دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

جداسازی و کلونینگ ژن ایزوفلاون سنتتاز از گیاه سویا رقم ویلیامز III

امیر آراسته فر[۱]، علی ریاحی مدوار[۲] و مسعود توحیدفر[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان
۲- استادیار، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، (نویسنده مسوول: riahi.ali@gmail.com)
۳- دانشیار، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۴

چکیده

ایزوفلاونوییدها، دسته‌ای از ترکیبات فلاونوییدی هستند که با استفاده از آنزیم ایزوفلاون سنتاز از پیش‌ماده فلاوانونی در گیاهان لگوم تولید می‌شوند. مهم‌ترین ایزوفلاون‌های موجود در گیاه سویا شامل: جنیستین و دیدزین می‌باشند که خواص دارویی زیادی دارند. تحقیقات نشان می‌دهد که مصرف مرتب این ترکیبات خطر ابتلا به سرطان‌های وابسته به هورمون‌های جنسی را کاهش داده و کاهش علایم یائسگی، پوکی استخوان، تعدیل کلسترول خون، بهبود بیماری‌های کرونری قلبی و غیره همگی از مزایای استفاده از این ترکیبات می‌باشد. در این پژوهش به‌منظور جداسازی ژن ۲- هیدروکسی ایزوفلاوانون سنتاز (IFS) ابتدا RNA کل از سویا جداسازی شده و کتاب‌خانه cDNA ساخته شد. ژن IFS با پرایمرهای اختصاصی با مکان‌های برشی *Hind*III و *Xba*I از طریق PCR تکثیر گردید و سپس ژن تکثیر شده با اندازه ۱۵۶۶ جفت بازی پس از خالص‌سازی از روی ژل در مکان *Xba*I/*Hind*III در ناقل بیانی pET28a+ کلون شد. سپس پلاسمید نوترکیب به استرین XLI-Blue باکتری *E. coli* منتقل گردید. وجود ژن IFS در پلاسمیدهای نوترکیب با دو روش PCR و هضم آنزیمی مورد تائید قرار گرفت. در نهایت، حامل مذکور را می‌توان برای بیان در داخل پروکاریوت یا با سابکلون کردن مجدد برای انتقال ژن به گیاهان مختلف با روش اگروباکتریوم و تفنگ ژنی مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ایزوفلاونوییدی، جنیستین، کلونینگ، اثرات دارویی، ژن IFS، سویا

مقدمه

ایزوفلاونوییدها یکی از مهم‌ترین ترکیبات ضدسرطان در نظر گرفته شده‌اند که در گیاه سویا به میزان زیادی از آن‌ها یافت می‌شود. مطالعه‌های اپیدمولوژیکی نشان می‌دهد که مصرف بالای سویا در جمعیت‌های آسیایی ارتباط مستقیمی با کاهش سرطان سینه و پروستات در آن‌ها دارد. جنیستین[۱] و دیدزین[۲] دو ایزوفلاون اصلی در گیاه سویا محسوب می‌شوند و به نظر می‌رسد که نقش مهمی را در جلوگیری از ایجاد سرطان بازی می‌کنند (۲،۱). مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که جنیستین و دیدزین اثرات مهارکنندگی قوی روی رشد سرطان‌های لوکمیا، سینه و پروستات دارند (۷،۶،۵،۴،۳). مطالعه‌های اولیه همچنین نشان می‌دهد که جنیستین یا دیدزین می‌توانند رشد سلولی تومور روده انسانی (HCT)[۳] را مهار کنند (۸). در عین حال، بررسی‌ها نشان می‌دهند با وجود تفاوت ساختاری کم بین جنیستین و دیدزین، تأثیرات این دو ترکیب روی رفتار سلول‌های بدخیم بسیار متفاوت می‌باشد (۹،۸). در حقیقت، ویژگی‌های بیوشیمیایی جنیستین باعث می‌شود تا این ترکیب بتواند با پذیرنده استروژن برهم‌کنش نماید و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، مهار DNA توپوایزومراز و هم‌چنین فعالیت‌های مهارکنندگی روی پروتئین تیروزین کیناز را نشان دهد (۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۱۰). با این حال، مکانیسمی که این تأثیرات مهارکنندگی را نشان می‌دهد، تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است.

ترکیبات ایزوفلاونی به‌صورت انحصاری در گیاهان خانواده لگوم یافت می‌شوند (البته در گیاهان دیگری از قبیل چغندر قند نیز گزارش شده‌اند). علاوه بر فواید این متابولیت‌ها بر سلامت انسان‌ها، برای گیاهان لگوم نیز دارای تأثیرات مفیدی هستند، برای مثال در خانواده لگومیان ترکیبات ضدمیکروبی یا ضد حشرات به شمار می‌روند، القاکننده بیان ژن‌های گرهک‌زایی هستند و در هم‌زیستی با باکتری ریزوبیوم و یا عوامل آللوپاتیک نقش دارند (۱۵).

ایزوفلاونوییدها از یک ترکیب حد واسط فلاوانونی حاصل می‌شوند که در همه گیاهان وجود دارند. به‌منظور وارد شدن این ترکیب به مسیر ایزوفلاونوییدها، فلاوانون تحت مهاجرت حلقه B به موقعیت ۳ قرار گرفته و به دنبال آن هیدروکسیلاسیون در موقعیت ۲ صورت گرفته که این فرآیند از طریق آنزیم سیتوکروم P450 (CYP93C1)، که ۲- هیدروکسی ایزوفلاوانون سنتاز و به‌صورت معمول‌تر IFS نامیده می‌شود) انجام می‌پذیرد. ترکیب ۲- هیدروکسی ایزوفلاوانون ایجاد شده ناپایدار بوده و طی فرآیند دهیدراسیون به ایزوفلاون‌های معادل خود تبدیل می‌شود. cDNA مربوط به سویا و

1- Genistein 2- Daidzein 3- Human Colon Tumor cells

دیگر گونه‌ها ایزوله و کلون شده (۱۸،۱۷،۱۶) و به‌منظور تولید ترکیبات ایزوفـلاونی به گیاهان رابیدوپسیس، ذرت و تنباکو انتقال داده شده‌اند (۱۹،۱۷). هدف از این تحقیق، همسانه‌سازی ژن IFS از گیاه سویا در یک وکتور بیانی است.

مواد و روش‌ها

تهیه، کشت بذرها، القای گیاهان **سویا و استخراج RNA**

بذرهای گیاه سویا رقم ویلیامز III از جهاد کشاورزی استان کرمان، تهیه شد. به‌منظور ضدعفونی کردن، ابتدا بذرها را با استفاده از آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو، سپس با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۲/۵٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی نموده و در نهایت، به مدت ۵ دقیقه مجدداً در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. بذرهای استریل شده داخل پیت ماس اتوکلاو شده کشت و به مدت ۹ روز در شرایط اتیوله (تاریکی کامل)، داخل انکوباتور با دمای $^{\circ}$C ۲۸ قرار گرفتند.

گیاهچه‌های ۹ روزه به مدت ۱۶ ساعت با محلول ۰/۲ درصد عصاره مخمر تیمار شدند. پس از گذشت ۱۶ ساعت، گیاهچه‌ها جمع‌آوری و به‌منظور حذف الیسیتور از سطح آنها آبکشی شدند. گیاهچه‌های ذکر شده در زیر هود روی دستمال کاغذی‌های استریل قرار گرفتند تا آب اضافی آنها حذف شود و در ادامه گیاهچه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفته و سپس تا مرحله استخراج RNA به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX–Plus (شرکت سینا ژن، شماره کاتالوگ: RN7713C) انجام شد. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. ۰/۵ گرم از گیاهچه برای هر بار استخراج مورد استفاده قرار گرفت و به‌منظور حذف آلودگی‌های DNA، از آنزیم DNase1 استفاده شد.

ساخت cDNA، تکثیر ژن و کلون‌سازی ژن

به‌منظور ساخت cDNA، ابتدا ۲۰۰۰ نانوگرم از RNA کل به تیوب‌های ۰/۲ اضافه شد (کلیه مراحل ساخت cDNA روی یخ انجام گرفت). سپس ۲ میکرولیتر پرایمر الیگو dT به RNA کل اضافه و تیوب‌های مذکور به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ده دقیقه بلافاصله تیوب‌ها به روی یخ منتقل شدند. سپس ۲/۵ میکرولیتر بافر RT 10 X، ۰/۲ میلی‌مولار از هرکدام از dNTPها، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) (MMuLV از شرکت فرمنتاز) و در نهایت آب دیونیزه استریل RNase free تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه گردید. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتهای واکنش به‌منظور حذف اثر RT، تیوب‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

واکنش PCR با استفاده از آنزیم DNA Polymerase *Pfu* به‌صورت زیر انجام شد. رشته الگو (cDNA) ۲/۵ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر، هر یک از پرایمرها ۵ پیکومول و با استفاده از آب دیونیزه استریل حجم نهایی واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد.

به این‌منظور دو پرایمر، پیشرو 5´-TCT AGA ATG TTA CTG GAA CTT GCA CTT G-3´ و معکوس 5´-AAG CTT TTA AGA AAG GAG TTT AGA TGC AAC-3 با استفاده از توالی ژنی گیاه *Glycin max* با شماره دسترسی NM 001249093 (ثبت شده در Gene Bank) طراحی شدند. نوکلئوتیدهای تیره مربوط به جایگاه‌های برشی *Hind*III و *Xba*I می‌باشند که به‌ترتیب در انتهای 5´ پرایمرهای پیشرو و معکوس قرار داده شدند. طراحی این آغازگرها با برنامه Oligi صورت گرفت و با استفاده از برنامه Vector NT صحت آن تأیید گردید و توسط شرکت MWG آلمان ساخته شدند. برای تکثیر از برنامه زیر استفاده شد.

واسرشت‌سازی اولیه: ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه.
واسرشت‌سازی اصلی: ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه.
اتصال پرایمرها: ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه.
بسط: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱/۵ دقیقه.
بسط نهایی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۸ دقیقه.

واکنش فوق به مدت ۳۰ سیکل انجام شد و در نهایت ژل‌گذاری محصول PCR با استفاده از آگارز ۱٪ انجام و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از ژل داک تصویر مشاهده شد. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification Kit انجام شد. به‌منظور کلون کردن ژن IFS، از پلاسمید pET28a+ استفاده گردید. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین می‌باشد، به همین دلیل استوک ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این آنتی‌بیوتیک تهیه و تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. باکتری حامل پلاسمید pET28a+ (به‌منظور استخراج پلاسمید) و هم‌چنین باکتری DH5α در محیط کشت LB کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ساعت با دور ۲۳۰rpm شیک شدند. استخراج پلاسمید از باکتری‌های رشد کرده با استفاده از کیت Miniprep شرکت بایونیر و طبق دستوالعمل شرکت انجام شد. پلاسمیدهای به‌دست آمده از این روش دارای کیفیت بالایی بوده و مستقیماً از آن‌ها برای فرآیند هضم و کلونینگ استفاده گردید. تهیه سلول‌های شایسته از باکتری DH5α، با استفاده از کلرید کلسیم انجام گرفت (۲۰).

فرآیند هضم پلاسمید و محصولات تخلیص شده PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Hind*III به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طبق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱- شرایط واکنش برای هضم دو گانه

مقدار	ماده
هر یک، ۱ میکرولیتر	*Xba*I و *Hind*III
۵ میکرولیتر	بافر 10x M
۱ میکروگرم	پلاسمید/ محصول PCR
۴۳ میکرولیتر	آب دیونیزه استریل

جداسازی و تخلیص قطعه مربوط به ژن IFS و پلاسمید از روی ژل آگارز با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction Kit انجام شد. برای کلون‌سازی قطعه ژن در پلاسمید pET28a+ از آنزیم DNA لیگاز (از شرکت سیگما) استفاده شد. پلاسمیدهای نوترکیب به روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد منتقل شدند. سلول‌های حاوی پلاسمید با کشت روی محیط LB جامد (حاوی ۱٪ اگار) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین شناسایی شدند. پس از استخراج پلاسمید، وجود ژن IFS با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی به بررسی نوترکیب‌ها از لحاظ وجود یا عدم وجود قطعه الحاقی پرداخته شد.

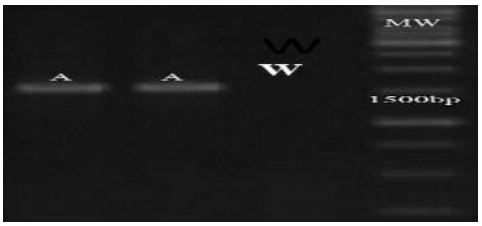
تایید کلونینگ با استفاده از تکثیر ژن IFS با پرایمرهای اختصاصی **و هضم با آنزیم‌های برشی**

به‌منظور تائید حضور ژن IFS در باکتری‌های رشد یافته روی محیط انتخابی، یک تک کلون از باکتری حاصل از رشد سلول‌های تراریزش شده، در محیط LB مایع که حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب بود کشت داده شدند و سپس پلاسمید آنها استخراج گردید. تکثیر ژن IFS در حضور پرایمرهای اختصاصی و با شرایط ذکر شده انجام گرفت. علاوه بر این، عمل هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای تخلیص شده در حضور آنزیم‌های *Hind*III / *Xba*1 انجام گرفت.

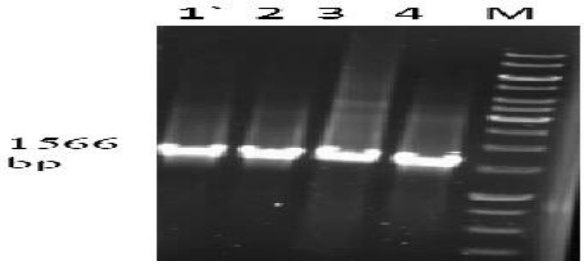
نتایج و بحث

cDNA ژن IFS به روش RT-PCR، از گیاه سویا تهیه شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در دو انتهای آن‌ها جایگاه‌های برشی *Hind*III/*Xba*I قرار داشتند تکثیر گردید. در شکل ۱، محصول PCR ژن IFS با طول ۱۵۶۶ bp روی ژل آگارز نشان داده شده است. عدم وجود باند در آب نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی در نمونه‌ها است. به‌منظور کلون‌سازی، ابتدا پلاسمید بیانی pET28a+، با آنزیم‌های برشی *Hind*III/*Xba*I هضم شدند (شکل ۲).

هم‌سانه‌سازی محصول PCR به همراه پلاسمید هضم‌شده پس از ریکاوری از روی ژل با استفاده از آنزیم لیگاز انجام شد (۲۰). پلاسمیدهای نوترکیب که دارای نشانگر مقاومت به کانامایسینس بودند به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* منتقل شدند (۲۰).

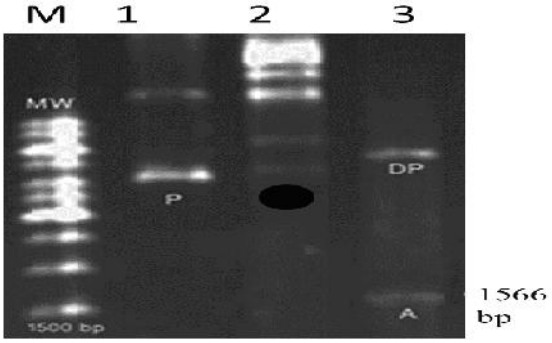


شکل ۱- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن IFS. M: مارکر وزن مولکولی، A: ژن IFS، W: نمونه بدون الگو.

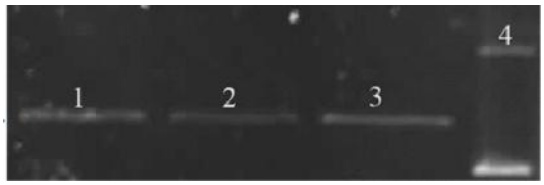


شکل ۲- هضم وکتور pET28a+ با آنزیم‌های برشی *Hind*III/*Xba*I (چاهک ۱ الی ۳ برش با *Hind*III/*Xba*I، چاهک ۴ پلاسمید برش نخورده).

ارزیابی تراریخت سلول‌های *E. coli*، به‌وسیله‌ی پلاسمیدهای کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بر مبنای ظهور کلونی‌های مقاوم روی محیط کشت LB حاوی کانامایسین (۵۰mg/L) صورت گرفت. به عبارت دیگر، پس از تراریخت باکتری با پلاسمیدهای ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سلول‌ها روی محیط جامد که حاوی همان آنتی‌بیوتیک بود کشت شدند. در این محیط، سلول‌هایی که پلاسمید دریافت نکرده بودند از بین رفته و تنها سلول‌های واجد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. با به‌کارگیری روش تکثیر با پرایمرهای اختصاصی (شکل ۳) و روش هضم آنزیمی (شکل ۴) به بررسی حضور قطعه الحاقی روی پلاسمیدهای نوترکیب پرداخته شد. همان طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود حضور یک تک باند در محدوده ۱۵۶۶ bp روی ژل آگارز نشان‌دهنده حضور ژن IFS در پلاسمید استخراج شده می‌باشد (۱۷). از طرف دیگر، حضور دو باند حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید که یک تک باند در محدوده ۱۵۶۶ bp و تک باند دیگری که معرف پلاسمید خطی شده است، تأیید دیگری بر الحاق ژن هدف در وکتور است (شکل ۴).



شکل ۳- محصول PCR کلونی‌های نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن IFS (۱ الی ۴ پلاسمید نوترکیب، M مارکر وزن مولکولی).



شکل ۴- هضم پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های برشی XbaI و HindIII. (۱- پلاسمید غیرنوترکیب، ۲- پلاسمید نوترکیب هضم نشده و ۳- پلاسمید نوترکیب هضم شده (A-ژن IFS، DP پلاسمید هضم شده) و M- مارکر وزن مولکولی).

نتایج و بحث

تاریخچه طولانی کاربری ایمن ماده ایزوفلاون که داروی ضد سرطان محسوب می‌شود، از مزایای بارز انتقال ژن مربوط به این آنزیم به گیاهان می‌باشد. انتظار می‌رود ادغام موفقیت‌آمیز ژن IFS، در ژنوم گیاهی، باعث افزایش بیان آن شود و با توجه به حضور پیش ماده سنتز ترکیبات ایزوفلاونی (نارینجنین[1] و لیکویریتیجنین[2]) در گیاهان مختلف، تولید این ترکیبات دارویی مهم در طیف وسیعی از گیاهان خوراکی میسر شود.

در این تحقیق ابتدا RNAی بافت جدا و سپس از روی آن کتابخانه cDNA ساخته شد و با عمل RT-PCR ژن هدف، تکثیر و سپس در وکتور بیانی پروکاریوتی (pET28a+) هم‌سانه‌سازی شد. برای انتقال این ژن به گیاه می‌توان با انجام ساب‌کلونینگ مجدد در یک وکتور مناسب (pBI121 تحت پروموتر CaMV35S) هم‌سانه‌سازی نمود.

در این تحقیق علاوه براین‌که ژن هدف از ارقام ایرانی جداسازی شده، نگرانی‌های مربوط به ایمنی زیستی بخاطر گیاهی بودن منشاء ژن کاهش می‌یابد و همچنین می‌توان از طریق مهندسی کلروپلاست میزان بیان آن را در گیاه افزایش داد. پیشرفت‌های اخیر انتقال ژن به پلاستید، فن‌آوری مهندسی پلاستید را گزینه‌ای جایگزین برای تراریزش هسته‌ای مطرح می‌کند، که از آن می‌توان به‌عنوان زمینه‌ای کارا و سازگار با مسایل زیست‌محیطی، برای ایجاد صفات با ارزش زراعی و نیز استفاده از گیاهان بیورآکتورهایی ایده‌آل محسوب می‌شوند. برای تولید پروتئین‌های درمانی، واکسن‌ها و مواد زیستی استفاده نمود.

1- Naringenin
2- Liquiritigenin

منابع

1. Messina, M.J., V. Persky, K.D.R. Kenneth, D.R. Setchell and S. Bames. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutrition and Cancer, 21: 1l3-l3l.
2. Chiechi, L.M. 1999. Dietary phytoestrogens in the prevention of long-term postmenopausal diseases. International Journal of Gynecology and Obstetrics, 67: 39-40.
3. Li, W. and G. Weber. l999. Synergistic action of tiazofurin and genistein on growth inhibition and differentiation of K562 human leukemic cells. Life Science, 22: l975-l98l.
4. Shao, Z.M., J. Wu, Z.Z. Shen and S.H. Barsky. l998. Genistein exerts multiplesuppressive effects on human breast carcinoma cells. Cancer Research, 58: 485l-4857.
5. Balabhadrapathruni, S., T.J. Thomas, E.J. Yurkow, P.S. Amenta and T. Thomas. 2000. Effects of genistein and structurally related phytoestrogenson cell cycle kinetics and apoptosis in MDAMB-468 human breast cancer cells. Oncology Reports, 1: 3-l2.
6. Zhou, J.R., E.T. Gugger, T. Tanaka, Y. Guo, G.L. Blackbmp and S.K. Clinton. 1999. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. Journal of Nutrition, 129: l628-l635.
7. Choi, Y.H., W.H. Lee, K.Y. Park and L. Zhang. 2000. P53-independellt induction of p21 (WAFl/CIPl), reduction of cyclin Bl and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. Japanese Journal of Cancer Research, 2: l64-l73.
8. Yu, J.T., Y. Cheng, L.P. Xie and R.Q. Zhang. 1999. Effect of genistein and daidzein on membrane characteristics of HCT cells. Nutrition Cancer, 33: l00-l04.
9. Wang, W.Q., C.M. Higuchi and R.Q. Zhang. 1997. Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. Nutrition Cancer, 29: 29-34.
10. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. The Journal of Biological Chemistry, 262: 5592-5595.
11. Miksicek, R.J. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenicactivity. Molecular Pharmacology, 44: 37-43.
12. Wei, H., L. Wei, K. Frenkel, R. Boven and S. Barnes. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. Nutrition Cancer, 20: 1-12.
13. Markovits, J., C. Linassier and P. Fosse. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II, Cancer Research, 49: 5111-5117.
14. Clark, J.W., A. Santos-Moore, L.E. Stevenson and A.R. Frackelton. 1996. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of human breast cancer cell lines and proteins important in the rat signaling pathway. International Journal of Cancer, 65: 186-191.
15. Dixon, R.A. 1999. In Comprehensive Natural Products Chemistry, edition. Sankawa, U. Elsevier, New York, 1: 773-823.
16. Steele, C.L., M. Gijzen, D. Qutob and R.A. Dixon. 1999. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. Archives of Biochemistry and Biophysics, 367: 147-150.
17. Jung, W., O. Yu, S.M.C. Lau, D.P. O'Keefe, J. Odell, G. Fader and B. McGonigle. 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of is of lavones in legumes. Nature Biotechnology, 18: 208-212.
18. Akashi, T., T. Aoki and S. Ayabe. 1999. Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant Physiology, 121: 821-828.
19. Yu, O., W. Jung, J. Shi, R.A. Croes, G.M. Fader, B. McGonigle and J.T. Odell. 2000. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. Plant Physiology, 124: 781-794.
20. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volume I. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6.

Isolation and Cloning of Isoflavone Synthase Gene from Soybean (*Glycin max*) Williams III Cultivar

Amir Arastefar[1], Ali Riahi-Madvar[2] and Masoud Tohidfar[3]

1- Graduated M.Sc., University of Advanced Technology, Kerman
2- Assistant Professor, University of Advanced Technology, Kerman
(Corresponding authors: riahi.ali@gmail.com)
3- Associate Professor, Shahid Beheshti University
Received: July 8, 2013 Accepted: July 26, 2014

Abstract

Isoflavonoids are a group of flavonoid compound which produced from flavanon precursors in legums, by isoflavone synthase (IFS) enzyme. The most important isoflavonoids finding in soybean are genistein and daidzein that have many medicinal impacts. Investigations have revealed that regularly using these compounds lowered the risk to come down with hormone-related cancers, besides menopausal symptoms and reduction in osteoprosis, balance in cholesterol bloods level, improving in heart-coronary diseases are benefits that are related to using these compounds. In this investigation in order to isolate isoflavone synthase, at first total RNA was extracted and cDNA was synthesized, subsequently. IFS gene was isolated and subjected to PCR by specific primers which have the *HindIII* and *XbaI* at their 5′ ends. Subsequently, amplified gene after extracting on agarose gel was cloned in restriction site of *XbaI/HnidIII* of pET28a^{+}. At the last step, recombinant plasmids were approved by PCR and enzymatic digestion. Finally, the mentioned vector can be used either as an expression vector in prokaryotic hosts or introduced into plants by agrobacterium or gene gun-mediated transformations.

Keywords: Cloning, Genistein, IFS Gene, Isoflavonoid Compounds, Medicinal Impacts, Soybean