

## جداسازی و بررسی بیان ژن کدکننده BBE دخیل در مسیر بیوسنتز سنگوئینارین تحت تنش خشکی در مامیران کبیر

### Isolation and expression study of BBE encoding gene involved in sanguinarin biosynthesis pathway in greater celandine under drought stress

طیبه شمسینی غیاثوند<sup>۱</sup>، صدیقه فابریکی اورنگ<sup>۲\*</sup>، سودابه مفاخری<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

Shamsini Ghasvand T<sup>1</sup>, Fabriki-Ourang S<sup>2\*</sup>, Mafakheri S<sup>3</sup>

1- PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini  
International University, Qazvin, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini  
International University, Qazvin, Iran

3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Imam Khomeini International  
University, Qazvin, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.ourang910@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

#### چکیده

بخش‌های مختلف گیاه دارویی مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) حاوی ترکیبات متعدد آلکالوئیدی مهم مانند چلیدونین، کلریتین، سنگوئینارین- بربرین است. سنگوئینارین یک بنزوفناتریدین چهار عضوی می‌باشد که به‌طور گسترده در گیاهان خانواده خشخاش، فوماریاسه و سداییان وجود دارد. این آلکالوئید بیولوژیک فعال دارای طیف گسترده‌ای از خواص دارویی بالقوه مفید مانند ضد میکروبی، ضد التهابی و خاصیت ضدتوموری می‌باشد. اولین مرحله در مسیر بیوسنتز آلکالوئید سنگوئینارین مستلزم تبدیل اس-رتیکولین به اس-اسکولین می‌باشد که این واکنش مهم به‌وسیله آنزیم کلیدی بربرین ریج که توسط ژن *BBE* کد می‌شود، صورت می‌گیرد. به‌منظور تهیه مواد گیاهی برای جداسازی ژن و نیز بررسی میزان بیان ژن *BBE* (Berberine Bridge Enzyme) در چهار سطح تنش خشکی شدید، متوسط، ضعیف و عدم تنش (به ترتیب با ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) در سه اندام ریشه، ساقه و برگ، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. جهت جداسازی cDNA کدکننده آنزیم *BBE* استخراج RNA از بافت ریشه و برای بررسی بیان ژن مذکور، استخراج RNA از ریشه، ساقه و برگ انجام شد. cDNA کدکننده آنزیم *BBE* از بافت ریشه با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز جداسازی و با موفقیت در پلاسمید PTG19-T درج و در سلول‌های مستعد شده *E. Coli* همسانه‌سازی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که ژن جداسازی شده با طول ۱۴۴۱ جفت‌باز، زنجیر پپتیدی به طول ۴۸۳ اسیدآمینه را کد می‌کند. زنجیر پپتیدی *BBE* حاصل، دارای موتیف NX(S/T) به‌عنوان جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون، flavin binding domain (برای اتصال هیستیدین فلاوین شده)، موتیف اسیدآمینه‌ای SGGH و دنباله Glu که نقش کاتالبتیکی مهمی در تشکیل پل بربرین در آنزیم‌های فلاووپروتئینی دارد، بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین و کمترین میزان بیان این ژن به ترتیب در بافت ریشه تحت تنش خشکی ضعیف (FC=70%) و در برگ و ساقه در شرایط عدم تنش (FC=100%) حاصل شد. در جمع‌بندی کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال تنش خشکی ضعیف، سبب افزایش بیان ژن *BBE* می‌شود و شاید از این طریق بتوان به تولید سنگوئینارین بیشتری در این گیاه دست یافت.

#### واژه‌های کلیدی

تنش خشکی

ژن *BBE*

سنگوئینارین

مامیران کبیر

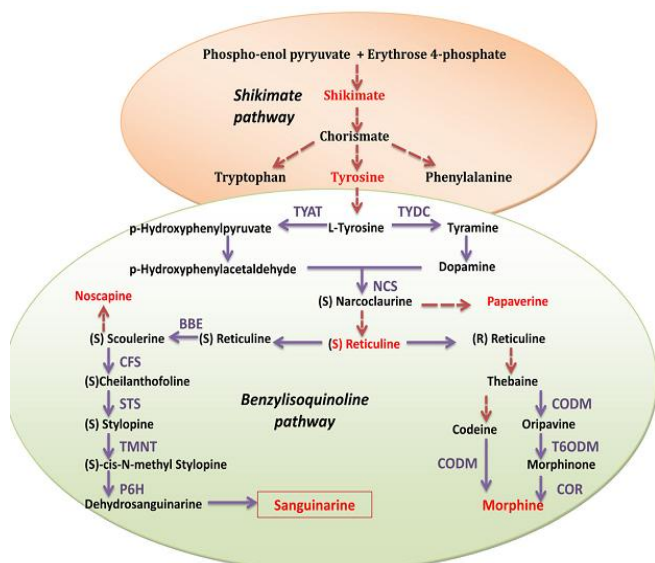
شیلانتیفولین پیش ماده سنگوئینارین تبدیل می شود (Hagel and Facchini 2010a) (شکل ۱). سنگوئینارین یک نمک آمونیومی و سمی می باشد که بیشتر در خانواده پاپاوراسه از جمله ریشه خشخاش یافت شده است (Beaudoin and Facchini 2013).

مامیران یا مامیران کبیر، گیاهی دارویی از خانواده خشخاش (Papaveraceae) با نام علمی *Chelidonium majus* L. می باشد که بخش های مختلف این گیاه در درمان بیماری هایی نظیر زخم معده، سرطان معده، زخم های دهان، بیماری های کبدی و غیره مورد استفاده قرار می گیرد. پتانسیل درمانی گیاه مامیران وابسته به شمار متعددی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند کلیدونین، کلریتین، سنگوئینارین، بربرین، پروتوپین، آلوکریپتوپین و کوپتیسین می باشد. به طور کمی این گیاه حاوی مقادیر زیادی از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی است (۰/۲۷ تا ۲/۲۵ درصد در بخش های هوایی و سه تا چهار درصد در ریشه) (Lee and Facchini 2010; Amal et al. 2015).

بنزلی ایزوکوئینولین ها، گروه بزرگی از آلکالوئیدها هستند که به طور عمده در خانواده های گیاهی *Papaveraceae*، *Fumariaceae*، *Berberidaceae* و *Ranunculaceae* شناسایی شده اند. بسیاری از آلکالوئیدهای این گروه دارای اثرات دارویی مهمی مانند مسکن (مورفین و کدئین)، ضد سرطان (سنگوئینارین)، ضد باکتری (بربرین) و شل کننده عضلات (پاپاورین) می باشند (Facchini et al. 2012).

بیوستز آلکالوئیدهای بنزلی ایزوکوئینولین با تبدیل تیروزین به دوپامین و ۴-هیدروکسی فنیل استالدهید (با شبکه ای از دکربوکسیلاسیون، اورتو هیدروکسیلاسیون و دامیناسیون) آغاز می شود. تیروزین دکربوکسیلاز، تیروزین و دهیدروکسی فنیل آلانین را به آمین های مشابه خود تبدیل می کند. دوپامین و ۴-هیدروکسی فنیل استالدهید توسط نورکولارین سنتتاز (NCS) با هم ترکیب شده تا اس-نورکولارین (پیش ماده مرکزی برای همه آلکالوئیدهای بنزلی ایزوکوئینولین در گیاهان) را تولید کند. تمام ۲۵۰۰ آلکالوئید بنزلی ایزوکوئینولین، از ماده حد واسط مرکزی اس-نورکولارین سنتز می شوند. اس-نورکولارین با همکاری ۶-۱-متیل ترنسفرز (6OMT)، ان-متیل ترنسفرز (CNMT)، یک P450 هیدروکسیلاز (CYP80B1) و ۴-۱-متیل ترنسفرز (4OMT) به اس-رتیکولین تبدیل می شود. هیدروکسیلاسیون حلقه آروماتیک شرکت کننده در تبدیل اس-نورکولارین به اس-رتیکولین توسط مونواکسیژناز وابسته به P450 (CYP80B1) کاتالیز شده و در آن اس-ان-متیل کولارین به اس-هیدروکسی-ان-متیل کولارین تبدیل می شود (Facchini et al. 1996). رتیکولین یک نقطه انشعابی بین مسیرهای مورفین و سنگوئینارین می باشد (Allen et al. 2004).

اولین مرحله در بیوستز آلکالوئید سنگوئینارین مستلزم تبدیل اس-رتیکولین به اس-اسکولین می باشد که این واکنش مهم توسط آنزیم کلیدی Berberine bridge enzyme (BBE) صورت می گیرد (Facchini et al. 1996). آنزیم BBE تبدیل ساختاری گروه N-متیل در S-رتیکولین را به کربن شماره ۸ در S-اسکولین کاتالیز می کند (Frenzel et al. 1988). سپس S-اسکولین توسط آنزیم شیلانتیفولین سنتتاز (DIOX) به S-



شکل ۱- مسیر آلکالوئیدی بنزلی ایزوکوئینولین (Verma et al. 2014).  
 tyrosine aminotransferase, dopa decarboxylase (TYDC)/Tyrosine berberine bridge enzyme, norcoclaurine synthase (NCS), (TYAT) cheilanthifoline synthase (CFS), stylopine synthase (STS), (BBE) methyltransferase (TNMT)-tetrahydroprotoberberine cis-N thebaine 6-O-demethylase, protopine 6-hydroxylase (P6H), (T6ODM), codeinone reductase (COR), codeine O-demethylase ((CODM)

ژنوتیپ‌ها، زمان وقوع تنش و شدت آن متفاوت است (Mousavi et al. 2012).

از آنجایی که یکی از دلایل اهمیت گیاه مامیران کبیر به وجود متابولیت سنگوینارین با خاصیت ضد سرطانی قوی برمی‌گردد؛ و همان‌گونه که در بالا به آن اشاره رفت آنزیم BBE واکنش بسیار مهم تبدیل اس- رتیکولین به اس- اسکولرین را انجام می‌دهد؛ و سلسله واکنش‌های بعدی در این مسیر منجر به تولید سنگوینارین می‌گردد. لذا در پژوهش حاضر در اولین گام، اقدام به جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE از ریشه گیاه مامیران شد. هم‌چنین در ادامه پس از جداسازی و همسانه‌سازی cDNA مربوط به BBE؛ تغییرات بیانی این ژن در شرایط تنش خشکی در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس اطلاعات موجود، این پژوهش اولین مطالعه در راستای بررسی مسیر بیوسنتزی سنگوینارین در گیاه مامیران کبیر می‌باشد لذا نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در جهت افزایش فعالیت آنزیم BBE به‌عنوان آنزیم مهم و کلیدی در مسیر تولید سنگوینارین و در نتیجه افزایش میزان این متابولیت به‌کار گرفته شود.

#### مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه مامیران کبیر از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد و به‌منظور تهیه مواد گیاهی برای جداسازی ژن و نیز بررسی میزان بیان ژن BBE (Berberine Beridge Enzyme) در گیاه مامیران کبیر، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. دو فاکتور مورد مطالعه شامل تنش خشکی در سه سطح خشکی شدید، متوسط و ضعیف (به ترتیب ۴۰، ۵۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) به همراه تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و سه اندام ریشه، ساقه و برگ بودند. تنش خشکی در مرحله چهار هفتگی گیاه و در سه زمان متوالی به مدت ۱۴ روز اعمال شد و پس از بروز تنش، نمونه‌گیری از اندام‌های ریشه، ساقه و برگ گیاه در سه تکرار زیستی انجام گرفت. به‌منظور جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE استخراج RNA از بافت ریشه و نیز برای بررسی بیان ژن

آزمایش‌های مختلفی در شرایط آزمایشگاهی و غیرآزمایشگاهی نشان داده‌اند که سنگوینارین موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی انسان می‌شود و مطالعه روی سنگوینارین به‌عنوان درمان بالقوه سرطان توصیه می‌شود.

علی‌رغم پیشرفت‌های به‌دست آمده در زمینه سنتز مصنوعی مواد موثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است؛ به‌طوری‌که بخش اعظم بازار گیاهان دارویی به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از این گیاهان مربوط می‌شود. غلظت پایین این ترکیب‌ها در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری و مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راه‌کارهایی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است (Mulabagal and Tsay 2004; Kumar and Gupta 2008).

اثربخشی الیستورهای زیستی و غیرزیستی را به‌عنوان روشی کارآمد برای بهبود تولید ترکیبات با ارزشی مانند متابولیت‌های ثانویه تایید شده است (Verma et al. 2014). تغییر در عوامل محیطی مانند تنش‌های محیطی می‌توانند باعث تغییر در نحوه رشد و میزان مواد ثانویه در گیاهان دارویی شوند. بر پایه تحقیقات انجام گرفته، مشخص شده است که تنش‌ها به‌عنوان الیستورهای غیرزیستی بر مقدار ماده موثره گیاهان دارویی، عناصر تشکیل دهنده مواد موثره و میزان وزن خشک تولید شده تاثیر می‌گذارند و می‌توانند تولید برخی از این ترکیب‌ها را تا چندین برابر افزایش دهند، البته این تاثیر همیشگی نبوده و در مواردی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است. اگرچه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله ژن‌ها کنترل می‌شود؛ ولی تولید آن‌ها به میزان زیادی تحت تاثیر عوامل محیطی می‌باشد. اطلاعات موجود در رابطه با اثرات شرایط تنش در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌طور عمده از تحقیقاتی به‌دست آمده است که سعی در افزایش این ترکیبات در گیاهان دارویی و معطر داشته‌اند (Timmermann et al. 1984). تنش خشکی، تاثیر گذارترین تنش غیرزنده محیطی است و میزان تاثیر آن بسته به

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مخلوط واکنش Ampliqon انجام شد. شرایط دمایی واکنش برای تکثیر، پنج دقیقه ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس بود که واکنش با ۴۰ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه و ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس ادامه یافت و در پایان یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. برای تایید تکثیر قطعه موردنظر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

پس از خالص‌سازی قطعه تکثیر شده با استفاده از کیت Expin Combo (Geneall)، همسانه‌سازی محصول حاصل در ناقل پلاسمیدی PTG19-T (Vivantis) با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده انجام پذیرفت. پس از آماده‌سازی سلول‌های مستعد باکتری *E. Coli* سویه *DH5a* به روش قلیایی کلریدکلسیم (Sambrook and Russel 2001)؛ معرفی ناقل نوترکیب به درون سلول‌های باکتری به روش شوک حرارتی (Sambrook and Russel 2001) انجام گرفت. سپس برای شناسایی باکتری‌های نوترکیب، از باکتری‌های رشد یافته در محیط گزینشگر حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، آزمون کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت.

مذکور، استخراج RNA از بافت‌های ریشه، ساقه و برگ با استفاده از بافر استخراج RNA (RNX- Plus Solution) محصول شرکت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دو روش نانودراپ (Nanodrop 2000c، شرکت Thermo scientific) و الکتروفورز ژل آگارز؛ ساخت cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (Thermofishen scientific, Ep0441) و آغازگر الیگو dT (Vivantis) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت.

برای طراحی آغازگرهای مورد نیاز جداسازی cDNA کدکننده آنزیم BBE؛ از کتابخانه‌های EST<sup>۱</sup> گیاه مامیران کبیر استفاده شد. اطلاعات این کتابخانه‌ها و توالی‌های EST آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI<sup>۲</sup> بدست آمد. برای پیدا کردن توالی‌های EST که با ژن BBE مرتبط بود از Blastn استفاده شد. بدین منظور از توالی‌های ژن BBE سایر گیاهان خانواده خشخاش به‌عنوان Query استفاده شد. در ادامه EST‌هایی که با توالی مورد نظر ما شباهت بالای ۶۰ درصد داشتند را انتخاب کرده و توسط نرم‌افزار EGassembler<sup>۳</sup> سرهم‌سازی شد. از میان کانتینگ‌های ساخته شده، بلندترین کانتینگ را انتخاب کرده و آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (جدول ۱) طراحی شد. بررسی خصوصیات آغازگرها با استفاده از برنامه آنالیز Oligo analyzer<sup>۴</sup> انجام گرفت و سنتز آن‌ها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد.

1 Expression Sequence Tag; EST

2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3 <http://www.genome.jp/tools/egassembler/>

4 <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

جدول ۱- توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده به‌منظور جداسازی و بررسی بیان ژن BBE در گیاه مامیران کبیر

ژن هدف	طول قطعه تکثیری (bp)	دمای اتصال (°C)	توالی آغازگر (۵'→۳')	نام آغازگر
BBE	۱۵۰۰	۵۷	TTGTCTAACTTCCCATGGCG GATGGTTAAACA CATTATTTGGA	BBE1-F BBE1-R
BBE	۱۴۰	۵۸	ACGCCGTTTCCTCATCGTAA TTCGACACGAACGGTTCCAT	BBE2-F BBE2-R
ef-alpha	۱۱۱	۵۸	AGATGATTCCAACCAAGCCCA CCTTGATGACACCAACAGCAACT	Elf-F Elf-R

تجزیه‌های آماری از نرم‌افزارهای MSTATC و SPSS استفاده شد.

### نتایج و بحث

با عنایت به اهمیت دارویی سنگوئینارین به‌عنوان ماده‌ای با اثر ضد سرطانی قوی، داشتن اطلاعات کافی از مسیر بیوسنتزی آن و نیز ژن‌های کنترل‌کننده به‌منظور بهره‌مندی از این ماده دارویی با ارزش ضروری می‌باشد. گیاه مامیران کبیر از جمله گیاهان دارای این ماده می‌باشد؛ لذا به‌نظر می‌رسد افزایش اطلاعات مولکولی بتواند کمک شایانی برای اهدافی مانند افزایش میزان این ماده موثره نماید. S-Reticuline (S) به‌عنوان یک نقطه انشعاب مرکزی در بیوسنتز بسیاری از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی در گیاهان عمل می‌کند که هر کدام از آنزیم‌های موجود در نقطه انشعاب، آن را به یک مسیر خاص هدایت می‌کنند و در نهایت منجر به تولید یک محصول نهایی و خاص می‌شود (Facchini et al. 1996). آنزیم Berberine Beridge Enzyme (BBE) اولین مرحله از بیوسنتز سنگوئینارین را با تبدیل S-Reticuline (S) به Scoulerine انجام می‌دهد؛ بنابراین با کسب اطلاعات مولکولی در این مسیر می‌توان تلاش‌هایی را در زمینه افزایش بیان ژن‌های مرتبط به‌منظور افزایش سنگوئینارین در مامیران نمود.

براساس نتایج ارائه شده در منابع مختلف، رونوشت‌های ژن BBE در ریشه گیاه خشخاش بیشتر از اندام هوایی مشاهده شده است (Facchini et al. 1996)؛ هم‌چنین مشخص شده است که در گیاه خشخاش، سنگوئینارین بیش‌تر در ریشه و گیاهچه تجمع می‌یابد (Facchini and Deluka 1995). بنابراین با توجه به این‌که گیاه مامیران نیز از خانواده خشخاش است، cDNA کدکننده آنزیم BBE از بافت ریشه جداسازی شد. پس از استخراج RNA کل از ریشه و ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای BBE1 (جدول ۱) انجام گرفت و مطابق انتظار قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل ۲ الف). قطعه تکثیر شده به‌منظور همسانه‌سازی از روی ژل آگارز خالص‌سازی و در ناقل پلاسمیدی PTG19-T درج شد و سپس در سلول‌های مستعد شده *E. Coli* همسانه‌سازی شد. به‌منظور تایید تراخی باکتری *E.*

پس از انجام PCR و انتخاب باکتری‌های نو ترکیب حاوی ژن BBE، دو کلون انتخاب شد و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت Exprop™ Plasmid SV (GeneAll) انجام گرفت. در ادامه، پس از بررسی کیفیت و کمیت پلاسمید استخراج شده (با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و نانودراپ)؛ توالی‌یابی قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 و T7 توسط شرکت Bioneer (کره) انجام پذیرفت.

بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی، توسط نرم‌افزار Clc main workbench (V5.5) انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار، توالی‌های اضافی که شامل توالی ناقل بودند از توالی حذف شد و توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. هم‌ردیفی چندگانه پروتئین مورد نظر با توالی‌های پروتئینی مشابه که قبلاً شناسایی شده‌اند، توسط برنامه ClustalW2 انجام شد. به‌منظور بررسی‌های بیش‌تر و تعیین زیرگروه ژن همسانه‌سازی شده، اقدام به بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Clustalw2 شد. سپس دمین‌های قطعه ژن جداسازی شده با استفاده از پایگاه‌های NCBI، Interproscan و Motif scan بررسی شد.

میزان بیان ژن BBE در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران تحت تیمارهای مختلف خشکی (۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌روش RT-PCR کمی با استفاده از آغازگرهای BBE2 بررسی شد. آغازگرهای BBE2 بر اساس اطلاعات حاصل از توالی‌یابی صورت گرفته طراحی شدند. از ژن *Elongation factor a* نیز به‌عنوان ژن مرجع در این آزمایش استفاده گردید. شرایط زمانی و دمایی واکنش RT-PCR کمی عبارت بود از چهار دقیقه دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی اولیه که با ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس (واسرشت‌سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس (اتصال)، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس (بسط) ادامه یافت و در نهایت رسم منحنی ذوب قطعه تکثیری از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. واکنش RT-PCR کمی با استفاده از کیت Syber green (PremixEX Tag II, Fermentas) Biorad ریل‌تایم ساخت آمریکا صورت گرفت. برای

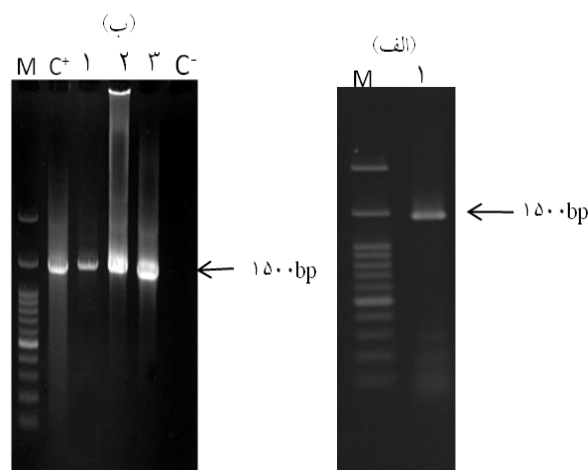
دارای توالی‌های توافقی با موتیف NX(S/T) به‌عنوان جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون می‌باشد (شکل ۳).

توالی‌های توافقی flavin binding domain (برای اتصال هیستیدین فلاوینه شده) شناسایی شده در توالی پروتئینی BBE مامیران در این آزمایش مشابه با توالی پروتئینی مربوط به *E. californica* (Dittrich and Kutchan, 1991) و خشخاش (Facchini et al. 1996) در نزدیکی انتهای آمینی (N-terminal) بود. از ویژگی منحصر به فرد این دومین، موتیف اسید آمینه‌ای SGGH به‌عنوان موتیف محافظت شده می‌باشد که همانند سایر گیاهان خانواده خشخاش، این جایگاه در توالی پروتئینی BBE گیاه مامیران نیز دیده شد (شکل ۳). همان‌گونه که از بررسی توالی اسید آمینه‌ای BBE خانواده خشخاش به دست آمد، یک دنباله Glu که نقش کاتالیتیکی مهمی در تشکیل پل بربرین در آنزیم‌های فلاووپروتئینی دارد؛ در موقعیت ۳۳۸ توالی BBE مامیران دیده شد. دنباله مذکور در موقعیت ۴۱۷ گیاه *E. californica* (Winkler et al. 2008) و موقعیت ۴۲۱ گیاه خشخاش (Hagel et al. 2012) گزارش شده است.

در بررسی روابط فیلوژنتیکی فلاووپروتئین‌های مربوط به خانواده‌های گیاهی مختلف و فلاووپروتئین حاصل از توالی جداسازی شده، بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی، پروتئین‌های BBE در دو دسته کلی قرار گرفتند. در یک گروه فلاووپروتئین‌های مربوط به گیاهان خانواده خشخاش قرار گرفت؛ در حالی که در گروه دیگر پروتئین‌های BBE خانواده‌های *Rununculaceae* و *Berberidaceae* دسته‌بندی شد (شکل ۴). بیشترین درصد یکسانی توالی پروتئینی cDNA جداسازی شده از مامیران در این آزمایش با توالی‌های پروتئینی *Argemon Mexicana* و *E. californica* با درصد یکسانی به ترتیب ۷۰/۵۸ و ۶۶/۳۶ درصد بود.

مطالعه نحوه تنظیم مسیر بیوستز سنگوئینارین و شناسایی مراحل تأثیرگذار بر سرعت تولید این متابولیت ارزشمند جزء اولین و مهم‌ترین گام‌ها جهت مهندسی متابولیک به‌منظور افزایش تولید آن‌ها می‌باشد.

*Coli* حاوی ناقل با cDNA رمزکننده آنزیم BBE، ابتدا با سلول‌های باکتری رشد کرده روی محیط گزینشگر (حاوی آمپی‌سیلین) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت (colony PCR) و پس از تایید اولیه درج قطعه مورد نظر در پلاسمید (شکل ۲ ب)؛ کشت باکتری‌های مورد نظر در محیط گزینشگر و استخراج پلاسمید انجام و در نهایت توالی‌یابی با آغازگرهای عمومی T7 و M13 در دو جهت انجام گرفت. پس از بررسی توالی به دست آمده و حذف توالی‌های اضافی مربوط به ناقل، توالی نهایی به طول ۱۴۴۱ جفت‌باز به دست آمد که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی KY595435 ثبت شد.



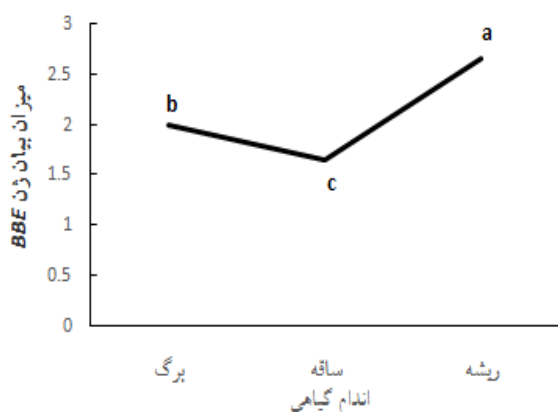
شکل ۲- الف) نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل از تکثیر *BBE* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز یک درصد (M- نشانگر اندازه مولکولی (100bp, cinnacron)، ۱- قطعه تکثیر شده از روی cDNA ریشه مامیران کبیر) ب) نتیجه آزمون PCR با همسانه‌های رشد کرده روی محیط گزینشگر (Colony PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز یک درصد (M- نشانگر اندازه مولکولی (100bp, cinnacron)، C<sup>+</sup>- کنترل مثبت (cDNA ریشه به‌عنوان الگو)، ۱ الی ۳- همسانه‌های دارای ناقل نوترکیب، C<sup>-</sup>- کنترل منفی).

با بررسی توالی نوکلئوتیدی cDNA آنزیم BBE این آزمایش با طول ۱۴۴۱ جفت‌باز، یک چارچوب قرائت آزاد با ۴۸۳ اسید آمینه شناسایی شد. همچنین مشخص شد که همانند BBE گیاه *Eschscholzia californica* (Dittrich and Kutchan, 1991) و گیاه خشخاش (Facchini et al. 1996)، BBE گیاه مامیران نیز

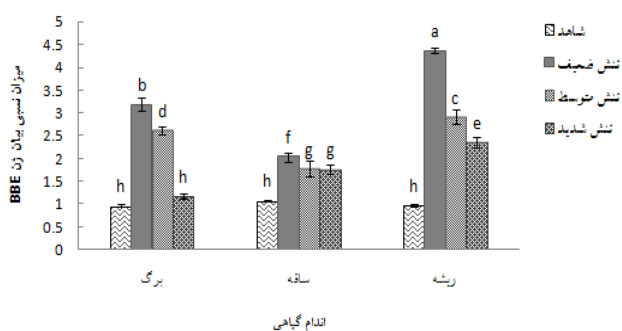


جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن BBE در سطوح مختلف تنش خشکی و اندام‌های مختلف گیاه مامیران کبیر

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منابع تغییر (S.O.V)
۶۱۹/۸**	۷/۹	۲۳/۷۷	۳	تنش خشکی
۲۵۰/۵**	۳/۲	۶/۴۱	۲	بافت
۷۸/۱**	۰/۹۹	۵/۹۹	۶	تنش خشکی × بافت
	۰/۰۱۳	۰/۳۱	۲۴	خطای آزمایش
	۵/۳۸			CV%

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ( $P \leq 0.01$ ).

شکل ۵- میزان بیان ژن BBE در بافت‌های مختلف گیاه مامیران کبیر



شکل ۶- میزان بیان ژن BBE اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران کبیر در سطوح مختلف تنش خشکی شدید، متوسط و کم (به ترتیب ۴۰، ۵۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و شاهد.

در توافق با نتایج این آزمایش، Davoudnia et al. (2016) در مطالعه بیان ژن BBE1 در چهار گونه مختلف خشکخاش، بیان بالای این ژن را در اندام ریشه هر چهار گونه گزارش کردند ولیکن بیشترین میزان بیان ژن در ریشه گونه *P. bracteatum* به دست آمد. Rezaei et al. (2016) نیز بیشترین میزان بیان ژن BBE1 را در ریشه گونه *P. bracteatum* و Facchini et al.

در واقع می‌توان گفت که سنتز یک ژن در یک اندام به معنای تجمع محصول تولیدی آن در همان اندام نیست. انتقال نیکوتین و هیوسیامین از ریشه توسط آوند چوبی به برگ‌ها یک مثال مشهود از آلکالوئیدهایی است که در ریشه سنتز می‌شوند و در اندام هوایی ذخیره می‌شوند (Hashimoto and Yamada 1992)، که با توجه به اطلاعات فوق می‌توان گفت که ممکن است چنین مکانیسمی برای سنگوئینارین نیز در مامیران وجود داشته باشد. به این صورت که سنگوئینارین در ساقه و برگ سنتز شده و توسط انتقال دهنده خاص در خلاف جهت حرکت مورفین و نیکوتین به سمت ریشه انتقال بیابد.

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل بافت در تنش، در تنش خشکی ضعیف (۷۰ درصد ظرفیت زراعی)، بیان ژن BBE در هر سه بافت مامیران نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد و بیشترین میزان بیان ژن در بافت ریشه مشاهده شد (شکل ۶). از سوی دیگر با افزایش شدت تنش، میزان بیان ژن BBE در خشکی متوسط و شدید نسبت به تنش ضعیف روند کاهشی پیدا کرد ولیکن در تمام سطوح تنش بیشترین میزان بیان ژن BBE در بافت ریشه مشاهده شد. در مجموع هر سه بافت، تنش خشکی ضعیف و متوسط به ترتیب افزایش سه و دو برابری در بیان ژن BBE نسبت به شاهد نشان دادند. در کل با افزایش شدت تنش، کاهش در میزان بیان ژن BBE مشاهده شد و می‌توان این‌گونه استنباط نمود که تنش خشکی در سطوح ضعیف و متوسط به‌عنوان شوک ملایم می‌تواند موجب افزایش بیان ژن BBE و به تبع آن افزایش سنتز سنگوئینارین گردد و هرچه تنش خشکی شدت یابد منجر به کاهش بیان ژن BBE خواهد شد (شکل ۶).



الیستور کاهش معنی‌داری در بیان این ژن‌ها در خشخاش گزارش شده است (khodayari et al. 2015). چنین کاهش بیانی در ژن *DIOX2* در مواجهه طولانی مدت با الیستورها نیز گزارش شده است (Hagel and Facchini 2010). در جمع‌بندی کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال تنش خشکی در سطوح ضعیف، بیان ژن *BBE* را تحت تاثیر قرار داده و سبب افزایش آن می‌شود و احتمالاً از این طریق بتوان به تولید سنگوئینارین بیشتری در این گیاه دست یافت.

(1996) بیشترین میزان بیان ژن *BBE1* را در ریشه *P. somniferum* گزارش کرده‌اند. همچنین Facchini and Park (2003) و Huang and Kutchan (2000) بیان ژن *BBE1* در برگ *P. somniferum* را گزارش کردند.

در مقایسه با نتایج این تحقیق، نتایج پژوهش‌های مختلف نشان از کاهش بیان ژن‌های درگیر در سنتز سنگوئینارین مانند *tydc7*، *DIOX2*، *DBOX* و *BBE1* در اثر محرک‌های غیرزیستی مانند نانوذره‌ها می‌باشد، به طوری که با افزایش مدت زمان تیمار با

### منابع

- Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thisleton J, Miller JAC, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the non-narcotic alkaloid reticuline in Opium poppy. *Natural Biotechnology* 22:1559-1566.
- Amal K, Maj I, Pratim B (2015) *Chelidonium majus* L. (Greater celandine) - A review on its phytochemical and therapeutic perspectives. *International Journal Herbal Medicin* 3:10-27.
- Beaudoin GA, Facchini PJ (2013) Isolation and characterization of a cDNA encoding (s)- cis-N-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431:597-603.
- Davoudnia B, Ahmadi J, Fabriki-Ourang S (2016) Investigation in expression of key genes involved in sanguinarine biosynthetic pathway in *Papaver* genus under drought and salinity. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding* 5:48-57.
- Dittrich H, Kutchan TM (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proceedings of Natlural Academy of Science USA* 88:9969-9973.
- Facchini PJ, Bohlmann J, Covelto PS, De Luca V, Mahadevan R, Page JE, Ro DK, Sensen CW, Storms R, Martin VJJ (2012) Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. *Trends Biotechnology* 30:127-131.
- Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase in Opium poppy. *Journal of Biological Chemistry* 269:26684-26690.
- Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D (1996) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from Opium poppy. *Plant Physiology* 112:1669-77.
- Facchini PJ, Park SU (2003). Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in Opium poppy. *Phytochemistry* 64:177-186.
- Frenzel T, Beale JM, Kobayashi M, Zenk MH, Flossm HG (1988) Stereochemistry of enzymic formation of the berberine bridge in protoberberine alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* 110:7878-7880.
- Gerardy R, Zank MH (1993b) Formation of salutaridine from (R)- reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *papaver somniferum*. *Phytochemistry* 32:79-86.
- Hagel JM, Beaudoni GA, Fossati E, Ekins A, Martin VJ, Facchini PJ (2012) Characterization of a flaboprotein oxidase from Opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 287:42972- 42983.
- Hagel JM, Facchini P (2010a) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in Opium poppy. *Nature Chemical Biology* 4:273-375.
- Hashimoto T, Yamada Y (1992) Tropane alkaloid biosynthesis: regulation and application. In proceedings of the 7<sup>th</sup> Annual Pennsylvania State Symposium on plant. *Physiology American Society of Plant Physiologists* 122-134.
- Huang FC, Kutchan TM (2000) Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 53:555-564.
- khodayari M, Omid M, Shahnejat-booshehri A, Yazdani D, Naghavi M (2015) Gene expression involved in sanguinarine biosynthesis affected by nano elicitors in *papaver somniferum*. *Journal of Medicinal Plants* 2:41-54 (In Farsi).
- Kumar J, Gupta PK (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports* 2:93-112.
- Lee EJ, Facchini PJ (2010) Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. *Plant Cell* 22:3489-3503.
- Mousavi A, Alizadeh B, Khodarahmi M, Mostafavi KH (2012) Investigation of cold resistance in winter canola (*Brassica napus* L.) cultivars in field condition. *Journal of Agronomy and Plant Breeding* 8:29-37 (In Farsi).
- Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of

biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2:29-48.

Rezaei M, Naghavi MR, Hosseinzadeh AH, Abbasi AR (2016a) Study the expression of genes involved in morphinan alkaloids biosynthesis and corresponding metabolites in *papaver somniferum*. Modern Genetics Journal 11:229-236 (In Farsi).

Rezaei M, Naghavi MR, Hosseinzadeh AH, Abbasi AR (2016b) Developmental accumulation of thebaine and some gene transcripts in different organs of *Papaver bracteatum*. Industrial Crops and Products 80:262-268.

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA (1984) Recent advanced in phytochemistry, phytochemical adaptation to stress. Plenum press 18:333.

Verma P, Khan SA, Mathur AK, Ghosh S, Shanker K, Kalra A (2014) Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. Protoplasma 251:1359-1371.

Winkler A, Hartner F, Kutchan TM, Glieder A, Macheroux P (2006) Biochemical evidence that berberine bridge enzyme belongs to a novel family of flavoproteins containing a bi-covalently attached FAD cofactor. The Journal of Biololigal Chemistry 281:21276-21285.

Zhao J, Davis L, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283-333.