جداسازی، کلونینگ و بررسی بیان موقت ژن *sat* از گیاه شقایق الی‌فرا *papaver somniferom* Rence

بهمن حسینی* - هاله هاشمی سهی - فرجا... شهریاری - حسن مرعشی [1]

تاریخ دریافت:۸۷/۲/۲۴

تاریخ پذیرش:۸۷/۹/۲

چکیده

آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی گروه متنوعی ازترکیبات ازت‌دار هستند که در ۲۰ درصد گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. در مهندسی متابولیک جداسازی ژنهای مؤثر در بیوسنتز مرفین *opium poppy* و تولید آلکالوئیدهای ویژه دارای اهمیت می‌باشد. آنزیم SAT تبدیل آلکالوئید سالوتاردینول به سالوتاردینول -۷ أ- استات که پیش ماده اولیه تبائین در مسیر بیوسنتزی مرفین به‌شمار می‌آید را عهده‌دار می‌باشد. در این مطالعه ژن کدکننده آنزیم SAT با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر توالی ژن در بانکهای اطلاعاتی از گیاهان شقایق الی‌فرا رقم Rence جدا گردید. سپس در ناقلهای کلونینگ و ناقل بیانی تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S کلون گردید. نتایج کلونینگ این ژن با استفاده ازروشهای مختلف مولکولی هضم آنزیمی و PCR تأیید گردید. بیان موقت ژن *sat* با استفاده از روش آگروباینفیلتراسیون، منجر به تولید مرفین و کدئین و پاپاورین در برگهای تراریخت شده با ژن *sat* در مقایسه با برگهای غیرتراریخت گردید.

واژه های کلیدی: آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی، سالوتاردینول-۷- أ - استیل‌ترانسفراز، *opium poppy*

مقدمه

گیاهان خانواده شقایق پاپاوراسه شامل *Caliornia poppy* و *Opium poppy* به لحاظ دارا بودن داروهای تخدیری و ترکیبات مرتبط دارای اهمیت تجاری خاصی هستند. *بومیان آمریکای شمالی از C. poppy* به عنوان گیاه دارویی سنتی استفاده می‌نمودند (۱). خصوصیات دارویی این گیاه مربوط به قابلیت تولید و بیوسنتز گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیر گروه آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی می‌باشد. آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی گروه متنوعی ازترکیبات ازت‌دار هستند که پراکنش تاکسونومی محدودی در بین گیاهان دارند. محصولات بدست آمده از *O. poppy* بیش از ۱۰۰ آلکالوئید مختلف می‌باشد که از پیش ماده اولیه ال-تیروزین و ماده حدواسط مرکزی اس-رتیکولین ساخته می‌شوند. مرفین به همراه مواد شیمی‌درمانی دیگر نظیر وین‌کریستین [2]، وین‌بلاستین [3] و کامپتوتسین [4] از آلکالوئیدهای مهم تجاری شده هستند که از گیاهان دارویی استخراج می‌شوند. علاوه بر خصوصیات و

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، دانشیار و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

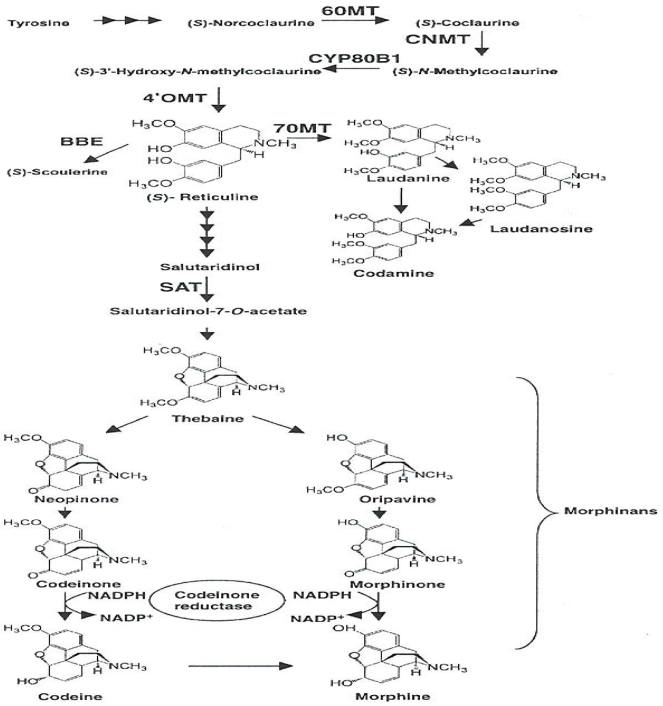
*- نویسنده مسئول Email: bhosseini57@gmail.com

2- Vincristine
3- vinblastine
4- camptothecine

Archive of SID

www.SID.ir

عملکردهای متنوع اکولوژیکی مربوط به رابطه پاتوژن- گیاه و گیاه- حیوان علفخوار، بسیاری از این‌ها دارای خصوصیات و فعالیت مهم دارویی می‌باشند و برخی نیز به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان مثال می‌توان به مسکن‌هایی نظیر مرفین و کدئین، آنتی‌بیوتیکهایی مانند سانگوایناریـن[1] دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد التهابی، نوسکاپین‌ها با خاصیت ضد سرفه و ضد توموری، پاپاورین به عنوان گشاد کننده رگها و توبوکورارین[2] شل کننده عضلات اشاره نمود (۱۷). سنتز شیمیایی این ترکیبات ارزشمند بدلیل ساختار پیچیده‌شان بسیار سخت است. بنابراین گیاهان وحشی یا اهلی به عنوان تنها منبع تجاری تامین کننده این ترکیبات مورد توجه می باشند. مرفینها به عنوان آلکالوئیدهای ۵ حلقه‌ای بنزیل‌ایزوکوئینولین، شامل تبائین، کدئین، مرفین و مشتقات آنها می‌باشند. درشکل (۱) چرخه بیوسنتز مرفین و آنزیمهای درگیر در این مسیر نمایش داده شده است (۱۶).



شکل (۱) مسیر کامل بیوسنتز مرفین

محتوی آلکالوئیدی در شقایقهای برداشت شده (کپسولهای خشک شده و قسمت بالایی ساقه) در ایالت تاسمانیای استرالیا معمولا" در حدود ۱/۵ تا ۲/۷ درصد وزن خشک اولیه می‌باشد. افزایش میزان آلکالوئید باعث افزایش رقابت‌پذیری صنعت کشت شقایق شامل کشت، انتقال، ذخیره و عصاره‌گیری و حذف ضایعات می‌شود. با استفاده از روشهای اصلاح نباتات میزان آلکالوئید در دودهه اخیر دو برابر شده است. با این حال افزایش سریع در عملکرد مرفین از طریق اصلاح سنتی تقریبا" محدود شده است.

جداسازی ژنهای مؤثر در بیوسنتز مرفین جهت بهبود مهندسی متابولیک *O.poppy* و تولید آلکالوئیدهای ویژه اهمیت زیادی دارد. یکی از توانایی‌های ارزشمند استفاده از

1- Sanguinarine
2- Tobcurarine

www.SID.ir

مهندسی ژنتیک، دستورزی مسیرهای بیوسنتتیک سلول گیاه و هر یک از متابولیت‌ها می‌باشد. میزان تولید مواد آلکالوئیدی مختلف را می‌توان با استفاده از دستورزی ژنتیکی آنزیم‌های کلیدی شرکت‌کننده در مسیر متابولیکی تولید مرفین و کدئین تغییر داد. در این روش‌ها می‌توان با واردنمودن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قراردادن آنها در کنار پیش‌برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. از طرف دیگر با استفاده از روش‌های خاموشی ژن[1] از طریق بکارگیری توالی‌های آنتی‌سنس، این امکان وجود دارد تا از طریق مهار تولید این آنزیم‌ها، راه متابولیکی را به سمت محصول مورد نظر نشانه‌گیری کرد. مسیر سنتز آنزیمی مرفین در *O.poppy* توسط لبنز و زنک (۱۹۹۵) و نیز توسط کوچان (۱۹۹۸) به طور کامل تشریح شده است. برخلاف تلاشهای بسیار زیادی که در طی سالهای اخیر جهت سنتز شیمیایی مرفین و کدئین انجام شده است، هنوز تولید اقتصادی آن با موفقیت چندانی همراه نبوده است. بنابراین تولید این مواد در گیاهان، مهمترین منبع مورد نیاز جهت تأمین نیازهای روزافزون انسان به داروهای آرام‌بخش می‌باشد. سالوتاردینول-۷-اُ- استیل ترانسفراز[2] تبدیل آلکالوئید فنانترن، سالوتاردینول به سالوتاردینول -۷ آ- استات، پیش ماده اولیه تبائین در طول مسیر بیوسنتز مرفین را بر عهده دارد (۶). مرفین از دو مولکول اسید آمینه ال-تیروزین[3] در طی حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی تولید می‌شود. مراحل آخر در مسیر بیوسنتز مخصوصا" از اس-رتیکولین[4] که یک ماده حدواسط در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین تا سنتز مرفین می‌باشد، سه آنزیم اکسیدوردوکتاز وابسته به NADPH (۱۰، ۴، ۲)، با احتمال زیاد سه آنزیم سیتوکروم P-450 (۵) و یک آنزیم استیل‌ترانسفراز وابسته به استیل‌کوآ (۱۰) در این مسیر دخالت دارند. استیل‌ترانسفراز وابسته به استیل‌کوآ نقش مهمی در متابولیسم آلکالوئید گیاهی بر عهده دارد (۶). آنزیم استیل‌ترانسفراز وابسته به استیل‌کوآ در بیوسنتز وینکولین در گیاه پروانش *Catharanthus roseus*, منبع آلکالوئید درمانی مهم وینبلاستین شرکت دارد (۱۴، ۳). استیل‌کوآدِاستیل ویندولین - ۴- اُ- استیل ترانسفراز[5] مرحله آخر در بیوسنتز ویندولین را کاتالیز می‌کند. آنزیم مرکزی در مسیر بیوسنتز مرفین نیز آنزیم استیل ترانسفراز وابسته به استیل کوآ (EC 2.3.1.150) می‌باشد. همه آنزیمهای شناخته‌شده در مسیر بیوسنتز مرفین در گیاهان *Papaver. somniferum* و کشت سوسپانسیون سلولی تشخیص داده شده‌اند، اما تجمع مرفین و کدئین در کشت سوسپانسیون سلولی هرگز مشاهده نشده است (۸). به نظر می‌رسد تجمع مرفین در گیاهان به سیستم تمایز شیرابه وابسته می باشد (۷). در مقاله حاضر جداسازی و کلون ژن مؤثر در بیوسنتز کدئین و مرفین در اواسط مسیر بیوسنتز یعنی ژن *sat* به منظور بیان نهایی در گیاهان شقایق الی‌فرا به عنوان هدف اصلی مورد تحقیق قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از رقم فرانسوی Rence گیاه شقایق *P.somniferum* استفاده گردید. بذور پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت هفت دقیقه و پس از چند بار شستشو با آب مقطر استریل در محیط کشت B5 تکمیل شده با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز کشت گردیدند، لوله‌ها در فیتوترون با دمای $۲۳^{\circ}c$ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت شش هفته نگهداری شدند.

استخراج mRNA و سنتز cDNA

1- Silencing
2- Salutaridinol 7-O-acetyltransferase
3- L-tyrosine
4- Acetyl-CoA:deacetylvindoline (S)-reticuline
5- O-acetyltransferase

Archive of SID

www.SID.ir

از کیت استخراج RNA XPLUS (سیناژن) جهت استخراج mRNA استفاده گردید. از گیاهان شش هفته‌ای *P.somniferum*، cDNA کدکننده ژن sat توسط واکنش رونویسی معکوس[1] mRNAی استخراج شده سنتز گردید. از cDNA سنتزشده به عنوان الگو جهت سنتز DNAی دورشته‌ای و تکثیر ژن توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن طبق برنامه استفاده شد. به‌منظورحذف ساختار دورشته‌ای DNA- RNA از دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه استفاده گردید. سی چرخه برای PCR بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس؛ اتصال یک دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس و بسط یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس؛ ۱۰ دقیقه اضافه برای بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار OLIGO6 و با استفاده از توالیهای موجود برای ژن مورد نظر در بانک اطلاعاتی NCBI انجام گردید. در طراحی آغازگرها به منظور وارد کردن ژنها در پلاسمید pBI121 توالیهای برشی برای آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I در انتهای ´۵ آغازگرها وارد گردید.

توالی آغازگر پیشرو 5′ TTG, GAT, CCG, CCA, CCA, TGG, CAA, CAA, TGT, ATA 3′، و توالی آغازگر برگشتی GAG, AGC, TCT, CAA, ATC, 5′ AAT, TCA, AGG,ATT, TCA 3′ بود .

هضم آنزیمی[2] پلاسمید T/A حامل ژن *sat*

به‌منظور تکثیر و نگهداری ژنهای مورد نظر و نیز کلونینگ آنها در ناقل pBI121، ابتدا محصولات PCR مستقیما" در ناقل T/A کلون گردید. پس از تولید DNAی دورشته‌ای ژن مورد نظر، کلون آنها در ناقل T/A، (Cloning Kit # k1214) توسط اتصال[3] محصولات PCR در پلاسمید pTZ57RIT به کمک آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل شرکت انجام گردید. انتقال پلاسمید به سلولهای مستعد باکتری *E.coli* با استفاده از روش فیزیکی گرم شدن و یخ‌زدن سریع[4] انجام گردید. سلولهای تراریخت حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در محیط مک کانگی و محیط انتخابی حاوی انتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و جهت استخراج پلاسمید نوترکیب به صورت شبانه کشت شدند. پس از استخراج پلاسمید به روش Miniprep و انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I، الکتروفورژ ژل آگارز به منظور خالص‌سازی ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roche) انجام گردید. به‌منظور کلون ژنهای مورد نظر در پلاسمید pBI121، ابتدا سلولهای سویه $DH_{5\alpha}$ باکتریایی حامل پلاسمید pBI121 در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به صورت شبانه کشت و صبح روز بعد استخراج پلاسمید به روشMiniprep از سلولهای کشت شده انجام پذیرفت. با استفاده از آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I ژن *gus* از پلاسمید pBI121 حذف شده و پلاسمید خطی فاقد ژن *gus* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA جهت انجام واکنش اتصال(لیگاسیون) آماده گردید. در مرحله بعد، ژنهای مورد نظر به پلاسمید pBI121 خطی شده توسط آنزیم T4 DNA لیگاز اتصال یافتند. تراریختی سلولهای *E.coli* با استفاده از پلاسمید نوترکیب pBI121sat به روش فیزیکی، شیمیایی انجام گردید. کلونهای تراریخت باکتریایی در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب گردیدند. جهت تأیید الحاق ژن در پلاسمید pBI121، آزمونهایcolony PCR، PCR با آغازگرهای اختصاصی *sat* و نیز آغازگر پیشرو *sat* همراه با آغازگر معکوس خاتمه‌دهنده nos و هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I انجام گردید. پس از تأیید

1- Reverse Transcription
2- Digestion
3- Ligation
4- Freez and Thaw

Archive of SID

www.SID.ir

نهایی ساخت سازه نوترکیب pBI121sat، انتقال این پلاسمید به باکتری آگروباکتریوم تومفسینس در دستور کار قرار گرفت. جهت انتقال ژن به گیاهان یکی از مفیدترین روشهای انتقال ژن، استفاده از باکتری خاکزی *Agrobacterium tumefaciens* می‌باشد. به همین منظور لازم است که پلاسمید حامل ژن مورد نظر ابتدا به آگروباکتریوم منتقل گردد و در ادامه گیاهان تراریخت گردند. سلولهای مستعد سویه GV3850 باکتری *A.tumefaciens* به روش مشابه *E.coli* تراریخت گردیدند. تأیید تراریختی آگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای colony PCR، PCR با آغازگرهای اختصاصی *sat* و نیز آغازگر پیشرو ژن *sat* همراه با آغازگر معکوس خاتمه‌دهنده nos انجام گردید.

بیان موقت[1] ژن *sat* در گیاهان شقایق *Opium poppy*

به‌منظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه ساخته‌شده در گیاهان و بررسی تولید مرفین و کدئین در برگهای گیاهان شقایق، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا گردید. بدین منظور ابتدا *A.tumefaciens* سویه GV3850 که دارای پلاسمید نوترکیب pBI121sat بود به میزان یک میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی 50 mg/l کانامایسین همراه با 10 mg/l ریفامپیسین به صورت شبانه کشت گردید. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری در ۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، به رسوب باکتریائی محیط MS با قند بالا pH: ۵/۵ به همراه ۲۰۰ میکرولیتر استوسرینگون (Fulka, 38766) و بافر 10 mM MES اضافه گردید. پس از دو ساعت که باکتری در محیط القائی رشد نمود، برگهای گیاهچه‌های شش هفته‌ای به درون لیوان حاوی سوسپانسیون باکتری منتقل و در داخل دسیکاتور قرار گرفته و توسط پمپ خلأ، انتقال باکتری به داخل برگها تسهیل و تسریع گردید. این عمل همراه با تکان‌دادن ظرف برای خروج کامل هوای میان بافتی به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. با حذف سریع سیستم خلأ، ورود باکتری به داخل برگ تسهیل می‌گردد. پتری‌های حاوی نمونه‌ها بداخل اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه‌سلسیوس به مدت ۳ روز منتقل و پس از پایان مدت زمان و رو به زردی گراییدن برگها، سنجش بیان مرفین، کدئین و تبائین با استفاده از آزمون کروماتوگرافی لایه نازک[2] انجام گردید. در این روش پس از استخراج آلکالوئید توسط متانول، محلول استخراج تقطیر و حلال موجود کاملا" حذف گردید. سپس رسوب باقی‌مانده دوباره در پنج میلی‌لیتر متانول حل و ۲۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد (sigma) که حاوی پنج آلکالوئید مهم شقایق (تبائین، نوسکاپین، پاپاورین، کدئین و مرفین) می‌باشد بر روی کاغذ 20 ×20 TLC aluminium sheets (Merk) با قدرت جذب UV لکه‌گذاری گردید. پس از خشک شدن لکه‌ها کاغذ TLC در محلول موبایل حاوی ۴۰ حجم تولوئن، ۴۰ حجم استون، ۶ حجم اتانول و ۲ حجم آمونیاک ۲۵ درصد قرار داده شد. پس از اینکه ۳/۴ طول کاغذ توسط موبایل طی گردید، کاغذ از تانک خارج و در هوا خشک گردید. با استفاده از TLC scaner (CAMAG) و تعیین مکان نقاط و RF هر یک از آلکالوئیدها در لکه استاندارد و تنظیم طول موج دستگاه بر روی ۲۸۷ نانومتر که ماکزیمم جذب آلکالوئید در این طول موج است، اسکن لکه‌ها انجام و آنالیز توسط نرم‌افزار WINCAT3 انجام گردید.

نتایج و بحث

استخراج RNA: نتایج استخراج RNA از برگهای گیاهان شقایق بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده و

1- Transient expression

2- Thin Layer Chromatography

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی گردید. باندهای بزرگ 18S و 25S در بالای ژل کاملاً واضح و نمایان می باشند. سنتز cDNA و در ادامه تکثیر DNAی دورشته‌ای با استفاده از آغازگر اختصاصی منجر به تکثیر قطعه DNA به اندازه بیش از ۱۴۳۰ bp گردید (شکل-۲). استخراج پلاسمید از باکتریها به روش Mini prep انجام گردید. در اثر واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I، قطعات DNA با اندازه بیش از ۱۴۰۰bp تولید گردید (شکل-۳). آزمون تأیید الحاق ژن از طریق PCR نیز انجام گردید. نتایج این روش نیز الحاق ژن بداخل پلاسمید T/A را اثبات کرد (شکل-۴). نتایج انجام PCR نیز نشاندهنده تکثیر قطعات bp ۱۴۳۰ و قطعه بیش از bp ۱۶۰۰ در هنگام استفاده از آغازگر برگشتی ژن *nos* همراه با آغازگر پیشرو ژن *sat* پس از تراریختی پلاسمید pBI121 می‌باشد. پس از تأیید الحاق ژن در پلاسمید pBI121، تراریختی سلولهای مستعد سویه GV3850 باکتری آگروباکتریوم تومفسینس با استفاده از روش فیزیکی، شیمیایی انجام گردید. پس از تراریختی، ابتدا سلولهای باکتری در محیط انتخابی حاوی کانامایسین تشکیل کلونی دادند و سپس این کلونی‌ها به محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ریفامپسین منتقل گردیدند. شکل-۵ الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگر خاتمه‌دهنده *nos* در باکتری آگروباکتریوم را نشان می‌دهد که مطابق انتظار در واکنش‌هایی که از آغازگرهای اختصاصی هر کدام از ژنها در PCR استفاده شده بود قطعات با اندازه بیش از ۱۴۰۰bp تکثیر یافت، ولی در واکنش‌هایی که از آغازگر مستقیم ژن و آغازگر برگشتی nos ترمیناتور استفاده گردید اندازه قطعات تکثیری به بیش از ۲۳۰bp افزایش یافت که نشان-دهنده نوترکیب‌بودن پلاسمیدهای منتقل‌شده می‌باشد. نتایج اولیه حاصل از آزمایش بیان موقت ژنها در برگ و استخراج آلکالوئیدهای تولیدی در برگها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک حاکی از صحیح بودن سازه‌های ساخته‌شده و نیز تولید مرفین، کدئین و تبائین به عنوان آلکالوئیدهای بسیار مهم در برگهای تراریخته می‌باشد در حالیکه در برگهای استخراج شده از گیاهان رشد یافته در محیط درون شیشه هیچکدام از مواد آلکالوئیدی؛ کدئین و مرفین مشاهده نگردید و تنها تبائین قابل تشخیص می‌باشد (جدول-۱). باید به این نکته توجه کرد که امکان اندازه‌گیری کمی توسط این دستگاه امکانپذیر می‌باشد اما بدلیل اینکه هدف تعیین کیفی آلکالوئید و بررسی عملکرد سازه ساخته‌شده می‌باشد سنجش کمی با استفاده از آزمون HPLC نیز تولید ترکیبات آلکالوئیدی کدئین و مرفین را تأیید کرده است (داده‌ها نشان داده نشده است).

بحث

آزمایشات زیادی تاکنون جهت بررسی اثرات مهندسی متابولیکی مسیرهای آنزیمی بیوسنتز مرفین، چه از طریق روشهای افزایش بیان یا خاموشی ژن انجام گرفته است. استیل‌ترانسفراز وابسته به استیل‌کوآ نقش مهمی در متابولیسم آلکالوئیدها در بسیاری از گیاهان دارد. این آنزیم در سنتز آلکالوئیدهای ایندول مونوترپنوئید در گونه‌های گیاهان دارویی نظیر *Rauwolfia serpentina*. نیز دخالت دارند (۱۴) آزمایش انجام شده توسط شیلبرگ و همکاران (۲۰۰۳) که بر روی بیان موقت ژن‌های مؤثر در بیوسنتز وینکاولین و وین‌کریستین صورت پذیرفت نشان داد که استفاده از این روش باعث افزایش تولید مواد مؤثره در گیاهان پروانش *C. roseus* می‌شود. در این آزمایش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالیهای موجود در بانکهای اطلاعاتی، قطعه‌ای به طول بیش از bp ۱۴۰۰ پس از استخراج mRNA و سنتز cDNA تکثیر گردید و در آزمایشات مقدماتی که توسط گروث وهمکاران (۲۰۰۱)، به منظور شناسایی و جداسازی ژن انجام

Archive of SID

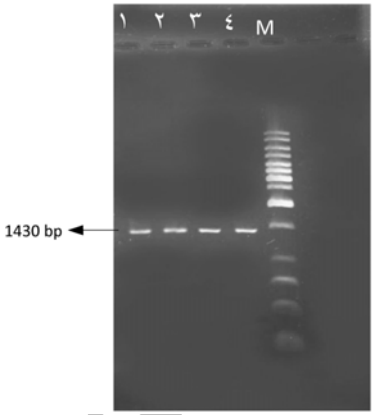
www.SID.ir

گردید و پس از ترجمه توالی اسیدهای آمینه به توالی اسیدهای نوکلوئیک، قطعه ۱۴۲۵ نوکلوئوتیدی با استفاده ه از RACE-PCR تکثیر گردید. نتایج هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I در پلاسمید pTZ57RIT و نیز در پلاسمید pBI121 منجر به تولید قطعه ای به طول بیش از bp ۱۴۰۰ گردید. کشت سلولهای تراریخت *Eschscholiza californica* با آنتی سنس ژن BBE کاهش ۱۰-۷ برابری در میزان کل بنزوفانتریدین‌ها را نشان داد (۱۱). کشت سلولهای تراریخت با آنتی‌سنس ژن CYP80B1 منجر به کاهش معنی‌داری در میزان بنزوفانتریدین‌ها گردید (۱۳). به طور مشابه کشتهای ریشه مویی تراریخت *E. californica* کاهش در میزان بنزوفانتریدین‌ها را نشان داد (۱۲). در مقابل افزایش زیاد بیان آنزیم BBE باعث افزایش ۶-۵ برابری در میزان کل بنزوفانتریدین‌ها در کشتهای ریشه‌مویی *E. californica* گردید (۱۲). در آزمایشات دیگری لارکین و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند که افزایش بیان کدئینون ردوکتاز (cor) باعث افزایش معنی‌دار در آلکالوئیدهای مورفین در تمامی گیاهان تراریخت در آزمایشات مزرعه‌ای و گلخانه‌ای می گردد. در این آزمایشات پس از چهار سال نشان داده شد که مجموع آلکالوئیدها بیش از ۲۸ درصد ، مرفین ۲۲ درصد ، کدئین ۵۸ درصد و تبائین ۷۵ درصد افزایش را نشان می‌دهد. در آزمایشات دیگری آلن و همکاران (۲۰۰۴)، با مهار کامل تمام اعضای خانواده چند ژن cor با استفاده از RNAi نشان دادند که ماده حد واسط اس-رتیکولین (۷ مرحله آنزیمی بالادست کدئین) در گیاهان تراریخت نسبت به کدئین، مرفین، اریپاوین و تبائین افزایش می یابد. در این آزمایشات تجمع مشتقات متیله رتیکولین نیز مشاهده گردید. با توجه به مواردی که ذکر گردید و نیز سایر موارد، آزمایشات افزایش بیان ژن نشان داده است که با دستورزی در بیان یک ژن سایر مسیرهای آنزیمی دچار تغییر شده و در نتیجه میزان سایر آلکالوئیدها تغییر می‌کند. با توجه به بررسی‌های زیادی که انجام گرفت، تاکنون هیچگونه گزارشی درباره بررسی افزایش بیان ژن *sat* گزارش نشده است و به احتمال خیلی زیاد این اولین گزارش دستورزی گیاهان شقایق با این ژن می‌باشد. در این مطالعه از روش بیان موقت به منظور بررسی فعالیت سازه ساخته شده در برگهای گیاهان شقایق استفاده شد. آزمایشات بیان موقت با این ژن نشان داد که در اثر بیان بیش از حد این ژن تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S در برگهای گیاهان تراریخت، مرفین، کدئین و پاپاورین در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت با استفاده از آزمون سنجش TLC تولید می‌گردد. نتایج اولیه آزمایش نشان داد که برگهای تراریخت شده با ژن *sat* ترکیبات مرفین، کدئین و پاپاورین را تولید می‌کنند در حالیکه در برگهای شاهد هیچکدام از این ترکیبات شناسایی نشد. با توجه به این موضوع که بیان مرفین و کدئین وابسته به سیستم تمایز سلولهای پارانشیمی لوله شیرابه می‌باشد(۷) و تنها پس از تشکیل کپسول این ترکیبات بیان و تجمع می‌یابند، تولید این ترکیبات در بافت برگی نشاندهنده عملکرد موفق این ژن تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S در ناقل pBI121 می-باشد. امروزه از روش بیان موقت به عنوان راهکار مناسبی جهت تولید ترکیبات دارویی و پروتئینهای ارزشمند در زراعت مولکولی[1] استفاده می‌کنند. تاکنون هیچ گزارشی از بیان موقت ژنهای مؤثر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزوفانتریدینی در گیاهان *P.somniferum* گزارش نشده است. با توجه به نتایج این آزمایشات، به احتمال زیاد بیان دائم در گیاهان تراریخت نیز باعث تغییر در میزان تولید آلکالوئیدهای بنزوفانتریدینی خواهد شد که این آزمایشات در آزمایشگاه‌های پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در حال انجام می‌باشد.

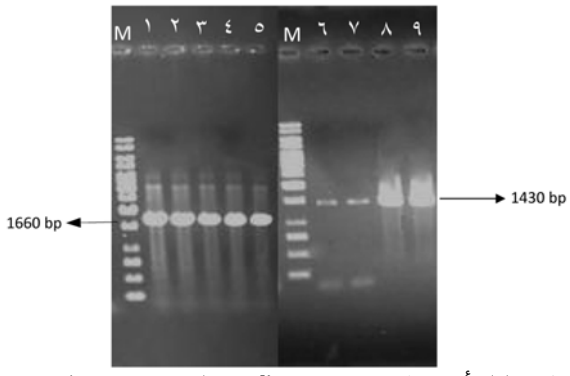
1- Molecular farming

Archive of SID

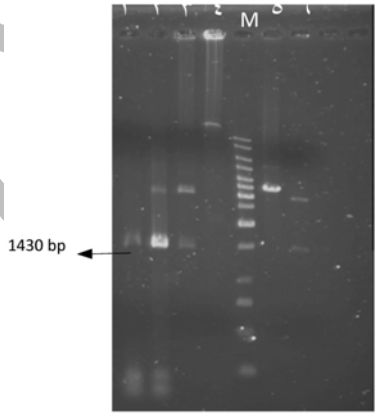
www.SID.ir



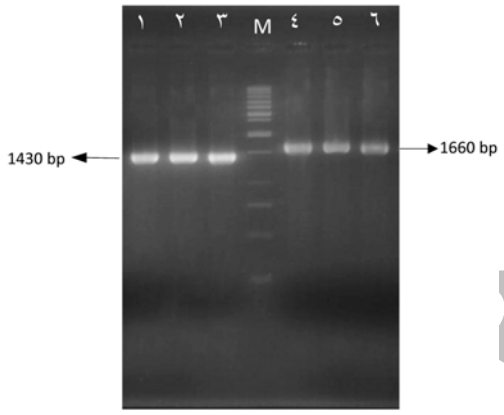
شکل-(۲) الکتروفورز فرآورده PCR ژن *sat*: لاینهای ۱، ۲،۳ و ۴ تکثیر DNAدورشته‌ای با استفاده از الگوی cDNA، M، مارکر، kb ۱ فرمنتاز



شکل (۴) تأیید تراریختی باکتری *E.coli*: لاینهای ۱-۵ تکثیر ژن *sat* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، لاینهای ۶-۹ تکثیر ژن *sat* با استفاده از اغازگر پیش‌رونده ژن *sat* وآغازگر برگشتی *nos*II، M، مارکر، kb ۱ فرمنتاز



شکل-(۳): الکتروفورز هضم آنزیمی ژن sat:: لاینهای ۱، ۲، ۳ و ۵ تجزیه پلاسمید و تولید قطعات ۱۴۳۰bp ژن sat، M، مارکر kb ۱ فرمنتاز



شکل(۵) تأیید تراریختی باکتری *A.tumefaciens*: لاینهای ۱-۳ تکثیر ژن *sat* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، لاینهای ۴-۶ تکثیر ژن *sat* با استفاده از اغازگر پیش‌رونده ژن *sat* وآغازگر برگشتی *nos*II، M، مارکر، kb ۱ فرمنتاز

جدول(۱) آنالیز بیان موقت توسط TLC

Peak	Start mm	Start Height	Max mm	Max Height	Max %	End mm	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	23.8	0.2	26.0	39.6	29.58	29.1	0.1	1129.5	27.47	MORPHINE
2	34.7	7.5	35.8	11.8	8.81	38.7	0.3	304.7	7.41	CODEINE
3	40.0	0.1	43.0	23.4	17.49	45.3	9.3	710.2	17.27	unknown *
4	46.1	7.5	46.6	8.2	6.11	49.6	1.0	162.7	3.96	THEBAINE
5	58.3	6.8	59.2	8.7	6.51	61.6	1.7	193.1	4.70	unknown *
6	64.5	2.2	68.2	13.1	9.80	70.8	3.1	539.9	13.13	unknown *
7	70.9	3.1	74.3	29.0	21.70	77.4	4.4	1071.3	26.06	unknown *

تشکر و قدردانی: این تحقیق به سفارش شرکت دارویی تماد و با تأمین هزینه‌های مالی و آزمایشگاهی آن انجام شده است. بدینوسیله از حمایت همه جانبه مدیرعامل شرکت در انجام این تحقیق تشکر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Cheney R. H. 1964. Therapeutic potential of *Eschscholtziae californicae herba*. Quarterly Journal of Crude Drugs 3, 413–416.
2. De-Eknamkul, W., and Zenk, M. H. 1992. Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductase from *Papaver somniferum* seedlings *Phytochemistry* 31, 813–821
3. Fahn, W., Gundlach, H., Deus-Neumann, B., and Sto¨ckigt, J. 1985. Purification of acetyl-CoA: 17-O-deacetylvindoline 17-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus* leaves. *Plant Cell rep* 8, 613-616.
4. Gerardy, R., and Zenk, M. H. 1993a. Formation of salutaridine from (*R*)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum. Phytochemistry* 32, 79–86.
5. Gerardy, R., and Zenk, M. H. 1993b. Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum. Phytochemistry* 34, 125–132
6. Grothe, T., Lenz, R. and Kutchan, T.M 2001. Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. J. *Biol.Chem*. 276, 30717–30723 .
7. Huang, F.C. and Kutchan, T.M. 2000. Distribution of morphin and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum. Phytochemistry*, 53, 555–564.
8. Kutchan, T. M 1998.Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis, In 'The Alkaloids' (Cordell, G., ed) Vol. 50, pp. 257–316, Academic Press, San Diego.
9. Lenz, R. and Zenk, M.H. 1995. Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur. J. Biochem*. 233,132–139
10. Lenz, R., and Zenk, M. H. 1995. Acetyl Coenzyme A:Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures *J. Biol. Chem*. 270, 31091–31096.
11. Park S. U. and Facchini P. J. 2000 *Agrobacterim rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *J Exp Bot* 51: 1005-1016.
12. Park, S.U., Yu, M. and Facchini, P.J. 2003. Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol. Biol*. 51, 153–164.
13. Park, S.U., Yu, M. and Facchini, P.J. 2002 Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiol*. 128, 696–706.
14. Pfitzner, A., and Sto¨ckigt, J. 1983. Biogenetic link between sarpagine and ajmaline type alkaloids *Tetrahedron Lett.* 24, 5197–5200.
15. Philip, J., Larkin., James, A. C., Miller, Robert, S. Allen., Julie, A. Chitty., Wayne, L. Gerlach., Susanne, Frick., Toni, M. Kutchan., and Anthony, J. Fist. 2007. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum. Plant Bio jou*, 5, 26–37.
16. Robert, S.A., Anthony, G.M., Julie.A., C., Jennifer.T., James. A. C.M., Anthony. J.F., Wayne. L.G.and Philip. J.L 2004. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in *opium poppy*. *Nature Biotech*. 22, 1559- 1566.
17. Stefano, D., Verena, H., Rainer, F., and Schillberg, S., 2004. Transient Gene Expression of Recombinant Terpenoid Indole Alkaloid Enzymes in Catharanthus roseus Leaves. Plant *Molecular Biology Reporter* 22: 15–22.
18. YeK, Ke Y, Keshava N, Shanks J, Kapp J.A, Tekmal RR, Petros J, Joshi H., C. 1998. Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apotosis in dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1601–1606.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and cloning of sat gene in *papaver somniferum* and evaluation of its transient expression

B. Hosseini*- H. Hashemi - F. Shahriari - H. Marashi[1]

Abstract

Benzylisoquinoline alkaloids are a diverse group of nitrogenous compounds which is found in about 20% of plant species. Isolation of effective genes involved in morphine biosynthesis of opium poppy is very important in the production of specific which can be achieved using metabolic engineering techniques. In this biosynthesis pathway, the key enzyme SAT is Involved in the conversion of salutaridinol 7-O-acetyltransferase (EC 2.3.1.150) to salutaridinol-7-O-acetate, which is the immediate precursor of thebaine. In this project, the gene encoding this enzyme was isolated using primers which were designed on the basis of the gene sequence available on data banks (NCBI) for papaver somniferum. This gene IS then cloned in expression vectors under the Control of Camv 355 promoter. The result of this cloning was confirmed using different molecular methods such as enzyme digestion and PCR. Agro infiltration method was also used for transient expression of SAT gene. The result of evaluation showed that morphine and codeine were only Produced in the leaves of transgenic plants containing SAT transgen.

Keywords: Benzylisoquinoline alkaloids, Salutaridinol 7-O-acetyltransferase, *opium poppy*

Archive of SID

*- Corresponding author Email: bhosseini57@gmail.com
1- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad

www.SID.ir