012. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 4640-4646.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda S, Dixon RA. 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 32: 1033-1048.
- Tansey TR, Shechter I. 2000. Structure and regulation of mammalian squalene synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1529: 49-62.
- Tian M, Yan H, Row KH. 2008. Extraction of glycyrrhizic acid and glabridin from licorice. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 571-577.
- Uchida H, Yamashita H, Kajikawa M, Ohyama K, Nakayachi O, Sugiyama R, Yamato KT, Muranaka T, Fukuzawa H, Takemura M. 2009. Cloning and characterization of a squalene synthase gene from a petroleum plant, *Euphorbia tirucalli* L. *Planta* 229: 1243-1252.
- Utsunomiya T, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. 1997. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 551-556.
- Wang Z, Nishioka M, Kurosaki Y, Nakayama T, Kimura T. 1995. Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* extract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18: 1238-1241.

- Wentzinger LF, Bach TJ, Hartmann MA. 2002.** Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiology* 130: 334-346.
- Wittschier N, Faller G, Hensel A. 2009.** Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 218-22.
- Young-Jun P, Nemoto K, Minami M, Matsushima K, Nomura T, Kinoshita J, Nishikawa T. 2016.** Molecular Cloning, Expression and Characterization of a Squalene Synthase Gene from Grain Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Japan Agricultural Research Quarterly* 50: 307-317.
- Zhang M, Wang S, Yin J, Li C, Zhan Y, Xiao J, Liang T, Li X. 2016.** Molecular cloning and promoter analysis of squalene synthase and squalene epoxidase genes from *Betula platyphylla*. *Protoplasma* 253: 1347-1363.
- Zhao H, Tang Q, Mo C, Bai L, Tu D, Ma X. 2017.** Cloning and characterization of squalene synthase and cycloartenol synthase from *Siraitia grosvenorii*. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7: 215-222.

Cloning, bioinformatics study and gene expression evaluation of Squalene Synthase 1 in Iranian native licorice

Zahra Shirazi¹, Ali Aalami^{2*}, Masoud Tohidfar³, Mohammad Mehdi Sohani²

1- Ph.D. student 2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran

3- Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

*Email corresponding author: ali_aalami@guilan.ac.ir

Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) is one of the most important medicinal plants and contains bioactive compounds such as triterpene saponins (glycyrrhizin) and phytosterols. Squalene synthase (EC 2.5.1.21) is a membrane- bound enzyme that converts two farnesyl diphosphate molecules into squalene, a key precursor for sterol and triterpene biosynthesis. In this study, the coding sequence of squalene synthase 1 in Iranian native licorice was cloned in pTZ57R/T and the characterization of its polypeptide was predicted by using bioinformatic tools. The cDNA of *GgSQS1* is 1242bp and encodes a 413 amino acid polypeptide. Bioinformatic analysis revealed that the deduced *GgSQS1* polypeptide had high similarity with squalene synthase1 of members of the *glycyrrhiza* genus. Subcellular analysis showed that the activity of this polypeptide is in the endoplasmic reticulum. The molecular weight of this polypeptide is 47.3 kDa with a pI value of 8.18. Two transmembrane domains and two protected regions were detected in the amino acid sequence. The three-dimensional protein structure was predicted using I-TASSER software. In the predicted structure, transmembrane helixes, hydrophobic amino acids, the conserved sequence and amino acids on the protein surface were identified using Chimera software. Studies of Squalene synthases1 gene expression showed that the highest and lowest expression occur in the root and green organs of the plant, respectively.

Keywords: *Glycyrrhiza*, Glycyrrhizin, Phytosterol, qRT-PCR, Terpenoid