

افزایش بیان دائم ژن کدئینون ردوکتاز در گیاه تراریخت شقایق الی فرا (*Papaver somniferom L.*)

بهمن حسینی^{۱*}، هاله هاشمی سهی^۲، فرج الله شهریاری^۳ و اسماعیل دهقان^۴

*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۲- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۰

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۸

چکیده

امروزه گیاه *Papaver somniferom L.* به عنوان منبع تجاری آلکالوئیدهای ارزشمند مورفین و کدئین محسوب می شود. آنزیم کدئینون ردوکتاز (Codeinone reductase) با قابلیت تبدیل کدئینون به کدئین و مورفینون به مورفین از آنزیم های کلیدی جهت مهندسی متابولیک مسیر بیوسنتز این ترکیب ها محسوب می شود. در این تحقیق ابتدا بهینه سازی انتقال ژن از طریق *Agrobacterium tumefaciens* دارای پلاسمید pBI121 (حاوی ژن گزارشگر *gus*) انجام گردید. جداسازی ژن مربوط به بیوسنتز کدئینون ردوکتاز براساس توالی موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI) انجام و در ناقل بیانی تحت کنترل پروموتور CaMV35S کلون گردید. پس از آماده شدن سازه، ریزنمونه های هیپوکوتیلی شقایق توسط آگروباکتریوم حامل سازه نو ترکیب، تلقیح شده و با استفاده از روش مولکولی PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشرو ژن *cor* و برگشتی ژن *nos* الحاق ژن در ژنوم گیاهان تأیید گردید. آنالیز HPLC نشان دهنده تغییر میزان، نوع و درصد ترکیب های آلکالوئیدی در نمونه های تراریخته نسبت به گیاهان شاهد بود. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده اهمیت دستورزی ژنتیکی آنزیم های مسیر بیوسنتزی مورفین در تغییر الگوی تولید متابولیت های ارزشمند بنزیل ایزوکوئینولین می باشد.

واژه های کلیدی: کدئینون ردوکتاز، مهندسی متابولیک، HPLC، *Papaver somniferom L.*، *Agrobacterium tumefaciens*

مقدمه

قدیمیترین گیاهان دارویی جهان بوده و در حال حاضر به عنوان سیستم مدل مهندسی متابولیت های ثانویه، تحقیقات مختلفی بر روی آن در حال انجام است (Zulak et al., 2008). این گیاه بیش از ۱۰۰ آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولین مختلف را تولید می کند که برخی از آنها نظیر مورفین ضددرد، کدئین و پاپاورین به عنوان

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین گروه بزرگ و متنوعی از محصولات طبیعی با بیش از ۲۵۰۰ ساختار شیمیایی مشخص می باشند که اغلب در ۵ خانواده گیاهی یافت می شوند (Facchini, 2001). گیاه خشخاش (*Opium poppy: Papaver somniferom*) یکی از

بیان آنزیم COR نشان می‌دهد که آن یک آنزیم کلیدی و اساسی است که توسط تیمار با محرک‌ها (Elicitors) یا زخمی کردن، برخلاف سایر ژن‌های سنتزکننده مورفین نظیر (sat) (Facchini & Park, 2003) القاء نمی‌شود.

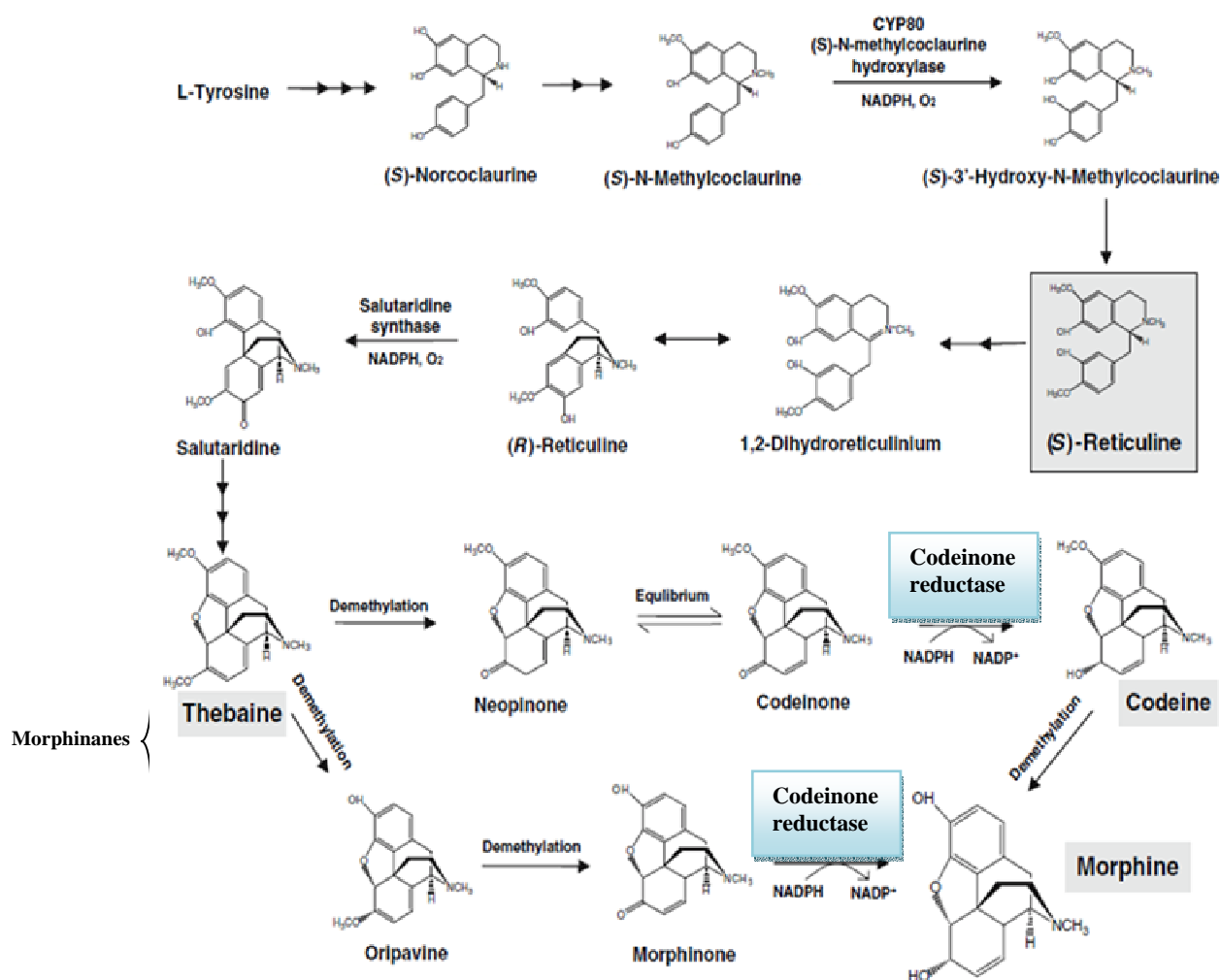
جداسازی ژن‌های مؤثر در بیوسنتز مورفین برای بهبود مهندسی متابولیک خشخاش و تولید آلکالوئیدهای ویژه اهمیت زیادی دارد. یکی از توانایی‌های ارزشمند استفاده از مهندسی ژنتیک، دستوری مسیرهای بیوسنتتیک سلول گیاه و هر یک از متابولیت‌ها می‌باشد.

میزان تولید مواد آلکالوئیدی مختلف را می‌توان با استفاده از دستوری ژنتیکی آنزیم‌های کلیدی شرکت‌کننده در مسیر متابولیکی تولید مورفین و کدئین تغییر داد. در این روش‌ها می‌توان با وارد نمودن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قراردادن آنها در کنار پیش‌برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. Larkin و همکاران (۲۰۰۷) با افزایش بیان آنزیم COR تولید مورفین به‌ازای وزن خشک گیاه *P. Somniferum* را افزایش دادند. Allen و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از تکنولوژی RNAi موفق به خاموشی خانواده چند ژنی COR در *P. somniferum* گردیدند. به‌واسطه خاموشی ژن مذکور، پیش‌ساز آلکالوئیدی رتیکولین به جای مورفینان‌ها در گیاه تجمع یافت.

نظر به موارد مذکور، تحقیق حاضر با هدف جداسازی و کلون ژن کلیدی کدئینون ردوکتاز به منظور افزایش بیان آن در گیاه شقایق الی‌فرا و افزایش تولید مورفین انجام شده‌است.

شل‌کننده عضلات، نوسکاپین به‌عنوان داروی ضدتومور و سانگوانارین به‌عنوان ترکیب ضد میکروبی از نظر پزشکی دارای اهمیت می‌باشند (Di Fiore et al., 2004). این ترکیب‌ها از پیش‌ماده اولیه ال-تیروزین (L-tyrosine) و ماده حدواسط مرکزی اس-رتیکولین (S-reticulin) ساخته می‌شوند. مورفین به همراه مواد شیمی درمانی دیگر نظیر وین کریستین (Vincristine)، وین‌بلاستین (Vinblastine) و کامپتوتسین (Camptothecine) از آلکالوئیدهای مهم تجاری بوده که از گیاهان دارویی استخراج می‌شوند. سنتز شیمیایی این ترکیب‌های ارزشمند به دلیل ساختار پیچیده‌شان بسیار سخت است. بنابراین گیاهان وحشی یا اهلی به‌عنوان تنها منبع تجاری تأمین‌کننده این ترکیب‌ها مورد توجه می‌باشند. در شکل ۱ چرخه بیوسنتز مورفین و آنزیم‌های درگیر در این مسیر نمایش داده شده‌است (Allen et al., 2004). مورفین طی نزدیک به ۱۷ مرحله آنزیمی از دو مولکول اسیدآمینو ال-تیروزین بدست می‌آید.

در طول مسیر بیوسنتزی مورفین در *P. somniferum*، آنزیم کدئینون ردوکتاز (Codeinone reductase) واکنش تبدیل کدئینون به کدئین را کاتالیز می‌کند که یک واکنش احیاء وابسته به NADP است. سرانجام مورفین در اثر دمتیلاسیون کدئین تولید می‌شود. به‌طور متناوب و در زنجیره دیگر، تبائین دمتیله شده و اریپاوین حاصل می‌گردد. در اثر اکسیداسیون اریپاوین، مورفینون تشکیل شده و در اثر احیاء آن توسط کدئینون ردوکتاز مورفین به‌عنوان محصول نهایی تولید می‌گردد (شکل ۱). نحوه‌ی



شکل ۱- مسیر کامل بیوسنتز مورفین

حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز کشت شدند، لیوان‌های حاوی بذر در فیتوترون با دمای 23°C و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت شش هفته جهت استخراج RNA از گیاهچه‌های تولید شده و ۹ روز جهت تهیه ریزنمونه نگهداری شدند. کلیه آزمایش‌های مربوط به کشت بافت و کارهای مولکولی در آزمایشگاه پژوهشگاه بیوتکنولوژی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و

مواد و روشها

مواد آزمایشی گیاهی و شرایط رشد

در این تحقیق از رقم فرانسوی Rence گیاه شقایق (*P. somniferum* L.) استفاده شد. در ابتدا بذرهای ریز شقایق با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت هفت دقیقه و چند بار شستشو با آب مقطر استریل ضد عفونی سطحی گردید. سپس بذرهای استریل شده در محیط کشت پایه B5

جهت استخراج mRNA از برگ‌های گیاهان استفاده گردید. از گیاهان شش هفته‌ای *P. somniferum*، cDNA کدکننده ژن cor توسط واکنش رونویسی معکوس (Reverse Transcription) با استفاده از mRNA استخراج شده سنتز گردید. cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو جهت سنتز cDNA دورشته‌ای و تکثیر توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن cor طبق برنامه بهینه‌سازی شده مورد استفاده قرار گرفت. به منظور حذف ساختار دورشته‌ای DNA-RNA از دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه استفاده گردید. ۳۰ چرخه برای PCR بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ اتصال یک دقیقه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۱۰ دقیقه اضافه برای گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Oligo6 و با استفاده از توالی‌های موجود برای ژن مورد نظر در بانک اطلاعاتی NCBI (با شماره دسترسی AF108435 و طول ۹۶۶ جفت باز) انجام گردید. به منظور وارد کردن ژن در پلاسمید pBI121، جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های محدودکننده *BamHI* و *SacI* در انتهای ۵ آغازگرها وارد شد.

توالی آغازگرهای طراحی شده عبارتند از:

AF108435 F: 5'- TCG.GAT.CCG.CCA.CCA.TGG.AGA.GTA.ATG.GTG.TA - 3'

AF108435 R: 5'- GAG.AGC.TCT.CAA.TCC.TTC.TCA.TCC.CAG - 3'

بیوتکنولوژی و آزمایش‌های مربوط به سنجش بیوشیمیایی در آزمایشگاه کنترل کیفی شرکت تماد انجام گردید.

باکتری و پلاسمید مورد استفاده

باکتری اشریشیا کولی (*Escherichia coli*) سویه DH5α و باکتری آگروباکتریوم تومه فشنس (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه GV3850، برای تهیه سلول‌های مستعد (Competent cells)، نگهداری، دستکاری و تکثیر پلاسمیدهای اصلی و نو ترکیب و همچنین جهت تراریخت نمودن ریزنمونه‌های گیاهی، مورد استفاده قرار گرفتند. از پلاسمیدهای pTZ57R/T به‌عنوان ناقل اولیه جهت نگهداری و تعیین توالی ژن و پلاسمید pBI121 جهت همسانه‌سازی و بیان ژن در گیاهان تراریخت استفاده شد. پلاسمید pTZ57R/T با داشتن طول ۲۸۸۶ جفت باز دارای ژن آنزیم بتالاکتاماز عامل مقاومت به آمپی‌سیلین، پیش‌برنده T7 در بالادست جایگاه کلونینگ، دارای خصوصیات متنوع دیگری به منظور کاربرد در کلونینگ می‌باشد. پلاسمید pBI121 دارای اندازه ۱۳kb حامل ژن نئوفسفوترانسفراز II (nptII) جهت ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌باشد که برای انتخاب سلول‌ها و گیاهان تراریخت حامل پلاسمید مورد نظر در شرایط محیط انتخابی استفاده می‌گردد.

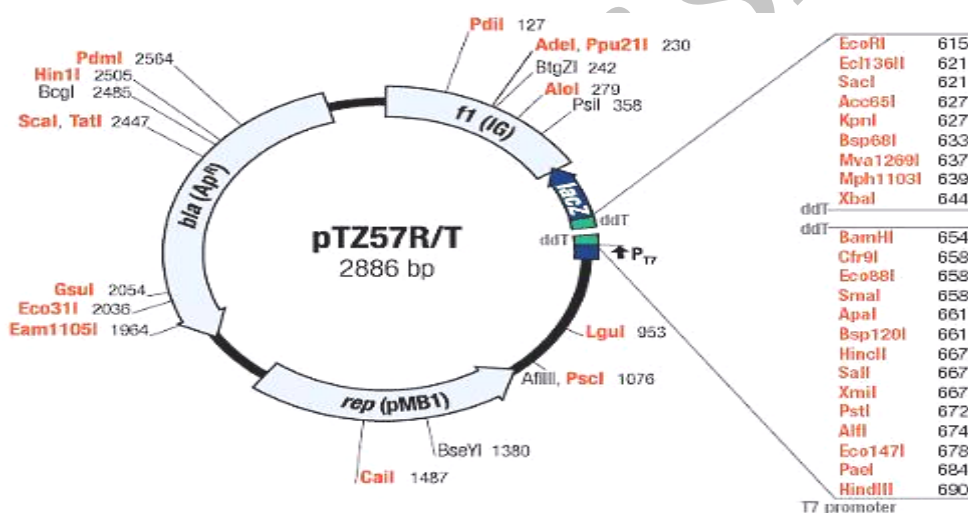
استخراج mRNA و سنتز cDNA

از کیت استخراج RNA XPLUS (شرکت سیناژن)

CaCl₂ تهیه شده بود (Sambrook & Russelle, 2001) با استفاده از روش فیزیکی گرم شدن و یخ زدن سریع (Freez and Thaw) انجام گردید. سلول‌های تراریخت حامل پلاسمیدهای نوترکیب در محیط مک‌کانگی و محیط انتخابی LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) انتخاب و جهت استخراج پلاسمید نوترکیب در طول شب (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش با دور ۱۸۰rpm) کشت شدند.

همسانه‌سازی ژن *cor* و ساخت ناقل دوگانه (Binary vector)

به منظور تکثیر، نگهداری و کلونینگ ژن مورد نظر در ناقل T/A، ابتدا محصولات PCR مستقیماً در ناقل T/A کلون گردید. پس از تولید dDNA دورشته‌ای ژن مورد نظر، کلونینگ آنها در ناقل T/A (Cloning Kit # k1214) توسط اتصال محصولات PCR در پلاسمید pTZ57R/T (شکل ۲) به کمک آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل کیت (فرمتاز) انجام گردید. در مرحله بعد، انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* که با استفاده از محلول



شکل ۲- پلاسمید pTZ57R/T

این پلاسمید در حالت خطی یک TA-vector است و برای کلون کردن محصولات PCR با انتهای ۳' آدنین دار مناسب می‌باشد.

حامل پلاسمید pBI121 در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰mg/l) در طول مدت شب (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش با دور ۱۸۰rpm) کشت و استخراج پلاسمید به روش Miniprep از سلول‌های کشت شده انجام شد. با استفاده از آنزیم‌های برشی *BamHI* و *SacI* ژن *gus* از پلاسمید pBI121

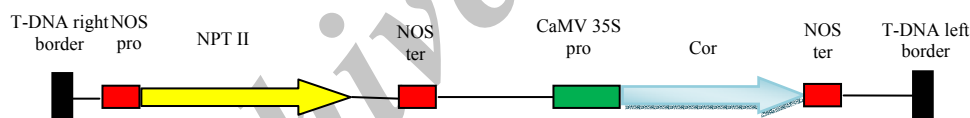
پس از استخراج پلاسمید به روش Miniprep و انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *SacI*، الکتروپورز ژل آگارز (۱٪) به منظور خالص‌سازی ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roche) انجام گردید. به منظور کلون نمودن ژن مورد نظر در پلاسمید pBI121، ابتدا سلول‌های سویه DH5 α باکتریایی

سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان پلت باکتریایی بدست‌آمده از سانتریفوژ، در محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت شبانه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و کلون‌های تراریخت باکتریایی انتخاب گردیدند. جهت تأیید الحاق ژن در پلاسمید pBI121، آزمون‌های Colony PCR و PCR با آغازگرهای اختصاصی *cor* در دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد و نیز آغازگر پیشرو *cor* به همراه آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد، همچنین هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *SacI* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. از ژل آگارز ۱٪ جهت مشاهده نتایج محصول PCR و محصول هضم آنزیمی استفاده گردید.

حذف شده و پلاسمید خطی فاقد ژن *gus* با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (Roche) جهت انجام واکنش اتصال (لیگاسیون) آماده گردید. در مرحله بعد، ژن *cor* در پلاسمید pBI121 خطی شده توسط آنزیم T4 DNA لیگاز اتصال یافت.

تراریختی باکتریهای مستعد *E. coli*

پس از پایان زمان آزمایش اتصال محصولات PCR در ناقل pBI121 (شکل ۳)، ۲۰ μ l از مخلوط واکنش را با ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مجدداً به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. سپس ۸۰۰ μ l محیط LB مایع استریل به ویال اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر انکوباتور و دمای ۳۷ درجه



شکل ۳- سازه نهایی ایجاد شده جهت انتقال و بیان ژن *cor* در گیاه

کلرید کلسیم، سلول‌های مستعد سویه GV3850 باکتری *A. tumefaciens* به روش مشابه *E. coli* تراریخت گردیدند. جهت گزینش کلون‌های نوترکیب از محیط کشت حاوی ریفامپسین و کانامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو تا سه روز استفاده گردید.

تأیید تراریختی آگروباکتریوم

تأیید تراریختی آگروباکتریوم با استفاده از آزمون‌های Colony PCR، PCR با آغازگرهای اختصاصی *cor* و نیز

تراریختی باکتریهای مستعد آگروباکتریوم

پس از تأیید نهایی ساخت سازه نوترکیب pBI121.cor، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در دستور کار قرار گرفت. جهت انتقال ژن به گیاهان یکی از مفیدترین روشهای انتقال ژن، استفاده از باکتری خاکزی *A. tumefaciens* می‌باشد. به همین منظور لازم است که پلاسمید حامل ژن مورد نظر ابتدا به آگروباکتریوم منتقل گردد و در ادامه گیاهان تراریخت گردند. پس از تهیه سلول‌های مستعد آگروباکتریوم توسط محلول‌های شیمیایی

نزدیک کوتیلدون و ناحیه نزدیک ریشه برش خورده و در سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و تکان داده شد. سپس ریزنمونه‌ها از سوسپانسیون خارج و روی کاغذ استریل جهت گرفتن باکتریهای اضافه مستقر شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها در محیط هم‌کشتی (Co-cultivation) B5 که حاوی ۲۰ gr/l ساکارز بود به مدت دو روز تحت شرایط روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

حذف باکتری از ریزنمونه‌ها: بعد از هم‌کشتی، حذف باکتری از ریزنمونه‌ها با شستشو توسط محلول آبی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم (Cefotaxime) انجام گردید. پس از رفع آلودگی باکتریایی، ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی (Selective medium) تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی (2,4-D) و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم جهت القای کالوس منتقل و هر ۳ هفته یک بار واکشت انجام گردید. پس از چند بار واکشت و تشکیل کالوس و القای جنین‌های سوماتیکی در محیط فاقد هورمون، جهت باززایی ساقه، جنین‌ها به محیط B5 بدون هورمون تکمیل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل گردید. سپس ساقه‌های القاء شده در محیط القای ریشه که همان محیط B5 تکمیل شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بود منتقل شدند. پس از ۱۰-۸ هفته ریشه‌ها القاء شده و پس از دو بار واکشت به داخل گلدان منتقل گردیدند.

استخراج ترکیب‌های آلکالوئیدی از برگ‌های گیاهان شقایق
استخراج مواد آلکالوئیدی برگ‌ها با استفاده از محلول متانول و کمی NaOH انجام گردید. ابتدا برگ‌های

آغازگر پیشرو ژن *cor* همراه با آغازگر معکوس خاتمه‌دهنده *nos* انجام گردید. جهت استخراج پلاسمید از آگروباکتریوم از کیت استخراج High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) استفاده گردید. در این کیت از محلول‌های آماده Washing Buffer, Binding Buffer و تیوب‌های Recovery جهت استخراج خالص پلاسمید استفاده گردید. در پایان، محصول خالص‌سازی شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد.

تراریختی *P. somniferum* و باززایی گیاهان تراریخت
تراریختی ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی شقایق در سه مرحله زیر انجام شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری: برای انجام تراریختی ابتدا تک‌کلونی آگروباکتریوم در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و همین مقدار ریفامپسین در شیکر با ۱۴۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در طول مدت شب کشت شد. سوسپانسیون باکتری با OD₆₀₀ برابر با ۰/۵ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شد. سپس رسوب بدست آمده با محیط 1/2MS مایع که دارای ۵۰ gr/l ساکارز و pH برابر ۵/۵ به همراه ۱۰۰ μl استوسرینگون (Acetosyringone) (200 μM) بود مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمد، در ادامه باکتریها در شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۴۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ ساعت نگهداری شدند. این سوسپانسیون باکتریایی برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد.

ترانسفورماسیون ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی شقایق:
ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی گیاهان ۷ تا ۹ روزه از ناحیه

این آزمایش در آزمایشگاه کنترل کیفی شرکت تماد انجام گردید.

نتایج

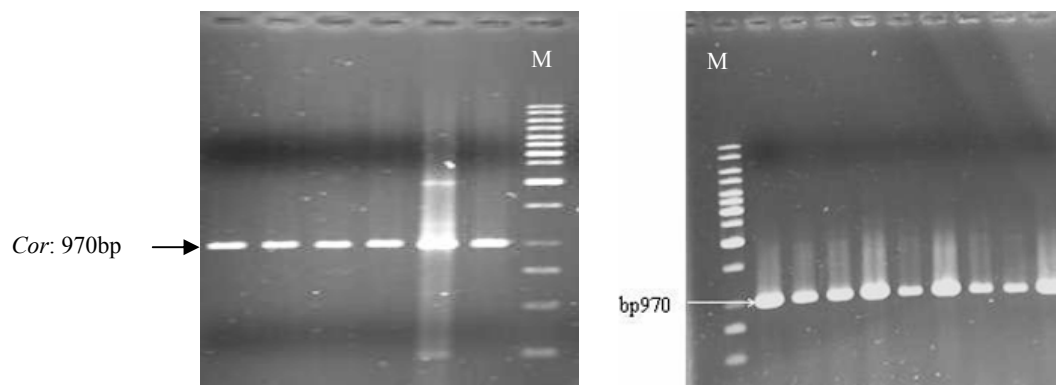
همسانه‌سازی ژن *cor*

پس از اتصال ژن مسئول بیوسنتز آنزیم COR به پلاسمید T/A، تراریختی باکتریهای مستعد *E. coli* انجام گردید. کلون‌های رشد یافته باکتری در دو محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و محیط مک‌کانگی به ترتیب انتخاب گردیدند. پس از استخراج پلاسمید، تأیید الحاق و تکثیر ژن مورد نظر در باکتری با استفاده از PCR و توالی آغازگرهای اختصاصی انجام گردید. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که پلاسمید pTZ57R/T نو ترکیب بوده و حامل قطعه ۹۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *cor* می‌باشد (شکل ۴- الف). یکی از روشهای تأیید سریعتر الحاق ژن، کاربرد آزمون Colony PCR و استفاده از کلونی‌های باکتری به‌عنوان الگو در واکنش PCR می‌باشد که در آن نیازی به استخراج پلاسمید نمی‌باشد. به همین منظور آزمون تأیید الحاق ژن از طریق Colony PCR نیز انجام گردید (شکل ۴- ب). نتایج این روش نیز الحاق ژن به داخل پلاسمید T/A را اثبات کرد.

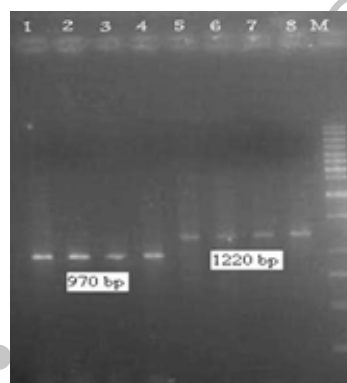
نتایج تأیید الحاق ژن در باکتری آگروباکتریوم نشان داد که در واکنش‌هایی که از آغازگرهای اختصاصی *cor* در PCR استفاده شده بود قطعات با اندازه ۹۷۰ bp تکثیر یافت، ولی در واکنش‌هایی که از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* (به منظور اطمینان از درج صحیح cDNA ژن *cor*) استفاده گردید اندازه قطعات تکثیری حدود ۲۵۰ bp افزایش یافت (شکل ۵).

نمونه‌های تراریخت و شاهد در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردیدند. سپس با ۳۰ ml متانول به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد ریفلاکس گردید. پس از سه مرحله استخراج، متانول تبخیر گردید. رسوب بدست آمده فیلتر شده و در نهایت در ۵ ml متانول حل گردید. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های مختلف استخراجی به همراه نمونه استاندارد با استفاده از سرنگ ویژه بر روی صفحه آلومینیومی سیلیکاژل (۲۰ در ۲۰ سانتی‌متر با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر و اندازه ذرات ۶-۵ میکرومتر، E-Merck, Germany) بارگیری شدند. در ادامه، این صفحه آلومینیومی در داخل تانک حاوی بافر ویژه تفکیک آلکالوئیدها شامل تولون- استون- اتانول- آمونیوم به نسبت (۴۰، ۶، ۲) به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. در پایان و پس از خشک کردن صفحه آلومینیومی در معرض هوا، وجود باندهای موجود در برگ‌های تراریخت و شاهد در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه CAMAG, Scanner 3 و مجهز به نرم‌افزار win CATS تشخیص داده شد. محلول‌های استاندارد مورفین، کدئین، پاپاورین، نوسکاپین و تبائین نیز از محصولات شرکت تماد تهیه گردید.

در ادامه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) میزان کمی تولید این ترکیب‌ها در نمونه‌های تراریخت و شاهد اندازه‌گیری شد. از دستگاه HPLC (مدل ۴۱۰ Varian prostar) با ستون 3.9×30 mm C18 (wat 011695 برای HPLC استفاده شد. فاز متحرک استفاده شده شامل ۶۰٪ Po4rNa2Po4H2Na و ۴۰٪ متانول با فشار ۰/۴۵ و مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد. طول موج ماوراءبنفش مورد استفاده برای شناسایی آلکالوئیدهای مورفین و کدئین ۲۵۴ nm در نظر گرفته شد.



شکل ۴- تایید همسانه سازی ژن *cor* در ناقل pTZ57R/T الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cor* (الف)، الکتروفورز الحاق ژن *cor* در یلاسمید با استفاده از Colony PCR (ب)، M مارکر ۱kb فرمتناز



شکل ۵- تایید تراریختی کلون‌های آگروباکتریوم از طریق الکتروفورز محصولات PCR

چاهک‌های ۴-۱ تایید تراریختی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکثیر حدود ۹۷۰bp ژن *cor*، ۴ چاهک بعدی تایید تراریختی آگروباکتریوم با استفاده از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* و تکثیر حدوداً ۱۲۲۰bp. مارکر ۱kb فرمتناز

باززایی گیاهان تراریخت

پس از تایید صحت عملکرد سازه‌های ساخته شده توسط بیان موقت (Transient expression)، سلول‌های باکتری حامل پلاسمید pBI121.*cor* جهت تراریختی دائم ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی گیاهان *P. somniferum* استفاده گردید. پس از تراریختی ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی و القای کالوس در محیط انتخابی 2 B5+2mg/l، 4-D + 200mg/l cefotaxime + 10mg/l kanamycin انجام شد. پس از گذشت ۴ ماه جنین‌زایی در محیط B5 فاقد هورمون حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر

کانامایسین تکمیل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. باززایی نیز در شرایط مشابه انجام گردید (متوسط نرخ باززایی گیاهان تراریخت ۸٪ بود). القای تشکیل ریشه در گیاهان شقایق بسیار مشکل می‌باشد و از همین طریق نرخ باززایی این گیاهان به دلیل مشکلات در عمل ریشه‌زایی بشدت کاهش می‌یابد (تنها ۵۰٪ گیاهان باززایی شده قادر به تولید ریشه کافی بودند). افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین باعث افزایش ۲۰-۳۰ درصدی ریشه‌زایی گردید. در نهایت ۱۵٪ گیاه قادر به تولید میزان کافی ریشه شدند (شکل ۶).



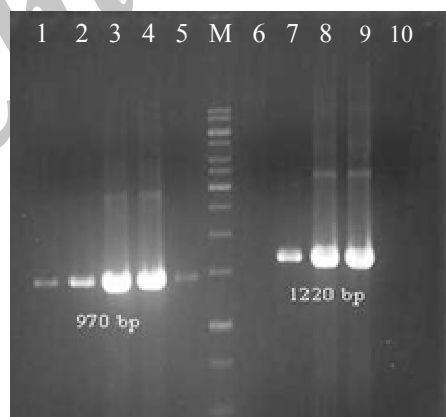
شکل ۶- باززایی گیاهان تراریخت *P. somniferum*

الف: تولید جنین‌های سوماتیکی در محیط انتخابی حاوی اسید آمینه گلوتامین
 ب: باززایی گیاهچه‌های تراریخت احتمالی در محیط باززایی B5 فاقد هورمون به‌علاوه سفوتاکسیم
 ج: ریشه‌زایی گیاهان تراریخت احتمالی در محیط B5 دارای پرولین و IBA

شناسایی می‌باشد، ولی استفاده از آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* هیچ بانندی را در گیاهان شاهد نشان نداد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ژن مورد نظر به درستی در ژنوم گیاهان تراریخته تلفیق یافته‌است. البته نتایج بررسی‌های مولکولی بر روی کلیه ۱۵ گیاه ریشه‌دار شده حضور ژن مورد نظر در آنها را تأیید نمود.

شناسایی ژن *cor* در گیاهان تراریخت

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR گیاهان تراریخته، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن *cor* و نیز با استفاده از آغازگرهای مستقیم و برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشها نشان داد که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن *cor* در گیاهان تراریخته و شاهد قابل



شکل ۷- تأیید تراریختی گیاهان شقایق الی‌فرا توسط ژن *cor* با استفاده از PCR

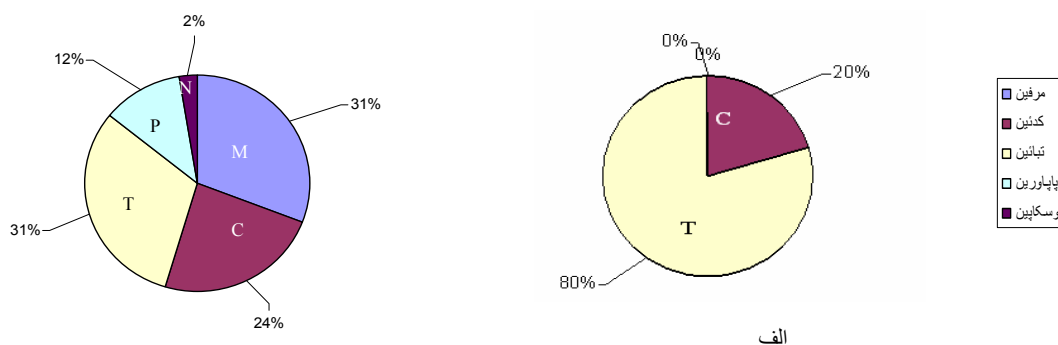
چاهک ۱، ۲ و ۵ تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cor* و تکثیر قطعات به طول ۹۷۰bp، چاهک ۳، ۴، ۸ و ۹ کنترل مثبت (پلاسمید pBI121*cor*)، چاهک ۷ تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از آغازگر مستقیم ژن *cor* و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* و تکثیر قطعات به طول ۱۲۰۰bp و چاهک ۱۰ گیاه غیرتراریخته می‌باشد.

برگی حکایت از افزایش تعداد و درصد آلکالوئیدها در نمونه‌های تراریخت در مقایسه با کنترل داشت.

بررسی تغییر متابولیت‌ها در گیاهان تراریخت و شاهد جهت سنجش درصد آلکالوئیدها در نمونه‌ها از روش HPLC و TLC استفاده شد. نتایج HPLC اولیه نمونه‌های

جدول ۱- نتایج آنالیز HPLC در برگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد

درصد آلکالوئید برگ‌های گیاهان		نوع آلکالوئید
تراریخته	شاهد	
۰/۱۳	۰	مورفین
۰/۱	۰/۰۹	کدئین
۰/۱۳	۰/۳۵	تبائین
۰/۰۵	۰	پاپاورین
۰/۰۱	۰	نوسکاپین



شکل ۸- درصد ترکیب‌های مختلف آلکالوئیدی در نمونه‌های برگ گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد

الف: گیاهان شاهد، ب: گیاهان تراریخته با ژن *cor*

C: کدئین، T: تبائین، M: مورفین، P: پاپاورین، N: نوسکاپین

مورفین، کدئین و نوسکاپین، میزان تبائین کاهش یافته‌است. در حالی که در برگ گیاهان شاهد مورفین غیر قابل ردیابی می‌باشد، در گیاهان تراریخته امکان تولید مورفین در برگ فراهم گردیده‌است. همچنین در گیاهان تراریخته ترکیب‌های مؤثر دیگری نظیر پاپاورین و نوسکاپین تولید می‌گردد که در گیاهان شاهد امکان شناسایی و اندازه‌گیری آنها وجود ندارد. درصد

نتایج آنالیز HPLC نشان داد که میزان، نوع و درصد ترکیب‌های آلکالوئیدی در نمونه‌های تراریخته و گیاهان شاهد متفاوت می‌باشد (جدول ۱). در حالی که در گیاهان شاهد تنها تبائین و مقدار کمی کدئین قابل تشخیص می‌باشد، اما در گیاهان تراریخته امکان شناسایی مورفین، پاپاورین و نوسکاپین وجود دارد. در گیاهان تراریخته با ژن *cor* بدلیل مصرف تبائین به‌عنوان پیش‌ماده بیوستز

ترکیب‌های آلکالوئیدی به کل ترکیب‌ها نیز در بین نمونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (شکل ۸). در حالی که درصد تبائین در گیاهان شاهد ۸۰٪ آلکالوئیدهای شناسایی شده را تشکیل می‌دهد. این نسبت پس از بیش‌بیان ژن *cor* برابر ۳۱٪ می‌باشد. درصد مورفین نیز در گیاهان تراریخته با ژن *cor* ۳۱٪ کل آلکالوئیدها را شامل می‌شود.

بحث

مورفین به همراه داروهای شیمی درمانی وینکریستین، وینبلاستین و کامپوتوسین یکی از مهمترین ترکیب‌های آلکالوئیدی است که به صورت تجاری از گیاهان دارویی استحصال می‌شود. افزایش میزان آلکالوئید باعث افزایش رقابت‌پذیری صنعت کشت شقایق می‌شود. با استفاده از روشهای اصلاح نباتات میزان آلکالوئید در دو دهه اخیر دو برابر شده است. با این حال، افزایش سریع در عملکرد مورفین از طریق اصلاح سنتی تقریباً محدود شده است. ترانسفورماسیون ژنتیکی گیاهان شقایق فرصت مناسبی را جهت افزایش و بهبود ترکیب‌های آلکالوئیدی در اندام‌های مختلف آن فراهم آورده است. در این راستا از راهبردهای مختلفی مانند افزایش فعالیت آنزیم‌ها در گلوگاه‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها و مهار واکنش‌های جانبی نامطلوب که جریان مسیر را به سمت ترکیب‌های نامطلوب هدایت می‌نماید استفاده شده است (Kutchan, 1998; Facchini, 2001; Larkin et al., 2007).

تاکنون گزارش‌های مختلفی از باززایی گیاهان از بافت‌های مختلف *P. somniferum* گزارش شده است (Nessler, 1982; Nessler & Mahlberg, 1979; Gerardy & Zenk, 1985; Yoshikawa & Furuya, 1985; Ikuta et al., 1978; Schumacher et al., 1987).

نتایج را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده است).

جهت افزایش بیان ژن یکی از ضروری‌ترین مسائل استفاده از پیش‌برنده‌های قوی می‌باشد. تاکنون اغلب از پیش‌برنده *CaMV35S* و پیش‌برنده فاژ T7 استفاده شده است. در این تحقیق نیز پلاسمید pBI121 حامل ژن نشانگر *gus* و ژن *iptII* استفاده گردید. ژن *cor* تحت

موضوع نشان می‌دهد که آنزیم کدئینون ردوکتاز با مصرف پیش‌ماده‌های مراحل قبلی باعث افزایش تولید محصولات نهایی می‌گردد. آزمایش‌های Allen و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که با مهار کامل تمام اعضای خانواده چند ژن *cor* با استفاده از RNAi، میزان ماده حد واسط اس-رتیکولین (۷ مرحله آنزیمی بالادست کدئین) در مقایسه با کدئین، مورفین، اریپاوین و تبائین افزایش می‌یابد. در این آزمایش‌ها تجمع مشتقات متیله رتیکولین نیز مشاهده گردید. بنابراین با توجه به مواردی که ذکر گردید و نیز سایر تحقیقات، آزمایش‌های افزایش بیان ژن نشان داده است که با دست‌ورزی در بیان یک ژن سایر مسیرهای آنزیمی نیز دچار تغییر شده و در نتیجه میزان سایر آلکالوئیدها تغییر می‌یابد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ژن‌های مورد نظر در بافت رنوم گیاهی تلفیق شده‌اند و همراه با رنوم گیاهان در تمامی سلول‌ها تقسیم شده و به سلول‌های دختری منتقل شده‌اند. نتایج PCR ژن‌ها با آغازگرهای پیشرو اختصاصی و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* نشان داد که ژن مورد نظر به‌صورت کاست بیانی در رنوم میزبان تلفیق شده‌است. در حالی که در گیاهان شاهد باندی برای تکثیر با استفاده از آغازگرهای مستقیم ژن و آغازگر برگشتی خاتمه‌دهنده *nos* تکثیر نگردید.

در مجموع، می‌توان گفت که با افزایش بیان *cor* پروفیل تولید متابولیت‌های مهم دارویی گیاه خشخاش تغییر یافته است. همان‌طور که انتظار می‌رفت تبدیل تبائین به ترکیب ارزشمند مورفین در برگ گیاه می‌تواند در برنامه‌های اقتصادی تولید ترکیب‌های دارویی این گیاه مؤثر باشد. از طرفی با توجه به تولید اختصاصی و ترشح این آلکالوئیدها در مجاری شیرابه‌ای، بررسی بیشتر و آنالیز

کنترل پیش‌برنده CaMV35S در باکتریهای *E. coli* و *A. tumefaciens* وارد و با استفاده از روش هم‌کشتی باکتری-ریزنمونه گیاهی، در رنوم گیاهان باززا شده الحاق گردید. بررسی مطالعات مولکولی گیاهان باززا شده در شرایط درون شیشه حضور ژن مورد نظر در گیاه را با رؤیت باندهای با اندازه تقریباً ۹۷۰bp که برابر با توالی کامل ژن *cor* می‌باشد، اثبات نمود. جهت آنالیز بیان ژن‌ها نیز از روش بیوشیمیایی HPLC استفاده گردید. ارزیابی‌ها نشان داد که در اثر افزایش بیان ژن *cor* میزان ترکیب‌های آلکالوئیدی شامل کدئین، مورفین، نوسکاپین و پاپاورین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داشته‌است و در مقابل میزان تبائین کاهش یافت. حداکثر افزایش تولید نیز برای آلکالوئید مورفین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده گردید. مورفین، نوسکاپین و پاپاورین در گیاهان شاهد قابل مشاهده نبود، در حالی که این ترکیب‌ها در گیاهان تراریخته به‌ترتیب در مقادیر ۰/۱۳، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد قابل شناسایی بودند. Larkin و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش بیان کدئینون ردوکتاز (*cor*) افزایش معنی‌دار مورفین در تمامی گیاهان تراریخته (در آزمایش‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای) را به همراه دارد. در این آزمایش‌ها پس از چهار سال نشان داده شد که مجموع آلکالوئیدها بیش از ۲۸٪، مورفین ۲۲٪، کدئین ۵۸٪ و تبائین ۷۵٪ افزایش را نشان می‌دهد. این مطالعات آشکار ساخت که میزان تبائین در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان کنترل به میزان بالایی کاهش یافت. اگرچه میزان تبائین در گیاهان کنترل ۸۰٪ کل ترکیب‌های آلکالوئیدی برگ را شامل می‌شود، اما این میزان در گیاهان تراریخته به ۳۱٪ کل ترکیب‌های آلکالوئیدی برگ تقلیل یافت. این

- Ikuta, A., Syono, K. and Furuya, T., 1978. Alkaloids of callus tissues and dedifferentiated plantlets in the Papaveraceae. *Phytochemistry*, 13: 2175-2179.
- Kapoor, L.D., 1995. *Opium poppy Botany, Chemistry and Pharmacology*. Routledge, 326p.
- Kutchan, T. M. 1998. Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. 257-316, In: Cordell, G., (ed.), *The Alkaloids*. Academic Press, San Diego, pp. 257-316.
- Larkin, P.J., Miller, J.A.C., Allen, R.S., Chitty, J.A., Gerlach, W.L., Frick, S., Kutchan, T.M. and Fist, A.J., 2007. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 26-37.
- Nessler, C.L. 1982. Somatic embryogenesis in the Opium Poppy, *Papaver Somniferum*. *Physiologia Plantarum*, 55(4): 453-458.
- Nessler, C.L. and Mahlberg, P.G., 1979. Ultrastructure of laticifers in redifferentiated organs on callus from *papaver somniferum*. *Canadian journal of botany*, 57(6): 675-685.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344p.
- Schumacher, H.M., Gundlach, H., Fiedler, F. and Zenk, M.H., 1987. Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 6(6): 410-413.
- Yoshikawa, T. and Furuya, T. 1985. Morphinan alkaloid production by tissues differentiated from cultured cells of *Papaver somniferum* (1). *Planta Medica*, 51(2): 110-113.
- Zulak, K.G., Weljie, A.M., Vogel, H.J. and Facchini, A.J., 2008. Quantitative HNMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biology*, 8: 5.

ترکیب‌های شیرابه‌ای کپسول گیاه نیز باید در برنامه‌های آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Allen, R.S., Millgate, A.G., Chitty, J.A. Thisleton, J., Miller, J.A.C., Fist, A.J., Gerlach, W.L. and Larkin, P.J., 2004. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in Opium poppy. *Nature Biotechnology*, 22: 1559-1566.
- Allen, R.S., Miller, J.A., Chitty, J.A., Fist, A.J., Gerlach, W.L. and Larkin, P.J., 2008. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in Opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 22-30.
- Di Fiore, S., Hoppmann, V., Fischer, R. and Schillberg, S., 2004. Transient Gene Expression of Recombinant Terpenoid Indole Alkaloid Enzymes in *Catharanthus roseus* Leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 15-22.
- Dieu, P. and Dunwell, J.M., 1988. Anther culture with different genotypes of Opium poppy (*Papaver somniferum* L.): effect of cold treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(3): 263-271.
- Facchini, P.J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(52): 29-66.
- Facchini, P.J. and Park, S.U., 2003. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in Opium poppy. *Phytochemistry*, 64: 177-186.
- Gerardy, R. and Zenk, M.H., 1992. Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 32: 79-86.

Stable Over expression of codeinone reductase gene in transgenic *Papaver somniferum* L.

B. Hosseini^{1*}, H. Hashemi Sohi², F. Shahriari³ and E. Dehghan⁴

1*- Corresponding author, Urmieh University, Urmieh, Iran, E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir

2- National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

4- PhD. student, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Received: February 2010

Revised: June 2011

Accepted: June 2011

Abstract

Papaver somniferum L. today is considered as the commercial source of the narcotic analgesics morphine and codeine. Codeinone reductase is a key gene in metabolic engineering of isoquinoline alkaloids pathway with the ability of conversion of codeinone to codein and morphine. In this project, at first optimization of the gene transfer of *P. somniferum* was performed via *A. tumefaciens* containing pBI121 plasmid. This gene then was cloned in expression vectors under control of CaMV35 promoter and transferred to plants by agro transformation. After preparing the structure, hypocotyl explants of *P. somniferum* was inoculated by agrobacterium carrying recombinant structures. HPLC analysis indicated the variation of the amount, type and percentage of alkaloid compounds in transgenic samples compared to the control plants. The result of the evaluation showed qualitative and quantitative changes in metabolite production of transgenic and control plants.

Key words: Codeinone reductase, metabolic engineering, HPLC, *Papaver somniferum* L., *Agrobacterium tumefaciens*.