جداسازی ژن هیوسیامین -β6- هیدروکسیلاز (*h6h*) از ریشه های کشت شده *Hyoscyamus niger* و همسانه سازی آن در باکتری *E.coli*

افسانه محکمی- حسن مرعشی- محمد فارسی- احمدرضا بهرامی[1]

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵

چکیده

اسکوپولامین بدلیل تأثیر ویژه بر اعصاب مرکزی از اهمیت ویژه ای در میان آلکالوئیدهای تروپانی برخوردار است. این ماده طی ۲ مرحله واکنش پی در پی از هیوسیامین بدست می آید. هر دو مرحله این واکنشها توسط آنزیم هیوسیامین -β6- هیدروکسیلاز (H6H) کاتالیز می شود. به منظور افزایش تولید اسکوپولامین در گونه های حاوی آلکالوئیدهای تروپانی، از طریق افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم هیوسیامین -β6-هیدروکسیلاز (H6H)، نیاز به جداسازی و همسانه سازی این ژن در باکتری *Escherchia coli* می باشد. برای این منظور استخراج RNA از ریشه های کشت شده *Hyoscyamus niger* انجام شد و cDNA آن پس از تولید و تکثیر در ناقل pUC19 قرار گرفته و سپس به باکتری *E.coli* سویه DH5α منتقل شد. و در مرحله نهایی قطعه کلون شده تعیین توالی شد. بر اساس نتایج بدست آمده، توالی ۱۱۴۷ نوکلئوتیدی قطعه DNA کلون شده مشخص شد. در نتایج بلاست قطعه DNA موردنظر با توالی *h6h* گونه *H.niger* در بانک اطلاعاتی تفاوت یک نوکلئوتیدی در مکان باز شماره ۱۲۴ مشاهده شد که سبب تغییر اسید آمینه والین (V) به ایزولوسین(I) در توالی آمینو اسیدی قطعه DNA کلون شده، می شود. در نتایج همراستایی چند گانه توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی قطعه کلون شده با توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی آنزیمهای مشابه، تغییرات مشابه ای در این مکان مشاهده گردید که احتمال وجود موتاسیون در این مکان را تقویت می کند. هر چند به دلیل خارج از دمین بودن این موتاسیون، احتمال فعال بودن این ژن همچنان وجود دارد.

واژه های کلیدی: اسکوپولامین، هیوسیامین -β6-هیدروکسیلاز، همسانه سازی، *Hyoscyamus niger*

مقدمه

آلکالوئید ها از دیر باز برای انسان شناخته شده و مورد استفاده دارویی قرار می گرفتند. یک گروه از این ترکیبات، آلکالوئیدهای تروپانی بوده که در ریشه تعدادی از گونه های خانواده سولاناسه مانند جنس های *Atropa*، *Duboisia* و *Hyoscyamus* تولید می شوند (۱۵). گیاه *H. niger* دارای مخلوطی از آلکالوئیدهای تروپانی مانند هیوسیامین، هیوسین یا اسکوپولامین و به مقدار کمتر آتروپین است. این آلکالوئیدها به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی کلینرژیک، در داروسازی دارای اهمیت می باشند (۱).

اسکوپولامین و هیوسیامین عمدتاً در سلولهای ریشه های جوان (سلولهای کامبیوم) تولید شده و به قسمتهای هوایی گیاه منتقل می شوند. اما از آنجایی که در سیستم کشت ریشه های عادی رشد به کندی صورت می گیرد، از کشت ریشه های تلقیح شده با *Agrobacterium rhizogenes* استفاده شده است، که در این روش رشد بیوماس و همچنین تولید آلکالوئیدها افزایش یافت (۱۷).

در مطالعات انجام شده، ریشه های مویین تراریخت گیاه *H.muticus* تلقیح شده با *A.rhizogenes*، افزایش رشد بیوماس و ثبات رشدی مطلوبی نشان دادند اما میزان آلکالوئیدها در کلون ریشه های مویین در واحد بیوماس نسبت به ریشه های معمولی متفاوت نبود (۲). در گیاهان باززایی شده از ریشه های مویین تراریخت حاصل از آزمایش مذکور افزایش رشد بیوماس ریشه مشاهده شد (۳). در ریشه های مویین *H.muticus* و بسیاری از گونه های حاوی آلکالوئیدهای تروپانی، هیوسیامین

۱- به ترتیب دانشجوی سابق، کارشناس ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد

آلکالوئید غالب بوده و اسکوپولامین درصد کمی از آلکالوئیدهای این گیاه را تشکیل می دهد (۱۳). با این وجود از آنجا که اسکوپولامین تاثیری قویتر از هیوسیامین بر سیستم اعصاب مرکزی داشته ولی اثرات جانبی نامطلوب کمتری بر جای می گذارد، تقاضای جهانی آن حدود ۱۰ برابر هیوسیامین است (۱۹). به این دلیل اقدامات گسترده ای در جهت تغییر الگوی آلکالوئیدی این گیاهان به منظور افزایش میزان اسکوپولامین انجام گرفته است (۱۹، ۱۸، ۱۴، ۹، ۸).

هیوسیامین طی ۲ واکنش پی در پی (هیدروکسیلاز واپوکسیداز) به اسکوپولامین تبدیل می شود. هر دو مرحله این واکنشها توسط آنزیم هیوسیامین -۶β-هیدروکسیلاز (H6H) انجام می شود (۷). این آنزیم توسط ژن *h6h* کد می شود. cDNA کد کننده این آنزیم اولین بار از طریق گزینش کتابخانه cDNA بدست آمده از ریشه های مویین *H.niger*، با استفاده از پروبهای الیگونوکلئوتیدی ایجاد شده بر اساس توالی آمینواسیدی آنزیم H6H جداسازی شد. قطعه کامل cDNA حاوی این ژن، دارای ۱۳۵۴ جفت باز می باشد که پروتئینی با ۳۴۴ اسید آمینه را کد می کند (۱۲). در سال ۱۹۹۹ با استفاده از توالی ژن *H.niger* (hnh6h) پرایمرهای اختصاصی ژن طراحی شد و با بکار بردن cDNA حاصل از RNAی کل ریشه های کشت داده شده، بعنوان رشته الگو، ژن مورد نظر را از طریق PCR جداسازی کرده و در نهایت وکتور بیان pLAL21 حاوی ژن *h6h* بدست آمد (۹). از pLAL21 در مطالعات بعدی در زمینه انتقال این ژن استفاده شده است.

ژن کامل *h6h* دارای۴۲۹۷ جفت باز بوده که شامل ۴ اگزون و ۳ اینترون می باشد(۱۰). این ژن از چند گونه دیگر خانواده سولاناسه نیز جداسازی شده است که در توالی های بدست آمده همولوژی نزدیکی مشاهده شد (۱۱). در ایران فقط جداسازی این ژن از گونه های *H.niger* و *H.tenuicaulis* توسط ابراهیم زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام شده است (۶). در راستای ادامه مطالعات انجام گرفته در آزمایشگاه ذکر شده، در زمینه مطالعه افزایش آلکالوئید های تروپانی، نیاز به وکتور بیان حاوی ژن *h6h* بود، اما از آنجا که این ساختار در اختیار ما قرار نگرفت و از طرف دیگر، نقش کلیدی این ژن در مسیر متابولیسمی اسکوپولامین و همچنین به منظور بومی ساختن این ساختار برای استفاده در مطالعات آینده، ژن موردنظر استخراج و همسانه سازی شد.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی

بذور *H.niger* بعنوان مواد گیاهی اولیه از دانشکده علوم دانشگاه تهران تهیه گردید. نخست برای تسریع در جوانه زنی، بذور گیاه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۰°C- قرار گرفتند (۶). سپس بذور به منظور تهیه گیاهچه سترون در شرایط استریل کشت داده شدند. ریشه های ۱/۵-۱ سانتی متری گیاهچه سترون به محیط کشت مایع B_5 (۳) حاوی ۱ میکرومول ایندول بوتیریک اسید (IBA) و ۳٪ ساکارز منتقل شدند. پس از حصول کلون ریشه در محیط کشت مایع، ریشه ها به محیط جامد B_5 بدون هورمون منتقل شده و پس از گذشت یک هفته برای استخراج RNA استفاده شدند.

استخراج RNA

مراحل استخراج RNA از روش فنل- کلروفورم طبق دستورالعمل آسف و همکاران(۴) با کمی تغییرات انجام شد. در این روش ۲۰۰ میلی گرم ریشه در حضور نیتروژن مایع پودر شده و به میکروتیوپ ۱/۵ml منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۴) به آن اضافه شد. محتوی میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر فنل و ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفورم به نمونه اضافه شد. مخلوط حاصله ورتکس و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از جمع آوری فاز رویی، مراحل بعد مطابق دستورالعمل ذکر شده انجام شد.

ساخت cDNA و تکثیر ژن *h6h* با استفاده از PCR

در تهیه cDNA از دستورالعمل کیت RevertAid ™ first Strand cDNA Synthesis Kit شرکت فرمنتاز استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از ۲۰ پیکو مول آغازگر برگشت انجام گرفت. آنزیم DNA پلیمراز *pfu* به علت دقت عمل بالا برای تکثیر ژن *h6h* در واکنش PCR در نظر گرفته شد. اما نخست برای اطمینان از ساخت cDNA و حصول شرایط اپتیمم PCR قطعه با آنزیم *Taq* polymerase تکثیر شد. برنامه چرخه ای PCR به صورت، سیکل نخست: ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۴۰

سیکل بعدی : ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۲°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و سیکل نهایی : ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت.

Forward primer: 5´-CCGGAATTCGGATCCC AACGTATAGATTCTTC-3´

Reverse primer: 5´-CGGGAATTC GAGCTC CAAACCATCACTGCAAT-3´

پس از بهینه سازی شرایط واکنش با استفاده از آنزیم *Taq*، ژن *h6h* توسط آنزیم DNA پلیمراز *pfu* تکثیر شد. برنامه چرخه ای واکنش PCR به صورت، سیکل نخست: ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل بعدی: ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه و سیکل نهایی : ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

برای تأئید تطابق محصول PCR با توالی ژن *h6h* در بانک اطلاعاتی، محصول PCR مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیمهای *Hae*III، *Rsa*I و *Pvu*II بصورت جداگانه و انفرادی، همراه با ۳ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C و سپس ۱۰ دقیقه در ۶۵°C(به منظور غیرفعال سازی) انجام گرفت.

اتصال محصول PCR به ناقل و ترانسفورماسیون

نخست برای افزایش خلوص محصول PCR، باند مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت فرمنتاز از روی ژل جداسازی شده و سپس محصول PCR استخراج شده از ژل و ناقل pUC19 برای تولید انتهای چسبان مشابه، بوسیله آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I که سایت برشی آنها در انتهای ´5 آغازگرها تعبیه شده بود، هضم شدند. واکنش هضم با استفاده از بافر آنزیم *Bam*HI، ۲ واحد آنزیم *Bam*HI و۴ واحد آنزیم *Sac*I انجام شد. به منظور اتصال محصول PCR به ناقل pUC19 از آنزیم T4 DNA ligase استفاده شد. واکنش با انکوباسیون شبانه در ۴°C انجام گرفت.

سلول باکتریایی مستعد ترانسفورماسیون(*E.coli* استرین DH5α)، مطابق روش کلرید کلسیم (۵) تهیه شد. به منظور ترانسفورماسیون از روش شوك حرارتی ۹۰ ثانیه در ۴۲°C و ۵ دقیقه در صفر درجه سانتی گراد استفاده گردید. پس از انجام مراحل ترانسفورماسیون، باکتریهای تراریخت به روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپلی سیلین، X-Gal و IPTG (۱۶) منتقل شدند.

تأیید پلاسمید نوترکیب حاوی ژن h6h

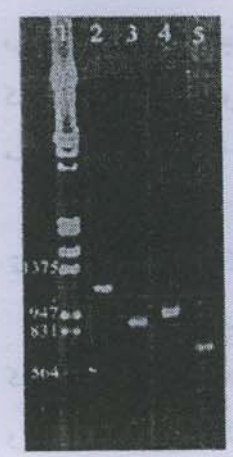
پس از استخراج پلاسمید به روش استخراج پلاسمید در حجم کم (۱۶)، پلاسمیدهای حاصله برای تأیید مورد هضم آنزیمی و واکنش PCR قرار گرفتند. برای تطبیق الگوی هضمی پلاسمید استخراج شده با الگوی هضمی پلاسمید نوترکیب مورد انتظار، از هضم مضاعف با آنزیمهای *Sac*I و *Bam*HI که کل ژن را از ناقل جدا می کنند و هضم انفرادی با آنزیم *Pvu*II استفاده شد. واکنش PCR مطابق مراحل تکثیر ژن با آنزیم *Taq* انجام گرفت (با تعداد سیکلهای کمتر). در مرحله نهایی برای تأیید این که قطعه وارد شده به پلاسمید همان ژن *h6h* می باشد، پلاسمید نوترکیب برای تعیین توالی قطعه وارد شده، به شرکت ژن فن آوران ارسال شد. تعیین توالی بر اساس آغازگرهای M13F و Mh13R انجام گرفت.

نتایج وبحث

استخراج RNA به روش فنل - کلروفورم از کیفیت قابل قبولی برخوردار بود. وضوح و کیفییت باندهای ۲۸s و ۱۸s ریبوزومی با کیفیت باندهای RNA در روش استخراج با گوانیدین ایزوتیوسیانات و شیب سزیم کلراید انجام شده توسط ابراهیم زاده و همکاران (۶) مشابه بود (شکل ۱).

قطعه تکثیر شده در واکنش PCR، ۱۱۷۷ جفت بازی بود که برابر با اندازه تعیین شده قطعه، بعد از طراحی پرایمر بر اساس توالی ژن در بانک اطلاعاتی بود. قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم های *Hae*III، *Rsa*I و *Pvu*II با نقشه آنزیمی توالی *h6h* موجود در بانک اطلاعاتی مطابقت داشته و صحت ژن تکثیر شده را تأیید کرد (شکل۲).

شکل(۱) RNA استخراج شده



چاهک ۱ : سایز مارکر / Lambda DNA EcoRI + Hind III
چاهک ۲ : محصول PCR
چاهک ۳ : هضم محصول PCR با *PvuII*
چاهک ۴ : هضم محصول PCR با *RsaI*
چاهک ۵ : هضم محصول PCR با *HaeIII*

شکل(۲) واکنش PCR و هضم محصول PCR

ترانسفورماسیون با موفقیت انجام شد و ۱۶ ساعت پس از کشت باکتریهای ترانسفورم شده در محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک، X-Gal و IPTG، کلونهای آبی و سفید تشکیل شدند. در نتایج هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم *Sac*I و *Bam*HI قطعات حدود ۲۷۰۰ جفت بازی (pUC۱۹) و ۱۱۵۰ جفت بازی (*h6h*) بدست آمد. هضم با آنزیم *Pvu*II قطعات حدود ۲۳۰۰، ۵۰۰ و ۹۵۰ جفت بازی حاصل شد که تمامی نتایج هضم با الگوی هضمی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *h6h* مطابقت دارد. در نتایج PCR تأییدی پلاسمید نوترکیب وجود باند حدود ۱۱۵۰ جفت بازی در نمونه پلاسمید نوترکیب، وجود ژن *h6h* را در این پلاسمید تأیید نمود.

بر اساس نتایج بدست آمده از رشته های رفت و برگشت توالی یابی، توالی ۱۱۴۷ نوکلئوتیدی قطعهDNA کلون شده بدست آمد. سپس به منظور مقایسه قطعه کلون شده با توالی *h6h* گونه *H.niger*، توالی مورد نظر در بانک اطلاعاتی NCBI به روش بلاست[1] جستجو شد. بررسی ها نشان داد که این قطعه (*hn2h6h*) با تعدادی از توالیهای موجود در بانک اطلاعاتی دارای همولوژی می باشد. بیشترین همولوژی را با ژن *h6h* استخراج شده از *H. niger* (hn1h6h) دارد. نتایج بلاست نشان داد که توالی قطعه کلون شده با توالی *h6h* گونه *H.niger* در بانک اطلاعاتی در ۳ مکان نوکلئوتیدی تفاوت وجود دارد. این تفاوتها در مکان بازهای شماره ۱۲۴، ۱۰۷۵ و ۱۰۷۷ رشته کلون شده قرار دارند. نوکلئوتید شماره ۱۲۴ در داخل منطقه CDS ژن می باشد که یک آدنوزین به جای گوانوزین قرار گرفته است. به منظور بررسی این مکان نوکلئوتیدی در میان cDNA ژنهای *h6h* گونه های دیگر و چند آنزیم با فعالیت مشابه در خانواده سولاناسه، همراستایی چند گانه[1] نوکلئوتیدی بین چندین گونه (شکل ۳) انجام شد. نتایج نشان داد که این مکان نوکلئوتیدی در cDNA ژنهای ذکر شده با تیمیدین و یا آدنوزین جایگزین شده است.

در نتایج بلاست پروتئینی بین توالی بدست آمده و توالی موجود در بانک اطلاعاتی مشخص شد که دو توالی در اسیدآمینه شماره ۳۱ متفاوت می باشند و اسیدآمینه ایزولوسین به جای اسیدآمینه

```
1-hn2h6h          GCACCATTACAGAAAAGAGCAGAAAAAGATGTTCCCATAGGAAATGATGTCCCTATTATT 147
2-hn1h6h          GCACCATTACAGAAAAGAGCAGAAAAAGATGTTCCCGTAGGAAATGATGTCCCTATTATT 158
3-Scopolia        GCACCATTAGAGAAAAGGGCAGAAAAGGATGTTCCCTTAGGAAATGATGTCCCTATGATT 114
4-Anisodus        GCACCATTAGATAAAAGGGCAGAAAAGGAAGTTCCCTTAGGAAATGATGTCCCTATCATT 173
5-Datura          GCACCATTAGAGAAAAGGGCAGAAAAGGATGTTGCTTTAGGAAATGATGTCCCTATTATT 165
6-S.demissum      GTTCCATTAGAAAAAAGAGTAAATGCAGATGTACCAATTGGTAAACATATTCCAGTTATT 120
7-dioxygenase.    TTGCCATTGCACGAAAGACCAGTGGATCCAGTTGAAATTGTGAACACTATTCCAGTAATT 128
8-2-oxoglutarate ATCCCAGTGCATGAAAGACCATCGGATCCAGTTGAAATTGTGGACTCTATTCCAGTCATT 163
                  *** *  *  **** *       **     * *   *   * * **  * ***
```

شکل(۳) نتایج همراستایی چندگانه توالیهای نوکلئوتیدی ذیل :

(۱) توالی کلون شده (hn2h6h). (۲) توالی mRNA ژن هیوسیامین ـβـ۶ـ هیدروکسیلاز گونه *H. niger* (hn1h6h)، کد بانک ژنM62719. (۳) توالی mRNA ژن هیوسیامین ـβـ۶ـ هیدروکسیلاز گونه *Datura metel*، کد بانک ژن AF435417. (٤) توالی mRNA پروتئین بیوستز آلکالوئید تروپانی گونه *Scopolia parviflora* کد بانک ژن AY762992. (۵) توالی mRNA ژن هیوسیامین ـβـ۶ـ هیدروکسیلاز گونه *Anisodus tanguticus*، کد بانک ژن AY356396. (۶) توالی mRNA هیوسیامین ـβـ۶ـ هیدروکسیلاز در گونه *Solanum demissum* کد بانک ژن AC136471. (۷) توالی mRNA دی اکسیژناز گونه *S. melongena* کد بانک ژن X77368. (۸) توالی mRNA دی اکسیژناز وابسته به ۲ـاگزوگلوتارات گونه *S. chacoense* کد بانک ژن AF104925.

1) Blast

والین قرار گرفته است. به منظور بررسی این مکان آمینواسیدی در ژنهای *h6h* استخراج شده از گونه های دیگر همراستایی چند گانه پروتئینی انجام شد (شکل ۴). بررسی ها نشان داد که در مکان مورد نظر در توالی های ذکر شده، این اسیدآمینه متفاوت بوده و اسیدآمینه لوسین یا ایزولوسین جایگزین والین شده است. اسیدهای آمینه والین (V) ایزولوسین (I) و لوسین (L) همگی مربوط به یک گروه آمینو اسید (اسیدهای آمینه خنثی) می باشند.

نتایج نشان داد که پروتئین توالی مورد نظر دارای دو دُمین حفاظت شده[1]، 2OG-FeII-oxygenase و Pcbs می باشد که هر دو آنها متعلق به اکسیژنازها و هیدروکسیلازهای وابسته به ۲-اکسوگلوتارات و Fe^{2+} غیر هم می باشند. این دو دُمین حفاظت شده در توالی hnh6h موجود در بانک اطلاعاتی نیز وجود دارد.

با توجه به نتایج همراستایی چند گانه نوکلئوتیدی مبنی بر اینکه در توالیهای مشابه در گونه های نزدیک به *H.niger*، این مکان نوکلئوتیدی متفاوت بوده و جایگزینی G ⟶ A نیز مشاهده می شود و در نتایج همراستایی چند گانه پروتئینی توالیهای مشابه در گونه های نزدیک به *H.niger*، در موقعیت اسیدآمینه ۳۱، اسیدآمینه لوسین یا ایزولوسین قرار گرفته است، می توان حدس زد که این قطعه در برگیرنده توالی آنزیم هیوسیامین β6- هیدروکسیلاز گونه *H.niger* (همراه با یک موتاسیون نقطه ای) می باشد.

با وجود موتاسیون مشاهده شده، به دلیل این که ۱- اسیدآمینه والین و ایزولوسین هر دو اسیدآمینه خنثی می باشند و ۲- تعبیری در مناطق دمین ایجاد نشده است، می توان حدس زد که پروتئین (آنزیم) توالی کلون شده دارای فعالیت آنزیمی مورد انتظار می باشد. اما آیا این تغییر در میزان فعالیت پروتئین توالی کلون شده در مقایسه با پروتئین *h6h* موجود در بانک اطلاعاتی تغییری ایجاد می کند یا نه، باید مورد بررسی قرار گیرد. در نهایت توالی cDNA کلون شده با کد DQ812529 در بانک ژن NCBI به ثبت رسید.

```
1-hn2h6h                  ----------MATFVSNWS--TKSVSESFIAPLQKRAEKDVPIGNDVPI 37
2-hn1h6h                  ----------MATFVSNWS--TKSVSESFIAPLQKRAEKDVPVGNDVPI 37
3-Scopolia                ----------MATLVSNWS--SNNVSESFIAPLEKRAEKDVPLGNDVPM 37
4-Anisodus                ----------MATLVSNWS--SNNVSESFIAPLDKRAEKEVPLGNDVPI 37
5-Atropa                  ----------MATLVSNWS--TNNVSESFVAPLEKRAENDVPLGNDVPI 37
6-Datura                  ----------MATLVSNWS--TNNVSESFIAPLEKRAEKDVALGNDVPI 37
7-S.demissum              ----------MASLVSSWSSEVNSIPEKYVVPLEKRVNADVPIGKHIPV 39
8-dioxygenase             ACCESSINCAAMADLLSNYSSKLEAVPPSHCLPLHERPVDPVEIVNTIPV 50
9-2-oxoglutarate-dependent----------MAELLSNWSSTLEAVPPSHCIPVHERPSDPVEIVDSIPV 39
                                     ** ::*.:*   : :. ..  *:.:*    * : . :*:
```

شکل(۴) نتایج همراستایی چندگانه توالیهای پروتئینی ذیل:

(۱) توالی پروتئینی قطعه کلون شده (hn2h6h). (۲) توالی پروتئینی هیوسیامین -β6- هیدروکسلاز گونه *H.niger* (hnlh6h)، کد بانک ژن M62719. (۳) توالی پروتئینی ژن هیوسیامین -β6- هیدروکسیلاز گونه *Datura metel*، کد بانک ژن AAQO4302 (۴) توالی پروتئین بیوسنتز آلکالوئید تروپاتی گونه *Scopolia parviflora*، کد بانک ژن AAY53932 (۵) توالی پروتئینی هیوسیامین -β6-هیدروکسیلاز گونه *Atropabelladonna*، کد بانک ژن BAA78340(۶) توالی پروتئینی هیوسیامین -β6- هیدروکسیلاز در گونه *Anisodus Languticus* کد بانک ژن AAQ75700 (۸) توالی پروتئینی دی اکسیژناز گونه *S.melongena* کد بانک ژن X77368(۹) توالی پروتئینی دی اکسیژناز وابسته به ۲-اگزوگلوتارات گونه S.chacoense کد بانک ژن AAC95363.

1) Conserved Domain

منابع

۱. زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران.

۲. ذوالعلی، ج. ۱۳۸۲. بررسی ویژگیهای رشدی ریشه های مویین گیاه *Hyoscyamus niger* حاصل از تلقیح *Agrobacterium rhizogenes*. پایان نامه کارشناسی ارشد. کتابخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. محمودنیا میمند، م. ۱۳۸۴. بررسی امکان باززایی گیاهان تراریخت بذرالبنج از ریشه موئین های حاصل از تلقیح با باکتری *A.rhizogenes* به منظور افزایش مواد آلکالوئیدی. پایان نامه کارشناسی ارشد. کتابخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

4. Asif, M., Dhawan, P. and Nath, P. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from rippen banana fruit. Plant Molcular Biology. 18: 109-115
5. Cimmyt applied molecular genetics laboratory. Third ed. In www. generationcp. org/ capcorner/ chile_wksp_2005/manuals/manual_01.pdf
6. Ebrahimzadeh, H., Teimoori, A. and Lohrasebi, T. 2003. Hyoscyamine 6?-hydroxylase gene isolation from invitro cultured roots of Hyoscyamus niger L. and Hyoscyamus tenuicaulis Schonbeck-Temesy . DARU. 11(1)
7. Hashimoto, T., Matsuda, J. and Yamada, Y. 1993. Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6?-hydroxylase. FEBS Lett. 329: 35-39
8. Hashimoto, T., Yun, D.-J. and Yamada, Y. 1993. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry. 42: 713-718.
9. Jouhikainen, K., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, H.T. and Oksman-Caldentey K.-M. 1999. Enhanced scopolamine production in Hyoscyamus hairy root cultures by genetic engineering. Planta. 208: 545-551.
10. Kanegae, T., Kajiya, H., Amano, Y., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1994. Species- dependent expression of the hyoscyamine 6?-hydroxlase gene in pericycle. Plant Physiol. 105: 483-490
11. Liu, T., Zhu, P., Cheng, K., Meng, C. and He, H. 2005. Molecular cloning, expression and characterization of hyoscyamine 6?-hydroxlase from hairy roots of Anisodus tanguticus. Planta Med. 71: 249-253
12. Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T. and Yamada,Y. 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6?-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of Hyoscyamus niger. J. Biol. Chem. 266: 9460-9464
13. Oksman-Caldentey, K.-M. and Hiltunen, R. 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field Crops Research. 45: 57-69.
14. Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R.-M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K.-M. and Pinol, M.-T. 2003. Alkaloid production in Duboisia hybrid hairy roots and plants overexpressing the h6h gene. Plant Science. 165(6): 1289-1295.

15. Ramavat, K.G. and Merillon, J.M. 1999. Biotechnology: Secondary Metabolites. Science Publishers, Enfield, USA, 372 pp.
16. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
17. Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using Agrobacterium rhizogenes. Physiol. Plant. 79: 140-146
18. Yun, D., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1992. Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic Atropa belladonna with an improved alkaloid composition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 11799?11803.
19. Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey,K.-M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., Zhang, H., Kai, G., Liao, Z., Sun, X. and Tang, K. 2004. Engineering tropane biosynthetic pathway in Hyoscyamus niger hairy root cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101 (17): 6786-6791.

Isolation of h6h gene from cultured roots of Hyoscyamus niger and cloning it in *E.coli*

A.Mohkami – H.Marashi – M.Farsi – A.R. Bahrami[1]

Abstract

Scopolamine is the most valuable tropane alkaloids for its effects on central nervous system. Scopolamine is the end propduct of biosynthetic pathway of tropane alkaloids Produced after two successive reactions (hydroxylase and epoxidase) from hyoscyamine. Both reactions are catalyzed by hyoscyamine-6*ß*-hydroxylase (H6H) which is encoded by the h6h gene. In order to enhance the production of scopolamine in species containing tropane alkaloids through overexpression of the h6h gene, it is necessary that this gene to be isolated and cloned in *E. coli*. Therefore, RNA was isolated from cultured root of *H. niger*. After production of cDNA, amplified cDNA ligated to vector (pUC19) and then transformed to *E. coli*, strain DH5?. Recombinant plasmid was extracted and for confirmation of that, digestion, PCR and sequencing were carried out. Results of sequencing determined 1147 nucleotides of cloned fragment. Result of homology search with h6h sequence in NCBI database showed that there are three different nucleotides, one of which them was in CDS area. Due to this change, Valine amino acid is replaced with Isoleucine, which both of them the same group. Multiple alignment of cloned fragment showed that similar changes exist among other species in this position. These results suggest possibility of mutation in this position. Since the mutation is not in the conserved domiane, the gene could still be active.

Key words: Scopolamine, Hyoscyamine-6ß-hydroxylase, Cloning, Hyoscyamus niger

[1]- Contribution from college of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad