جداسازی، همسانه سازی و خاموشی موقت ژن *BBE1* با استفاده از تکنیک خاموشی ژن القا شده توسط ویروس (VIGS) در ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق (*Papaver somniferum* L.)

سید محسن سهرابی، احمد اسماعیلی* و فرهاد نظریان فیروزآبادی

خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۴

چکیده

گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی جهان است و به عنوان تنها منبع تجاری برای تولید مسکن‌های مهم دارویی و مشتقات نیمه سنتزی مانند اکسی کدون و نالترکسون مطرح است. چندین آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولینی دیگر با ویژگی‌های بالقوه دارویی از جمله پاپاورین، نوسکاپین و سانگوینارین نیز توسط این گیاه تولید می‌شود. ژن *BBE1* یکی از ژن‌های کلیدی در بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در گیاه شقایق بوده و اولین مرحله واکنش را در تولید آلکالوئیدهای نوسکاپین و سانگوینارین کاتالیز می‌کند. در این پژوهش، ابتدا توالی کامل کد کننده ژن *BBE1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از گیاه شقایق جداسازی شد. پس از جداسازی ژن مورد نظر، بخشی از آن به عنوان قطعه هدف خاموشی ژن انتخاب و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T همسانه سازی و مورد تعیین توالی قرار گرفت. در مرحله بعد این قطعه خاموشی ژن *BBE1* به ناقل‌های ویروس جغجغه‌ای توتون (pTRV) وارد و سازه‌های مختلف pTRV2-BBE1، pTRV2-Empty حاصل به همراه سازه کمکی pTRV1 بواسطه آگروباکتریوم به برگ‌های گیاهان ۳ تا ۵ برگی تزریق و منتقل شد. نتایج جداسازی، وجود توالی ۱۶۰۸ جفت بازی را برای ژن *BBE1* نشان داد. آنالیز PCR با پرایمرهای ژن CP وجود رونوشت‌های این ژن را در گیاهان تراریخت شده نشان داد. آنالیز Real-time PCR میزان خاموشی و کاهش ۷۳ درصدی رونوشت‌های ژن *BBE1* را در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داد.

واژه های کلیدی: شقایق، خاموشی ژن، ناقل pTRV، واکنش Real-time PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۲۰۰۰۱۲-۰۶۶۱، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

شقایق با نام علمی *Papaver somniferum* L. گیاهی از خانواده *Papavaraceae* است. شقایق یک گیاه یکساله قوی، بدون کرک، سبز رنگ و شیرآبه‌ای است که دارای بوته‌ای کوچک تا ارتفاع ۱۵۰ سانتی متر، به ندرت منشعب با ریشه‌ی قائم است. بنظر می رسد منشاء اصلی این گیاه آسیای صغیر بوده باشد ولی محل دقیق آن مشخص نیست. این گیاه احتمالاً یکی از اولین گیاهانی بوده است که به وسیله انسان در قاره اروپا کشت می شده است (۳و ۸).

شقایق یکی گیاهان دارویی باستانی در جهان بوده و تنها منبع تجاری برای تولید داروهای مسکن طبیعی و نیمه سنتزی است. این گیاه همچنین چندین آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولینی دیگر با ویژگی‌های بالقوه دارویی از جمله پاپاورین باز کننده رگ، داروی ضد سرفه و ضد سرطان بالقوه نوسکاپین و عامل ضد میکروبی سانگوینارین را تولید می‌کند (۵، ۱۵ و ۱۸). گیاه شقایق به عنوان یک سیستم مدل برای بررسی بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل

ایزوکوئینولینی در گیاهان بکار برده می‌شود. مهندسی متابولیک به منظور تغییر در ترکیب و میزان آلکالوئیدها و یا ترکیبی از آنها در شقایق مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد ژنومیکس عملکردی و بیوشیمیایی منجر به تغییرات اخیر در کشف ژن‌های بیوسنتزی دخیل در تشکیل آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در شقایق شده است. در دسترس بودن ابزارهای ژنتیکی بیوشیمیایی گسترده و اطلاعات مربوط به متابولیسم آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی مطالعه دامنه وسیعی از پدیده‌ها از جمله زیست شناسی ساختاری کاتالیزورهای جدید، سازماندهی ژنومی ژن‌های بیوسنتزی، تجمع سلولی و درون سلولی آنزیم‌های بیوسنتزی و انواعی از کاربردهای بیوتکنولوژیکی را تسهیل می‌کند (۴و۱۱و۱۴).

تاکنون از روش‌های مختلف مهندسی ژنتیک برای دستورزی مسیرهای بیوسنتزی آلکالوئیدها در گیاهان دارویی استفاده شده است. خاموشی ژن موقت و دائم و افزایش بیان ژن از جمله تکنیک‌های مورد استفاده برای مهندسی متابولیک در گیاهان دارویی هستند. تکنیک خاموشی ژن القا شده توسط ویروس Virus induced gene silencing (VIGS)، یکی از ابزارهای ژنومیکس عملکردی در شناسایی نقش ژن‌هاست. در این تکنیک از نوعی سیستم دفاع ذاتی گیاهان در برابر ویروس‌ها برای خاموش سازی و کاهش بیان ژن‌های هدف استفاده می‌شود. در این روش از ناقل‌های ویروسی استفاده می‌شود که قادر به انتقال سیستمیک در گیاه بوده و در عین حال با استفاده از آنزیم RNA پلی مراز وابسته به RNA می‌تواند RNA دو رشته‌ای یا dsRNA تولید کند. این dsRNA پس از تولید در سلول باعث راه اندازی مکانیسم دفاعی گیاه شده و بدین ترتیب باعث قطعه قطعه شدن تمام RNA های همولوگ با dsRNA می‌شود. در کاربردهای بیوتکنولوژی و ژنومیکس عملکردی قطعات ۳۰۰-۵۰۰ جفت بازی از توالی کد کننده ژن هدف را در ناقل‌های ویروسی اختصاصی تکنیک VIGS مانند pTRV2 (ویروس جغجغه‌ای توتون) همسانه سازی کرده و همراه با ناقل کمکی pTRV1 به واسطه آگروباکتریوم به گیاه وارد می‌کنند. پس از تکثیر قطعات ویروسی موجود در ناقل‌ها در گیاه و تولید dsRNA از ژن هدف، ساز و کار دفاعی گیاه (یا فرآیند خاموشی ژن پس از ترجمه) فعال شده و پس از تولید قطعات siRNA از dsRNA ژن هدف، باعث خاموشی بخش عمده‌ای از رونوشت‌های مربوط به آن ژن می‌شود (۱۳و۱۶).

گروهی از محققین در سال ۲۰۰۵ تکنیک VIGS مبتنی بر ناقل‌های TRV را برای خاموشی ژن فایتوئن دساچوراز (*PDS*) در دو گیاه شقایق و شقایق کالیفرنیایی بهینه سازی کردند. نتایج نشان داد که تکنیک VIGS مبتنی بر ناقل‌های TRV هیچ اثر مضری بر ساختار گیاه نداشته و از طرفی باعث خاموشی و کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد رونوشت‌های ژن هدف می‌شود (۱۰).

مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی با ترکیب دو اسید آمینه تیروزین شروع شده و طی چند مرحله تغییر آنزیمی منجر به تولید آلکالوئید واسطی مانند S- کوکلارین می‌شود. آلکالوئید S-کوکلارین با چند تغییر آنزیمی به آلکالوئید دارویی پاپاورین تبدیل شده و با چند تغییر آنزیمی متفاوت در شاخه‌ای دیگر از مسیر، S-رتیکولین را تولید می‌کند. آلکالوئید S-رتیکولین پیش ساز مهم بسیاری از آلکالوئیدهای مهم بنزیل ایزوکوئینولینی است و با تغییرات متفاوت آنزیمی در شاخه‌های مختلف مسیر این آلکالوئیدها را تولید می‌کند. آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی متعلق به تعداد نسبتاً محدودی از خانواده‌های پروتئینی، از جمله سیتوکروم‌های P450، O و N متیل ترانسفرازهای وابسته به S-آدنوزیل متیونین، دهیدروژناز-ردوکتازهای وابسته به NADPH، اکسیدو ردوکتازهای وابسته به FAD و تعدادی از O-استیل ترانسفرازهای وابسته به استیل کوآنزیم A، دی اکسیژنازهای وابسته به آهن-اکسوگلوتارات و کربوکسیل

استرازها هستند. ژن *BBE1* عضوی از خانواده اکسیدازهای وابسته به FAD است که در فرآیندهای مختلف سلولی دخیل بوده و یکی از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در گیاه شقایق است (۶و۱۷). با توجه به نقش مهم مواد مؤثره گیاه شقایق در صنایع داروسازی، در این پژوهش توالی کد کننده کامل ژن *BBE1* به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی جداسازی شد و نقش آن در بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی از طریق خاموشی به وسیله‌ی تکنیک VIGS مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت گیاهان، استخراج RNA و سنتز cDNA : بذور ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق از سازمان جنگل‌ها و مراتع دریافت شد. بذور در گلدان‌هایی با ترکیب ۶۰:۴۰ رس و کود حیوانی کشت شدند و لایه‌ای نازک از کود الک شده روی آن‌ها قرار گرفت. گلدان‌ها پس از کشت در گلخانه با شرایط دمایی ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و هفته‌ای یکبار با کود کامل تغذیه شدند. گیاهان ۳-۵ برگی برای استخراج RNA، همسانه سازی ژن و خاموشی موقت مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج RNA کل از بافت‌ها با استفاده از کیت سیناکلون (RNA-Cinna Pure)، طبق روش شرکت سازنده انجام شد. به منظور حذف آلودگی‌های DNA ژنومی از آنزیم *DNase* I استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) تعیین شد. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

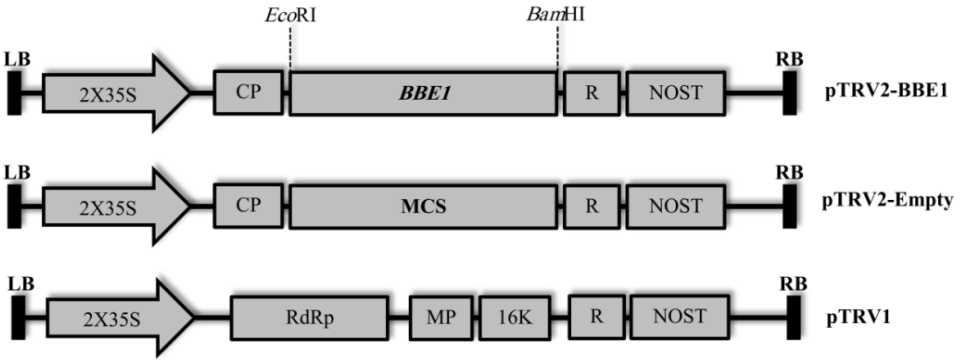
همسانه سازی و تعیین توالی ژن *BBE1* : توالی ژن *BBE1* گیاه شقایق با شماره دسترسی AF025430.1 از بانک ژن پایگاه NCBI دریافت شد. توالی دریافت شده برای تأیید بیشتر علیه تمام EST های موجود گیاه شقایق مورد همردیفی قرار گرفت. توالی‌های EST حاصل از همردیفی که دارای شباهت بیشتر از ۹۵ درصد بودند انتخاب و سرهم بندی شدند. کانتیگ بدست آمده از سر هم بندی، حاوی ORF کامل ژن *BBE1* بود و به منظور طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI 10.3 و Allele ID 7.0 یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). آغازگرهای مورد نظر برای تکثیر توالی ORF کامل ژن *BBE1* طراحی شدند. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Pfu* با برنامه دمایی، واسرشتگی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی گراد و گسترش ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد طی ۳۵ چرخه انجام شد. همچنین واسرشتگی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی ۲۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش، با استفاده از آنزیم *Taq* به انتهای محصولات واکنش نوکلئوتید A اضافه شد. در واکنش PCR از cDNA بعنوان الگو استفاده شد. پس از بررسی نتایج واکنش PCR روی ژل آگاروز یک درصد و تأیید اندازه، قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی و خالص سازی شدند. پس از خالص سازی قطعات، واکنش اتصال بین این قطعات و پلاسمید pTZ57R/T توسط آنزیم DNA لیگاز T4 انجام شد سپس پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از روش الکتروپوریشن و همچنین کیت همسانه سازی به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند. پس از انتخاب کلنی‌های سفید روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و IPTG و X-Gal با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و کشت آنها در محیط LB مایع، واکنش کلنی PCR به منظور تأیید اولیه با استفاده از ترکیب آغازگرها انجام شد. استخراج پلاسمید از کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت شرکت Thermo Fisher

Scientific طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت و هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI انجام شد. پس از تأیید توسط هضم آنزیمی، پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعات ORF کامل ژن *BBE1* برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند.

طراحی و ساخت سازه خاموشی ژن *BBE1* : پس از تجزیه و تحلیل نتایج توالی یابی، توالی ORF کامل ژن *BBE1* برای طراحی سازه خاموشی مورد استفاده قرار گرفت. برای انتخاب قطعه مناسب برای خاموشی در ژن *BBE1*، توالی نوکلئوتیدی ORF این ژن به قطعات ۳۰۰ نوکلئوتیدی تقسیم بندی و با استفاده از ابزار siRNA Scan یا RNAi Scan مورد بررسی قرار گرفت (۱۹) . جستجوی siRNA های تولیدی احتمالی در این سایت با پارامترهای طول ۲۱ نوکلئوتیدی، میزان GC بین ۳۰-۶۰ درصد، وجود نوکلئوتیدهای AU در '۵ و نوکلئوتیدهای GC در '۳ (کمتر بودن Tm انتهای '۵ از Tm انتهای '۳)، عدم وجود تکرارهای ۳ یا بیشتر از نوکلئوتیدهای GC و عدم وجود تکرارهای ۴ یا بیشتر از نوکلئوتیدهای AT صورت گرفت. پس از انتخاب قطعه‌ی با بیشترین میزان تولید siRNA، با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI 10.3 و Allele ID 7.0 یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر این ناحیه طراحی شد (جدول ۱). واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Pfu* با برنامه دمایی، واسرشتگی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی گراد و گسترش ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد طی ۳۵ چرخه انجام شد. همچنین واسرشتگی اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی ۲۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش، با استفاده از آنزیم *Taq* به انتهای محصولات واکنش نوکلئوتید A اضافه شد. در واکنش PCR از پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعات ORF کامل ژن *BBE1* بعنوان الگو استفاده شد. پس از بررسی نتایج واکنش PCR روی ژل آگاروز یک درصد و تأیید اندازه، قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج از ژل طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی و خالص سازی شدند و در پلاسمید pTZ57R/T همسانه سازی شدند. پس از تعیین توالی و آنالیزهای اولیه، پلاسمیدهای pTZ57R/T نوترکیب حاوی قطعه انتخاب شده برای خاموشی و پلاسمید اختصاصی خاموشی القا شده بوسیله‌ی ویروس (pTRV2) با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. قطعات خاموشی حاصل از هضم پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T به پلاسمید pTRV2 وارد شدند و پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از روش الکتروپوریشن و همچنین کیت همسانه‌سازی به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند. پس از تأیید همسانه سازی توسط کلنی PCR و هضم آنزیمی سازه خاموشی نهایی pTRV2-BBE1 نامگذاری شد (شکل ۱). سازه‌های خاموشی pTRV2-BBE1 و pTRV2-Empty (به عنوان شاهد) و همچنین پلاسمید کمکی pTRV1 به صورت جداگانه با استفاده از روش الکتروپوراسیون به آگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل شدند و پس از تأیید با کلنی PCR و هضم آنزیمی برای آزمایش خاموشی مورد استفاده قرار گرفتند. ورود پلاسمیدهای pTRV2-BBE1، pTRV2-Empty با کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *BBE1* و ژن *CP* صورت گرفت و پس از آن تأیید نهایی با هضم آنزیمی انجام شد. ورود پلاسمید کمکی pTRV1 با کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *RdRp* صورت گرفت (جدول ۱).

آزمایش خاموشی القا شده توسط ویروس: آزمایش خاموشی القا شده توسط ویروس با استفاده از روش ارائه شده توسط هیلمن و همکاران انجام شد (۱۰). از کشت شب مانده آگروباکتریوم حاوی سازه‌های pTRV2-BBE1 و pTRV2-Empty و همچنین پلاسمید کمکی pTRV1 به طور جداگانه برای تلقیح ۲۰۰ میلی لیتر از محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، ۵۰ میلی‌گرم در

لیتر ریفامپیسین، ۲۰ میکرومولار استوسیرینگون و ۱۰ میلی مولار MES استفاده شد.



شکل ۱- سازه‌های مختلف pTRV2-BBE1، pTRV2-Empty و pTRV1. در این شکل 2X35S: پروموتر دو برابر ویروس موزایک کلم، CP: پوشش پروتئینی ویروس، R: ریبوزیم خود برشی، NOST: خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز، MCS: جایگاه همسانه سازی چندگانه، RdRp: آنزیم RNA پلی مراز وابسته به RNA، MP: پروتئین حرکتی ویروس، 16K: پروتئین ۱۶ کیلودالتونی، RB: مرز راست T-DNA و LB: مرز چپ T-DNA هستند.

کشت‌های مایع تا رسیدن جذب نوری ۶۰۰ نانومتر به میزان ۰/۵ در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در شیکر با دور ۱۸۰ نگهداری شدند. سپس کشت‌ها در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از حذف محیط رویی، رسوب باکتری‌ها در بافر تلقیح حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون و ۱۰ میلی مولار MES تا رسیدن جذب نوری ۶۰۰ نانومتر به میزان ۲ حل شد. کشت‌های حاوی هر کدام از سازه‌های pTRV2-BBE1 و pTRV2-Empty به نسبت ۱:۱ با کشت حاوی پلاسمید کمکی pTRV1 مخلوط و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هر کدام از کشت‌های مخلوط pTRV2-BBE1 : pTRV1 و pTRV2- Empty : pTRV1 با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتری به سطح پشتی برگ‌های ۲۰ گیاه ۳-۵ برگی مستقل تزریق شدند. در نهایت گیاهان پس از تزریق در شرایط گلخانه نگهداری شدند و بعد از ظهور جوانه گل و قبل از باز شدن و ظهور پرچم‌ها نمونه برداری از برگ‌های بالایی صورت گرفت و نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند.

آنالیز Real time PCR : پس از نمونه برداری از گیاهان تزریق شده، RNA کل از بافت‌های برگ استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA کل استخراج شده از گیاهان توسط الکتروفورز در ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر صورت گرفت و پس از هم غلظت سازی از روی آن cDNA ساخته شد. تأیید صحت cDNA ساخته شده با استفاده از PCR با پرایمرهای ژن کنترل داخلی *EF1* صورت گرفت (جدول ۱). به منظور تأیید تراریختی و وجود قطعات ویروسی در گیاه از واکنش PCR همراه با پرایمرهای اختصاصی پوشش پروتئینی ویروس (CP) بر روی cDNA ساخته شده از گیاهان استفاده شد (جدول ۱). گیاهان با نتیجه PCR مثبت که دارای قطعات ویروسی بودند، برای مراحل بعدی آنالیز انتخاب شدند. به منظور تعیین میزان بیان نسبی ژن‌های هدف در گیاهان CP مثبت از PCR کمی استفاده شد. پنج گیاه از بین گیاهان CP مثبت برای واکنش PCR کمی انتخاب شد و PCR کمی روی هر گیاه نیز دو بار تکرار شد. هر واکنش PCR کمی در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل مخلوط سایبرگرین، cDNA بعنوان الگو، پرایمرهای اختصاصی ژن *BBE1* و یا ژن کنترل داخلی *EF1* و آب بود. برای ژن *BBE1* واکنش با ۲ دقیقه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه آغاز و سپس در ۴۰ چرخه متوالی ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ ثانیه در ۵۲/۴ درجه سانتی گراد و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد اعمال شد. برای ژن کنترل داخلی *EF1* نیز همین برنامه دمایی تنها با تغییر دمای اتصال به ۵۳/۱ درجه

سانتی گراد بکار برده شد. همزمان با هر واکنش، استانداردهایی برای تعیین محدوده دینامیکی واکنش و تعیین بازده واکنش بکار برده شدند. در نهایت داده‌های حاصل با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ کمی سازی شدند (۱۲).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق.

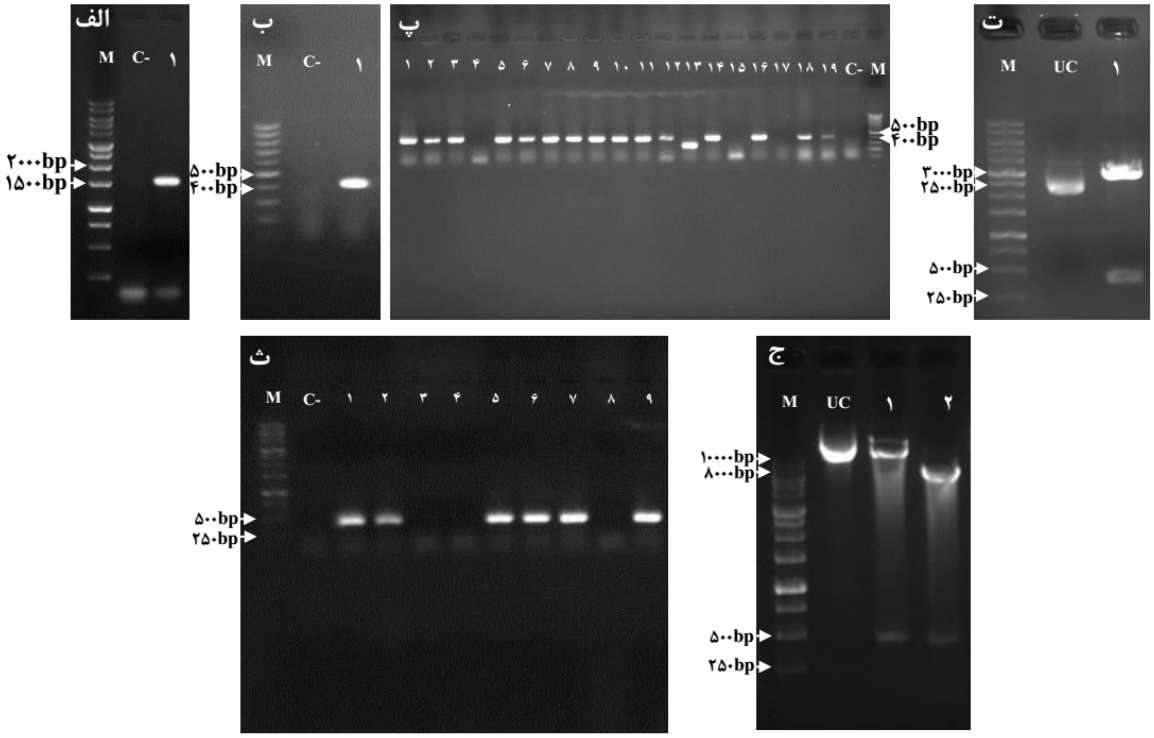
نام پرایمر	توالی پرایمر	کاربرد	اندازه قطعه تکثیری bp	دمای اتصال °C
BBE1-F	5'-CAATGATGTGCAGAAGCTTAACA-3'	جداسازی ژن	۱۶۱۸	۵۰
BBE1-R	5'-ACCTAGTACTACAATTCCTTCAACATG-3'			۵۰
BBE1-Si-F	5'-CCATCTCTGAACTAAACAACAGG-3'	تکثیر سازه خاموشی	۳۹۲	۵۰
BBE1-Si-R	5'-TCTCCAATCTATCCCTCCAATA-3'			۵۰
CP-F	5'-CGGGCTAACAGTGCTCTTG-3'	تأیید وجود CP درگیاه	۱۳۴	۵۵
CP-R	5'-CTCCCTTGGTTCGTCGTAAC-3'			۵۵
RdRp-F	5'-CTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC-3'	تأیید همسانه سازی	۹۳۶	۵۵
RdRp-R	5'-GTAAAATCATTGATAACAACACA-3'			۵۵
EF1-F	5'-CGATAGGCGATCTGGAAAGG-3'	کنترل داخلی	۱۲۴	۵۳/۱
EF1-R	5'-AGGTGGATACTGAGCGAAGG-3'			۵۳/۱
BBE1-RT-F	5'-CGCTTCATCTTTACTTCACAAATG-3'	بررسی بیان	۱۲۹	۵۲/۴
BBE1-RT-R	5'-CGTCCCAAGTGTAAGCCTAAG-3'			۵۲/۴

F: Forward, R: Reverse

نتایج و بحث

واکنش PCR برای تکثیر توالی کامل ژن *BBE1* تکثیر قطعه‌ای در حدود ۱۶۰۰ جفت باز را نشان داد. نتایج کلنی PCR و هضم آنزیمی نیز وجود قطعه‌ای به همین طول را اثبات کرد (شکل ۲). برای اطمینان بیشتر دو کلونی برای تعیین توالی فرستاده شد و کانتیگ حاصل از سر هم بندی نتایج توالی یابی با استفاده از ابزار BLASTn موجود در پایگاه NCBI علیه بانک ژن مورد همردیفی قرار گرفت. توالی جداسازی شده با ۱۰۰ درصد همسانی به ژن *BBE1* گیاه شقایق (*Papaver somniferum*)، ۸۰ درصد همسانی به ژن *BBE1* گیاه شقایق مکزیکی (*Argemone mexicana*)، با ۹۳ درصد همسانی به گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*)، با ۷۶ درصد همسانی به گیاه شقایق کالیفرنیایی (*Eschscholzia californica*)، با ۶۸ درصد همسانی به گیاهان زرشک (*Berberis stolonifera*) و تالیکتروم زرد (*Thalictrum flavum*) و با ۶۷ درصد همسانی به گیاه زرین ریسمان ژاپنی (*Coptis japonica*) شباهت داشت.

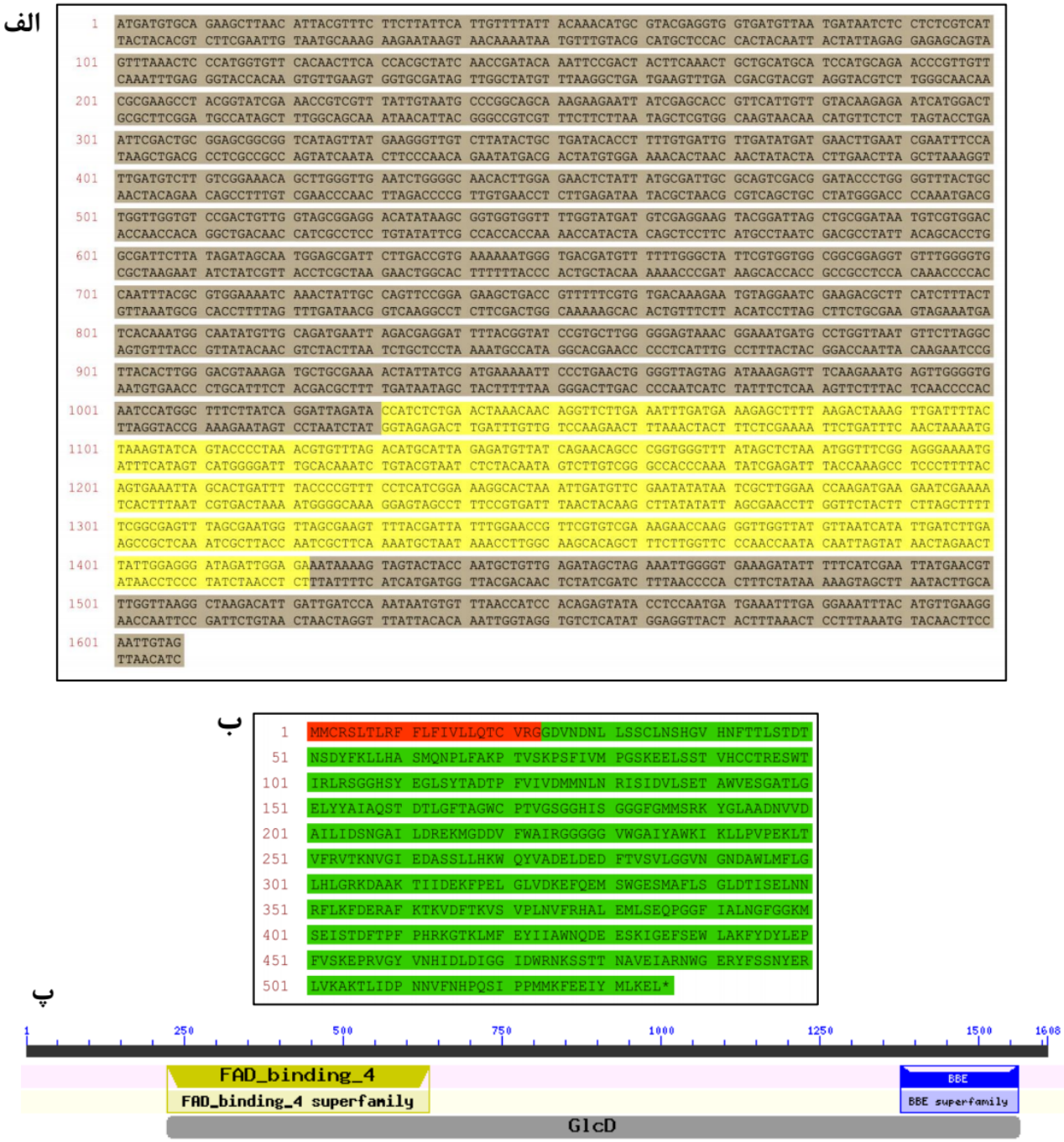
نتایج تعیین توالی ژن *BBE1* همچنین نشان داد که طول ORF کامل این ژن ۱۶۰۸ جفت باز بوده که با کدون ATG شروع و با کدون TAG خاتمه پیدا می‌کند. توالی ORF کامل ژن *BBE1* یک پروتئین به طول ۵۳۵ اسید آمینه را کد می‌کند که دارای سه دمین (دامنه) عملکردی FAD binding، Berberine و FAD/FMN-containing dehydrogenase است. وجود این دمین‌های عملکردی نشان دهنده صحت جداسازی ژن *BBE1* است زیرا این ژن عضوی از خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته به FAD است و وجود این دمین‌های عملکردی در این خانواده ضروری است. این پروتئین دارای سیگنال پپتیدی با طول ۲۳ اسید آمینه بوده و در کلروپلاست و شبکه آندوپلاسمی تجمع پیدا می‌کند (شکل ۳).



شکل ۲- مراحل مختلف جداسازی ژن *BBE1* و ساخت سازه خاموشی. الف- تکثیر توالی کامل ژن *BBE1*، M: نشانگر اندازه 1Kb، -C: کنترل منفی، ۱: توالی کامل ژن *BBE1* با طول ۱۶۱۸ جفت باز؛ ب- تکثیر قطعه خاموشی ژن *BBE1*،M: نشانگر اندازه 100bp، -C: کنترل منفی، ۱: توالی قطعه ژن *BBE1* با طول ۳۹۲ جفت باز؛ پ- کلنی PCR قطعه خاموشی در پلاسمید pTZ57R/T، ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۱۹: کلنی‌های مثبت با طول ۳۹۲ جفت باز، ۴، ۱۳، ۱۵ و ۱۷: کلنی‌های منفی، -C: کنترل منفی، M: نشانگر اندازه 100bp؛ ت- هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعه خاموشی، M: نشانگر اندازه 1Kb، UC: پلاسمید pTZ57R/T برش نخورده، ۱: پلاسمید pTZ57R/T برش خورده با قطعه خاموشی خارج شده با طول ۳۹۲ جفت باز؛ ث- کلنی PCR قطعه خاموشی در پلاسمید pTRV2، M: نشانگر اندازه 1Kb، -C: کنترل منفی، ۱، ۲، ۵، ۶، ۷ و ۹: کلنی‌های مثبت با طول ۳۹۲ جفت باز، ۳، ۴ و ۸: کلنی‌های منفی؛ ج- هضم آنزیمی پلاسمید pTRV2 حاوی قطعه خاموشی، M: نشانگر اندازه 1Kb، UC: پلاسمید pTRV2 برش نخورده، ۱ و۲: پلاسمیدهای pTRV2 برش خورده با قطعات خاموشی خارج شده با طول ۳۹۲ جفت باز.

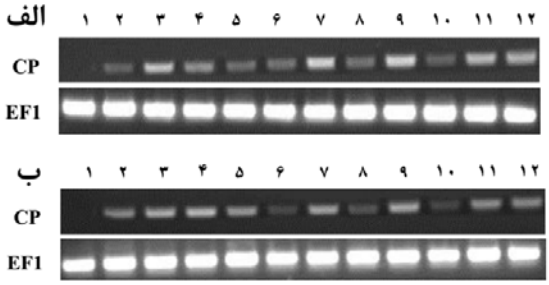
با توجه به صحت توالی جداسازی شده کامل ژن *BBE1*، از این توالی برای ساخت سازه خاموشی استفاده شد. نتایج آنالیز توالی کامل ژن *BBE1* با استفاده از ابزار siRNA Scan نشان داد که ناحیه ۱۱۰۰ تا ۱۴۰۰ جفت باز از ORF کامل ژن *BBE1* با تولید بیش از ۴۰ مورد siRNA بهترین ناحیه برای طراحی سازه خاموشی است. نتایج تکثیر، همسانه سازی، تعیین توالی و آنالیز این قطعه انتخاب شده نشان داد که این توالی به علت استفاده از آنزیم *Pfu* دچار هیچ تغییری نشده و کاملاً مشابه با توالی کامل ژن *BBE1* بود. برای تولید قطعات siRNA در سلول باید dsRNA (یا RNA دو رشته‌ای) موجود باشد که تولید مصنوعی dsRNA با روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد که یکی از این روش‌ها استفاده از سیستم مبتنی بر پلاسمیدهای ویروس جغجغه‌ای توتون یا TRV است. در این سیستم از دو پلاسمید pTRV1 و pTRV2 به طور همزمان استفاده می‌شود. پلاسمید pTRV2 در ناحیه T-DNA دارای پروموتر 35S دو برابر ویروس موزاییک کلم، ژن پوشش پروتئینی ویروس، ریبوزیم خود برشی و خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز است. همچنین پلاسمید pTRV1 در ناحیه T-DNA دارای پروموتر 35S دو برابر ویروس موزاییک

کلم، RNA پلی مراز وابسته به RNA، پروتئین حرکتی ویروس، پروتئین ۱۶ کیلودالتونی، ریبوزیم خود برشی و خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز است (شکل ۱).



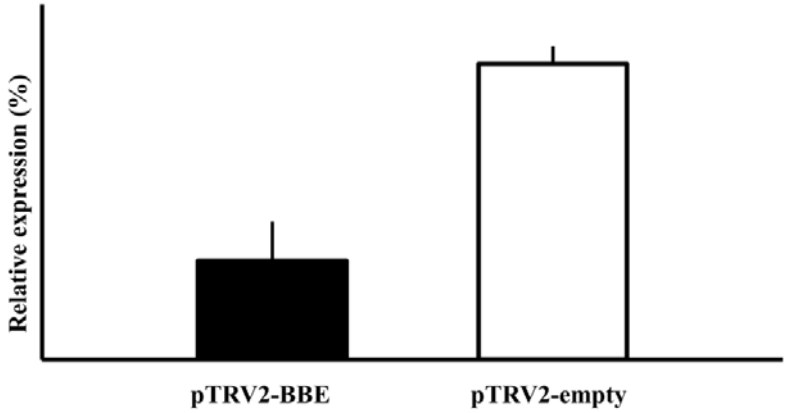
شکل ۳- توالی ژنی، توالی پروتئینی و دمین‌های عملکردی ژن *BBE1*. الف- توالی ORF کامل ژن *BBE1* که در آن ناحیه انتخاب شده برای خاموشی با رنگ زرد مشخص شده است. ب- توالی پروتئینی ژن *BBE1* که در آن سیگنال پپتید با رنگ قرمز مشخص شده است. پ- دمین‌های عملکردی موجود در ژن *BBE1*.

ناحیه انتخاب شده برای خاموشی، با استفاده از دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI از پلاسمید pTZ57R/T برش خورده و در پلاسمید pTRV2 همسانه سازی شد. نتایج کلونی PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت همسانه سازی را نشان داد (شکل ۲). سازه‌های pTRV1، pTRV2-BBE1 و pTRV2-Empty پس از انتقال به آگروباکتریوم به گیاهان تزریق شدند و گیاهان تزریق شده در مدت نگهداری هیچ تغییر مورفولوژیکی نسبت به گیاهان عادی بدون تزریق پیدا نکردند. پس از گذشت مدت زمان معین (سه ماه) از تمام گیاهان تزریق شده استخراج RNA صورت گرفت و رشته اول cDNA ساخته شد. نتایج غربال‌گری برای وجود CP در گیاهان تزریق شده نشان داد که از ۲۰ گیاه تزریق شده با سازه pTRV2-BBE1 تعداد ۱۵ گیاه و از ۲۰ گیاه تزریق شده با سازه pTRV2-Empty تعداد ۱۳ گیاه تراریخت بود و رونوشت‌های ژن CP را نشان دادند. میزان تراریختی در گیاهان تزریق شده با سازه‌های pTRV2-BBE1 و pTRV2-Empty به ترتیب ۷۵ و ۶۵ درصد بود. گیاهان عادی بدون تزریق هیچ اثری از رونوشت‌های ژن CP نشان ندادند. در شکل ۴ تنها ۱۱ گیاه تراریخت تزریق شده مثبت و یک گیاه عادی بدون تزریق نشان داده شده‌اند. از گیاهان با نتیجه CP مثبت، ۵ گیاه برای PCR کمی انتخاب شدند (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج PCR برای تأیید وجود رونوشت‌های ژن CP همراه با ژن کنترل داخلی *EF1* برای تأیید ساخت cDNA در گیاهان تراریخت بدست آمده. الف- نتایج تکثیر برای سازه pTRV2-Empty، ۱: گیاه عادی بدون تزریق، ۲ تا ۱۲: گیاهان تراریخت؛ ب- نتایج تکثیر برای سازه pTRV2-BBE، ۱: گیاه عادی بدون تزریق، ۲ تا ۱۲: گیاهان تراریخت (تزریق شده).

نتایج واکنش PCR در زمان واقعی برای گیاهان تراریخت بدست آمده برای سازه‌های pTRV2-Empty و pTRV2-BBE در شکل ۵ آمده است. این نتایج نشان داد که میزان خاموشی و کاهش رونوشت‌های ژن *BBE1* نسبت به شاهد حدود ۷۳ درصد است (شکل ۵). انتظار می‌رود این میزان کاهش بیان ژن باعث کاهش تولید آنزیم *BBE1* شده و محصول تولیدی این آنزیم را در گیاه کاهش دهد.



شکل ۵- مقایسه بیان نسبی ژن *BBE1* در گیاهان تزریق شده با سازه خاموشی pTRV2-BBE و گیاهان شاهد (تزریق شده با سازه pTRV2-Empty). خطوط روی ستون هیستوگرام‌ها نشان دهنده خطای معیار میانگین است.

آنزیم *BBE1* یک فلاووپروتئین از خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته به FAD است. این آنزیم از FAD به عنوان کوفاکتور برای کاتالیز استفاده می‌کند. این آنزیم مانند تمام اعضاء خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته

به FAD از ژن‌های پایه‌ای حیات بوده که در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء و تولید انرژی دخیل است. این آنزیم به علت داشتن دمین عملکردی Berberine Bridge در چرخه تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی نقش دارد. در گیاه شقایق این آنزیم با تبدیل S-رتیکولین به S-اسکولرین نقش مهمی در تولید آلکالوئیدهای سانگوینارین و نوسکاپین بازی می‌کند (۶و۷ و۹) . به علت نقشی که این نوع آنزیم‌ها در حیات پایه‌ای موجودات بازی می‌کنند، ژن‌هایی با میزان محافظت شدگی بالا هستند. آنزیم *BBE1* با تجمع در دو مکان متفاوت دو نقش متفاوت را انجام می‌دهد. با تجمع در کلروپلاست در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا شرکت کرده و پس از تجمع در شبکه آندوپلاسمی در بیوسنتز آلکالوئیدها ایفای نقش می‌کند (۴و ۶) . آلکالوئید S-رتیکولین پیش ساز اصلی آلکالوئیدهای مورفینان مهمی مانند تبائین، کدئین و مورفین است و آنزیم *BBE1* با تبدیل آن به آلکالوئید S-اسکولرین، کانال متابولیکی را به سمت آلکالوئیدهای مهم دیگری مانند سانگوینارین و نوسکاپین تغییر می‌دهد. با خاموشی ژن این آنزیم می‌توان کانال متابولیکی را به سمت آلکالوئیدهای مورفینان تغییر داد و تقویت کرد.

تکنیک‌های خاموشی ژن مبتنی بر همولوژی از جمله روش VIGS، ابزار کارآمد برای مطالعات عملکرد ژنی مطرح هستند. در این بین خاموشی ژن القا شده بوسیله‌ی ویروس VIGS بعلت سهولت، سرعت و میزان خاموشی بالا در هر دوی مطالعات ژنتیک معکوس و ژنتیک رو به جلو برای شناسایی ژن‌های گیاهی دخیل در فرآیندهای گیاهی مختلف، استفاده می‌شود (۱۶). با استفاده از این تکنیک می‌توان نقش‌های احتمالی یک ژن خاص را در مسیر متابولیکی یا در تولید متابولیتی خاص در گیاه به صورت موقت بررسی و در مورد آن تصمیم گیری کرد. این تکنیک باعث خاموشی و کاهش تمام رونوشت‌های یک ژن نمی‌شود و همواره مقادیری از رونوشت‌های آن ژن فعال باقی خواهند ماند. همچنین این تکنیک بسته به ژن هدف، ساختار خاموشی انتخاب شده و عمل ساختار خاموشی، میزان متفاوتی از خاموشی را در گیاهان مختلف ایجاد خواهد کرد (۱ و ۲). با این وجود، این تکنیک نیاز به تولید گیاهان تراریخت برای مطالعات ژنی را که کاری زمان بر و پرهزینه بوده کاهش داده و در مدت زمان بسیار کمی نتایج قابل توجهی را برای محققین ایجاد می‌کند. بسیاری از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی مهم از نظر دارویی دارای یک یا بیشتر مرکز کایرال هستند که مانع سنتز شیمیایی برای تولید تجاری می‌شوند و تولید آن‌ها هنوز هم وابسته به گیاه است (۴). گیاهان خانواده شقایق طیف وسیعی از این آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی را تولید می‌کنند که با بهره گیری از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک مانند خاموشی ژن و افزایش بیان ژن می‌توان میزان آلکالوئیدهای مورد نظر را دستورزی کرده و افزایش یا کاهش داد. امروزه درخواست صنعت داروسازی برای مواد مؤثره گیاهی به شدت رو به افزایش است و روش‌های سنتی تولید این مواد جوابگوی حجم بالای تقاضا نیست. تنها راه پاسخ به حجم گسترده تقاضا استفاده از تکنیک‌های نوین بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک است. با استفاده از این روشها می‌توان ژن‌های کلیدی در تولید مواد مؤثره را شناسایی و با توجه به هدف مورد نظر دستورزی کرد.

ژن *BBE1* یکی از ژن‌های مهم در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در گیاه شقایق است. با توجه به اینکه این ژن S-رتیکولین را که پیش ساز آلکالوئیدهای مورفینان است به S-اسکولرین تبدیل می‌کند، لذا با خاموشی ژن *BBE1* می‌توان از مصرف S-رتیکولین توسط این آنزیم جلوگیری کرد و مقدار اضافی S-رتیکولین را به سمت تولید آلکالوئیدهایی مثل تبائین و کدئین هدایت کرد. در مجموع نتایج کلی این تحقیق نشان داد که ژن *BBE1* ژنی با محافظت شدگی بسیار بالاست و بین ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف از لحاظ توالی این ژن تفاوتی مشاهده نمی‌شود. همچنین ناحیه انتخاب شده در این ژن ناحیه‌ی بسیار مناسبی برای خاموشی بوده و

می‌توان برای تولید گیاهان تراریخت دائم برای خاموشی این ژن از این ناحیه استفاده کرد. با خاموشی این ژن می‌توان رونوشت‌های آن را به طور مؤثری در گیاهان تراریخت کاهش داد و آلکالوئیدهای مرتبط با آن را دستورزی کرد.

منابع

۱. رخشنده رو، ف.، پالوکایتیس، پ. و شمس بخش، م. ۱۳۹۲. ناپایداری ساختارهای ساقه – حلقه در جلوگیری از بیان ژن‌های مسئول مقاومت در برابر آلودگی‌های ویروسی در توتون‌های تراریخت. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۶، شماره ۳، ص ۴۱۵-۴۰۱.

۲. شاهی‌وند، ح.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف. و زبرجدی، ع. ۱۳۹۵. خاموش‌سازی سیستماتیک ژن کدئین اُ-دمتیلاز (*CODM*) با استفاده از فن القای خاموشی از طریق ویروس (VIGS) در گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۹، شماره ۱، ص ۱۰۱-۹۲.

3. Acock M., Pausch R., Acock B. (1997) Growth and development of opium poppy (Papaver somniferum L.) as a function of temperature. Biotronics 26:47-57.

4. Beaudoin G.A., Facchini P.J. (2014) Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. Planta:1-14.

5. Brochmann-Hanssen E., Chen C.-h., Chen C.R., Chiang H.-c., Leung A.Y., McMurtrey K. (1975) Opium alkaloids. Part XVI. The biosynthesis of 1-benzylisoquinolines in Papaver somniferum. Preferred and secondary pathways; stereochemical aspects. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1:1531-1537.

6. Daniel B., Pavkov-Keller T., Steiner B., Dordic A., Gutmann A., Nidetzky B., Sensen C.W., Van Der Graaff E., Wallner S., Gruber K. (2015) Oxidation of monolignols by members of the Berberine Bridge Enzyme family suggests a role in plant cell wall metabolism. Journal of Biological Chemistry 290:18770-18781.

7. Dittrich H., Kutchan T.M. (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 the National Academy of Sciences 88:9969-9973.

8. Gentner W.A., Taylorson R.B., Borthwick H.A. (1975) Responses of poppy, Papaver somniferum, to photoperiod. Bulletin on narcotics 27:23-31.

9. Hagel J.M., Beaudoin G.A., Fossati E., Ekins A., Martin V.J., Facchini P.J. (2012) Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 287:42972-42983.

10. Hileman L.C., Drea S., Martino G., Litt A., Irish V.F. (2005) Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species Papaver somniferum (opium poppy). The Plant Journal 44:334-341.

11. Kapoor L. (1995) Opium poppy: botany, chemistry, and pharmacology Food Products Press.

12. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25:402-408.

13. Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcombe D.C. (2003) Virus-induced gene silencing in plants. Methods 30:296-303.

14. Paul B.D., Dreka C., Knight E.S., Smith M.L. (1996) Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Detection of Narcotine, Papaverine, and Thebaine in Seeds of Papaver somniferum. Planta medica 62:544-547.

15. Preininger V. (1986) Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. Elsevier 29: 1-98.

16. Senthil-Kumar M., Mysore K.S. (2011) New dimensions for VIGS in plant functional genomics. Trends in plant science 665-16:656.

17. Winkler A., Hartner F., Kutchan T.M., 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. Journal of Biological Chemistry 281:21276-21285.

18. Winzer T., Gazda V., He Z., Kaminski F., Kern M., Larson T.R., Li Y., Meade F., Teodor R., Vaistij F.E. (2012) A Papaver somniferum 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. Science 336:1704-1708.

19. Xu P., Zhang Y., Kang L., Roossinck M.J., Mysore K.S. (2006) Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. Plant Physiology 142:429-440.

Isolation, cloning and transient silencing of *BBE1* gene using virus induced gene silencing technique in Iranian genotypes of *Papaver somniferum* L.

Sohrabi S.M., Ismaili A. and Nazarian Firouz-Abadi F.

Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.of Iran

Abstract

The poppy (*Papaver somniferum* L.) is one of the oldest medicinal plant in the world. It remains the only commercial source for the important narcotic analgesics and semi-synthetic derivatives such as oxycodone and naltrexone. Several other benzylisoquinoline alkaloids with potent pharmacological properties including papaverine, noscapine and sanguinarine also produce with this plant. *BBE1* is one of key genes in biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids and catalyzes first step in production of noscapine and sanguinarine alkaloids. In the present study, the full length CDS of *BBE1* gene was isolated from poppy plant using specific primers. Then, a specific fragment, corresponding to the *BBE1* CDS was selected as silencing fragment and cloned into pTZ57R/T plasmid. In the next step, silencing fragment was cloned into pTRV plasmid and resulting constructs (pTRV2-BBE1 and pTRV2-Empty) along with helper plasmid (pTRV1) were transferred to *Agrobacterium* and infiltrated into young leaves. Result showed a 1608 bp DNA fragment for *BBE1* gene. PCR analysis using CP specific primers showed presence of CP transcripts in the infiltrated plants. Real-time PCR analysis showed transcript reduction (about 73%) in the transgenic plant (infiltrated with pTRV2-BBE1) compared with control plants (infiltrated with pTRV2-Empty and non-infiltrated).

Key words: poppy, gene silencing, pTRV plasmid, real-time PCR