وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه بین المللی امام خمینی
دانشکده فنی و مهندسی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

همسانه سازی ژن تروپینون رداکتاز- I (*tr-I*) در باکتری *E. coli*

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

نگارش:
لیلا پناهنده

اساتید راهنما:
دکتر قاسمعلی گروسی
و
دکتر رحیم حداد

شهریور ۱۳۸۸

چکیده

آلکالوئید های گیاهی گروه های بزرگی از تولیدات طبیعی را تشکیل می دهند، که ترکیبات فعال دارویی فراوانی را مهیا می سازند. ریشه های برخی از گیاهان خانواده سولاناسه (Solanaceae) مانند گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) توانایی تولید آلکالوئیدهای تروپانی مانند هیوسیامین و اسکوپولامین را دارند. این دو آلکالوئید عمدتاً در سلول های ریشه های کامبیون جوان تولید می شوند. آن ها عمدتاً بدلیل تأثیر روی سیستم عصبی پاراسمپاتیک، داروهای مهمی بشمار می آیند. ژن های زیادی در مسیرهای بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها مطالعه شده اند که همسانه سازی ژن و مهندسی متابولیک این آلکالوئیدها را ممکن می سازند.

در این بررسی به منظور تهیه ساز واره عامل تولید هیوسیامین از طریق مهندسی ژنتیک، ژن کد کننده آنزیم تروپینون رداکتاز I جداسازی و در باکتری *E. coli* همسانه سازی شد. برای این منظور نخست RNA کل از ریشه های کشت شده *H. niger* تحت شرایط *in vitro* استخراج و پس از انجام واکنش RT- PCR، ژن هدف از طریق واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر گردید. سپس ناقل pUC19 در جایگاه برشی آنزیم محدودگر *Bam*HI با این ژن نوترکیب شده و باکتری *E. coli* سویه DH5α توسط ناقل نوترکیب ترانسفورم گردید. پس از انتخاب کشت باکتری های تراریخت، پلازمید از آن ها استخراج و درستی همسانه سازی بوسیله هضم آنزیمی و PCR تأیید شد. در مطالعه همردیف سازی توالی ژن هدف و اسید آمینه تخمینی آن با اطلاعات موجود در NCBI به ترتیب به میزان ۹۵٪ و ۹۱٪ مشابهت مشاهده گردید.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱ تیره سولاناسه ۲

۱-۱-۱ جنس بنگدانه ۳

۱-۱-۲ هیوسیاموس نایجر (*Hyoscyamus niger*) ۴

۱-۲ متابولیت های ثانویه ۵

۱-۳ مهندسی ژنتیک مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه (تروپان آلکالوئیدها) ۶

۱-۴ الیسیتورها ۷

۱-۵ آلکالوئیدهای گیاهی ۸

۱-۵-۱ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۹

۱-۶ تروپان رداکتازها ۱۱

۱-۶-۱ ساختار و وظیفه دو تروپینون رداکتاز (TR- I و TR- II) ۱۴

۱-۶-۲ سیر تکاملی تروپینون رداکتازها ۱۶

۱-۷ همسانه سازی ژن ۱۹

۱-۷-۱ ناقل های همسانه سازی ۲۰

۱-۷-۱-۱ ناقلین پلازمیدی ۲۳

۱-۷-۲ آنزیم های مورد نیاز برای دستکاری DNA ۲۵

۱-۷-۳ انتخاب ژن ۲۶

۱-۷-۴ انتخاب میزبان مناسب ۲۷

۱-۷-۵ روش های وارد کردن ناقل ها به داخل میزبان ۲۷

۱-۷-۶ همسانه سازی محصولات پی سی ار ۲۸

۱-۷-۶-۱ طراحی آغازگرها ۲۸

۱-۷-۷ دلایل ضرورت انجام تحقیق ۲۹

فصل دوم: بررسی منابع ۳۰
۲-۱ کشت ریشه ۳۱
۲-۲ تیمار جاسمونات و متیل جاسمونات ۳۳
۲-۳ تروپان آلکالوئیدها ۳۶
۲-۴ مهندسی ژنتیک مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۳۷

فصل سوم: مواد و روش ها ۴۱
۳-۱ مواد گیاهی و تیمار جوانه زنی ۴۲
۳-۲ ضدعفونی بذرها ۴۲
۳-۳ محیط های کشت و نحوه تهیه آن ها ۴۳
۳-۳-۱ محیط کشت مایع B5 ۴۳
۳-۳-۲ محیط کشت جامد B5 ۴۴
۳-۴ کشت بذرها ۴۴
۳-۵ کشت ریشه ها در محیط کشت مایع ۴۴
۳-۶ تیمار با الیسیتور ۴۵
۳-۷ استخراج RNA کل ۴۶
۳-۷-۱ ضدعفونی مواد و وسایل مورد استفاده جهت استخراج RNA ۴۶
۳-۷-۲ استخراج RNA ۴۶
۳-۸ تخمین کمیت و خلوص RNA ۵۰
۳-۸-۱ تخمین کمیت و خلوص به وسیله اسپکتروفتومتر ۵۰
۳-۸-۲ تعیین کیفیت RNA بوسیله الکتروفورز ژل آگارز حاوی فرمالدئید ۵۱
۳-۹ واکنش نسخه برداری معکوس: ساخت cDNA ۵۲
۳-۱۰ تعیین کیفیت محصول واکنش نسخه برداری معکوس بوسیله الکتروفورز ژل آگارز ۵۴
۳-۱۱ واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۶
۳-۱۲ طراحی آغازگرها ۵۷
۳-۱۳ بررسی محصولات PCR ۵۸
۳-۱۴ خالص سازی محصولات PCR از ژل آگارز ۵۸

۳-۱۵ هضم آنزیمی محصولات PCR خالص سازی شده از ژل ۵۹
۳-۱۶ تغلیظ پس از هضم آنزیمی ۶۰
۳-۱۷ هضم آنزیمی ناقل پلازمیدی و حذف فسفر پایانه ′۵ ۶۱
۳-۱۸ اتصال ژن *tr- I* به ناقل pUC19 ۶۴
۳-۱۹ رشد و تکثیر باکتری *E. coli* ۶۶
۳-۲۰ انواع مختلف محیط های کشت باکتری و نحوه تهیه آن ها ۶۶
۳-۲۰-۱ محیط کشت LB ۶۷
۳-۲۰-۲ محیط کشت SOB ویژه غربال باکتری های تراریخت ۶۷
۳-۲۰-۳ محیط کشت SOC ۶۸
۳-۲۱ ذخیره باکتری های رشد یافته در محیط کشت مایع ۶۸
۳-۲۲ مستعد سازی سلول های *E. coli* ۶۹
۳-۲۳ تراریخت کردن سلول های مستعد *E. coli* با استفاده از شوک حرارتی ۷۱
۳-۲۴ استخراج پلازمید با استفاده از محلول قلیایی و SDS ۷۲
۳-۲۵ بررسی پلازمید نوترکیب ۷۵
۳-۲۵-۱ بررسی کلونی های نوترکیب توسط PCR ۷۵
۳-۲۵-۲ بررسی کلونی های نوترکیب توسط هضم آنزیمی ۷۵
۳-۲۷ توالی یابی DNA ۷۵

فصل چهارم: نتایج و بحث ۷۶
۴-۱ تیمار جوانه زنی بذرها ۷۷
۴-۲ ریشه زایی ۷۷
۴-۳ استخراج RNA ۷۹
۴-۴ نسخه برداری معکوس (Reverse Transcriptase) از ژن هدف ۸۰
۴-۵ واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۸۲
۴-۶ خالص سازی محصولات PCR از ژل ۸۳
۴-۷ هضم آنزیمی ژن *tr- I* و ناقل پلازمیدی ۸۴
۴-۸ اتصال ژن *tr- I* به ناقل pUC19 ۸۴

۴-۹ تراریختی *E. coli* با سازواره تهیه شده ۸۵
۴-۱۰ تأیید کلونی های نوترکیب بوسیله هضم آنزیمی و PCR ۸۶
۴-۱۱ توالی یابی DNA ۸۹
نتیجه گیری نهایی ۹۱
پیشنهادها ۹۲
منابع ۹۳
پیوست ها ۱۰۰

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: تروپینون رداکتاز خانواده Solanaceae ۱۵

جدول ۳-۱: محیط کشت جامد B5 ۴۳

جدول ۳-۲: ترکیب محلول واکنش RT- PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ۵۴

جدول ۳-۳: ترکیب محلول واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ۵۷

جدول ۳-۴: مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت PCR اختصاصی ۵۸

جدول ۳-۵: مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی cDNA ژن *tr- I* ۶۰

جدول ۳-۶: مقدار و غلظت ترکیبات واکنش اتصال DNA هدف به ناقل پلازمیدی ۶۵

جدول ۳-۷: ترکیبات محیط کشت LB ۶۷

جدول ۳-۸: ترکیبات محیط کشت SOB ۶۸

جدول ۴-۱: نتایج اسپکتروفتومتری RNA کل ۷۹

فهرست اشکال

شکل ۱- ۱: مسیر بیوسنتز نیکوتین و تروپان ۱۲

شکل ۱- ۲: بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۱۳

شکل ۱- ۳: مدل پروتئینی TR- I و TR- II از گیاه *D. stramonium* ۱۴

شکل ۱- ۴: نمودار درختی فیلوژنی گیاهان گلدار (نهان دانه گان) ۱۸

شکل ۱- ۵: مراحل اصلی یک آزمایش همسانه سازی ۲۲

شکل ۱- ۶: ناقل پلازمیدی pUC ۲۵

شکل ۴- ۱: ریشه های رشد یافته گیاه *H. niger* ۷۸

شکل ۴- ۳: RNA استخراج شده از ریشه های گیاه بنگدانه ۸۰

شکل ۴- ۴: cDNA ساخته شده توسط RT- PCR و پرایمر برگشتی اختصاصی ۸۱

شکل ۴- ۵: نتایج PCR در دماهای اتصال متفاوت ۸۲

شکل ۴- ۵: الکتروفورز محصولات PCR جهت خالص سازی ۸۳

شکل ۴- ۶: الکتروفورز محصول خالص سازی شده ژن ۸۳

شکل ۴- ۷: هضم آنزیمی ژن *TR- I* و ناقل پلازمیدی pUC19 ۸۵

شکل ۴- ۸: الکتروفورز آزمون اتصال DNA هدف به DNA ناقل ۸۶

شکل ۴- ۹: شناسایی کلونی های نوتریب باکتریایی با استفاده از آزمون سفید- آبی ۸۷

شکل ۴- ۱۰: هضم آنزیمی پلازمید نوترکیب استخراج شده کلونی های تراریخت توسط آنزیم محدودالاثر *Bam*HI ۸۸

شکل ۴- ۱۰: PCR پلازمید های استخراج شده از کلونی های نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی ژن *tr- I* ۸۸

اصطلاحات و اختصارات

Complementary DNA	cDNA
Diethyl pirocarbonate	DEPC
Dithiothreitol	DTT
Ethylen diamin thetra acetic acid	EDTA
Hyoscyamine 6β- hydroxylase	H6H
Indolyl-3-butyric acid	IBA
Jasmonic acid	JA
Methyl jasmonate	MJ
Naphtaleneacetic acide	NAA
Polymerase chain reaction	PCR
Potrescine *N*-methyltransferase	PMT
Rapid amplification of cDNA end	RACE
Ribonucleic acid	RNA
Rreverse transcription PCR	RT-PCR
Short- chain dehydrogenases/ reductases	SDR
Tropinon reductase-I	TR-I
Tropinone reductase-II	TR-II
Ultra vilot	UV

فصل اول

مقدمه

۱-۱ تیره سولاناسه[1]

در این تیره ۲۵۰۰ گونه در ۹۰ جنس جای دارند که در نواحی گرم کره زمین مخصوصاً آمریکای مرکزی و جنوبی و یا در نواحی معتدله پراکنده اند.

گیاهان این تیره غالباً گیاهان علفی یکساله یا پایا و بندرت بالا رونده یا دارای اعضاء کاملاً چوبی و درخت مانند می باشند. برگ های آن ها متناوب معمولاً بدون گوشوارک[2] ساده یا لوب دار و یا مرکب از برگچه های مساوی است. گل های آن نر- ماده (دو جنسی)، بندرت شامل یکی از اجزای گل (پرچم یا مادگی) منفرد یا مجتمع بصورت گرزن های دوسویه بوده و یا وضع در هم دارند. اجزای گل آن ها ۵ تایی است، ولی در بین آن ها انواعی با پرچم های کمتر نیز دیده می شود. مادگی آن ها اصولاً ۲ برچه‌ای و محتوی تخمک های فراوانی است. در بعضی از این گیاهان کاسه گل در طی دوران نمو میوه به صورتی در می آید که آن را مانند غشاء نازک و قرمز رنگ که فقط در انتها کمی باز است، فرا می گیرد. جام گل در انواع مختلف این گیاهان به صورت قیفی شکل، استکانی و یا دارای ظاهر چرخ مانند است. با آنکه در غالب این گیاهان تخمدان دارای بیش از دو خانه نیست با این وجود در بعضی از آن ها مانند گونه های جنس داتوره[3] حفره تخمدان بر اثر بوجود آمدن جدارهای داخلی به ۴ خانه تبدیل می شود. در بعضی از آن ها نیز مانند گوجه فرنگی تخمدان دارای بیش از ۱۰ خانه است. میوه آن ها به صورت های مختلف گوشتدار (سته) یا پوشینه (کپسول) و محتوی دانه های فراوان آلبومن دار می باشد. جنس های مهم این تیره به قرار زیر می باشد (خاتم ساز ۱۳۷۷):

Solanum دارای حدود ۲۰۰۰ گونه

Datura با ۱۰ گونه

Hyoscyamus با ۱۱ گونه

Lyciun با۱۰۰ گونه

Capsicum با ۳۰ گونه

Atropa با ۲ گونه

Nicotiana با ۷۵ گونه

Cestrum با ۱۵ گونه

---

[1]- Solanaceae
[2]- Stipul
[3]- Datura

در ادامه با توجه به موضوع تحقیق به اختصار در مورد جنس بنگدانه توضیحاتی داده می شود.

۱-۱-۱ جنس بنگدانه[۴]

از میان جنس های این تیره، بنگدانه با نام علمی هیوسیاموس (*Hyoscyamus* sp.) گیاه دارویی مهمی است. از جنبه دارویی خواص ضد درد، تشنج، درد مفاصل، رماتیسم و دردهای عصبی از این گیاه گزارش شده است.

بنگدانه گیاهی است علفی یک ساله، دو ساله یا چند ساله، پوشیده از کرک تا بدون کرک، برگ ها ساده، سینوسی، لب دار یا کاملاً منقسم هستند. گل ها معمولاً نامنظم، مجتمع در گرزن یک سویه یا دو سویه، به رنگ سفید تا متمایل به بنفش، یا زرد هستند که اغلب دارای رگه های کاملاً مشخص بنفش می باشند. کاسه گل کوزه ای یا استکانی- لوله ای، واجد ۵ دندانه نوک تیز است که کپسول را در بر می گیرد. جام گل قیفی- استکانی، در سطح خارجی گاهی واجد کرک و غده می باشد که دارای ۵ لبه کوچک با حاشیه مدور است. دارای ۵ عدد پرچم، تخمدان دو خانه ای، با تخمک های فراوان، خامه رشته ای، کلاله سرسان، دولبه می باشد.

میوه ها کپسول با سرپوش باز می باشند و دانه ها کلیوی- عدسی شکل، سطح آن غده دار یا مشبک- چاله دار است.

جنس هیوسیاموس دارای ۱۲ گونه به شرح زیر می باشد:

۱- *H. insanus*

۲- *H. bronmulleri*

۳- *H. tenuicaulis*

۴- *H. malekianus*

۵- *H. leptocalyx*

۶- *H. senecionis*

۷- *H. niger*

۸- *H.reticulatus*

۹- *H. squarrosus*

---

[4]- *Hyoscyamus*

۱۰- *H. kurdicus*

۱۱- *H. arachnoids*

۱۲- *H. turcomanicus*

در اینجا با توجه به موضوع پژوهش تنها به توضیحات اجمالی در خصوص هیوسیاموس نایجر بسنده می شود (خاتم ساز ۱۳۷۷).

۱-۱-۲ هیوسیاموس نایجر (*Hyoscyamus niger*)

گیاهی علفی، دو ساله است، دارای ساقه ای استوانه ای شکل، خمیده در ناحیه رأس و به ارتفاع ۶۰ تا ۸۰ سانتی متر که درکنار جاده ها، اماکن مخروبه و نواحی بایر غالب نقاط اروپا، نقاط غربی و مرکزی آسیا و ایران می روید. دارای ریشه راست، دراز و نسبتاً ضخیم است. برگ های آن متناوب و مثلث شکل و نوک تیز بوده و در قسمت انتهایی ساقه معمولاً عاری از دمبرگ و منقسم به لوب های نامساوی نوک تیز است. درازی برگ ها به ۲۰ و پهنای آن ها ۵ تا ۷ سانتی متر می رسد. رنگ آن ها سبز مایل به زرد و دارای شبکه ای از خطوط ظریف و به رنگ ارغوانی است (خاتم ساز، ۱۳۷۷).

هیوسیاموس نایجر (بنگدانه سیاه) یکی از مهمترین گیاه داروئی متعلق به خانواده سولاناسه است (لابوراتویر و همکاران[5]، ۲۰۰۵) خاصیت داروئی بنگدانه با مقدار تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین[6] و هیوسیامین[7] آن همبستگی دارد (اورانبی[8]، ۲۰۰۵). هیوسیامین عمدتاً در سلول های ریشه های جوان این گیاه (سلول های کامبیون) تولید و به قسمت های هوایی منتقل می شود (محکمی و همکاران، ۱۳۸۵).

۱-۲ متابولیت های ثانویه

متابولیت های ثانویه ترکیباتی با وزن مولکولی کم می باشند که به میزان زیاد در سرتاسر گیاه ساخته می شوند. گیاهان انواع زیادی از متابولیت های ثانویه را تولید می کنند که در بقای

---

[5]- Laboratoire *et al*.
[6]- Scopolamine
[7]- Hyoscyamine
[8]- Uranbey

آن ها در زیستگاه شان نقش مهمی دارند. بنابراین متابولیت های ثانویه گیاهی در مقاومت به آفات و بیماری ها، جذب گرده، اثر متقابل با میکروارگانیزم های همزیست و... شرکت دارند.

آن ها همچنین بدلیل اینکه تعیین کننده کیفیت غذا (رنگ، طعم و بو) و آرایش گیاهان (رنگ گل، عطر) هستند، حائز اهمیتند. افزون بر این تأثیرات گوناگون متابویت های ثانویه در بهبود سلامتی و فعالیت های پیشگیری از بیماری در حال روشن شدن است، از جمله خواص آنتی اکسیدانی و کاهش کلسترول خون. بعلاوه، تعدادی از متابویت های ثانویه استخراج شده از گیاهان به عنوان مواد شیمیای مفید از نظر تجاری در دسترس هستند، به عنوان مثال داروها، رنگ ها، چاشنی ها، خوش بوکننده ها و حشره کش ها. برخی از این مواد شیمیایی زیستی بدلیل مقدار کم آن ها در گیاهان طبیعی، گران قیمت هستند (لی زانگ و همکاران[۹]، ۲۰۰۴).

تا سال ۲۰۰۵ تقزیباً ۱۰.۰۰۰ متابولیت ثانویه شناخته شده است. بزرگترین گروه از آن ها شامل ایزوپرنوئیدها با بیش از ۱/۳ تمام ترکیبات شناخته شده و دومین گروه بزرگ را آلکالوئیدها تشکیل می دهند که شامل خیلی از داروها و سموم می باشند (لی زانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

در سال های اخیر توجه به متابویت های ثانویه به سرعت رو به افزایش است. جریان پیشرفت در بیوتکنولوژی گیاهی، تولید متابولیت های ثانویه مفید از جمله آلکالوئیدها، ترپنوئیدها را بوسیله کشت سلول ها، اندام و بافت گیاهی مهیا می سازد (گانتت و همکاران[۱۰]، ۱۹۹۷). در این بین، کشت های ریشه بدلیل سرعت رشد زیادشان و ثبات تولید متابولیت به عنوان نمونه موثر از تولید بیوماس ، نشان داده شده اند (کاروالهو و همکاران[۱۱]، ۱۹۹۸). علاوه بر این مهمترین مکان بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ریشه ها می باشند (هاشیموتو و همکاران[۱۲]، ۱۹۹۱; سوزوکی و همکاران[۱۳]، ۱۹۹۹).گزارش های زیادی از کشت ریشه چندین گونه سولاناسه به منظور استخراج شیمیایی آن ها داده شده است (هیلتون و همکاران[۱۴]، ۱۹۹۰). البته تولید به این روش بدلیل محصول کم با موفقیت کمی همراه بوده (ایبل[۱۵]، ۱۹۸۶; بویتلر و ترمپر[۱۶] ۱۹۹۲; کاسیدو و همکاران[۱۷]، ۱۹۹۹) و در بیشتر موارد محصولات طبیعی تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و

---

[9]- Lei Zhang *et al*.
[10]- Gantet *et al*.
[11]- Carvalho *et al*.
[12]- Hashimoto *et al*.
[13]- Suzuki *et al*.
[14]- Hilton *et al*.
[15]- Ebel
[16]- Buitelaar and Tramper
[17]- Cusido *et al*.

هیوسیامین برای استفاده تجاری بسیار پایین است. بنابراین لازم است که میـزان تولیـد آلکالوئیـد برای بهره برداری تجاری افزایش یابد (مویانو و همکاران[18]، ۲۰۰۲).

۱-۳ مهندسی ژنتیـک مسـیر بیوسـنتز متابولیـت هـای ثانویـه (تروپـان آلکالوئیدها)

برای غلبه بر تولید پایین محصول، تحقیقات بـه سـمت بهینـه کـردن وضـعیت کشـت و انتخاب لاین های سلولی با محصول بالا سوق یافته اسـت (کانـگ و همکـاران[19]، ۲۰۰۴). یکـی از راه های بهبود افزایش متابولیت های ثانویه، بهبود تولید بیومـاس مـی باشـد (دیچـاکس و بویتـل کونتی[20]، ۲۰۰۵). از روش های مفید دیگر در این خصوص اسـتفاده از انـواع الیسـیتورها[21](زائـو و همکاران[22]، ۲۰۰۵) و همچنین استفاده از مهندسـی ژنتیـک مـی باشـد (هاشـیموتو و همکـاران، ۱۹۹۳; جاهیکاینن و همکاران[23]، ۱۹۹۹). اخیراً تحقیقات قابـل توجـه ای در خصـوص مهندسـی ژنتیک تروپان آلکالوئیدهای مهم دارویی در حال انجام است (اوکـزمن کالـدنتی و آروو[24]، ۲۰۰۰). در این میان مهندسی مسیرهای بیوسنتز متابولیت های ثانویه در سلول هـای کشـت شـده بـرای افزایش یا کاهش مقدار ترکیبات یا گروهی از ترکیبات مورد نظر، روش مناسبی است (دیگـزون[25]، ۲۰۰۱). بیان بیشتر آنزیم های تنظیم کننده مسیر تروپان آلکالوئیدها، بیوسنتز محصول نهـایی را افزایش خواهد داد (سان لی و همکاران[26]، ۲۰۰۵). در این راستا تلاش های زیادی برای مهندسـی متابولیکی سلول های گیاهی با تمرکز روی دستکاری کردن مسـیر بیوسـنتز تروپـان آلکالوئیـدها برای افزایش تولید آن ها صورت گرفته است (ساتو و همکارن[27]، ۲۰۰۱). در مراحـل منحصـربفرد مهندسی ژنتیک برای افزایش فعالیت آنزیم، بیان بیشتر ژن های درونی، یـا معرفـی یـک ژن غیـر مشابه بسیار مناسب و بدین صورت غلبه بر مراحل خاص محدود کننده سرعت در مسیر بیوسنتز، خاموش کردن مسیرهای رقابتی و کاهش کاتابولیسم محصول مورد نظر، می توانـد مـورد بررسـی قرار گیرد. تاکنون کارهای قابل توجهی با درجات مختلفـی از موفقیـت روی مهندسـی مسـیرهای

---

[18]- Moyano *et al*.
[19]- Kang *et al*.
[20]- Dechaux and Boitel- Conti
[21]- Elicitores
[22]- Zhao *et al*.
[23]- Jouhikainen *et al*.
[24]- Oksman Caldentey and Arroo
[25]. Dixon
[26]- Sun Lee *et al*.
[27]. Sato *et al*.

منفرد بیوسنتز در گیاهان انجام گرفته است (لی زانگ و همکاران، ۲۰۰۵). با این حال مسیر کامل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها تاکنون به طور کامل درک نشده است و تنها تعداد کمی از آنزیم های شرکت کننده در مسیر، استخراج و ژن های مرتبط با آن ها همسانه سازی شده اند (سان لی و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۴ الیسیتورها

در بیشتر موارد محصول تروپان آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین در کشت های درون شیشه[۲۸] بسیار کم است. برای غلبه به این محدودیت ها یکی از روش های مفید استفاده از الیسیتورهاست. در یک مفهوم کلی، الیسیتورها فاکتورهای زنده و غیر زنده ای هستند که در تحریک پاسخ های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و همچنین تولید فیتوآلکسین در گیاهان نقش دارند، تعداد زیادی از این قبیل تیمارها به طور موثر تولید سطح وسیعی از متابولیت های ثانویه گیاهی را هم در کشت درون شیشه و هم درون محیط زنده[۲۹] افزایش داده است (زائو و همکاران[۳۰]، ۲۰۰۵). مولکول های الیسیتور فعل و انفعالاتی با گیرنده غشاء سلولی ایجاد می کنندکه در این میان یک مکانیسم ناشناخته ژنهای خاصی را فعال می کند که نتیجه آن سنتز تقریباً تمام گروه های شیمیایی تولیدات ثانویه گیاهی است (زائو و همکاران، ۲۰۰۱). در میان انواع الیسیتورها، جاسمونات اسید و ترکیبات وابسته به آن مدت زمان طولانی است که به عنوان انتقال دهنده های سیگنال برای تولید متابولیت های شناخته شده اند (فارمر و همکاران[۳۱]، ۲۰۰۳). تأثیر متیل جاسمونات[۳۲] خارجی به عنوان ماده موثر در تولید متابولیت های ثانویه در کشت های سلول گیاهی تأیید شده است (کت چام و همکاران[۳۳]، ۱۹۹۹). همچنین ثابت شده که تیمار MJ می تواند انباشتگی چندین گروه از آلکالوئیدها شامل بنزوفنانتریدین ها[۳۴]، وینکا[۳۵] آلکالوئیدها و تروپان آلکالوئیدها را در یک سری از گونه های گیاهی افزایش دهد (گاندلاچ و همکاران[۳۶]، ۱۹۹۳).

---

[28]- *In vitro*
[29]- *In vivo*
[30]- Zhao *et al*.
[31]- Farmer *et al*.
[32]- Methyl jasmonate (MJ)
[33]- Ketchum *et al*.
[34]- Benzophenanthridines
[35]- Vinca
[36]- Gundlach *et al*.

جاسمونیک اسید[۳۷] و متیل جاسمونیک به عنوان شرکت کننده در قسمتی از مسیر هدایت سیگنال، آنزیم های خاصی را برای کاتالیز کردن واکنش های بیوشیمیایی تولید کننده ترکیبات دفاعی با وزن مولکولی کم در گیاهان مانند پلی فنول ها[۳۸]، آلکالوئیدها، کوئینون ها[۳۹]، ترپنوئیدها[۴۰] و پلی پپتیدها[۴۱] تحریک می کنند (میزوکامی و همکاران[۴۲]، ۱۹۹۳; ویلیام و همکاران[۴۳]، ۱۹۹۶)

۱-۵ آلکالوئیدهای گیاهی

آلکالوئیدهای گیاهی یکی از بزرگترین گروه های تولیدات طبیعی را تشکیل می دهند که تعداد زیادی از ترکیبات فعال دارویی را مهیا می سازند. پس از شناسایی اولین آلکالوئید (مورفین[۴۴]) از گیاه خشخاش[۴۵](پاپاور سومنیفروم[۴۶]) تا کنون حدود ۱۰.۰۰۰ آلکالوئید استخراج و ساختمان آن ها مشخص شده است. در این میان تعداد تروپان آلکالوئیدهای شناخته شده از منابع طبیعی بالغ بر ۲۰۰ عدد می باشند که از خانواده های مختلف گیاهی مانند Solanaceae، Erythroxylaceae، Convolvulaceae، Proteaceae، Rhizophoracea، Brassicacea و Euphorbiaceae استخراج می شوند. از میان این خانواده ها گیاهان سولاناسه از گذشته استفاده های دارویی از جمله درمان تشنج[۴۷] و مسمومیت[۴۸] داشته اند که اینگونه خواص آن ها به تروپان آلکالوئید موجود در این گیاهان مربوط می شود (کاتچان[۴۹]، ۱۹۹۵).

بسیاری از جنس های این خانواده شامل هیوسیاموس، دابوسیا[۵۰]، آتروپا[۵۱]، اسکوپولیا[۵۲] توانایی تولید نیکوتین و تروپان آلکالوئیدها را بطور همزمان دارا می باشند.

هیوسیامین و اسکوپولامین[۵۳]، دو تروپان آلکالوئید مهم یافت شده در خانواده سولاناسه، داروهای مهمی هستند که بیشترین تاثیر آن ها روی سیستم اعصاب پاراسمپاتیک می باشد. این

---

[37]- Jasmonic acide (JA)
[38]- Polyphenols
[39]- Quinones
[40]- Terpenoids
[41]- Polypeptides
[42]- Mizukami *et al.*
[43]- William *et al.*
[44]- Morphine
[45]- Opium poppy
[46]- *Papaver somniferum*
[47]- Hallucinogenic
[48]- Poisonous
[49]- Kutchan
[50]- *Duboisia*
[51]- *Atropa*
[52]- *Scopolia*

آلکالوئیدها از تروپیک اسید و مشتقات تروپین ساخته مـی شـوند. تـروپین خـود از اورنتـین و یـا آرژنین مشتق می شود در حالی که تروپیـک اسـید از فنیـل آلانـین سـنتز مـی شـود (ریچتـر و همکاران[۵۴]، ۲۰۰۵).

ریشه های گیاهان خـانواده سولاناسـه مهمتـرین مکـان بیوسـنتز تروپـان آلکالوئیـد هسـتند. از این رو کشت های ریشه نیز استعداد ذخیره مقدار زیادی از این متابولیت ها را دارند (کالدنتی و آروو[۵۵]، ۲۰۰۰). در خانواده سولاناسـه، تولیـد تروپـان آلکالوئیـدها توسـط ریشـه هـای هـوایی در جنس های مختلف از جمله آتروپا، داتوره، دوبیسیا، هیوسـیاموس و اسـکوپولیا نیـز گـزارش شـده است (زانگ و همکاران، ۲۰۰۵). کشت های ریشـه گیـاه آتروپـا بلادونـا[۵۶] از نظـر تروپـان حـاوی آلکالوئیدهای هیوسیامین (۹ ماکرومول در گرم وزن خشک ماده) و اسکوپولامین (۱ ماکرومول در گرم وزن خشک ماده) می باشد (ریچتر و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۵-۱ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها

مسیر بیوسنتز تروپین آلکالوئیدها مثل هیوسیامین و اسکوپولامین، در سـطح آنزیمـی در شکل ۱-۱ آورده شده است.

به طور کلی پذیرفتن فرضیه شکل گیری این آلکالوئیدها با شکل گیری یون *N*-methyl-Δ^1-pyrrolinium از آمینواسیدهای اورنتین و آرژنین آغاز می شـود (اسـتفن و دیویـد[۵۷]، ۲۰۰۲). مسـیرهای بیوسـنتز تروپـان و پیریـدین آلکالوئیـد، هـر دو یـک متابولیسـم پلـی آمـین عمـومی (پوترسین) را در اوایل مسیرشان به اشتراک می گذارند. پوترسین یک پیشساز عمـومی بـرای هـر دو پلی آمین اسپرمیدین و اسپرمین، همچنین تروپان/ پیریدین آلکالوئیدها می باشد (هاشیموتو و یامادا[۵۸]، ۱۹۸۶; هـی بـی و همکـاران[۵۹]، ۱۹۹۴). پوترسـین N- متیـل ترانسـفراز[۶۰] (PMT; EC 2.1.1.53) آنزیم مسئول برداشتن پوترسین از مخزن پلی آمـین و هـم چنـین *N* متیلاسـیون دی آمین از N- متیل پوترسین[۶۱] می باشد. بدلیل اینکه هـر دو حلقـه تروپـان، تروپـان آلکالوئیـدها و حلقه پیرولیدین، نیکوتین، طی مسیر *N*-methylputresine سنتتاز از پوترسین بدسـت مـی آیـد،

---

[53]- Scopolamine
[54]- Richter *et al*.
[55]- Caldentey and Arroo
[56]- *Atropa belladonna*
[57]- Stephen and David
[58]- Hashimoto and Yamada
[59]- Hibi *et al*.
[60]- Potrescine *N*-methyltransferase (PMT)
[61]- *N*-methylputresine

بنابراین N –متیلاسیون[۶۲] پوترسین که توسط PMT کاتالیز می شود اولین مرحله بیوسنتز این آلکالوئیدها به شمار می رود.

در بیوسنتز تروپان آلکالوئید در هیوسیاموس نایجر، دو رداکتاز (تروپینون رداکتاز I و II)[۶۳] در قرار گرفتن تروپینون در دو مسیر متفاوت نقش مهمی دارند. هر یک از رداکتازها تنها یک ایزومر استر از تروپینون را تولید می کند. تروپین برای هیوسیامین و اسکوپولامین پیش ساز است، در حالیکه پزودوتروپین[۶۴] به ساخت کالیستوژن ها[۶۵] منحرف می شود (لی زانگ و همکاران، ۲۰۰۵). کالیستوژن ها، غیر تروپان آلکالوئیدهایی هستند که از نقطه انشعاب مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئید مشتق می شوند (شکل ۱-۲). (یوت ریچتر و همکاران، ۲۰۰۴).

در این مسیر هیوسیامین 6β- هیدروکسیلاز[۶۶] (H6H;EC 1.14.11.11)، یک ۲-اکسیدوگلوتارات وابسته به داکسیژناز است که هیدروکسیلاسیون هیوسیامین را به 6β-هیدروکسی سیامین[۶۷] و عیناً طی واکنش اپواکسیداسیون، ماده اخیر را به اسکوپولامین کاتالیز می کند (هاشیموتو و یامادا، ۱۹۸۶; ماتسودا و همکاران، ۱۹۹۱) (شکل ۱-۱).

۱-۶ تروپان رداکتازها

آنالیزهای آزمایشگاهی نشان داده اند که انباشتگی هر دو تروپان رداکتازهای I و II در ریشه های جانبی گیاه هیوسیاموس نایجر نسبت به ریشه های اصلی آن بیشتر است. همچنین ماتسودا و همکاران[۶۸] در تحقیقات خود در سال ۱۹۹۱ مشاهده کردند که mRNA آنزیم هیدروکسی آمین ۶- هیدروکسیلاز تقریباً ۰/۳٪ کل mRNA ریشه را شامل می شود، بیان قوی H6H در ریشه های کشت شده بیانگر مکانی خاص برای پروتئین H6H است، این گونه سلول ها تنها در ریشه های جوان بدون رشد ثانویه موجود می باشد، مانند ریشه های کشت داده شده در محیط کشت (هاشیموتو و همکاران، ۱۹۹۱; کانگا و همکاران[۶۹]، ۱۹۹۴). این مناطق خاص بیوسنتز اسکوپولامین، نشان دهنده بافتی خاص برای بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها و همچنین

---

[62]- *N*-methylation
[63]- TRI, TRII
[64]- Pseudotropine or ψ-tropine
[65]- Calystegines
[66]- Hyoscyamine 6β- hydroxylase (H6H)
[67]- 6β- Hydroxyhyoscyamine
[68]- Matsuda *et al*
[69]- Kanegae *et al*.

بیانگر جابجا شدن تروپان آلکالوئیدها از ریشه ها به سمت قسمت های هوایی است (یوت ریچتر و همکاران ۲۰۰۵).

دو تروپین رداکتازهای I و II وابسته به NADPH[۷۰]، تشکیل دهنده یک نقطه انشعاب در بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها هستند: TR- I تبدیل تروپینون به تروپین را کاتالیز می کند در حالیکه TR- II تروپینون را به پزودوتروپینون تبدیل می کند (شکل ۱-۱) (کولن و گروس،[۷۱] ۱۹۸۲، دراگر و همکاران،[۷۲] ۱۹۸۸).

این دو تروپینون رداکتاز از کشت ریشه انواع گونه ها، داتورا استرامونیوم[۷۳]، هیوسیاموس نیجر و آتروپا بلادونا[۷۴] استخراج و مشخص شده است.

---

[70]- two stereospecific NADPH-dependent reductases
[71]- Koelen and Gross
[72]- Drager *et al.*
[73]- *Datura stramonium*
[74]- *Atropa belladonna*