ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۴۰۲-۳۹۷

تجزیه مولکولی ژن رمز کننده آنزیم کلیدی سورولین سنتتاز درگیاه دارویی *Psoralea corylifolia*

Molecular analysis of gene coding Psoralen synthase as a key enzyme in medicinal plant *Psoralea corylifolia*

بهروز محمدپرست*[۱]، موسی رسولی[۱]، محمود قربانی[۱]، ساناز زرداری[۲]

۱- به ترتیب استادیاران و مربی، دانشگاه ملایر
۲- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تبریز

Mohammad Parast B*[1], Rasouli M[1], Ghorbani M[1], Zardari S[2]

1. Assistant Professors and Instructor, Malayer University
2. Graduated MSc Student, Tabriz University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: BMP2013@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۸ – تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

سورولین یکی از متابولیت های ثانویه مهم می‌باشد که در گیاه *Psoralea corylifolia* وجود دارد. از جنبه‌های مهم دارویی سورولین می‌توان به تاثیر ضد سرطانی آن بر علیه سرطان خون، ریه و سینه اشاره کرد. در این تحقیق به علت اهمیت دارویی سورولین، چرخه ساخت آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ژن رمزکننده آنزیم کلیدی سورولین سنتتاز که مسئول ساخت سورولین می‌باشد، برای اولین بار بوسیله تکنیک‌های مولکولی از بافت برگ گیاه *Psoralea corylifolia* جداسازی و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی مولکولی مشخص نمود که طول ژن آنزیم کلیدی سورولین سنتتاز ۱۲۳۷ bp می‌باشد. همچنین بررسی ترتیب نوکلوتیدها با استفاده از توالی ژن‌های ثبت شده در سایت بانک جهانی ژن مشخص کرد که ژن همسانه‌سازی شده ۹۳ درصد با ژن سورولین سنتتاز موجود در گیاه *Ammi magus* مشابهت داشت.

واژه‌های کلیدی
ارزیابی مولکولی
ژن سورولین سنتتاز
سورولین
متابولیت ثانویه
Psoralea corylifolia

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه دارویی به هر نوع گیاهی گفته می شود که یک یا چند اندام آن دارای موادی می باشند که برای اهداف درمانی یا ساخت دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاه *Psorallea corylifolia* متعلق به خانواده *Fabaceae* و در گروه گیاهان رو به انقراض می‌باشد. این گیاه منبع غنی از متابولیت های ثانویه می‌باشد که به همین دلیل دارای ارزش دارویی بالایی جهت تامین سلامتی انسان‌ها است. مواد موثره با ارزش این گیاه در گروه‌های ایزوفلاونوئیدها[1]، فورانوکمارین‌ها[2] و کومارین‌ها قرار می‌گیرند. فورانوکمارین‌ها از متابولیت‌های طبیعی می‌باشند که به دو دسته خطی سورولین[3] و غیر خطی آنژلیسین[4] تقسیم می‌شوند (Anonymous 1989). از بین همه ترکیبات با ارزش دارویی که در این گیاه وجود دارد سورولین یکی از مهمترین آنها می‌باشد.

این ماده به عنوان دارو برای درمان سرطان پوست، خون، سینه و ریه استفاده می‌شود (Anonymous 1989; Oliveira et al. 2006). شناسایی ژن های رمز کننده آنزیم های کلیدی در فرآیند تولید متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی در گیاهان مختلف، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. شناسایی این ژن‌ها و بررسی نحوه بیان آنها امکان تولید در سطح صنعتی مواد با ارزش دارویی را فراهم می‌سازد. تاکنون مطالعاتی در زمینه شناخت آنزیم‌های کلیدی و جداسازی ژن (های) آنها در فرآیند تولید متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است (Larbat et al. 2007).

فرآیند ساخت سورولین را در گیاه *Ammi majus* L. با بررسی آنزیم‌های کلیدی موثر در تولید این ماده، مورد مطالعه قرار دادند (Larbat et al. 2007). نتایج آنها نشان داد که آنزیم سورولین سنتتاز به عنوان موثرترین آنزیم در فرآیند تولید "سورولین" از پیش ماده "مارماسین" می باشد. همچنین آنها با استفاده از آغازگرهای تخصصی طراحی شده، ژن رمز کننده آنزیم کلیدی سورولین سنتتاز را شناسایی و سپس همسانه‌سازی کرده و در نهایت بیان این ژن را بررسی کردند. علاوه بر این، شناسایی سایر آنزیم‌های کلیدی مسئول سنتز متابولیت های ثانویه در گیاهان مختلف بررسی شده است. به طوری که Xu et al. (2008) ژن رمز کننده آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیا لیاز[5] را که در فرآیند تولید فلاونوئید در گیاه *Ginkgo biloba* نقش اصلی دارد، شناسایی و همسانه‌سازی کردند. به دلیل اهمیت سورولین چرخه ساخت آن مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته به طوری که در چرخه ساخت این ماده آنزیم‌های دی متیل آلیل آمبلی فرون ترانسفراز، مارماسین سنتاز و سورولین سنتاز نقش اساسی دارند (Buchanan et al. 2000). بر اساس بررسی منابع انجام شده ژن-های رمز کننده آنزیم‌های کلیدی موثر در فرآیند تولید سورولین در گیاه *Psorallea corylifolia* کشف نشده است.

هدف از انجام این تحقیق شناسایی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن رمزکننده آنزیم کلیدی مسئول ساخت سورولین در چرخه تولید این ماده در گیاه *Psorallea corylifolia* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia* از آزمایشگاه فارماکولوژی واقع در قازی آباد در ایالت اوتارپرادش[6] هندوستان خریداری شد و در باغ گیاهشناسی دانشگاه دهلی در اسفند ماه ۱۳۸۹کشت شد. برگهای جوان و توسعه یافته گیاهان کشت شده در شرایط مزرعه جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند.

RNA بوسیله روش تعیر شکل یافته Salzman et al. (1999) استخراج شد. اولین رشته cDNA بوسیله دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز ساخته شد. آغازگرها برای ساخت cDNA توسط نرم افزار پرایمر تری[7] بر اساس ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز که در گیاه Ammi magus توالی یابی شده بود، طراحی شدند (جدول۱). در مخلوط واکنش، مقدار دو میکرولیتر از cDNA تهیه شده با غلظت ۵ نانوگرم بر میکرولیتر به ۱۸ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل ۴/۳ میکرولیتر مخلوط (dNTPs، PCR buffer، Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$)، µl

[1] Isoflavonoids
[2] Furanocoumarins
[3] Psoralen
[4] Angelicin
[5] Phenylalanine ammonia lyase
[6] Attar pradesh
[7] Primer3

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده و مورد استفاده در مطالعه ژن آنزیم کلیدی مسئول ساخت سورولین

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول آغازگر(نوکلئوتید)	GC%	دمای اتصال °C
۱	RBF	5′-GCAGAGTGCAGAGCAATAGAAATGAAGATGC-3′	31	45.16	73.7
۲	RBL1	5′-GAG GCTTTGAAAACCCATGA-3′	25	48	68.3
۳	RBL2	5′-CGCAAGCATCACTCAGAGAC-3′	20	45	63.8
۴	RBR	5′-GAGCTGGGAATGAGTATTGACATGG-3′	20	50	64.1
۵	RBR1	5′-CAAACATGTGGTCTGGCAAC-3′	20	55	63.8
۶	RBR2	5′-CAAACATGTGGTCTGGCAAC-3′	20	50	64.1

جدول۲- چرخه دمایی استفاده شده برای سه مرحله (باز شدن، اتصال و بسط) در هر یک از مراحل.

مرحله	مرحله انجام شده	تعداد سیکل (تکرار)	درجه حرارت °C
۱	شروع باز شدن رشته DNA	۱	۹۵
	تک رشته ای شدن DNA	۵	۹۵
۲	اتصال آغازگر به DNA	۵	۴۵
	بسط آغازگر		۷۲
	تک رشته ای شدن DNA	۲۵	۹۵
۳	اتصال آغازگر به DNA	۲۵	۵۸
	بسط آغازگر		۷۲
۳	تکمیل بسط	–	۷۲

۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پسرو با غلظت µM ۱۰ و ۱۲/۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل اضافه شد که در نهایت حجم محلول واکنش PCR به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ ذکر شده است. پس از انجام واکنش PCR، الکتروفورز نمونه ها با استفاده از ژل آگاروز ۱/۶ تا ۲ درصد (بسته به تعداد مکان های مورد هدف هر آغازگر) به مدت ۲/۵ ساعت با جریان ۸۰ ولت صورت گرفت. پس از این مرحله ژل رنگ‌آمیزی شد و قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV توسط دستگاه ژل داک مشاهده شده و عکس‌برداری از ژل صورت گرفت.

همسانه‌سازی ژن سورولین سنتاز از گیاه *Psorallea corylifolia*

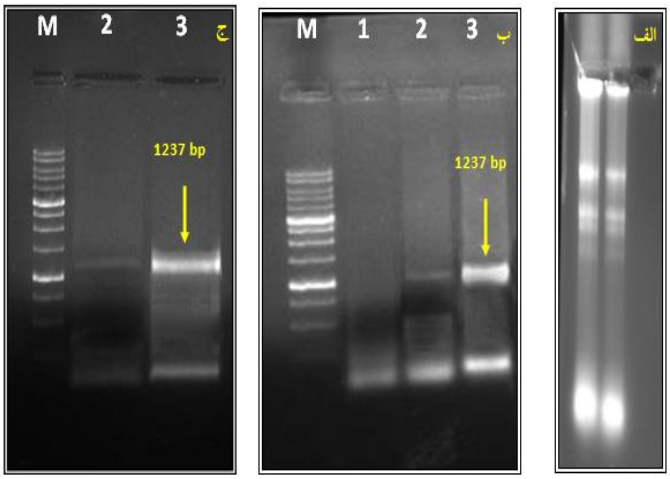
cDNA تهیه شده از برگ *Psorallea corylifolia* برای ظهور سورولین سنتاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز استفاده شد. محصول ظاهر شده و خالص شده PCR به درون ناقل PGEM-T همسانه-سازی شدند و ترکیب حاصل به درون سلول‌های باکتری کلی باسیل (سویه DH5α) انتقال یافتند. ترکیب حاصل روی یخ قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از ترکیب حاوی قطعه cDNA برداشته شد و با ترکیب کیت مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به ترکیب حاوی سلول‌های کلی باسیل اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعدی شوک حرارتی به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به این ترکیب ۹۰۰ میکرولیتر از محیط کشت آماده LB اضافه شد. مجددا ترکیب جدید حاصله بر روی گرم کن با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. به پتری دیش‌های حاوی محیط

Archive of SID
www.SID.ir

کشت LB^{Amp} ترکیب IPTG (20%) و X-gal (2%) به ترتیب به مقدار ۷ و ۴۰ میکرولیتر اضافه و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشته و داخل پتری دیش حاوی IPTG (20%) و X-gal (2%) پخش شد. محیط کشت باقی‌مانده با سرعت $g \times$ ۴۰۰۰ در دمای معمولی به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی شناور حذف و سپس رسوب (پلت) دوباره سانتریفوژ شده و در سطح محیط کشت حاوی IPTG (20%) و X-gal (2%) پخش شد. پتری دیش‌های حاوی محیط کشت به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه نگهداری و صبح روز بعد همسانه‌های آبی و سفید رنگ مشاهده شدند. سپس همسانه-های سفید موجود در محیط کشت برای انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) انتخاب شدند. همچنین پلاسمید بوسیله روش لیز قلیایی جداسازی شد (Sambrook et al. 1989). در نهایت توالی نوکلوتیدی DNA با استفاده از دستگاه تعیین توالی (ABI Prism) به روش Sanger et al. (1977) تعیین شد.

نتایج و بحث

RNA استخراج شده براساس روش تغییر یافته Salzman et al. (1999) دارای کمیت و کیفیت مناسبی بود (شکل۱-الف). برای بدست آوردن توالی ژن رمز کننده سورولین سنتاز از cDNA بدست آمده از برگهای گیاه *Psorallea corylifolia* همراه با ۳ جفت آغازگرهای مخصوص پیشرو (RBF، RBF_1 و RBF_2) و پسرو (RBR، RBR_1 و RBR_2) استفاده شد. آغازگرهای RBF_2 و RBR_1 ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز را شناسایی کردند (شکل۱-ب و ج). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل جداسازی و به دو ناقل p-GEM-T و p-GEM-T Easy انتقال داده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که ناقل p-GEM-T Easy کارایی مناسب‌تری نسبت به p-GEM-T داشت و در مراحل بعدی این ناقل حاوی ژن مورد نظر به داخل باکتری کلی باسیل (سویه DH5α) منتقل شد.



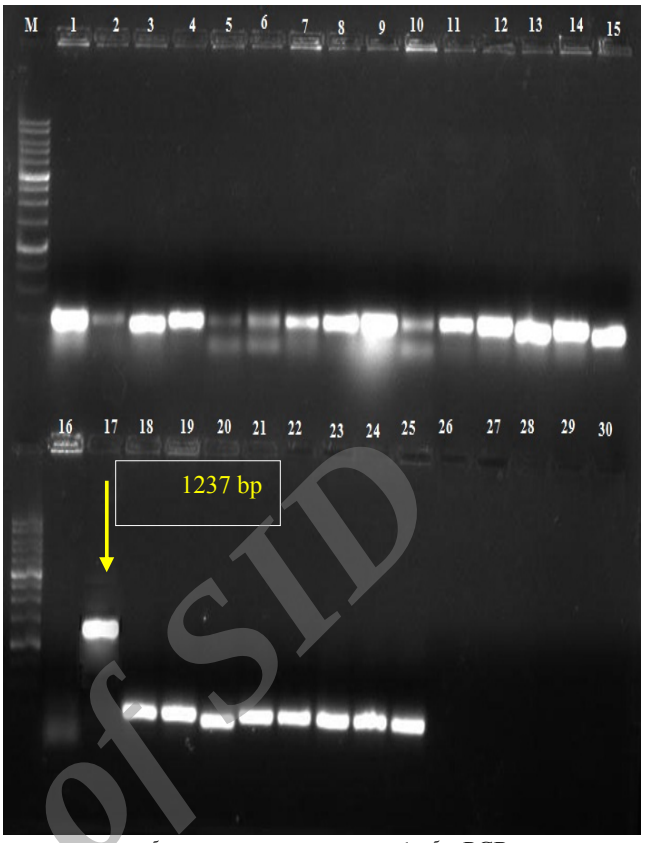
شکل۱- الف) استخراج RNA از برگهای گیاه *Psorallea corylifolia*؛ ب و ج) باندهای حاصل از واکنش PCR با آغازگرهای متفاوت؛ شماره‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب شامل آغازگرهای RBF-RBR،RBL1-RBR1 و RBL2-RBR1 است. M نشانگر اندازه می‌باشد.

۲۵ همسانه سفید از بین همسانه های آبی/سفید انتخاب شد و همسانه PCR با آغازگرهای RBF_2 و RBR_1 ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز صورت گرفت. از میان ۲۵ همسانه انتخاب شده تنها یک همسانه (شماره ۱۷) نشان دهنده اندازه ژن مورد نظر بود (شکل۲).

ناقل حاوی ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز از باکتری‌های حاوی این ناقل با استفاده از روش لیز قلیایی جداسازی شد. سپس ناقل حاوی ژن مورد نظر در با استفاده از آغازگرهای اختصاصی T7 (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′) و SP6 (5′-ATTTAGGTGAACACTATAG-3′) توالی‌یابی شد. عمل تعین ترتیب نوکلوتیدها به روش Sanger et al. (1977) با استفاده از دستگاه DNA sequencer (ABI Prism) انجام گرفت. نتایج حاصل از این توالی یابی نشان داد که ترتیب نوکلوتیدی ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز دارای طول ۱۲۳۷ جفت باز بود. آنالیز ترتیب نوکلوتیدها با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیک موجود در بانک جهانی ژن انجام گرفت. همچنین ژن کلون شده ۹۳ درصد با ژن *Psoralen Synthase* موجود در گیاه *Ammi magus* مشابهت داشت.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲- همسانه PCR با آغازگرهای ژن مخصوص رمز کننده آنزیم سورولین سنتتاز (چاهک شماره ۱۷ نشان دهنده وجود ژن مورد نظر می باشد).

در چرخه تولید فورانوکومارین‌های خطی (سورولین) سه آنزیم اصلی به نام‌های DMAPP- آمبلی فرون دی میتل ترانسفراز، مارماسین سنتتاز (O2, cytochrome P450, NADPH) و سورولین سنتتاز (O2, Cyt, P450, NADPH) نقش اساسی دارند. از بین موارد ذکر شده آنزیم سورولین سنتتاز نقش کلیدی در ساخت سورولین از مارماسین از طریق جدا کردن کربن استونی دارد. پژوهش‌های زیادی جهت جداسازی آنزیم‌های کلیدی موثر در چرخه ساخت متابولیت‌های ثانویه از گونه‌های خانواده‌های گیاهی متفاوت توسط محققین زیادی صورت گرفته است. در این پژوهش نیز تمرکز اصلی روی شناسایی، جداسازی و همسانه سازی ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتتاز موثر در ساخت سورولین بود که نتایج بدست آمده با یافته های دیگر محققین مطابقت داشت (Samanani et al. 2005; Dutta et al. 2007; Kasajima et al. 2007; Takizawa et al. 2007; Xu et al. 2008).

آگاهی از اساس ژنتیکی و شناسایی ژن های موثر در نحوه عمل این آنزیم ها جهت شناخت بیشتر مکانیسم آنها امری ضروی و اجتناب ناپذیر می باشد. ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتتاز به طول۱۲۳۷ جفت باز و با ۹۳ درصد تشابه با ژن *Psoralen Synthase* موجود در گیاه *Ammi magus* در این تحقیق شناسایی شد که در راستای آگاهی بیشتر از اساس ژنتیکی و مشخص شدن ژن های موثر در تولید ماده موثره با ارزش سورولین بود.

با استفاده از نتایج بدست آمده می توان جهت افزایش تولید این ماده با ارزش ضد سرطانی در گیاه *Psorallea corylifolia* پس از انجام آزمایش های تکمیلی اقدام کرد.

منابع

Anonymous (1989) *Psoralea* spp. The Wealth of India: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. 8:295-298.

Buchanan B, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. I K International Publishing House Prevate Limited New Delhi.

Dutta A, Singh D, Kumar S, Sen J (2007) Transcript profiling of terpenoid indole alkaloid pathway genes and regulators reveals strong expression of repressors in *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Reports 26: 907-915.

Kasajima I, Fujiwar T (2007) Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. Plant Biotechnology Journal 24: 355-360.

Larbat R, Kellner S, Specker S, Hehn A, Gontier E, Hans J, BourgaudF, Matern U (2007) Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 282: 242-254.

Oliveira A, Raposo M A G, Manuela M, Oliveira M, Machado AEH, Puapairoj P, Pedro M, Nascimento MSJ, Portela AC, Pinto M (2006) Psoralen analogues: synthesis, inhibitory activity of growth of human tumor cell lines and computational studies. European Journal of Medicinal Chemistry 41: 367-372.

Salzman RA, FujitaT, Salzman Z, Hasegawa PM, Bressan RA (1999) An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter 17: 11-17.

Samanani N, Park SU, Facchini PJ (2005) Cell type specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. Plant Cell 17: 915-926.

Archive of SID
www.SID.ir

Takizawa M, Hori K, Inai K, Takase H, Hashimoto T, Watanabe Y (2007) A virus-induced gene silencing approach for the suppression of nicotine content in Icotiana *benthamiana.* Plant Biotechnology Journal 24: 295-300.

Xu F, Cai R, Cheng S, Du H, Wang Y, Cheng S (2008) Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba.* African Journal of Biotechnology 7: 721-729.

Sambrook J, Fritsch EF, Mianiatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Sanger F, Nickles S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA 74: 5463-5467.

Archive of SID

www.SID.ir