مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۴۸-۳۷

همسانه‌سازی، مطالعه بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن سکوالن سینتاز ۱ در شیرین‌بیان 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 Shirazi[1], Ali Aalami[2*], Masoud Tohidfar[3], Mohammad Mehdi Sohani[2]

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

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که دارای ترکیبات فعال زیستی مانند ساپونین تری‌ترپنوئیدها (گلیسیریزین) و فیتواسترول‌ها 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 می‌کند. سکوالن پیش ماده اصلی بیوسنتز تری‌ترپن‌ها و استرول‌ها است. در این مطالعه توالی بیان کننده سکوالن سینتاز ۱ شیرین‌بیان بومی ایران در وکتور pTZ57R/T همسانه‌سازی و ویژگی‌های بیوانفورماتیکی پلی‌پپتید با استفاده از نرم‌افزارها پیش‌بینی شد. cDNA سکوالن سینتاز ۱، ۱۲۴۲ جفت باز دارد و یک پلی‌پپتید ۴۱۳ آمینواسیدی را بیان می‌کند. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که پلی‌پپتید سکوالن سینتاز ۱ شیرین‌بیان، بیشترین شباهت را با سکوالن سینتاز ۱ جنس *Glycyrrhiza* دارد. بررسی جایگاه درون‌سلولی 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 حفاظت‌شده مشخص شد. ساختار سه‌بعدی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار I-TASSER پیشگویی شد. در ساختار پروتئین پیشگویی شده، مارپیچ فراغشایی، آمینواسیدهای آب‌گریز، توالی حفاظت شده و آمینواسیدهای سطح پروتئین با نرم‌افزار Chimera مشخص شد. الگوی بیان ژن سکوالن سینتاز ۱ نشان داد که بیشترین و کمترین بیان به‌ترتیب مربوط به ریشه و اندام سبز گیاه است.

واژه‌های کلیدی

ترپنوئید، RT-PCR، کمی، فیتواسترول، گلیسیریزین، *Glycyrrhiza*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

مقدمه

شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L.، گیاهی چندساله از خانواده بقولات (Fabaceae) و یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران است که مقدار زیادی از ریشه آن سالیانه به کشورهای مختلف صادر می‌شود (Amani *et al*. 2005; Bi *et al*. 2010; Khanahmadi *et al*. 2013; Tian *et al*. 2008). ریشه شیرین‌بیان دارای ترکیبات مختلفی ازجمله تری‌ترپن ساپونین‌ها (گلیسیریزین، سویا ساپونین)، فلاونوئیدها، ایزوفلاون، هیدروکسی کومارین، استرول، رزین، روغن‌های فرار، ساکارز (۲-۱ درصد)، نشاسته، پلی‌ساکارید (۳۰-۲ درصد) و به مقدار جزئی اسانس است (Asl and Hosseinzadeh 2008; Hajimehdipoor *et al*. 2008; Wittschier *et al*. 2009). ریشه شیرین‌بیان حاوی یکی از مهم‌ترین ترکیبات دارویی خام دنیا با نام گلیسیریزین (۲-۸ درصد وزن خشک) است (Asl and Hosseinzadeh 2008; Ibanoglu and Ibanoglu, 2000; Shibata, 2000). گلیسیریزین، یک نوع اولئان تری‌ترپنوئید ساپونین و حدود ۵۰ بار شیرین‌تر از شکر است و به‌عنوان شیرین‌کننده و طعم‌دهنده در صنایع غذایی استفاده می‌شود (Chin *et al*. 2007). شیرین‌بیان در اختلالات کبدی حاد، هپاتیت B و C مزمن، هپاتیت عفونی، عفونت HIV و بیماری‌های سیستم ایمنی مؤثر است و مانع همانندسازی ویروس HIV در بیماران مبتلا به ایدز می‌شود و اثر محافظتی گیاه در بیماری‌های کبدی، التهاب و زخم‌های معده مربوط به ماده مؤثره گلیسیریزین است (Haraguchi *et al*. 1998; Li *et al*. 2011; Sato *et al*. 1996). گلیسیریزین اثر ضدویروسی در برابر عفونت ناشی از ویروس آنفلوانزا نیز دارد (Lehtihet and Nygren 2000; Utsunomiya *et al*. 1997). بررسی‌های آزمایشگاهی، اثر ضد - سرطانی و فعالیت ضد ویروسی قوی گلیسیریزین در برابر سندروم حاد تنفسی (سارس) را نشان داده‌اند (Cinatl *et al*. 2003; Wang *et al*. 1995). بیوسنتز ترپنوئیدها در شیرین‌بیان با تبدیل دو مولکول فارنسیل دی‌فسفات (FDP) به‌وسیله آنزیم سکوالن سینتاز(squalene synthase) به سکوالن شروع می‌شود (Jennings *et al*. 1991; Robinson *et al*. 1993). آنزیم سکوالن سینتاز با اتصال دو مولکول فارنسیل دی‌فسفات ترکیب ۳۰ کربنه سکوالن را تولید می‌کند و این واکنش را در دو مرحله انجام می‌دهد. در مرحله اول اتصال دو مولکول FDP را تسریع کرده و پری‌سکوالن پیروسولفات (PSPP) را تولید می‌کند. در مرحله بعدی PSPP در حضور NADPH و Mg^{2+} به سکوالن تبدیل می‌شود (Tansey and Shechter, 2000). در گیاهان، آنزیم SQS نقش مهمی در تنظیم بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترپنوئیدها 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 شیرین‌بیان (Hayashi *et al*. 1999)، تنباکو (Devarenne *et al*. 2002) ، جینسینگ (Lee *et al*. 2004) ، آرابیدوپسیس (Kribii *et al*. 1997) ، فلفل زینتی (Lee *et al*. 2002) ، یونجه (Suzuki *et al*. 2002) ، سویا (Nguyen *et al*. 2013) و سایر گیاهان گزارش‌شده 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 اندام‌های مختلف بررسی کردند (Zhao *et al*. 2017). Filiz و همکاران (۲۰۱۶) در دو گیاه صنوبر و افرا ویژگی پروتئین بیان شونده SQS را با نرم‌افزارها بررسی نمودند. Zhang و همکارن (۲۰۱۶) طول کامل ژن SQS گیاه توس سفید را همسانه‌سازی کردند و بیان ژن را در ریشه، ساقه و برگ‌های گیاه ۴ هفته‌ای بررسی کردند و گزارش نمودند که ژن *SQS* در تولید ترپنوئیدها نقش دارد (Zhang *et al*. 2016). بررسی متابولیکی اندام‌های مختلف شیرین‌بیان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی گازی (GC) نشان داد که گلیسیریزین فقط در ریشه‌های ضخیم گیاه تولید می‌شود. در قسمت‌های هوایی، ریشه‌های فرعی و گره‌های ریشه‌ای گلیسیریزین مشاهده نگردید (Hayashi, 2009). از طرفی شیرازی و همکاران، تولید گلیسیریزین در ریشه مویین *G.glabra* ایرانی را گزارش کردند که تا قبل از آن، عدم تولید گلیسیریزین درکشت ریشه مویین و سوسپانسیونی این گونه گزارش‌شده بود (Shirazi *et al*. 2012). تنوع ژنتیکی درون گونه و تنوع محیطی از عوامل مؤثر در سنتز گلیسیریزین است و برای مطالعات مسیر بیوسنتز گلیسیریزین بهتر است از واریته‌ای استفاده شود که گلیسیریزین بیشتری تولید می‌کند (Kojoma *et al*. 2011). در پژوهش‌ها، شیرین‌بیان بومی ایران دارای بیشترین مقدار

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

گلیسیریزین گزارش‌شده است (Douglas *et al.* 2004). بدین منظور در این مطالعه توالی کامل cDNA بیان کننده 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 بیان کننده *SQS* در جنس *Glycyrrhiza* شناسایی‌شده است که با بررسی بیان ژن *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^{TM} M-MuLV) شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد.

طراحی آغازگرها و تکثیر ناحیه بیان کننده ژن *SQS1*

جهت طراحی آغازگرها از توالی نوکلئوتیدی ناحیه بیان کننده *SQS1* جنس *Glycyrrhiza* موجود در بانک داده‌NCBI با شماره دسترسی D86409.1، AM182329.1 و AM182331.1 استفاده شد و یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر ناحیه بیان کننده این ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه هفت طراحی شد. توالی آغازگرها شامل آغازگرهای رفت - 5’AAGGAGGATCCTATGGGGAGTTTGG و برگشت- 5’AAAGAGCTCCTCCTAATTATCTTGGCGTT توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، یک میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از آغازگرهای رفت‌وبرگشت (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. درنهایت قطعه تکثیرشده از روی ژل و با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Thermo Fisher Scientific خالص‌سازی شد.

همسانه‌سازی و توالی یابی 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 Thermo Scientific Ins TAclone PCR Cloning 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 *Xba*I و *Bam*HI 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 رفت‌وبرگشت 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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

بررسی پروتئین پیش‌گویی شده

توالی نوکلئوتیدی به توالی اسیدآمینه‌ای ترجمه شد. هم‌ردیف سازی 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 فیزیکوشیمیایی پروتئین با نرم‌افزار Protparam (http://web.expasy.org/protparam)، پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین بیان شونده با (https://npsaprabi.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 هیدورپونیک کشت شدند. برای تولید ریشه مویین 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 مویین برای حذف باکتری واکشت ریشه‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انجام شد. بعد از اطمینان ازحذف باکتری، برای تأیید مولکولی ریشه‌های مویین استخراج DNA از ریشه‌ها انجام گرفت. (Shirazi *et al.* 2012). تأیید تراریختی ریشه مویین با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B موجود در ناحیه T-DNA باکتری انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B شامل آغازگرهای رفت 5'TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC- و برگشت 5'TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. بعد از تأیید وجود ژن *rol*B در ریشه‌های مویین، ریشه ها به محیط مایع منتقل شدند. بعد از گذشت یک ماه از ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های کشت‌شده در محیط هیدروپونیک و همچنین ریشه مویین 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* بـا اسـتفاده از روش RT–PCR کمی با آغازگرهای اختصاصـی ژن همسانه‌سازی شده و ژن کنترل داخلی ۱۸s 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 $۲^{-\Delta CT}$ 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 به‌طول 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 *Xba*I و *Bam*HI نیز باند ۱۲۴۲ bp را نشان داد (شکل ۱، ب).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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
SQS_1-Forward	5'-GGTTCTTCGAGCCCTTGACA	۵۸
SQS_1-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*. M – 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. M- 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

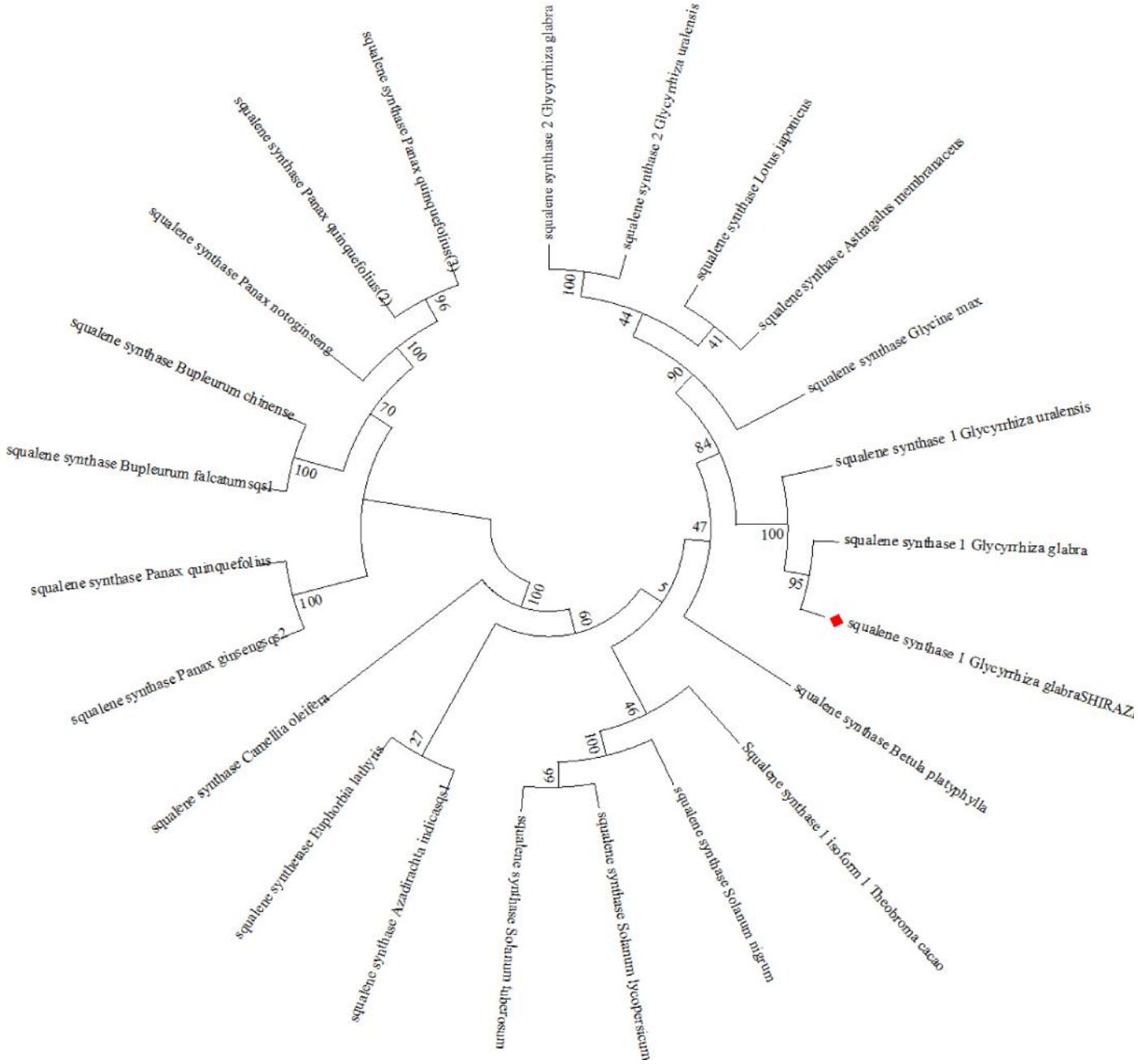
نتایج توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی شده نشان داد، cDNA بیان کننده ژن *SQS1* به‌طور کامل جداسازی شده است. توالی با کدون ATG آغازشده و با کدون TAG خاتمه یافته و یک پروتئین ۴۱۳ اسیدآمینه‌ای را بیان می‌کند. یافته‌های کامل این توالی در بانک داده NCBI ثبت و با شماره دسترسی KT987235.1 در دسترس است. این ژن ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به سکوالن سینتاز گونه *glabra* ثبت‌شده در NCBI به شماره دسترسی D86409.1 و BAA13083.1 دارد. نتایج هم‌ردیف سازی چندگانه توالی اسیدآمینه‌ای و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با SQS سایر گیاهان با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 با روش nieghbor joining انجام شد و نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان داد که بیشترین تشابه را با SQS1 جنس *Glycyrrhiza* دارد (شکل ۲).

بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین SQS1

نتایج تجزیه با نرم‌افزار Protparam نشان داد فرمول مولکولی توالی پروتئینی SQS1، $C_{2117}H_{3359}N_{567}O_{602}S_{27}$ است. وزن مولکولی محاسبه‌شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی‌شده این توالی به‌ترتیب ۴۷/۳ کیلودالتون و ۸/۱۸ است. شاخص ناپایداری پروتئین ۴۳/۲۰ محاسبه شد که جزء پروتئین‌های ناپایدار است (شاخص پروتئین‌هایی پایدار کمتر از ۴۰ است) و ممکن است پروتئین برای پایداری نیاز به پردازش بعد از ترجمه داشته باشد. شاخص آلیفاتیک، به‌عنوان 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 نرم‌افزار

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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 پلی‌پتیدی است. دمین‌های آب‌گریز در بالا و دمین‌های آب‌دوست در زیرخط صفر قرار دارند (شکل ۳، الف). الگوی آب‌گریزی-آبدوستی نقش مهمی در پیش‌بینی ساختار دوم و تقسیم نواحی عملکردی پروتئین دارد. بررسی ساختار دوم پروتئین با نرم‌افزار SOPMA نشان داد که این پروتئین دارای ۲۸۲ مارپیچ α (۶۸/۲۸ درصد)، ۳۱ رشته قابل‌تعمیم (۷/۵۱ درصد)، ۱۹ پیچ β (۴/۶۰ درصد) و ۸۱ پیچ تصادفی (۱۹/۶۱ درصد) است. بررسی جایگاه درون-سلولی با نرم‌افزار 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.

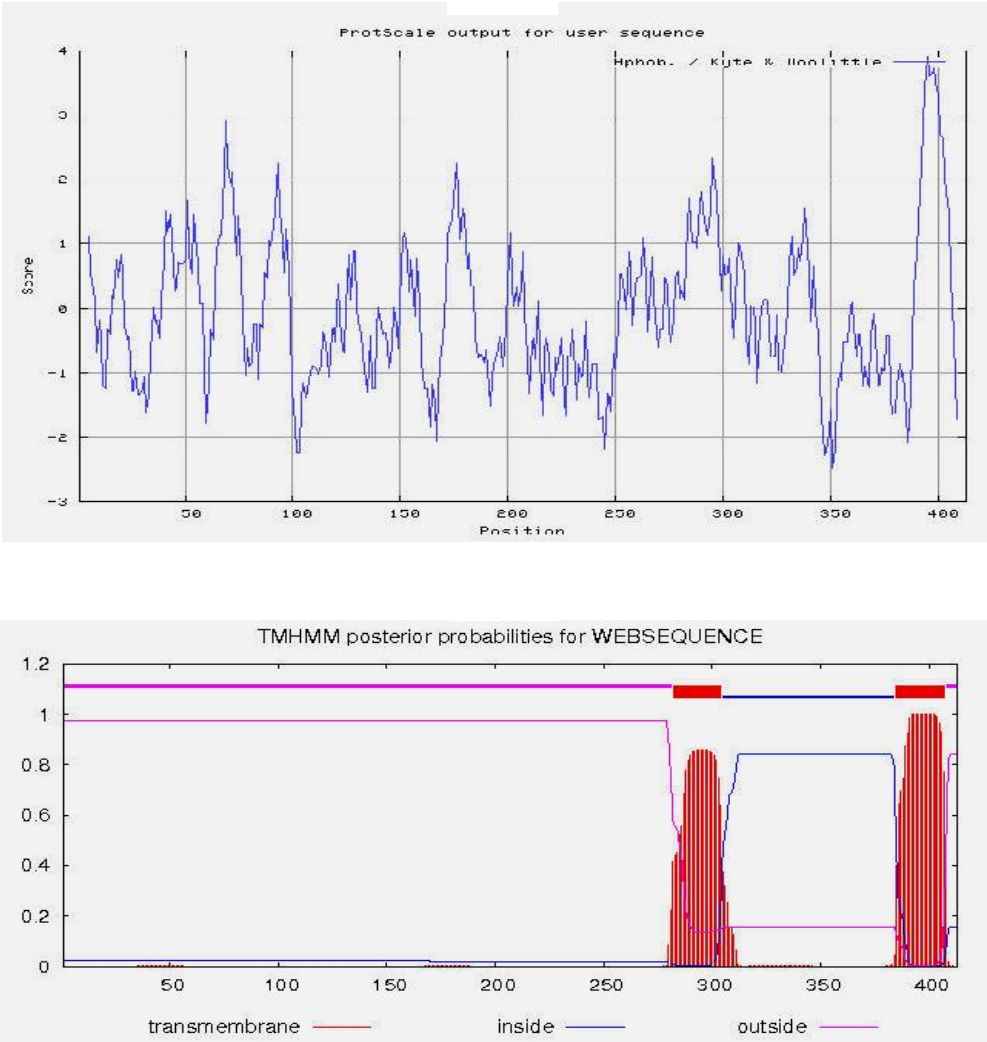


شکل ۲-درخت فیلوژنتیکی توالی اسیدآمینه‌ای SQS1 با SQS سایر گیاهان

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

بررسی بخش‌های فراغشایی با استفاده از برنامه TMHMM نسخه دو مشخص شد که دو مارپیچ فراغشایی در موقعیت اسیدآمینه‌های ۳۰۴-۲۸۲ و اسیدآمینه‌های ۴۰۷- ۳۸۵ قرار دارد و اسیدآمینه‌های ۲۸۱-۱ به‌سمت خارج، ۳۰۴-۲۸۲ فراغشایی، ۳۸۴-۳۰۵ داخلی،۴۰۷-۳۸۵ فراغشایی و ۴۱۳-۴۰۸ به‌سمت خارج قرار دارند (شکل ۳، ب). بررسی توالی حفاظت شده پروتئین SQS1 با برنامه Prosite دو توالی Y-[CSAM]-x(2)-[VSG]-A-[GSA]-[LIVAT]-[IV]-G-x(2)-[LMSC]-x(2)-[LIV] و [LIVM]-G-x(3)-Q-x(2,3)-[ND]-[IFL]-x-[RE]-D-[LIVMFY]-x(2)-[DE]-x(4,7)-R-x-[FY]-x-P را به‌عنوان الگوی حفاظت‌شده پروتئین مشخص کرد که این موتیف‌ها با استفاده از برنامه Scan Prosite و Pfam در موقعیت ۱۸۳-۱۶۸ توالی پروتئین شامل اسیدآمینه‌های YChyVAGLVGlgLskL و موقعیت ۲۲۹-۲۰۱ شامل اسیدآمینه‌های MGlflQktNIiRDYleDineipksRmFwP می‌باشند. پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین با برنامه I-TASSER و تجزیه‌وتحلیل آن با نرم‌افزار Chimera انجام گرفت. ساختار فراغشایی، اسیدآمینه‌های آب‌گریز، ساختار سطحی و موتیف حفاظت‌شده در مدل پروتئینی پیش‌بینی‌شده، مشخص‌شد (شکل ۴).

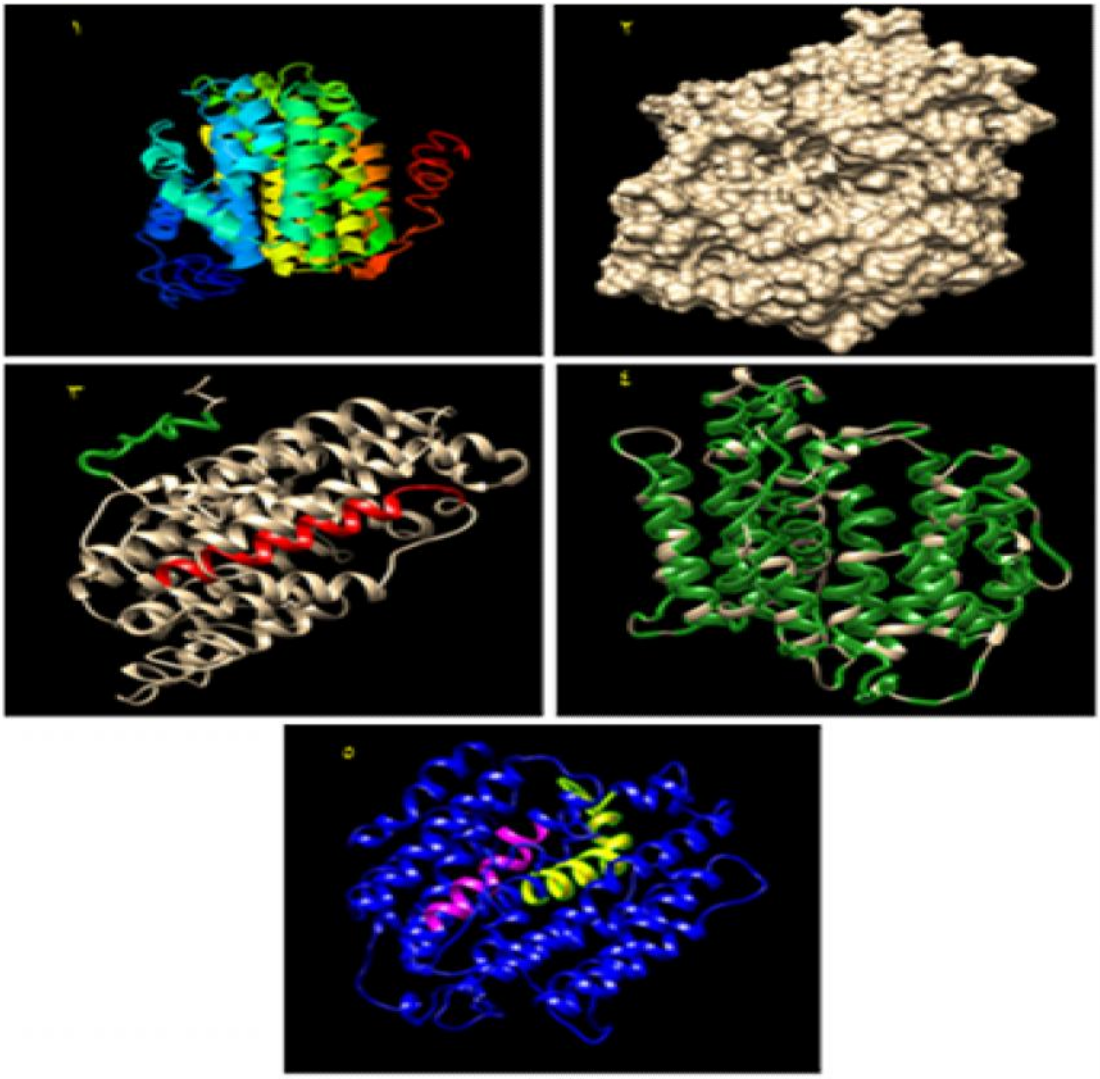


شکل ۳- بالا: الگوی آب‌گریزی-آبدوستی پروتئین SQS1. پایین: بررسی ناحیه فراغشایی پروتئین SQS1 توسط برنامه TMHMM

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]



شکل ۴ – نمایش ساختار سه‌بعدی پروتئین با برنامه I-TASSER و بررسی آن با نرم‌افزار Chimera. ۱- ساختار سه‌بعدی روبان. ۲- سطح پروتئین. ۳- بخش‌های فراغشایی. ۴- اسیدآمینه‌های آب‌گریز. ۵- توالی حفاظت شده پروتئین: توالی YChyVAGLVGlgLskL (رنگ صورتی) و توالی MGlflQktNIiRDYleDineipksRmFwP (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- concerved sequence of the protein: YChyVAGLVGlgLskL sequence (pink) and MGlflQktNIiRDYleDineipksRmFwP sequence (yellow).

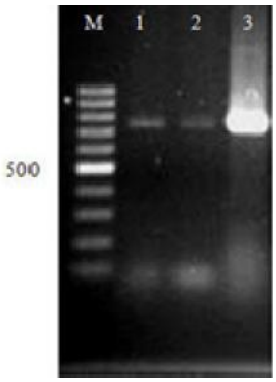
بررسی بیان ژن *SQS1* در اندام‌های مختلف گیاه شیرین‌بیان

بعد از تلقیح برگ گیاهچه‌های شیرین‌بیان و ظهور ریشه‌های مویین برای تایید تراریختی ریشه های مویین و ورود ناحیه T-DNA به ژنوم ریشه‌ها از تکثیر ژن *rol*B موجود در ناحیه T-DNA استفاده شد. تکثیر DNA ریشه مویین با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*B، قطعه ۷۸۰ جفت بازی را نشان داد (شکل ۵) که نشان‌دهنده تراریخته بودن ریشه‌های به‌دست‌آمده و انتقال ژن *rol*B به ژنوم ریشه‌ها است.

بیان ژن *SQS1* در اندام‌های ریشه، اندام هوایی (سبز) و ریشه مویین 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).

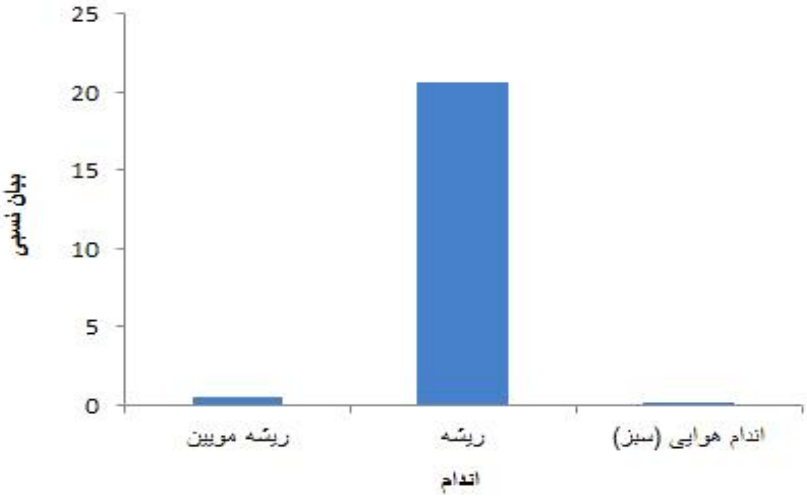
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]



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

Figure 5. Electrophoresis of PCR product for *rol*B 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

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 کلیدی را در مسیر ایزوپرن‌ها و بردن جریان کربنی به‌سمت بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترپنوئیدها دارد (Abe *et al*. 1993; Piironen *et al*. 2000; Wittschier *et al*. 2009). پیش‌بینی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

دو بخش فراغشایی در ساختار پروتئین مشخص شد که در ناحیه C-terminal قرارگرفته است و باتوجه 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 به‌دست‌آمده در این پژوهش با توالی ثبت‌شده، 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 مارپیچ 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)، افوربیا (Uchida *et al*. 2009) و برنج (Hata *et al*. 1997) یک ژن *SQS* و در آرابیدوپسیس (Kribii *et al*. 1997) و شیرین‌بیان، دو ژن *SQS* شناسایی‌شده است (Hayashi *et al*. 2003). درکشت سلولی شیرین‌بیان، 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 پایین‌دست مثل سکوالن اپوکسیداز، دامارندیول سینتاز، بتاآمیرین سینتاز وسیکلوآرتنول سینتاز 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 به‌شدت 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 مشخص‌شده 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 آرابیدوپسیس، افزایش بیان رونوشت *SQS1* و افزایش ترکیبات فیتواسترول را نشان داد (Nguyen *et al*. 2013). مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین SQS1 آنزیم کلیدی در بیوسنتز ساپونین تری‌ترپنویید و فیتواسترول 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 بذرهای جوان با روش real-time PCR (qRT-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 شناسایی‌نمودند 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 شیرین‌بیان 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 گزارش‌شده از تولید متابولیت گلیسیریزین همخوانی دارد. تاکنون ژن *SQS1* از گونه شیرین‌بیان بومی ایران گزارش نشده است. نتایج این مطالعه بیان بیشتر *SQS1* در بافت ریشه را نشان می‌دهد

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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.

سپاسگزاری

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

منابع

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 Glycyrrhetinic Acid Froml icorice 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, Hajiaghaee R. 2013. A Review on Medicinal Plant of *Glycyrrhiza glabra* L. Journal of Medicinal Plants 2: 1-12. (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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 SQS*1 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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 Shirazi[1], Ali Aalami[2]*, Masoud Tohidfar[3], Mohammad Mehdi Sohani[2]

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.4.6]

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