همسانه‌سازی و بررسی ژن‌های شبه‌سایکلوتاید در ذرت

Cloning and Characterization of Cyclotide-Like Genes in *Zea mays*

سمیرا ترکمن[۱]، بهمن بهرام‌نژاد[۲]* و نازنین کودری[۱]

تاریخ دریافت:۹۱/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲

چکیده

سایکلوتایدها دسته‌ای بزرگ از پپتیدهای حلقوی هستند که فعالیت‌های زیستی متنوعی دارند. از جمله می‌توان به فعالیت ضد میکروبی، ضدتوموری، ضدویروسی، تخریب گلبولهای قرمز، سلول‌کشی و حشره‌کشی اشاره کرد. شبه‌سایکلوتایدها در گیاهان به صورت خانواده ژنی بیان شده و دارای نواحی حفاظت شده می‌باشند. در این پژوهش بر اساس توالی نواحی حفاظت‌شده پروتئین آغازگر طراحی شد و با استفاده از تکنیک 3'RACE-PCR ژن‌های کدکننده پروتئین‌های شبه سایکلوتاید در ذرت همسانه سازی و تعیین توالی شدند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های ژنی PGI نشان داد که تعداد نه ژن شبه‌سایکلوتاید جدید در ذرت به‌دست آمده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای این ژن‌ها آنها را به دو دسته تقسیم کرد. دسته اول شباهت زیادی با سایر شبه‌سایکلوتایدهای موجود در پایگاه داده‌های ژنی داشته و دارای نواحی حفاظت شده سایکلوتایدی بودند. دسته دوم دارای ساختار منظم سایکلوتایدی نبودند و تعداد نوکلئوتیدهای این دو دسته از ۴۸۵-۴۱۳ متغیر بود. این اولـــین گزارش در زمینه همســانه‌سازی ژن‌های شبه‌سایکلوتاید در گرامینه‌ها بود و نشان داد که ذرت تنوع بالایی از این ژن‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: شبه‌سایکلوتاید، ذرت، پپتیدهای حلقوی ضدمیکروبی، 3'RACE-PCR

۱. دانشجویان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

*: نویسنده مسوول **Email**: b.bahramnejad@uok.ac.ir

مقدمه

سایکلوتایدها پروتئین‌هایی غیرعادی هستند که اولین‌بار در سال ۱۹۷۰ در مطالعه خواص دارویی گیاهی آفریقایی بنام کالاتا کالاتا شناسایی شدند (Gran *et al*. 1973). ساختار پروتئینی در سایکلوتایدها خاص و منحصر به‌فرد است و باعث پایداری پروتئین در برابر تجزیه شیمیایی، دمایی و آنزیمی می‌گردد (Colgrave *et al*. 2004). انتهای کربوکسیلی و آمینی این پروتئین‌ها توسط پیوند پپتیدی به‌هم متصل شده اند و در نتیجه ایجاد ساختاری حلقوی می‌کنند. این پروتئین های حلقوی به‌طور تقریب دارای ۳۰ اسیدآمینه هستند که در بین آنها شش اسیدآمینه سیستئین وجود دارد که دو به دو توسط پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند و در نتیجه پروتئین سایکلوتاید دارای سه پیوند دی‌سولفید است که ساختاری به نام گره‌های سیستئینی حلقوی به‌وجود می‌آورند (Craik *et al*. 1999). ساختار حلقوی نقش مهمی در فعالیت و پایداری پروتئین ایفا می‌کند و وجود گره‌های سیستئینی حلقوی برای پایداری در برابر دمای بالا مهم است (Colgrave and Craik, 2004). پیوندهای دی‌سولفیدی در قسمت داخلی پروتئین قرار می‌گیرند و در نتیجه باعث آبگریزی سطح خارجی پروتئین می‌شوند (Burman *et al*. 2008).

سایکلوتایدها به دو زیر خانواده مهم موبیوس و بریسلت تقسیم می‌شوند. این تقسیم‌بندی براساس کونفورماسیون اسیدآمینه پرولین در حلقه پنجم است. حضور پیوند پپتیدی به‌حالت سیس باعث چرخش در ساختمان پروتئین می‌شود. زیر خانواده موبیوس دارای پیوند پپتیدی به‌حالت سیس و زیر خانواده بریسلت فاقداین ساختار می‌باشد *کرایک* و همکاران، (۱۹۹۹) و (Jennings *et al*. 2005). تقریباً دو سوم سایکلوتایدهایی که تا کنون شناسایی شده اند متعلق به زیر خانواده بریسلت هستند (Zhang *et al*. 2009). بریسلت‌ها شامل تعداد زیادی اسیدهای‌آمینه کاتیونی در حلقه پنج و شش و همچنین دارای یک مارپیچ α در حلقه سه هستند. حلقه یک و چهار در هر دو زیر خانواده حفظ شده است.

ژن‌های کدکننده سایکلوتایدها شامل قسمت‌هایی به نام ناحیه کدکننده سیگنال پپتید، ناحیه ابتدایی، انتهای آمینی، ناحیه سایکلوتاید و دم می‌باشد. این ژن‌ها ابتدا به صورت پیش‌پروتئین سایکلوتاید بیان شده و پروتئین اولیه حاصل در نتیجه برش آنزیمی، تشکیل باندهای دی‌سولفید و سپس اتصال ابتدا و انتهای آن به هم به‌صورت حلقوی و بالغ در می-آید (Gruber *et al*. 2007). انتهای آمینی دارای ساختار مارپیچ آلفا است و در تبدیل پیش پروتئین سایکلوتاید به سایکلوتاید بالغ نقش دارد.

سایکلوتایدها متعلق به پروتئین‌های دفاعی گیاهان می‌باشند. علاوه بر تنش‌های زیستی، بیان این ژن‌ها در تنش‌های غیرزیستی نیز گزارش شده است. برای مثال بیان ژن‌های سایکلوتاید درگیاه *O. affinis* هنگام حمله عامل بیماری‌زا افزایش یافت. در گیاه *Viola baoshanensis* تنش کادمیوم بیان سایکلوتایدها را افزایش داد *ژانگ و همکاران* (۲۰۰۹). علاوه بر این نقش‌های زیستی زیادی برای سایکلوتایدها گزارش شده است که از جمله می‌توان به فعالیت‌های ضد ایدز (Chen *et al*. 2005)، جلوگیری از اتصال ناقل عصبی نوروتنسین به غشا سلولی (Witherup *et al*. 1994)، تسهیل زایمان (Gran *et al*. 1973)، تخریب گلبولهای قرمز (Schöpk *et al*. 1993)، فعالیت علیه سلول‌های سرطانی (Lindholm *et al*. 2002) و فعالیت‌های حشره‌کشی (Jennings *et al*. 2005) اشاره نمود.

سایکلوتایدها تاکنون در سه خانواده‌ی بنفشیان، روناس و کدوئیان گزارش شده است (Herrmann *et al*. 2008). مطالعات بعدی وجود توالی‌های شبه‌سایکلوتایدی را در گرامینه‌هایی مانند گندم, ذرت و برنج نشان داده است (Mulvena *et al*. 2006). مهم‌ترین شباهت شبه‌سایکلوتایدها با سایکلوتایدها درحلقه شماره یک ساختار سه‌بعدی می‌باشد که واجد اسیدآمینه گلوتامیک است که در همه سایکلوتایدها کاملاً حفظ شده است و در توالی‌های شبه‌سایکلوتایدی نیز وجود دارد. این اسیدآمینه در پایداری ساختار سایکلوتایدها بسیار مهم است (Mulvena *et al*. 2006). هریک از ژن‌های شناسایی شده در گرامینه‌ها حاوی توالی سیگنال استاندارد شبکه آندوپلاسمی و پیش‌پروتئین می‌باشد. این پیش‌پروتئین شامل ۳۶- ۲۶ اسیدآمینه است که شامل شش اسیدآمینه سیستئین بسیار شبیه سایکلوتایدهای شناخته می‌باشند. در ذرت ده، گندم پنج و ارزن یک توالی شبه سایکلوتاید احتمالی بر اساس داده‌پردازی‌های زیستی در پایگاه داده PGI گزارش شده (Mulvena *et al*. 2006).

تاکنون هیچ گزارشی در مورد همسانه‌سازی و مطالعه ژن‌های شبه سایکلوتایدی در غلات منتشر نشده است و موارد فوق براساس داده‌پردازی‌های زیستی در پایگاه داده EST این گیاهان بوده است. هدف از این تحقیق همسانه‌سازی ژن‌های کدکننده شبه‌سایکلوتاید در ذرت و تعیین توالی این همسانه‌ها و مقایسه توالی‌ها با سایر شبه‌سایکلوتایدهای موجود در پایگاه داده‌های EST می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور گیاه ذرت (رقم سینگل کراس K۷۰۴) در شرایط اتاقک رشد در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان با دمای۲۰±۲°C درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۴hروشنایی و ۱۰h تاریکی کشت شدند و پس از جوانه‌زنی از کلئوپتیل‌ها نمونه برداری صورت گرفت و بلافاصله داخل ازت مایع قرار داده شد.

استخراج RNA

از کلئوپتیل‌های برداشت شده با استفاده از کیت AccuZol™ (شرکت BIONEER) استخراج RNA صورت گرفت و با کمک ژل آگارز ۱٪ صحت حضور آنها مورد بررسی قرار گرفت و کیفیت RNA با دستگاه نانودراپ (WPA Biowave II، انگلستان) تعیین شد.

سنتز cDNA

به‌منظور سنتز cDNA از کیت RevertAid™ first strand cDNA synthesis (شرکت Fermentase) با کمک آغازگر Oligo dT-anchor توسط آنزیم رونویسی معکوس (MMLV) از RNA های استخراج شده، اولین رشته cDNA سنتز شد.

طراحی آغازگر

با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی پروتئین‌های شبه‌سایکلوتاید گنـــدم و ذرت موجـــود در ســـایت PGI (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html) و هم-ردیفی آنها در سایت ClustalW (http://www.ebi.ac.uk) با مشخص‌کردن ناحیه حفاظت شده آغازگر اختصاصی طراحی شد(جدول۱).

3'RACE-PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 3'RACE براساس دستورالعمل بهرام‌نژاد و همکاران(Bahramnejad *et al*. 2010) انجام گرفت. در واکنش ۲۵µl شامل ۲µl از cDNA سنتز شده، ۱۲µl Mastermix (Fermentase)، ۸µl آب فاقد نوکلئاز، ۱/۵µl آغازگر اختصاصی با غلظت 100µM، ۱/۵ µl آغازگر معکوس با غلظت 100µM انجام شد. شرایط زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت ۹۴°C به‌مدت ۳ min برای شروع و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به‌مدت ۴۰s، ۵۳°C به‌مدت ۴۰s، ۷۲°C به‌مدت ۴۰s و در نهایت ۷۲°C به‌مدت ۲۰min بود.

آنالیز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس باند مورد نظر از ژل جدا شد. خالص‌سازی باند مورد نظر از ژل آگارز توسط کیت Nucleic Acid Extraction (شرکت Vivantis) صورت گرفت. برای تأیید وجود قطعه مورد نظر از ژل آگارز ۱ ٪ استفاده شد و همچنین غلظت آن توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد. DNA جدا شده از ژل، با استفاده از کیت InsTAclone™ PCR cloning kit (Fermentase ,۱۲۱۴K) درون ناقل همسانه‌سازی شد. ناقل موجود در این کیت مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است.

جدول۱: توالی آغازگرها

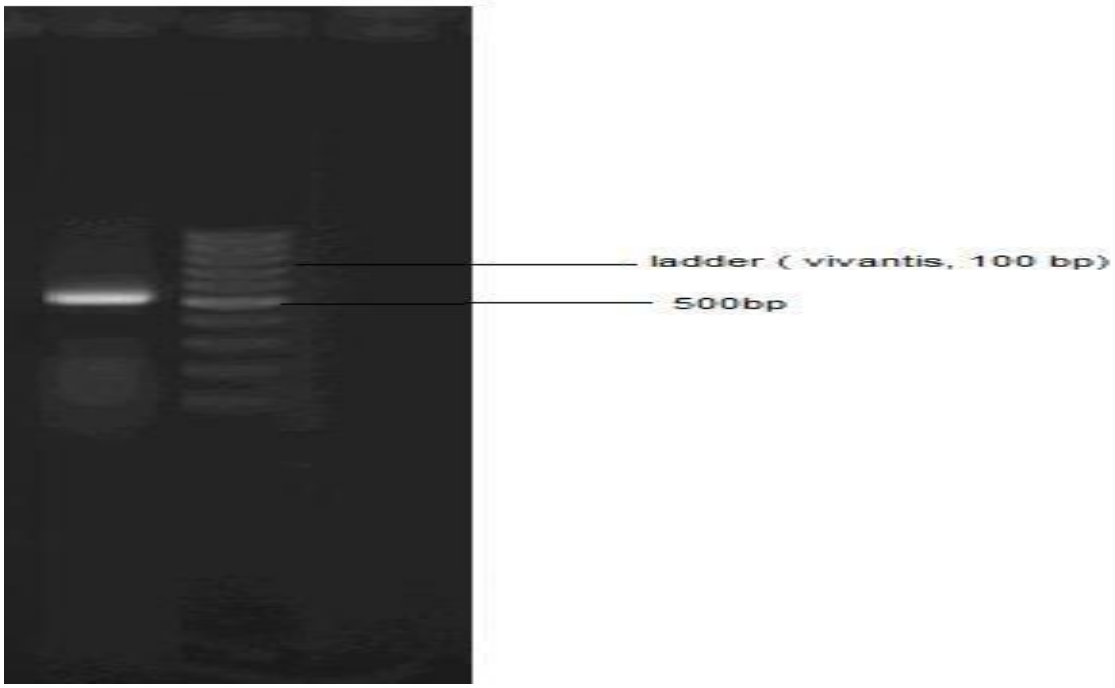
Table 1: Primers' sequences

نام آغازگر name sequences	توالی آغازگر primer sequences
ZF(Forward)	AGAGAGAGAGGAAAGCTAGC
ZR(reverse)	CAATAAGTTGAACACCACCG
Oligo dT anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTV
PCR anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

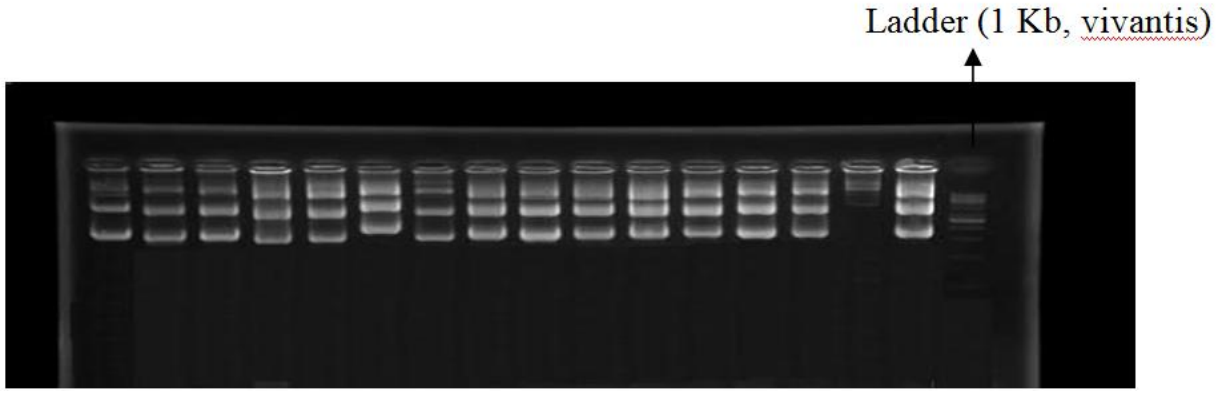
جدول ۲: مشخصات شبه‌سایکلوتای‌های موجود در شکل۶

Table 2: Characteristic of cyclotide-like gene in Fig 6

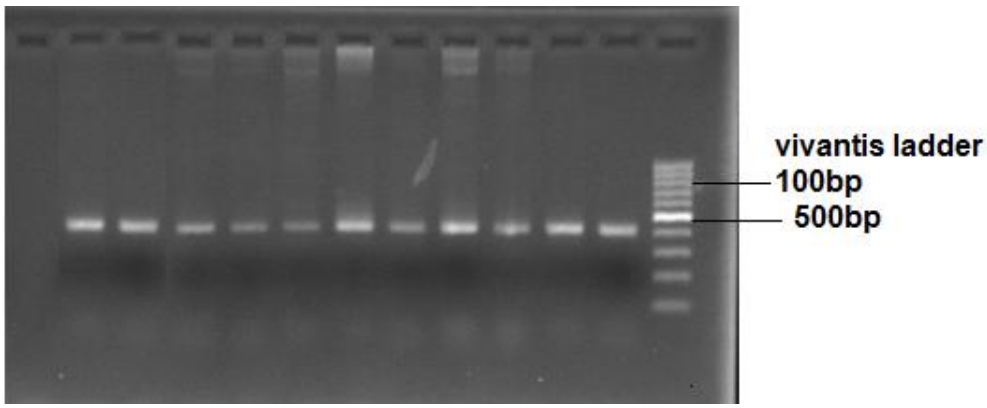
Identity with یکسانی با	Identity یکسانی	E value	Length Bp اندازه(جفت باز)	Name نام	Plant گیاه	Source منبع	EST associated number
NM001151219	88%	1e-155	485	Zm cyc1	*Zea mays*	Current study	_
BT009169	88%	8e-148	467	Zm cyc2	*Z. mays*	Current study	_
BT009169	87%	1e-142	464	Zm cyc3	*Z. mays*	Current study	_
BT009169	95%	4e-142	463	Zm cyc4	*Z. mays*	Current study	_
BT009169	95%	2e-143	513	Zm cyc5	*Z. mays*	Current study	_
BT009169	75%	5e-30	425	Zm cyc6	*Z. mays*	Current study	_
CF015733	74%	106e-37	470	Zm cyc7	*Z. mays*	Current study	_
EU975452	83%	2e-44	413	Zm cyc8	*Z. mays*	Current study	_
BT009169	92%	5e-25	412	Zm cyc9	*Z. mays*	Current study	_
			383	S1	*Sorghum bicolor*	P G I	BE125990
			562	H1	*Hordeum vulgare*	P G I	AL450615
			474	Z1	*Z.mays*	P G I	CF060985
			502	Z2	*Z. mays*	P G I	CF014141
			505	Z3	*Z. mays*	P G I	CK369406
			526	Z4	*Z. mays*	P G I	BM379838
			518	Z5	*Z. mays*	P G I	CF630454
			538	Z6	*Z. mays*	P G I	CF013901
			392	Z7	*Z. mays*	P G I	CN070702
			496	Z8	*Z. mays*	P G I	BI674581
			571	Z9	*Z. mays*	P G I	BM080572
			601	Z10	*Z. mays*	P G I	CK368015
			429	W1	*Triticum aestivum*	P G I	CA617438
			907	W2	*T. aestivum*	P G I	CK154330
			889	W3	*T. aestivum*	P G I	CK154890
			596	W4	*T. aestivum*	P G I	CA595705
			466	W5	*T. aestivum*	P G I	BE591233



شکل۱: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که پس از انجام تکنیک 3'RACE-PCR روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد
Fig1: 3' RACE-PCR amplified product on 1% agrose gel



شکل۲: تصویر ژل الکتروفورز، استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید
Fig 2: Plasmid extraction from white colony



شکل ۳: تصویر ژل آگارز، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط آغازگرهای Zf و Zr از پلاسمیدهای استخراج شده
Fig 3: PCR amplification with Zf and Zr primer of extracted plasmid

تهیه سلول مستعد (Competent cell) **و تراریختی**

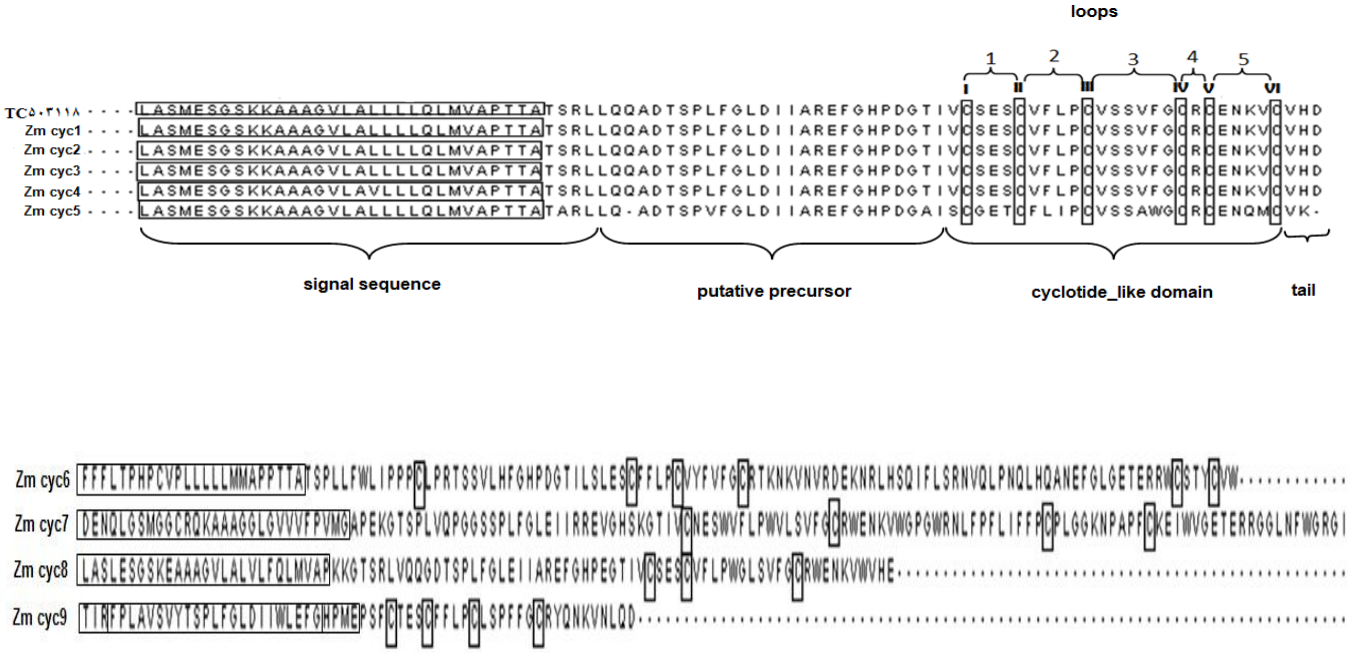
به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد از باکتری *E.coli* سویه DH5α روش کلسیم کلراید به کار گرفته شد (Sambrook & Russell, 2001). تراریختی به روش فیزیکی ذوب و انجماد انجام گردید، در این روش به میزان ۱۰۰µl از سلول مستعد را با ۱µl از پلاسمید حاوی ژن موردنظر مخلوط گردید و به‌مدت ۹۰s در دمای ۴۲°C و سپس بلافاصله به‌مدت ۳min روی یخ گذاشته شد. سپس ۵۰۰ µl، LB مایع به آن اضافه گردید و در انکوباتور (۳۷°C، دور۱۸۰rpm، به‌مدت ۱-۲h) قرار داده شد. پس از مدت زمان موردنظر باکتری‌ها روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ mg/ ml^{-1})، X-gal و IPTG کشت گردیدند و پس از گذشت ۱۲h کلونی‌های آبی و سفید مشاهده شدند. برای تأیید تراریختی مقداری از یک کلونی در ۵۰µl آب مقطر حل شد و در دمای ۹۵°C به‌مدت ۵min حرارت داده شد. سپس دو میکرولیتر از مایع رویی به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و محصول PCR پس از انجام واکنش و برای مشاهده اندازه قطعه DNA موردنظر و تایید حضور ژن در کلونی مربوطه در ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. کلونی‌هایی که حضور ژن مورد نظر در آن‌ها تایید شد، بر روی LB جامد حاوی آمپی‌سیلین (غلظت ۱۰۰ mg/ml^{-1}) واکشت شدند و پس از یک شبانه روز رشد برای استخراج پلاسمید به‌کار رفتند. استخراج پلاسمید به‌روش لیز قلیایی صورت گرفت. یک کلونی از باکتری‌های واکشت شده را به ۱/۵ml LB مایع منتقل و داخل انکوباتور به‌مدت یک شبانه روز قرار داده سپس باکتری رشد کرده را سانتریفیوژ (۴°C،۱min و ۱۲۰۰۰ rpm) نموده و رسوب به‌دست آمده را در ۱۰۰µl محلول سرد شامل ۵۰mM گلوکز، ۲۵mM Tris-Hcl(pH=۸)، ۱۰mM EDTA (pH=۸) حل گردید و به‌مدت ۵min در دمای اتاق قرار داده شد و بعد ۲۰۰µl از محلول حاوی ۰/۲M NaOH و ۱٪ SDS به آن اضافه گردید و به آرامی مخلوط و ۵min روی یخ گذاشته شد. سپس ۱۵۰µl استات پتاسیم ۳M (۴/۸ = pH) اضافه کرده و ۱۵min روی یخ قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان لازم به‌مدت ۵min در دمای ۴°C و rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از مخلوط کردن به‌مدت ۳۰min در فریزر۲۰- قرار داده شد و بعد سانتریفیوژ (به مدت ۲۰min، دمای ۴°C و ۱۲۰۰۰rpm) شد و رسوب به‌دست آمده با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و بعد از خشک شدن رسوب ۵۰µl آب استریل به آن اضافه شد و رسوب حاصل در آن حل گردید. برای تایید حضور پلاسمید از ژل آگارز ۱٪ استفاده و کیفیت پلاسمیدها با نانودراپ سنجیده شد (برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم‌بروماید mg/lit^{-1} ۱ استفاده شد). ۰/۵µl از پلاسمید استخراج شده با آب استریل رقیق گردید و ۰/۵µl از آن به‌عنوان الگو در واکنش PCR (master mix ۸µl، ۱۰µl آب، ۱/۵µl آغازگر مستقیم و ۱/۵µl آغازگر معکوس اختصاصی (با غلظت 100µM) استفاده و محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ بارگذاری و با مشاهده باند موردنظر صحت پلاسمیدهای نوترکیب تأیید شد.

تعیین توالی و آنالیز بیوانفورماتیکی

تعداد ۱۲پلاسمید نوترکیب تأییدشده، برای تعیین توالی به شرکت Bioneer (کشور کره‌جنوبی) فرستاده شد. توالی‌های به‌دست آمده ابتدا در پایگاه اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)، بلاست گردیدند و پس از تأیید این که توالی‌های به‌دست آمده شبه‌سایکلوتاید هستند، اقدام به ترجمه توالی‌ها (http://web.expasy.org/translate/) شد و توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای آنها توسط پایگاه اطلاعاتی (http://www.ebi.ac.uk) هم‌ردیف و توسط نرم‌افزار Mega4 درخت تکاملی آنها رسم شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای شبه‌سایکلوتایدی موجود در ذرت بررسی شد و توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه Zm cyc۱-۹ با خانواده پروتئین‌های شبه‌سایکلوتاید حلقوی موجود درپایگاه داده‌ای EST غلات مقایسه شدند. بر اساس توالی‌های به‌دست آمده و مقایسه آنها با سایر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی PGI مشخص شد که در ذرت توالی‌های جدید و متنوع شبه‌سایکلوتایدی وجود دارد.



شکل ۴: هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی مطالعه حاضر با توالی پروتئینی شبه سایکلوتاید ذرت موجود در PGI، قسمت‌های مختلف توالی‌ها مشخص شده است

Fig4: alignment of protein sequences in current study with maize cyclotide-like EST in ESTdatabase

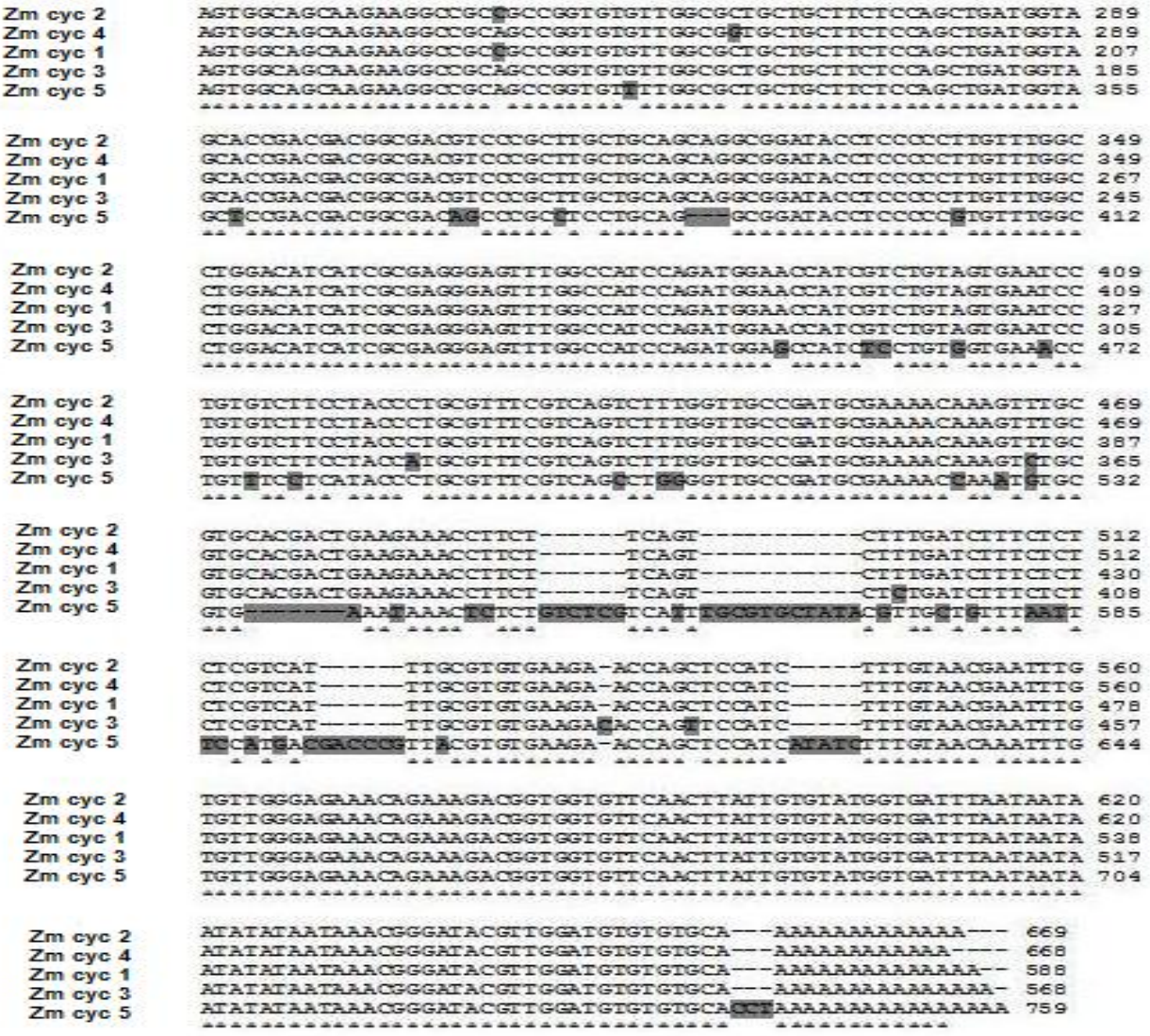
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Zm cyc ۴        LASMESGSKKAAAGVLAVLLLQLMVAPTTATSRLLQQADTSPLFGLDIIAREFGHPDGTI 60
TC۵۰۳۱۱۸        LASMESGSKKAAAGVLALLLLQLMVAPTTATSRLLQQADTSPLFGLDIIAREFGHPDGTI 60
Zm cyc ۱        LASMESGSKKAAAGVLALLLLQLMVAPTTATSRLLQQADTSPLFGLDIIAREFGHPDGTI 60
Zm cyc ۲        LASMESGSKKAAAGVLALLLLQLMVAPTTATSRLLQQADTSPLFGLDIIAREFGHPDGTI 60
Zm cyc ۳        LASMESGSKKAAAGVLALLLLQLMVAPTTATSRLLQQADTSPLFGLDIIAREFGHPDGTI 60
Zm cyc ۵        LASMESGSKKAAAGVLALLLLQLMVAPTTATARLLQ-ADTSPVFGLDIIAREFGHPDGAI 59
                ******************:*************:**** *****:***************:*

Zm cyc ۴        VCSESCVFLPCVSSVFGCRCENKVCVHD 88
TC۵۰۳۱۱۸        VCSESCVFLPCVSSVFGCRCENKVCVHD 88
Zm cyc ۱        VCSESCVFLPCVSSVFGCRCENKVCVHD 88
Zm cyc ۲        VCSESCVFLPCVSSVFGCRCENKVCVHD 88
Zm cyc۳         VCSESCVFLPCVSSVFGCRCENKVCVHD 88
Zm cyc۵         SCGPTCFLIPCVSSAWGCRCENQMCVK- 86
                 *.*:*.::*****.:******::**:
```

شکل۵: هم‌ردیفی پروتئین‌های سایکلوتایدی به‌دست آمده دسته اول با یکی از پروتئین‌های شبه‌سایکلوتاید موجود در پایگاه داده (ESTdatabase)

Fig5: First class of Z. mays new cyclotide-like protein alignment with one putative cyclotide-like EST in ESTdatabase



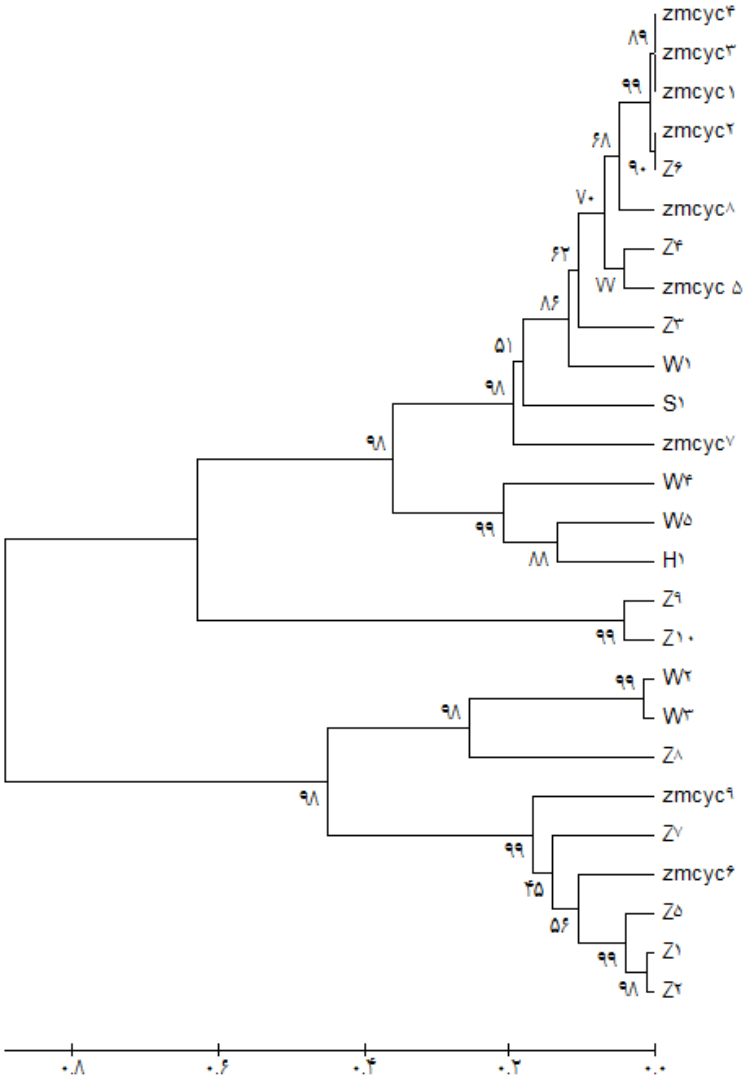
شکل ۶: هم‌ردیفی نوکلئوتیدی توالی‌های شبه‌سایکلوتاید به‌دست آمده از ذرت (کلاس ۱)

Fig 6: *Zea Mays* new cyclotide-like class I nucleotide alignment

پس از انجام تکنیک3'RACE-PCR تک‌باندی در حدود bp ۵۰۰ در ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد (شکل۱) و با اندازه مورد انتظار شبه‌سایکلوتایدها همخوانی داشت. در نتیجه تعیین توالی ۱۲ کلونی تصادفی پس از استخراج پلاسمید نهایتا نه ژن شبه‌سایکلوتاید در ذرت به‌دست آمد. آغازگرمستقیم در ناحیه حفاظت شده طراحی شده بود و بنابراین توانست تعدادی زیادی ژن را تکثیر کند. اندازه توالی‌ها بین ۴۱۳ تا ۵۱۳ نوکلئوتید متغیر بود. بلاست توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ای PGI و NCBI نشان داد که این توالی‌ها شبه‌سایکلوتاید هستند(جدول۱). درصد تشابه توالی‌های به‌دست آمده با شبه‌سایکلوتایدهای موجود در پایگاه داده‌ای ذکر شده از ۷۴٪ تا ۹۵٪ متغیر بود و E value نیز از $5e^{-25}$ تا $1e^{-155}$ متفاوت بود که نشان از شبه‌سایکلوتاید بودن توالی‌های همسانه‌شده در ذرت دارد.

شبه‌سایکلوتایدهای به‌دست آمده به دو دسته تقسیم شدند. دسته اول توالی‌ها شباهت زیادی با توالی‌های شبه‌سایکلوتایدی شناخته شده داشتند که درشکل ۴ قسمت‌های مختلف این دسته و یکی از پروتئین‌های موجود در پایگاه‌داده مشخص شده است. این توالی‌های پروتئینی شامل قسمت‌های سیگنال، ناحیه ابتدایی، جایگاه شبه‌سایکلوتایدی و دم می‌باشد. طول سیگنال با نرم افزار Signal P (http://www.cbs.dtu.dk) بررسی و طول آن حدود۳۰-۲۴ اسیدآمینه به‌دست آمد. طول ناحیه ابتدایی در شبه‌سایکلوتایدهای مختلف تا حدود ۷۰ اسیدآمینه می‌باشد، این شبه‌سایکلوتایدها حاوی شش اسیدآمینه سیستئین حفظ

شده می‌باشند که با فواصل مشخصی در کنار هم قرار گرفته‌اند. پیوند دی‌سولفید این سیستئین‌ها باعث ایجاد ۶ حلقه شده است. علاوه بر سیستئین‌های حفظ شده اسیدآمینه‌های حفظ شده دیگری هم در این ناحیه وجود دارد، اسیدآمینه گلوتامیک در حلقه یک در اکثر سایکلوتایدها وجود دارد که در تمامی توالی‌های شبه‌سایکلوتایدی به‌دست آمده از این مطالعه وجود داشت. این اسیدآمینه در پایداری ساختار پروتئین‌های سایکلوتاید نقش مهمی ایفا می‌نماید زیرا با دومین یا سومین اسیدآمینه‌ی دارای گروه هیدروکسیل (Thr, Ser) موجود در حلقه سه پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کند (Rosengren et al. 2003). این اسیدآمینه هیدروکسیله(Thr, Ser) در تمام توالی‌های شبه‌سایکلوتایدی موجود در خانواده گرامینه (Rosengren et al. 2003). آخرین اسیدآمینه موجود در حلق هسه گلیسین یا آلانین می‌باشد که در اکثر سایکلوتایدها حفظ شده است(Rosengren et al. 2003) که در این مطالعه گلیسین بود. طول قسمت دوم ۱۲-۲ اسیدآمینه می‌باشد و توالی‌های شبه سایکلوتایدی براساس طول دم به دو دسته با طول دم کوتاه و دم بلند تقسیم می‌شوند. در این مطالعه تمامی توالی‌ها با طول دم کوتاه بودند.



شکل ۷ : فیلوگرام پروتئین های شبه‌سایکلوتاید دربعضی از گرامینه‌ها (مشخصات فیلوگرام در جدول ۲ موجود می‌باشد)

Fig 7: Phylogenetic tree of cyclotide-like proteins in some gramineous plants

دسته دوم توالی‌های به‌دست آمده دارای شباهت اندکی با سایر شبه‌سایکلوتایدهای شناخته شده می‌باشند و دارای طول سیگنال متفاوتی هستند. فاصله سیستئین‌های این دسته از نظم خاصی پیروی نمی‌کند. شکل۵ هم‌ردیفی پروتئینی شبه‌سایکلوتایدهای به‌دست آمده را با شبه‌سایکلوتاید ذرت به شماره دستیابی TC503118 نشان می‌دهد. در این شکل

شباهت زیادی بین توالی‌ها مشاهده می‌شود، اما تفاوت‌هایی نیز وجود دارد که پروتئین‌ها را به سه دسته تقسیم می‌نماید. دسته اول شامل Zm cyc4، دسته دوم شامل Zm Zm cyc 1 , Zm cyc 3, TC503118, Zmcyc2, و دسته سوم شامل Zm cyc 5 می‌باشد. این دسته‌بندی بر اساس تفاوت در نوع اسیدآمینه است.

با وجود این شباهت پروتئینی، همردیفی نوکلئوتیدی (شکل۶) تفاوت‌های بیشتری را نشان می‌دهد. در دسته دوم، Zm cyc 3 دارای ۸ نوکلئوتید متفاوت با Zm cyc 2 و Zm cyc 1 است که اثبات می‌کند این پروتئین‌های تقریبا همسان از لحاظ نوکلئوتیدی متفاوتند. در شکل ۷ فیلوگرام پروتئین‌های شبه‌سایکلوتاید موجود در پایگاه داده با پروتئین‌های به‌دست آمده در این تحقیق رسم شده است که نشان می‌دهد این پروتئین‌ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند که توالی‌های پروتئینی به‌دست آمده در این تحقیق در هر دو گروه قرار می‌گیرند که مشخصات این شبه‌سایکلوتایدها در جدول ۲ مشخص شده‌است.

سایکلوتایدها در دفاع گیاه در برابر عوامل مختلف بیماریزا نقش دارند. در مورد شبه‌سایکلوتایدها گزارش‌های کمتری وجود دارد. در تحقیقی بر روی پروتئین‌های دفاعی که علیه قارچ *Ustilago maydis* در ذرت انجام شده است، مشخص شد یک پروتئین شبه‌سایکلوتاید(GenBank: AY679129.1) هم وجود داشت که مقدار آن بعد از حمله عامل بیماری زا افزایش یافت (Basse *et al.* 2005). دسته اول پروتئین‌های شبه سایکلوتاید به‌دست آمده در مطالعه حاضر شباهت زیادی با این پروتئین دارند. بنابراین تنوع بالای این ژن‌ها در ذرت ممکن است با نقش آنها در مقاومت به بیماری-های مختلف مرتبط باشد.

ژن‌های شبه‌سایکلوتاید به‌دست آمده از قسمت کلئوپتیل این گیاه بود. انتخاب کلئوپتیل بر اساس فراوانی EST ژن‌های شبه سایکلوتاید در پایگاه داده‌های PGI صورت گرفت، زیرا سایکلوتایدها در این اندام فراوانی بیشتری نسبت به سایر اندام ها نشان دادند، بنابراین تعداد این ژن‌ها ممکن است بیشتر از آنچه در این مطالعه گزارش شده است باشد. بنابراین لازم است که از بافت‌های مختلف و در شرایط متفاوت RNA استخراج و ژن‌های شبه‌سایکلوتاید همسانه‌سازی و مطالعه شوند. پروتئین‌های شبه سایکلوتایدی دارای تنوع زیادی هستند که تعدادی از این توالی‌ها در این تحقیق گزارش شده است. تایید و حضور سایکلوتایدها در غلات از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا نشان دهنده‌ی حضور سایکلوتایدها در تک لپه‌ای‌ها است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سایکلوتایدها ممکن است از یک ژن اجدادی مشتق شده باشند که در جد مشترک تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها وجود داشته است. مطالعات بیشتری در خصوص نقش این پروتین-های حلقوی در این گیاهان لازم است.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۴-۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.

Cloning and Characterization of Cyclotide-like Genes in *Zea mays*

Torkaman[1], S., Bahramnejad[2]*, B. and Koodary[3], N.

Abstract

Cyclotides-like proteins are a family of small disulfide-rich and plant-derived peptides made up of ~30 amino acids. They contain a unique structural motif that consists of a head-to-tail cyclic backbone and knotted arrangement of three disulfide bonds, together referred to as the cyclic cystine knot (CCK). The cyclotides are antimicrobial circular peptides that have a variety of biological activities such as anti-HIV, anti-tumor, cytotoxic, hemolytic activity and etc. In current study, we have cloned new members of the cyclotide-like gene family from *Zea Mays* leaf cDNA using 3'RACE-PCR and specefic primers based on sequences found in a continuous region of homology present in EST database. Clones were randomly picked and sequenced. Nine cyclotide-like genes were identified. Phylogenetic analysis divided them in two separate classes; first class with length 300-500nt showed similarity with classical cyclotide-like genes in databases. In contrast the other class was very different with length 90-500nt and showed variations in number of disulfide bands. The cloning of these genes in maize showed that they are very diverse and may have important role in plant response to different stresses.

Keywords: Cyclotide-like genes, Maize, 3'RACE-PCR

References

Anderson, M. A. and Craik, D. J. 2006. Discovery of cyclotide-like protein sequences in graminaceous crop plants: ancestral precursors of circular proteins? The Plant Cell, 18: 2134-2144.

Bahramnejad, B., Erickson, L. R. and Goodwin, P. H. 2010. Induction of expression susceptibili due to silencing a 4, 5-DOPA dioxygenase extradiol-like gene of *Nicotiana benthamiana* in the interaction with the hemibiotrophic pathogens, *Colletotrichum orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*, 178: 147-157.

Chen, B., Colgrave, M. L., Daly, N. L., Rosengren, K. J., Gustafson, K. R. and Craik, D. J. 2005. Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. Biochemistry, 280: 22395-22405.

Christoph, W. B. 2005. Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor formation1. Plant Physiology, 138: 1774-1784.

Colgrave, M. L. and Craik, D. J. 2004. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. Biochemistry, 43: 5965-5975.

Craik, D. J., Daly, N. L. and Bond, T. 1999. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif . Molecular biology, 294: 1327-1336.

Derua, R., Gustafson, K. R. and Pannell, L. K. 1996. Analysis of the disulfide linkage pattern in circulin A and B, HIV-inhibitory macrocyclic peptides. Biochemical and Biophysical Research Communications, 228: 632-638.

Gran, L. 1973. Effect of a polypeptide isolated from Kalata-Kalata (*Oldenlandia-Affinis* DC) on estrogen dominated uterus. Acta Pharmacol Toxicol, 33: 400-408.

1. M.Sc students, Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj

2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture,University of Kurdistan, Sanandaj

*: Corresponding Author **Email**: b.bahramnejad@uok.ac.ir

Gruber, C. W., Cemazar, M., Anderson, M. A. and Craik, D. J. 2007. Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. Toxicon, 49: 561-57.

Herrmann, A., Burman, R., Mylne, J. S., Karlsson, G., Gullbo, J., Craik, D. J., Clark, R. J. and Goransson, U. 2008. The alpine violet, Viola biflora, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity . Phytochemistry, 69: 939-952.

Jennings, C. V., Rosengren, K. J., Daly, N. L., Plan, M., Stevens, J. and Scanlon, M. J. 2005. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of Kalata B2, a circular protein with a twist: do mobius strips exist in nature?. Biochemistry, 44: 851-860.

Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. and Anderson, M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98:10614-10619.

Keith, K. M., Bogusky, M. J., Anderson, P. S., Ramjit, H., Ransom, R. W., Wood, T. and Sardana, M. 1994. Cyclopsychotride-A, a biologicaly-active, 31-residue cyclic peptide isolated from *psychotria longipes*. Journal of Natural Products, 57: 1619-1625.

Lindholm, P., Goransson, U., Johansson, S., Claeson, P., Gullbo, J., Larsson, R., Bohlin, L. and Backlunbl, A. 2002. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 365-369.

Mulvenna, J. P., Mylne, J. S., Bharathi, R., Burton, R. A., Shirley, N. J., Fincher, G. B., Nourse, A., Trabi, M., Daly, N. L. and Craik, D. J. 2004. A comparison of the self-association behavior of the plant cyclotides kalata B1 and kalata B2 via analytical ultracentrifugation. The Journal of Biological Chemistry, 279: 562-570.

Saether, O., Craik, D. J., Campbell, I. D., Sletten, K., Juul, J. and Norman, D. G. 1995. Elucidation of the primary and 3-dimensional structure of the uterotonic polypeptide Kalata B1. Biochemistry, 34: 4147-4158.

Schöpke, T. H., Hasan Agha, M. I., Kraft, R., Otto, A. and Hiller, K. 1993. Hämolytisch athog komponenten aus *Viola tricolor*L. and *Viola arvensis* Murray. Scientia Pharmaceutica, 61: 145-153.

Witherup, K. M., Bogusky, M. J., Anderson, P. S., Ramjit, H., Ransom, R. W., Wood, T. and Sardana, M. 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. Nature, 57: 1619-1625.

Zhang, J., Liao, B., Craik, D. J., Li, J. T., Hu, M. and Shu, W. S. 2009. Identification of two suites of cyclotide precursor genes from metallophyte *Viola baoshanensis*: cDNA sequence variation, alternative RNA splicing and potential cyclotide diversity. Gene, 431: 23-32.