

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

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

بهرز محمدپرست^{۱*}، موسی رسولی^۱، محمود قربانی^۱، ساناز زرداری^۲

۱- به ترتیب استادیاران و مربی، دانشگاه ملایر

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه تبریز

Mohammad Parast B^{*1}, Rasouli M¹, Ghorbani M¹, Zardari S²

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 می باشد که در گیاه *Psoralea corylifolia* وجود دارد. از جنبه های مهم دارویی سورولین می توان 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 رمز کننده آنزیم کلیدی سورولین سنتتاز که مسئول ساخت سورولین می باشد، برای اولین بار بوسیله تکنیک های 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 می باشد. همچنین بررسی ترتیب نوکلوتیدها با استفاده از توالی ژن های ثبت شده در سایت بانک جهانی ژن مشخص کرد که ژن همسانه سازی شده ۹۳ درصد با ژن سورولین سنتتاز موجود در گیاه *Ammi magus* مشابهت داشت.

واژه های کلیدی

ارزیابی مولکولی

ژن سورولین سنتتاز

سورولین

متابولیت ثانویه

Psoralea corylifolia

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 می گیرد. گیاه *Psorallea corylifolia* متعلق به خانواده *Fabaceae* و در گروه گیاهان رو به انقراض می باشد. این گیاه منبع غنی از متابولیت های ثانویه می باشد که به همین دلیل دارای ارزش دارویی بالایی جهت تامین سلامتی انسان ها است. مواد موثره با ارزش این گیاه در گروه های ایزوفلاونوئیدها^۱، فورانوکمارین ها^۲ و کومارین ها قرار می گیرند. فورانوکمارین ها از متابولیت های طبیعی می باشند که به دو دسته خطی سورولین^۳ و غیر خطی آنژیلسین^۴ تقسیم می شوند (Anonymous 1989). از بین همه ترکیبات با ارزش دارویی که در این گیاه وجود دارد سورولین یکی از مهمترین آنها می باشد.

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

فرآیند ساخت سورولین را در گیاه *Ammi majus* L. با بررسی آنزیم های 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 همسانه سازی کرده و در نهایت بیان این ژن را بررسی کردند. علاوه بر این، شناسایی سایر

آنزیم های 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^۵ را که در فرآیند تولید فلاونوئید در گیاه *Ginkgo biloba* نقش اصلی دارد، شناسایی و همسانه سازی کردند. به دلیل اهمیت سورولین چرخه ساخت آن مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته به طوری که در چرخه ساخت این ماده آنزیم های 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 آنزیم های کلیدی موثر در فرآیند تولید سورولین در گیاه *Psorallea corylifolia* کشف نشده است.

هدف از انجام این تحقیق شناسایی، همسانه سازی و توالی یابی ژن رمز کننده آنزیم کلیدی مسئول ساخت سورولین در چرخه تولید این ماده در گیاه *Psorallea corylifolia* می باشد.

مواد و روش ها

بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia* از آزمایشگاه فارماکولوژی واقع در قازی آباد در ایالت اوتارپرادش^۶ هندوستان خریداری شد و در باغ گیاهشناسی دانشگاه دهلی در اسفند ماه ۱۳۸۹ کشت شد. برگهای جوان و توسعه یافته گیاهان کشت شده در شرایط مزرعه جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند.

RNA بوسیله روش تعبیر 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^۷ بر اساس ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتتاز که در گیاه *Ammi magus* توالی یابی شده بود، طراحی شدند (جدول ۱). 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، MgCl₂)، ۱۸

^۱ Isoflavonoids^۲ Furanocoumarins^۳ Psoralen^۴ Angelicin^۵ Phenylalanine ammonia lyase^۶ Attar pradesh^۷ Primer3

جدول ۱- 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

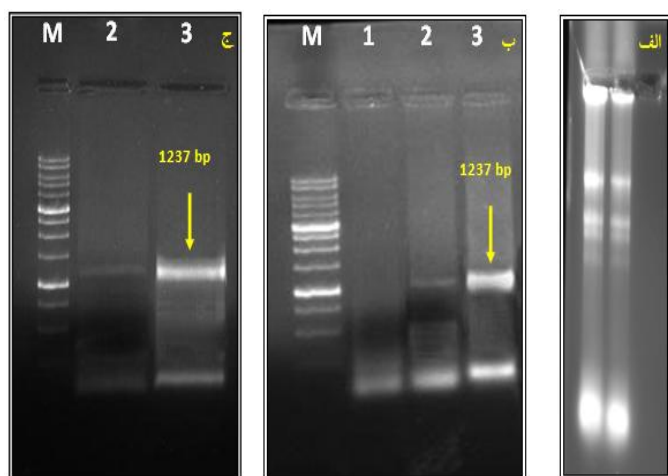
جدول ۲- چرخه دمایی استفاده شده برای سه مرحله (باز شدن، اتصال و بسط) در هر یک از مراحل.

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	۵	۷۲
	تک رشته ای شدن DNA	۲۵	۹۵
۳	اتصال آغازگر به DNA	۲۵	۵۸
	بسط آغازگر	۲۵	۷۲
۳	تکمیل بسط	-	۷۲

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. مجدداً 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

۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پسرو با غلظت ۱۰ μM و ۱۲/۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل اضافه شد که در نهایت حجم محلول واکنش PCR به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس 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 نمونه‌ها با استفاده از ژل آگاروز ۱/۶ تا ۲ درصد (بسته به تعداد مکان‌های 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*



شکل ۱- 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 RBL1-RBF1، 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 RBF₂ و RBR₁ 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 (شکل ۲).

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 تعیین ترتیب نوکلوتیدها به روش Sanger et al. (1977) با استفاده از دستگاه (ABI Prism) DNA sequencer انجام گرفت. نتایج حاصل از این توالی‌یابی 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.

کشت LB^{Amp} ترکیب (20%) IPTG و (2%) X-gal 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 (20%) IPTG و (2%) X-gal پخش شد. محیط کشت باقی‌مانده با سرعت $4000 \times g$ 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 (2%) X-gal 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 همسانه‌های سفید موجود در محیط کشت برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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.

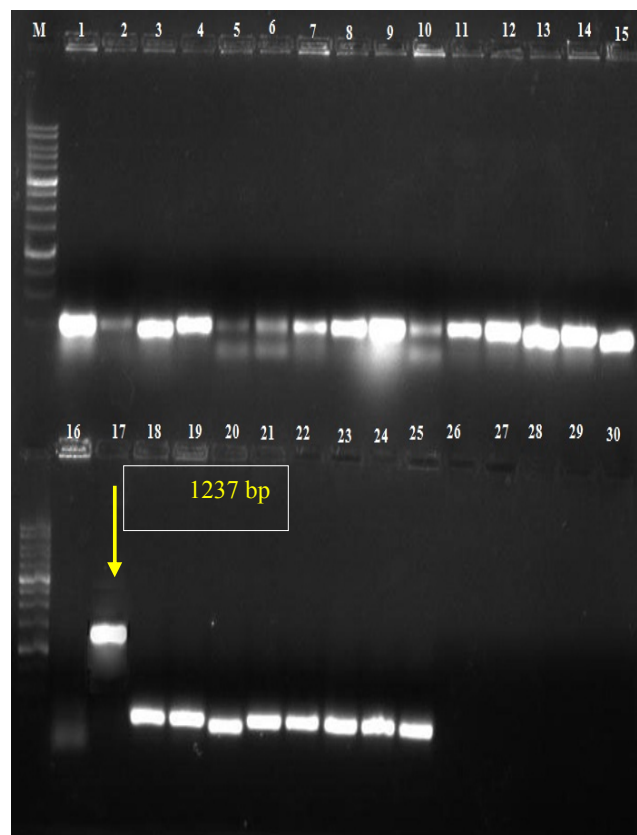
نتایج و بحث

RNA استخراج شده براساس روش تغییر یافته (Salzman et al. 1999) دارای کمیت و کیفیت مناسبی بود (شکل ۱-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 (RBF₁، RBF₂ و RBR₁، RBR₂) پسرو (RBR₁، RBR₂ و RBR₁) استفاده شد. آغازگرهای RBF₂ و RBR₁ ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتاز را شناسایی کردند (شکل ۱-ب و ج). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ژل جداسازی و به دو ناقل p-GEM-T Easy و p-GEM-T 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.

آگاهی از اساس ژنتیکی و شناسایی ژن های موثر در نحوه عمل این آنزیم ها جهت شناخت بیشتر مکانیسم آنها امری ضروری و اجتناب ناپذیر می باشد. ژن رمز کننده آنزیم سورولین سنتتاز به طول ۱۲۳۷ جفت باز و با ۹۳ درصد تشابه با ژن *Psoralea 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 *Psoralea 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 Private 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, Bourgaud F, 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, Fujita T, 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.



شکل ۲- 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 فورانوکومارین های خطی (سورولین) سه آنزیم اصلی به نام های DMAPP- آمبلی فرون دی میتل ترانسفراز، مارماسین سنتتاز (O_2 , cytochrome P450, NADPH) و سورولین سنتتاز (O_2 , 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. پژوهش های زیادی جهت جداسازی آنزیم های کلیدی موثر در چرخه ساخت متابولیت های ثانویه از گونه های خانواده های 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; Xu et al. 2008; Kasajima et al. 2007; Takizawa et al. 2007).

Sambrook J, Fritsch EF, Mianiat 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.

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.