



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

ایزوفلاونوئیدها، دسته‌ای از ترکیبات فلاونوئیدی هستند که با استفاده از آنزیم ایزوفلاون سنتتاز 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 علائم یائسگی، پوکی استخوان، تعدیل کلسترول خون، بهبود بیمای‌های کرونری قلبی و غیره همگی از مزایای استفاده از این ترکیبات می‌باشد. در این پژوهش به منظور جداسازی ژن IFS-۲- هیدروکسی ایزوفلاونون سنتتاز (IFS) ابتدا RNA کل از سویا جداسازی شده و کتابخانه cDNA ساخته شد. ژن IFS با پرایمرهای اختصاصی با مکان‌های برشی *XbaI* و *HindIII* از طریق PCR تکثیر گردید و سپس ژن تکثیر شده با اندازه ۱۵۶۶ جفت بازی پس از خالص‌سازی از روی ژل در مکان *XbaI/HindIII* 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 تأیید 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 ایزوفلاونوئیدی، جنیستین، کلونینگ، اثرات دارویی، ژن IFS، سویا

مقدمه

ایزوفلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین ترکیبات ضدسرطان در نظر گرفته شده‌اند که در گیاه سویا به میزان زیادی از آن‌ها یافت می‌شود. مطالعه‌های اپیدمیولوژیکی 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 لوکمی، 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

(۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴). با این حال، مکانیسمی که این تأثیرات مهارکنندگی را نشان می‌دهد، تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است.

ترکیبات ایزوفلاونی به صورت 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 ضد میکروبی یا ضد حشرات به شمار می‌روند، القاکننده بیان ژن‌های گرهک‌زایی هستند و در هم‌زیستی با باکتری ریزوبیوم و یا عوامل آللوپاتیک نقش دارند (۱۵).

ایزوفلاونوئیدها از یک ترکیب حد واسط فلاوانونی حاصل می‌شوند که در همه گیاهان وجود دارند. به‌منظور وارد شدن این ترکیب به مسیر ایزوفلاونوئیدها، 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 سنتتاز 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

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 *HindIII* و *XbaI* 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 سحت 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 آغاز 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 آنتی‌بیوتیک 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 ۱۶ ساعت با دور ۲۳۰ rpm شیک شدند. استخراج پلاسمید از باکتری‌های رشد کرده با استفاده از کیت Miniprep شرکت بایونیر و طبق دستورالعمل 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).

دیگر گونه‌ها ایزوله و کلون شده (۱۸، ۱۷، ۱۶) و به‌منظور تولید ترکیبات ایزوفلاوونی 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. بذرها استریل شده داخل پیت ماس اتوکلاو شده کشت و به مدت ۹ روز در شرایط اتیوله (تاریکی کامل)، داخل انکوباتور با دمای ۲۸ C 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 الیسیستور 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 تیوب‌ها اضافه گردید. واکنش ساخت cDNA به مدت

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

جدول ۱- شرایط واکنش برای هضم دو گانه

ماده	مقدار
<i>HindIII</i> و <i>XbaI</i>	هر یک، ۱ میکرولیتر
یافر 10x M	۵ میکرولیتر
پلاسمید/ محصول PCR	۱ میکروگرم
آب دیونیزه استریل	۴۳ میکرولیتر

شده انجام گرفت. علاوه بر این، عمل هضم آنزیمی روی
پلاسمیدهای تخلیص شده در حضور آنزیم‌های
HindIII / *XbaI* 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 *HindIII/XbaI* 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
HindIII/XbaI هضم شدند (شکل ۲).

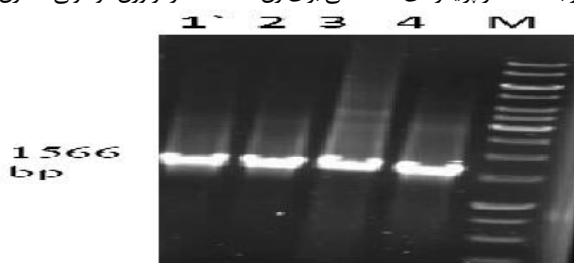
هم‌سانه‌سازی محصول PCR به همراه پلاسمید
هضم‌شده پس از ریکاوری از روی ژل با استفاده از آنزیم
لیگاز انجام شد (۲۰). پلاسمیدهای نوترکیب که دارای
نشانگر مقاومت به کانامایسینس بودند به روش
شوک حرارتی به باکتری *E. coli* منتقل شدند (۲۰).

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٪ آگار) 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 تأیید 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



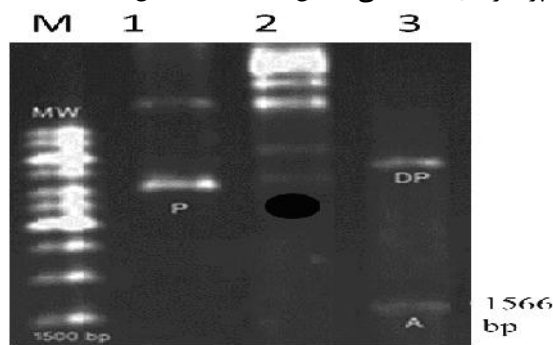
شکل ۱- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن IFS: M: مارکر وزن مولکولی، A: ژن IFS، W: نمونه بدون الگو.



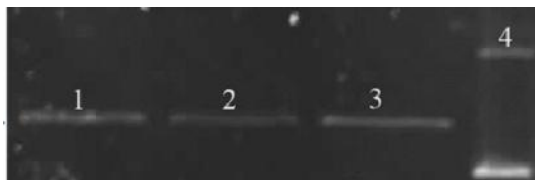
شکل ۲- هضم و کتور pET28a+ با آنزیم‌های برشی *XbaI/HindIII* (چاهک ۱ الی ۳ برش با *XbaI/HindIII*، چاهک ۴ پلاسمید برش نخورده).

۳) و روش هضم آنزیمی (شکل ۴) به بررسی حضور قطعه الحاقی روی پلاسمیدهای نوترکیب پرداخته شد. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود حضور یک تک باند در محدوده ۱۵۶۶ bp روی ژل آگارز نشان دهنده حضور ژن IFS در پلاسمید استخراج شده می باشد (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).

ارزیابی تراریخت سلول های *E. coli* به وسیله ی پلاسمیدهای کدکننده مقاومت به آنتی بیوتیک، بر مبنای ظهور کلونی های مقاوم روی محیط کشت LB حاوی کانامایسین (۵۰mg/L) صورت گرفت. به عبارت دیگر، پس از تراریخت باکتری با پلاسمیدهای ژن مقاوم به آنتی بیوتیک، سلول ها روی محیط جامد که حاوی همان آنتی بیوتیک بود کشت شدند. در این محیط، سلول هایی که پلاسمید دریافت نکرده بودند از بین رفته و تنها سلول های واجد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. با به کارگیری روش تکثیر با پرایمرهای اختصاصی (شکل



شکل ۳- محصول PCR کلونی های 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 آنزیم های برشی *XbaI* و *HindIII* (۱- پلاسمید غیر نوترکیب، ۲- پلاسمید نوترکیب هضم نشده و ۳- پلاسمید نوترکیب هضم شده (A-ژن IFS، DP پلاسمید هضم شده) و M- مارکر وزن مولکولی).

یک وکتور مناسب (pBI121 تحت پروموتور CaMV35S) هم سانه سازی نمود.

در این تحقیق علاوه بر این که ژن هدف از ارقام ایرانی جداسازی شده، نگرانی های مربوط به ایمنی زیستی بخاطر گیاهی بودن منشاء ژن کاهش می یابد و همچنین می توان از طریق مهندسی کلروپلاست میزان بیان آن را در گیاه افزایش داد. پیشرفت های اخیر انتقال ژن به پلاستید، فن آوری مهندسی پلاستید را گزینه ای جایگزین برای تراریخت هسته ای مطرح می کند، که از آن می توان به عنوان زمینه ای کارا و سازگار با مسایل زیست محیطی، برای ایجاد صفات با ارزش زراعی و نیز استفاده از گیاهان بیورآکتورهای ایده آل محسوب می شوند. برای تولید پروتئین های درمانی، واکسن ها و مواد زیستی استفاده نمود.

نتایج و بحث

تاریخچه طولانی کاربری ایمن ماده ایزوفلاون که داروی ضد سرطان محسوب می شود، از مزایای بارز انتقال ژن مربوط به این آنزیم به گیاهان می باشد. انتظار می رود ادغام موفقیت آمیز ژن IFS در ژنوم گیاهی، باعث افزایش بیان آن شود و با توجه به حضور پیش ماده سنتز ترکیبات ایزوفلاونی (نارینجین^۱ و لیکویریتیجنین^۲) در گیاهان مختلف، تولید این ترکیبات دارویی مهم در طیف وسیعی از گیاهان خوراکی میسر شود.

در این تحقیق ابتدا RNA 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+) هم سانه سازی شد. برای انتقال این ژن به گیاه می توان با انجام ساب کلونینگ مجدد در

1- Naringenin

2- Liquiritigenin

منابع

1. Messina, M.J., V. Persky, K.D.R. Kenneth, D.R. Setchell and S. Barnes. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and Cancer*, 21: 113-131.
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. 1999. Synergistic action of tiazofurin and genistein on growth inhibition and differentiation of K562 human leukemic cells. *Life Science*, 22: 1975-1981.
4. Shao, Z.M., J. Wu, Z.Z. Shen and S.H. Barsky. 1998. Genistein exerts multiplesuppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Research*, 58: 4851-4857.
5. Balabhadrapathruni, S., T.J. Thomas, E.J. Yurkow, P.S. Amenta and T. Thomas. 2000. Effects of genistein and structurally related phytoestrogen on cell cycle kinetics and apoptosis in MDAMB-468 human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 1: 3-12.
6. Zhou, J.R., E.T. Gugger, T. Tanaka, Y. Guo, G.L. Blackbump and S.K. Clinton. 1999. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *Journal of Nutrition*, 129: 1628-1635.
7. Choi, Y.H., W.H. Lee, K.Y. Park and L. Zhang. 2000. P53-independellt induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 2: 164-173.
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: 100-104.
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 Arastefar¹, Ali Riahi-Madvar² and Masoud Tohidfar³

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 flavanone precursors in legumes, 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 osteoporosis, 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/HindIII* 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