

همسانه‌سازی، آنالیز بیان و بررسی روابط خویشاوندی ژن *dbat* از گیاه سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata* L.)

محمد مجیدی^{۱*}، محمد فارسی^۲، احمدرضا بهرامی^۳، جواد بهروان^۴، سیدحسین مرعشی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 - ۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 - ۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، مشهد، ایران
 - ۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 - ۵- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- *آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی
کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۸، تلفن: ۸۷۹۶۸۱۸ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۷۸۷۴۳۰ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: mmajidi82@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

مقدمه: تاکسول یکی از مهم‌ترین داروهای ضدسرطان می‌باشد که تأمین آن عمدتاً به روش‌های زیستی وابسته می‌باشد. ژن ۱۰- داستیل باکاتین III - اُ- استیل ترانسفراز (*dbat*) یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول می‌باشد و می‌توان انتظار داشت افزایش بیان آن منجر به افزایش تولید تاکسول در سیستم‌های زیستی شود.

هدف: بررسی ویژگی‌های ژن *dbat* از سرخدار بومی ایران، آنالیز بیان ژن و تهیه سازه افزایش بیان ژن مذکور.

روش بررسی: ابتدا توالی ژن کلون شد. خصوصیات توالی با استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی مشخص شد. آنالیز بیان ژن در پاسخ به الیستور متیل جاسمونات و در زمان‌های مختلف انجام شد. در نهایت به منظور تهیه سازه افزایش بیان، توالی تحت کنترل پرموتر CaMV35S و کتور pCambia1304 کلون شد.

نتایج: مقایسه درجه شباهت توالی مشخص نمود که توالی مذکور بیشترین شباهت را با توالی *Taxus × hunnewelliana* نشان می‌دهد. یک جایگزینی اسید آمینه‌ای منحصر به فرد در توالی مشاهده شد که بررسی آن نشان داد که تغییر مذکور نمی‌تواند خصوصیات کلی آنزیم را تغییر دهد و بنابراین آنزیم حاصل یک آنزیم فعال می‌باشد. آنالیز بیان ژن نشان داد که در پاسخ به متیل جاسمونات سطوح بیان ژن به میزان حداکثر ۲۴ برابر در ۱۲ ساعت پس از تحریک افزایش می‌یابد. در پایان، درج ژن مذکور در جایگاه مناسب و کتور افزایش بیان توسط آزمون‌های هضمی مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: تحریک سرشاخه‌های بریده گیاه سرخدار می‌تواند روش جایگزین مناسبی برای کشت‌های سلولی سرخدار به منظور بررسی‌های بیان ژن باشد. سادگی، سهولت و حذف مرحله زمانبر کشت‌های سلولی از مهم‌ترین مزایای آن می‌باشد.

کل واژگان: سرخدار، تاکسول، همسانه‌سازی، الیستور، افزایش بیان، بیوانفورماتیک



مقدمه

می‌باشند. امکان کنترل دقیق شرایط تولید، قابلیت استفاده از محرک‌های تولید از قبیل الیستورها، استفاده از بیوراکتورها برای تولید در مقیاس صنعتی، ایجاد سیستم‌های تولیدی مداوم که در آن سلول‌ها همیشه در فاز تولید می‌باشند، تحریک سلول‌ها به ترشح متابولیت مربوطه به درون محیط کشت و سهولت استخراج آن در مقایسه با استخراج از گیاه طبیعی و قابلیت استفاده از پتانسیل دستوری‌های ژنتیکی از مهم‌ترین مزایای این سیستم‌ها می‌باشند. با استفاده از کشت‌های سلولی تولید تاکسول در محیط‌های آزمایشگاهی به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر و در محیط‌های صنعتی به ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسیده است [۱۶ - ۱۲].

دستوری در نحوه بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی که مهندسی متابولیک نامیده می‌شود از مهم‌ترین روش‌های افزایش تولید در سیستم‌های زیستی است. افزایش بیان ژن‌های مطلوب، کاهش بیان ژن‌های نامطلوب و دستوری بیان فاکتورهای نسخه‌برداری خاص از مهم‌ترین موارد کاربرد مهندسی متابولیک می‌باشد [۷، ۱۲، ۱۷، ۱۸].

شناخت و درک عمیق مسیرهای بیوسنتزی و نحوه کنترل آن، پیش‌نیاز اصلی طراحی روش‌های مهندسی متابولیک است. علیرغم تلاش‌های فراوان صورت گرفته به منظور شناخت مسیر بیوسنتزی تاکسول، به دلیل وجود واکنش‌های آنزیمی مشابه و نیز غلظت پایین بسیاری از ترکیبات حد واسطه، این مسیر کاملاً شناخته شده نمی‌باشد با این وجود به طور کلی فرض بر این است که بیوسنتز تاکسول شامل ۱۹ مرحله آنزیمی می‌باشد که اولین مرحله آن حلقوی شدن ژرانیل ژرانیل دی فسفات توسط آنزیم تاکسادی‌ان استاز می‌باشد. پس از ساخت هسته تاکسانی، مولکول توسط اکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P450 دچار تغییرات بیشتری می‌شود. سپس واکنش‌های اسیل/آروئیل ترانسفرازی انجام می‌شود و در نهایت اتصال زنجیره جانبی فنیل ایزوسرین منجر به تولید تاکسول می‌شود [۶، ۱۱، ۱۷، ۱۹، ۲۰].

ژن *dbat* یکی از مهم‌ترین ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول می‌باشد که آنزیم حاصل باعث تبدیل حد واسطه ۱۰- داستیل باکاتین III به باکاتین III می‌شود. مشاهده شده

گیاهان دارویی منبع تأمین بیش از ۲۵ درصد کل داروهای مصرفی دنیا را تشکیل می‌دهند که در این میان نقش ویژه‌ای در تأمین داروهای ضدسرطانی ایفا می‌کنند [۱]. داروهای ارزشمندی چون تاکسول، وین بلاستین، وین کریستین، کامپوتوسین و پودوفیلوتوکسین از مهم‌ترین داروهای ضدسرطانی با منشأ گیاهی می‌باشند که تاکسول و ترکیبات هم خانواده آن (تاکسان‌ها (Taxanes) یا تاکسوئیدها (Taxoid)) از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند [۲]. هم‌اکنون این دارو برای درمان سرطان‌های تخمدان، سینه، ریه و نیز کاپوسی سارکومای وابسته به ایدز مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین اثربخشی تاکسوئیدها در درمان بسیاری از بیماری‌های دیگر نیز به اثبات رسیده است، به طوری که هم‌اکنون بیش از صد آزمون بالینی برای درمان با این ترکیبات در حال اجرا می‌باشد که این آزمون‌ها طیف گسترده‌ای از بیماری کبدی پلی سیستیک تا آلزایمر را شامل می‌شوند. انتظار بر این است که با کشف سودمندی این ترکیبات بر طیف گسترده‌تری از بیماری‌ها، تقاضا برای تاکسوئیدها که دارای بازاری چند میلیاردی می‌باشند، بازم افزایش یابد [۷ - ۳].

تاکسان‌ها ترکیباتی دی تربنی می‌باشند که نقش دفاع از گیاه در برابر تنش‌هایی چون زخم و حملات پاتوزنی بر عهده دارند. منبع طبیعی تأمین آن گونه‌های سرخدار (*Taxus spp.*) می‌باشد. به دلیل کمیاب بودن، رشد کند و غلظت بسیار پایین آن در گیاه طبیعی و همچنین وجود بیش از ۴۰۰ ترکیب مشابه که عمل خالص‌سازی را بسیار پیچیده می‌نماید، استخراج این مواد از گیاه روشی مقرون به صرفه نمی‌باشد و بایستی روش‌های دیگری جایگزین آن شوند [۸، ۹، ۱۰].

روش‌های جایگزین تولید شامل سنتز شیمیایی، نیمه سنتزی، تولید میکروبی و استفاده از کشت‌های سلولی سرخدار می‌باشند. بازده تولید بسیار پایین به دلیل تولید ایزومرهای نامطلوب فراوان، نوسانات فراوان در میزان تولید پیش‌سازها و تولید بسیار کم در مقایسه با گیاه از مهم‌ترین مشکلات روش‌های اول تا سوم می‌باشند [۴، ۵، ۸، ۹، ۱۱]. روش‌های کشت سلولی از بهترین گزینه‌های موجود برای تولید تاکسول



گل استان گلستان صورت گرفت. سرشاخه‌ها در شرایط مرطوب منتقل شدند و به منظور نگهداری طولانی مدت در یخچال قرار گرفتند.

بهبودسازی روش استخراج RNA: به دلیل بافت چوبی، وجود ترکیبات فنلی، پلی‌ساکاریدی و متابولیت‌های ثانویه فراوان، استخراج RNA از سرخدار فرایندی مشکل می‌باشد به طوری که کیت‌های تجاری چندان موفقیتی در این زمینه وجود ندارند. بدین منظور از بین روش‌های بسیار موجود برای استخراج RNA، تنها استفاده از روش CTAB مناسب تشخیص داده شد. روش مورد استفاده در مقاله حاضر ترکیبی از روش‌های لیاو (Liao) و همکاران [۲۶]، وانگ (Wang) و همکاران [۲۷] و گامینو (Gambino) و همکاران [۲۸] به همراه اعمال برخی تغییرات می‌باشد.

۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج (تریس - HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۲۵ میلی‌مولار، CTAB ۳ درصد، PVP ۳ درصد، NaCl ۲ مولار، pH نهایی بافر ۸) به همراه ۵۰ میکرولیتر سیترات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به مدت ۱۰ دقیقه در بنماری ۶۵ درجه گرم شد. همچنین ۳۰ میکرولیتر بتا مرکاپتو اتانول نیز چند لحظه قبل از افزودن بافت به هر تیوب اضافه شد. ۱۰۰ میلی‌گرم بافت شاخه و برگ سرخدار با استفاده از ازت مایع و هاون به خوبی پودر شد و بلافاصله به تیوب حاوی بافر گرم شده منتقل شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه به شدت ورتکس شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در بنماری ۶۵ درجه قرار گرفتند. به منظور استخراج بهتر تیوب‌ها هر ۱۰ دقیقه یکبار مجدداً ورتکس می‌شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون به نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر کمکی (استات پتاسیم ۲ مولار، گلوکز ۲۵ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، pH کلی بافر برابر ۶) اضافه شد و پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط خنک شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل سرد (نسبت ۲۴ به ۱) اضافه شد و تیوب‌ها ۵ ثانیه ورتکس شدند. پس از آن نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت حاصل مجدداً با کلروفرم استخراج شد. سپس سوپرناتانت به تیوب جدیدی منتقل شد و ۴۰۰ میکرولیتر از کلرید لیتیم ۱۰ مولار به آن اضافه شد و پس از چند اینورت،

است که در گیاه میزان ۱۰- داستیل باکاتین III بسیار بیشتر از باکاتین III می‌باشد (۲/۷ تا ۱۰ برابر)، به طوری که ۱۰- داستیل باکاتین III به جای اینکه مانند یک حدواسط به ماده بعدی خود تبدیل شود، معمولاً تجمع پیدا می‌کند. این موضوع مشخص می‌کند که مرحله مذکور، یک نقطه محدود کننده متابولیسم است. علاوه بر بررسی‌های متابولیسمی، بسیاری از آزمایش‌های آنالیز بیان ژن نیز مشخص نموده‌اند که این ژن یک آنزیم محدود کننده می‌باشد. می‌توان انتظار داشت با افزایش بیان این ژن، تولید تاکسول به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کند [۱۷، ۲۰، ۲۱، ۲۲].

علاوه بر دستورزی‌های ژنتیکی، تولید مناسب تاکسان‌ها نیازمند مولکول‌های محرک تولید می‌باشد زیرا مسیر بیوسنتزی تاکسول جزئی از مکانیسم دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و گیاهخواران محسوب می‌شود بنابراین بیان آن نیازمند ترکیبات القا کننده می‌باشد. به طور کلی چنین ترکیباتی که قادر به تحریک بیان ژن‌های مسیره‌های دفاعی می‌باشند الیسیتور (Elicitor) نامیده می‌شوند. ترکیباتی چون عصاره‌های قارچی، ترکیبات اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و فلزات سنگینی چون لانتانوم و وانادیوم از مهم‌ترین الیسیتورهای تاکسول می‌باشند که در این میان متیل جاسمونات مهم‌ترین الیسیتور مورد استفاده می‌باشد. حضور متیل جاسمونات تقریباً در تمامی موارد موفقیت‌آمیز تولید تاکسول لازم می‌باشد و با استفاده از آن افزایش بیش از ۱۰۰ برابری در تولید تاکسول مشاهده شده است [۹، ۱۲، ۲۴، ۲۵].

در مطالعه حاضر ژن *dbat* برای اولین بار از گونه بومی ایرانی جداسازی و کلون شد. سپس با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی صحت توالی مورد تأیید قرار گرفت. در ادامه بیان این ژن در پاسخ به متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت ژن کلون شده به منظور تهیه سازه افزایش بیان ژن، تحت کنترل پروموتور CaMV35S وکتور بیانی pCAMBIA1304 قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌برداری در اوایل فصل تابستان و از سرشاخه‌های جوان درختان موجود در جنگل‌های منطقه زرین



3'-5'-*taactagtatggcagggtcgacagaatc*-5' و توالی برگشت
 3'-5'-*tatggtcacccttaagttactacaatttcaagg*-5'. شرایط PCR
 عبارت بود از: ۹۴ درجه ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه
 ۱ دقیقه، ۵۷ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۲/۵ دقیقه و در نهایت
 ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه. به منظور اجتناب از جهش‌های ناشی از
 تکثیر، واکنش PCR با استفاده از آنزیم Pfu شرکت فرمتاز
 انجام شد. پس از اتمام واکنش تکثیر با Pfu، به منظور افزودن
 انتهای A به قطعه تکثیر یافته (برای کلون در وکتورهای TA)
 به محصول PCR ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq اضافه شد و به
 مدت ۳۰ دقیقه در ۷۲ آنکوبه شد. برای تأیید تکثیر ژن مورد
 نظر، محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد
 الکتروفورز شد (شکل شماره ۲).

همسانه‌سازی: باند مورد نظر پس از خالص‌سازی با نسبت
 مولی ۵ به ۱ (قطعه به وکتور) در وکتور pDRIVE (شرکت
 کیاژن) کلون شد. بعد از واکنش اتصال (Ligation)، محصول
 به دست آمده به منظور ترانسفورماسیون، با روش شوک
 حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α
 انتقال داده شدند و سپس به منظور شناسایی کلون‌های
 نوترکیب، بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک
 آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و پیش‌ماده‌های Xgal و
 IPTG کشت شدند و در نهایت در دمای ۳۷ درجه قرار
 گرفتند. انتخاب کلونی‌های نوترکیب احتمالی از میان
 کلونی‌های سفیدی صورت گرفت که ۱۲ تا ۱۶ ساعت بعد از
 کشت روی محیط ظاهر شده بودند. علاوه بر خصوصیات
 رنگ کلونی و رشد بر روی محیط حاوی آمپی‌سیلین، تأیید
 نهایی آنها از طریق آزمون هضم آنزیمی صورت گرفت. پس از
 اطمینان از نوترکیب بودن، به منظور تأیید نهایی مورد توالی‌یابی
 قرار گرفتند. توالی‌یابی با روش دی‌داکسی و توسط شرکت
 ماکروژن (کره جنوبی) صورت گرفت.

آنالیز توالی و بیوانفورماتیک: اتصال (Assembling) و
 ویرایش نواحی همپوشان (Contig) قطعات توالی‌یابی شده با
 استفاده از نرم‌افزارهای Primer Premier 5، BioEdit و
 نیز 5 Main Workbench CLC صورت گرفت. ترسیم

تیوب‌ها به مدت یک شب داخل یخ و در یخچال ۴ درجه
 سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از انکوباسیون یک شبه در دمای ۴
 درجه، تیوب‌ها ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور با دمای ۴ درجه
 سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. پلت حاصل با الکل ۷۰ درصد
 شسته و بعد از خشک شدن در ۳۰ میکرولیتر آب حل شد. در
 ادامه ۲ میکرولیتر از آنزیم DNase I شرکت فرمتاز به تیوب
 اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ آنکوبه شد. پس از آن به
 تیوب‌ها ۲۰۰ میکرولیتر SDS ۰/۵ درصد، ۳۰۰ میکرولیتر آب و
 ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و پس از چندین اینورت به
 مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سوپرناتانت
 حاصل با حجم مساوی ایزوپروپانول سرد مخلوط شد و بعد از
 اینورت، به مدت ۲ ساعت در ۲۰- درجه قرار گرفت. نمونه‌ها
 در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و
 پلت حاصل با الکل ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در
 آب تیمار شده با DEPC حل شد. به منظور بررسی کیفیت
 RNA، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.
 در ادامه کیفیت و غلظت RNA با دستگاه نانودراپ مورد
 اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل شماره ۱).

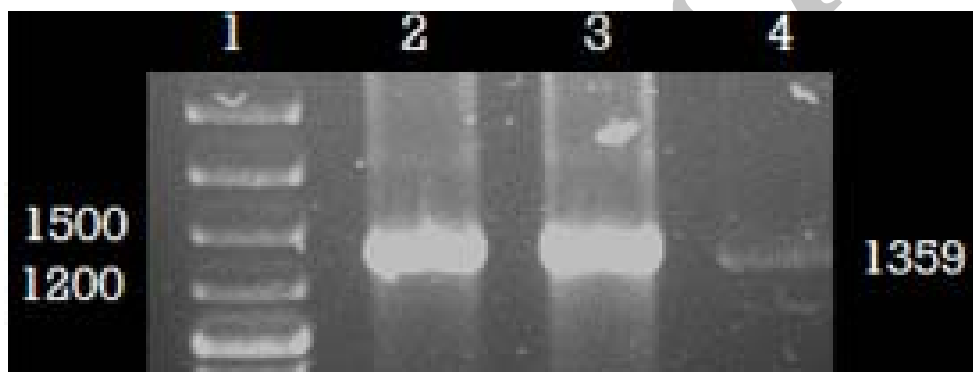
تهیه cDNA: مقدار ۵ میکروگرم RNA به عنوان الگوی
 ساخت cDNA در واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار
 گرفت. سنتز cDNA توسط کیت First Strand Fermentas
 و پرایمر Oligo dT صورت گرفت. جهت تکثیر قطعه کامل
 ژن از ۱ میکرولیتر cDNA رقیق نشده استفاده شد در حالی‌که
 در آزمون‌های ریل تایم (RealTime PCR) (که به مقادیر
 کمتری الگو نیاز دارند) از ۱ میکرولیتر cDNA رقیق شده
 (۵ برابر) به عنوان الگو استفاده شد.

PCR و جداسازی ژن: با استفاده از اطلاعات موجود در
 پایگاه اطلاعاتی NCBI و نرم‌افزار Primer Premier 5
 پرایمرهای مناسبی برای تکثیر قطعه کامل ژن طراحی شدند. از
 آنجایی‌که هدف نهایی قرار دادن ژن *dbat* تحت پروموتور
 CaMV35S وکتور بیانی pCAMBIA1304 بود، در
 پرایمرهای تکثیر ژن، محل‌های شناسایی آنزیم‌های SpeI
 (پرایمر رفت) و BstEII (پرایمر برگشت) قرار داده شد. توالی
 پرایمرها عبارت بودند از: توالی رفت





شکل شماره ۱- ژل حاصل از الکتروفورز RNA استخراج شده از گیاه سرخدار، حضور باندهای rRNA بیانگر موفقیت روش استخراج می باشد



شکل شماره ۲- نتایج تکثیر قطعه مورد نظر با Pfu: چاهک ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، چاهک ۲ و ۳ تکثیر از نمونه‌های تحریک شده و چاهک ۴ تکثیر از نمونه تحریک نشده می باشد

آنالیز بیان ژن: به منظور بررسی روند افزایش بیان ژن *dbat* سرشاخه‌های بریده شده گیاه تحت تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار قرار گرفت و در ادامه در فواصل زمانی مختلف نمونه برداری از آنها صورت گرفت تا الگوی افزایش بیان و نیز بهترین زمان نمونه‌گیری مشخص شود. آنالیز بیان ژن با تکنیک ریل تایم صورت گرفت.

توالی پرایمرهای ریل تایم ژن *dbat* عبارت بودند از: توالی رفت: 3'-ttgctgaagccagaagacc-5' و توالی برگشت: 5'-gagccctcgtccttctatcc-3' از ژن *gapdh* نیز به عنوان ژن مرجع برای مقایسه افزایش یا کاهش بیان ژن استفاده شد که توالی پرایمرهای آن عبارت بود از توالی رفت 5-atcaaggctgcatcaaggag-3 و توالی برگشت

درخت فیلوژنیکی براساس روش Maximum Likelihood (ML) با استفاده از فاصله‌های Kimura 2-parameter و با پشتوانه تکرار (Bootstrap) ۱۰۰۰ با نرم‌افزار Mega 5.1 انجام شد. همچنین با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی expasy (<http://www.expasy.org>) و نیز Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) و نیز نرم‌افزارهای Rasmol و Bidesigner ساختار سه بعدی ژن کلون شده مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت از فاصله گرانتهام (Grantham Amino Acid Substitution Distance) جهت بررسی جانشینی‌های پروتئینی و شدت آنها استفاده شد.

شود مقادیر فراوانی آلودگی نمکی و پروتئینی افزوده می‌شود که باعث اثرات منفی بر کیفیت RNA حاصل می‌شود. همچنین استفاده از SDS بعد از تیمار DNase نیز به حذف آلودگی‌های پروتئینی بخصوص حذف DNase کمک نمود.

الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز نشان داد که RNA استخراج شده سالم می‌باشد و باندهای 18S، 28S و 16S و 5S به خوبی دیده می‌شدند و حتی باند 23S نیز که معمولاً غلظت پایین‌تری نسبت به بقیه انواع rRNA دارد قابل رویت بود (شکل شماره ۱). کمیت‌سنجی نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ نشان داد که نسبت‌های جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (بیانگر نسبت اسید نوکلئیک به پروتئین) و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر (بیانگر نسبت اسید نوکلئیک به ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدی) مقداری بین ۲ تا ۲/۲ بود که بسیار عالی می‌باشد. بازده RNA حاصل نیز در حدود ۱۵۰ میکروگرم در گرم بافت سرخدار بود که برای گیاه سرخدار و با توجه به گزارش‌های سایر محققان [۲۶] بسیار خوب می‌باشد. این روش علاوه بر گیاه سرخدار در چندین گیاه دارویی و یا چوبی دیگر از قبیل ژینکو، بذرالبنج و نیز پروانش مورد استفاده قرار گرفت که در تمامی موارد موفقیت‌آمیز بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). به طور کلی این روش برای استفاده در طیف وسیعی از گیاهان بخصوص گیاهان حاوی ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدی بالا مناسب می‌باشد.

تکثیر توالی کامل ژن: با توجه به بیان ناچیز ژن در حالت طبیعی، مشاهده شد که تکثیر توالی کامل در شرایط تحریک شده بسیار بیشتر از حالت پایه می‌باشد (شکل شماره ۲). مطابق انتظار باند ۱۳۵۹ جفت بازی در PCR تکثیر شد که از این تعداد ۱۳۴۰ جفت باز شامل توالی ژن بود و بقیه توالی‌های تشخیصی افزوده شده به منظور هضم آنزیمی بود.

همسانه‌سازی: مواردی چون استفاده از نسبت مولی ۵ به ۱ (نسبت قطعه به وکتور)، افزودن ۱ میکرولیتر ATP (۱۰ میلی‌مولار) به واکنش اتصال و انکوباسیون محصول اتصال در دمای ۸ درجه به مدت ۱۲ ساعت باعث افزایش کارایی اتصال شد. همچنین سلول‌های مستعد نیز بر کارایی ترانسفورماسیون بسیار مؤثر بودند به طوری که بازده استفاده از سلول‌هایی که به مدت یک شب در کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار قرار داشتند ۵ برابر سلول‌های مستعد تازه تهیه شده و یا سلول‌های فریز شده

5-ctgtaacccattcgttgctcg-3. شرایط PCR ریل تایم عبارت بود از ۹۵ درجه ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۳۵ ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه. به منظور بررسی صحت تکثیر از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. تکثیر با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت فرمتاز Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes و دستگاه Biorad CFX96 صورت گرفت و در نهایت نیز آنالیز بیان ژن‌ها با نرم‌افزار REST انجام شد.

کلون در وکتور بیان pCAMBIA1304: پس از تأیید صحت توالی، وکتور حاوی قطعه مورد نظر و همچنین ناقل بیان pCAMBIA1304 با آنزیم‌های SpeI و BstEII هضم شدند و طبق شرایطی که قبلاً اشاره شد ترانسفورم شدند. کشت بر روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و IPTG و Xgal انجام شد. تأیید نهایی نوترکیبی وکتور نیز با آنزیم‌های برشی مناسب صورت گرفت.

نتایج

بهینه‌سازی استخراج RNA: استفاده از سایر روش‌های متداول استخراج RNA از قبیل SDS و گوانیدین و کیت‌های تجاری موجود تماماً با شکست مواجه شد. روش پایه CTAB نیز با وجودی که بهتر از روش‌های دیگر بود با این وجود بازهم کیفیت آن پایین‌تر از حد مطلوب بود و پلت‌های بزرگ و سبز رنگی تشکیل می‌شد که معمولاً به دلیل عدم توانایی در حذف کامل آلودگی‌های فنلی، پلی ساکاریدی و پروتئینی بود.

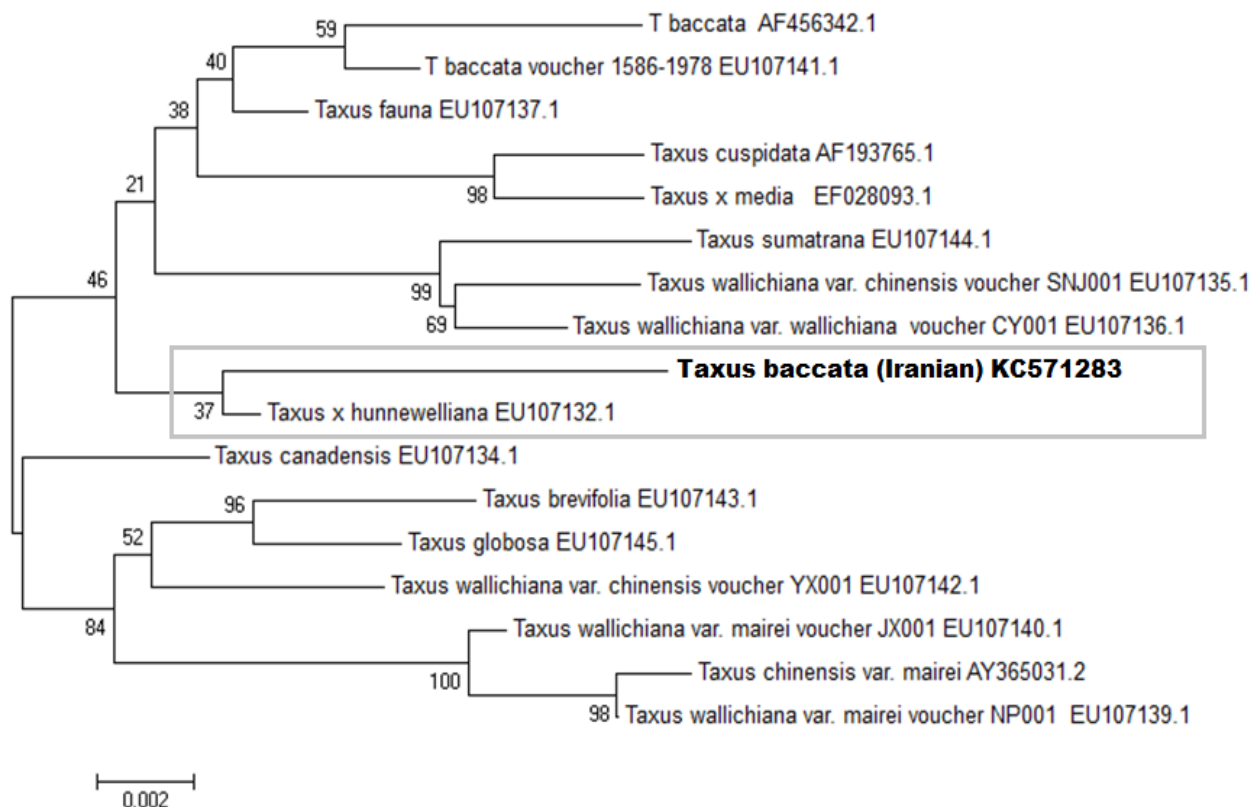
آزمون انواع ترکیبات مختلف (که اکثراً پایه تجربی داشت و ترکیبی از سایر روش‌های استخراج RNA و حتی پلاسمید بود) برای بهبود استخراج مشخص نمود که افزودن ۵۰ میکرو مول سترات سدیم به بافر CTAB به میزان بسیار زیادی باعث کم شدن آلودگی‌های پلی ساکاریدی و پروتئینی می‌شود. استفاده از بافر کمکی نیز باعث شفاف‌تر شدن سوپرناتانت و حذف متابولیت‌های ثانویه از سوپرناتانت می‌شد. انجام تیمار DNase در اواسط مراحل استخراج بهتر از استفاده از آن در انتهای فرایند بود زیرا در صورتی که در آخر استخراج استفاده



بسیاری از نواحی توالی این ژن‌ها مجاز نمی‌باشد و تنها در بخش‌های کوچکی از توالی می‌تواند دچار تغییر شوند. این امر در مورد ژن‌های مسیر بیوسنتزی تاکسول نیز صدق می‌کند زیرا آنها بخشی از مکانیسم دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و گیاهخواران می‌باشند [۲۹]. برخلاف انتظار که تصور می‌شد توالی ژن *dbat* گونه بومی ایران بیشترین مشابهت را با توالی‌های موجود گونه باکاتا نشان دهد، بیشترین مشابهت را با هیبرید *T. × hunnewelliana* نشان داد که هیبریدی از گونه‌های سرخدار کانادایی و ژاپنی می‌باشد. همچنین این توالی بیشترین فاصله را با *Taxus wallichiana* var. *mairei* نشان داد (شکل شماره ۳).

بود. در مورد گزینش کلونی‌های نوترکیب نیز مشخص نمود که بهترین روش تأیید نوترکیبی استفاده از هضم پلاسمیدی می‌باشد. استفاده از کلونی PCR به دلیل نشان دادن نتایج مثبت کاذب (False positive) توصیه نمی‌شود.

آنالیز توالی و روابط خویشاوندی: نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی مورد نظر دارای یک چارچوب قرائت آزاد (ORF) (Open Reading Frame) حاوی ۱۳۲۰ نوکلئوتیدی می‌باشد که ۴۴۰ اسید آمینه را کد می‌کند. بلاست توالی مشخص نمود که توالی دارای درجه بسیار بالایی از مشابهت (۹۷ تا ۹۹ درصد) با توالی‌های موجود از این ژن می‌باشد. این درجه بالای محافظت شدگی اشاره بر اهمیت دفاعی بالای این ژن دارد، زیرا ژن‌های دخیل در مکانیسم‌های دفاعی به دلیل اهمیت حیاتی، به شدت محافظت می‌شوند و تغییرات در



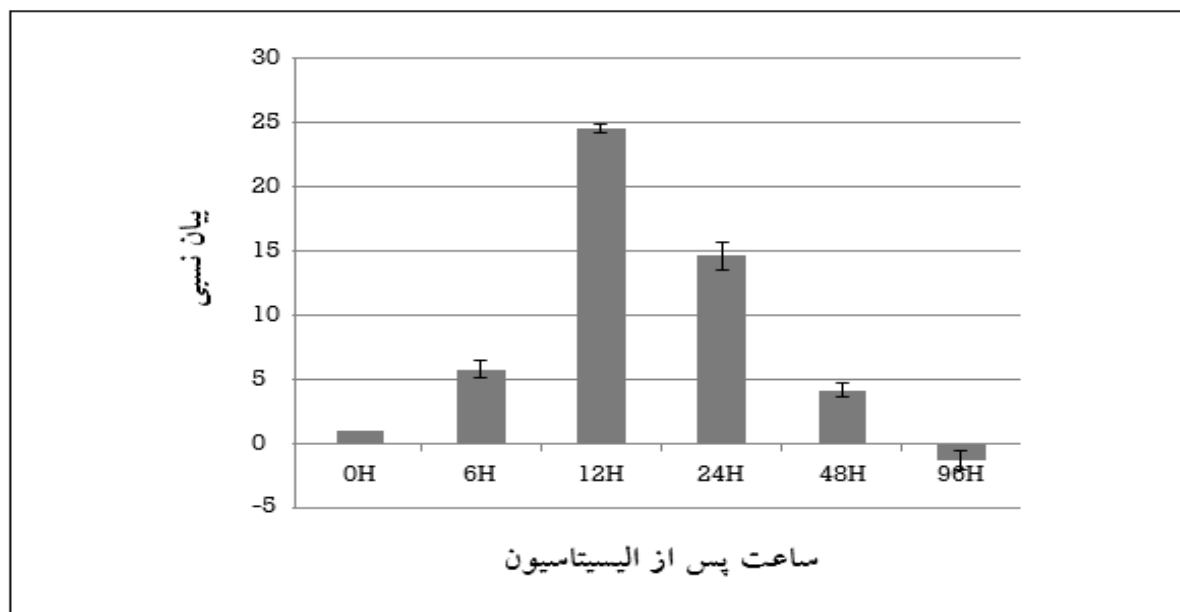
شکل شماره ۳- دندروگرام روابط فیلوژنتیکی توالی‌های ژن *dbat* اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده پشتوانه تکرار (bootstraps) می‌باشند و اعداد کنار گونه‌ها نشان‌دهنده شماره دسترسی (accession number) آنها می‌باشد



مقایسه تحریک گیاهان گلدانی و سرشاخه‌های بریده شده نشان داد که سرشاخه‌های بریده شده بهتر به الیستاسیون جواب می‌دهند (بیان ۴ برابری) که دلیل عمده آن می‌تواند تماس بهتر سرشاخه‌ها با متیل جاسمونات و نیز درجه تنش بیشتر باشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

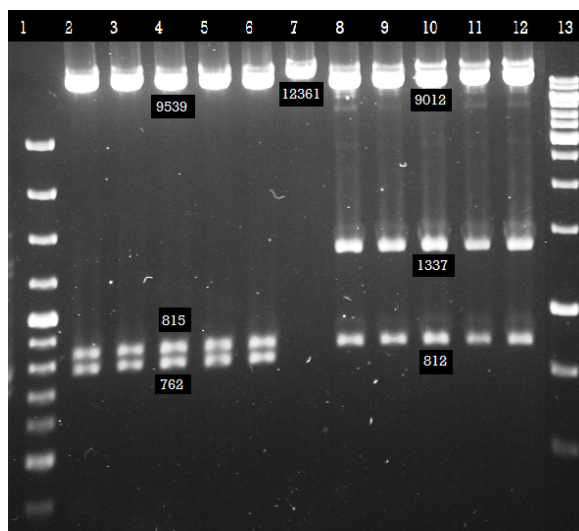
همسانه‌سازی در ناقل بیانی: بعد از تکثیر قطعه مورد نظر در ناقل بیانی pCAMBIA1304 و بررسی کلونی‌ها با آزمون‌های هضمی، مشخص شد که تمامی کلونی‌ها حامل قطعه هدف در جایگاه مورد نظر می‌باشند که اندازه سازه حاصل ۱۱۱۴۸ جفت باز بود (شکل شماره ۵).

بررسی بیان ژن: بررسی الگوی بیان ژن *dbat* نشان داد که در گیاهان شاهد میزان بیان این ژن بسیار اندک می‌باشد به طوری که میزان بیان آن در مقایسه با ژن *gapdh* (یک ژن متابولیسم اولیه) حدود ۲۰۰ برابر کمتر بود. استفاده از الیستور باعث افزایش چشمگیر بیان ژن *dbat* شد به طوری که میزان بیان نسبی آن در ۶ ساعت پس از تحریک به ۵/۸ برابر و در ۱۲ ساعت به حداکثر میزان خود یعنی ۲۴/۵۳ برابر حالت پایه خود رسید. مقادیر بالای بیان با اندکی کاهش (بیان نسبی ۱۴/۶۵ برابر) تا ساعت ۲۴ ادامه داشت. در ۴۸ ساعت میزان بیان به طور محسوسی کاهش یافت (بیان نسبی ۴/۵۱) و در نهایت در ۹۶ ساعت میزان بیان به حدود مقادیر پایه بازگشت نمود (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴- روند بیان ژن *dbat* در زمان‌های مختلف در پاسخ به تحریک با ۱۰۰ میکرو مول متیل جاسمونات (هر ستون میانگینی از ۳ اندازه‌گیری می‌باشد، مقادیر انحراف معیار نیز آورده شده است)





شکل شماره ۵- نتایج هضم سازه افزایش بیان *dbat-1304* با آنزیم‌های برشی: چاهک ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز، چاهک‌های ۲ تا ۶ نتیجه هضم وکتور نو ترکیب با *HindIII* (قطعات قابل انتظار: ۷۶۲، ۸۱۵ و ۹۵۳۹)، چاهک ۷ نتیجه هضم پلاسمید 1304 غیر نو ترکیب با *HindIII* (قطعه ۱۲۳۶۱ جفت بازی)، چاهک‌های ۸ تا ۱۲ برش وکتور نو ترکیب با *SalI/BsteII* (قطعات قابل انتظار ۸۱۲، ۱۳۳۷، ۹۰۱۲ جفت بازی) و چاهک ۱۳ سایز ۱ کیلو بازی فرمتاز می‌باشد

بحث

پروتئین) است. با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئینی از قبیل *expasy* و نیز *Phyre2* ساختار سه بعدی پروتئین به دست آمد. مقایسه ساختار پروتئینی حاصل با سایر توالی‌ها مشخص نمود که جایگزینی مذکور تغییر چندانی در شکل و ساختار سه بعدی پروتئین ایجاد نمی‌کند.

به منظور بررسی جانیشینی‌های اسید آمینه‌ای، فاصله گرانتهام می‌تواند ابزار مناسبی باشد که عواملی چون اندازه، بار، قطبیت و آبدوستی اسیدهای آمینه جایگزین شده را مورد توجه قرار می‌دهد [۳۰]. در این روش، فاصله کمتر از ۵۰ جانیشینی محافظت شده (Conservative)، ۵۱ تا ۱۰۰ نسبتاً محافظت شده (More conservative)، ۱۰۱ تا ۱۵۰ نسبتاً بنیادی (More radical) و بیشتر از ۱۵۰، جانیشینی بنیادی (Radical) در نظر گرفته می‌شود. در این روش کمترین مقدار ۵ می‌باشد که برای جانیشینی لوسین و ایزولوسین می‌باشد و بیشترین فاصله ۲۱۵ می‌باشد که برای جایگزینی سیستئین و تریپتوفان می‌باشد [۳۰]. بررسی الگوهای جانیشینی اسیدهای آمینه در تمامی توالی‌های مذکور نشان داد که در مقایسه با توالی مورد توافق ۹۶ جایگزینی دیده می‌شود و در این میان ۹ جانیشینی از نوع بنیادی می‌باشند. بررسی دقیق‌تر توالی نشان

بررسی روابط خویشاوندی: چنین الگوی خویشاوندی که ژن *dbat* سرخدار بومی ایران شباهت بیشتری با گونه دورتر خود یعنی *Taxus × hunnewelliana* نشان می‌دهد را می‌توان بین سایر ژن‌های این مسیر نیز مشاهده نمود، به طوری که بررسی توالی ژن‌های *txs* و *pam* نیز نشان داد که در برخی موارد حتی اختلاف توالی درون یک گونه بیشتر از دو گونه مختلف سرخدار می‌باشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). چنین الگوی تکاملی نشان می‌دهد که عواملی غیر از عوامل جغرافیایی نیز می‌توانند بر تکامل این ژن‌ها مؤثر باشند که می‌توان به میکروکلیمای مربوطه، نوع پاتوژن‌ها و گیاهخواران موجود و رژیم غذایی پاتوژن‌ها و گیاهخواران اشاره نمود [۲۹]. بررسی جهش‌های نقطه‌ای توالی نشان داد که توالی مذکور دارای سه جهش تک نوکلئوتیدی (SNP) (Single Nucleotide Polymorphism) منحصر به فرد می‌باشد که در سایر توالی‌های مورد بررسی وجود ندارند. محل وقوع این جهش‌ها عبارتند از جایگاه‌های ۳۸۱، ۶۵۲ و ۱۱۹۷، که در این میان تنها جهش در جایگاه ۶۵۲ باعث تغییر آمینو اسید شده است که در آن سرین جایگزین پرولین شده (جایگاه ۲۱۸



می‌باشد، می‌توان انتظار داشت که این تفاوت منحصر به فرد موجود در توالی، تغییرات چندانی را در خصوصیات کلی آنزیم ایجاد نمی‌کند و در کل منجر به تولید آنزیم فعال می‌شود. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که جایگاه فعال احتمالی در این آنزیم موتیف HXXXDG (اسیدهای آمینه ۱۶۲ تا ۱۶۷) می‌باشد که مشخص شد که هم در سرخدار ایرانی و هم در تمامی توالی‌های مورد بررسی، این موتیف کاملاً محافظت شده است و هیچ‌گونه تغییری نداشته است. فرض بر این است که که هیستیدین موجود به عنوان یک باز عمومی در کاتالیز انتقال گروه اسیل از اسیل / آرویل (acyl / aroyl) کوآ به سوبسترای الکی نقش ایفا می‌کند [۲۱]. از مجموع بررسی‌های توالی صورت گرفته مشخص شد که توالی مذکور یک توالی کارآمد می‌باشد که می‌تواند آنزیم فعال تولید کند.

داد که در محدود ۲۰۰ تا ۲۴۰ توالی آمینو اسیدی، ۲۳ عدد جانشینی دیده می‌شود که شدت جایگزینی در این ناحیه ۳/۱۵ برابر میانگین سایر نواحی می‌باشد (شکل شماره ۶). به علاوه مشخص شد که ۵ عدد از این جایگزینی‌ها بنیادی می‌باشند، یعنی شدت وقوع جانشینی‌های بنیادی در این ناحیه ۲۱/۷ برابر سایر نواحی توالی می‌باشد. وجود تغییرات بنیادی فراوان در ناحیه خاصی از آنزیم بیانگر آن است که ناحیه مذکور ناحیه‌ای مستعد جانشینی می‌باشد زیرا چنین جانشینی‌های شدیدی باعث از دست رفتن فعالیت آنزیم نشده است. تغییرات در چنین نواحی، باعث تکامل پروتئین می‌شود [۲۹،۳۰]. با توجه به اینکه SNP اسید آمینه‌ای منحصر به فرد توالی سرخدار ایرانی در ناحیه ۲۱۸ می‌باشد که این جایگاه در داخل ناحیه متحمل به جایگزینی می‌باشد و همچنین این نکته که فاصله گرانتهام آن ۷۴ می‌باشد که از نوع جانشینی نسبتاً حفاظت شده

	200	210	220	230	240
Consensus Sequence	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus baccata (Iranian) KC571283	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSFVITSETINCI				
T baccata AF456342.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSGLITSETIKWI				
T baccata EU107141.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus brevifolia EU107143.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus canadensis EU107134.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSFVITSETINCI				
Taxus chinensis var. mairei AY365031.2	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus cuspidata AF193765.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus fauna EU107137.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSFVITSETINCI				
Taxus globosa EU107145.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSFVITSETINCI				
Taxus x hunnewelliana EU107132.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGSFVITSETINCI				
Taxus x media EF028093.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus sumatrana EU107144.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus wallichiana var. chinensis EU107135.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus wallichiana var. wallichiana EU107136.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus wallichiana var. mairei EU107139.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus wallichiana var. mairei EU107140.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				
Taxus wallichiana var. chinensis EU107142.1	PEDPLYRFQYYHFRLLIRPPSTFGKIVQGS�VITSETINCI				

شکل شماره ۶- هم‌ردیف‌سازی (Alignment) ناحیه بسیار متغیر (جایگاه ۲۰۰ تا ۲۴۰) توالی‌های مختلف ژن *dbat* از گونه‌های سرخدار با استفاده از نرم‌افزار BioEdit. نواحی دارای جانشینی با کادر مشخص شده‌اند. جانشینی منحصر به فرد سرخدار ایرانی نیز در جایگاه ۲۱۸ مشخص شده است. اعداد کنار نشان‌دهنده شماره‌های دسترسی توالی‌ها می‌باشد.



منظور تهیه لاین‌های سلولی با پتانسیل ژنتیکی بالا) و امکان تولید تاکسان‌های متنوع‌تر (به دلیل وجود ساختارهای سلولی تمایز یافته‌تر) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بررسی افزایش بیان ژن در پاسخ به متیل جاسمونات مشخص نمود که سرشاخه‌های گیاه سرخدار می‌توانند جایگزین مناسبی برای کشت‌های سلولی باشند. سهولت، سادگی و عدم نیاز به پروسه زمانبر و حساس کشت‌های سلولی از مهم‌ترین مزایای آن می‌باشد. همچنین می‌توان گیاهان دارای استعداد ژنتیکی بالاتر را به سرعت غربال نمود تا لاین‌های سلولی پرتولید ایجاد شوند. به علاوه با توجه به اینکه شدت افزایش بیان ژن‌های انتهایی مسیر از قبیل *dbat* بسیار کمتر از ژن‌های اول مسیر می‌باشد می‌توان با استفاده از پروموتورهای افزایش بیانی از قبیل *CaMV35* بیان آن را به میزانی قابل رقابت با ژن‌های ابتدای مسیر افزایش داد، از این رو با توجه به نتایج سایر محققان [۱۸،۳۵،۳۶] می‌توان انتظار داشت سازه افزایش بیان حاصل در این تحقیق بتواند منجر به افزایش بیان این ژن کلیدی و متعاقباً افزایش تولید تاکسول روش‌های آنالیز در مقیاس وسیع ترانسکریپتوم، متابولوم و پروتئوم به همراه گسترش پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، سال‌های آینده شاهد جایگاه ویژه مهندسی متابولیک در تأمین داروهای ارزشمندی چون تاکسول در سیستم‌های زیستی بود.

بررسی بیان ژن: میزان بیان اندک مشاهده شده در گیاهان طبیعی، بیانگر نقش این ژن در متابولیسم ثانویه می‌باشد زیرا در شرایط طبیعی و عدم وجود استرس، نیازی به مقادیر بالای بیان ژن‌های دفاعی نمی‌باشد [۶،۱۱]. روند افزایش بیان مورد مشاهده با نتایج محققانی چون نیمس (Nims) و همکاران [۶] و اُنروپیا (Onrubia) و همکاران [۳،۲۵] همخوانی داشت. آنها نیز گزارش نمودند که میزان بیان در ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از تحریک به حداکثر خود می‌رسد و پس از آن به سرعت کاهش نشان می‌دهد. با وجودی که حداکثر بیان ژن مذکور در ۲۴ ساعت اول مشاهده می‌شود ولی محققان مختلف نشان دادند که حداکثر تجمع متابولیت مربوطه (باکاتین III) چندین روز پس از الیسیتاسیون مشاهده می‌شود که این وقفه به دلیل زمان مورد نیاز برای انجام واکنش‌های ترجمه‌ای و تولید متابولیت می‌باشد. همچنین از آنجایی که محققان مختلف وجود یک همخوانی بین بیان ژن *dbat* و بیان دو ژن محدود کننده مهم دیگر مسیر یعنی *bapt* و *dbtnbt* را مشاهده کرده‌اند، بنابراین میزان افزایش بیان ژن *dbat* می‌تواند بیانگر میزان بیان دو ژن دیگر نیز باشد. این محققان همچنین وجود ارتباط مستقیم بین افزایش بیان ژن *dbat* و تولید متابولیت‌های باکاتین III (فرآورده مستقیم آنزیم مذکور) و تاکسول (فرآورده نهایی مسیر بیوسنتزی) را گزارش نموده‌اند [۳۳، ۳۴، ۳۲، ۳۱، ۲۵، ۲۰، ۶، ۳]. بررسی میزان افزایش بیان نسبی نشان داد که سرشاخه‌ها می‌توانند به میزانی قابل رقابت با کشت‌های سلولی [۳] افزایش بیان داشته باشند (بیش از ۲۴ برابر) با این وجود تحریک سرشاخه‌های سرخدار دارای مزایایی چون سهولت و سرعت انجام (به دلیل حذف پروسه زمانبر و حساس کشت سلولی)، امکان غربال سریع گیاهان دارای سطوح بیان ژنتیکی بالا (به

منابع

1. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27: 1 - 93.
2. Cragg G and Newman D. Plants as a source of anti-cancer agenents. *Journal of Ethnopharmacol*.

2005; 100: 72 - 9.

3. Onrubia M, Moyano E, Bonfil M, Cusido RM, Goossens A and Palazon J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus*. *Journal of Plant Physiol*. 2013; 170: 211 - 9.



4. Malik S, Cusido R, Mirjalili M, Moyano E, Palazon J and Bonfil M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochem.* 2011; 46: 23 – 34.
5. Frense D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 73: 1233 – 40.
6. Nims E, Dubois CP, Roberts SC and Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng.* 2006; 8: 385 – 94.
7. Gomez-Galera S, Pelacho A, Gene A, Capell T and Christou P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep.* 2007; 26: 1689 – 715.
8. Jaziri M, Zhiri A, Gue Y and Dupont J. *Taxus* cell and organ culture as an alternative resource for taxoids production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 1996; 46: 59 - 75.
9. Zhong, JJ. Plant cell culture for Production of Paclitaxel and other Taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002; 94 (6): 591 - 9.
10. Sabater-Jara AB, Tudela LR and Lopez-Perez AJ. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochem Rev.* 2010; 9: 343 – 56.
11. Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R and Wildung M. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Rev.* 2006; 5: 75 - 97.
12. Ramachandra SR and Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002; 20: 101 – 53.
13. Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 2004; 7: 1 – 23.
14. Tabata H. Production of paclitaxel and related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Current Drug Targets* 2006; 7: 453 - 61.
15. Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of Paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 1129 – 32.
16. Patil R, Koleve M, Normanly J and Roberts S. Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. *Biotechnology J.* 2012; 7: 418 - 27.
17. Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biol.* 2007; 3: 387 - 95.
18. Ketchum REB, Wherland L and Croteau RB. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 2007; 26: 1025 – 33.
19. Walker K and Croteau RB. Taxol biosynthetic genes. *Phytochem.* 2001; 58: 1 - 7.
20. Zhang P, Li S, Liu T, Fu C, Zhou P, Zhao C and Yu L. Overexpression of a 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyltransferase gene leads to increased taxol yield in cells of *Taxus chinensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2011; 106: 63 – 70.
21. Walker K and Crteau RB. Molecular cloning of a 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *PNAS.* 2000; 97 (2): 583 - 7.
22. Ho C, Chang S, Lung J, Tsai C and Chen K. The Strategies to Increase Taxol Production by Using *Taxus mairei* Cells Transformed with TS and DBAT Genes. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2005; 3 (3): 179 - 85.
23. Han KH, Fleming P, Walker K, Loper M, Chilton WS, Mocek U, Gordon MP and Floss HG. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the in-vitro production of the anticancer drug, Taxol. *Plant Sci.* 1994; 95: 187 – 96.
24. Yari Khosroushahi A, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahi M, Naghdibadi H, Dadpour MR and Omid Y. Improved taxol



production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. 2006; 30: 262 – 9.

25. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Palazón, J., Goossens, A. and Cusidó, R.M. The relationship between TXS, DBAT, BAPT and DBTNBT gene expression and taxane production during the development of *Taxus baccata* plantlets. *Plant Science*. 2011; 181: 282 – 7.

26. Liao ZH, Chen M, Guo L, Gong YF, Tang F, Sun XF and Tang KX. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Prep. Biochem. Biotechnol*. 2004; 34: 209 – 14.

27. Wang T, Zhang N and Du L. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. *Biotechnology Letters* 2005; 27: 629 – 33.

28. Gambino G, Perrone I and Griebaudo I. A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. *Phytochemical Analysis* 2008; 19: 520 – 5.

29. Hao DC, Huang B, Yang L and Huang B. Molecular evolution of paclitaxel biosynthetic genes TS and DBAT of *Taxus* species. *Genetica*. 2009; 135: 123 – 35.

Grantham R. Amino-acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185: 862 – 4.

32. Brunakova K, Kosuth J, Katkovicinova Z, Lazarova M and Cellarova E. Expression of two genes of paclitaxel biosynthetic pathway during germination of *Taxus baccata* zygotic embryos. *Biologian Plantarum* 2010; 54 (3): 515 - 9.

33. Katkovicinova Z, Lazarova M, Brunacova K, Kosuth J and Cellarova E. Expression of dbat and dbtnbt genes involved in paclitaxel biosynthesis during the growth cycle of *Taxus baccata* L. callus cultures. *Methods Mol Biol*. 2009; 547: 249 - 62.

34. Li S, Zhang P, Zhang M, Fu C, Zhao C, Dong Y, Guo A and Yu L. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics* 2012; 13: 295 - 305.

35. Wu Q, Sun C, Luo H, Li Y, Niu Y, Sun Y, Lu A and Chen S. Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 Pyrosequencing. *Planta Med*. 2011; 77: 394 – 400.

36. Furmanowa M and Syklowska-Baranek K. Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. *Biotechnology Letters*. 2000; 22: 683 – 6.

37. Kim JA, Beak KH, Son YM, Son SH and Shin H. Hairy Root Cultures of *Taxus cuspidata* for Enhanced Production of Paclitaxel. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 2009; 52 (2): 144 - 50.

