ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۵۲-۳۴۳

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 امیدی[۲]، محمود سلوکی[۳]، نفیسه مهدی نژاد[۴]، هوشنگ علیزاده[۵]

۱،۳و۴- به ترتیب فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشیار و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زابل
۲و۵- به ترتیب استاد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران

Koohzadi F *[1], Omidi M[2], Solouki M[3], Mahdinejad N[4], Alizadeh H[5]

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 بیوسنتز 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 کدون 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 اگروباکتری حاوی سازه 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

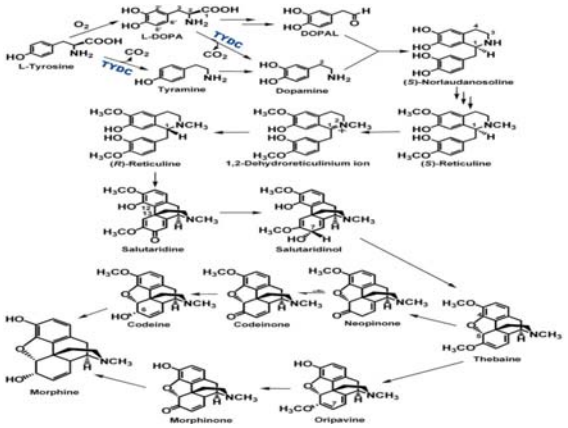
تشدید بیان ژن،
توالی کوزاک،
تیروزین‌دکربوکسیلاز (*TYDC2*)،
خشخاش،
مورفین.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

مقدمه

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 دستورزی 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 نوترکیب می‌باشد. همزمان با پیدایش تکنولوژی DNA نوترکیب 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*[1] 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 شناخته‌شده برای مهندسی متابولیک به شمار می‌آید. بدین ترتیب که با توسعه‌ی ابزارهای ژنومیکس، به خصوص EST[2] ها زمینه مناسبی برای کشف ژن‌های بیوسنتزی *BIAS*[3] فراهم شد و بسیاری از آنزیم‌های دخیل در سنتز مورفین شناخته‌شد و همچنین کتابخانه‌ی cDNA برای این ژن‌ها *ازجمله TYDC، NCS، SOMT، CNMT، CYP80A1، CYP80B1، BBE، TNMT، SAT* و *COR* فراهم گردید. این اطلاعات بر پایه‌ی توالی یابی بیش از ۳۰۰۰۰ cDNA از کتابخانه‌ی کشت سلولی خشخاش که توسط elicitor ها تیمار شدند، حاصل شده‌است (Weid et al. 2004). آلکالوئیدهای گروه مورفین از دو مولکول ال- تیروزین، که توسط آنزیم ال- تیروزین/دوپا دکربوکسیلاز (*TYDC*)[4] به تیرامین و دوپامین تبدیل می‌شود، سنتز می‌شود. تیرامین در مرحله بعد به ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید تبدیل می‌شود. سپس از ترکیب دوپامین با ۴- هیدروکسی فنیل استالدئید اس- نورکوکلورین[5] تولید می‌شود (شکل ۱). اس- نورکوکلورین به عنوان پیش‌ماده عمومی آلکالوئیدها شناخته شده‌است و تعداد زیادی از آلکالوئیدها مانند بنزوفنانتریدین آلکالوئیدها، پروتوپین آلکالوئیدها و بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها از آن منشعب می‌شوند(Bird et al. 2003).



شکل۱- مسیر سنتز مورفین در گیاه خشخاش (Verpoorte and Alfermann 2000).

در مسیری که به سنتز مورفین منتهی می‌شود، اس-نورکوکلورین طی چند واکنش متوالی به اس- نورلادانوزولین[6] و این ترکیب هم بعد از چند مرحله دیگر به اس- رتیکولین[7] 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*[8] به اس- اسکولرین تبدیل شده و بعد از چند واکنش پی در پی دیگر سنگوئینارین[9] که دارای خاصیت آنتی بیوتیکی است، سنتز می‌شود. از طرفی اس-رتیکولین به آر-رتیکولین و سپس به سالوتاریدین تبدیل می‌شود. آنزیم سالوتاریدینول ۷- ا و- استیل ترنسفراز، تبدیل آلکالوئید فنانتریدینی سالوتاریدینول به سالوتاریدینول ۷- ا و- استات را کاتالیز می‌کند که این ترکیب هم در مرحله بعد با از دست دادن گروه استات و تغییر شکل

[1] Scoulerine–o-methyltransferase
[2] Expressed sequence tags
[3] Benzyl-isoquinoline alkaloids
[4] Tyrosine decarboxylase
[5] S-Norcoclaurine
[6] S-Norlaudanosoline
[7] S-Reticuline
[8] Berberine Bridge Enzyme
[9] Sanguinarine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

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 اوریپاوین 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 ۳- ا و- متیل اکسیداز[1] و ۶- ا و- متیل اکسیداز[2] 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[3] 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 شده‌است. 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 مسیرسنتز مورفین را نشان داد و در مقابل، افزایش بیان ژن *BBE* منجربه افزایش ۶-۵ برابری در میزان کل آلکالوئیدهای مسیر سنتزمورفین در کشت های ریشه مویی *E.californic* 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 خانوادهٔ ژنی بزرگی از تیروزین/دوپا دکربوکسیلازها (*TYDCs*) می‌باشد که از حدود ۱۵ عدد ژن تشکیل شده‌است. تا کنون ۸ عدد از این ژن‌ها جداسازی و بر اساس شباهت توالی به دو زیرخانواده‌ی *TYDC1* و *TYDC2* دسته‌بندی شده‌اند. نتایج آزمایشات حاکی از آن بود که هریک از این دو گروه در اندام‌های خاصی بیان می‌شوند. به این ترتیب که خانواده *TYDC1* به مقدار زیاد در ریشه و خانوادهٔ *TYDC2* هم در ریشه و هم در ساقه بیان می‌شوند. اختصاصی بودن بیان این دو خانواده ژنی در این اندام ها نشان می‌دهد که یکی از مکانیزم‌های تنظیمی گیاه در سنتز گروه های 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 نوترکیب حاوی ژن *TYDC2*

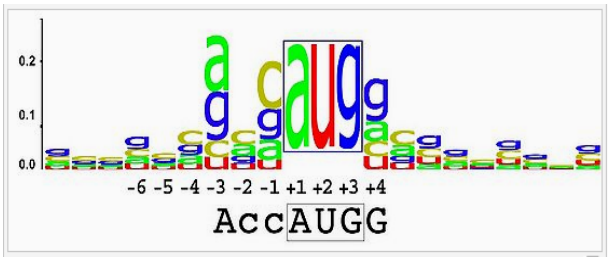
در این تحقیق از گیاه *Papaver* گونه *Somniferum*، باکتری‌های *E. coli* سویه *DH5α*، *Agrobacterium tumefacines* سویه *LBA4404* استفاده شد. DNA گیاه خشخاش به روش CTAB استخراج شد و سپس ژن *TYDC2* توسط PCR با استفاده از آنزیم pfu DNA polymerase وآغازگرهای R_1: 5′ ACTTGCTCCAAGGCTGTGC 3′) و (F_1: 5′ CAGCATTATGGATGACCCG 3′ که توسط نرم افزار Primer3 از روی توالی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسیU08598 طراحی شده‌بود، 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 کلسیم کلراید و شوک حرارتی منتقل شد و در محیط مک کانکی آگار حاوی آنتی

[1] 3-O-methyloxidase
[2] 6-O-methyloxidase
[3] Normorphine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

بیوتیک آمپی سیلین کشت شدند (Sambrook and Russel 2001). کلونی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۱۸۰ rpm به مدت یک شب رشد داده‌شدند. 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_2و 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(شکل۲).



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 گرفته‌شد. 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 *Xba*I در ابتدای این آغازگر در نظر گرفته‌شد. علاوه بر آن کدون خاتمه UAA جایگزین کدون UAG در آغازگر برگشتی R_2: (5′AGAGCTCATTAACTTGAAAAATCTGCTTCAC 3′) شد و سایت برشی *Sac*I در ابتدای این آغازگر قرار داده‌شد. 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 با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I برش خورده بودند، توسط واکنش Ligation به یکدیگر متصل شدند و بدین ترتیب سازه نوترکیب به نام pBI121-TK ساخته‌شد (Sambrook and Russel 2001). پلاسمید دوتایی pBI121 حاوی ژن *GUS* تحت کنترل پیشبر CaMV35S و پایان بر Nos و ژن *npt*II 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[1] به باکتری آگروباکتریوم سویه *LBA4404* انتقال داده‌شد و در نهایت اگروباکتری حاوی سازه نوترکیب در تلقیح گیاه استفاده شد.

تراریختی گیاه خشخاش به روش Agroinfiltration

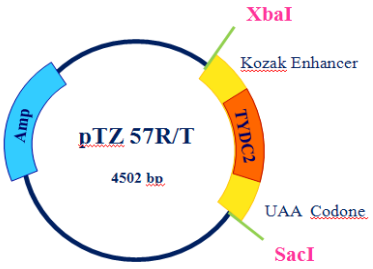
برای بهینه کردن شرایط انتقال ژن به روش Agroinfiltration در گیاه خشخاش، ابتدا از ناقل pBI121 حاوی ژن گزارشگر GUS استفاده شد. بدین ترتیب یک کلونی اگروباکتریوم حاوی ناقل pBI121 در ۱۰ ml LB مایع حاوی ۵۰ mg/l کانامایسین و ۵۰mg/l ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت شبانه داده شد. باکتری‌های رشد یافته توسط سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۵۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه رسوب داده‌شد. 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 ۱۰mM بافر MES) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت مجددا درون انکوباتور در دمای مذکور قرار گرفت. سپس برگهای خشخاش درون آن قرار داده‌شد 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 سانتی‌گراد قرار داده‌شد. 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

[1] Freeze-Thaw

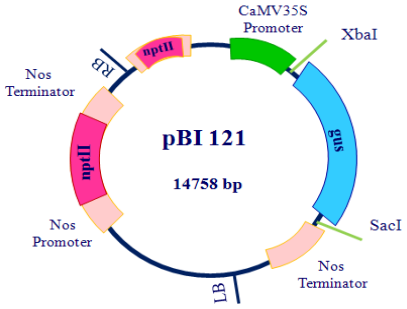
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]



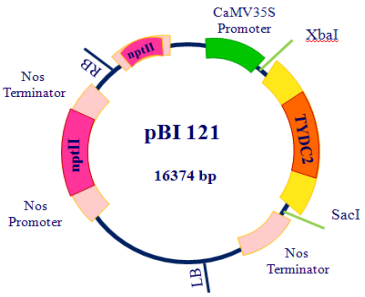
الف) نقشه پلاسمید نوترکیب pGEM-*TYDC2*



ب) نقشه پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-*TYDC2*



ج)نقشه پلاسمید pBI121



د) نقشه پلاسمید نوترکیب pBI121-TK

شکل ۳- تصویر شماتیک مراحل ساخت پلاسمید نوترکیب 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 *Xba*I و *Sac*I در پلاسمید pTZ57R/T درج شد ج و د) پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I به منظور خارج کردن ژن *GUS* برش داده شد سپس ژن $TYDC_2$ حاوی توالی کوزاک در آن درج شد.

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 ۵-۴ مرتبه با اتانول ۷۵درصد شستشو شد. این کار تا حذف کامل کلروفیل و نمایان شدن لکه های آبی ادامه داشت (Kapila et al. 1997). در نهایت گیاهان خشخاش شش هفته ای با آگروباکتری حاوی سازه نوترکیب pBI121-TK مطابق با شرایط بهینه شده در مراحل قبل، تلقیح شدند.

استخراج آلکالوئید و تجزیه HPLC

بعد از گذشت سه روز و به زردی گرائیدن برگ‌ها، نمونه‌های تراریخت و شاهد بطور جداگانه به مدت یک هفته در سایه خشک و آسیاب شد و پس از گذراندن از الک، استخراج آلکالوئید از نمونه‌ها 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 خشخاش را به ارلن ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده و حلال استخراجی، شامل ۵ میلی لیتر آمونیاک۲۵درصد، 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 داشته‌شد. با استفاده از چند قطره محلول آمونیاک pH محلول بین ۱۱-۱۰ تنظیم شد. در این مرحله فاز کلروفرمی در بالن های کوچکتر جمع آوری و فاز آبی مجددا با ۱۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج و جمع آوری شد. برای آبگیری به آن سدیم سولفات انیدرید اضافه شد و سپس بوسیله کاغذ صافی صاف گردید. مجددا با دستگاه روتاری حلال آن کاملا خارج شد و مواد باقی مانده با ۵ میلی لیتر متانول جمع آوری شد. در تجزیه عصاره

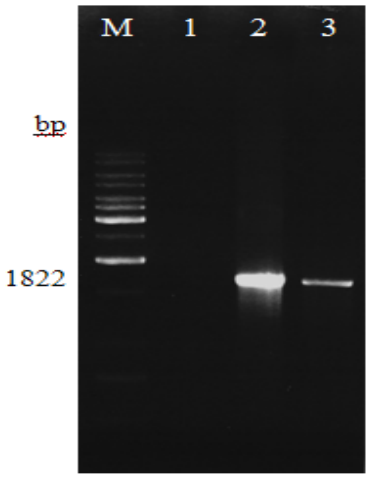
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

ها از دستگاه HPLC[1] 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 دتکتور UV با طول موج ۲۵۴ nm، ستون CN (4.9*250) 5micrometer استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، ابتدا غلظت‌های (mg/ml) ۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۰/۷۵ ، 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 (r_2) 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 عصاره گیری شده، به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آنها ثبت شد.

نتایج و بحث

تایید ساختار

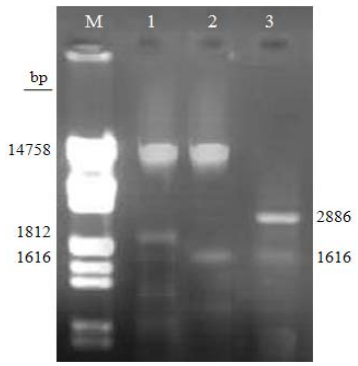
حضور ژن *TYDC2* در پلاسمید pGEM T-Easy Vector، بوسیله برش توسط آنزیم *Eco*RI و تکنیک PCR تایید شد (شکل ۴). کلونی‌هایی که ژن *TYDC2* را دریافت کرده بودند، مطابق انتظار قطعه‌ای به طول ۱۸۲۲ جفت باز در آنها مشاهده شد. بعد از الحاق توالی کوزاک به توالی ژن تیروزین دکربوکسیلاز و همسانه سازی آن در پلاسمید pTZ57R/T استخراج پلاسمید از کلونی-های سفید انجام گرفت و با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I 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 تائید صحت سازه ساخته شده pBI121-TK، این سازه با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I برش داده‌شد 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 همچنین نتایج حاصل از برش آنزیمی، صحت سازه ساخته شده را تایید نمود (شکل ۵ و ۶). به این ترتیب پلاسمید نوترکیب 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 *npt*II (ژن مقاومت به کانامایسین) تحت پیشبر و پایان بر Nos، ساخته‌شد. 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 برگی که این پلاسمید را دریافت کردند به طور جداگانه در محلول X-gluc قرار داده‌شدند. آبی رنگ شدن سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز که در نتیجه بیان ژن GU*S* در نمونه‌هایی که اگروباینفیلتراسیون 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 می رود با استفاده از Agroinfiltration، سازه pBI121-TK به این گیاه انتقال یافته و ژن هدف با موفقیت در ژنوم خشخاش وارد شود.



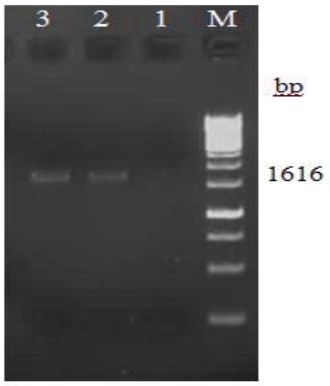
شکل ۴– تایید حضور ژن *TYDC2* در ناقل pGEM T-Easy Vector با استفاده از تکنیک PCR. M) نشانگر وزن مولکولی 1000 bp (Fermentas) ۱) کنترل منفی (واکنش PCR با آب مقطر بدون DNA)، ۲) محصول ناشی از تکثیر ژن *TYDC2* با آغازگرهای R_1,F_1 در ناقل pGEM، ۳) کنترل مثبت (قطعه‌ای که توسط آغازگرهای R_1,F_1 از ژنوم گیاه تکثیر شد.)

[1] High performance liquid chromatography

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

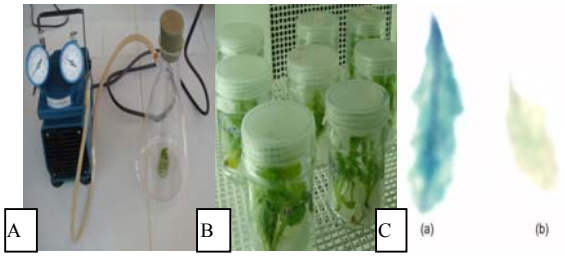


شکل ۵- نتایج برش آنزیمی. M) نشانگر وزن مولکولی Lambda (DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker)، ۱) محصول برش pBI121 با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I به منظور جایگزین کردن ژن *TYDC2* در محل ژن GUS، ۲) محصول برش pBI121-TK با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I به منظور اثبات حضور ژن *TYDC2* حاوی توالی کوزاک، در سازه ساخته شده،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



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 متابولیت-های 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 می-پذیرند، و با حذف یک گروه کربوکسیل از تیروزین و دی هیدروکسی فنیل آلانین (دوپا) آنها را به ترتیب به تیرامین و دوپامین تبدیل می‌کنند 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 پاسخ های 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

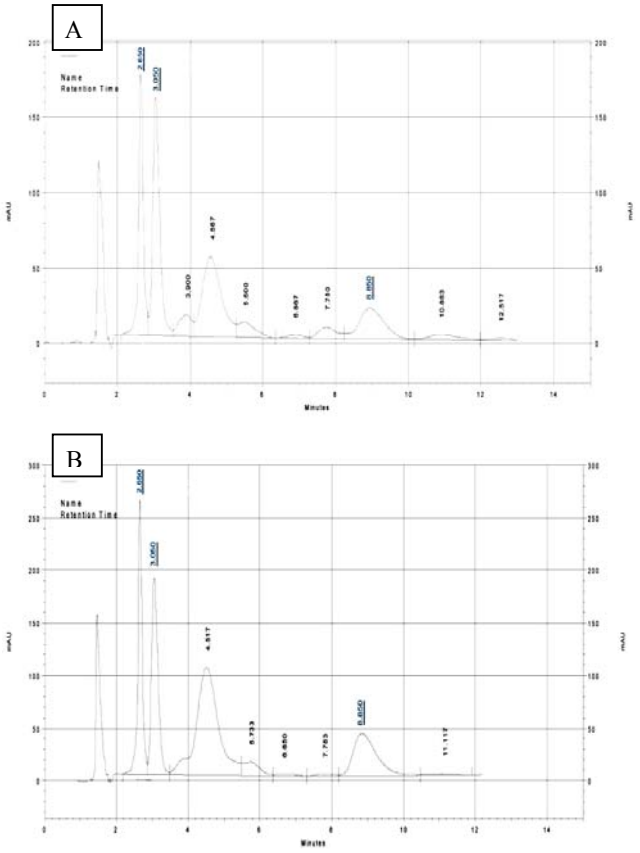
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

مورفین، کدئین و تبائین در مجموع ۷۵/۲ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته‌است (شکل ۹و۸) در حالی که این میزان افزایش در مقایسه با سایر ژن‌هایی که توسط دیگر محققین دستورزی شده‌است از جمله افزایش بیان ژن *BBE* توسط Park et al. (2003) منجر به افزایش ۶- ۵ برابری در میزان کل بنزوفنانترن‌ها در کشت های ریشه مویی *Eschscholiza californic* شد و یا افزایش بیان ژن *CYP80B3* توسط Frik et al. (2007) منجر به افزایش ۴۵۰ درصدی در کل آلکالوئیدهای موجود در لاتکس شد، نسبتا کمتر می‌باشد. ولی این میزان افزایش، نشان دهنده پتانسیل بالای این ژن برای بکار گیری آن جهت افزایش میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین از طریق مهندسی متابولیت‌ها در این گیاه می‌باشد. در مسیر سنتز مورفین از متابوایت اولیه تیروزین، حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی شناخته شده باید طی شود و از طرفی در نقطه انشعابی اس- رتیکولین مسیر سنتز آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین در خشخاش به سه شاخه مجزا منشعب می‌شود و محصولات حاصل از بیان ژن *TYDC2* به سه

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

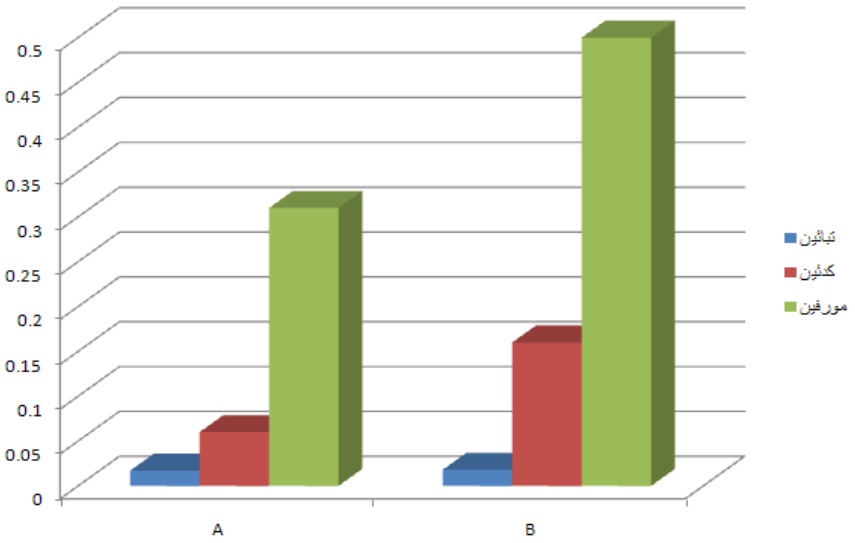
ترکیبات	نمونه شاهد (mg/ml)	نمونه تراریخت (mg/ml)
مورفین	۰/۳۱	۰/۵
کدئین	۰/۰۶	۰/۱۶
تبائین	۰/۰۱۷	۰/۰۱۸
کل	۰/۳۸۷	۰/۶۷۸

مسیر مختلف هدایت شده و به تدریج مقدار آن طی این مسیرهای آنزیمی تعدیل می‌شود. علاوه بر آن، تعداد زیادی مسیر ناشناخته دیگر وجود دارد که تیرامین در ترکیب با دیگر مولکولها موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه ای مانند هیدروکسی سینامیک آمید می‌شود 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 می‌باشد، تعدد مسیرهای متابولیکی موجود باعث می‌شود که سهم کمتری در مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین قرار گیرد. در نتیجه به نظر می رسد این اختلاف، نسبت به افزایش بیان دیگر ژنهای تشدید بیان شده در این مسیر که توسط دیگر محققین انجام شده‌است، از اینجا ناشی می‌شود. با وجود اینکه مورفین و کدئین از همان ابتدای رشد در گیاهچه های کوچک خشخاش سنتز می‌شوند ولی مقدار آن در مقایسه با مرحله گلدهی و تکامل مجاری لاتکس که گیاه پتانسیل بیشتری برای تولید آلکالوئیدهای گروه مورفین دارد، بسیار ناچیز می‌باشد. 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 لائودانوزین می انجامد و پیش ماده های موجود در بالادست سنتز مورفین را به دیگر مسیرها که مد نظر ما نیست هدایت می‌کنند، 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)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]



شکل ۹- مقایسه میزان افزایش آلکالوئیدهای 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 7-0-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 Bidogy 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, rhizigensis, and morphinan alkaloids production in to 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]

Park SU, Johnson AG, Yostand CP, Facchini PJ (1999) Analysis of promoters from tyrosine /dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberinebridge enzyme genes involved benzylisoquinoline 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, 3nd 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, Voigtiander 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.4.5]