

## جداسازی، تعیین خصوصیت و تحلیل بیان ژن *4'OMT2* گیاه دارویی شقایق

سید محسن سهرابی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۳</sup> و کامران سمیعی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد پست الکترونیک: ismaili.a@lu.ac.ir

۳- استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۳

### چکیده

گیاه شقایق (*Papaver somniferum L.*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی جهان بوده و چندین آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولینی دارویی مهم را تولید می‌کند. در این پژوهش ژن *4'OMT2* (3-hydroxy-N-methylcoclaurine 4-O-methyltransferase) از این گیاه جداسازی، تعیین توالی و تعیین خصوصیت شد. پس از تکثیر توالی کدکننده و ژنومیک ژن *4'OMT2* با استفاده از PCR، این قطعات در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند. نتایج توالی‌یابی قطعاتی با طول ۱۰۷۴ و ۱۱۸۹ جفت بازی را به ترتیب برای توالی کدکننده و ژنومیک نشان داد. برای اولین بار در این گیاه، نتایج وجود یک اینترون با طول ۱۱۵ جفت باز را در توالی ژنومیک ژن *4'OMT2* نشان داد. ژن جداسازی شده از ژنوتیپ ایرانی با همسانی بسیار بالایی به ژن *4'OMT2* جنس شقایق شباهت داشت و با همسانی بیشتر از ۶۷ درصد به گیاهان راسته آلاله سانان شبیه بود. بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیشتر نشان داد که ژن *4'OMT2* آنزیمی پایدار را تولید می‌کند که بدون سیگنال پپتید بوده و در سیتوپلاسم تجمع پیدا می‌کند. برای بررسی آنالیز بیان ژن، پنج کتابخانه از داده‌های SRA (نوع mRNA) گیاه شقایق مربوط به ترانسکریپتوم جوانه گل، برگ، میوه در حال نمو، ساقه و ریشه از پایگاه SRA دریافت و بیان ژن جداسازی شده *4'OMT2* در آنها با استفاده از نرم‌افزار IDEG6 و آزمون‌های آماری بررسی شد. نتایج نشان داد که این ژن دارای بیان متفاوتی در بافت‌های مختلف گیاه شقایق بوده و بیشترین میزان بیان را در بافت ساقه دارد. شناسایی توالی کدکننده ژن‌های بیوسنتزی و بررسی خصوصیات آنها اولین قدم در دست‌ورزی ژنتیکی و بهره‌گیری در مهندسی متابولیک است. در این پژوهش برای اولین بار توالی کدکننده کامل ژن *4'OMT2* از گیاه شقایق جداسازی شد و وجود یک اینترون در ساختار آن مشخص و اثبات شد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، O- متیل ترانسفراز، توالی ژنومیک، شقایق، SRA

### مقدمه

به‌حدی زیاد است که برآورده کردن آن از گیاهان موجود در طبیعت غیرممکن است، بنابراین نیاز به روش‌هایی برای افزایش این مواد ضروری به‌نظر می‌رسد (Chandra et al., 2014). با استفاده از روش‌های مهندسی متابولیک می‌توان میزان متابولیت‌های مفید را افزایش و میزان متابولیت‌های

طی سالیان متمادی گیاهان دارویی تنها راه درمان بیماری‌ها محسوب می‌شد و مواد مؤثره موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت (Shahid et al., 2013). نیاز صنعت داروسازی به مواد مؤثره گیاهی

مولکولی آن بررسی شده است ( Inui et al., 2007; )  
 (Samanani et al., 2005; Morishige et al., 2000).  
 همچنین در سال ۲۰۰۶ توالی کدکننده این ژن در رقم‌های  
 ماریانه و لوئیسایانه گیاه دارویی شقایق جداسازی و تعیین  
 خصوصیت شده است (Samanani et al., 2006). امروزه  
 با وجود حجم زیاد اطلاعات ژنومی و ترانسکریپتومی در  
 موجودات مختلف و همچنین دسترسی آسان به ابزارهای  
 بیوانفورماتیکی متعدد، شناسایی و بررسی ویژگی ژن‌های  
 مختلف به سادگی و در کوتاه‌ترین مدت زمان ممکن قابل  
 انجام است. به طوری که با استفاده از این اطلاعات و  
 بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف می‌توان قبل  
 از اقدام به هر گونه فعالیت آزمایشگاهی به صورت *in*  
*silico* ژن یا ژن‌های مورد نظر را شناسایی کرد،  
 ویژگی‌های آنها را بررسی و فعالیت‌هایی را که این ژن‌ها  
 در آن دخیل هستند شبیه‌سازی کرد. شناسایی‌ها،  
 پیش‌بینی‌ها و شبیه‌سازی‌های *in silico* با احتمال بسیار  
 زیادی نزدیک به واقعیت هستند و معمولاً توسط کارهای  
 آزمایشگاهی تأیید می‌شوند ( Periwat & Scaria, 2014; )  
 (Bao et al., 2014; Gill & Sanseau, 2000). در  
 پژوهشی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و  
 بهره‌گیری از کتابخانه‌های EST گیاه کلزا تمام ایزوفرم‌های  
 مربوط به ژن‌های FatB و SAD با موفقیت جداسازی و  
 تعیین خصوصیت شد (Sun et al., 2014). در پژوهشی  
 دیگر، گروهی از محققان با طراحی و ایجاد یک الگوریتم  
 بیوانفورماتیکی با موفقیت ژن‌های مختلفی در گیاه  
 آرابیدوپسیس را پیش‌بینی و نواحی اینترونی و آگزونی آنها  
 را مشخص کردند (Pavy et al., 1999).  
 اهدافی که در این مطالعه به آنها پرداخته شد، عبارت  
 بودند از: ۱- جداسازی و توالی‌یابی کامل CDS و ژنومیک  
 ژن *4'OMT2* از گیاه دارویی شقایق برای اولین بار، ۲-  
 بررسی ساختار و خصوصیات بیولوژیکی این ژن و ۳-  
 تحلیل بیان این ژن در بافت‌های مختلف گیاه با استفاده از  
 روش‌های *in silico* و بر اساس اطلاعات موجود در  
 بانک‌های اطلاعاتی.

مضر را کاهش داد. قدم اول در مهندسی متابولیک شناسایی  
 ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های خاص است  
 (Shahid et al., 2013; Beaudoin & Facchini, 2014).  
 گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.) یکی از  
 قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان است و به‌عنوان تنها منبع  
 تجاری برای مسکن‌های طبیعی و مشتقات نیمه سنتزی مانند  
 اکسی‌کدون و نالترکسون باقی مانده است. این گیاه همچنین  
 چندین آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولینی دیگر با ویژگی‌های بالقوه  
 دارویی از جمله پاپاورین بازکننده رگ، داروی ضد سرفه و ضد  
 سرطان بالقوه نوسکاپین و عامل ضد میکروبی سانگوینارین را  
 تولید می‌کند (Kapoor, 1995; Paul et al., 1996). شقایق  
 به‌عنوان یک سیستم مدل برای بررسی بیوسنتز آلکالوئیدهای  
 بنزیل ایزوکوئینولینی در گیاهان به‌کار برده می‌شود (Beaudoin  
 & Facchini, 2014). کاربرد ژنومیکس عملکردی و  
 بیوشیمیایی منجر به تغییرات اخیر در کشف ژن‌های بیوسنتزی  
 دخیل در تشکیل آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در شقایق  
 شده است که کاربردهای بیوتکنولوژیکی را تسهیل می‌کند  
 (Beaudoin & Facchini, 2014).  
 اولین قدم در سازماندهی مطالعات مهندسی متابولیک،  
 شناسایی ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های خاص  
 است. ژن *S-3'*-هیدروکسی-N-متیل کوکلارین-4-O-  
 متیل ترانسفراز دو یا *4'OMT2* یکی از ژن‌های دخیل در  
 مسیرهای بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در  
 گیاه شقایق است. این ژن در دو مسیر بیوسنتزی دخیل  
 است؛ در مسیر بیوسنتزی آلکالوئید پاپاورین *S-*  
 نوررتیکولین را به *S-*تتراهیدروپاپاورین تبدیل می‌کند. در  
 مسیر بعدی که ابتدای بیوسنتز آلکالوئیدهایی مانند تبائین،  
 کدئین، مورفین، نوسکاپین و سانگوینارین است، *S-3'*-  
 هیدروکسی-N-متیل کوکلارین را به *S-*رتیکولین که  
 پیش‌ساز اصلی بسیاری از آلکالوئیدهای بنزیل  
 ایزوکوئینولینی ارزشمند است، تبدیل می‌کند. این ژن تاکنون  
 در گیاهان دارویی مختلفی مانند *Eschscholzia*  
*Thalictrum flavum*، *Coptis japonica*، *californica*  
 و *Coptis chinensis* جداسازی شده و ویژگی‌های

## مواد و روش‌ها

### کشت گیاهان، استخراج DNA، RNA و ساخت cDNA

در این تحقیق بذره‌های گیاه شقایق (*P. L. somniferum*) در گلدان‌هایی با ترکیب شن، رس و پرلایت (با نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند و لایه نازکی از کود حیوانی روی آنها ریخته شد و در شرایط گلخانه به مدت سه هفته نگهداری شدند. گیاهچه‌های سه هفته‌ای در نیتروژن مایع قرار گرفته و برای استخراج DNA و RNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از روش ادواردز و همکاران (Edwards *et al.*, 1991) که روشی مبتنی بر SDS است، انجام شد. استخراج RNA کل از بافت‌ها با استفاده از کیت استخراج CinnaPure که مبتنی بر ستون‌های تعویض یونی حاوی سیلیکا است، طبق روش شرکت سازنده انجام شد. به منظور حذف آلودگی‌های DNA ژنومی از آنزیم DNase I استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA و RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA انجام شد.

### تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن 4'OMT2

ابتدا کتابخانه EST موجود برای گیاه شقایق (متشکل از ۲۱۰۹۴ توالی) از بانک ژن دریافت و با استفاده از آنها در نرم‌افزار CLC Genomic Workbench 9.0 یک پایگاه هم‌ردیفی ایجاد شد. تنها توالی ژن 4'OMT2 گیاه شقایق با شماره دسترسی AY217334 از بانک ژن دریافت شد و علیه پایگاه ایجاد شده، هم‌ردیف گردید. قطعات حاصل از هم‌ردیفی در نرم‌افزار Vector NTI 10.3 سرهم‌بندی شدند و یک کانتیگ ایجاد شد. از کانتیگ حاصل از سرهم‌بندی پس از تأیید چارچوب خوانش باز و دیگر آنالیزهای تأییدی، با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI 10.3 و Allele ID 7.0 یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شد. از آغازگر رفت با توالی 5'-GTAGTTTAGATGCAAAACC-3' و آغازگر برگشت با توالی 5'-TACTAAGGGAAGGCTTCAATGAC-3'

برای تکثیر توالی کدکننده و توالی ژنومیک ژن 4'OMT2 استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Pfu* با برنامه دمایی، واسرشتگی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ چرخه انجام شد. همچنین واسرشتگی اولیه پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۲۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. پس از انجام واکنش، به منظور اضافه کردن نوکلئوتید A به انتهای محصولات واکنش از آنزیم *Taq* و dATP استفاده شد. در واکنش PCR به منظور تکثیر توالی کدکننده و توالی ژنومیک ژن 4'OMT2 به ترتیب از cDNA و DNA به‌عنوان 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 جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از خالص‌سازی قطعات، واکنش اتصال با استفاده از این قطعات، پلاسمید pTZ57R/T و آنزیم DNA لیگاز T4 انجام شد و پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از روش الکتروپوریشن و همچنین کیت همسانه‌سازی به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5 منتقل شدند. پس از انتخاب کلنی‌های سفید روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کشت آنها در محیط LB مایع، واکنش کلنی PCR به منظور تأیید اولیه با استفاده از ترکیب آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای ژن 4'OMT2 انجام شد. استخراج پلاسمید از کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید انجام و هضم آنزیمی با دو آنزیم *BamHI* و *EcoRI* انجام شد. پس از تأیید همسانه‌سازی توسط هضم آنزیمی، پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعات CDS و ژنومیک ژن 4'OMT از سه کلنی استخراج گردید و به صورت رفت و برگشتی مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

پیش‌بینی اولیه و تعیین چارچوب خوانش باز

نتایج توالی‌یابی پس از ویرایش اولیه با استفاده از

### تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

توالی‌های جداسازی شده با استفاده از برنامه BLASTn علیه تمام توالی‌های گیاهی موجود در بانک ژن پایگاه NCBI هم‌ردیف و توالی‌های همولوگ با میزان همسانی بیشتر از ۶۰ درصد انتخاب و دریافت شدند. توالی‌های دریافتی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 هم‌ردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد.

### پیش‌بینی عناصر تنظیمی

پیش‌بینی عناصر تنظیمی در نواحی غیرکدکننده توالی ژنومیک ژن *4'OMT2* با استفاده از پایگاه‌های PlantCARE و PlantPAN و الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی انجام شد.

### آنالیز بیان ژن *in silico*

در آنالیز بیان ابتدا پنج کتابخانه از داده‌های RNA-seq گیاه شقایق با شماره‌های دسترسی ERX651037، ERX651023، ERX651056، ERX651082 و ERX651062 از پایگاه SRA سایت NCBI دریافت شد. کتابخانه‌ها به ترتیب مربوط به ترانسکریپتوم جوانه گل، برگ، میوه در حال نمو، ساقه و ریشه بودند. از کتابخانه‌های دریافت شده پنج پایگاه داده اختصاصی در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 ایجاد شد. توالی جداسازی شده ژن *4'OMT2* علیه این پنج پایگاه داده اختصاصی ایجاد شده مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی به‌طور جداگانه برای هر پایگاه یادداشت شد. در نرم‌افزار IDEG6 تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی بین بافت‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های Fisher، Audic and Claverie و exact test و Chi-squared 2X2 از لحاظ آماری مقایسه شد.

نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0، Vector NTI 10.3 و ORF finder برای وجود چارچوب خوانش باز کامل مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد توالی‌ها با استفاده از ابزار BLASTn موجود در NCBI علیه بانک ژن مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. در این مرحله صحت اولیه جداسازی ژن‌های مورد نظر بررسی شد. به‌منظور بررسی صحت قاب خوانش، کانتیگ‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل، با استفاده از ابزار CDD موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. ابزار CDD با ترجمه توالی‌های مورد نظر در شش قاب خوانش، قاب خوانش اصلی توالی را با یافتن دامنه‌های عملکردی موجود در توالی تعیین می‌کند.

### تعیین دامنه‌های عملکردی و پیش‌بینی محل تجمع پروتئین‌ها

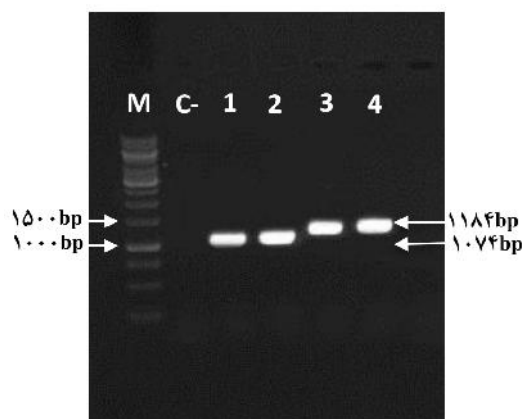
پس از تعیین قاب صحیح خوانش باز در توالی‌های نوکلئوتیدی، با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 توالی‌های نوکلئوتیدی در چارچوب خوانش باز اختصاصی خود به پروتئین ترجمه شدند. سپس با استفاده از ابزارهای CDD موجود در پایگاه NCBI، Interproscan و Pfam دامنه‌های عملکردی موجود در این توالی‌ها مشخص شد. دامنه‌های عملکردی تأیید شده به‌وسیله سه ابزار محاسباتی مذکور به‌عنوان دامنه‌های اصلی انتخاب شدند. با استفاده از ابزارهای Signal P و CELLO وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در پروتئین‌ها و همچنین محل تجمع پروتئین‌ها مشخص شد (Petersen *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2006).

### پیش‌بینی ساختار و مشخصات پروتئینی

با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9 و ابزار Phyre2 ساختارهای ثانویه و سه بعدی پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. تعیین پارامترهای پروتئین شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک و فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از ابزارهای ProtParam و Protein Calculator و محاسبه شد.

توالی‌های جداسازی شده با استفاده از ابزار BLASTn موجود در پایگاه NCBI علیه بانک ژن مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. نتایج هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که توالی‌های جداسازی شده با ۱۰۰ درصد همسانی به ژن *4'OMT2* گیاه *P. somniferum*، با ۷۸ درصد همسانی به *E. californica*، با ۷۲ درصد همسانی به گیاهان *C. chinensis japonica* و *T. flavum* و با ۶۷ درصد همسانی به گیاه *Sinopodophyllum hexandrum* شباهت داشت. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن *4'OMT2* جداسازی شده نشان داد که این ژن در گروه ژن‌های *4'OMT2* گیاهان متعلق به راسته *Ranunculales* و خانواده *Papaveraceae* قرار می‌گیرد (شکل ۳).

چارچوب خوانش باز ژن *4'OMT2* توالی پروتئینی به طول ۳۵۷ اسید آمینه را کد می‌کند. نتایج آنالیز با استفاده از ابزارهای CDD، Pfam و Interproscan وجود دو دامنه عملکردی O-متیل ترانسفراز و دامنه دایمری شدن را در ساختار پروتئینی ژن *4'OMT2* نشان داد (شکل ۲). این پروتئین دارای وزن مولکولی ۳۹/۷ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ۵/۳، شاخص ناپایداری ۳۷/۵۵، شاخص آلیفاتیک ۱۰۰/۵۳ و میانگین نسبی آبدوستی یا آبگریزی ۰/۰۹۴- است. اسیدهای آمینه آلانین، گلايسین، ایزولوسین و لوسین بالاترین فراوانی را در ساختار پروتئینی ژن *4'OMT2* دارند. نتایج آنالیز در پایگاه SignalP نشان داد که توالی پروتئینی ژن *4'OMT2* فاقد سیگنال پپتید است. بررسی در سرور CELLO نشان داد که محصول پروتئینی ژن *4'OMT2* با احتمال ۹۸ درصد در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا می‌کند. همچنین نشان داد که این پروتئین دارای عملکردهای متیل ترانسفراز و اتصال به پروتئین بوده و در فرایندهای بیوسنتزی، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید مولکول‌های کوچک، پاسخ به تنش‌ها، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، متابولیسم نیتروژن سلولی، تمایز سلولی، ریخت‌زایی، نمو ساختار آناتومیکی، تولیدمثل و ترجمه نقش دارد. جستجو برای ساختارهای ثانویه، وجود ۱۹ ماریچ آلفا و ۸ رشته بتا را در ساختار پروتئین ژن *4'OMT2* نشان داد (شکل ۴).

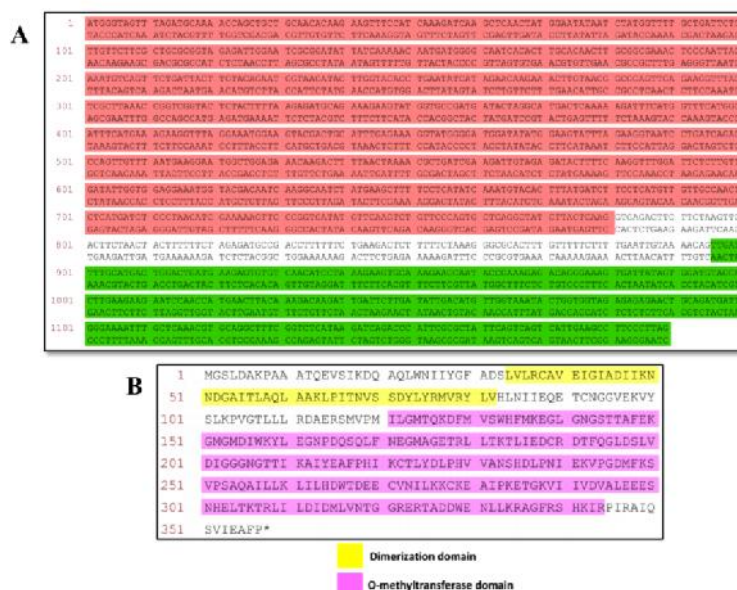


شکل ۱- تصویر الکتروفورزی محصولات PCR. M: نشانگر مولکولی 1Kb، -C- واکنش کنترل منفی، ۱ و ۲- توالی کدکننده ژن *4'OMT2*، ۳ و ۴- توالی ژنومیک ژن *4'OMT2*

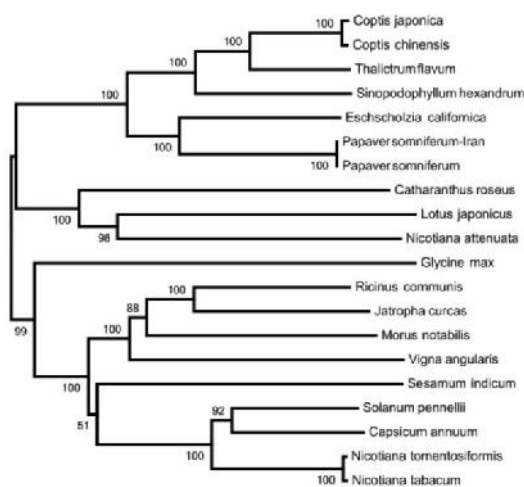
## نتایج

نتایج هم‌ردیفی علیه پایگاه هم‌ردیفی، پنج EST با شباهت بیشتر از ۹۵ درصد با ژن *4'OMT2* را مشخص کرد. از سرهم‌بندی این ESTها یک کانتیگ با طول ۱۱۵۰ جفت باز حاصل شد که دربردارنده یک چارچوب خوانش باز ۱۰۷۴ جفت بازی بود. کانتیگ حاصل دارای شباهت کامل با توالی دریافت شده از بانک ژن بود. پس از ایجاد اطمینان از صحت توالی‌ها، از کانتیگ ایجاد شده برای طراحی پرایمر استفاده شد. نتایج حاصل از تکثیر ژن *4'OMT2* با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، قطعاتی با طول ۱۰۷۴ و ۱۱۸۹ جفت بازی را به ترتیب برای توالی کدکننده و توالی ژنومیک نشان داد (شکل ۱).

نتایج تعیین توالی نشان داد که توالی کدکننده ژن *4'OMT2* جداسازی شده از گیاه شقایق حاوی چارچوب خوانش بازی به طول ۱۰۷۴ جفت باز است. این چارچوب خوانش باز با کدون ATG شروع و با کدون TAG پایان پیدا می‌کند. توالی ژنومیک ژن *4'OMT2* جداسازی شده از ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق حاوی یک اینترون به اندازه ۱۱۵ جفت باز است که از نوع GU-AG بوده و نزدیک به آگزون انتهایی ۳' قرار گرفته است. نتایج آنالیز در پایگاه‌های PlantCARE و PlantPAN وجود سه عنصر تنظیمی پاسخ به نور، عنصر تشدیدکننده بیانی و عنصر هسته پروموتری را در اینترون ژن *4'OMT2* مشخص کرد.



شکل ۲- توالی ژنی، توالی پروتئینی و دامنه‌های عملکردی ژن *4'OMT2* A- توالی کامل ژن *4'OMT2* که در آن اگزون شماره یک با رنگ قرمز و اگزون شماره دو با رنگ سبز مشخص شده‌اند. توالی اینترون بین دو اگزون بدون رنگ مشخص شده است. B- توالی پروتئینی ژن *4'OMT2* که در آن دامنه‌های عملکردی موجود با رنگ‌های زرد (برای دامنه دایمری شدن) و صورتی (برای دامنه O- متیل ترانسفراز) مشخص شده‌اند.

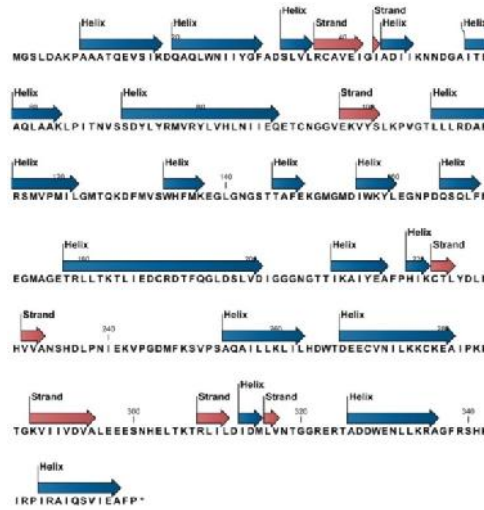


شکل ۳- درخت تکاملی رسم شده برای ژن *4'OMT2*

آنالیز بیان ژن *4'OMT2* در بافت‌های برگ، ساقه، ریشه، جوانه گل و میوه در حال توسعه گیاه شقایق نشان داد که این ژن دارای بیان متفاوتی بین بافت‌های مختلف است. بیشترین میزان بیان ژن *4'OMT2* در بافت ساقه و کمترین میزان بیان این ژن در ریشه، برگ و میوه در حال توسعه مشاهده شد. سه آزمون آماری Audic and Claverie،

Chi-squared 2X2 و Fisher exact test تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان ژن *4'OMT2* بین بافت ساقه و بافت‌های برگ، ریشه، جوانه گل و میوه در حال توسعه مشخص کرد (جدول ۱). همچنین سه آزمون آماری مذکور تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان ژن *4'OMT2* بین بافت جوانه گل و دیگر بافت‌ها مشخص کرد. البته بین بافت‌های برگ،

ریشه و میوه در حال توسعه تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن *4'OMT2* مشاهده نشد (شکل ۵).

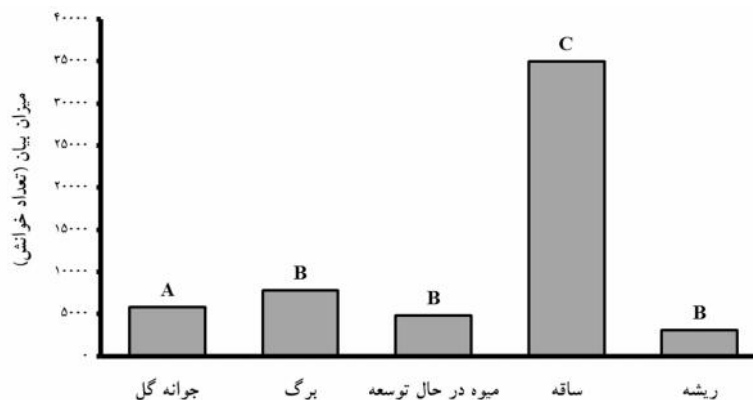


شکل ۴- ساختارهای ثانویه پروتئین ژن *4'OMT2*

جدول ۱- آنالیز بیان ژن *4'OMT2* در بافت‌های مختلف گیاه شقایق بر اساس اطلاعات داده‌های RNA seq

کتابخانه‌ها	جوانه گل	برگ	میوه در حال نمو	ساقه	ریشه
جوانه گل	-	*	*	*	*
برگ	*	-	ns	*	ns
میوه در حال نمو	*	ns	-	*	ns
ساقه	*	*	*	-	*
ریشه	*	ns	ns	*	-

\*: معنی داری با آزمون Audic and Claverie. : معنی داری با آزمون Fisher. : معنی داری با آزمون Chi-squared 2X2. ns: عدم معنی داری



شکل ۵- مقایسه میزان بیان ژن *4'OMT2* در بافت‌های مختلف گیاه شقایق با استفاده از آزمون‌های اختصاصی Fisher, Audic and Claverie

Chi-squared 2X2 و exact test

ستون‌های با حروف غیر مشترک تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن دارند.

## بحث

تاکون ژن‌های بیوسنتزی مختلفی از گیاهان دارویی جداسازی و بررسی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به جداسازی تری بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ژن کلیدی در بیوسنتز کاردنولیدها از گیاه گل انگشتانه ایرانی *Digitalis nervosa* L. (Maroufi et al., 2017) و همچنین جداسازی ژن دلتا سیکس دساچوراز از گیاه گل گاوزبان ایرانی *Echium amoenum* اشاره کرد (Shokri et al., 2012). در این تحقیق توالی کدکننده و ژنومیک ژن *4'OMT2* از ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق جدا شد. ژن *4'OMT2* جداسازی شده از ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق شباهت کاملی به ژن مشابه خود در گیاه شقایق داشت. این ژن همچنین دارای شباهت بالای ۶۷ درصد نسبت به ژن‌های مشابه خود در گیاهان هم‌خانواده و هم‌راسته خود بود. تمام این موارد نشان‌دهنده محافظت‌شدگی بالای این ژن بین گیاهان مختلف است. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که ژن *4'OMT2* جداسازی شده در گروه ژن‌های *4'OMT2* گیاهان متعلق به راسته *Ranunculales* قرار می‌گیرد و در درخت تکاملی ترسیم شده بیشترین فاصله تکاملی را با گیاهان *Nicotiana*, *Catharanthus roseus*, *Sesamum indicum* و کمترین *Lotus japonicus* و *Glycine max attenuata* فاصله تکاملی را با ژن *4'OMT2* گیاه *Eschscholzia californica* دارد. توالی ژنومیک ژن *4'OMT2* جداسازی شده از این گونه دارای یک اینترون ۱۱۵ جفت بازی است که در این پژوهش برای اولین بار گزارش شده و توالی جداسازی شده با شماره دسترسی MF038040 در بانک ژن پایگاه NCBI ثبت شده است. اینترون شناسایی شده در ابتدا با دی نوکلئوتید GT شروع شده و در پایان به دی نوکلئوتید AG ختم می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد ژن *4'OMT2* با وجود یک اینترون قابلیت انجام پیرایش متناوب را نداشته و تنها یک محصول پروتئینی تولید می‌کند. این مورد معمولاً در ژن‌های تک اینترونی اتفاق می‌افتد، زیرا پیرایش متناوب تنها در آگرون‌های داخلی انجام می‌شود و آگرون‌های اول و آخر ژن در فرایند پیرایش متناوب درگیر نمی‌شوند (Matlin et al.,

2004; Ast, 2005). بررسی بیشتر اینترون ژن *4'OMT2* وجود عناصر تنظیمی تشدیدکننده بیان ژن، هسته پرموتری و پاسخ به نور را در ساختار آن مشخص کرد. وجود این عناصر نشان‌دهنده نقش تکاملی مهم اینترون‌ها و دیگر عناصر غیرکدکننده در ژنوم موجودات است. عناصر تنظیمی تشدیدکننده بیان ژن باعث افزایش رونویسی و بیان ژن می‌شوند. عناصر هسته پرموتری، عناصر تنظیمی ضروری برای بیان هر ژن هستند. وجود عنصر پاسخ به نور اینترون ژن *4'OMT2* احتمالاً به علت نقش این ژن در فرایندهای مختلف سلول گیاهی مانند پاسخ به تنش‌های محیطی و رشد و نمو است (Lam et al., 2007).

ژن *4'OMT2* آنزیمی را کد می‌کند که از خانواده O-متیل ترانسفرازهای وابسته به S-آدنوزیل-متیونین است. وجود دامنه عملکردی O-متیل ترانسفراز وابسته به S-آدنوزیل-متیونین در این ژن‌ها ضروریست. همچنین به علت اینکه O-متیل ترانسفرازهای گیاهی عموماً به صورت دایمری عمل می‌کنند وجود دامنه عملکردی دایمری شدن در این پروتئین‌ها ضرورت دارد. وجود دو دامنه عملکردی O-متیل ترانسفراز و دامنه عملکردی دایمری شدن در توالی جداسازی شده صحت جداسازی را تأیید می‌کند (شکل ۲). این آنزیم مانند تمام اعضاء خانواده O-متیل ترانسفرازهای وابسته به S-آدنوزیل-متیونین از آنزیم‌های پایه‌ای حیات بوده و در واکنش‌های بیوسنتزی و دیگر واکنش‌های حیاتی سلول مانند تمایز سلولی دخیل است (Zubieta et al., 2001). این آنزیم همچنین نقش مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی دارد. در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی در گیاه شقایق آنزیم *4'OMT2* در دو مسیر تولید آلکالوئید پاپاورین و تقویت مسیر کلی تولید آلکالوئیدهای مورفینان، سانگوینارین و نوسکاپین دخیل است (Gurkok et al., 2016). آنزیم *4'OMT2* در سیتوپلاسم سلول همراه آوند آبکش تولید شده و از طریق منافذ پلاسمودسم به سیتوپلاسم سلول‌های آوند آبکش منتقل می‌شود. آنزیم *4'OMT2* در سیتوپلاسم سلول‌های آوند آبکش فعالیت کاتالیزوری خود را در بیوسنتز



شناسایی به درستی انجام شود، تا حد زیادی ما را به هدف نزدیک می‌کند. پس از شناسایی اولیه ژن‌های احتمالی می‌توان با روش‌هایی مانند خاموشی یا افزایش بیان موقت نقش اصلی آن را در بیوسنتز یک متابولیت خاص مشخص کرد. گیاه شقایق تعداد زیادی از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی با خاصیت دارویی مفید را تولید می‌کند که با بهره‌گیری از تکنیک‌های ژنومیکس عملکردی، تاکنون ژن‌های بیوسنتزی فراوانی در آن شناسایی شده و نقش آنها مشخص شده است. با وجود این هنوز ژن‌ها و مسیرهای بیوسنتزی فراوانی در این گیاه ناشناخته مانده‌اند. امروزه با استفاده از پایگاه‌های داده EST و داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل بعدی و همچنین کاربرد ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان در مدت زمان بسیار کم و با کمترین میزان فعالیت آزمایشگاهی توالی ژن‌های بیوسنتزی مورد نظر را شناسایی و جداسازی و برای اهداف مختلفی دست‌ورزی کرد (Dardel & Kepes, 2007; Pevsner, 2015). در این پژوهش توالی ژن *4'OMT2* با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی در ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیت شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که ژن *4'OMT2* دارای نقش کلیدی و مهمی در بیوسنتز آلکالوئیدهای دارویی گیاه شقایق است و بیشترین بیان این ژن در بخش هوایی گیاه به‌ویژه ساقه می‌باشد.

در این پژوهش برای اولین بار توالی کامل ژن *4'OMT2* از گیاه دارویی شقایق جداسازی شد و وجود اینترون ۱۱۵ جفت بازی در آن مشخص شد. با توجه به نقش مهم این ژن در فرایندهای حیاتی گیاه مانند رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی، با جداسازی، دست‌ورزی و انتقال این ژن می‌توان پاسخ‌های رشد و نمو و همچنین پاسخ‌های احتمالی گیاهان به تنش‌های محیطی را بررسی کرد و بهبود بخشید. از سویی با توجه به نقش تعیین‌کننده این ژن در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی گیاه شقایق می‌توان با افزایش بیان این ژن، میزان تولید آلکالوئیدهای مفید را در این گیاه افزایش داد. همچنین از نتایج این تحقیق می‌توان در مطالعات آینده روی این گیاه و دیگر گیاهان تولیدکننده

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی انجام داده و آلکالوئیدهای حاصل به سلول‌های هدایت‌کننده شیرابه منتقل می‌شوند (Beaudoin & Facchini, 2014). به‌علت تجمع و فعالیت سیتوپلاسمی آنزیم *4'OMT2*، این آنزیم فاقد سیگنال پیتید بوده و عدم وجود سیگنال پیتید در ژن جداسازی شده صحت جداسازی را تأیید می‌کند (Weid et al., 2004). به‌علت اینکه آنزیم *4'OMT2* از محل تولید (سیتوپلاسم سلول همراه آوند آبکش) تا محل فعالیت (سیتوپلاسم سلول‌های آوند آبکش) باید مسیری را طی کند، آنزیم نسبتاً پایداری است. شاخص ناپایداری محاسبه شده (۳۷/۵۵) برای آنزیم جداسازی شده نیز نشان‌دهنده پایداری این آنزیم می‌باشد. شاخص آلفاتیک حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های آلفاتیک بوده و معیاری از آبریز بودن و پایداری پروتئین است. شاخص آلفاتیک محاسبه شده برای آنزیم *4'OMT2* تأییدی بر پایداری این آنزیم است. میانگین نسبی آبدوستی یا آبریزی محاسبه شده و فراوانی بالای اسیدهای آمینه آلفاتیک آلانین، گلايسین، ایزولوسین و لوسین برای آنزیم *4'OMT2* تأیید دیگری بر آبریزی و پایداری نسبی این آنزیم است. وجود ماریپج‌های آلفا و رشته‌های بتای فراوان در ساختار پروتئینی آنزیم *4'OMT2* باعث ایجاد ساختار سوم به هم پیچیده و پایداری شده که پایداری و فعالیت مناسب آنزیم در سلول را تضمین می‌کند. به‌علت دخیل بودن آنزیم *4'OMT2* در فرایندهای مختلف سلولی، میزان بیان رونوشت‌های آن در سلول‌ها و بافت‌های مختلف گیاه متفاوت است. این آنزیم در بافت‌های مختلف گیاه شقایق میزان بیان متفاوتی داشته و بیشترین میزان بیان آن در بافت ساقه مشاهده شد. بنابراین احتمال داده می‌شود به‌علت وجود بیشترین مقدار سلول‌های همراه آوند آبکش، سلول‌های آوند آبکش و سلول‌های هدایت‌کننده شیرابه در ساقه گیاهان ترشح‌کننده شیرابه بوده و همچنین به‌علت نقش آنزیم *4'OMT2* در تولید آلکالوئیدها که بخشی از شیرابه هستند، این آنزیم بیشترین میزان بیان را در بافت ساقه داشته باشد (Samanani et al., 2006).

در مهندسی متابولیک شناسایی ژن‌های کلیدی در بیوسنتز متابولیت‌های مورد نظر اولین قدم بوده، در صورتی این

- Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 25: 97-110.
- Matlin, A.J., Clark F. and Smith, C.W., 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nature reviews Molecular Cell Biology, 6: 386-398.
  - Morishige, T., Tsujita, T., Yamada Y. and Sato, F., 2000. Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine: 3-hydroxy-N-methylcoclaurine 4-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. Journal of Biological Chemistry, 275: 23398-23405.
  - Paul, B.D., Dreka, C., Knight E.S. and Smith, M.L., 1996. Gas chromatographic/mass spectrometric detection of narcotine, papaverine, and thebaine in seeds of *Papaver somniferum*. Planta Medica, 62: 544-547.
  - Pavy, N., Rombauts, S., Dehais, P., Mathe, C., Ramana, D.V., Leroy P. and Rouze, P., 1999. Evaluation of gene prediction software using a genomic data set: application to *Arabidopsis thaliana* sequences. Bioinformatics, 15: 887-899.
  - Periwal, V. and Scaria, V., 2014. Bioinformatics Review. Bioinformatics, 45: 1-9.
  - Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne G. and Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 8: 78.
  - Pevsner, J., 2015. Bioinformatics and functional genomics. John Wiley & Sons, United States, 1160p.
  - Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak K.G. and Facchini, P.J., 2006. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. The Plant Journal, 47: 547-563.
  - Samanani, N., Park S.U. and Facchini, P.J., 2005. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. The Plant Cell, 17: 915-926.
  - Shahid, M., Shahzad, A., Malik A. and Sahai, A., 2013. Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants. Springer, London, 359p.
  - Shokri, E., Kazemi Tabar, S., Zolala, J., Nematzadeh, G., Hoseinpoor Azad, N. and Nasiri, N., 2012. Cloning and characterization of full length CDS of delta-6 desaturase (d6d) from Iranian borage (*Echium amoenum*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 19: 205-217.
  - Sun, J.Y., Hammerlindl, J., Forseille, L., Zhang H. and Smith, M.A., 2014. Simultaneous over-

آلکالوئید به‌ویژه در مهندسی ژنتیک مسیرهای متابولیکی بهره جست.

### منابع مورد استفاده

- Ast, G., 2004. How did alternative splicing evolve? Nature Reviews Genetics, 5: 773-782.
- Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W.A., Jiang H. and Feng, G., 2014. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. Cancer Informatics, Sup 2: 67-83.
- Beaudoin, G.A. and Facchini, P.J., 2014. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. Planta, 240: 19-32.
- Chandra, S., Lata H. and Varma, A., 2014. Biotechnology for medicinal plants. Springer.
- Dardel, F. and Kepes, F., 2007. Bioinformatics: genomics and post-genomics. John Wiley & Sons, United States, 252p.
- Edwards, K., Johnstone C. and Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 19: 1349.
- Gill, R.W. and Sanseau, P., 2000. Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). Biotechnology Annual Review, 5: 25-44.
- Gurkok, T., Ozhuner, E., Parmaksiz, I., Özcan, S., Turktas, M., Ipek, A., Demirtas, I., Okay S. and Unver, T., 2016. Functional Characterization of 4 OMT and 7OMT Genes in BIA Biosynthesis. Frontiers in Plant Science, 7.
- Inui, T., Tamura, K.I., Fujii, N., Morishige T. and Sato, F., 2007. Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-O-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*. Plant and Cell Physiology, 48: 252-262.
- Kapoor, L., 1995. Opium poppy: botany, chemistry, and pharmacology. Food Products Press, United States, 326p.
- Lam, K.C., Ibrahim, R.K., Behdad B. and Dayanandan, S., 2007. Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. Genome, 50: 1001-1013.
- Maroufi, A., Salimi V. and Majdi, M., 2017. Isolation of 5-3 -hydroxysteroid dehydrogenase involved in the biosynthetic pathway of cardenolides and its expression level under the influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors in foxglove (*Digitalis nervosa* L.). Iranian

- 13957-13962.
- Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu C.H. and Hwang, J.K., 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64: 643-651.
  - Zubieta, C., He, X.Z. Dixon R.A. and Noel, J.P., 2001. Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8: 271-279.
  - Weid, M., Ziegler J. and Kutchan, T.M., 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: expressing of an acyl-ACP thioesterase (FatB) and silencing of acyl-acyl carrier protein desaturase by artificial microRNAs increases saturated fatty acid levels in *Brassica napus* seeds. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 624-637.

## Isolation, characterization and expression analysis of 3-hydroxy-N-methylcoclaurine 4 -methyltransferase (*4'OMT2*) gene in *Papaver somniferum* L.

S.M. Sohrabi<sup>1</sup>, A. Ismaili<sup>\*2</sup>, F. Nazarian Firouz-Abadi<sup>3</sup> and K. Samiei<sup>1</sup>

1- Ph.D. Student, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran.

2\*- Corresponding author, Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran.

Email: ismaili.a@lu.ac.ir

3- Prof., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R.Iran.

Received: 07.04.2017

Accepted: 24.06.2017

### Abstract

Poppy (*Papaver somniferum* L.) is one of the oldest medicinal plant in the world. It produces several important narcotic benzylisoquinoline alkaloids. In this study, *4'OMT2* (3-hydroxy-N-methylcoclaurine 4 -O-methyltransferase) gene was isolated, sequenced and characterized. After amplification of genomic and coding sequence of *4'OMT2* gene using PCR, the fragments were cloned into pTZ57R/T plasmid and sequenced. Sequencing results showed two fragments of 1074 and 1189bp for coding and genomic sequences, respectively. For the first time, results showed one intron of 115bp in the genomic sequence of *4'OMT2* in the species. Isolated gene from Iranian genotypes was similar to *Papaver* genus with high identity, and had 67% identity to *Ranunculales* plants. Further bioinformatics analyses revealed, *4'OMT2* gene produces a stable enzyme without signal peptide that localize in the cytoplasm. For gene expression analysis, five poppy RNA-seq (mRNA type) libraries (belonging to flower bud, leaf, developing fruit, stem and root tissues) were retrieved from SRA database and analysis of *4'OMT2* gene expression were done using IDEG6 software and statistical tests. Results showed that *4'OMT2* has differential expression among different tissues and has maximum expression in stem tissues. Identification and characterization of biosynthetic genes is the first step in genetic manipulation and metabolic engineering. In present study, for the first time, full length coding sequence of *4'OMT2* gene was isolated from poppy plant and presence of one intron in its sequence was determined.

**Keywords:** Gene expression, Genomic sequence, Poppy, SRA, 3-hydroxy-N-methylcoclaurine 4 -O-methyltransferase