

شناسایی، جداسازی و همسانه سازی ژن سیتوکروم *p450* از آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)

مهسا محمدی^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}

چکیده

تیمول یکی از پرکاربردترین متابولیت ثانویه در گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) بعنوان دارو می‌باشد. یکی از ژن‌های کلیدی که در سنتز آن نقش دارد ژن سیتوکروم *p450* است. به منظور جداسازی و همسانه سازی آن ابتدا استخراج RNA انجام شد و پس از ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از مناطق حفاظت شده در حضور آنزیم HF که خاصیت ۳' به ۵' اگزونوکلئازی دارد عمل تکثیر صورت گرفت. در مرحله اول، همسانه سازی به روش T/A کلونینگ در پلاسمید pTG19 صورت گرفت. انتخاب نوترکیب‌ها از طریق سیستم PCR کلونی و هضم آنزیمی با *Bam*HI انجام شد. قطعات همسانه شده برای تایید نهایی توالی یابی شدند. به منظور همسانه سازی در وکتور بیانی *pBI121^{GUS-9}* قطعه برش خورده با آنزیم *Bam*HI در سایت همولوگ در وکتور *pBI121^{GUS-9}* تحت پروموتور 35s و خاتمه دهنده Nos همسانه شد. تایید کلونی‌های نوترکیب با PCR کلونی و هضم آنزیمی انجام شد. وکتور نوترکیب گیاهی طراحی شده میتواند جهت پژوهش‌های بعدی به منظور فرا بیان تیمول مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آویشن باغی، تیمول، سیتوکروم *p450*، همسانه سازی

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۲ * نویسنده مسئول. گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. ایمیل: m_tohidfar@sbu.ac.ir

مقدمه

این تکنیک‌ها، مهندسی متابولیت در راستای افزایش فرآورده‌های دارویی است (Shirazi, 2018). در این روش‌ها می‌توان با وارد کردن ژن مربوط به آنزیم‌های کلیدی و قرار دادن آن‌ها در کنار پیش برنده‌های قوی، بیان ژن را افزایش داد. از طرف دیگر با استفاده از روش‌های خاموشی ژن با استفاده از توالی‌های آنتی‌سنس، این امکان وجود دارد تا از طریق مهار تولید این آنزیم‌ها، راه متابولیکی تولید محصول مورد نظر را هموار کرد (Kumar, 2008). برخی از داروهای ضدسرطان مهم همانند وین‌بلاستین، وین‌کریستین و تاکسول و تیمول که از ارزش اقتصادی بسیار بالایی برخوردار بوده و قیمت آن‌ها از چند دلار تا چند هزار دلار تغییر می‌کند از همین ترکیبات ارزشمند دارویی حاصل شده‌اند. تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی غالباً بسیار دشوار و حتی در مواردی غیرممکن هستند و از طرف دیگر محدودیت‌های طبیعی مختلف مانع تولید این مواد می‌شوند. بکارگیری فناوری نوین راه حل مناسبی جهت تولید انبوه و سریع این متابولیت‌ها می‌باشند (Mulabagal, 2004). با توجه به مصرف بالای تیمول، تولید این ماده به روش‌های سنتی اقتصادی نبوده و لازم است که برای تولید بیشتر این ماده، از روش‌های نوین بهره گرفت که منجر به افزایش آن در واحد سطح می‌شود (Erlangung, 1977). هدف از این تحقیق جداسازی و همسانه سازی ژن سیتوکروم *p450* از گیاه آویشن در راستای بهره برداری آن در گیاهان است.

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش بعنوان منبع ارزشمند دارویی کاربرد فراوان داشته‌اند. برطبق تخمین سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد مردم بطور سنتی یا مدرن از گیاهان دارویی برای سلامتی خود بهره می‌برند، همچنین بسیاری از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده اند (Tripathi, 2003) تقاضا برای گیاهان دارویی در حال افزایش است اما باید به این نکته توجه داشت که زیستگاه‌های طبیعی این گیاهان محدود بوده و با توجه به شرایط محیطی و ترکیبات مهم دارویی در گیاه، تخریب روز افزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی این گیاهان، محققین را به استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک جهت افزایش تولید و بهره برداری گیاهان دارویی معطوف نموده است. فناوری مهندسی ژنتیک امکان شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژن‌های دخیل در این مسیرها، افزایش بیان آن ژن‌ها، دستورزی و انتقال آن‌ها از موجودی به موجود دیگر را فراهم کرده است. تولید گیاهان تراریخته یکی از مهمترین کاربردهای مهندسی ژنتیک است (Shirazi, 2018). امروزه با استفاده از تکنیک‌های انتقال ژن و روش‌های مشابه آن، تولید گیاهان تراریخت با بهبود در خصوصیات هم‌چون عملکرد، کیفیت غذایی بالاتر، مقاومت به آفات و بیماری‌ها، تولید گیاهان دارای خاصیت درمانی و تولید گیاهان با خاصیت ماندگاری بالا امکان پذیر شده است. یکی از مهمترین کاربردهای

مواد و روش‌ها

خالصسازی قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از High Pure PCR Purification (Bioneer) Kit صورت گرفت. در ابتدا طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از توالی ژن سیتوکروم *p450* گیاهان هم‌خانواده آویشن باغی از مناطق حفاظت شده انجام شد، و به جهت تعیین مناطق حفاظت شده از نرم افزار T-coffee استفاده شد. که به شرح زیر است:

F-5' ATGGATATTTCAATTTTCATGGG-3'

R- 5' TTATGAGGTTGGATTGTGG-3'

(۷) سانتیفریوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

(۸) حذف مایع رویی و خشک کردن در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت نیم ساعت و اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر آب DEPC.

(۹) قرار دادن در بن ماری ۵۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه.

تیمار DNase

به منظور حذف آلودگی ژنومی تیمار حذف ژنومی به شرح زیر صورت گرفت

(۱) افزودن یک میکرولیتر DNase buffer و ۰.۲۵ میکرولیتر از RNase inhibitor به همراه یک میکرولیتر آنزیم DNase به نمونه حاوی یک میکروگرم RNA.

(۲) قرار دادن نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه.

در این تحقیق از باکتری *E.coli* سویه DH5α و پلاسمیدهای pTG19 (شرکت سیناکلون) و pBI121⁻ و *GUS* استفاده شد. استخراج پلاسمید و واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های با خاصیت اصلاح‌کنندگی و تهیه باکتری‌های مستعد و واکنش اتصال طبق دستور العمل‌های Sambrook و Russel (۲۰۰۰) انجام شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های گیاهی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) (با استفاده از ترایزول) و سنتز cDNA به شرح زیر انجام شد:

(۱) پودر کردن ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی در ازت مایع.

(۲) اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر ترایزول به هر نمونه.

(۳) اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه.

(۴) سانتیفریوژ در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g.

(۵) جمع آوری سوپرناتانت (مایع رویی) و اضافه کردن حجم مساوی ایزوپروپانول سرد، مخلوط کردن و نگهداری روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه و سپس سانتیفریوژ.

(۶) حذف مایع رویی و اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰% به هر نمونه.

واکنش زنجیره ای پلی مرز و خالص سازی DNA تکثیری

واکنش PCR به منظور تکثیر ژن هدف از آنزیم HF با خاصیت اصلاح کنندگی و توانایی اضافه کردن A در انتهای 3' طبق پروتکل زیر استفاده شد. (آنزیم به میزان ۱ میکرولیتر در ویال های آماده وجود دارد).

۴) غیرفعال کردن آنزیم با استفاده از EDTA و قرار دادن برای ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد.

ساخت cDNA

مراحل ساخت cDNA طبق پروتکل شرکت کایژن cDNA Synthesis Kit با شماره کاتالوگ ۳۳۰۴۵۱ انجام شد.

مقدار	اجزای واکنش
۵۱ μ	H ₂ O
۵۰ ng (μ۱)	آغازگر forward
۵۰ ng (μ۱)	آغازگر reverse
۱۲۱ μ	مخلوط master
۱۰۰ ng (μ۱)	الگو
۲۰۱ μ	حجم نهایی

برنامه PCR به منظور تکثیر ژن هدف به شرح زیر است:

عمل	دما	زمان
۱ چرخه	94°C	۵ دقیقه
۳۵ چرخه	94°C	۶۰ ثانیه
چسبیدن آغازگر به DNA هدف	58°C	۶۰ ثانیه
تکثیر DNA هدف	72°C	۳ دقیقه
تکثیر نهایی	72°C	۵ دقیقه

همسانه سازی در پلاسمید pTG19

K0513) خالص سازی شدند. همسانه سازی بر اساس سیستم T/A-cloning و با استفاده از کیت T/A از شرکت سیناژن در ناقل pTG19 به شرح زیر انجام شد.

پس از آشکارسازی قطعات ژنی تکثیر شده در ژل الکتروفورز، قطعات مورد نظر با استفاده از کیت Silica Bead Gel Extraction Kit (Fermentas Co, Cat.No:

مقدار نسبت (۱:۳)	اجزای واکنش
۴ میکرولیتر	آب دوبار تقطیر
۱ میکرولیتر	بافر لیگاز
۱۰۰ ng	ناقل pTG19
۲۰ ng	قطعه DNA (خالص سازی شده)
۱ واحد	آنزیم DNAT ₄ لیگاز
۱۰ میکرولیتر	حجم نهایی

روش لیز قلیایی از سلول های باکتری استخراج شدند. به منظور تأیید درج قطعه از روش پی سی آر کلونی و هضم آنزیمی BamHI استفاده شد، در ادامه به منظور تایید نهایی توالی یابی صورت گرفت.

در ادامه، واکنش در دمای ۲۲ درجه برای یک ساعت نگهداری شد.

جهت تراریزش پلاسمید های نو ترکیب از باکتری سویه XL1Blue مطابق روش Sambrook و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. پلاسمید های نو ترکیب به

پلاسمید نو ترکیب pTG19 و حاوی ژن سیتوکروم p450 مورد هضم آنزیمی با BamHI به شرح زیر انجام شد.

همسانه سازی در پلاسمید pBI121^{-GUS}

مقدار	اجزای واکنش
۳۱ μ	آب
۱۱ μ	بافر تانگو 10x
۱ میکروگرم	پلاسمید
۱۱ μ	آنزیم BamHI
۱۰۱ μ	حجم نهایی

فسفاتاز از شرکت فرمانتاز (شماره کاتالوگ: MAN0012876) به شرح زیر صورت گرفت.

مقدار	اجزای واکنش
۲ میکرولیتر	آب دوبار تقطیر
۲ میکرولیتر	بافر (10x)
۱ μg	ناقل بیانی pBI121 ^{-GUS}
۱ میکرولیتر (یک واحد)	آنزیم آلکالین فسفاتاز
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی

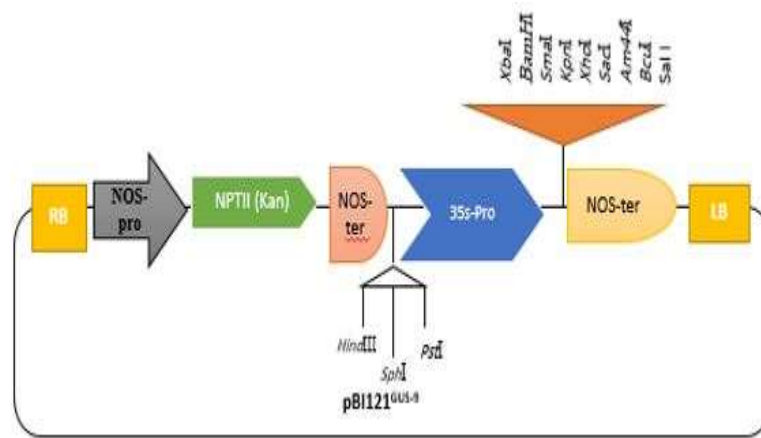
همزمان وکتور بیانی pBI121^{-GUS} (شکل ۱) با آنزیم *BamH1* برش داده شد. به منظور جلوگیری از عمل خود اتصالی دی فسفریله شدن توسط آنزیم آلکالین

قطعه هدف در سایت همولوگ وکتور pBI121^{-GUS} با استفاده از آنزیم لیگاز (شماره کاتالوگ: EL0014) از شرکت فرمانتاز طبق واکنش زیر همسانه شد.

میکرولیتر	اجزای واکنش
۶ میکرولیتر	H ₂ O
۲ میکرولیتر	Buffer T ₄ DNA ligase (10x)
۴۰ نانوگرم در میکرولیتر	قطعه ژن الحاقی
۳۰ نانوگرم در میکرولیتر	پلاسمید
۱ میکرولیتر (یک واحد)	آنزیم T ₄ DNA ligase
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی

از کلونی‌ها جهت بررسی و تایید همسانه سازی انتخاب شدند ، درنهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب به روش لیزقلیایی انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با دو روش PCR کلونی و هضم آنزیمی بررسی شدند.

وکتور نوترکیب به باکتری *E.coli* سویه *DH5α* انتقال یافت و باکتری‌ها روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین گزینش شدند. تعدادی



شکل ۱: شمایی از پلاسمید بیانی $pBI121^{GUS}$

شد، هضم آنزیمی با آنزیم برشی *BamHI* صورت گرفت (شکل ۲.پ). حضور دو باند حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید که یک تک باند در محدوده ۱۷۰۰bp مربوط به قطعه مورد نظر بوده و تک باند دیگر در محدوده ۳۰۰۰bp که مربوط به پلاسمید pTG19 می‌باشد، نشان‌دهنده الحاق ژن هدف در وکتور مورد نظر است. عدم وجود باند در آب نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی در نمونه‌ها است. پس از همسانه سازی و تایید قطعه هدف انالیز توالی یابی با استفاده از بلاست نشان داد که قطعه تکثیر شده با حداکثر شباهت متعلق به ژن سیتوکروم *p450* است. در ادامه قطعه هدف در سایت NCBI با کد دسترسی MK266241 به ثبت رسید. نتایج مربوط به همسانه سازی در وکتور بیانی $pBI121^{GUS}$ در شکل ۲.ث آورده شده است. جهت تایید همسانه سازی از دو روش PCR کلونی و هضم *BamHI* استفاده شد. حضور دو باند حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید که یک تک باند در محدوده ۱۷۰۰bp که مربوط به ژن سیتوکروم *p450* و تک باند دیگر در محدوده

نتایج و بحث

تکثیر ژن سیتوکروم *p450*

استخراج RNA از گیاه آویشن باغی نشان‌دهنده کیفیت مطلوب آن بود (شکل ۲-الف)، تکثیر ژن سیتوکروم *p450* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و آنزیم HF (که برآمدگی A اضافه می‌کند) در شکل ۲ آورده شده است. عدم وجود باند در کنترل منفی نشان دهنده عدم آلودگی واکنش است. هم ردیف بودن باند هدف با اندازه ۱۷۰۰ جفت بازی نشان دهنده تکثیر درست قطعه مورد نظر است.

نتایج مربوط به همسانه سازی ژن سیتوکروم در وکتور pTG19 به روش PCR کلونی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در شکل ۲.ب آورده شده است. قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی مربوط به تکثیر قطعه مورد نظر بوده و این بدان معناست که ژن سیتوکروم *p450* در وکتور pTG19 همسانه شده‌است. به منظور تایید بیشتر کلونی‌هایی که در مرحله‌ی PCR نتیجه‌ی مثبت داشتند انتخاب شده و از آن‌ها استخراج پلاسمید انجام

۱۳۰۰۰bp که مربوط به وکتور بیانی $pBI121^{GUS}$ می باشد.



شکل ۲. الف: تصویر استخراج RNA از نمونه‌ی آویشن باغی. ب: تصویر الکتروفورز محصول PCR جهت تایید پرایمرهای طراحی شده و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر. چاهک ۱ مربوط به قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژن سیتوکروم *p450* و چاهک - مربوط به کنترل منفی و چاهک M مربوط به لدر 1kb می باشد. ج: تایید همسانه سازی ژن سیتوکروم *p450* با روش PCR. چاهک M مربوط به لدر 1kb می باشد، چاهک های ۱ و ۳ و ۴ و ۵ مربوط به تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در نتیجه ی انجام PCR کلونی می باشد. د: هضم آنزیمی با *BamHI*. چاهک های M مربوط به لدر 1kb می باشد و چاهک های ۱ و ۲ و ۳ مربوط به هضم آنزیمی با *BamHI* می باشد. ه: آزمون PCR کلونی تایید کننده‌ی قطعه ژن سیتوکروم *p450*. چاهک M مربوط به لدر 1kb می باشد، چاهک ۲ و ۳ و ۴ و ۵ مربوط به تکثیر قطعه‌ی مورد نظر می باشد، چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت و چاهک منفی مربوط به کنترل منفی می باشد. ی: هضم آنزیمی پلاسمید $pBI121^{GUS-9}$ با *BamHI*. چاهک ۱ پلاسمید برش نخورده، چاهک ۲ پلاسمید غیرنوترکیب بعنوان کنترل منفی، و چاهک ۳، ۴ و ۵ پلاسمیدهای نوترکیب برش خورده با آنزیم برشی *BamHI* می باشد.

نتیجه گیری

سیتوکروم *p450* با بررسی مسیرهای بیوشیمیایی به این نتیجه رسیدند که در سنتز تیمول به همراه ژن ترپن سنتاز نقش کلیدی دارد (Erlangung, 1977)، بدین ترتیب آنچه ضروری بنظر می رسد کار بر روی افزایش بیان این ژن و استفاده از تشدیدکننده‌ها در بیان آن است. در این تحقیق تلاش ما بر این بوده است که روشی با کارایی بالا جهت همسانه سازی ژن سیتوکروم *p450* که می تواند برای بیوتکنولوژی و تنظیم مسیرهای تولید متابولیت های ثانویه به جهت افزایش ترکیبات مفید و ضدسرطانی همچون تیمول، مورد استفاده قرار گیرد.

در طی این تحقیق، ژن سیتوکروم *p450* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که طراحی شده بود بوسیله تکنیک PCR برای اولین بار جداسازی و کلون گردید و پس از تایید کلونینگ، تعیین توالی صورت گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی، نشان دهنده شباهت این ژن با ژن سیتوکروم *p450* در سایر گیاهان هم خانواده ی آویشن بود. در نهایت ژن هدف در وکتور بیانی $pBI121^{GUS}$ تحت پروموتور 35s همسانه شد. این وکتور طراحی شده می تواند جهت انتقال به گیاه مورد استفاده قرار گیرد. در رابطه با شناسایی نحوه عملکرد ژن

منابع

terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Marchese, A. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A

Croteau, A and Poulou, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -

Based Complementary and Alternative Medicine.

- Amaral, A. Fernandes, D. Labory, C. and Perina, E. (2015). Thymus vulgaris essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. *Pest management science*.
- Zmantar and. Miladi, M (2016). Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microbial pathogenesis*.
- Ahmad, I. Jafri. (2019). Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*.
- Jeon, J. Lee, Y. Chung, N & Lee, H. S Park.(2017). Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. *Scientific reports*.
- Kumar. J. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*. ۱۱۲-۹۳ .
- Karuzina. (1994). the oxidative inactivation of cytochrome p450 in monooxygenase reactions. *free radical biology and medicine*.
- brief review of the literature. *food chemistry*.
- Abd El Kader. (2012) .Evaluation of protective and antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on paracetamol-induced toxicity in rats. *Aust J. basic appl sci*.
- Crocoll. (2011). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. *Academic Dissertation, der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
- Basch, E (2004). *Thymus vulgaris* L, thymol. *Journal of herbal pharmacotherapy*.
- Panaitescu, M. Lengyel. (2019) . Chemical Compounds from *Thymus Vulgaris* and their Antimicrobial Activity. *Management of Sustainable Development*.
- Wanner, E and Höferl, M. (2012) . Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Natural product communications*.
- Kummer, F and Estevao-Silva, R. Fachini-Queiroz. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-*

- Mulabagal. (2004). Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*. ۲۰-۱ ،
- Visone, R. Marabini, C. M. and Calò, L. (2015). Thymol and Thymus Vulgaris L. activity against UVA-and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. *Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- Qaderi, S. Fatehi, A and Habibi, F (2018). The Study of Relative Expression of Key Genes of Thymol Biosynthesis Pathway in Thymus vulgaris cv. 'Varico 3' under Cold Stress Using Real-Time PCR. *Journal of Medicinal Plants*.
- Shirazi, Z (2018). Metabolic Engineering of Glycyrrhizin Pathway by Over-Expression of Beta-amyrin 11-Oxidase in Transgenic Roots of Glycyrrhiza glabra. *Molecular Biotechnology*. ۴۱۹-۴۱۲ .
- Erlangung, Z.(1977). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes , thymol and carvacrol , by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme Dissertation. Thesis.
- Benincasa, L. Fachin, A. L., Franca, Ferreira, S.C. (2016). Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. *Veterinary parasitology*.
- Tripathi, L. (۲۰۰۳). Role of biotechnology in medicinal plants. *Biotechnology and medicinal plant Trop J Pharm Res Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. ۲۴۳ ، (۲۲) ۲ .
- Tohidfar, M and Nomani, M. (۲۰۱۹) overexpression of TPS2 gene to increase thymol content using Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation in Trachyspermum ammi (Qom ecotype). *Industrial Crops and Products*.
- Mahmoudi. (2013). Effects of Mentha longifolia L. essential oil on viability and cellular ultrastructure of Lactobacillus casei during ripening of probiotic Feta cheese. *international journal of dairy technology*.
- Monira. (2012). Evaluation of protective and antioxidant activity of thyme (Thymus vulgaris) extract on paracetamol-induced toxicity in rats. *Australian journal of basic and applied sciences*. ۴۶۷ .

Identification, isolation and cloning of *cytochrome p450* from *Thymus vulgaris*

Mahsa Mohammadi¹ and Masoud Tohidfar^{2*}

Abstract

Thymol is one of the most widely used secondary metabolites in *Thymus vulgaris*, as a drug. One of the key genes which is involved in its synthesis is the *cytochrome p450* gene. In order to isolate and cloning *p450* gene, the extraction of RNA was carried out subsequently the cDNA synthesized. Amplification of cDNA was carried by using designed primers from conserve region in the presence of the HF enzyme that has the property of 3' to 5' exonuclease. In first stage cloning was done by T/A method in plasmid pTG19. Selection of recombinant colony was performed by PCR system and digestion with *Bam*HI. The cloned fragments were sequenced for the final confirmation. In order to cloning in the plant expression vector pBI121^{GUS-9}, the fragments that were cut with the *Bam*HI enzyme were cloned in homologous site of the pBI121^{GUS-9} vector under the promoter 35s and the Nos terminator. Confirmation of recombinant colonies was performed with colony PCR and digestion. This designed recombinant vector can be used for further research and over- expression of thymol.

Keyword: *Thymus vulgaris* L, Thymol, *cytochrome p450*, cloning

¹ Student of MSc. Of Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² *Corresponding Author. Department of Plant Biotechnology, Faculty of science and biotechnology, Shahid Beheshti University, G. C. Tehran, Iran. Email: M_Tohidfar@sbu.ac.ir