

تشدید بیان ژن *TYDC2* در گیاه دارویی خشخاش به منظور افزایش آلکالوئیدهای دارویی

Overexpression of *TYDC2* in medicinal plant opium poppy to increase its medicinal alkaloids contents

فرزانه کوهزادی^{۱*}، منصور امید^۲، محمود سلوکی^۳، نفیسه مهدی نژاد^۴، هوشنگ علیزاده^۵

۱، ۳، ۴- به ترتیب فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشیار و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زابل
۲، ۵- به ترتیب استاد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران

Koohzadi F^{*1}, Omid M², Solouki M³, Mahdinejad N⁴, Alizadeh H⁵

1,3,4. Graduate student, Associate Professor, Instructor, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2,5. Professor, Assistant Professor, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: koohzadi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

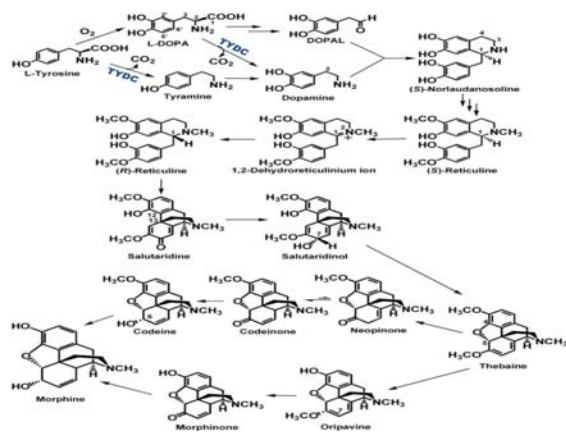
آلکالوئیدهای گروه مورفین در خشخاش از دو مولکول اسید آمینه ال- تیروزین توسط حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی طی چندین واکنش اکسیداتیو پیوسته سنتز می‌شوند. اولین آنزیم کلیدی در این مسیر ال- تیروزین دکربوکسیلاز (TYDC) می‌باشد. تیروزین دکربوکسیلاز یک آمینو اسید دکربوکسیلاز حلقوی رایج و عمومی در گیاهان می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی بیوستنز تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه به آن وابسته می‌باشد. به منظور تشدید بیان این ژن در گیاه خشخاش، سازه ژنی مناسب به نام pBI121-TK طراحی شد. بدین ترتیب که توالی کوزاک به عنوان یک افزایش دهنده بیان ژن در بالا دست بدون شروع ژن *TYDC2* الحاق و در پلاسمید حد واسط pTZ57R/T درج شد و سپس در ناحیه T-DNA پلاسمید دوتایی pBI121، در جایگاه ژن *GUS* تحت پیشبر CaMV35S و پایان بر Nos وارد شد. نتایج کلونینگ با استفاده از روشهای مختلف مولکولی از جمله برش آنزیمی، PCR و کلونی PCR در هر مرحله از آزمایش بررسی و تایید شد. بهینه سازی انتقال ژن به روش آزمون هیستوشیمیایی *GUS* در گیاهان اگرواینفیلتره شده توسط پلاسمید pBI121 حاوی ژن *GUS* انجام شد و در نهایت اگروباکتری حاوی سازه نو ترکیب pBI121-TK مطابق با شرایط بهینه شده، به گیاهان شش هفته ای تلقیح شد. میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان دهنده افزایش ۷۵/۲ درصدی آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین در نمونه تراریخته نسبت به نمونه شاهد بود.

واژه‌های کلیدی

تشدید بیان ژن،
توالی کوزاک،
تیروزین دکربوکسیلاز (*TYDC2*)،
خشخاش،
مورفین.

مقدمه

ترکیب دوپامین با ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید اس- نورکوکلوئین^۵ تولید می‌شود (شکل ۱). اس- نورکوکلوئین به عنوان پیش‌ماده عمومی آلکالوئیدها شناخته شده‌است و تعداد زیادی از آلکالوئیدها مانند بنزوفاکونتریدین آلکالوئیدها، پروتوپین آلکالوئیدها و بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها از آن منشعب می‌شوند (Bird et al. 2003).



شکل ۱- مسیر سنتز مورفین در گیاه خشخاش (Verpoorte and Alfermann 2000).

در مسیری که به سنتز مورفین منتهی می‌شود، اس-نورکوکلوئین طی چند واکنش متوالی به اس-نورلادانوزولین^۶ و این ترکیب هم بعد از چند مرحله دیگر به اس-رتیکولین^۷ تبدیل می‌شود. اس-رتیکولین یکی دیگر از نقاط انشعابی مهم است که سه گروه مهم آلکالوئیدی یعنی آلکالوئیدهای گروه مورفین، سنگوئینارین و لاودانوزین از آن منشعب می‌شوند. بدین ترتیب که اس-رتیکولین از یک سو توسط آنزیم BBE^۸ به اس-اسکولرین تبدیل شده و بعد از چند واکنش پی در پی دیگر سنگوئینارین^۹ که دارای خاصیت آنتی بیوتیکی است، سنتز می‌شود. از طرفی اس-رتیکولین به آر-رتیکولین و سپس به سالوتاریدین تبدیل می‌شود. آنزیم سالوتاریدینول ۷-۱ و- استیل ترانسفراز، تبدیل آلکالوئید فنانتریدینی سالوتاریدینول به سالوتاریدینول ۷-۱ و- استات را کاتالیز می‌کند که این ترکیب هم در مرحله بعد با از دست دادن گروه استات و تغییر شکل

امروزه با بکارگیری انتقال ژن و روش‌های مشابه آن، تولید گیاهان تراریخت با بهبود در خصوصیات مربوط به عملکرد، کیفیت غذایی بالاتر، مقاومت به بیماری‌ها و آفات امکان پذیر شده‌است. یکی از کاربردهای مهم این تکنیک‌ها بالا بردن قابلیت تولید یک فرآورده با ارزش دارویی با دستوری مسیر سنتز آنها در گیاهان است، که تحت عنوان مهندسی متابولیک نامیده می‌شود. مهندسی متابولیک روشی قدرتمند جهت طراحی هوشمندانه مسیرهای بیولوژیکی جدید، سیستم‌ها و در نهایت فنوتیپ‌های جدید، با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب می‌باشد. همزمان با پیدایش تکنولوژی DNA نو ترکیب محققین به پتانسیل استفاده از ژن‌های چندگانه برای به وجود آوردن مسیرهای جدید که طیف وسیعی از ترکیبات از سوبستراهای مختلف را تولید می‌کنند، پی بردند. انتقال ژن *SOMT*^۱ از گیاه *Coptis japonica* به خشخاش کالیفورنیایی جهت تولید ترکیباتی جدید، از آن جمله می‌باشد (Verpoorte and Alfermann 2000; Ziegler et al. 2006).

بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در گیاه خشخاش یکی از مناسب ترین مدل‌های شناخته شده برای مهندسی متابولیک به شمار می‌آید. بدین ترتیب که با توسعه‌ی ابزارهای ژنومیکس، به خصوص EST^۲ ها زمینه مناسبی برای کشف ژن‌های بیوسنتزی *BIAS*^۳ فراهم شد و بسیاری از آنزیم-های دخیل در سنتز مورفین شناخته شد و همچنین کتابخانه‌ی cDNA برای این ژن‌ها/زجمله *TYDC*, *SOMT*, *NCS*, *CNMT* گردید. این اطلاعات بر پایه‌ی توالی یابی بیش از ۳۰۰۰۰ cDNA از کتابخانه‌ی کشت سلولی خشخاش که توسط elicitorها تیمار شدند، حاصل شده‌است (Weid et al. 2004). آلکالوئیدهای گروه مورفین از دو مولکول ال-تیروزین، که توسط آنزیم ال-تیروزین/دوپا دکربوکسیلاز^۴ (*TYDC*) به تیرامین و دوپامین تبدیل می‌شود، سنتز می‌شود. تیرامین در مرحله بعد به ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید تبدیل می‌شود. سپس از

^۵ S-Norcoclaurine

^۶ S-Norlaudanosoline

^۷ S-Reticuline

^۸ Berberine Bridge Enzyme

^۹ Sanguinarine

^۱ Scoulerine-o-methyltransferase

^۲ Expressed sequence tags

^۳ Benzyl-isoquinoline alkaloids

^۴ Tyrosine decarboxylase

(*TYDCs*) می‌باشد که از حدود ۱۵ عدد ژن تشکیل شده است. تا کنون ۸ عدد از این ژن‌ها جداسازی و بر اساس شباهت توالی به دو زیرخانواده‌ی *TYDC1* و *TYDC2* دسته بندی شده‌اند. نتایج آزمایشات حاکی از آن بود که هر یک از این دو گروه در اندام‌های خاصی بیان می‌شوند. به این ترتیب که خانواده *TYDC1* به مقدار زیاد در ریشه و خانواده *TYDC2* هم در ریشه و هم در ساقه بیان می‌شوند. اختصاصی بودن بیان این دو خانواده ژنی در این اندام‌ها نشان می‌دهد که یکی از مکانیزم‌های تنظیمی گیاه در سنتز گروه‌های مختلف آلکالوئیدی، خانواده ژنی *TYDC1* و *TYDC2* می‌باشد (Facchini and De Luca 1995; El-Ahmadi and Nessler 2001; Grothe et al. 2001).

در این تحقیق قصد داریم با تشدید بیان ژن *TYDC2* در گیاه خشخاش، مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین را به سمت تولید هرچه بیشتر این ترکیبات با ارزش هدایت کنیم. تا بدین وسیله امکان تولید هرچه ارزان تر این داروهای با ارزش و حیاتی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه نو ترکیب حاوی ژن *TYDC2*

در این تحقیق از گیاه *Papaver* گونه *Somniferum* باکتری‌های *E. coli* سویه *DH5a* *Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA4404* استفاده شد. DNA گیاه خشخاش به روش CTAB استخراج شد و سپس ژن *TYDC2* توسط PCR با استفاده از آنزیم DNA polymerase pfu و آغازگرهای 5' R₁: 3' ACTTGCTCCAAGGCTGTGC و 5' F₁: 3' CAGCATTATGGATGACCCG که توسط نرم افزار Primer3 از روی توالی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی U08598 طراحی شده بود، تکثیر شد.

محصول PCR از روی ژل آگارز با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction (شرکت Roche) بازیابی و در پلاسمید pGEM T-Easy Vector (شرکت Promega) درج شد و به سلولهای مستعد شده باکتری *E. coli* با استفاده از روش کلیم کلراید و شوک حرارتی منتقل شد و در محیط مک کانکی آگار حاوی آنتی

در ساختمان مولکولی اولین ترکیب شش حلقه‌ای مورفینی این مسیر، یعنی تبائین را می‌سازد (Guillet et al. 2000). سپس بعد از دمتیله شدن تبائین، مورفین تولید می‌شود. البته باید ذکر کرد که دمتیلاسیون تبائین از دو مسیر مختلف صورت می‌گیرد. در مسیر اول تبائین ابتدا به اورپاوپین و سپس مورفینون و در نهایت به مورفین تبدیل می‌شود. در مسیر دیگر تبائین ابتدا توسط کدئین ردوکتاز به کدئین تبدیل و در نهایت کدئین نیز به مورفین تبدیل می‌گردد. غالب بودن یکی از دو مسیر بر دیگری به فعالیت نسبی آنزیم‌های ۱-۳ و ۱-۶-متیل اکسیداز^۱ و ۱-۶-متیل اکسیداز^۲ در تبائین بستگی دارد. مورفین ماده نهایی مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین نیست و تحت شرایط خاصی به ویژه در کپسول‌ها به سرعت به نورمورفین^۳ و در نهایت به مواد غیر آلکالوئیدی تبدیل می‌شود (Facchini and De Luca 1995; Allen et al. 2008). محققین بسیاری در دنیا سعی دارند با تکنیک‌های مهندسی متابولیک از جمله خاموشی و افزایش بیان ژن‌های این مسیر، به راندمان مطلوب تولید آلکالوئید در واحد سطح دست یابند و تاکنون موفقیت‌های زیادی در این زمینه حاصل شده است. در آزمایشی که توسط Frick et al. (2007) صورت گرفت، افزایش بیان ژن *CYP80B* در گیاه *P.Somniferum* منجر به افزایش ۴۵۰ درصدی کل آلکالوئیدهای موجود در گیاهان تراریخته شد.

آزمایشات دیگری که توسط Park et al. (2003) انجام شد، کشت سلولهای تراریخت شده *Eschscholiza californica* با آنتی‌سنس ژن *BBE* کاهش ۱۰-۷ برابری در میزان کل آلکالوئیدهای مسیر سنتز مورفین را نشان داد و در مقابل، افزایش بیان ژن *BBE* منجر به افزایش ۶-۵ برابری در میزان کل آلکالوئیدهای مسیر سنتز مورفین در کشت های ریشه مویی *E.californica* شد.

TYDC2 یکی از آنزیم‌های مهم نقاط انشعابی در مسیر تبدیل متابولیت اولیه تیروزین به سمت سنتز متابولیت ثانویه مورفین است. mRNA این ژن توسط Facchini and De Luca (1994) جداسازی شد. در بین گونه‌های مختلف گیاهی، خشخاش دارای خانواده ژنی بزرگی از تیروزین/دوپا دکربوکسیلازها

¹ 3-O-methyloxidase

² 6-O-methyloxidase

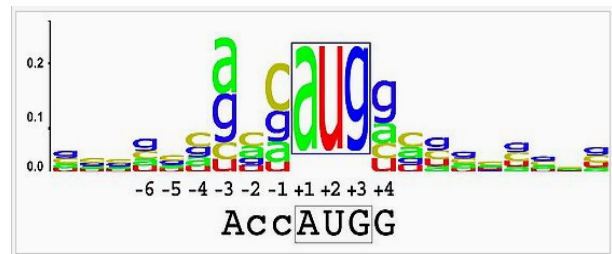
³ Normorphine

با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* برش خورده بودند، توسط واکنش Ligation به یکدیگر متصل شدند و بدین ترتیب سازه نو ترکیب به نام pBI121-TK ساخته شد (Sambrook and Russel 2001). پلاسمید دوتایی pBI121 حاوی ژن *GUS* تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* و پایان بر *Nos* و ژن *nptII* تحت پیشبر و پایان بر *Nos* به عنوان نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین است (شکل ۳). سازه ساخته شده pBI121-TK و پلاسمید pBI121 به طور جداگانه به روش ذوب و انجماد^۱ به باکتری آگروباکتریوم سویه *LBA4404* انتقال داده شد و در نهایت آگروباکتری حاوی سازه نو ترکیب در تلقیح گیاه استفاده شد.

تراریختی گیاه خشخاش به روش Agroinfiltration

برای بهینه کردن شرایط انتقال ژن به روش Agroinfiltration در گیاه خشخاش، ابتدا از ناقل pBI121 حاوی ژن گزارشگر *GUS* استفاده شد. بدین ترتیب یک کلونی آگروباکتریوم حاوی ناقل pBI121 در ۱۰ ml LB مایع حاوی ۵۰ mg/l کانامایسین و ۵۰ mg/l ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت شبانه داده شد. باکتری‌های رشد یافته توسط سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۵۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه رسوب داده شد. مایع فوقانی خارج شد و به رسوب باکتری، محیط القایی رشد (۲۰ ml محلول MS ۱/۲ با pH=۵/۵ حاوی ۶۰ gr/l ساکارز و ۲۰۰ μl استوسیرنگون و ۱۰ mM بافر MES) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت مجدداً درون انکوباتور در دمای مذکور قرار گرفت. سپس برگهای خشخاش درون آن قرار داده شد و در دسیکاتور خلاء، تحت خلاء ۲۵۰ میلی بار به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. این کار همراه با تکان دادن ظرف برای خروج کامل هوای میان بافتی و سه بار حذف سریع سیستم خلاء برای نفوذ مایع به فضای بین بافتی انجام شد. نمونه‌ها با آب شستشو و بر روی کاغذ صافی مرطوب، درون لیوان به مدت ۳ روز در اتاق کشت با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. جهت ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز، از آزمون هیستوشیمیایی *GUS* استفاده شد (Jefferson 1987; Kapila et al. 1997; Joh et al. 2005). برگها در بافر رنگ آمیزی X-Gluc قرار گرفتند و پس از قرار

بیوتیک آمپی سیلین کشت شدند (Sambrook and Russel 2001). کلونی‌های سفید حاوی پلاسمید نو ترکیب انتخاب و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۸۰ به مدت یک شب رشد داده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit (شرکت Fermentas) انجام شد. پلاسمید استخراج شده که حاوی ژن *TYDC2* بود، به عنوان DNA الگو، توسط جفت آغازگرهای دوم (R_2 و F_2) که حاوی توالی توافقی کوزاک (Kozak Enhancer) بود، PCR شد. بدین ترتیب توالی کوزاک به ابتدای ژن *TYDC2* الحاق شد. توالی افزایش دهنده کوزاک gccRccAUGG یک توالی توافقی است که در mRNA یوکاریوت‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲- توالی توافقی کوزاک (Kozak 1987).

R یک باز پورین (آدنین یا گوانین) می‌باشد. توالی *taaAcaAUGG* یکی از توالی‌های متداول در گیاهان می‌باشد که در این تحقیق به کار گرفته شد. این توالی نقش مهمی در شروع فرآیند ترجمه بر عهده دارد (Kozak 1987). در حین طراحی برای الحاق این توالی به ژن *TYDC2*، دقت شد آغازگر پیشرو حاوی توالی مورد نظر (F_2 : 5'ATCTAGATAAACAATGGGTAGTCTTAACACTG3') طوری طراحی شود که چارچوب خواندن در مرحله رونویسی و ترجمه تغییر نکند. سایت برشی *XbaI* در ابتدای این آغازگر در نظر گرفته شد. علاوه بر آن کدون خاتمه UAA جایگزین کدون UAG در آغازگر برگشتی (R_2 : 5'AGAGCTCATTAACCTTGAAAAATCTGCTTCAC 3') شد و سایت برشی *SacI* در ابتدای این آغازگر قرار داده شد. سپس محصول PCR (ژن *TYDC2* حاوی توالی کوزاک) از روی ژل آگارز بازیابی و در پلاسمید *pTZ57R/T* (شرکت Fermentas) درج شد و به باکتری *E. coli* انتقال یافت. در مرحله بعد ژن *TYDC2* حاوی توالی کوزاک و ناقل pBI121، که هر دو

^۱ Freeze-Thaw

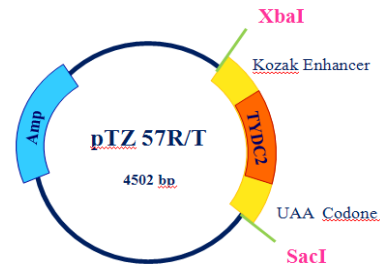
دادن تحت خلاء ۲۵۰ mbar به مدت ۵ دقیقه، به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد و در نهایت ۴-۵ مرتبه با اتانول ۷۵ درصد شستشو شد. این کار تا حذف کامل کلروفیل و نمایان شدن لکه های آبی ادامه داشت (Kapila et al. 1997). در نهایت گیاهان خشک شش هفته ای با آگروباکتری حاوی سازه نو ترکیب pBI121-TK مطابقت با شرایط بهینه شده در مراحل قبل، تلقیح شدند.

استخراج آلکالوئید و تجزیه HPLC

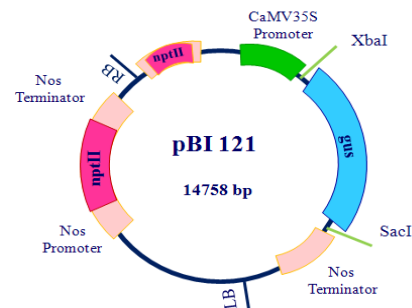
بعد از گذشت سه روز و به زردی گرائیدن برگها، نمونه های تراریخت و شاهد بطور جداگانه به مدت یک هفته در سایه خشک و آسیاب شد و پس از گذراندن از الک، استخراج آلکالوئید از نمونه ها به روش (Facchini and De Luca (1995); Frick et al. (2004) با اندکی تغییر انجام شد. بر اساس این روش، مقدار یک گرم از پودر خشک را به ارلن ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده و حلال استخراجی، شامل ۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ میلی لیتر متانول و ۷۵ میلی لیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک نگهداری شد و بعد به وسیله کاغذ صافی و پنبه آنرا صاف کرده و به کمک ۱۰ میلی لیتر کلروفرم محتویات باقی مانده در ارلن نیز از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده، در یک بالن ۲۰۰ میلی لیتری به دستگاه روتاری متصل شد تا حلال های آن تبخیر و خارج شود. به رسوب حاصل، ۲۵ میلی لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد. محلول فوق را به یک دکانتور منتقل کرده و پس از ایجاد دو فاز مجزا، فاز پایینی که فاز کلروفرمی بود، از دکانتور خارج کرده و فاز بالایی را که فاز آبی بود، نگه داشته شد. با استفاده از چند قطره محلول آمونیاک pH محلول بین ۱۰-۱۱ تنظیم شد. در این مرحله فاز کلروفرمی در بالن های کوچکتر جمع آوری و فاز آبی مجدداً با ۱۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج و جمع آوری شد. برای آگیری به آن سدیم سولفات انیدرید اضافه شد و سپس بوسیله کاغذ صافی صاف گردید. مجدداً با دستگاه روتاری حلال آن کاملاً خارج شد و مواد باقی مانده با ۵ میلی لیتر متانول جمع آوری شد. در تجزیه عصاره



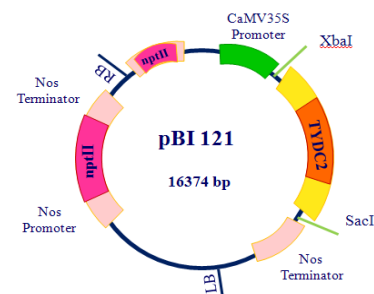
الف) نقشه پلاسمید نو ترکیب pGEM-TYDC2



ب) نقشه پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-TYDC2



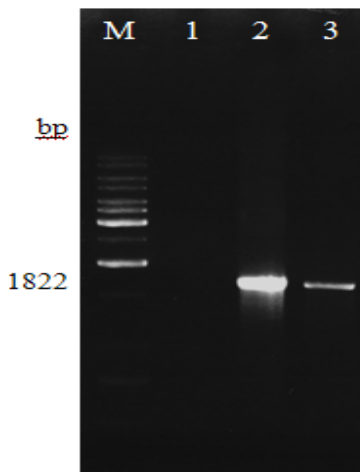
ج) نقشه پلاسمید pBI121



د) نقشه پلاسمید نو ترکیب pBI121-TK

شکل ۳- تصویر شماتیک مراحل ساخت پلاسمید نو ترکیب pBI121-TK. الف) ژن *TYDC2* در پلاسمید pGEM T-Easy Vector درج شد (ب) توالی افزایش دهنده کوزاک به ابتدای ژن *TYDC2* الحاق شد و پس از برش با آنزیم- های *XbaI* و *SacI* در پلاسمید pTZ57R/T درج شد (ج و د) پلاسمید pBI121 با آنزیم های *XbaI* و *SacI* به منظور خارج کردن ژن *GUS* برش داده شد سپس ژن *TYDC2* حاوی توالی کوزاک در آن درج شد.

همچنین نتایج حاصل از برش آنزیمی، صحت سازه ساخته شده را تایید نمود (شکل ۵ و ۶). به این ترتیب پلاسمید نو ترکیب حاصل موسوم به pBI121-TK حاوی ژن تیروزین دکربوکسیلاز تحت پیشبر CaMV35S و پایان بر Nos در ناحیه T-DNA خود به همراه نشانگر انتخابی *nptII* (ژن مقاومت به کانامایسین) تحت پیشبر و پایان بر Nos، ساخته شد. به منظور انتقال این پلاسمید به روش *Agroinfiltration* به گیاه خشخاش، مراحل کار به روش آزمون هیستوشیمیایی GUS توسط پلاسمید pBI121 به روش Jefferson (1987) بهینه شد. بدین ترتیب که نمونه‌های برگ‌گی که این پلاسمید را دریافت کردند به طور جداگانه در محلول X-gluc قرار داده شدند. آبی رنگ شدن سوسترا در اثر فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز که در نتیجه بیان ژن GUS در نمونه‌هایی که آگرواینفیلتراسیون در آنها با پلاسمید pBI121-GUS صورت گرفته بود، نشان داد که ژن GUS تحت پیشبر CaMV35S و پایان بر Nos به طور صحیح در برگ‌های گیاه خشخاش رونویسی و بیان می‌شود (شکل ۷) در نتیجه انتظار می‌رود با استفاده از *Agroinfiltration*، سازه pBI121-TK به این گیاه انتقال یافته و ژن هدف با موفقیت در ژنوم خشخاش وارد شود.



شکل ۴- تایید حضور ژن *TYDC2* در ناقل pGEM T-Easy Vector با استفاده از تکنیک PCR. M نشانگر وزن مولکولی 1000 bp (Fermentas) کنترل منفی (واکنش PCR با آب مقطر بدون DNA)، ۲ محصول ناشی از تکثیر ژن *TYDC2* با آغازگرهای R₁,F₁ در ناقل pGEM، ۳ کنترل مثبت (قطعه‌ای که توسط آغازگرهای R₁,F₁ از ژنوم گیاه تکثیر شد).

ها از دستگاه HPLC مدل Knauer با Flow rate ۲ میلی لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده، آمونیوم استات mM ۱۰۰، دی اکسان، استونیتریل، به نسبت (۴۰:۵۰:۵۰:۸۶۰) با اسید استیک pH=۵/۶ و دکتور UV با طول موج ۲۵۴ nm، ستون CN 5micrometer (4.9*250) استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، ابتدا غلظت‌های (mg/ml) ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵، ۱ از استانداردهای هر یک از آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین در متانول تهیه شد و هر یک در سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق و سطح زیر منحنی در مقابل مقدار تزریق ترسیم شد. معادله خط و ضریب همبستگی (R₂) استاندارد مورفین، کدئین و تبائین محاسبه و منحنی کالیبراسیون آن رسم گردید. سیستم در گستره غلظت نمونه‌های استاندارد تنظیم شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از هر یک از نمونه‌های عصاره‌گیری شده، به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آنها ثبت شد.

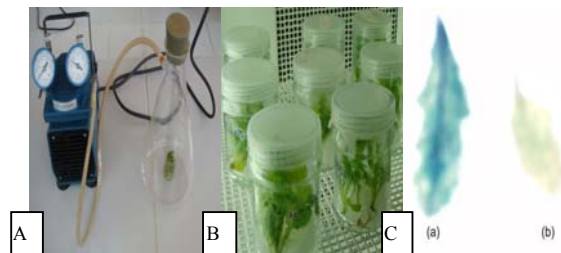
نتایج و بحث

تایید ساختار

حضور ژن *TYDC2* در پلاسمید pGEM T-Easy Vector، بوسیله برش توسط آنزیم *EcoRI* و تکنیک PCR تایید شد (شکل ۴). کلونی‌هایی که ژن *TYDC2* را دریافت کرده بودند، مطابق انتظار قطعه‌ای به طول ۱۸۲۲ جفت باز در آنها مشاهده شد. بعد از الحاق توالی کوزاک به توالی ژن تیروزین دکربوکسیلاز و همسانه سازی آن در پلاسمید pTZ57R/T استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید انجام گرفت و با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* برش آنزیمی شدند و در نتیجه، قطعاتی به طول ۲۸۸۶ و ۱۶۱۶ جفت باز مشاهده شد (شکل ۵). همچنین در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعاتی به طول مورد انتظار ۱۶۱۶ جفت باز مشاهده شد (شکل ۶). برای بررسی و تایید صحت سازه ساخته شده pBI121-TK، این سازه با آنزیم‌های *SacI* و *XbaI* برش داده شد و قطعاتی به طول ۱۶۱۶ و ۱۴۷۸۵ جفت باز مشاهده شد. برای اطمینان بیشتر از صحت سازه ساخته شده، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. وجود باند اختصاصی ژن به طول مورد انتظار ۱۶۱۶ جفت باز و

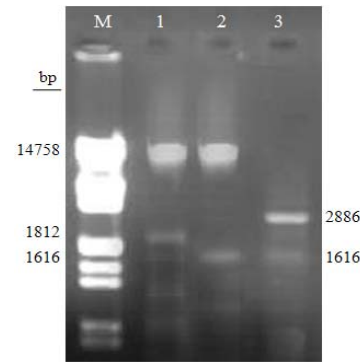
¹ High performance liquid chromatography

هیدروکسی فنیل آلانین (دوپا) آنها را به ترتیب به تیرامین و دوپامین تبدیل می‌کند این عمل اولین مرحله در تبدیل یک متابولیت اولیه به سمت سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. این ترکیبات نیز بر اساس اینکه کدامیک از ایزوفرم‌های خانواده ژنی *TYDC* شروع کننده این مسیر است، طی چندین واکنش اکسیداتیو پی در پی به متابولیت‌های ثانویه ای مانند آلکالوئیدها، کومارین ها، لیگنین و غیره تبدیل می‌شوند (Park et al. 1999; Kassem and Jacquin 2001). در آزمایشاتی که توسط Park et al. (1999) جهت بررسی الگوی بیانی ژن *BBE1* با دو ایزوفرم *TYDC* انجام شد، الگوی بیانی *BBE1* مشابه با ژن *TYDC2* بود. از آنجایی که ژن *BBE1* در بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین شرکت دارد، لذا محققین بر این باورند که ژن‌هایی که بیانشان مشابه با بیان ژن‌های زیرخانواده *TYDC2* است در سنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین نقش دارند. در حالی که ژن‌هایی که بیانشان مشابه با بیان ژن‌های زیرخانواده *TYDC1* است در سایر پاسخ‌های دفاعی گیاه شرکت دارند (Zigler et al. 2006). از آنجا که مورفین یکی از ترکیباتی است که در گروه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی دسته‌بندی می‌شود لذا در این تحقیق ژن *TYDC2* به منظور دستورزی مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین انتخاب شد.

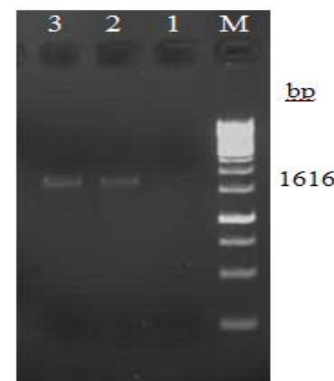


شکل ۷- مراحل انجام Agroinfiltration در خشخاش. (A) قرار دادن گیاه در سوسپانسیون باکتری و اعمال خلاء، (B) نگهداری گیاهان اینفیلتره شده در اتاق رشد، (C) مشاهده نقاط آبی رنگ در اثر فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز در برگ‌هایی که Agroinfiltration در آنها انجام گرفت، (a) نمونه بزرگ گیاه ترانسفورم شده، (b) نمونه بزرگ شاهد.

میزان مورفین، کدئین و تبائین در نمونه‌های تراریخته با سازه pBI121-TK و شاهد (گیاه غیر تراریخته) با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد (جدول ۱). نتایج نشان داد میزان آلکالوئیدهای



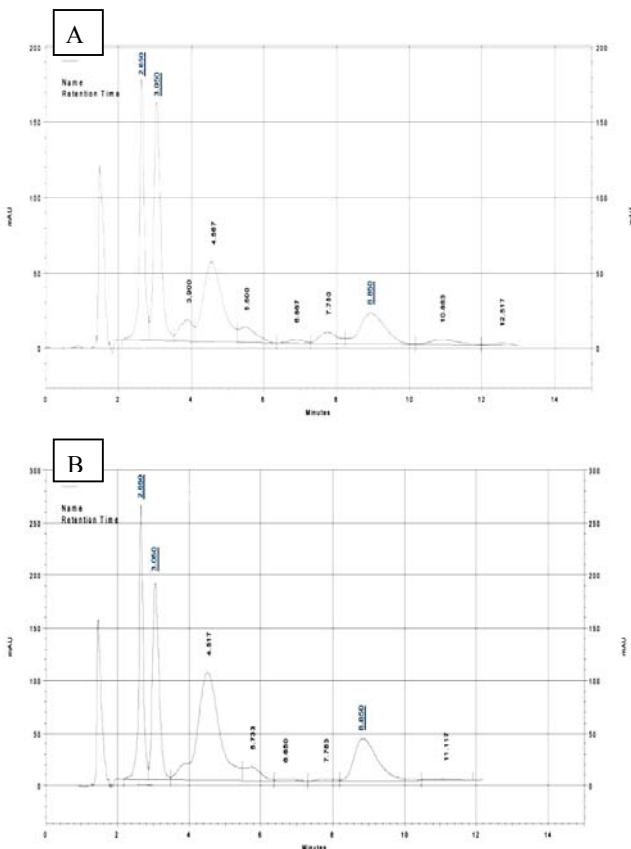
شکل ۵- نتایج برش آنزیمی. (M) نشانگر وزن مولکولی (Lambda) (DNA/EcoRI+HindIII Marker)، (۱) محصول برش pBI121 با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* به منظور جایگزین کردن ژن *TYDC2* در محل ژن *GUS*، (۲) محصول برش pBI121-TK با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* به منظور اثبات حضور ژن *TYDC2* حاوی توالی کوزاک، در سازه ساخته شده، (۳) کنترل مثبت (محصول برش ناقل pTZ57R/T-TK با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*).



شکل ۶- تایید حضور ژن *TYDC2* در ناقل pBI121-TK با استفاده از تکنیک PCR. (M) نشانگر وزن مولکولی 1000 bp (Fermentas) (۱) کنترل منفی (واکنش PCR با آب مقطر بدون DNA)، (۲) کنترل مثبت (محصول ناشی از تکثیر ژن *TYDC2* با آغازگرهای R2,F2 در ناقل pTZ57R/T-TK)، (۳) محصول ناشی از تکثیر ژن *TYDC2* با آغازگرهای R2,F2 در ناقل pBI121-TK.

این پلاسمید برای انتقال به گیاهان دارویی که سرشار از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند، جهت افزایش آلکالوئیدها و حتی دیگر ترکیبات ثانویه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. چرا که اغلب این گیاهان دارای خانواده ژنی از تیروزین/دوپا دکربوکسیلاز (*TYDCs*) می‌باشند. تمام *TYDC*های گیاهی شناخته شده تیروزین و دی هیدروکسی فنیل آلانین (دوپا) را به عنوان پیش‌ماده می‌پذیرند، و با حذف یک گروه کربوکسیل از تیروزین و دی

بیان دیگر ژنهای تشدید بیان شده در این مسیر که توسط دیگر محققین انجام شده است، از اینجا ناشی می شود. با وجود اینکه مورفین و کدئین از همان ابتدای رشد در گیاهچه های کوچک خشکشاخ سنتز می شوند ولی مقدار آن در مقایسه با مرحله گلدهی و تکامل مجاری لاتکس که گیاه پتانسیل بیشتری برای تولید آلکالوئیدهای گروه مورفین دارد، بسیار ناچیز می باشد. بنابراین با انتقال این ژن به صورت پایدار راندمان تولید آلکالوئیدهای گروه مورفین به مراتب بیشتر از این مقدار خواهد بود. امیدوار هستیم که در آینده با تشدید بیان ژن TYDC2 به همراه خاموش سازی ژنهای موجود در نقطه انشعابی اس رتیکولین، دو مسیری که به سنتز سنگوئینارین و لانودانوزین می انجامد و پیش ماده های موجود در بالادست سنتز مورفین را به دیگر مسیرها که مد نظر ما نیست هدایت می کنند، به میزان بالایی از مورفین دست یابیم.



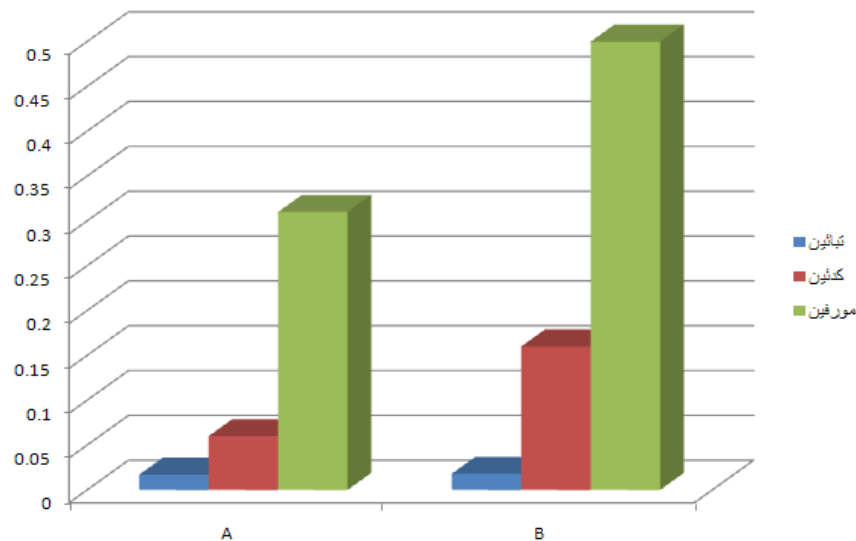
شکل ۸- کروماتوگرام HPLC مربوط به گیاه تراریخته و شاهد. (A) گیاه شاهد (B) گیاه تراریخته توسط سازه pBI121-TK (مورفین ۲/۶۵۰ دقیقه، کدئین ۳/۰۵۰ دقیقه، تبائین ۸/۸۵۰ دقیقه)

مورفین، کدئین و تبائین در مجموع ۷۵/۲ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است (شکل ۸ و ۹) در حالی که این میزان افزایش در مقایسه با سایر ژنهایی که توسط دیگر محققین دستوری شده است از جمله افزایش بیان ژن BBE توسط Park et al. (2003) منجر به افزایش ۶-۵ برابری در میزان کل بنزوفنانترن ها در کشت های ریشه موی *Eschscholiza californica* شد و یا افزایش بیان ژن CYP80B3 توسط Frik et al. (2007) منجر به افزایش ۴۵۰ درصدی در کل آلکالوئیدهای موجود در لاتکس شد، نسبتاً کمتر می باشد. ولی این میزان افزایش، نشان دهنده پتانسیل بالای این ژن برای بکارگیری آن جهت افزایش میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین از طریق مهندسی متابولیت ها در این گیاه می باشد. در مسیر سنتز مورفین از متابولیت اولیه تیروزین، حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی شناخته شده باید طی شود و از طرفی در نقطه انشعابی اس- رتیکولین مسیر سنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین در خشکشاخ به سه شاخه مجزا منشعب می شود و محصولات حاصل از بیان ژن TYDC2 به سه

جدول ۱- نتایج حاصل از HPLC در گیاه تراریخت و شاهد

ترکیبات	نمونه شاهد (mg/ml)	نمونه تراریخت (mg/ml)
مورفین	۰/۳۱	۰/۵
کدئین	۰/۰۶	۰/۱۶
تبائین	۰/۰۱۷	۰/۰۱۸
کل	۰/۳۸۷	۰/۶۷۸

مسیر مختلف هدایت شده و به تدریج مقدار آن طی این مسیرهای آنزیمی تعدیل می شود. علاوه بر آن، تعداد زیادی مسیر ناشناخته دیگر وجود دارد که تیرامین در ترکیب با دیگر مولکولها موجب سنتز متابولیت های ثانویه ای مانند هیدروکسی سینامیک امید می شود که مانند آلکالوئیدهای گروه مورفین دارای منشا تیروزینی هستند (De Luca and St Pierre 2000; Davies and Schwinn 2003). از آنجا که میزان اسید آمینه تیروزین در گیاه محدود می باشد، تعدد مسیرهای متابولیکی موجود باعث می شود که سهم کمتری در مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین قرار گیرد. در نتیجه به نظر می رسد این اختلاف، نسبت به افزایش



شکل ۹- مقایسه میزان افزایش آکالوئیدهای گروه مورفین در نمونه تراریخت (B) نسبت به نمونه شاهد (A).

منابع

- Allen RS, Miller JAC, Chitty JA, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ (2008) Metabolic engineering of morphinan alkaloids by overexpression and RNAi suppression of salutarinol 7-O-acetyltransferase opium poppy. *Plant Biotechnology Journal* 6: 22-30.
- Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ (2003) A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* 15: 2626-2635.
- Davies KM, Schwinn KE (2003) Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol* 30: 913-925.
- De Luca V, St Pierre B (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 5: 168-173.
- El-Ahmadi SH, Nessler CL (2001) Cellular localization of tyrosin decarboxylase expression in transgenic opium poppy and tobacco. *Plant cell Reports* 20: 313-317.
- Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* 7: 1811-1821.
- Facchini PJ, Park SU (2003) Development and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 64: 177-186.
- Facchini PJ, Loukanina N, Blanche V (2008) Genetic transformation via somatic embryogenesis to establish herbicide-resistant opium poppy cultures. *Plant Cell Rep* 27: 719-727.
- Frick S, Chitty JA, Kramell R, Schmidt J, Allen RS, Larkin PL, Kutchan TM (2004) Transformation of opium poppy with antisense berberine bridge enzyme gene (anti-bbe) via somatic embryogenesis results in an altered ratio

of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Research* 13: 607-613.

Frick S, Kramell R, Kutchan TM (2007) Metabolic engineering with a morphine biosynthesis P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic Engineering* 9:169-176.

Grothe T, Lenz R, Kutchan TM (2001) Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum*). *J Biol Chem* 276: 30717-30723.

Guillet G, Poupart J, Basurco J, De Luca V (2000) Expression of Tryptophan Decarboxylase and Tyrosine Decarboxylase Genes in Tobacco Results in Altered Biochemical and Physiological Phenotypes. *Plant Physiology* 122: 933-943.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plant: the gus gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5:387-405.

Joh LD, Wroblewski T, Ewing NN, VanderGheynst JS (2005) High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnology and Bioengineering* 91:863-873.

Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122:101-108.

Kassem AM, Jacquin A (2001) Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in tobacco species of opium poppy. *Biomedicine and Biotechnology* 1: 70-78.

Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-8148.

Park SU, Johnson AG, Yostand CP, Facchini PJ (1999) Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberinebridge enzyme genes involved benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Molecular Biology* 40:121-131.

Park SU, Yu M, Facchini PJ (2003) Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol Biol* 51: 153-164.

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

Verpoorte R, Alfermann AW (2000) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 253 pp.

Weid M, Ziegler J, Kutchan TM (2004) The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13957-13962.

Ziegler J, Voightiander S, Schmidt J, Kramell R, Miersch O, Ammer C, Gesell A, Kutchan TM (2006) Comparative transcript and alkaloid profiling in papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant Journal* 48: 177-192.