ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷
صفحه ۵۱۲ - ۵۰۳

شناسایی، همسانه‌سازی و بررسی برخی ژن‌های ضد میکروبی دیفنسین گیاه یولاف *Avena sativa*

Identification, cloning and characterization of some antimicrobial peptide defensin from oat plant *Avena sativa*

سارا امامی‌فر[۱]، شمس الضحی ابوالمعالی[۱]، محسن محمدی*[۲]، سید محسن سهرابی[۳]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Emamifar S[1], Abolmaali Sh[1], Mohammadi M[*2], Sohrabi SM[3]

1- Graduated MSc Student, Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Semnan University, Semnan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
3- Graduated PhD Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohamadi419@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

ظهور و گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری‌های بیماری‌زا یک تهدید جدی سلامت عمومی در جهانی است. به خاطر افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مرسوم، بیشتر مطالعات روی توسعه پپتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان یک درمان جایگزین متمرکز شده‌اند. دیفنسین‌ها گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین هستند که در گیاهان و جانوران وجود دارند. این پپتیدها در گیاهان به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی علیه پاتوژن‌ها و آفات عمل می‌کنند. هدف از این تحقیق، شناسایی برخی از ژن‌های دیفنسین از گیاه یولاف و بررسی ویژگی‌های آن‌ها بود. به این منظور، خانواده ژنی دیفنسین گیاه گندم از بانک ژن دریافت و علیه ترانسکریپتوم گیاه یولاف مورد همردیفی قرار گرفت. توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی جمع‌آوری و سرهم‌بندی شدند و سپس کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های به‌دست آمده با استفاده از ابزار BLASTn، علیه پایگاه داده نوکلئوتیدی هم‌ردیف شدند. توالی‌های حاصل برای وجود چارچوب خوانش باز کامل بررسی و از توالی‌های حاوی چارچوب خوانش باز کامل برای طراحی آغازگرها استفاده شد. در مرحله‌ی بعد، از مخلوط بافت‌های (ریشه، ساقه و برگ) گیاه یولاف استخراج RNA صورت گرفت و cDNA ساخته شد. قطعات ۳۲۷، ۳٤۰، ۳۷۵، ۳۹۱ و ۳۹۷ جفت‌بازی بوسیله PCR تکثیر و در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی و توالی‌یابی شدند. نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی، وجود ۹ توالی کدکننده برای ژن‌های دیفنسین را در ترانسکریپتوم گیاه یولاف مشخص کرد. از این تعداد ۵ ژن همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند. این ژن‌ها دارای چارچوب‌های خوانش باز بین ۲٤٦-۲۳٤ بودند و پپتیدهایی به طول بین ۸۱- ۷۷ اسید آمینه را کد می‌کردند. توالی پپتیدی دیفنسین‌های شناسایی شده، دارای دمین عملکردی Knot1 از خانواده gamma-thionin بود. شناسایی ژن‌ها و بررسی خصوصیات آن‌ها، اولین قدم در مهندسی ژنتیک و تولید موجودات با صفات مفید است. در این تحقیق برای اولین بار، توالی کدکننده‌ی ۵ ژن دیفنسین از گیاه یولاف جداسازی شد و ساختار و ویژگی‌های مختلف آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک
پپتیدهای ضد میکروبی
دیفنسین‌های گیاهی
Avena sativa

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهایی کوچک با جرم مولکولی پایین و در حدود ۸ کیلودالتون هستند. تمامی موجودات زنده از میکروارگانیسم‌های تک سلولی تا گیاهان عالی و جانوران این پپتیدها را به‌منظور محافظت از خود در برابر عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند. در مراحل ابتدایی حمله‌ی پاتوژن‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی به‌همراه سایر عوامل دفاعی، به‌عنوان بخشی از مکانیسم دفاعی وارد عمل می‌شوند (Holaskova et al. 2015). پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، در گروه‌های متفاوتی شامل، دیفنسین‌ها، اسنیکین‌ها، نوتین‌ها، هوئین‌ها، و سایکلوتیدها تقسیم‌بندی می‌شوند (Cools et al. 2017). دیفنسین‌ها دسته‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی هستند که کاتیونی بوده و طولی بین ٤٥ تا ٥٤ اسید آمینه دارند. این دسته از پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی دارای ٦ تا ٨ اسید آمینه سیستئین محافظت شده هستند که ٣ تا ٤ پیوند دی‌سولفیدی را تولید می‌کنند. پپتیدهای ضد میکروبی دیفنسین، قسمتی از سیستم دفاعی عمومی گیاهان بوده و بخشی از خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند. پپتیدهای ضد میکروبی نسل جدیدی از عوامل ضد میکروبی برای حفاظت از گیاهان و نیز درمان بیماری‌های عفونی انسان را تشکیل می‌دهند (Elsbach 2003; Holaskova et al. 2015). همچنین در برخی مطالعات برای این پپتیدها، فعالیت علیه سلول‌های سرطانی نیز گزارش شده‌است (Ramamoorthy et al. 2007; Hoskin and Ramamoorthy 2008). تاکنون چندین مکانیسم متفاوت برای عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی گزارش شده‌است. برهمکنش و آسیب به غشاهای میکروبی، آسیب به بخش‌های درون سلولی مانند دستگاه تولید ماکرومولکول‌های سلول و برهمکنش با سایر اجزاء حیاتی سلول از جمله عملکردهای پپتیدهای ضد میکروبی هستند (Zasloff 2002). برهمکنش با غشاهای میکروبی عمومی‌ترین مکانیسم عمل پپتیدهای ضد میکروبی بوده و در اثر این برهمکنش منفذی در غشاء ایجاد می‌شود که منجر به ایجاد میسل، از بین رفتن قطبیت غشایی، بیرون ریختن محتویات سیتوپلاسم و مرگ سلول می‌شود (Goyal and Mattoo 2016). پپتیدهای دیفنسین در تمام گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و بسیار متنوع هستند. این پپتیدهای ضد میکروبی در ابتدا در بذرهای گیاهان شناسایی و جداسازی شده‌اند، در حالی‌که در سایر اندام‌های گیاه مثل برگ‌ها و گل‌ها نیز تولید می‌شوند. دیفنسین‌ها همچون دیگر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی دائماً در برخی اندام‌ها مانند اندام‌های ذخیره‌ای گیاهان و هم‌چنین در واکنش به تنش‌های زیستی و غیر زیستی گوناگون نیز القاء و تولید می‌شوند. دیفنسین‌های گیاهی برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ از آندوسپرم گندم و جو شناسایی و جداسازی شدند. از آن زمان تاکنون، این پپتیدها از گیاهان مختلفی مانند یونجه، عدس، تربچه، خرما، شنبلیله، نخود،انگور، آرابیدوپسیس، لوبیا و گندم جداسازی و شناسایی شده‌اند (Thomma et al. 2002; Janssen et al. 2003). یولاف زراعی *(Avena sativa)* با نام انگلیسی Oat گیاهی هگزاپلوئید ($2n = 6x = 42$) از خانواده Poaceae است که همواره یکی از هشت محصول مهم زراعی شناخته شده دنیا به شما می‌آید (Chew et al. 2016). در مقایسه با گندم و جو، یولاف دارای ارزش تغذیه‌ای بیشتری برای انسان و دام است. مصرف آرد یولاف به‌علت داشتن بتاگلوکان بالا، کاهش کلسترول خون را به‌همراه دارد و هم‌چنین خطر احتمال سرطان روده بزرگ را کاهش می‌دهد (Gazza et al. 2016). هم‌چنین، از این گیاه در مصارف داروسازی و تهیه مواد آرایشی بهداشتی استفاده می‌شود به‌طوری که اهمیت آن در صنایع بیوشیمیایی رو به فزونی بوده و از این گیاه به‌عنوان یک محصول مناسب در صنایع مرتبط با کشاورزی در بسیاری از کشورهای جهان یاد می‌شود. از این رو در حال حاضر تقاضای جهانی مصرف یولاف رو به افزایش است (Nirmalakumari et al. 2013). امروزه محققان با مقادیر انبوهی از اطلاعات ژنومی و ترانسکریپتومی در موجودات زنده‌ی مختلفی رو به رو هستند. این حجم بالای اطلاعات در کنار دسترسی به ابزارهای محاسباتی مختلف، شناسایی و بررسی خصوصیات ژن‌های مختلف را به‌صورت بسیار ساده وسریع امکان پذیر کرده است. با استفاده از این داده‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان پیش از انجام هر گونه فعالیت آزمایشگاهی به‌صورت *in silico* ژن یا ژن‌های مورد نظر را شناسایی، خصوصیات آن‌ها را بررسی و فعالیت‌های مرتبط با این ژن‌ها را شبیه سازی کرد.(Gill and Sanseau 2000; Periwal and Scaria 2014; Bao et al. 2014). بررسی‌ها، شناسایی‌ها،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

پیش‌بینی‌ها و شبیه‌سازی‌های بیوانفورماتیکی با تقریب بسیار بالایی به آنچه در واقعیت می‌گذرد نزدیک هستند و معمولاً به وسیله آزمایش‌های عملی مورد تأیید قرار می‌گیرند (Gill and Sanseau 2000; Periwal and Scaria 2014; Bao et al. 2014). پروژه توالی‌یابی ژنوم گیاه یولاف در جریان بوده و دسترسی به توالی اولیه‌ی ژنوم این گیاه محدود است و همچنین مستندسازی ژنوم یولاف هنوز انجام نشده‌است. با توجه به این موارد، برای شناسایی ژن‌های جدید در این گیاه باید از گیاهان هم خانواده به‌همراه کتابخانه‌های EST موجود این برای گیاه استفاده کرد. با استفاده از این اطلاعات می‌توان ژن‌های مورد نظر را شناسایی و جداسازی کرد و برای اهداف مختلف بیوتکنولوژی به‌کار برد. در این تحقیق، با استفاده از روش‌های محاسباتی و بیوانفورماتیکی توالی کدکننده‌ی برخی از اعضاء خانواده ژنی دیفنسین از کتابخانه‌های EST گیاه یولاف جداسازی و تعیین خصوصیت شد. در مراحل بعد با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی، صحت جداسازی بیوانفورماتیکی این ژن‌ها تأیید شد. این تحقیق با هدف شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیت توالی کدکننده‌ی پپتیدهای ضد میکروبی از گیاه تک لپه یولاف و به‌منظور معرفی عوامل ضد میکروبی جدید صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

ابتدا خانواده ژنی کامل دیفنسین مربوط به کولتیوار Chinese Spring گیاه گندم، حاوی تعداد ۳۱ توالی نوکلئوتیدی از بانک ژن دریافت شد. در مرحله‌ی بعد، تعداد ۲۵۴۰۰ توالی EST مربوط به گیاه یولاف زراعی از پایگاه داده EST موجود در NCBI دریافت و از آن‌ها یک پایگاه داده اختصاصی در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 ایجاد شد. سپس، با استفاده از ابزار BLAST محلی موجود در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 توالی‌های کامل ژن‌های دیفنسین گیاه گندم با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پایگاه داده اختصاصی ایجاد شده، مورد همردیفی قرار گرفتند. کانتیگ‌های حاصل از ژن‌هایی که در همردیفی علیه پایگاه داده اختصاصی دارای جواب بودند، به‌صورت جداگانه جمع‌آوری شد. در مرحله‌ی بعد، کانتیگ‌های جداگانه با هم مخلوط شدند و با استفاده از دو نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 11.0 سرهم‌بندی شدند.

کانتیگ‌های حاصل از سرهم‌بندی با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0، Vector NTI 11.0 و ORF finder برای وجود چارچوب خوانش باز کامل با طول بیش‌تر از ۲۰۰ جفت‌باز مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد، کانتیگ‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل، با استفاده از ابزار $BLAST_n$ موجود در NCBI علیه بانک ژن مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. در این مرحله صحت اولیه جداسازی ژن‌های مورد نظر بررسی می‌شود و کانتیگ‌هایی که دارای شباهت با ژن‌های دیفنسین هستند برای مرحله‌ی بعد انتخاب و کانتیگ‌های غیر شبیه به این ژن‌ها حذف می‌شوند. به‌منظور بررسی صحت قاب خوانش، کانتیگ‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل، با استفاده از ابزار CDD موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند.

آغازگرهای مورد استفاده، بر اساس کانتیگ‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل که در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی صحت آن‌ها به اثبات رسیده بود، طراحی شدند. آغازگرها با اهداف جداسازی کامل قطعات ژنی و با استفاده از دو نرم‌افزار Vector NTI 11.0 و AlleleID 7.0 طراحی شدند. توالی و خصوصیات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده‌است.

در این پژوهش، بذورگیاه یولاف در گلدان‌های با ترکیب ۶۰:۴۰ رس و کود حیوانی کشت شدند. گلدان‌ها پس از کشت در شرایط گلخانه نگهداری شدند و هفته‌ای یکبار با کود کامل NPK تغذیه شدند. از مخلوط بافت‌های برگ، ساقه، ریشه و بذور در حال توسعه گیاهان برای استخراج RNA استفاده شد. بافت‌های برداشت شده از گیاهان بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۸۰- نگهداری شدند. استخراج RNA کل از مخلوط بافت‌ها، با استفاده از کیت CinnaPure شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف DNA ژنومی از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase I شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر و ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده

نام	توالی	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	اندازه قطعه تکثیری (جفت‌باز)
Def 1-F	5'-TAGCCCCTAAGATTAAGAAGAAG-3'	۵۸/۲	۳۴۰
Def 1-R	5'-CGTTGGACTTTGATGGATGG-3'		
Def 4-F	5'-GCGTGATCCATCCAAGTTCC-3'	۶۰/۵	۳۹۷
Def 4-R	5'-GGCTGGCTAGTGGCTACC-3'		
Def 5-F	5'-GTGCGATTCAGACATCCAG-3'	۶۰	۳۹۱
Def 5-R	5'-TCACTAGCAGACCCTCTTG-3'		
Def 9-F	5'-TTCATAAGAAATCTCAACAATGC-3'	۵۶/۵	۳۲۷
Def 9-R	5'-AAGGTCCTCTAGCAGTTCC-3'		
Def 10-F	5'-GCGACTCAGGTGGTGTTGG-3'	۶۱/۷	۳۷۵
Def 10-R	5'-GCGGGCACAGGAGGTAGC-3'		

ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo Fisher Scientific و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Taq* پلی‌مراز شرکت سیناژن و با برنامه دمایی، واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (جدول۱) به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طی ۳۵ چرخه صورت گرفت. همچنین واسرشته‌سازی اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۳۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش، محصولات واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند. پس از بررسی نتایج واکنش PCR و تأیید اندازه روی ژل آگاروز، قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت Thermo Fisher Scientific طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص سازی شدند. قطعات خالص سازی شده به همراه پلاسمید pTZ57R/T شرکت Thermo Fisher Scientific در واکنش‌های اتصال جداگانه‌ای وارد و با استفاده از آنزیم T4 لیگاز شرکت Thermo Fisher Scientific به هم متصل شدند. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از کیت همسانه‌سازی شرکت Thermo Fisher Scientific به باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند. پس از انتخاب کلنی‌های سفید روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، واکنش کلنی PCR با استفاده از ترکیب آغازگرهای اختصاصی هر ژن، برای تأیید اولیه همسانه‌سازی انجام شد. از کلنی‌های مثبت حاوی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Thermo Fisher Scientific استخراج پلاسمید انجام شد و هضم آنزیمی با دو آنزیم *Eco*RI و *Bam*HI صورت گرفت. پس از تأیید اندازه‌ی قطعات توسط هضم آنزیمی، پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعات مورد نظر، مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج توالی یابی هر ژن به‌صورت جداگانه و با استفاده از دو نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0، Vector NTI 11.0 بررسی شد و پس از بررسی و ویرایش، برای وجود چارچوب خوانش باز کامل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سپس، توالی‌ها با استفاده از ابزار $BLAST_n$ موجود در پایگاه NCBI علیه بانک ژن مورد همردیفی قرار گرفتند و صحت جداسازی آن‌ها بررسی شد. پس از تعیین چارچوب خوانش باز، توالی‌های نوکلئوتیدی مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 11.0 به پروتئین ترجمه شدند. دمین‌های عملکردی موجود در این توالی‌ها با استفاده از ابزارهای CDD، Interproscan و Pfam مشخص شدند (Marchler-Bauer et al. 2014; Jones et al. 2014; Finn et al. 2016). به‌کمک ابزارهای SignalP و CELLO وجود یا عدم وجود پپتید نشانه و همچنین محل تجمع پروتئین‌ها مشخص شد (Jones et al. 2014; Nielsen 2017). ساختارهای ثانویه‌ی موجود در توالی‌های پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 پیش‌بینی شد. تعداد پیوندهای دی سولفیدی موجود در پروتئین‌ها با استفاده از ابزار DiANNA 1.1 پیش‌بینی شد. سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک و فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از ابزار ProtParam تعیین شد (Ferrè and Clote 2006; Gasteiger et al. 2005; Pradniwat and Rojnuckarin 2014). از پایگاه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

CAMP برای تعیین خاصیت ضد میکروبی توالی‌های پروتئینی استفاده شد. پایگاه CAMP مجموعه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی است که به‌صورت محاسباتی یا آزمایشگاهی خاصیت ضد میکروبی آن‌ها تأیید شده‌است. در پایگاه CAMP، خاصیت ضد میکروبی پروتئین‌ها با استفاده از الگوریتم‌های Support Vector Machine، Random Forest، Artificial Neural Network و Discriminant Analysis پیش‌بینی شد (Waghu et al. 2014). توالی‌های جداسازی شده از یولاف به‌همراه خانواده پروتئینی دیفنسین گندم و برخی توالی‌های مشابه با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Maximum likelihood و آزمون Bootstrap با ۵۰۰ تکرار ترسیم شد (Tamura et al. 2013).

نتایج و بحث

سر هم بندی ESTهای حاصل از هم‌ردیفی در گیاه یولاف، باعث ایجاد ۵ کانتیگ با طول‌های ٤٧٥، ٦٦١، ٧٣٥، ٤٢٠، ٥٧٣ جفت‌باز شد. با الگو قرار دادن کانتیگ‌های ایجاد شده، آغازگرهایی طراحی شد. نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعاتی با طول ٣٤٠، ٣٩٧، ٣٩١، ٣٢٧، ٣٧٥جفت‌بازی را به‌ترتیب برای دیفنسین‌های *Def1*، *Def4*، *Def5*، *Def9*، *Def10* نشان داد (شکل ۱). با استفاده از ابزارهای SignalP و CELLO توالی‌های پروتئینی خانواده دیفنسین گیاه یولاف آنالیز شدند و در ساختار این پروتئین‌ها، وجود پپتیدهای نشانه‌ای به‌طول ۲۵، ۱۵، ۲۱، ۲۱، ۱۸ اسید آمینه تأیید شد. تجمع خارج سلولی و القاء در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی بخش دیگری از ویژگی‌های پیش‌بینی شده برای پپتیدهای دیفنسین گیاه یولاف بود (جدول ۲).

پپتیدهای ضد میکروبی و از جمله دیفنسین‌ها برای فعالیت خود باید به خارج از سلول یعنی جایی که اغلب پاتوژن‌ها ابتدا در آنجا قرار می‌گیرند، ترشح شوند و وجود پپتید نشانه ترشحی در ساختار آن‌ها ضروری است. همچنین، نقش دفاعی دیفنسین‌های گیاهی ارتباط مستقیمی با محل تجمع آن‌ها دارد. این ژن‌ها در بذور، گل‌ها، غلاف بذر، غده‌ها و برگ‌ها و نقش مهمی در حفاظت از گیاهچه‌های جوان بازی می‌کنند (Lacerda et al. 2014).

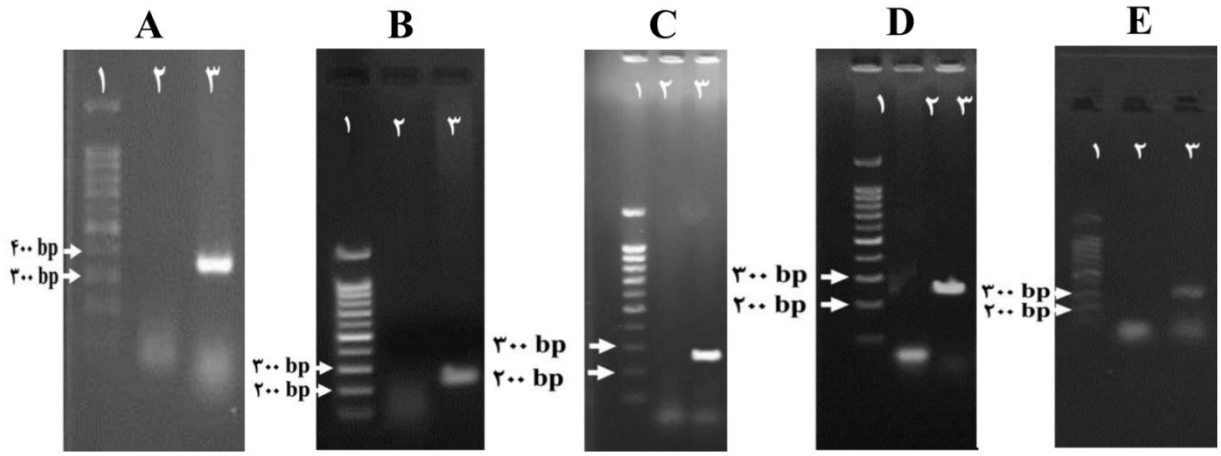
نتایج بررسی ساختارهای ثانویه، وجود مارپیچ‌های آلفا و هم‌چنین رشته‌های بتا به صورت تکی یا با هم را در ساختار تمام دیفنسین‌های گیاه یولاف مشخص کرد. نتایج، وجود ۲ تا ٤ مارپیچ آلفا و همچنین ۱ تا ٦ رشته بتا را در ساختار این پپتیدها مشخص کرد (شکل۲). دیفنسین‌ها به منظور داشتن عملکرد مناسب و ماندگاری در شرایط متفاوت زیستی، نیازمند ایجاد پیچ و تاب‌های ویژه در ساختار خود هستند. مارپیچ‌های آلفا و رشته‌های بتا شکلی از این تغییرات ساختاری محسوب می‌شوند که در ساختار دیفنسین‌ها ایجاد می‌شوند و عامل پایداری این پپتیدها در محل تجمع خود و همچنین افزایش قابلیت برهمکنش این پپتیدها با پاتوژن‌های هدف خود می‌شوند (Thomma et al. 2002; Valente et al. 2013; Nawrot et al. 2014).

نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها، وزن مولکولی حدود ۸۲۰۰ تا ۸۸۰۰ دالتون، ضریب ناپایداری ۲۷/۱۷ تا ۵۰/۲۹، شاخص آلیفاتیک ٦١/٢٨ تا ٧٨/٣١، pH ایزوالکتریک ٧/٦ تا ٩/٠٦، و GRAVY ٠/٠٠٩- تا ٠/١٠١ را برای ژن‌های دیفنسین جدا شده ازگیاه یولاف مشخص کرد (جدول ۳).

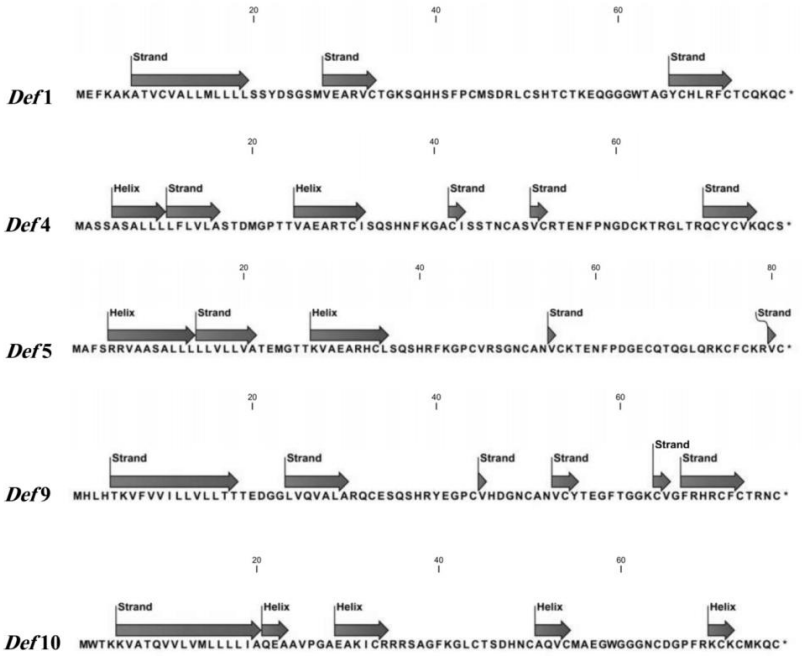
جدول ۲- ویژگی‌های ژن‌های دیفنسین گیاه یولاف

پپتید	طول ORF (جفت باز)	طول پپتید (اسید آمینه)	موقعیت پپتید نشانه (اسید آمینه)	محل تجمع	عملکرد
Def 1	٢٣٧	٢٥	١-٢٦	خارج از سلول	پاسخ به تنش‌ها
Def 4	٢٣٧	١٥	١-١٦	خارج از سلول	پاسخ به تنش‌ها
Def 5	٢٤٦	٢١	١-٢٢	خارج از سلول	پاسخ به تنش‌ها
Def 9	٢٣٤	٢١	١-٢٢	خارج از سلول	پاسخ به تنش‌ها
Def 10	٢٣٤	١٨	١-١٩	خارج از سلول	پاسخ به تنش‌ها

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های دیفنسین روی cDNA. A- *Def 1*، B- *Def 4*، C- *Def 5*، D- *Def 9* و E- *Def 10*. در تمام تصاویر چاهک ۱- نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۲- واکنش کنترل منفی (آب)، چاهک ۳- توالی تکثیر شده ژن مورد نظر روی cDNA.



شکل ۲- ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده در دیفنسین‌های جداسازی شده از گیاه یولاف

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پپتیدهای دیفنسین جداسازی شده از گیاه یولاف

نام	وزن مولکولی	pH ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	GRAVY
Def 1	۸/۶	۸/۴۲	۴۹/۱۲	۶۱/۲۸	-۰/۰۰۹
Def 4	۸/۲	۸/۵	۲۷/۰۷	۷۰/۱۳	۰/۱۰۱
Def 5	۸/۸	۹/۲۷	۴۵/۶۰	۷۸/۲۷	۰/۰۱۱
Def 9	۸/۵	۷/۶	۳۶/۸۹	۷۸/۳۱	۰/۰۶۸
Def10	۸/۳	۹/۰۶	۵۰/۲۹	۷۴/۸۱	۰/۰۹۷

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

وزن مولکولی پایین دیفنسین‌ها، باعث افزایش سرعت تولید، انتقال و عملکرد این پپتیدهای ضد میکروبی می‌شود (Sels et al. 2008). دامنه‌ی pH ایزوالکتریک پیش‌بینی شده برای دیفنسین‌های جداسازی شده، بیانگر ویژگی بازی بالای این گروه از پپتیدهاست. اسیدهای آمینه‌ی بازی مانند سیستئین به وفور در ساختار دیفنسین‌ها مشاهده می‌شود و خود دلیلی بر خاصیت خاصیت بازی این پپتیدهای ضد میکروبی است (Castro and Fontes 2005; Patr´ ıcia B. Pelegrini 2005).

شاخص ناپایداری محاسبه شده برای دیفنسین‌های ۱، ۵ و ۱۰ بالاتر از ٤٠ و برای دیفنسین‌های ٤ و ۹ پایین‌تر از ٤٠ قرار دارد و نشان دهنده پایداری و ماندگاری پایین دیفنسین‌های ۱، ۵ و ۱۰ و پایداری و ماندگاری بالای دیفنسین‌های ٤ و ۹ در محیط است. پایداری زیاد، یکی از عوامل موثر در داشتن اثر ضد میکروبی این پپتیدها است (Guruprasad et al. 1990). شاخص آلیفاتیک حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های آلیفاتیک بوده و معیاری از آبگریز بودن و پایداری پروتئین است. شاخص آلیفاتیک محاسبه شده برای پپتیدهای دیفنسین گیاه یولاف، نشان‌دهنده مقاومت نسبتاً خوب آن‌ها در مقابل درجه حرارت است که می‌توان آن را به درصد بالای اسیدهای آمینه والین، لوسین، و آلانین و هم‌چنین وجود ساختارهای ثانویه و پل‌های دی سولفیدی موجود در این پپتیدها نسبت داد (Ikai 1980). برهمکنش با غشاهای سلولی عمومی‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم اثر پپتیدهای ضد میکروبی علیه پاتوژن‌ها است. ویژگی آبگریزی در کنار ساختارهای ثانویه خاص و پیوندهای دی سولفیدی، برهمکنش پپتیدها با غشاهای دولایه سلولی را تسهیل می‌کند. پپتیدهای دیفنسین برای ایجاد برهمکنش با غشاهای دولایه‌ی سلولی که عمدتاً از اسیدهای چرب تشکیل شده‌اند و به شدت آبگریزهستند، باید ویژگی آبگریزی خود را افزایش دهند که این مورد را با افزایش در میزان اسیدهای آمینه آبگریزی مانند آلانین و سیستئین در ساختار خود انجام می‌دهند (Gasteiger et al. 2005; Sagaram et al. 2012). تمام دیفنسین‌های جداسازی شده در این پژوهش، دارای ۸ اسید آمینه‌ی سیستئین محافظت شده بودند که توانایی تشکیل ٤ پیوند دی سولفیدی درون مولکولی را در ساختار این پپتیدها داشتند. پپتیدهای دیفنسین بالغ دارای ۸ اسید آمینه سیستئین محافظت شده در ساختار خود هستند (Van der Weerden and Anderson 2013; Vriens et al. 2014). اسیدهای آمینه سیستئین محافظت شده با تشکیل ٤ پل دی سولفیدی، ساختار ویژه‌ای را به پپتید داده که عامل پایداری آن شده و در برهمکنش پپتید با غشاء سلولی پاتوژن‌ها نقش مهمی بازی می‌کند (Aerts et al. 2008; Vriens et al. 2014). اکثر پپتیدهای ضد میکروبی و از جمله دیفنسین‌ها، برای پایداری و عملکرد مناسب، نیازمند برقراری تاخوردگی‌های ویژه در ساختار خود هستند. پیوندهای دی سولفیدی، مارپیچ‌های آلفا و رشته‌های بتا انواعی از این تاخوردگی‌های ساختاری هستند که در ساختار دیفنسین‌ها ایجاد می‌شوند تا پپتید ضد میکروبی بتواند با ساختار مناسب خود و با بیشترین قابلیت با غشاهای سلولی پاتوژن‌های هدف برهمکنش داشته باشد (Cools et al. 2017). به‌علت وجود ویژگی‌هایی مانند آبگریزی، وجود تاخوردگی‌های خاص، بار مثبت بالا و دیگر ویژگی‌ها، فعالیت ضد میکروبی در دیفنسین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی، ایجاد می‌شود. بر اساس این ویژگی‌ها، پایگاه CAMP با استفاده از چندین الگوریتم محاسباتی مختلف، وجود فعالیت ضد میکروبی را در پپتیدها و پروتئین‌های مختلف را پیش‌بینی می‌کند. الگوریتم‌های پایگاه CAMP، تنها در صورتی فعالیت ضد میکروبی را در یک پپتید یا پروتئین پیش بینی می‌کنند که یک یا چند ویژگی مشترک ضد میکروبی را دارا باشد. نتایج پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی ژن دیفنسین گیاه یولاف با استفاده از سایت CAMP، خاصیت ضد میکروبی را در تمام پپتیدهای خانواده دیفنسین مشخص کرد. پس از حذف پپتید نشانه از دیفنسین‌ها، الگوریتم Support Vector Machine با میزان احتمال بیشتر از ۰/۷۲۰، الگوریتم Random Forest با میزان احتمال بیشتر از ۰/٤۲۲، الگوریتم Artificial Neural Network با تأیید کامل (به استثناء *Def* 1) و الگوریتم Discriminant Analysis با میزان احتمال بیش‌تر از ۰/۵۲٦، فعالیت ضد میکروبی را در تمام پپتیدهای دیفنسین جداسازی شده از گیاه یولاف پیش‌بینی کردند (جدول٤).

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن‌های دیفنسین جداسازی شده نشان داد که، این ژن‌ها با بیشترین قرابت در گروه ژن‌های دیفنسین گیاهان تک لپه‌ای و به‌خصوص گیاهان متعلق به راسته

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

Poales و خانواده Poaceae قرار می‌گیرند. در این پژوهش، دیفنسین‌های 1 *Def* و 10 *Def* به‌همراه گاما تیونین و دیفنسین ۱ گیاه ذرت (*Zea mays*)، دیفنسین‌های ۳، ۱۶، ۲۲ و ۳۱ گیاه گندم معمولی (*Triticum aestivum*)، گاما تیونین جو (*Hordeum vulgare*) و دیفنسین گیاه نخل خرما (*Phoenix dactylifera*) در یک گروه قرار گرفتند. دیفنسین 9 *Def* همراه با دیفنسین‌های ۲۳، ۲۵ و ۲۶ گیاه گندم معمولی (*Triticum aestivum*) در یک گروه قرار گرفت. دیفنسین 5 *Def* همراه با دیفنسین ۱/۲ گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor*)، دیفنسین گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum*)، دیفنسین گیاه ارزن (*Setaria italica*) و دو دیفنسین از گیاه چمن جاوری (*Brachypodium distachyon*) در یک گروه قرار گرفتند. در نهایت، دیفنسین 4 *Def* در یک گروه جداگانه قرار گرفت. نتایج تجزیه‌ی فیلوژنتیکی در هر دو سطح DNA و پروتئین، روند تقریباً مشابهی از نزدیکی ژنتیکی را برای ژن‌های جداسازی شده نشان داد (شکل ۳).

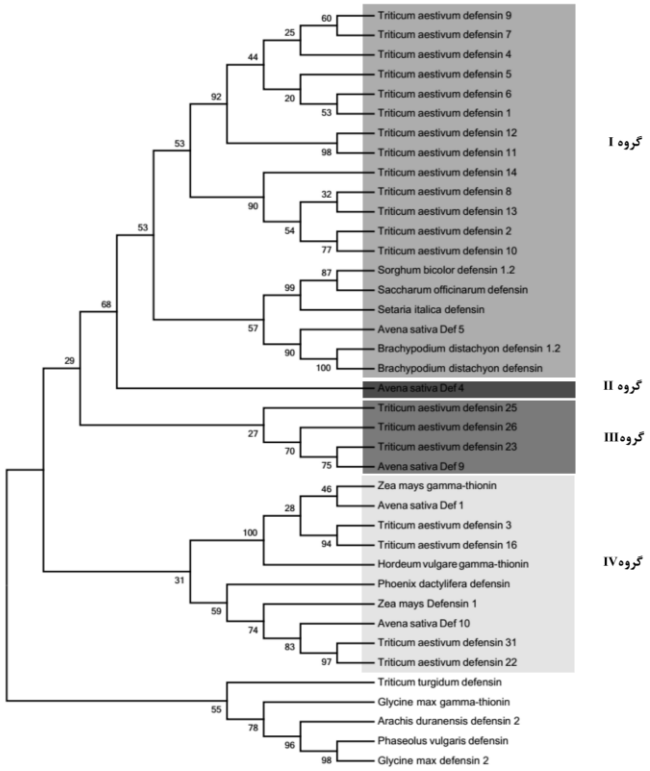
جدول ٤- پیش بینی خاصیت ضد میکروبی خانواده دیفنسین گیاه یولاف.

نام پپتید	ANN	DA	RF	SVM
Def 1	خیر	۰/۵۲٦	۰/٤۹۹۵	۰/۷۲۰
Def 4	بله	۰/۵۲۷	۰/٤۲۲	۰/۷۳۲
Def 5	بله	۰/۹۷۷	۰/۹۱۷	۰/۹۵۷
Def 9	بله	۰/۸۹۸	۰/۵۰۳	۰/۸۰٦
Def 10	بله	۰/۹٦۲	۰/۷۰٤۵	۰/۹۵۲

SVM، RF، ANN و DA الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی هستند.

احتمالات ≤ ۰/۵ به معنی تأیید خاصیت ضد میکروبی هستند.

✓ بله و خیر به‌ترتیب به معنی تأیید و عدم تأیید خاصیت ضد میکروبی است.



شکل ۳- درخت تکاملی رسم شده برای ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه یولاف

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

در این تحقیق، برای اولین بار، توالی کدکننده‌ی ۵ ژن از خانواده‌ی پپتیدهای ضد میکروبی دیفنسین، از گیاه یولاف شناسایی و جداسازی شد. در مراحل بعدی تحقیق، ویژگی‌های این ژن‌ها مانند طول توالی کدکننده، طول توالی پپتیدی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، محل تجمع سلولی، و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها بررسی شد.

نتیجه‌گیری کلی

توجه به‌عوامل ضد میکروبی و به‌خصوص پپتیدهای ضد میکروبی به دو دلیل نیاز به ایجاد روش‌های جدید در محافظت از گیاهان و همچنین نیاز به عوامل ضد میکروبی جدید در پزشکی، در سال‌های اخیر به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. پپتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان گروهی از بهترین نامزدهای احتمالی، می‌توانند نیاز بخش‌های کشاورزی و پزشکی را به ترکیبات ضد میکروبی جدید، از طریق روش‌های مختلف بیوتکنولوژی پاسخ دهند. نتایج پژوهش حاضر، وجود خانواده‌ی چند ژنی دیفنسین را در گیاه یولاف نشان داد. در مجموع نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که، ژن‌های خانواده دیفنسین در گیاه یولاف مانند دیگر دیفنسین‌های گیاهی، هم در سطح ژنی و هم پروتئینی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابهی از خود نشان می‌دهند. با توجه به نقش مهم این ژن‌ها در فرآیندهای محافظتی گیاهان و پاسخ آن‌ها به تنش‌های محیطی، با جداسازی، دستورزی ژنتیکی و انتقال این ژن‌ها می‌توان باعث افزایش مقاومت گیاهان به‌عوامل پاتوژن و بهبود پاسخ‌های احتمالی گیاهان به تنش‌های محیطی شد. همچنین، با بیان و خالص‌سازی این گروه از پپتیدهای ضد میکروبی در سیستم‌های مختلف بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی، می‌توان از آن‌ها در پزشکی و دامپزشکی به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در مقابله با پاتوژن‌های انسانی و دامی استفاده کرد.

منابع

Aerts A, François I, Cammue B, Thevissen K (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cellular and Molecular Life Sciences 65:2069-2079.

Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe W A, Jiang H, Feng G (2014) Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. Cancer Informatics: 67-83.

Castro M S, Fontes W (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. Protein and Peptide Letters 12:11-16.

Chew W L, Tabebordbar M, Cheng J K, Mali P, Wu E Y, Ng A H, Zhu K, Wagers A J, Church G M (2016) A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. Nature Methods 13: 868.

Cools T L, Struyfs C, Cammue B P, Thevissen K (2017) Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. Future Microbiology 12: 441-454.

Elsbach P (2003) What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? Journal of Clinical Investigation 111: 1643.

Ferrè F, Clote P (2006) DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. Nucleic Acids Research 34: W182-W185.

Finn R D, Coggill P, Eberhardt R Y, Eddy S R, Mistry J, Mitchell A L, Potter S C, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Research 44: D279-D285.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S e, Wilkins M R, Appel R D, Bairoch A, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer.

Gazza L, Galassi E, Ciccoritti R, Cacciatori P, Pogna N E (2016) Qualitative traits of perennial wheat lines derived from different Thinopyrum species. Genetic Resources and Crop Evolution 63: 209-219.

Gill R W, Sanseau P (2000) Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). Biotechnology Annual Review 5: 25-44.

Goyal R K, Mattoo A K, 2016. Plant Antimicrobial Peptides. Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents. Springer.

Guruprasad K, Reddy B B, Pandit M W (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering, Design and Selection 4: 155-161.

Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz M T (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. Biotechnology Advances 33: 1005-1023.

Hoskin D W, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1778: 357-375.

Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The Journal of Biochemistry 88: 1895-1898.

Janssen B J, Schirra H J, Lay F T, Anderson M A, Craik D J (2003) Structure of Petunia hybrida defensin 1, a novel

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]

plant defensin with five disulfide bonds. Biochemistry 42: 8214-8222.
Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30: 1236-1240.
Lacerda A F, Vasconcelos É A, Pelegrini P B, de Sa M F G (2014) Antifungal defensins and their role in plant defense. Frontiers in Microbiology 5.
Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, Lu S, Chitsaz F, Geer L Y, Geer R C, He J, Gwadz M, Hurwitz D I (2014) CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Research 43: D222-D226.
Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A (2014) Plant antimicrobial peptides. Folia microbiologica 59: 181.
Nielsen H (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. Protein Function Prediction: Methods and Protocols 1611: 59-73.
Nirmalakumari A, Sellammal R, Thamotharan G, Ezhilarasi T, Ravikesavan R (2013) Trait association and path analysis for grain yield in oat in the western zone of Tamil Nadu. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR) 3: 309-316.
Patr´ ıcia B. Pelegrini O L F (2005) Plant -thionins: Novel insights on the mechanism ofaction of a multi-functional class of defense proteins. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 37.
Periwal V, Scaria V (2014) Bioinformatics Review. Bioinformatics pp: 1-9.
Pradniwat P, Rojnuckarin P (2014) Snake venom thrombin-like enzymes. Toxin Reviews 33: 16-22.
Ramamoorthy V, Zhao X, Snyder A K, Xu J R, Shah D M (2007) Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in Fusarium graminearum. Cellular Microbiology 9: 1491-1506.
Sagaram U S, Kaur J, Shah D, 2012. Antifungal plant defensins: structure-activity relationships, modes of action, and biotech applications. Small Wonders: Peptides for Disease Control. ACS Publications.
Sels J, Mathys J, De Coninck B M, Cammue B P, De Bolle M F (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46: 941-950.
Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
Thomma B P, Cammue B P, Thevissen K (2002) Plant defensins. Planta 216: 193-202.
Valente A P, de Paula V S, Almeida F C (2013) Revealing the properties of plant defensins through dynamics. Molecules 18: 11311-11326.
Van der Weerden N L, Anderson M A (2013) Plant defensins: common fold, multiple functions. Fungal Biology Reviews 26: 121-131.
Vriens K, Cammue B, Thevissen K (2014) Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. Molecules 19: 12280-12303.
Waghu F H, Gopi L, Barai R S, Ramteke P, Nizami B, Idicula-Thomas S (2014) CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. Nucleic acids research 42: D1154-D1158.
Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415: 389-395.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.5.8]