

همسانه‌سازی و مطالعه ویژگی‌های بیوانفورماتیکی ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ (TR II) از گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*)

میترا پارسا^۱، قاسمعلی گروسی^{۲*}، رحیم حداد^۳ Ph.D.

- ۱- دانش آموخته دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، گروه اکولوژی و سیستماتیک گیاهی، تهران، ایران، کدپستی ۱۹۶۱۵۱۱۷۱
- ۲- دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران، کد پستی ۳۴۱۴۹-۱۶۱۸۱۸
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: agarooosi90@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۵

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش استخراج و همسانه‌سازی ژن تروپینون ردوکتاز ۲ (*tr-II*) در جهت آنتی‌سنس در ناقل دوتایی pBI121 جهت تهیه گیاهان تراریخت با توانایی کاهش آنزیم TR-II و تولید بیشتر آلکالوئیدهای هیوسيامین و اسکوپولامین در پروژه‌های آینده بود.

مواد و روش‌ها: RNA کل از ریشه‌های کشت شده گیاه بنگدانه بومی ایران استخراج و ژن هدف پس از ساخت cDNA و همسانه‌سازی در جهت آنتی‌سنس در ناقل دوتایی pBI121، به آگروباکتریوم تومیفسینس سویه GV3101 منتقل شد. درستی همسانه‌سازی به سه روش هضم آنزیمی، PCR و توالی‌یابی نوکلئوتیدی مطالعه گردید. سپس خصوصیات بیوانفورماتیکی ژن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: واکنش PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی نوکلئوتیدی درستی همسانه‌سازی ژن هدف را با سودمندی بالا تایید کرد. توالی نوکلئوتیدی نشان داد که ژن هدف بطول ۷۸۳ bp بوده و باستثنای یک نوکلئوتید، مشابه با نمونه ثبت شده در بانک جهانی NCI است و یک پروتئین با ۲۶۰ اسیدآمینو را رمز می‌کند. وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده پروتئین به ترتیب برابر ۲۸۴۳۷/۴ دالتون و ۵/۴۶ بود. بررسی ساختارهای دو بعدی و سه بعدی نشان داد که پروتئین کاملاً مشابه با آنچه که قبلاً در پایگاه PDB ثبت شده بود، نبود. همچنین، نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن به گروه I تروپینون ردوکتازها تعلق دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به همسانه‌سازی موفقیت‌آمیز و مشابهت بالای توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی ژن *tr-II* با نمونه‌های ثبت شده جهانی، انتظار می‌رود مراحل بیان ژن در نیل به هدف اصلی نیز با موفقیت همراه باشد.

کلمات کلیدی: آگروباکتری، آنتی‌سنس، بنگدانه، همسانه‌سازی، بیوانفورماتیک، TR-II

مقدمه

تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین، ترکیبات هتروسیکلیک آمینی هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه در تعدادی از گیاهان تیره سولاناسه، از جمله جنس‌های *Duboisia* هستند (۲ و ۱). این آلکالوئیدها روی سیستم پاراسمپاتیک عمل کرده و در داروسازی به عنوان رفع‌کننده اسپاسم، تسکین‌دهنده درد و برای اتساع زیاد مردمک چشم بکار برده می‌شود (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶). این ترکیبات و سایر تروپان آلکالوئیدها به‌طور عمده در ریشه‌های گیاهان خانواده سولاناسه از جمله شابی‌زک، تاتوره، بنگدانه و اسکوپولیا سنتز و از طریق آوندهای چوبی به دیگر اندام‌های گیاهی انتقال یافته و در بافت‌های مخزن در سلول‌های اپی‌درم ذخیره می‌شوند (۷، ۸ و ۹). در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدهای یاد شده، آنزیم‌های بسیاری دخیل هستند (۱۰ و ۱۱)، ولی در پایین دست تروپینون که یک ترکیب حدواسط کلیدی این مسیر بیوسنتزی محسوب می‌شود، دو تروپینون ردوکتاز ۱ و ۲ (TR-I و TR-II) در قرار گرفتن آن در دو مسیر متفاوت نقش مهمی دارند. تفاوت فاحش این دو آنزیم در وابستگی آن‌ها به سوبسترای تروپینون می‌باشد. هر دو آنزیم متعلق به گروه B اکسیدوردوکتازها می‌باشند که نقش آن‌ها در انتقال pro-s هیدروژن NAD(P)H به سوبسترای آن‌ها می‌باشد (۱) و میل ترکیبی متفاوتی نسبت به تروپینون از خود نشان می‌دهند (TR-II میل ترکیبی بیشتری نسبت به TR-I دارد). تروپینون ردوکتازهای ۱ و ۲ وابسته به NADPH تشکیل‌دهنده یک نقطه انشعاب در بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها هستند: آنزیم TR-I تروپینون را از طریق NADPH، گروه ۳- کربونیل تروپینون را به یک گروه α - هیدروکسیل، به تروپین کاتالیز می‌کند که در پایان مسیر به آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین ختم می‌شود، در حالی که آنزیم TR-II آن را با استفاده از NADPH احیا و پزودوتروپین به همراه یک گروه β - هیدروکسیلی و در نهایت آلکالوئید غیر تروپانی کالستیژن را تولید می‌کند (۱۲ و ۱۳).

هاشیموتو و همکاران (۱۴) دو آنزیم تروپینون ردوکتاز ۱ و ۲ را از گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) جدا سازی، خالص‌سازی و شناسایی کردند. آن‌ها نشان دادند که این دو آنزیم مشخصات کینتیکی مشابه و بیوشیمیایی متفاوتی دارند. برای درک بهتر ساختار و تکامل روابط این ردوکتازها، ناکاجیما و همکاران (۱۵) cDNA ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ مربوط به گیاه

بنگدانه را سنتز و توالی یابی کردند و اعلام نمودند که این ژن ۱۰۲۹bp طول داشته و از ۷۸۳bp آن نسخه برداری می‌شود و پپتیدی به‌طول ۲۶۰ اسید آمینه را رمز می‌کند. توالی آمینواسیدی آنزیم TR-II نشان داده است که این آنزیم متعلق به خانواده دهیدروژناز/ردوکتاز رشته کوتاه (Short-chain Dehydrogenases/Reductases, SDR) می‌باشد. آنزیم‌های خانواده SDR، برای واکنش‌های آنزیمی خود نیاز به فلزات و یا پیوندهای سیستمی ندارند. همچنین این آنزیم‌ها د یک رشته Try-x-x-x-Lys دارند. عمل کرد باقیمانده‌های حفاظت شده (تیروزین، لیزین و همچنین سرین) از ساختار سه بعدی آنزیم‌های SDR برای اولین بار در دهه ۹۰ پیشنهاد شده است. تیروزین به عنوان یک کاتالیست اسید و باز عمومی عمل می‌کند که در آن لیزین و سرین این عمل را به ترتیب از طریق اثرات الکترواستاتیکی و پیوند هیدروژنی با تیروزین تسهیل می‌کنند (۱).

هر چند در پایین دست آنزیم تروپینون ردوکتاز ۱ در مسیر تبدیل تروپین به اسکوپولامین آنزیم‌های مهم دیگری از جمله هیوسیامین 6 β - هیدروکسیلاز (Hyoscyamine 6 β - hydroxylase, H6H) وجود دارند که تولید اسکوپولامین را کاتالیز می‌نمایند (۱۶ و ۱۷)، ولی آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ رقیب اصلی آنزیم تروپینون ردوکتاز ۱ در انشعاب مسیر به سمت آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین و یا آلکالوئید غیر تروپانی کالستیژن می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که کالستیژن نسبت به آتروپین و اسکوپولامین در سولاناسه به میزان بیشتری وجود دارد (۱۸) و در زمان کوتاهی پس از تیمار پیش‌ماده تروپینون در بافت‌های مختلف سولاناسه، پزودوتروپین سریعتر از تروپین تجمع می‌یابد (۱۹). کای و همکاران (۲۰) نشان دادند که در گیاه *Anisodus acutangulus* میزان بیان آنزیم TR-II به مراتب بیشتر از TR-I و بیان هر دو در تیمار با اسید جاسمونیک و همچنین در ریشه‌های مویین افزایش می‌یابد ولی با افزایش TR-II بیش از TR-I می‌باشد. بنابراین تصور می‌شود کاهش آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ می‌تواند در افزایش بیان ژن تروپینون ردوکتاز ۱ و در نتیجه افزایش میزان تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین نقش قابل توجهی داشته باشد (۲۱). بدلیل اهمیت ذکر شده، در این مطالعه ژن تروپینون ردوکتاز ۲ (tr-II) از یک گونه گیاه بنگدانه بومی ایران جداسازی و به منظور کاهش بیان آن در جهت آنتی سنس همسازسازی شد. همچنین برای

(PCR) از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۱ میکروگرم cDNA، ۱/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت (۲۰ pmol)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (۲۰ pmol)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز در حجم کلی واکنش (۲۵ میکرولیتری) استفاده گردید. برنامه چرخه‌ای PCR با آغازگرهای رفت و برگشت در ۳۵ دور انجام گرفت. درستی بیان ژن تروپینون ردوکتاز II (*tr-II*) توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد صورت گرفت. محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، تهران-ایران) خالص سازی شد.

همسازسازی و توالی‌یابی DNA محصول PCR و فاژمید pBluescript II (SK-) با استفاده از آنزیم *Xba* I هضم و قطعه مورد نظر با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T_4 و مطابق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده به فاژمید متصل گردید. پس از تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5 α در $OD_{600}=0.4$ به روش قلیایی کلرید کلسیم (۱۷)، فاژمید نوترکیب با استفاده از شوک حرارتی (۲۷) به باکتری انتقال داده شد. سلول‌های باکتری تراریخت با استفاده از آزمون پلاک‌های سفید و آبی انتخاب (۲۷) پس از کشت باکتری تراریخت، فاژمیدهای نوترکیب به روش قلیایی با SDS (۲۸) با کمی تغییرات استخراج شدند. از تکنیک هضم آنزیمی و PCR با آغازگرهای اختصاصی برای بررسی کلونی‌های نوترکیب استفاده شد. جهت انجام هضم آنزیمی، ۱ میکروگرم از محلول DNA پلاسمیدی به طور جداگانه با استفاده از ۳ آنزیم محدود کننده *Hind* III، *Xba* I و *Sac* I هضم (۲۹) و محصول واکنش بوسیله الکتروفورز در یک ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از اینکه کلونی‌های نوترکیب با استفاده از PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفتند، صحت توالی همسازسازی شده از طریق توالی‌یابی DNA با استفاده از آغازگرهای راه انداز باکتروففاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab آلمان انجام شد.

ساخت سازواره نوترکیب pBII21 و انتقال به آگروباکتری تراریخت GV3101. با توجه به هدف پژوهش، ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز II با حذف ژن بتاگلوکورونیداز (GUS) در جهت آنتی سنس در درون پلاسمید بیان دو تایی pBII21 همسازسازی گردید. بدین منظور فاژمید نوترکیب (pBluescript sk-) حاوی ژن هدف و پلاسمید pBII21

آگاهی از ساختار شیمیایی و بیوشیمیایی ژن و پروتئین گیاه بومی و مقایسه آن با چند گیاه هم نام و مشابه خصوصیات شیمیایی، ساختار دوم و سوم و همچنین تکامل ژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جداسازی RNA کل: بذرهای گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*)، جمع‌آوری شده از اطراف شاهی جان پیرکوه، شهرستان سیاهکل استان گیلان، با کد گیاهی ۲۱۱۶۱ از سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه و جهت تسریع در جوانه‌زنی با اسید جیبرلیک ۲۰۰ ppm به مدت ۴۸ ساعت تیمار (۲۲) و پس از ضدعفونی بر روی محیط کشت جامد B5 بدون هورمون به مدت ۴ روز کشت شدند. ریشه‌های به طول تقریبی ۲ سانتی متر از بذر جدا و برای رشد و افزایش بیشتر به مدت ۴ هفته در محیط کشت مایع B5 به همراه ۱ میکرومولار هورمون IBA واکشت و بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در تاریکی نگهداری شدند (۲۳ و ۲۴). RNA کل از بافت ریشه به روش لیتیوم کلراید (۲۵ و ۲۶) با کمی تغییرات استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی به ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی فرم آلدئید و اسپکتروفتومتر (labomed-UVD3200 انگلستان) مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز رشته اول cDNA برای سنتز cDNA ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲، از آغازگر عمومی $18(dT)$ Oligo و آنزیم نسخه بردار معکوس RevertAidTM M-MuiV (شرکت فرمنتاز) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

طراحی آغازگرها و واکنش RT-PCR با استفاده از توالی قطعه ژن مورد نظر از گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) با توالی ژن HYSTR2A با شماره دسترسی L20485 که توسط ناکاجیما و همکاران (۱۵) در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شده است، یک جفت آغازگر اختصاصی ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ حامل ۱۱ جفت باز اختصاصی به همراه ترادف نوکلئوتیدی آنزیم برشی *Xba* I (با ترادف بازی آغازگر رفت 5'-ATATCTAGAACCATGGCTGGCAG-3' و آغازگر برگشت 5'-GGCGTCTAGATTA AAAAACCACCAT-3) در پایانه 5' طراحی گردید. آغازگرها توسط شرکت metabion آلمان سنتز شدند. برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز

یابایی با استفاده از برنامه Translate (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) ترجمه شده و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه protparam (۳۲) (http://www.expasy.org/tools/protpar-ref.html) protscale، (http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl) و TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services) مورد بررسی قرار گرفت. ساختار دوم توالی پروتئین با استفاده از برنامه SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp) و ساختار سوم آن با استفاده از برنامه SPDV Viwer، I-TASSER و PYMOL تعیین گردید (۳۳، ۳۴ و ۳۵).

بررسی فیلوژنتیکی: برای کسب اطلاع از توالی پروتئین‌های مشابه، توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در بانک اطلاعاتی با استفاده از برنامه BLASTp در سایت (www.uniprot.org/blastp) مورد جستجو قرار گرفت. توالی‌های پروتئینی که بیشترین تشابه را با توالی مورد نظر داشتند (جدول ۱)، در ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA 4 مورد استفاده قرار گرفتند (۳۶ و ۳۷).

وحشی با دو آنزیم برشی *BamH I* و *Sac I* هضم دوتایی شدند. برای انجام واکنش اتصال از کیت Rapid DNA ligation kit (با شماره کاتالوگ K1421، محصول شرکت فرمنتاز) استفاده و مطابق توصیه شرکت سازنده آزمایش انجام گردید. از سازواره نوترکیب ساخته شده برای ساخت آگروباکتری تراریخت استفاده شد. بدین منظور ابتدا سلول‌های مستعد آگروباکتریوم به روش وایز، لیو و بینز (۳۰) تهیه و سپس پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد نظر به روش شوک حرارتی (۳۰) به درون سلول‌های مستعد آگروباکتریوم منتقل گردید. پلاسمید نوترکیب با استفاده از محلول کلیایی و با استفاده از SDS استخراج و مورد مطالعه قرار گرفت (۳۱).

برای مطالعه درستی همسازسازی پلاسمید نوترکیب علاوه بر روش PCR، از هضم آنزیمی استفاده شد. برای انجام هضم آنزیمی از روش هضم دوتایی استفاده شد. بدین منظور ۱ میکروگرم از محلول DNA پلاسمید نوترکیب با آنزیم *BamH I* و *Sac I* عمل هضم دوتایی انجام و سپس محصولات واکنش به وسیله الکتروفورز در یک ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی توالی و پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم

پروتئین: توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرآیند توالی

جدول ۱: مشخصات توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در ساخت درخت فیلوژنتیکی به همراه شماره دستیابی موجود در پایگاه اطلاعات توالی *NCBI GenBank*.

| ردیف | نام علمی | نام ژن | شماره دستیابی |
|------|---|--|---|
| ۱ | <i>Hyoscyamus niger</i> | tropinone reductase-II | P50164 |
| ۲ | <i>Datura stramonium</i> | tropinone reductase-I | GenBank: AAA33281.1 |
| ۳ | <i>Datura stramonium</i> | tropinone reductase-II | GenBank: AAA33282.1 |
| ۴ | <i>Datura stramonium</i> | Tropinone reductase homolog; AltName: Full=P29X | UniProtKB/Swiss-Prot: P50165.1 |
| ۵ | <i>Solanum tuberosum</i> | Tropinone reductase II | GenBank: CAC19810.1 |
| ۶ | <i>Solanum tuberosum</i> | tropinone reductase I | GenBank: CAC34420.1 |
| ۷ | <i>Arabidopsis thaliana</i> | putative tropinone reductase | GenBank: AAN15454.1 |
| ۸ | <i>Arabidopsis thaliana</i> | putative tropinone reductase | GenBank: AAM10204.1 |
| ۹ | <i>Arabidopsis thaliana</i> | putative tropinone reductase | GenBank: AAO42159.1 |
| ۱۰ | <i>Oryza sativa Japonica Group</i> | Tropinone reductase, putative, expressed | GenBank: ABG22470.1 |
| ۱۱ | <i>Boechera divaricarpa</i> | putative tropinone reductase | GenBank: ABW74581.1 |
| ۱۲ | <i>Vitis vinifera</i> NCBI Reference Sequence: | PREDICTED: tropinone reductase homolog | XP_002280517.2 |
| ۱۳ | <i>Vitis vinifera</i> | PREDICTED: tropinone reductase homolog At1g07440 | NCBI Reference Sequence: XP_002277835.1 |
| ۱۴ | <i>Zea mays</i> | tropinone reductase | GenBank: ACG34080.1 |
| ۱۵ | <i>Zea mays</i> | tropinone reductase 2 | GenBank: ACG28624.1 |

نتایج

پس از گذشت ۴ هفته، توده‌ای از ریشه‌ها به وزن تقریبی ۱۵ گرم در محیط کشت مایع B5 حاوی ۱ میکرومولار هورمون IBA به دست آمد (شکل ۱). نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد و فرمالدئید (شکل ۲A) نشان داد که استخراج RNA با این روش از کمیت (۳/۳۶) نانوگرم RNA به ازای ۲/۵ گرم بافت ریشه) و کیفیت قابل قبولی برخوردار است. در RT-PCR با استفاده از cDNA ساخته شده تنها یک باند قوی و تقریباً به طول ۷۸۳ bp در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد (شکل ۲B). بازده تراریختی سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* با استفاده از کلریدکلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار در OD₆₀₀ به میزان ۰/۴ بوده و استخراج فاژمید نوترکیب با استفاده از روش SDS نیز با موفقیت انجام شد.

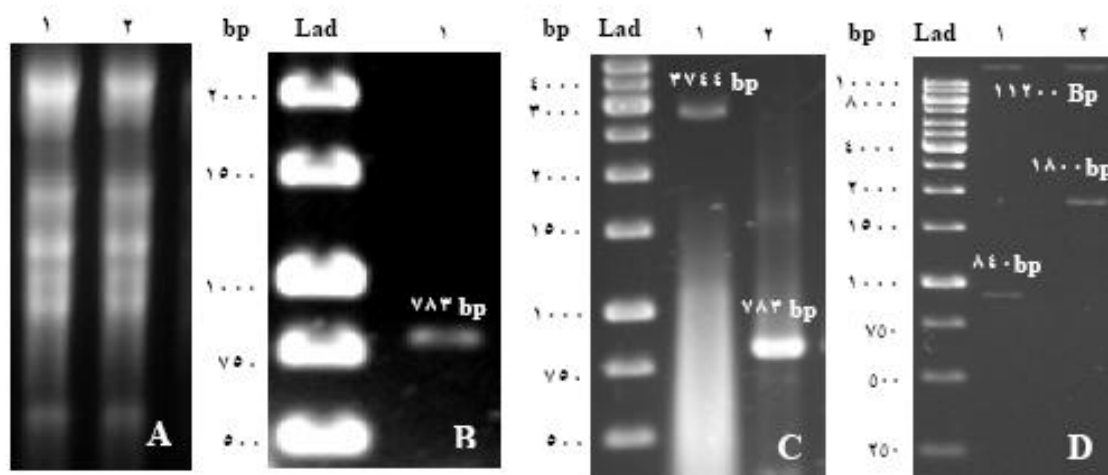


شکل ۱: تشکیل کلون ریشه در محیط کشت مایع B5 همراه با ۱ میکرومولار IBA.

هضم آنزیمی فاژمید نوترکیب با استفاده از ۳ آنزیم برشی *Hind* III، *Xba* I و *Sac* I، درستی ساخت فاژمید نوترکیب را تأیید کرد. نتایج حاصل از PCR فاژمید نوترکیب، قطعه‌ای به طول ۷۸۳bp را ایجاد کرد که مطابق با طول قطعه مورد انتظار بود (شکل ۲C).

درستی همسازسازی ژن هدف در جهت آنتی سنس در ناقل دوتایی pBI121 (شکل ۲D) و انتقال آن به درون اگروباکتریوم GV3101، با استخراج پلاسمید دو تایی نوترکیب و هضم آن با آنزیم‌های برشی *Bam*H I و *Sac* I، با ایجاد دو قطعه با اندازه‌های تقریبی ۱۱۲۰۰ و ۸۴۰ جفت بازی به اثبات رسید (شکل ۲C).

نتایج توالی‌یابی DNA، صحت قطعه همسازسازی شده را تأیید نمود. توالی قطعه ژن مورد نظر از گیاه بومی بنگ‌دانه با توالی ژن HYSTR2A با شماره دسترسی L20485 که توسط ناکاجیما و همکاران (۱۵) در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شده است، مورد مقایسه قرار گرفت. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از برنامه BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که این دو توالی ۹۹ درصد با یکدیگر مشابهت دارند. قطعه مورد نظر مشابه نتایج ناکاجیما و همکاران (۱۵) یک پروتئین با ۲۶۰ اسیدآمینو را کد می‌نماید. بررسی توالی اسیدآمینو ای نشان داد که در آن یک جایگاه فعال آنزیم به عنوان گیرنده پروتون و همچنین یک جایگاه اتصال سوبسترا وجود دارد (شکل ۳).



شکل ۲: الکتروفورز محصولات RNA و DNA (A) ۱ و ۲ دو نمونه RNA استخراج شده از ریشه‌های گیاه بنگ‌دانه. (B) تکثیر cDNA ژن *tr-II* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکنیک PCR با دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد: ستون ۱ باند قطعه هدف در تیمار هورمونی IBA (C) PCR اختصاصی فاژمید نوترکیب: ستون ۱ فاژمید نوترکیب حلقوی (شاهد)، ستون ۲ محصول PCR فاژمید نوترکیب با آغازگرهای اختصاصی ژن *tr-II* (D) محصول هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBI121 با آنزیم‌های برشی *Bam*H I و *Sac* I: ستون ۱ باندهای حاصل پس از هضم پلاسمید دوتایی pBI121 نوترکیب (حاوی ژن *TR-II*) و ستون ۲: باندهای حاصل پس از هضم پلاسمید دوتایی pBI121 غیر نوترکیب.

| | |
|-----|--|
| 1 | atggctggcaggtggaatccttgaaggctgcactgcccttggtactggtggctcgcgagggc |
| 1 | M A G R W N L E G C T A <u>L V T G G S R G</u> |
| | ▲ ▲ ▲ ▲ |
| 61 | atagggtatgggatcgtagaggaattagcaaatccttgagcatcagttatacatgttca |
| 21 | <u>I G Y G I V E E L A N L G A S V Y T C S</u> |
| | ▲ ▲ |
| 121 | cgtaatcaaaaggagccttgatgagtggttaactcaatggagaagtaaaggttttaatggt |
| 41 | R N Q K E L D E C L T Q W R S K G F N V |
| | ▲ ▲ |
| 181 | gaagccttctggttgattatcatcaagatctgaacgagaagagtttatgaagactgta |
| 61 | E A S V C D L S S R S E R E E F M K T V |
| | ▲ ▲ ▲ |
| 241 | tctaatacatttccatggaaaactcaatattttggtaaataatgctggtattgtcatatac |
| 81 | S N H F H G K L N I L V N N A G I V I Y |
| | ▲ |
| 301 | aaggaagctaaagattacactatggaagattactctcatattatgagcataaaactttgag |
| 101 | K E A K D Y T M E D Y S H I M S I N F E |
| | ▲ ▲ |
| 361 | gctgcttatcacttatctgtacttgcacatcccttttgaaggcatcagaaaggggaaat |
| 121 | A A Y H L S V L A H P F L K A S E R G N |
| | |
| 421 | gttgattttatctcctcatttctggggcttctgcactaccatattgaggctgtttatgga |
| 141 | V V F I S S I S G A S A L P Y E A V <u>Y</u> G |
| | ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ |
| 481 | gcaaccaaaaggagcaatggaccaactgacaagatgcttggcgtttgagtgggcaaggac |
| 161 | A T <u>K</u> G A M D Q L T R C L A F E W A K D |
| | ▲ ▲ |
| 541 | aatattcgtgtcaatgggtgttgacctggggttattgcaacttctatgggtcgaaatgact |
| 181 | N I R V N G V G P G V I A T S M V E E M T |
| | ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲ |
| 601 | attcaagatccagaacaaaagaaaacttggaataagctgattgatagatgtgctctccgg |
| 201 | I Q D P E Q K E N L D K L I D R C A L R |
| | |
| 661 | cgaatgggagagcccaaagaacttgcagcagtggttgcattcctctgtttcctgctgct |
| 221 | R M G E P K E L A A V V A F L C F P A A |
| | |
| 721 | tcatatgtcactggccaaattatctatggttgatgggtggatttatggctaattgggtggtttt |
| 241 | S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N G G F |
| | |
| 781 | taa (Stop codon) |

شکل ۳: توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن TR-II. توالی‌های آبی رنگ: بخش ژنی توالی‌های آغازگرهای رفت و برگشت؛ توالی پپتید راهنما بصورت زیرخط، آمینواسیدهای تیروزین و لیزین به عنوان باقیمانده‌های حفاظت شده در آنزیم‌های متعلق به خانواده SDR به ترتیب با علامت مربع و دایره و اسید آمینه‌های موجود در جایگاه‌های اتصال و فعال به ترتیب با مثلث‌ها سیاه و زرد رنگ نشان داده شده‌اند.

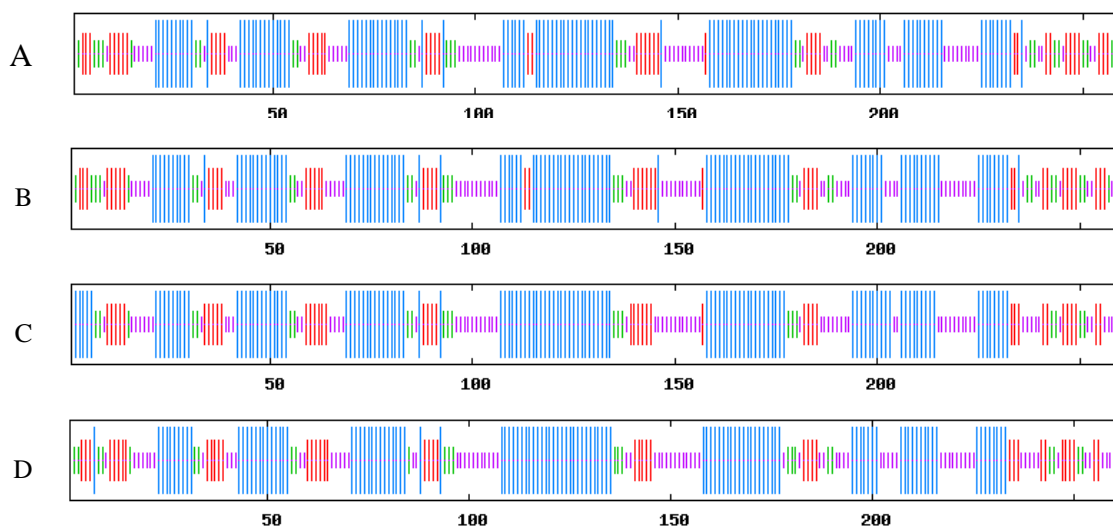
پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از ۴۰ جز پروتئین‌های پایدار تقسیم بندی می‌شوند. شاخص ناپایداری پروتئین مورد نظر در حدود ۳۲/۹۳ محاسبه گردید، با توجه به وجود یک اسید آمینه حفظ شده متیونین در انتهای آمینوی پروتئین، نیمه عمر آن در محیط درون شیشه در حدود ۳۰ ساعت محاسبه می‌گردد. عامل مهم در برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت، شاخص

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده توالی پروتئینی ژن هدف با فرمول مولکولی $C_{1255}H_{1963}N_{341}O_{381}S_{16}$ به ترتیب برابر ۲۸۴۳۷/۴ دالتون و ۵/۴۶ می‌باشد. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیان‌گر میزان پایداری آن‌ها در لوله آزمایش می‌باشد و

۱۱۷ مارپیچ α (۳۴/۳۸ درصد)، ۴۵ صفحه β (۱۷/۳۱ درصد)، ۲۹ پیچ β (۱۱/۱۵ درصد) و ۶۹ مارپیچ تصادفی (۲۶/۵۴ درصد) می‌باشد. این نتایج با ساختار دوم توالی پروتئینی ژن تروپینون ردوکتاز II در سه گیاه *Hyoscyamus niger* [با ۱۱۷ مارپیچ α (۳۴/۳۸ درصد)، ۴۵ صفحه β (۱۷/۳۱ درصد)، ۲۹ پیچ β (۱۱/۱۵ درصد) و ۶۹ مارپیچ تصادفی (۲۶/۵۴ درصد)]، گیاه *Dartura Stramonium* [با ۱۲۱ مارپیچ α (۴۶/۵۴ درصد)، ۴۲ صفحه β (۱۶/۱۵ درصد)، ۲۲ پیچ β (۸/۴۶ درصد) و ۷۵ مارپیچ تصادفی (۲۸/۸۵ درصد)] و گیاه *Solanum tuberosum* [با ۱۱۳ مارپیچ α (۴۳/۳۰ درصد)، ۴۴ صفحه β (۱۶/۸۶ درصد)، ۲۵ پیچ β (۹/۵۸ درصد) و ۷۹ مارپیچ تصادفی (۳۰/۲۷ درصد)] بالاترین تشابه را نشان داد (شکل ۴).

آلیفاتیک است. این شاخص در پروتئین تروپینون ردوکتاز II، ۸۴/۸۱ می‌باشد. الگوی آب‌گریزی که توسط ProtScale استفاده از Kyte & Doolittle Hydrophobicity Scale محاسبه گردید، نشان داد که این پروتئین آب‌گریز بوده و از مجموع کل اسیدی آمینه، ۲۴ اسید آمینه بار الکتریکی مثبت (Arg+Lys) و ۳۰ اسید آمینه دیگر بار منفی (Asp+Lys) دارند. همچنین با استفاده از برنامه TMHMM مشخص گردید که با توجه به داشتن دومین غشایی، آنزیم TR II مورد مطالعه یک پروتئین خارج سلولی است.

بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه SOPMA نشان داد که این پروتئین دارای ۵۵/۵ درصد اسیدآمینه آب‌گریز و ۴۴/۵ درصد اسیدآمینه آب دوست است. پروتئین TR II حاوی



شکل ۴: ساختار دوم پروتئین TR-II گیاه هدف با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی پروتئینی در سه گیاه دیگر: *Hyoscyamus niger* (گیاه بنگدانه هدف)، *Hyoscyamus niger* (گیاه بنگدانه موجود در NBI)، *Datura stramonium* (C) و *Solanum tuberosum* (D) و مارپیچ α (خطوط آبی)، صفحه β (خطوط قرمز)، پیچ β (خطوط سبز) و مارپیچ تصادفی (خطوط بنفش).

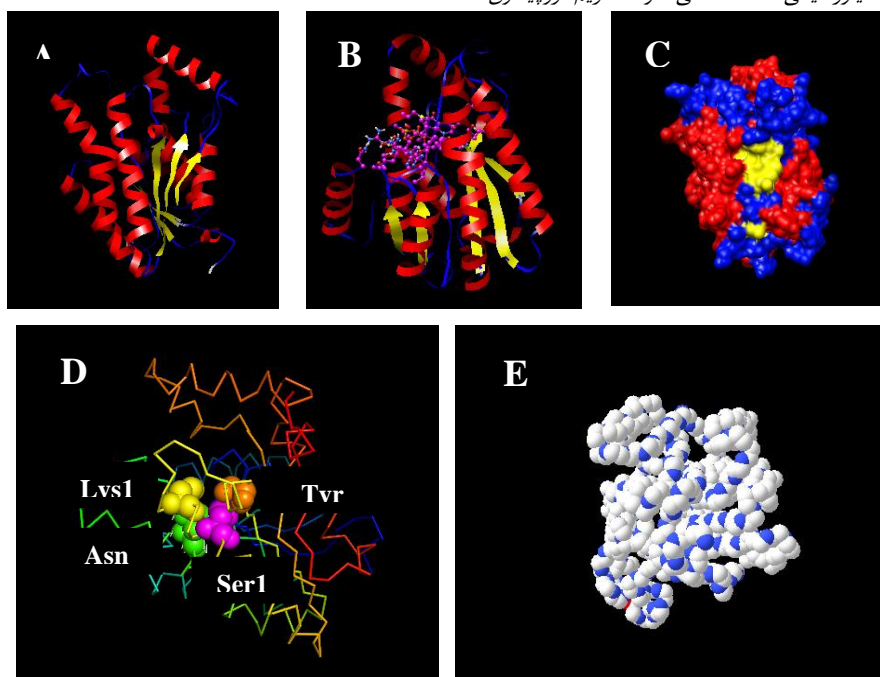
نشان داد که توالی پروتئینی تروپینون ردوکتاز II از سه گیاه *Solanum tuberosum*، *Dartura Stramonium* و *Hyoscyamus niger* در یک گروه (I) و توالی پروتئینی تروپینون ردوکتاز I از دو گیاه *Dartura Stramonium* و *Solanum tuberosum* در گروه مجزای دیگر (II) قرار دارند. بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئینی تروپینون ردوکتاز I و II گیاهان خانواده سولاناسه نشان داد که از لحاظ تکاملی از یک جد مشترک می‌باشند (شکل ۶) که با توجه به اینکه تروپینون ردوکتازها در ۶۴ درصد بنیان‌های آمینواسیدی مشترک بوده و متعلق به خانواده‌ی دهیدروژنازا/ردوکتاز زنجیره کوتاه (SDR) هستند، موید نتایج دیگران می‌باشد (۱۳).

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن تروپینون ردوکتاز II بوسیله برنامه I-TASSER نشان داد که این آنزیم حاوی ۸ صفحه β و ۱۲ مارپیچ α می‌باشد. نحوه آرایش مارپیچ‌های α و صفحات β در ساختار سه‌بعدی پروتئین این آنزیم به گونه‌ای است که مارپیچ‌های α در سطح خارجی پروتئین و صفحات β در داخل پروتئین قرار گرفته‌اند. صفحات β بطور موازی و هم جهت با هم قرار گرفته‌اند (شکل ۵).

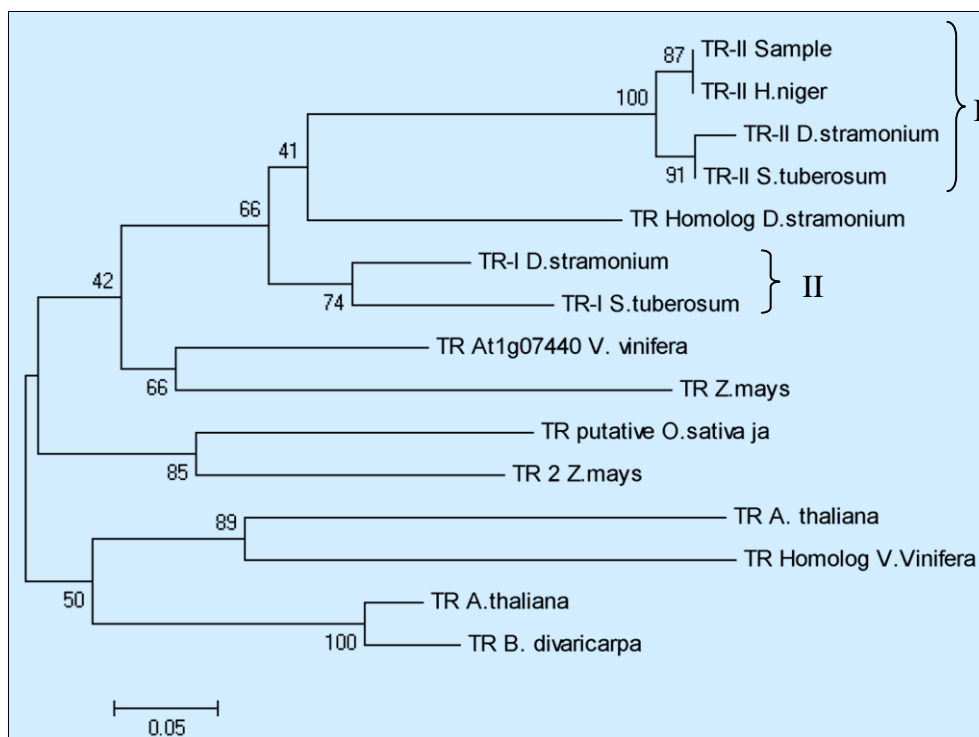
بررسی‌های فیلوژنتیکی توالی پلی‌پپتیدی تروپینون ردوکتاز II با توالی‌های پروتئینی آنزیم تروپینون ردوکتاز در گیاهان دیگر با استفاده از نرم افزار Mega 4 و با روش Neighbor Joining

ردوکتاز III/استخراج شده از گیاه *Hyoscyamus niger* (Sample) در گروه I قرار دارد (شکل ۶).

هر چند تصور برخی این است که TRII آنزیمی است که از نظر تکاملی قدیمی تر بوده و TRI از آن انشعاب یافته است (۳۸). همانطور که در درخت فیلوژنتیکی مشاهده می‌شود، آنزیم تروپینون



شکل ۵: مدل‌های سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن *TR-II*. (A) مدل سه‌بعدی روبان (Cartoon) توالی پروتئینی با مارپیچ‌های α (قرمز)، صفحات β (زرد) و نواحی مارپیچ پیچیده (آبی)؛ (B) آمینواسیدهای موجود در جایگاه اتصال به شکل گوی-میله (Ball-stick)؛ (C) مدل سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن *TR-II* با سطح جامد؛ (D) اسیدهای آمینه *Lys*، *Tyr*، *Ser* و *Asn* موجود در جایگاه فعال به شکل کروی (Sphere)؛ (E) مدل سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن *TR-II* به همراه سطح واندروالسی.



شکل ۶: درخت فیلوژنتیکی ژن تروپینون ردوکتاز ۱ و ۲ با توالی‌های پروتئینی تروپینون ردوکتاز از گیاهان دیگر. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

بحث

اکثر محققان وجود میزان متعادل از اکسین و سیتوکنین را برای ریشه زایی و شاخه زایی لازم می‌دانند (۳۹). اکسین‌ها در تحریک تقسیم سلولی، افزایش طول سلول‌ها، تحریک آغاز ریشه، تمایز یابی بافت‌های آوندی و افزایش حرکت مواد در آوندها نقش دارند (۴۰). در تمامی مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین (۲۴، ۲۵، ۴۱، ۴۲ و ۴۳) از محیط کشت B5 حاوی ۱ میکرومولار هورمون IBA برای رشد ریشه‌های موئین استفاده گردید اما در این آزمایش از ریشه‌های گیاه غیرتراریخت استفاده شد. نتایج این تحقیق با مطالعات انجام گرفته توسط این محققین از نظر امکان تکثیر ریشه همسانی نشان داد، ولی با نتایج هیگا و همکاران (۴۱) مشابهت بیشتری داشت. هر چند به نظر می‌رسد علاوه بر نوع گیاه (۴۴)، نوع ریشه، سن ریشه (۴۵)، ترکیب محیط کشت (۴۶) نیز می‌تواند موثر باشد. ولی به هرحال نتیجه این تحقیق نشان داد که به منظور هدف مشابه می‌توان از ریشه‌های تراریخت جهت تکثیر استفاده نمود.

کریستوسک و همکاران (۴۶) بیان نمودند که روش استخراج با فنل - کلروفرم موجب تجمع RNA، حذف نواحی پلی (A) از انتهای mRNA می‌شود که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۵) از دو روش استخراج با گوانیدین ایزوسیانات و شیب سزیم کلراید و فنل - کلروفرم برای استخراج RNA استفاده نموده و به این نتیجه دست یافتند که روش استخراج با شیب سزیم کلراید بهتر از روش فنل - کلروفرم است که مغایر با نتایج این آزمایش می‌باشد. این نتایج بیانگر این نکته می‌تواند باشد که احتمالاً شرایط و شیوه انجام آزمایش نیز می‌تواند بر نتیجه آزمایش موثر باشد.

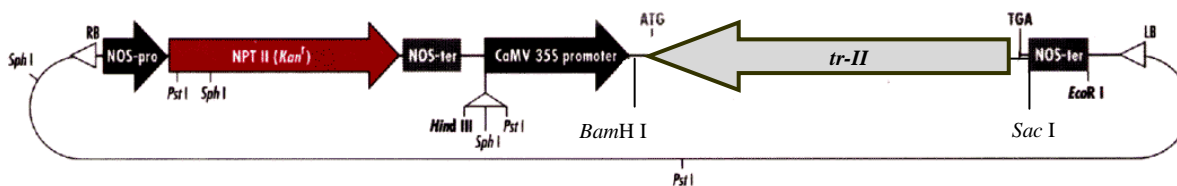
نتیجه RT-PCR حاصل از cDNA به دست آمده با طول ۷۸۳bp با اندازه توالی ژن ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI، ۹۹ درصد مطابقت دارد.

انتقال پلاسمید به درون سلول‌های مستعد باکتری تکنیک کلیدی و مهمی در همسازسازی مولکولی محسوب می‌شود. میزان بازده تراریختی بدست آمده در این تحقیق (۰/۴) با مقدار بدست آمده توسط کوهن و همکاران (۰/۴۵) (۲۷) قابل توجه می‌باشد. همچنین این نتیجه با نتایج زمینگ و همکاران (۴۷) در روش مشابه و با استفاده از ۷۵ میلی مولار کلرید کلسیم مطابقت داشت.

همان‌طور که در نتایج ذکر شد حضور قطعه ژن مورد نظر در فازمید نو ترکیب تهیه شده با استفاده از سه روش هضم آنزیمی، PCR و توالی یابی نوکلئوتیدی تأیید شد. مقایسه توالی یابی قطعه ژن هدف مستخرج از بنگدانه بومی ایران و قطعه ژن ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI نشان می‌دهد که احتمالاً خاستگاه آن‌ها یکسان باشد.

با استفاده از برش‌های آنزیمی، نقشه سازواره‌های ناقل دوتایی حاوی ژن هدف ترسیم گردید (شکل ۷). همان‌طور که در شکل یادشده مشاهده می‌شود، ژن تروپینون ردوکتاز II در جهت آنتی سنس به جای ژن بتاگلوکورونیداز (GUS) قرار گرفته است. به‌رحال تهیه موفقیت آمیز سازواره نو ترکیب با جهت آنتی- سنس ژن هدف امکان انتقال آن به گیاه بنگدانه و یا گیاهان مشابه تولیدکننده آلکالوئیدهای ترپوانی هیوسیامین و اسکوپولامین و غیر ترپوانی کالستین را فراهم نموده تا پس از بیان ژن هدف در سطح نسخه‌برداری در گیاه بتوان میزان متابولیت‌های ثانویه هیوسیامین و اسکوپولامین و همچنین فعالیت آنزیم تروپینون ردوکتاز-II و دیگر آنزیم‌هایی موثر در مسیر بیوسنتزی تولید این متابولیت‌های ثانویه را دقیق‌تر بررسی نمود.

بررسی‌های حاصل از ساختار سه بعدی و نتایج حاصل از جایگاه اتصال و جایگاه فعال آنزیم با داده‌های حاصل از یاماشینا (۱) مطابقت کامل ندارد که با توجه به شیوه مطالعه و تخمین ساختار نیاز به مطالعه دقیق‌تر می‌باشد.



شکل ۷: نمودار ترسیمی سازواره نو ترکیب بیان همسازسازی ژن *tr-II* در ناقل دوتایی *pBI121* در جهت آنتی سنس. سازواره شامل ژن گزارشگر نومایسین فسفوترانسفراز ۲ (*NPT-II*) برای مقاومت در باکتری و گیاه تحت کنترل پروموتور بیان *NOS* و ژن تروپینون ردوکتاز ۲ (*tr-II*) (قطعه سنگین) تحت کنترل پروموتور بیان *CaMV 35S*، که در ناقل دو تایی *pBI121* پس از حذف ژن β -*GUS* در جهت معکوس (آنتی سنس) بجای آن قرار گرفته است.

منابع

1. Yamashita A. Structural basis for the reaction of tropinone reductase -II analyzed by X-ray crystallography, PhD thesis, D Agr, Kyoto University, Japan. 1998; pp77.
2. Kai G, Yang S, Zhang Y, Luo X, et al. Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *anisodus acutangulus*. *Mol Biol Rep*. 2012; 39: 1721-1729.
3. Keiner R, Kaiser H, Nakajimia K, Hashimoto T, et al. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of SDR family in *Solanum tuberosum*. *Plant Mol Biol*. 2002; 48: 299- 308.
4. Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y. cDNA encoding tropinone reductase- II from *Hyoscyamus niger*. *Plant Gene Regist*. 1993; 103: 1465-1466.
5. Dehghan E, Häkkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Shahriari Ahmadi F. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2012; 110: 35-44.
6. Jirschitzka J, Schmidt GW, Reichelt M, Schneider B, et al. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 26; 109(26):10304-9.
7. Gonzalez DJ, Weathers PJ. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep*. 2003; 21: 809-813.
8. Richter U, Rothe G, Fabian AK, Rahfeld B, et al. Overexpression of tropinone reductase alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *J Exp Bot*. 2005; 56 (412): 645-652.
9. Caldentey K.M, Arroo R. Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures. In Verpoorte R, Alfermann AW, (eds). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000; 253- 281.
10. Kandoth K, Singh S, Jayabaskaran C. Expression of hyoscyamine 6b-hydroxylase in the root pericycle cells and accumulation of its product scopolamine in leaf and stem tissues of *Datura metel* L. *Plant Sci*. 2010; 178(2): 202–206.
11. Kim YD, Kang SM, Min JY, Choi WK, et al. Production of Tropane Alkaloids during De-differentiation of *Scopoliaparviflora calli*. *J Nat Prod*. 2010; 73(2): 147–150. 12.
12. Koelen KJ, Gross GG. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med*. 1982; 44(4): 227-230.

همانطور که پیشتر اشاره شد، تروپینون ردوکتاز II در گیاه *H. niger* در سطح آمینو اسیدی، شباهت بالایی به آنزیم TR-II در دیگر گیاهان خانواده سولاناسه داشته و در یک گروه قرار می‌گیرند، در حالی که مجموعه آنزیم‌های TR I در گروه مجزای دیگری جای گرفته اند و تنها حدود ۶۶ درصد تشابه آمینواسیدی بین این دو آنزیم وجود دارد. این تفاوت می‌تواند بدلیل ساختار فضایی متفاوت در دو تروپینون ردوکتاز باشد که باعث قرار گرفتن آن‌ها در دو گروه مجزا می‌شود. الگوی تکامل ژنتیکی بدست آمده در این مطالعه نشان داد که با نتایج کای و همکاران (۴۸) مطابقت دارد.

نتیجه گیری

cDNA ژن عامل آنزیم تروپینون ردوکتاز ۲ با توجه به RNA کل مستخرج از ریشه‌های گیاه بنگدانه بومی ایران، کشت شده در شرایط درون شیشه جداسازی و با در ناقل دوتایی pBI121 در جهت آنتی سنس همسازسازی و سپس ناقل نو ترکیب به اگروباکتريوم تومیفیسینس سویه GV3101 منتقل شد. در نهایت خصوصیات بیوشیمیایی ژن مورد بررسی قرار گرفت. همسازسازی با موفقیت مورد تایید قرار گرفت و توالی‌یابی نوکلئوتیدی نشان داد که توالی ژن هدف بطول ۷۸۳ bp بوده و باستثنای یک نوکلئوتید، مشابه با نمونه ثبت شده در بانک جهانی NCBI است و یک پروتئین با ۲۶۰ اسید آمینه را رمز می‌نماید. علیرغم تشابه بالای توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی، بررسی ساختارهای پروتئینی کاملاً مشابه با آنچه که قبلاً در پایگاه اطلاعاتی پروتئین PDB ثبت شده نبود. نتایج حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن به گروه I تروپینون ردوکتازها تعلق دارد. با توجه به همسازسازی موفقیت‌آمیز و مشابهت بالای توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی ژن هدف با نمونه‌های ثبت شده جهانی، انتظار می‌رود مراحل بیان ژن در نیل به هدف اصلی نیز با موفقیت همراه باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر حسن مداح عارفی (سازمان جنگل‌ها و مراتع) جهت اهدای بذرها گیاه بنگ‌دانه و همچنین سرکارخانم دکتر قنادنیا و جناب آقای مهندس سلیمانی (کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیولوژی مولکولی) جهت همکاری در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

13. Drager B. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochem.* 2006; 67(4): 327-337.
14. Hashimoto T, Nakajima K, Ongena G, Yamada Y. Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured root of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* 1992; 100(2): 836-845.
15. Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y. cDNA encoding tropinone reductase- II from *Hyoscyamus niger*. *Plant Gene Regist.* 1993; 103: 1465-1466.
16. Hashimoto T, Yamada Y. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root culture. *Plant Physiol.* 1986; 81(2): 619-625.
17. Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T, Yamada Y. Molecular cloning of hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured root of *Hyoscyamus niger*. *Biol. Chem.* 1991; 266(15): 9460-9464.
18. Griffin W, Lin D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochem.* 2000; 53(6):623-37.
19. Dräger B, Schaal A. Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochem.* 1994; 35:1441-1447.
20. Kai G, Li L, Jiang Y, Yan X, et al. Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000; 54(3):177-86.
21. Bahmanzadegan A, Sefidkon F, Sonboli A. Determination of Hyoscyamine and Scopolamine in Four *Hyoscyamus* Species from Iran. *Iranian J of Pharma Res.* 2009; 8(1): 65-70.
22. Mahmoodzadeh A, Nojvan M, Bagheri Z. [Effects of different treatments on breaking of dormancy and seed germination of *Datura stramonium* L.]. *Iranian J Biol.* 2005; 18(4): 341-349. Persian.
23. Akramian M, Fakhr Tabatabaei SM, Mirmasoumi M. Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Genetic Transformation of Four *Hyoscyamus* Species. *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci.* 2008; 3(5): 759-763.
24. Mohkami A, Marashi H, Farsi M, Bahrami AR. Isolation of h6h gene from cultured roots of *Hyoscyamus niger* and cloning it in *E. coli*. *Agric Sci and Technol J.* 2007; 21(2): 57-64.
25. Ebrahimzadeh H, Teimoori A, Lohrasbi T. Hyoscyamin 6- β -hydroxylase gene isolation from in vitro cultured roots of *Hyoscyamus niger* L. and *Hyoscyamus tenuicaulis schonbeck-Temesy*". *Daru.* 2003; 11(1): 34-37.
26. Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). *Plant Mol Biol Rep.* 1994; 12: 198-203.
27. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmid in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70(11): 3240-3244.
28. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid.* 1979; 7(6): 1513-1523.
29. Sambrook, J, Russell, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001; Vol:1-3.
30. Liu Z, Binns AN. Functional subsets of the VirB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in VirB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. *J. Bacteriol.* 2003; 185(11): 3259-3269.
31. Brent R, Irwin N. Minipreps of plasmid DNA. In Ausubel FM, Brent R, Kingston K, Moore D, et al. (eds). *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, NY; 1992; 1-16.
32. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud, S, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In Walker J. M. (eds), *The proteomics protocols handbook*. Humana Press; 2005; 571-607.
33. Yang Z. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008; 9: 40.
34. Ambrish R, Jianyi Y, Yang Z. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res*, 2012; 40: W471-W477.
35. Ambrish R, Alper K, Yang Z. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2010; 5(4): 725-738.
36. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24(8): 1596-1599.
37. Felsenstein J. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* 1985; 39(4): 783-91.
38. Nakajima K, Hashimoto T. Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific

patterns. *Plant and Cell Physiol.* 1999; 40(11): 1099-1107.

39- Gousiadou C, Karioti A, Heilmann J, Skaltsa H. Iridoids from *Scutellaria albida* ssp. *albida*. *Journal of Phytochemistry.* 2007; 68: 1799-1804.

40- Mohammadi J. [Servey the effectof growth regulator substances on sexual emersion in cucumber via in vitro method]. Abstract proceeding of the First Iranian Horticultural Congress. 1996, Tat press. Persian.

41. Higa A, Miyamoto E, Rahman L, Kitamura Y. Root tip-dependent, active riboflavin secretion by *Hyoscyamus albus* hairy roots under iron deficiency. *Plant Physiol Biochem.* 2008; 46: 452-460.

42. Kanegae T, Kajiya H, Amano Y, Hashimoto T, et al. Specie- dependent expression of the hyoscyamine 6 β - hydroxylase gene in the pericycle. *Plant Physiol.* 1994; 105: 483- 490.

43. Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T, Yamada Y. Molecular cloning of hyoscyamine 6 β - hydroxylase, a 2- oxoglutarate- dependent dioxygenase, from cultured root of *Hyoscyamus niger*. *Biol chem.* 1991; 266(15): 9460 - 9464.

44. Sueng HW, Jong MP, Ji- Won Y. Induction of branch roots by cutting method in *Hyoscyamus niger* root culture. *J Plant Growth Regul.* 1997; 16:159–167.

45. Biondi S, Lenzi C, Baraldi R, Bagni N. Hormonal Effects on Growth and Morphology of Normal and Hairy Roots of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tissu Organ Cult.* 1997; 48:131–134.

46. Krystosek A, Cawthon L, Kabat D. Methods for purification and assay of eukaryotic messenger ribonucleic acids and ribosomes. *Biol chem.* 1975; 250(15): 6077-6084.

47. Zhiming T, Guangyuan H, Kexiu XLi, Minigjie JC, et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherchia coli* strains. *Microbial Biotech.* 2005; 1-7.

48. Kai G, Yang S, Zhang Y, Luo X, et al. Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009; 54: 177-186.

Cloning and Study the Bioinformatic Trait of Tropinone Reductase-II (TR II) Gene from *Hyoscyamus niger*

Parsa M. M.Sc.¹, Garoosi G.A. Ph.D.^{2*}, Haddad R. Ph.D.²

1. Graduated from Imam Khomeini International University, (preset address) Plant Ecology and Systematic Department, Applied Science Institute, Shaid Beheshti University, Tehran, Iran. P.BOX: 196151171

2. Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. P.BOX: 34149-161818

* Email corresponding author: agaroosi90@yahoo.com

Received: 25 Jun. 2012

Accepted: 22 Jan. 2013

Abstract

Aim: The purpose of present research was extraction and cloning of tropinone reductase-II gene (*tr-II*) at antisense direction in pBI121 binary vector to provide transgenic plants with low rate of tropinone reductase-II enzyme and high production of scopolamine and hyoscyamine for future projects.

Material and methods: Total RNA was extracted from Iranian native *Hyoscyamus niger* roots, and the interest gene after cDNA synthesis and cloning at antisense direction in pBI121 binary vector, was transferred to *Agrobacterium tumefaciens*. Accurate cloning was studied through 3 methods; enzymatic digestion, PCR and DNA sequencing. The bioinformatic characters of the gene were then surveyed.

Results: Three used methods confirmed true cloning in high efficiency. Nucleotide sequence of the gene revealed the 783 bp in length, encoding a polypeptide of 260 amino acid residues, with high similarity to that one registered in NCBI. The predicted molecular mass and isoelectric point of deduced polypeptide were 28437.3 Da and 5.46, respectively. Protein structures were not completely similar to those previously reported at PDB data base. Also, phylogenic study demonstrated that this gene belongs to the group I of TRs.

Conclusion: Due to successful cloning and high similarity of nucleotide and polypeptide sequences of gene with those recorded in world data bases; it is expected to get success in access to main purpose.

Keywords: *Agrobacterium*, Antisense, Bioinformatics, Cloning, *Hyoscyamus niger*, Tropinone reductase II, TR-II