

جداسازی، مدل سازی ساختاری و بررسی بیان ژن استریکتوزیدین سنتاز دخیل در مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در گیاه *Papaver somniferum*

محمد بصیری^۱، امین ابراهیمی^۲، سجاد رشیدی منفرد^{۳*}، مهدی رضایی^۴، مختار جلالی جواران^۵

۱- کارشناس ارشد و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ۴- استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۹)

چکیده

پروتئین استریکتوزیدین یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای گیاهی است. در حال حاضر، هیچ اطلاعاتی درباره توالی ژن استریکتوزیدین در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف برای گیاه خشخاش ثبت نشده است. بنابراین، این تحقیق با هدف جداسازی توالی کامل ژن استریکتوزیدین، آنالیزهای بیوانفورماتیکی و بررسی بیان آن در اندام‌های مختلف *Papaver somniferum* و *Papaver bracteatum* انجام شد. توالی توافقی ژن STR با ۱۱۷۹ جفت باز، پس از شناسایی توالی‌های توافقی حاصل از سره کردن خوانش‌های مشابه در گونه‌های نزدیک به دست آمد. مطالعات فیلوژنی نشان داد که بخش انتهایی این آنزیم، دارای بیشترین حفاظت شدگی است. در ضمن، محدوده دمین عملکردی پروتئین استریکتوزیدین شامل باقیمانده‌های ۱۸۱ تا ۲۶۸ بود. با توجه به جداسازی طول کامل توالی توافقی ژن استریکتوزیدین، پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین آن با استفاده از روش مقایسه‌ای حاصل از برنامه Modeller و پیش‌بینی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آن با استفاده از نرم‌افزار GROMACS انجام شد. نتایج پیش‌بینی و ارزیابی ساختار سوم، بیانگر پایداری ساختاری مدل پیش‌بینی شده بود. در نهایت بررسی بیان ژن استریکتوزیدین در بافت‌های برگ، ساقه و غوزه گیاه خشخاش نشان داد که میزان بیان این ژن در بافت‌های مورد مطالعه به ترتیب حدود ۱۲، ۴/۰۹ و ۱/۳ برابر ریشه به‌عنوان شاهد بود. همچنین در گیاه شقایق کبیر، ریشه بیشترین بیان (بیش از پنج برابر کپسول) را به خود اختصاص داد، درحالی‌که میزان بیان ساقه و برگ به ترتیب بیش از سه و ۲/۵ برابر کپسول بود. نتایج این تحقیق، امکان دستوری ژن استریکتوزیدین با هدف مهندسی مسیر آلکالوئیدهای خشخاش را فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها، خشخاش، جداسازی، ژن استریکتوزیدین.

Isolation, structural modeling and evaluation of strictosidine synthase gene expression involved in the biosynthesis pathway of indole alkaloids in *Papaver somniferum*

Mohammad Basiri¹, Amin Ebrahimi², Sajad Rashidi-Monfared^{3*}, Mahdi Rezaei⁴, Mokhtar Jalali-Javaran⁵

- 1,5. Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran.
2. Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran.
3. Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran.
4. Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran.

(Received: November 11, 2020 - Accepted: December 19, 2020)

ABSTRACT

Strictosidine synthase protein is one of the key enzymes involved in the biosynthesis of plant alkaloids. To date, no information on strictosidine synthase sequences of *Papaver somniferum* has been recorded in various databases. Therefore, the aim of this study was to isolate the complete ORF sequence of strictosidine gene, bioinformatics analysis of this gene and study its expression in different organs of *Papaver somniferum* and *Papaver bracteatum*. The consensus sequence of strictosidine gene with 1179 bp was obtained after identifying the consensus sequence resulting from assembling similar readings in related species. Also, the strong sequence conservation was observed in the terminal parts of the strictosidine synthase enzyme. Due to the isolation of the full length of the consensus sequence, the prediction of its third protein structure was performed using the comparative method obtained from the Modeller program and its molecular dynamics was predicted and simulated using the GROMACS software. The results of prediction and evaluation of the third structure indicated the structural stability of the predicted model. Finally, the expression of strictosidine synthase gene expression in the leaf, stem and capsule tissues of *Papaver somniferum* was 12, 4.09 and 1.3 times more than the root as a control, respectively. Also, in *Papaver bracteatum*, the root had the highest expression (5 times than the capsule) and the stem (3 times than the capsule) and the leaf (2.5 times than the capsule) took the next ranks. The results of this study provide the possibility of STR gene manipulating with the aim of engineering the pathway of Papaver alkaloids.

Keywords: Gene expression, gene isolation, indole alkaloid biosynthesis, papaver, strictosidine gene.

* Corresponding author E-mail: Rashidims@modares.ac.ir

مقدمه

(Ajmaline) موثر هستند (Ma et al., 2006).

پروتئین استریکتوزیدین (با نام اختصاری STR) یکی از آنزیم‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گیاهی است که با ترکیب دو بلوک ساختاری اولیه یعنی تریپتامین (Tryptamine) و سکولوگانین (Secologanin)، باعث تولید استریکتوزیدین می‌شود. آنزیم استریکتوزیدین، اولین مرحله از این مسیر بیوسنتزی را با هدف تولید تمام اعضای خانواده مونوترپنوئید ایندول آلکالوئیدها کاتالیز می‌کند که در حقیقت به‌عنوان یک نمونه‌ی استثنایی از واکنش‌های دخیل در مسیر بیوسنتز محصولات طبیعی شناخته می‌شود (Ma et al., 2006). داستیل ایزوآپیوکساید سنتاز^۱؛ داستیل آپیوکساید سنتاز^۲ و نورکوکلاپورین سنتاز^۳ تنها آنزیم‌های شناخته شده وابسته به استریکتوزیدین هستند. داستیل ایزوآپیوکساید سنتاز و داستیل آپیوکساید سنتاز، در ترکیب با تریپتامین و سکولوگانین، واکنش را به سمت تولید آلکالوئیدهای مونوترپنوئید تتراهیدروایزوکوئینولین هدایت می‌کنند (Ma et al., 2006) و نورکوکلاپورین سنتاز در ترکیب با دوپامین 4-Hydroxyphenylacetaldehyde شروع بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین^۴ (از قبیل مورفین، سنگواینارین یا بربرین) را تحریک می‌کند (Samanani et al., 2004). بنابراین استریکتوزیدین و آنزیم‌های ساختاری مربوط به آن، جزو آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز ۵۰ درصد از تمام انواع آلکالوئیدها محسوب می‌شوند و در حال حاضر، مکانیسم واکنش و یا آمینواسیدهای ضروری برای فعالیت آنزیمی آن‌ها به‌درستی مشخص نشده است (Ma et al., 2006). توالی نوکلئوتیدی استریکتوزیدین برای اولین بار از سوسپانسیون سلولی *Catharanthus roseus* و سپس *Rauwolfia serpentina* جداسازی شد (Ma et al., 2006). آنزیم استریکتوزیدین حاصل از *R. serpentina* پروتئینی مونومر با ۳۴۴ آمینواسید

بسیاری از داروها و پیش‌سازهای دارویی از جمله خانواده آلکالوئیدها و ایندول آلکالوئیدها از منابع گیاهی تأمین می‌شوند. آلکالوئیدهای خشخاش (به‌غیر از Protopine، Cryptopine و Thebaine) بسیار منحصربه‌فرد هستند، چراکه در هیچ یک از جنس‌های گیاهی به‌جز *Papaver* تولید نمی‌شوند. بنابراین، لزوم توجه به گیاه خشخاش به‌عنوان تنها منبع تأمین‌کننده آلکالوئیدهای گروه مورفین (مورفین، تبائین، کدئین...) و متابولیت‌های ثانویه خشخاش و مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Leonard et al., 2009). جداسازی توالی کامل cDNA، یک مرحله‌ی کلیدی در تحقیقات مرتبط با بیان ژن، شناخت عملکرد، ساختار و برهمکنش‌های پروتئین با پروتئین محسوب می‌شود (Hirano, 2004)؛ از این رو، کسب اطلاعات در زمینه توالی‌های ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در این مسیرهای بیوسنتزی ضروری به‌نظر می‌رسد.

آلکالوئیدهای خشخاش از طریق مسیرهای متفاوتی تولید می‌شوند. در مسیر اول، ابتدا L-تریپتوفان (L-Tryptophan) با حضور تریپتوفان دکربوکسیلاز (Tryptophan decarboxylase) به تریپتامین تبدیل می‌شود؛ سپس تریپتامین با سکولوگانین (Secologanin) ترکیب می‌شود و اولین حدواسط منبع نیتروژن در تولید مولکول‌های آلکالوئیدی استریکتوزیدین (Strictosidine) را تولید می‌کند (Facchini et al., 2000). در مسیر دوم، آنزیم تیروزین/دوپا دکربوکسیلاز منجر به تولید اولین حدواسط حاصل از تیروزین در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهایی با منشأ تیروزین می‌شود (Facchini et al., 2000). آلکالوئیدهایی با منشأ تیروزین، جزو متنوع‌ترین انواع آلکالوئیدها از لحاظ دارویی و ساختاری محسوب می‌شوند و در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان (Vinblastine)، Camptothecin و نیز نوسکاپین، مالاریا (Quinine)، فشارخون بالا (Reserpine و Raubasine)، شیزوفرنی (Reserpine با دوز بالا) و اختلالات تپش قلب

^۱- Dastyl isoepoxide synthase

^۲- Dastyl ipoxide synthase

^۳ Neuroclaurin synthase

^۴- Benzyl isoquinoline

خوانش‌های ژن استریکتوزیدین حاصل از پروژه‌های توالی‌یابی RNAی خشخاش (با شناسه‌های دسترسی SRX039638 و SRX096061) در پایگاه SRA-NCBI با استفاده از توالی‌های ارتولوگ مشابه در سایر گیاهان با کمک برنامه BLAST Offline (v.2.7.0) شناسایی شدند. سپس، مجموع این قطعات، با استفاده از نرم‌افزار Codoncode aligner (Ver. 5.0.1) با یکدیگر سرهم^۵ شدند. در مرحله بعد، چارچوب قرائت ژن استریکتوزیدین با بررسی توالی حاصل در برنامه آنلاین^۶ ORF Finder شناسایی شد. به‌منظور تأیید این چارچوب و ORF مورد نظر، از نرم‌افزار^۷ BLASTp استفاده شد. هم‌ردیفی چندگانه با استفاده از برنامه^۸ Clustal Omega و رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه^۹ MEGA انجام شد. پس از تأیید توالی مورد نظر، دو آغازگر در خارج و داخل ناحیه ORF ناحیه طراحی شدند (جدول ۱). ویژگی‌ها و برهمکنش‌های احتمالی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین^{۱۰} OligoAnalyzer 3.1 بررسی شد.

ساخت cDNA، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن استریکتوزیدین خشخاش

استخراج RNA با استفاده از کیت خالص‌سازی RNAی گیاه و قارچ شرکت Topaz top (mini-prep) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و جهت حذف آلودگی‌های احتمالی DNA، آنزیم DNase I (TIANGEN Biotech (Beijing) Co., Ltd., cat No.: RT411, China) مورد استفاده قرار گرفت.

کیفیت RNA از طریق دستگاه نانودراپ شرکت Epoch BioTek و ژل آگارز یک درصد بررسی شد. cDNA در حجم ۲۰ μl با استفاده از OligodT و آنزیم

می‌باشد (Kutchan, 1993) که به‌ترتیب با آنزیم‌های جدا شده از *Ophiorrhiza* و *Catharanthus roseus*، ۷۹ و ۵۸ درصد شباهت دارد (Ma et al., 2006). توجه به گیاه خشخاش و نیز مسیرهای متابولیکی و ژنتیکی وابسته به آن به‌خصوص ژن استریکتوزیدین می‌تواند در تولید آلکالوئیدهای مهم این مسیر بیوسنتزی در حال و آینده موثر باشد. تاکنون اطلاعاتی درباره توالی ژن استریکتوزیدین در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف برای این گیاه ثبت نشده است. بنابراین این تحقیق با هدف جداسازی توالی کامل ژن استریکتوزیدین به‌عنوان عاملی کلیدی در سنتز ایندول آلکالوئیدها، بررسی ویژگی‌های پروتئین شناختی آن و ارزیابی میزان بیان نسبی این ژن در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و غوزه گیاهان خشخاش (*Papaver somniferum*) و شقایق کبیر (*Papaver bracteatum* L.) انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر *P. somniferum* در گلدان‌های چهار لیتری با ترکیب ۴۰ درصد کوکوپیت، ۴۰ درصد پرلیت و ۲۰ درصد خاک زراعی در گلخانه با شرایط نوری هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی کاشته شد. قوزه‌های خشخاش، سه ماه پس از تاریخ کاشت ظاهر شدند و در مرحله بلوغ (دو هفته پس از ریزش گلبرگ‌ها)، نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف گیاه انجام شد. نمونه‌های گونه *P. bracteatum* به‌دلیل چند ساله بودن گیاه مذکور از منطقه پلور (دماوند) جمع‌آوری و پس از فریز شدن در محل، به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

شناسایی توالی توافقی و ORF احتمالی

به‌منظور شناسایی توالی توافقی^۱ ناحیه کدکننده^۲ ژن استریکتوزیدین، ابتدا توالی‌های قطعات بیانی^۳ و

^۵ Reads

^۶ - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>

^۷ Assemble

^۸ - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

^۹ - Search protein database using a protein query

^۱ - <https://www.ebi.ac.uk/Tool/MSA/clustalo/>

^۱ - <http://www.megasoftware.net/mega.php>

^۱ - <https://eu.idtdna.com/calculator/oligo>

^۱ - Open Reading Frame

^۲ Consensus

^۳ - CDS (Coding DNA Sequence)

^۴ - Expressed Sequence Tag (EST)

جدول ۱- اسامی و مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در بخش‌های مختلف این تحقیق

Table 1. Names and characteristics of specific primers designed in different parts of this research

Name	Type	(5' - 3') Primer Sequence	Length (bp)
PS.STR.F1	Inside ORF	TGTTTATTGCGCAGTTGATCC	1129
PS.STR.R1	Inside ORF	TTCCAACGTATAAACGGCAAC	
PS.STR.F2	Outside ORF	AATTCCTTTACTCACTCCGG	1316
PS.STR.R2	Outside ORF	AGTCATTTCCAGAATCCATCC	
PsSTRF1. F	qRT-PCR	TGTTTATTGCGCAGTTGATCC	119
PsSTRR. R	qRT-PCR	TCTTGCTATCCCTCTCTGTG	-
ACT. F (Reference)	qRT-PCR	GCAGGGATCCACGAGACCACC	193
ACT. R (Reference)	qRT-PCR	CCCACCACTGAGCACAATGTTC	-
EF1 α . F	qRT-PCR	CTGGTGGTTTTGAAGCTGGT	213
EF1 α . R	qRT-PCR	TGTTGTACCCTCGAATCCA	-
PsSTRF2. F	Nested-PCR	AATTCCTTTACTCACTCCGG	-
PsSTRR2. R	Nested-PCR	AGTCATTTCCAGAATCCATCC	-
PsSTRF1. F	Nested-PCR	TGTTTATTGCGCAGTTGATCC	-
PsSTRR1. R	Nested-PCR	TTCCAACGTATAAACGGCAAC	-
Short-Primer	Nested-PCR	AAGAAGTCCTAACAACGCAGAGC	-
Long-Primer	Nested-PCR	AAGAAGTCCTAACAACGCAGAGCAC	-
Modified OligodT	Nested-PCR	AAGAAGTCCTAACAACGCAGAGCAC (t)18	-
PS.STR_F1	Inside ORF	TGTTTATTGCGCAGTTGATCC	119
STR.Real	Inside ORF-RT	TCTTGCTATCCCTCTCTGTG	-

PCR^۲ استفاده شد. برای ساخت cDNA، از نوعی OligodT تغییر یافته حاوی یک توالی ۲۵ نوکلئوتیدی در قسمت انتهایی آن (یعنی بعد از توالی ۱۸ نوکلئوتیدی تیمین) استفاده شد (بنابراین به انتهای ۳' تمام cDNAهای سنتز شده، یک توالی ۲۵ نوکلئوتیدی اضافه شد). در مرحله بعد با توجه به توالی اضافه شده، دو آغازگر مکمل با طول‌های متفاوت (Short-Primer، Long-Primer) (جدول ۱) طوری طراحی شدند که بعد از سنتز، دو قطعه همپوشان را تکثیر کنند. غلظت نهایی Buffer، MgCl₂، dNTP، هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت و Taq Polymerase به ترتیب 1X، 1X، ۰/۳۵ میلی مولار، یک پیکومول و ۰/۱۲۵ واحد بر میکرولیتر بود. به این ترتیب با استفاده از آغازگرهای آشیانه‌ای و نیز دو آغازگر Long و Short وجود ژن مورد نظر تأیید و توالی 3'UTR از ژن استریکتوزیدین جداسازی شد. طی اولین PCR، از cDNA تغییر یافته و آغازگرهای F2 و Long-Primer و در مرحله بعد، از محصول اولین PCR همراه با آغازگرهای F1 و Short-Primer استفاده شد. سپس قطعه تکثیری با طول مورد انتظار خالص سازی، همسانه سازی و توالی‌یابی شد.

رونوشت بردار معکوس M-MuLV^۱ شرکت SolisBiodyne و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. برای تعیین دمای اتصال بهینه آغازگرها، از PCR با شیب دمایی و دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد (به عنوان دمای بهینه اتصال) استفاده شد. سپس PCR با ترکیب‌های آغازگری F1+R1، F2+R2، F1+R2 و F2+R1 انجام شد. قطعه تکثیر شده از ORF به وسیله کیت PCR product clean up شرکت Sigma از روی ژل تخلیص و در وکتور TA cloning (pTG19-T) شرکت Vivantis همسانه سازی شد. در ضمن، از باکتری *E-Coli* سویه DH5 α به عنوان میزبان استفاده شد. برای شناسایی و تأیید همسانه‌های تراریخت، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. پس از تأیید و کشت همسانه انتخاب شده، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت Topaz انجام و با هدف توالی‌یابی به شرکت سیناکلون ارسال شد. سپس نتایج حاصل از توالی‌یابی با توالی مورد توافق، هم‌ردیف و مقایسه شدند. در نهایت، آغازگرهای مورد نظر با هدف تأیید توالی ژن هدف و انجام واکنش RT-PCR طراحی شدند.

جداسازی انتهای 3'UTR

به منظور جداسازی انتهای 3'UTR از روش RACE-

^۲- Rapid amplification of cDNA ends

^۱- Reverse Transcriptase (RT)

مدل و زنجیره‌های جانبی آن با استفاده از برنامه ارزیابی مدل‌های ساخته‌شده از نرم‌افزار آنلاین ProSa-Web استفاده شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین RAMPAGE^۹، نمودار رامچاندرا مدل بهینه شده ترسیم شد.

کمی‌سنجی رونوشت‌های ژن استریکتوزیدین

در این تحقیق، میزان بیان ژن استریکتوزیدین در دو گونه *Papaver bractatum* و *Papaver somniferum* با استفاده از روش Quantitative Real time PCR در چهار بافت غوزه، برگ، ساقه و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. RNA از تمام بافت‌ها با استفاده از کیت شرکت Topaz استخراج و کیفیت و کمیت آن با استفاده از نانوداراپ و ژل آگارز یک درصد تعیین شد. از دو ژن خانه‌دار Actin (Gholami *et al.*, 2013) و Elongation factor 1 α (Cutri, 2013) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱). از بین این دو ژن، بهترین گزینه با استفاده از نرم‌افزارهای Bestkeeper-1 و geNorm (Pfaffl *et al.*, 2004) انتخاب شد. واکنش‌ها qRT-PCR در حجم ۲۰ μ l و با استفاده از 2x Cybergreen Master mix شرکت Ampliqon در دستگاه BioRad (mini opticum) (با سه تکرار بیولوژیکی) انجام شد. مرحله اولیه واکنش در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. سپس واکنش اصلی در ۳۵ چرخه و با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه) انجام شد. واکنش کنترل منفی، شامل استفاده از تمامی ترکیبات واکنش به‌جز cDNA جهت بررسی احتمال آلودگی خارجی به‌کار گرفته شد. به‌منظور تجزیه داده‌های qRT-PCR، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی^{۱۰} بر پایه فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

پیش‌بینی مکان درون سلولی و مدل‌سازی پروتئین

به‌منظور شناسایی موقعیت اسیدهای آمینه موجود در زنجیره‌های ساختار پروتئین، از برنامه آنلاین PORTER^۱ و Sum PDB^۲ استفاده شد. همچنین از برنامه آنلاین Predict NLS^۳ و PSORT^۴ جهت پیش‌بینی مکان قرارگیری پروتئین STR و از برنامه آنلاین Signal P^۵ به‌منظور پیش‌بینی وجود و عدم وجود Signal peptide و مکان قرارگیری آن‌ها استفاده شد. برنامه آنلاین BlastP با هدف شناسایی شبیه‌ترین ساختار احتمالی به توالی پروتئینی حاصله در پایگاه (PDB)^۶ مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصل از پایگاه PDB، از ساختار NMR STR1 در *Rauvolfia serpentina* (شناسه PDB: 2FP8) به‌عنوان الگو استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار Modeller ver. 9.14، ساختاری کلی برای توالی STR استخراج شده از گیاه خشخاش پیش‌بینی شد.

از بین ۱۰۰۰ مدل ساخته شده توسط نرم‌افزار Modeller، بهترین مدل با کمک دو معادله ارزیابی-کننده Dope score و Molpdf (با کمترین میزان Dope score) انتخاب شد و برای شبیه‌سازی دینامیکی مورد استفاده قرار گرفت. از برنامه GROMACS 5.0.2 به‌منظور بررسی دینامیک مولکولی ساختار پروتئینی پیش‌بینی شده و اطمینان از صحت پیش‌بینی ساختار استفاده شد. زمان شبیه‌سازی ۲۰ نانوثانیه و گام‌ها معادل دو فمتو ثانیه در نظر گرفته شد و از مدل آب SPC^۷ ویژه Force Field GROMOS96 43a1 در این شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. برای خنثی‌سازی سیستم و ایجاد تعادل بار، دو یون سدیم به جای مولکول‌های آب به سیستم اضافه شد. پس از ساخت و تأیید مدل،

¹- <http://distill.ucd.ie/porter/>

²- <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>

³- <https://www.predictprotein.org/>

⁴- <https://wolfsort.hgc.jp/>

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

⁶- <https://www.rcsb.org/>

⁷- Simple point charge

⁸-

<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>

⁹-

<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage>.

¹ - Relative standard curve method

نتایج و بحث

سرهم کردن قطعات EST و خوانش‌ها، تعیین

توالی کانتیگ توافقی و ترسیم درخت فیلوژنی

از ESTها به منظور دستیابی به توالی توافقی ژن‌های فاقد اطلاعات در بانک‌های اطلاعاتی استفاده می‌شود. از آنجا که ESTها مجموعه‌ای از قطعات همپوشان هستند که به صورت تکرار شونده توالی‌یابی شده‌اند، بنابراین ممکن است توالی‌های تکراری در قسمت‌های همپوشان با سایر قطعات تا حدودی متفاوت باشند. این ویژگی باعث ایجاد خطا در به دست آوردن توالی توافقی خواهد شد؛ به همین دلیل برای دستیابی به نتایج مطمئن ابتدا باید این توالی‌ها را از مجموعه هدف حذف کرد. به این روش اصطلاحاً یکپارچه‌سازی اطلاق می‌شود. در این پژوهش، در مجموع ۲۰۰ توالی EST حاصل از همردیفی محلی با کمک برنامه BLAST انتخاب شدند. تعداد توالی‌های EST بعد از فرآیند یکپارچه‌سازی به ۱۸۰ عدد کاهش یافتند و در مرحله بعدی با استفاده از برنامه Codoncode aligner سرهم‌بندی شدند. طول توالی توافقی حاصل از سرهم‌بندی توالی‌های EST ۱۴۶۸ نوکلئوتید بود. تعیین چارچوب قرائت مناسب به وسیله نرم‌افزار ORF finder، وجود یک قطعه به طول ۱۱۷۹ باز (از باز ۱۸۱ الی ۱۳۵۹) را در فریم ۲- تایید کرد. پس از همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعه مورد نظر، توالی آن با شماره دسترسی KP143741 در پایگاه NCBI ثبت شد. با انجام BLASTp علاوه بر تأیید صحت توالی انتخاب شده، توالی‌های ارتولوگ ژن مورد نظر نیز انتخاب و ذخیره شدند. پس از انجام همردیفی چندگانه با استفاده از برنامه CLUSTAL Omega، درخت فیلوژنی بر اساس روش Maximum Likelihood (ML) با تست BootStrap 1000 ترسیم شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که

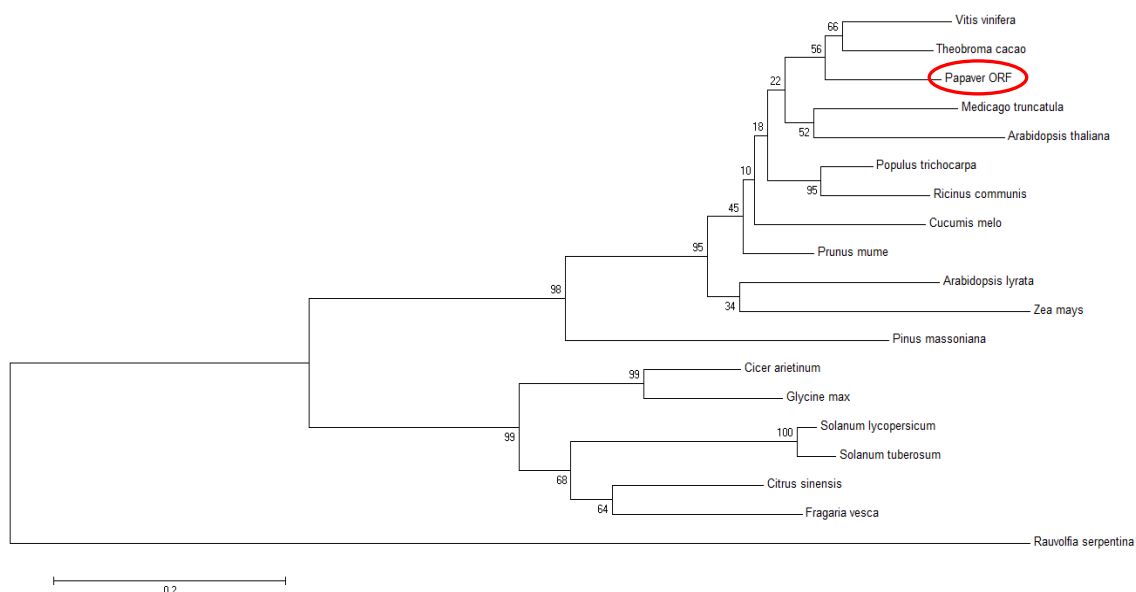
خشخاش، دارای بیشترین قرابت از نظر ژن مذکور با گیاهان کاکائو و انگور می‌باشد (شکل ۱). علاوه بر این، محدوده تقریبی دمین پروتئین استریکتوزیدین پیش-بینی و جهت تایید آن از پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئین InterPro استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل، دمین عملکردی پروتئین استریکتوزیدین شامل باقیمانده‌های ۱۸۱ تا ۲۶۸ بود (شکل ۲).

واکنش PCR آشیانه‌ای

بعد از شناسایی توالی توافقی ژن استریکتوزیدین در خشخاش، از واکنش PCR آشیانه‌ای و آغازگرهای مختلف (جدول ۱) به منظور تایید این توالی استفاده شد. با توجه به شکل ۳، دو آغازگر طراحی شده از قسمت‌های داخلی ژن استریکتوزیدین به صورت کاملاً اختصاصی تکثیر شده‌اند؛ بنابراین ناحیه داخلی ORF در یک ناقل مناسب همسانه‌سازی شد. با انجام PCR بر روی کلنی‌های حاصل (شکل ۳)، استخراج ناقل و توالی‌یابی به صورت دوطرفه هویت قطعه تکثیری تایید شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی وجود یک قطعه تقریباً ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتیدی را مطابق با نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی (همردیفی ESTهای سرهم‌بندی شده) تایید کرد.

واکنش RACE-PCR

به منظور تایید دقیق‌تر توالی ژن استریکتوزیدین و نیز پیش‌بینی طول UTR 3' این ژن، از روش RACE-PCR استفاده شد. قطعات حاصل از آغازگرهای اختصاصی RACE-PCR (جدول ۱)، دارای طولی در حدود ۱۴۰۰-۱۵۰۰ نوکلئوتید بودند (شکل ۳). از آنجا که طول چارچوب قرائت باز در این ژن تقریباً ۱۲۰۰ نوکلئوتید بود، بنابراین طول ناحیه UTR 3' این ژن تقریباً برابر با ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۴). اندازه قطعات تکثیر شده بر اساس توالی مورد توافق با قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز، بیانگر صحت تکثیر ناحیه 3' توالی مورد توافق می‌باشد.



شکل ۱- درخت فیلوژنی حاصل از توالی‌های اورتولوگ ژن استریکتوزیدین بر اساس مدل Maximum Likelihood (ML) با استفاده از نرم افزار Mega 5

Figure 1. Phylogenetic tree obtained from orthologous sequences of STR gene based on Maximum Likelihood (ML) model using Mega 5 software (*V. vinifera* (XP_002278088.1), *T. cacao* (EOY33230.1), *P. trichocarpa* (EEE82963.2), *R. communis* (EEF48687.1), *M. truncatula* (KEH29729.1), *A. thaliana* (AEE28296.1), *P. mume* (XP_008230556.1), *C. melo* (XP_008453519.1), *A. lyrata* (EFH50300.1), *Z. mays* (DAA51393.1), *P. massoniana* (AGU43759.1), *C. arietinum* (XP_004493426.1), *G. max* (XP_003554139.1), *S. lycopersicum* (XP_004249227.1), *S. tuberosum* (XP_006351273.1), *C. sinensis* (XP_006494390.1), *F. vesca* (XP_004307669.1), *R. serpentina* (P68175)).

Vitis_vinifera	ATSLVTEADGVPLRFTNDLDIDD-AGNIYFTDSSSYQRRNFMQLVFSSEDSGRLKLYDE	222
Theobroma_cacao	ATSLVTEAEGVPLRFTNDLDIDD-EGNIYFTDSSSIYQRRNFMQLVFSSESSESGRLKLYNE	222
Populus_trichocarpa	ATSLSNEAEGVPLRFTNDLDIDD-EGNIYFTDSSITIQRRNFMQLVFSSESGRLKLYNE	222
Papaver_ORF	ATSLVTEAEGVPLRFTNDLDIDD-EGNIYFTDSSITIQRRNFIQLVFSSESGRLKLYNE	223
Rauwolfia_serpentina	ATQLATSVDGVPFKWLVAVTVDQRTGIVYFTDVSSTLYDDSGVQQIMDTSDTGRLLKLYDE	194

Vitis_vinifera	LTRETTVLLRGLQFPNGVSLSDGSEFLVLCGSPGLVLYWLGDKAGTSEVFAILPGYF	282
Theobroma_cacao	HTREATTVLVNIQFPNGVSLSDGSEFLVFCGCLGLRHYWLGDKAGTSEVFAILPGFP	282
Populus_trichocarpa	TTRETTVLVNLOFPNGVSLSDGSEFLVFCGSLGLRHYWLGDKAGTSEVFAILPGFP	282
Papaver_ORF	NTRETTVLVNLOFPNGVSLSDGSEFLVFCGSLGLRHYWLGDKAGTSEVFAILPGFP	283
Rauwolfia_serpentina	STRETTVLLRGLHVFEGGAEVSDSSPVLVAEFLSHQIVLYWLGEGPKKGTAVLVKIP-NF	253

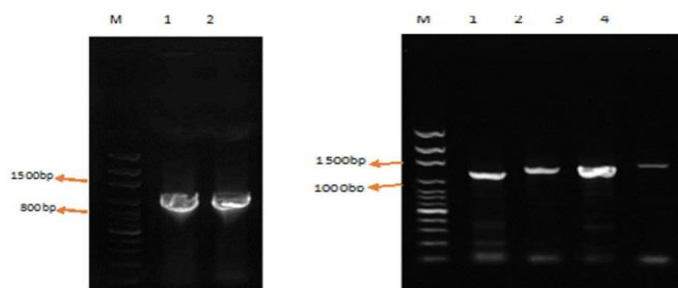
شکل ۲- بخشی از نتایج هم‌ردیفی توالی‌های ارتولوگ در چهار گونه *Theobroma cacao* (EOY33230.1), *Populus trichocarpa* (EEE82963.2), *Rauwolfia serpentina* (P68175) با توالی ORF

خشخاش به منظور شناسایی زمین‌های حفاظت شده و جایگاه‌های فعال (نواحی خاکستری رنگ شامل زمین عملکردی استریکتوزیدین دارای بیشترین حفاظت شدگی است).

Figure 2. A part of *P. somniferum* CLUSTAL W2 alignment with four other species *Vitis vinifera* (XP_002278088.1), *Theobroma cacao* (EOY33230.1), *Populus trichocarpa* (EEE82963.2), *Rauwolfia serpentina* (P68175) to find the STR conserved domain and active site (the highlighted grey amino acids and marked with upside green bars).

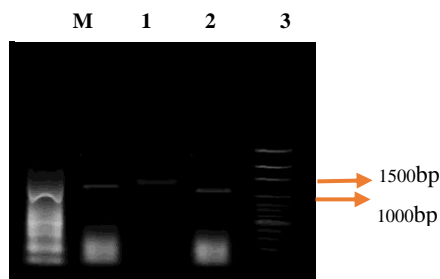
Zenk, (1984)، سیتوسول را به‌عنوان محل قرارگیری و ذخیره این آنزیم پیش‌بینی کرد، درحالی‌که در سال- های ۱۹۹۱ و ۲۰۰۳ طی دو پژوهش متفاوت، واکوئل به‌عنوان محل صحیح قرارگیری و ذخیره تایید شد (Hashimoto & Yamada, 2003; Salim & De) (Luca, 2013).

مکان‌یابی درون سلولی پروتئین استریکتوزیدین جهت پیش‌بینی محل ذخیره و قرارگیری آنزیم استریکتوزیدین، از برنامه PSORT و نرم‌افزار Predict NLS استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که محل ذخیره و قرارگیری آنزیم استریکتوزیدین در واکوئل است. نتایج پژوهش Deus-Neumann &



شکل ۳- محصول واکنش PCR آغازگرهای آشیانه‌ای (شکل سمت راست) آغازگرهای F1 و R1، ۲) آغازگرهای F1 و R2، ۳) آغازگرهای F2 و R1، ۴) آغازگرهای F2 و R2. محصول کلنی PCR ژن STR (جهت تشخیص همسانه‌های حاوی قطعات توالی مورد نظر) (شکل سمت چپ).

Figure 3. PCR product reaction of nested primers (right figure) F1 and R1 primers, 2) F1 and R2 primers, 3) F2 and R1 primers, 4) F2 and R2 primers. STR gene PCR colony product (to identify clones containing the desired sequence fragments) (left figure).



شکل ۴- الکتروفورز محصولات واکنش RACE-PCR بر روی ژل آگارز یک درصد، چاهک یک: ترکیب دو آغازگر F1 و R1، چاهک دو: محصول RACE-PCR دوم، چاهک سه: ترکیب دو آغازگر F2 و R2 و چاهک چهار: محصول RACE-PCR اول.

Figure 4. Electrophoresis of RACE-PCR reaction products on 1% agarose gel, 1: combination of two primers F1 and R1, 2: RACE-PCR product II, 3: combination of two primers F2 and R2 and 4: product RACE-PCR first.

پیش‌بینی ساختمان دوم و سوم پروتئین استریکتوزیدین

پس از تایید توالی نوکلئوتیدی ORF ژن استریکتوزیدین، توالی پروتئینی این ژن با هدف شناسایی ویژگی‌های پروتئین شناختی آن بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز ساختمان اول پروتئین استریکتوزیدین نشان داد که این پروتئین با ۳۹۲ آمینواسید دارای وزن مولکولی ۴۳/۹۹ کیلودالتون است و نقطه ایزوالکتریک آن برابر با ۷/۵۲ می‌باشد. در این پژوهش موقعیت هر آمینواسید در توالی پروتئین نهایی و جایگاه آن‌ها در ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از برنامه PORTER بررسی شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۳۹۲ آمینواسید تشکیل دهنده پروتئین استریکتوزیدین در گیاه خشخاش، ۹/۱۸

با توجه به نتایج حاصل از برنامه آنالیز Signal P، پروتئین استریکتوزیدین احتمالاً در ۱۹ آمینواسید ابتدایی دارای سیگنال پپتید می‌باشد. در حقیقت، احتمال وجود سیگنال پپتید در آمینواسید شماره ۱۹ بیش از ۹۸ درصد پیش‌بینی شد. در ضمن نتایج این پژوهش نشان داد که این پروتئین دارای تغییرات پس از ترجمه در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی می‌باشد. نتایج پژوهش‌های آزمایشگاهی بر روی پروتئین استریکتوزیدین در گیاهان مختلف وجود سیگنال پپتید در قسمت‌های ابتدایی توالی (آمینواسیدهای ۱-۳۰) و گلیکوزیلاسیون در نواحی ۱۰۰-۹۰ را تایید کرده‌اند (Kutchan *et al.*, 1988; Bracher & Kutchan *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1992).

توسط Modeller و نیز مدل بهینه شده (توسط برنامه SCRWL) به ترتیب برابر با ۵/۲۹- و ۶/۵۵- بود. از آن جا که امتیازهای مذکور در محدوده قابل قبول قرار داشتند، بنابراین مدل پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار Modeller و مدل بهینه شده آن دارای کیفیت مناسبی بودند و احتمالاً با آنچه که در طبیعت می‌تواند وجود داشته باشد نیز تطابق دارند (شکل ۵).

ارزیابی مدل بر اساس پلات رامچاندران

پس از انتخاب مدل پیش‌بینی شده توسط Modeller (V9.14) و بهبود زنجیره‌های جانبی آن، از برنامه RAMPAGE⁵ به منظور بررسی صحت ساختار سه-بعدی پروتئین استریکتوزیدین استفاده شد. بر اساس نمودار رامچاندران (شکل ۶)، تمام زوایای موجود، در نواحی مجاز واقع شده‌اند و مدل پیش‌بینی شده از لحاظ نوع و مکان قرارگیری زوایای موجود در آن قابل قبول است.

دینامیک مولکولی

به منظور مطالعه پایداری ساختار پیش‌بینی شده ژن استریکتوزیدین، از برنامه شبیه‌ساز دینامیک مولکولی GROMACS 5.0.2 با دو پارامتر RMSD و RMSF⁶ استفاده شد. شیب نمودار RMSD، بیان‌کننده پایداری مدل در طول زمان شبیه‌سازی (۲۰ نانوثانیه) است. در حقیقت، هر چه این شیب به صفر نزدیکتر باشد، مدل شبیه‌سازی شده پایدارتر خواهد بود. از طرفی، چنانچه شیب به تدریج افزایش یابد و یا دارای نوسان زیادی باشد، مدل ناپایدار است. در مورد مدل RSDM، هیچ ناپایداری در طول زمان شبیه‌سازی مشاهده نشد (شکل ۷). میزان انعطاف‌پذیری بخش‌های مختلف پروتئین در شکل ۸ قابل مشاهده است. باقیمانده‌های تشکیل‌دهنده جایگاه فعال آنزیم (در محور افقی نمودار با پیکان سبز رنگ مشخص شده- اند)، دارای بیشترین انعطاف‌پذیری یعنی بین ۱/۵ تا ۲/۵ نانومتر بود، درحالی‌که باقیمانده‌های نواحی

درصد در تشکیل پیچ‌ها ۴۰ درصد در تشکیل صفحات و رشته‌ها و حدود ۵۰/۷۶ درصد در تشکیل مارپیچ‌ها شرکت می‌کنند.

در این تحقیق، پیش‌بینی ساختمان سوم با استفاده از توالی آمینواسیدی و انتخاب بهترین الگو انجام شد. در حقیقت، الگو شبیه‌ترین ساختار احتمالی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی می‌باشد که از طریق مطالعات آزمایشگاهی به دست آمده است. در پژوهش حاضر، از ساختار پروتئین *Strictosidine synthase* در پایگاه PDB متعلق به گیاه *Rauwolfia serpentine* به عنوان الگو برای پیش‌بینی ساختار سوم با استفاده از برنامه Modeller استفاده شد. در این برنامه، جهت انتخاب بهترین مدل از فاکتوری با عنوان "Dope Score"⁴ استفاده می‌شود و مقادیر کمتر از این فاکتور بیانگر دقت بیشتر مدل پیش‌بینی شده است (Webb & Sali, 2014). بنابراین، در بین مدل‌های پیشنهادی توسط نرم‌افزار Modeller، مدل با کمترین Dope Score انتخاب شد و در مرحله بعدی، این مدل پیش‌بینی شده با استفاده از برنامه SCRWL بهینه شد. شناخت خطاها در مدل‌های تجربی و نظری ساختارهای پروتئینی پیش‌بینی شده، یک مشکل عمده در زیست‌شناسی ساختاری محسوب می‌شود. برنامه آنلاین ProSA-Web، میزان تطابق مدل پیش‌بینی شده را با مدل واقعی (نتیجه حاصل از تجزیه و تحلیل‌های آزمایشگاهی) مقایسه و برای هر مورد یک امتیاز (Z-Score) را محاسبه می‌کند (Sippl, 1993; Wiederstein & Sippl, 2007). در صورتی‌که این امتیاز خارج از محدوده مورد نظر برای پروتئین‌های شناخته شده باشد، ساختار پیش‌بینی شده احتمالاً صحیح نخواهد بود. امتیاز قابل قبول برای این برنامه بین ۲-۱۵ (قدر مطلق) است (Wiederstein & Sippl, 2007). نتایج Z-Score برای مدل پیش‌بینی شده

¹- helix : DSSP's H (alpha helix) + G (3-10 helix) + I (pi-helix) classes

²- Strand : DSSP's E (extended strand) + B (beta-bridge) classes

³- The rest : DSSP's T (turn) + S (bend) + . (the rest)

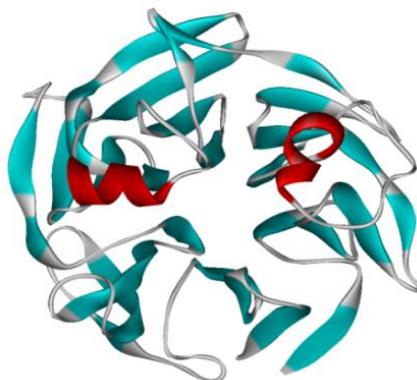
⁴- Discrete Optimized Protein Energy

⁵-

<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>

⁶- Root mean squared deviation (RMSD) and root mean squared fluctuation (RMSF)

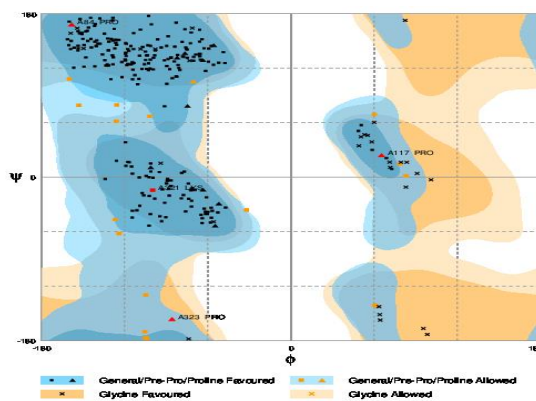
ساختارهای ثانویه شامل مارپیچ آلفا و صفحه‌های بتا و پیچ‌ها، دارای کمترین انعطاف‌پذیری بودند. در حقیقت، این نتایج بیانگر تطابق کامل با وظیفه ساختاری این نواحی از پروتئین است (شکل ۸)



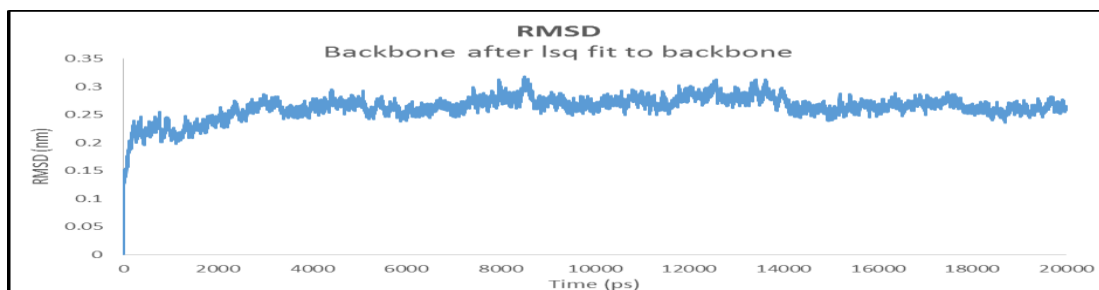
شکل ۵- ساختار سوم پیش- بینی شده و بهینه شده پروتئین

استریکتوزیدین در گیاه خشخاش با استفاده از برنامه Modeller و SCRWL

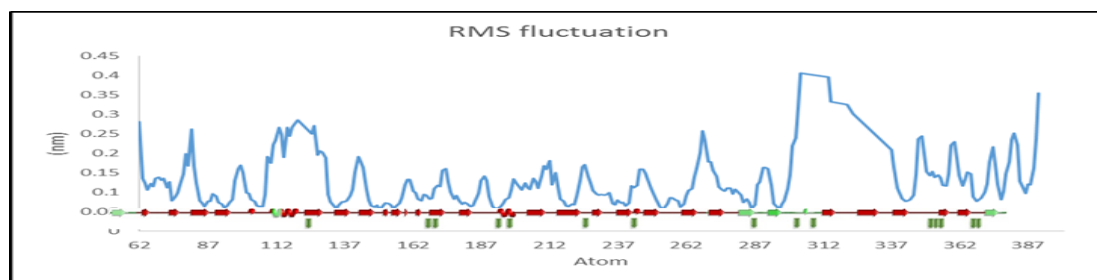
Figure 5. Predicted and optimized structure of Strictosidine synthase protein in *Papaver somniferum* using Modeller and SCRWL



شکل ۶- نمودار رامچاندرا حاصل از برنامه آنلاین RAMPAGE برای مدل بهبود داده شده پروتئین استریکتوزیدین
Figure 6. Ramachandran diagram derived from RAMPAGE online program for the improved model of STR protein



شکل ۷- نمودار RMSD پروتئین استریکتوزیدین در برنامه GROMACS
Figure 7. RMSD diagram of PsSTR protein in GROMACS program



شکل ۸- نمودار RMSF پروتئین استریکتوزیدین در برنامه GROMACS. نمادهای رنگی در پایین نمودار بیانگر مقادیر نوسان در مناطق مختلف ساختار هستند. پیکان‌ها، اشکال مارپیچ و خطوط نازک به ترتیب نشان‌دهنده α -Helix، β -Turns و حلقه‌ها هستند.

Figure 8. RMSF diagram of PsSTR protein in GROMACS program. The coloured symbols at the bottom of the graph indicate fluctuation values in different regions. The arrow, spiral-like and thin line shapes corresponded to α -Helix, β -Turns and loops respectively.

رسیده است. در گیاهانی نظیر درخت زندگی^۱ و *Ophiorrhiza pumila*، بیشترین میزان بیان به ترتیب در گل‌های بالغ، برگ‌ها، ساقه و ریشه گزارش شده است (Yamazaki *et al.*, 2003b). این مسئله در مورد گیاه پروانش و *Ophiorrhiza japonica* تا حدودی متفاوت است، چراکه پروفایل بیانی آن‌ها، بیانگر کمترین میزان بیان در ساقه بود (Sibénil *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2001). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در هر دو گونه، بافت غوزه دارای بیان نسبی کمتری نسبت به سایر بافت‌ها بود. در شقایق کبیر، ریشه بیشترین و غوزه کمترین میزان بیان را به خود اختصاص دادند. تفاوت بسیار معنی‌داری دو رقم فوق (که متعلق به یک گونه نیز می‌باشند) و نتایج متناقض سایر محققین، احتمالاً با پیچیدگی‌های سیستم بیانی این ژن در گیاهان مختلف مرتبط می‌باشد. این موضوع، احتمالاً با تکامل واگرایی آیین سیستم و ژن در طول تکامل مرتبط است (Lu *et al.*, 2009). بیان این ژن تحت تاثیر انواع تنش‌ها و محرک‌های مختلف قرار می‌گیرد. از آن‌جا که محرک‌های غیرزیستی از قبیل متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیان این ژن و در نتیجه تولید ایندول آلکالوئیدها را در *Ophiorrhiza japonica* افزایش می‌دهند (Lu *et al.*, 2009)، بنابراین افزایش در بیان ژن استریکتوزیدین به‌طور مستقیم باعث افزایش تولید

بیان ژن استریکتوزیدین در گیاه خشخاش و شقایق کبیر

با توجه به این‌که دو بافت ریشه و کپسول، به ترتیب در خشخاش و شقایق کبیر دارای کمترین میزان بیان نسبت به سایر بافت‌ها بودند، در نتیجه از آن‌ها به عنوان بافت پایه به منظور نرمال‌سازی استفاده شد. میزان بیان ژن استریکتوزیدین در گیاه خشخاش در بافت برگ، ساقه و غوزه به ترتیب ۱۲، ۴/۰۹ و ۱/۳ برابر ریشه بود. در گیاه شقایق کبیر، ریشه دارای بیشترین بیان (بیش از پنج برابر) بود، درحالی‌که ساقه (بیش از سه برابر) و برگ (بیش از ۲/۵ برابر) رتبه‌های بعدی را به خود اختصاص دادند (شکل ۹). به‌طور کلی، میزان بیان ژن استریکتوزیدین در گیاه خشخاش به صورت معنی‌داری بیشتر از شقایق کبیر بود. کمترین میزان بیان بین بافت‌های هر دو گیاه مربوط به کپسول *P. bracteatum* بود و ریشه خشخاش، برگ و ساقه شقایق کبیر، کپسول خشخاش، برگ شقایق کبیر و ساقه و برگ خشخاش رتبه‌های بعدی را به خود اختصاص دادند. بین بافت با بیشترین (برگ خشخاش) و کمترین میزان بیان (کپسول شقایق کبیر)، ۳۰ برابر اختلاف مشاهده شد (جدول ۲).

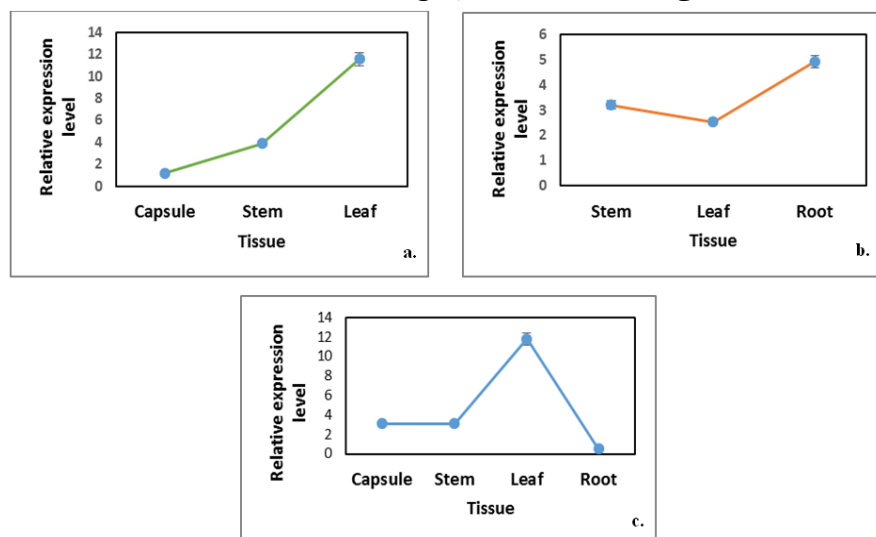
تاکنون حضور و بیان ژن استریکتوزیدین در گیاهان مختلفی از قبیل آرابیدوپسیس (Sohani *et al.*, 2009) و *Ophiorrhiza japonica* (Lu *et al.*, 2009) به اثبات

^۱- *Camptotheca acuminata*

^۲- Divergent

محرك‌های غیرزیستی نقش دارند. همچنین عوامل رونویسی متعددی از قبیل MYC و bHLH که وجود آن‌ها در گیاهانی از قبیل گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است، نیز در پاسخ به این محرك‌ها دخیل هستند (Yang et al., 2015).

ایندول آلکالوئیدها می‌شود. به‌طورکلی، وجود موتیف‌های حفاظت شده در توالی‌های بالادستی (از جمله بخش‌های G-box) و راه‌انداز به‌منظور پاسخ به محرك‌ها ضروری است. حضور توالی‌های G-box در نقاط مختلف توالی‌های راه‌انداز در پاسخ به



شکل ۹- مقایسه سطح بیان ژن استریکتوزیدین در بافت‌های مختلف گیاه (A) خشخاش، (B) شقایق کبیر و (C) تفاوت نسبی بین دو گیاه.

Figure 9. Comparison of STR gene expression level in different plant tissues A) *Papaver somniferum*, B) *bracteatum Papaver* and C) relative difference between two plants

جدول ۲- مقایسه سطوح نسبی بیان ژن استریکتوزیدین در بافت‌های متناظر بین دو گونه *P. somniferum* و *P. bracteatum*

Table 2. Comparison of relative levels of STR gene expression in the corresponding tissues between *P. somniferum* and *P. bracteatum*

Tissue	<i>P. somniferum</i> / <i>P. bracteatum</i>	SD
Capsule	3.25	0.74
Leaf	12.12	2.28
Shoot	3.25	0.55
Root	0.55	0.11

محسوب می‌شود (Dutta et al., 2007). اعضای خانواده Papaveraceae گیاهانی روزبلند هستند و به شدت نوری در حدود ۱۶ کیلو لوکس نیاز دارند. در صورت عدم وجود نور کافی، خشخاش کوتاه‌تر و گل-دهی در آن تسریع می‌شود. وجود نور کامل پس از ظهور اولین غنچه‌ها، باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه به بیشترین میزان خود می‌شود، البته این مسئله در مورد بافت‌ها و اندام‌هایی که در معرض تابش مستقیم نور خورشید هستند، موثرتر است (Bernáth et al., 1988). بنابراین تولید بیشتر mRNA کدکننده استریکتوزیدین در گیاه خشخاش، با توجه به وجود توالی‌های CBF2 و عوامل رونویسی

تجزیه و تحلیل عملکردی راه‌انداز ژن استریکتوزیدین نشان داده است که توالی‌های تنظیمی سیس^۱ نیز در واکنش به محرك‌ها دخیل هستند. این توالی‌ها در تعامل با دمین‌های AP2/ERF عوامل رونویسی ORCA2 و ORCA3 عمل می‌کنند (Sibérial et al., 2001). در حقیقت، عوامل رونویسی AP2/ERF با اتصال به نقاط CBF2 در پاسخ به محرك‌های مربوطه تأثیرگذار هستند. وجود توالی‌های CBF2 در راه‌انداز ژن‌های TDC و STR به اثبات رسیده است. شدت نور UV خورشید نیز از جمله محرك‌های تأثیرگذار

¹- Cis-regulatory element

کاملاً معنی‌دار بود)، بیانگر میزان تولید بیشتر Strictosidine و احتمالاً تولید بیشتر ایندول آلکالوئیدها در خشخاش بود. در صورتی که هدف از کشت و کار خشخاش، تولید مقادیر بیشتری آلکالوئیدها باشد، بیان بیشتر ژن این پروتئین علاوه بر اتلاف انرژی بیشتر (که می‌تواند صرف تولید لاتکس در گیاه شود) می‌تواند به سمت تولید ایندول آلکالوئیدها هدایت شود. در ضمن، یکی از پیش‌ماده‌های مشترک در تولید لاتکس و ایندول آلکالوئیدها، تریپتامین (Tryptamin) است که در این مورد نیز با تولید لاتکس در این گیاه در رقابت است. اطلاع از پروفایل بیان ژن استریکتوزیدین، امکان محاسبه این اتلاف را فراهم می‌آورد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش در بخش هم‌ردیفی نشان داد که تغییرات زیادی در طی تکامل در آنزیم استریکتوزیدین رخ داده است. نقاط نزدیک به انتهای پروتئین، به علت وجود دمین عملکردی، بسیار حفاظت شده است و همین امر باعث ایجاد عملکرد مشابه در گیاهان مختلف می‌شود. از طرفی، وجود قسمت‌های با حفاظت‌شدگی کمتر و نیز طول‌های متفاوت (که در گیاهان مختلف مشاهده می‌شود)، باعث بروز تغییرات و تفاوت‌هایی در شکل و جهت‌گیری فضایی این ژن شده‌اند و طبیعتاً این تفاوت‌ها و تاثیرات می‌تواند بر میزان فعالیت و کارایی آن در گیاهان تأثیرگذار باشند. با در دست داشتن توالی دقیق ژن استریکتوزیدین، امکان دست‌ورزی آن با استفاده از مهندسی ژنتیک فراهم می‌شود. همچنین داشتن آگاهی از توالی این ژن برای هر گیاه جهت تخمین میزان کارایی این آنزیم لازم است. علاوه بر این مسئله، در بررسی‌های تکاملی، میزان قرابت بین همولوگ‌های آن، تنها با داشتن تمام آمینواسیدهای موجود در توالی پروتئینی آن امکان‌پذیر خواهد بود.

در بافت‌های هوایی برگ و ساقه، بیانگر همین موضوع می‌باشد. جست‌وجوی توالی توافقی تنظیمی سیس در راه‌انداز STR، حضور G-box را در نزدیکی عامل رونویسی ORCA2 به اثبات رسانده است (Sibérial *et al.*, 2001). همچنین وجود G-box مشابه راه‌انداز استریکتوزیدین در راه‌انداز ژن TDC که کدکننده آنزیم Tryptophan decarboxylase می‌باشد نیز به اثبات رسیده است (Ouwerkerk *et al.*, 1999) که این مسئله احتمالاً بیانگر تنظیم هم‌زمان این دو ژن می‌باشد. شواهدی مبنی بر تنظیم هم‌بیانی ژن‌های TDC و استریکتوزیدین در گیاه *Ophiorrhiza pumila* تایید شده است (Yamazaki *et al.*, 2003a). الگوی بیان حاصل از این پژوهش در هر دو گیاه مورد بررسی ممکن است تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیکی و محیطی و بافت‌های مختلف قرار گیرد؛ به عنوان مثال، در این تحقیق با وجود نور بیشتر در قسمت هوایی شقایق کبیر (ساقه و برگ)، ریشه بیشترین بیان را به خود اختصاص داد. احتمالاً این موضوع بیانگر وجود ساختار متفاوت راه‌انداز و یا پیام‌های سلولی ناشناخته مختلف در بافت‌های متفاوت است. با توجه به این مسئله، احتمالاً وجود تفاوت بیان و همچنین الگوی بیانی متفاوت بین دو گونه خشخاش و شقایق کبیر در این پژوهش، ممکن است با رخدادهای به وقوع پیوسته در طی تکامل و انشقاق این دو از یکدیگر مرتبط باشد؛ تا آن‌جا که منجر به بروز چنین الگوی بیان متضادی در ریشه (بیشترین بیان در ریشه شقایق کبیر و کمترین بیان در ریشه خشخاش) شده است. تعداد آمینواسید آنزیم استریکتوزیدین در اغلب گیاهان بسیار مشابه است و محدوده‌ای بین ۳۴۴ (*Cucumis melo*) تا ۴۰۲ (*Rauvolfia serpentina*) را پوشش می‌دهد (از این بین عدد ۳۹۱ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است) (Young *et al.*, 2013; Motamayor *et al.*, 2011). تفاوت معنی‌دار در میزان بیان نسبی این ژن و نیز مقایسه آن با شقایق کبیر (تفاوت در میزان بیان و نیز نوع بافت

REFERENCES

- Bernáth, J., Dános, B., Veres, T., Szantó, J. & Tétényi, P. (1988). Variation in alkaloid production in poppy ecotypes: responses to different environments. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16, 171–178.
- Bracher, D. & Kutchan, T. M. (1992). Strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*: analysis of a gene involved in indole alkaloid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294, 717–723.
- Cutri, L. (2013). *Oaroma das flores de Passiflora spp na atração de polinizadores: uma abordagem bioquímica e molecular*. Ph.D. Thesis. Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- Deus-Neumann, B. & Zenk, M. H. (1984). A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta*, 162, 250–260.
- Dutta, A., Sen, J. & Deswal, R. (2007). Downregulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of a AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). *Plant Cell Reports*, 26, 1869–1878.
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L. & Tari, L. W. (2000). Plant aromatic *L-amino acid decarboxylases*: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 54, 121–138.
- Gholami, M., Fakhari, A. & Ghanati, F. (2013). Selective Regulation of Nicotine and Polyamines Biosynthesis in Tobacco Cells by Enantiomers of Ornithine. *Chirality*, 25, 22–27.
- Hashimoto, T. & Yamada, Y. (2003). New genes in alkaloid metabolism and transport. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 163–168.
- Hirano, M. (2004). RACE Using only a gene-specific primer. *Molecular Biotechnology*, 27, 179–186.
- Kutchan, T. M. (1993) Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry*, 32, 493–506.
- Kutchan, T. M., Hampp, N., Lottspeich, F. & Zenk, M. H. (1988). The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia* and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 237, 40–44.
- Leonard, E., Runguphan, W., O'Connor, S. & Prather, K. J. (2009). Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 5, 292–300.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lu, Y., Wang, H., Wang, W., Qian, Z., Li, L., Wang, J., Zhou, G. & Kai, G. (2009). Molecular characterization and expression analysis of a new cDNA encoding strictosidine synthase from *Ophiorrhiza japonica*. *Molecular Biology Reports*, 36, 1845–1852.
- Ma, X., Panjikar, S., Koepke, J., Loris, E. & Stöckigt, J. (2006). The structure of *Rauvolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed beta-propeller fold in plant proteins. *The Plant Cell*, 18, 907–920.
- Motamayor, J. C., Mockaitis, K., Schmutz, J., Haiminen, N., Donald, L., Cornejo, O., Findley, S. D., Zheng, P., Utro, F. & Royaert, S. (2013). The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology*, 14, 53–65.
- Ouwerkerk, P. B. F., Trimborn, T. O., Hilliou, F. & Memelink, J. (1999). Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the Tdc gene from *Madagascar periwinkle*: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Molecular and General Genetics*, 261, 610–622.
- Pasquali, G., Goddijn, O. J. M., de Waal, A., Verpoorte, R., Schilperoort, R. A., Hoge, J. H. C. & Memelink, J. (1992). Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology*, 18, 1121–1131
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509–515.
- Salim, V. & De Luca, V. (2013). Towards complete elucidation of monoterpene indole alkaloid biosynthesis pathway: *Catharanthus roseus* as a pioneer system. *Advances in Botanical Research*, 68, 1–37.
- Samanani, N., Liscombe, D. K. & Facchini, P. J. (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 40, 302–313.
- Sibénil, Y., Benhamron, S., Memelink, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Thiersault, M., Boisson, B., Doireau, P. & Gantet, P. (2001). *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. *Plant Molecular Biology*, 45, 477–488.

23. Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 17, 355–362.
24. Webb, B. & Sali, A. (2014). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54, 5–6.
25. Wiederstein, M. & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, 407–410.
26. Yamazaki, Y., Urano, A., Sudo, H., Kitajima, M., Takayama, H., Yamazaki, M., Aimi, N. & Saito, K. (2003a). Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. *Phytochemistry*, 62, 461–470
27. Yamazaki, Y., Sudo, H., Yamazaki, M., Aimi, N. & Saito, K. (2003b). Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds. *Plant and Cell Physiology*, 44, 395–403.
28. Yang, K., Rashidi-Monafared, S., Wang, H., Lundgren, A., & Brodelius, P. E. (2015). The activity of the artemisinic aldehyde $\Delta 11$ (13) reductase promoter is important for artemisinin yield in different chemotypes of *Artemisia annua* L. *Plant Molecular Biology*, 1–16.
29. Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J. & Schoofm, H. (2011). The medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480, 520–524.