

بررسی بیوانفورماتیکی RIP ها جهت شناسایی مناسبترین RIP برای تولید پروتئینی با خاصیت بیولوژیکی

۱- فاطمه بیکدلی ۲- مجتبی رنجبر ۳- فاطمه خاکدان ۴- داریوش غلامی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه

تخصصی فناوریهای نوین آمل

۲- دانشیار گروه زیست شناسی میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوریهای

نوین آمل

۳- استادیار گروه زیست شناسی، پردیس فرزاتگان، دانشگاه سمنان

۴- استادیار گروه زیست شناسی میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوریهای

نوین آمل

Email: fateme.bikdeli@gmail.com (نویسنده اول)

Email: ranjbarf@ausmt.ac.ir (نویسنده دوم)

چکیده

پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریپوزوم (RIPs) آنزیم‌هایی با فعالیت N- گلیکوزیدازی و مهارکننده سنتز پروتئین می‌باشند. برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب RIP توسط رهیافت‌های مختلف مهندسی ژنتیک باید ژن کدکننده این پروتئین‌ها از نظر ساختاری، تکاملی، و پارامترهای مختلف بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج نشان داد بیشترین پایداری پروتئین‌های این خانواده مربوط به گیاه *Chenopodium album* با شاخص ناپایداری ۱۴/۷۴ می‌باشد. طبق بررسی رابطه‌ی تکاملی، این پروتئین‌ها به دو کلاستر اصلی تقسیم می‌شوند و نتایج هم‌ردیفی در گیاه *Spinacia oleracea* بیشترین شباهت را نشان داد. ساختار دوم پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریپوزوم از راندوم کوئل و مارپیچ آلفای بیشتری تشکیل شده است.

کلمات کلیدی: کاربردهای بیولوژیکی، شاخص ناپایداری، آمارانتین، مهارکننده سنتز پروتئین

۱. مقدمه و هدف

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در قرن بیستم است و با تداوم و افزایش شیوع در قرن بیست و یکم گسترش می‌یابد. وضعیت به قدری نگران‌کننده است که از هر چهار نفر یک نفر در معرض خطر ابتلا به سرطان است. کشور هند سالانه بیش از ۱۱ میلیون مورد جدید سرطان را ثبت می‌کند، این در حالی است که این رقم در سراسر جهان بیش از ۱۴ میلیون نفر است. ما دائماً در معرض انواع مختلفی از عوامل ایجادکننده سرطان هستیم که به‌عنوان سرطان‌زا شناخته می‌شوند (۱). به‌طور کلی سرطان رشد غیر طبیعی سلول‌هایی است که توانایی توقف رشد خود را از دست داده اند. جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی به‌عنوان روش‌های مرسوم برای درمان سرطان استفاده می‌شوند. پرتودرمانی یک روش موضعی است که در درمان سرطان استفاده می‌شود. در چند سال اخیر به‌منظور دستیابی به اثربخشی درمان سرطان، تحقیقات بر روی ترکیبات با منشأ طبیعی از جمله ترکیبات گیاهی سوق داده شده است (۲). از جمله این ترکیبات پروتئین‌های غیرفعال کننده‌ی ریبوزوم (RIPs) است که فعالیت RNA ریبوزومی N-گلیکوزیداز را نشان می‌دهند و با جدا کردن RNA ریبوزومی ۲۸ S زیر واحد بزرگ ۶۰ S ریبوزوم‌های یوکاریوتی، مانع سنتز پرتئین در حالت غیرقابل برگشت می‌شود (۳). مطالعات قبلی نشان داده‌است که RIP ها فعالیت مختلفی از جمله فعالیت ضدتوموری، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی با طیف گسترده از خود نشان می‌دهد (۴). برای تولید پروتئین با خاصیت عملکردی بالا توسط میزبان‌های مختلف در مهندسی ژنتیک عوامل مختلفی نقش دارد که طی آن باید ویژگی‌های ساختاری، بیوشیمیایی و تکاملی ژن بررسی شود. هدف از این مطالعه آنالیزهای بیوانفورماتیکی پروتئین های دارای خاصیت بیولوژیکی به منظور تعیین ساختار دوم، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک، حضور یا عدم حضور پیوند دی سولفیدی و بررسی روابط تکاملی در گیاهانی از جمله *Beta vulgaris*, *Amaranthus tricolor*, *Amaranthus viridis*, *Beta vulgaris subsp. Vulgaris*, *Daucus*, *Spinacia oleracea*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium album vulgaris subsp. Vulgaris* می‌باشد.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

طبق بررسی‌هایی که بر روی RIP‌های موجود در گیاهان صورت گرفته، این پروتئین‌ها بر اساس خصوصیات فیزیکی به سه نوع اصلی نوع I و II و III تقسیم می‌شوند. RIP‌های نوع I که آنزیم‌های تک واحدی با وزن تقریباً ۳۰ کیلو دالتون و با فعالیت N-گلیکوزیدازی هستند و همچنین فراوان‌ترین نوع RIP‌های موجود در طبیعت‌اند. RIP‌های نوع II، شامل دو دمین متفاوت هستند، یک زنجیره A فعال ۳۰ کیلو دالتونی با فعالیت N-گلیکوزیدازی و دمین دیگر شامل یک زنجیره B با وزن حدود ۳۵ کیلو دالتون است که با خاصیت لکتینی امکان تسهیل جذب زنجیره A به داخل سلول میزبان را فراهم می‌کند. این دو زنجیره توسط یک پیوند دی‌سولفیدی بصورت کووالان بهم متصل می‌شوند. RIP‌های نوع III نیز دارای زنجیره A فعال ۳۰ کیلو دالتونی با فعالیت N-گلیکوزیدازی شناخته شده در RIP است و با یک دامنه C ترمینال عملکردی ناشناخته ترکیب شده است. این RIP ها فقط از جو و ذرت مشخص شده اند و در مقایسه با RIP های نوع I یا نوع II بسیار کمتر هستند (۴).

طی بررسی‌های گسترده‌ای که در این باره صورت گرفته است، RIP‌ها دارای فعالیت N-گلیکوزیدازی هستند که ریبوزوم‌ها را غیرفعال می‌کند و سنتز پروتئین را به طور غیرقابل برگشتی مهار می‌کند. علاوه بر فعالیت کلاسیک آن به صورت RNA N-glycosidase، RIPs کار برش آدنین از DNA یا دم پلی A، RNA را انجام می‌دهند. به علاوه

فعالیت polyadenosine glycosidase برای بسیاری از آنها گزارش شده است و این عملکرد RIPها آنها را به سمومی با خاصیت ضدسرطانی، ضدباکتری و ضدویروسی تبدیل کرده است (۵).
وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ برای اولین بار بیان عملکردی یک سم گیاهی از گروه RIPها با عنوان Abrin-a A chain (ABRaA) جدسازی شده از گیاه *Abrus precatorius* با فعالیت N-گلیکوزیدازی 28S rRNA یوکاریوتی در میزبان/شرشیا کلای را مورد بررسی قرار دادند.

مطالعه روی و همکاران در ۲۰۰۶ نشان داد که برای کلون کردن و خالص سازی RIP موجود در برگ گیاه *Amaranthus tricolor* شناسایی ژن کدکننده پروتئین لازم است و به این منظور به بررسی خصوصیات ژنتیکی و مقایسه‌ی روابط تکاملی این پروتئین و سایر RIPها پرداخته شد (۶). مطالعات برتولوتی و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی پروتئین بوگانین به عنوان یک RIP نشان داد که برای سنتز ایمونوتوکسین با خاصیت بیولوژیکی و عملکرد هدفدار فقط بر روی سلول‌های سرطانی لازم است که این پروتئین از نظر ساختاری و خصوصیات بیوشیمیایی و پایداری شناسایی شود (۷).

۳. مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۳ توالی آمینواسیدی پروتئین غیرفعال کننده‌ی ریبوزوم از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت و به فرمت FASTA ذخیره شد. آنالیز تجزیه‌ی کلاستر توالی‌های استخراج شده با نرم افزار MEGA6 انجام شد به طوری که در طی آن توالی‌ها با روش ClustalW هم‌ردیف شدند و سپس درخت فیلوژنتیکی براساس neighbor-joining رسم شد و سپس از طریق محاسبه فاصله ژنتیکی به بررسی روابط فیلوژنتیکی پرداخته شد. هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی گیاهان مورد مطالعه از طریق نرم افزار MegaAlign انجام شد.

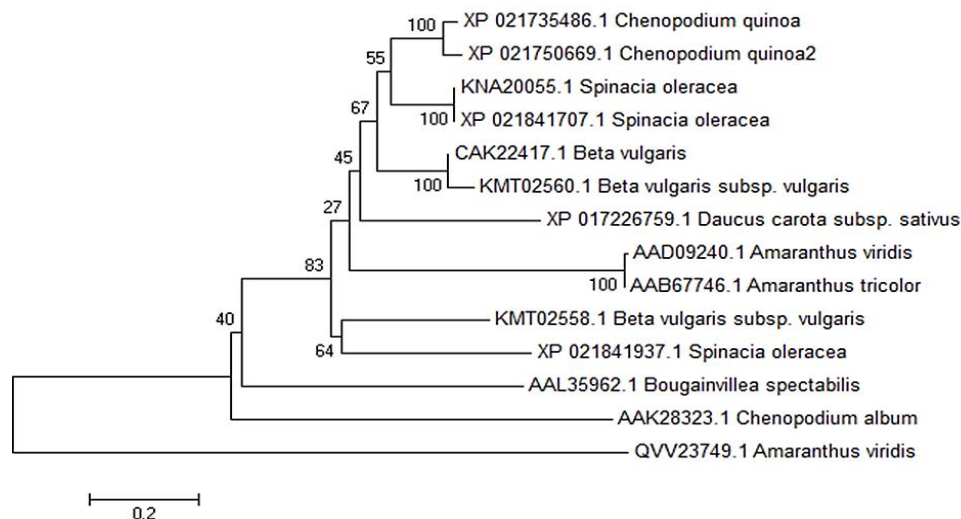
آنالیزهای مقایسه‌ای و بیوانفورماتیکی توسط نرم‌افزارهای برخط در وب سایت expasy توسط نرم‌افزار protparam محاسبه شد و طی آن خصوصیات فیزیکیوشیمیایی پروتئین‌ها نظیر تعداد آمینواسیدها، وزن مولکولی، نقطه‌ی ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری و شاخص آلیفاتیک بررسی شد. برای تعیین ساختار دوم پروتئین‌ها به منظور بررسی درصد آلفا هلیکس، مارپیچ بتا، سوپر کوئل از وب سایت sopma استفاده شد. هم چنین برای بررسی حضور یا عدم حضور پیوند دی سولفیدی در پروتئین‌ها از وب سایت برخط softberry استفاده شد (۸).

۴. نتایج و بحث

۴.۱ آنالیز فیلوژنتیکی و هم‌ردیفی RIPها

درخت فیلوژنتیکی برای تجزیه و تحلیل رابطه ژنتیکی بین RIPهای گیاهان مختلف رسم شد و در ادامه به بررسی رابطه تکاملی پروتئین آمارانتین (AAD09240.1) در گیاه *A. viridis* و سایر RIPها مختلف پرداخته شد. نتایج حاصل از این بررسی

بیانگر این است که دو کلاستر اصلی در بین RIPها ایجاد شد و AAK28323.1 در یک کلاستر جدا قرار گرفت و سایر RIPها در یک کلاستر دیگر جمع آوری شدند (شکل ۱).



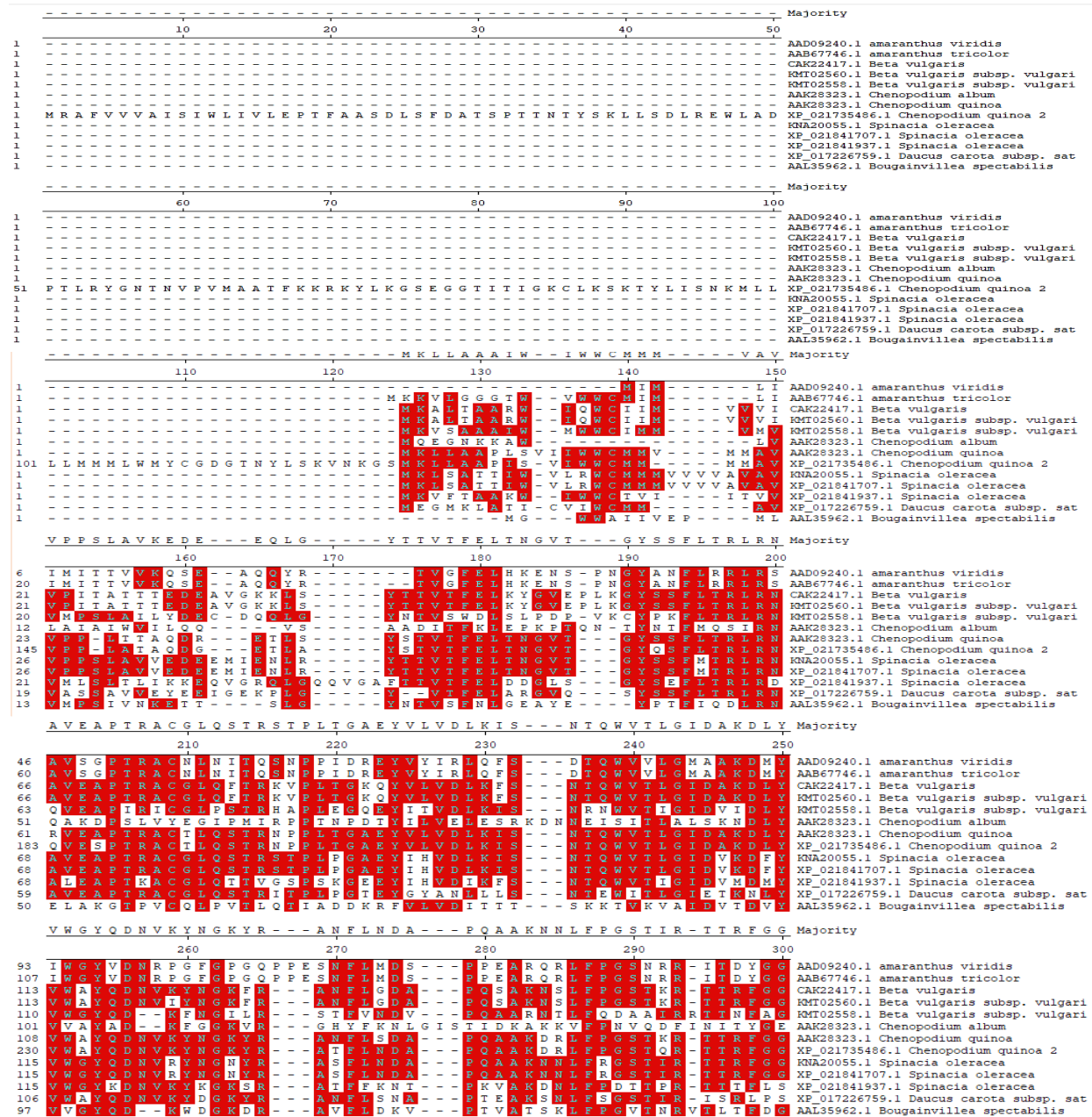
شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئین RIP در گیاهان مختلف

بررسی دقیق‌تر نشان داد پروتئین AAB67746.1 رابطه‌ی ژنتیکی نزدیک‌تری با پروتئین آمارانتین (AAD09240.1) دارد به طوری که فاصله‌ی ژنتیکی بین آنها ۰/۰۰۵ می‌باشد (شکل ۲).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. AAD09240.1 Amaranthus viridis														
2. AAB67746.1 Amaranthus tricolor	0.005													
3. CAK22417.1 Beta vulgaris	0.677	0.666												
4. KMT02560.1 Beta vulgaris subsp. vulgaris	0.710	0.699	0.045											
5. KMT02558.1 Beta vulgaris subsp. vulgaris	0.892	0.879	0.518	0.575										
6. AAK28323.1 Chenopodium album	1.278	1.297	1.099	1.149	1.297									
7. XP 021735486.1 Chenopodium quinoa	0.710	0.699	0.247	0.297	0.491	1.115								
8. XP 021750669.1 Chenopodium quinoa2	0.732	0.721	0.254	0.304	0.465	1.099	0.062							
9. KNA20055.1 Spinacia oleracea	0.710	0.699	0.304	0.342	0.473	1.149	0.233	0.247						
10. XP 021841707.1 Spinacia oleracea	0.710	0.699	0.304	0.342	0.473	1.149	0.233	0.247	0.000					
11. XP 021841937.1 Spinacia oleracea	0.961	0.947	0.575	0.645	0.614	1.258	0.614	0.604	0.565	0.565				
12. XP 017226759.1 Daucus carota subsp. sativus	0.866	0.853	0.500	0.565	0.688	1.239	0.491	0.537	0.465	0.465	0.732			
13. AAL35962.1 Bougainvillea spectabilis	1.239	1.258	0.905	0.933	0.961	1.202	0.919	0.947	0.947	0.947	0.947	1.066		
14. QVV23749.1 Amaranthus viridis	2.074	2.074	1.877	1.842	1.877	2.214	2.118	2.118	1.951	1.951	2.214	2.031	2.074	

شکل ۲. فاصله ژنتیکی بین پروتئین RIP در گونه‌های گیاهی

نتایج حاصل از همردیفی این RIP ها نشان داد که توالی آنها در ۲۳ اسیدآمینیه هم ردیف هستند و در این میان ۱۷ اسیدآمینیه از بین اسیدآمینیه‌های مشترک، آب‌گریزند (شکل ۳). در طی این هم ردیفی بررسی دقیق‌تر بر روی AAD09240.1 و AAB67746.1 نشان داد که فقط یک جایگزینی در طی تکامل صورت گرفته و اسید آمینه‌ی متیونین در AAB67746.1 به جای اسیدآمینیه ی ایزولوسین در AAD09240.1 قرار گرفته است. اسید آمینه‌ی متیونین به دلیل داشتن گوگرد توانایی شرکت در پیوند دی سولفیدی دارد.



NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI Majority					
310	320	330	340	350	
139	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	139	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	139	AAD09240.1 amaranthus viridis
153	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	153	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	153	AAB67746.1 amaranthus tricolor
156	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	156	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	156	CAK22417.1 Beta vulgaris
156	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	156	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	156	KMT02560.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
152	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	152	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	152	KMT02558.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
146	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	146	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	146	AAK28323.1 Chenopodium album
151	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	151	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	151	AAK28323.1 Chenopodium quinoa
273	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	273	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	273	XP_021735486.1 Chenopodium quinoa 2
158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	KNA20055.1 Spinacia oleracea
158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	XP_021841707.1 Spinacia oleracea
158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	158	XP_021841937.1 Spinacia oleracea
149	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	149	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	149	XP_017226759.1 Daucus carota subsp. sat
139	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	139	NYNSLEPAAAGVTRKNNLVLGLIQNLDDGAIRSVYVGKQSEELNKGNAEARFFLLI	139	AAL35962.1 Bougainvillea spectabilis
A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA Majority					
189	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	189	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	189	AAD09240.1 amaranthus viridis
203	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	203	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	203	AAB67746.1 amaranthus tricolor
206	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	206	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	206	CAK22417.1 Beta vulgaris
206	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	206	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	206	KMT02560.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
196	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	196	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	196	KMT02558.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
201	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	201	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	201	AAK28323.1 Chenopodium album
323	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	323	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	323	AAK28323.1 Chenopodium quinoa
208	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	208	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	208	XP_021735486.1 Chenopodium quinoa 2
208	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	208	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	208	KNA20055.1 Spinacia oleracea
207	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	207	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	207	XP_021841707.1 Spinacia oleracea
199	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	199	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	199	XP_021841937.1 Spinacia oleracea
185	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	185	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	185	XP_017226759.1 Daucus carota subsp. sat
199	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	199	A IQMVAAEAAARFKFMEEQGIIVRGDNTDSFK--LKMVAFONDWDPISIAIHNA	199	AAL35962.1 Bougainvillea spectabilis
E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S Majority					
235	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	235	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	235	AAD09240.1 amaranthus viridis
249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	AAB67746.1 amaranthus tricolor
254	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	254	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	254	CAK22417.1 Beta vulgaris
237	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	237	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	237	KMT02560.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	KMT02558.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
242	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	242	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	242	AAK28323.1 Chenopodium album
249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	249	AAK28323.1 Chenopodium quinoa
371	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	371	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	371	XP_021735486.1 Chenopodium quinoa 2
256	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	256	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	256	KNA20055.1 Spinacia oleracea
256	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	256	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	256	XP_021841707.1 Spinacia oleracea
255	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	255	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	255	XP_021841937.1 Spinacia oleracea
247	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	247	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	247	XP_017226759.1 Daucus carota subsp. sat
235	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	235	E AATPKCTITITPTLVISNIDYR-QEVNNVDEIKNDMGLLLKYK---S-T-S	235	AAL35962.1 Bougainvillea spectabilis
- I - - S - - I - D D D - - - - - Majority					
270	- I - - S - - I - D D D - - - - -	270	- I - - S - - I - D D D - - - - -	270	AAD09240.1 amaranthus viridis
284	- I - - S - - I - D D D - - - - -	284	- I - - S - - I - D D D - - - - -	284	AAB67746.1 amaranthus tricolor
300	VVNSI--LADDDGGSSLEFLES AVL	300	VVNSI--LADDDGGSSLEFLES AVL	300	CAK22417.1 Beta vulgaris
239	VVNSI--LADDDGGSSLEFLES AVL	239	VVNSI--LADDDGGSSLEFLES AVL	239	KMT02560.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
295	NSNMADNDIDVGV--LAVLES AV M	295	NSNMADNDIDVGV--LAVLES AV M	295	KMT02558.1 Beta vulgaris subsp. vulgari
279	NSNMADNDIDVGV--LAVLES AV M	279	NSNMADNDIDVGV--LAVLES AV M	279	AAK28323.1 Chenopodium album
295	VIGSS--ILDDD--I	295	VIGSS--ILDDD--I	295	AAK28323.1 Chenopodium quinoa
417	VIGSS--ILDDD--I	417	VIGSS--ILDDD--I	417	XP_021735486.1 Chenopodium quinoa 2
302	SIAS--ILDDD--EFLES ALI	302	SIAS--ILDDD--EFLES ALI	302	KNA20055.1 Spinacia oleracea
302	SIAS--ILDDD--EFLES ALI	302	SIAS--ILDDD--EFLES ALI	302	XP_021841707.1 Spinacia oleracea
299	SISND DGV DND--QNLHFS EL	299	SISND DGV DND--QNLHFS EL	299	XP_021841937.1 Spinacia oleracea
288	SISND DGV DND--QNLHFS EL	288	SISND DGV DND--QNLHFS EL	288	XP_017226759.1 Daucus carota subsp. sat
282	TMIRSAIVEDLDGDELEIPNIA	282	TMIRSAIVEDLDGDELEIPNIA	282	AAL35962.1 Bougainvillea spectabilis

شکل ۳. هم ردیفی چندگانه توالی آمینواسیدی RIP ها

۴.۲ آنالیز ساختار فیزیکی شیمیایی RIP ها

بررسی ساختار فیزیکی شیمیایی پروتئین‌ها نشان می‌دهد که تعداد اسید آمینه‌ها در این پروتئین‌ها در محدوده‌ی ۲۷۰ تا ۴۲۷ و وزن مولکولی ۲۶ تا ۴۷ کیلو دالتون است. نقطه‌ی ایزوالکتریک نقطه‌ای از pH است که در آن بار الکتریکی برابر صفر است. این مطلب در خالص سازی پروتئین اهمیت دارد. به طوری که انحلال پروتئین‌ها در این pH در کمترین حد است. علاوه بر آن پویایی این pH در سیستم الکتروفوکسینگ برابر صفر است. اسیدی ترین RIP، پروتئین AAL35962.1 با نقطه‌ی ایزوالکتریک ۵/۱۶ می‌باشد و قلیایی ترین آنها پروتئین AAD09240.1 با نقطه‌ی ایزوالکتریک ۹/۷۶ است.

شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیانگر میزان پایداری آنها در لوله‌ی آزمایش است. به طوری که اگر این عدد پایین‌تر از ۴۰ باشد به عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته می‌شود، پایدارترین پروتئین AAK28323.1 می‌باشد و شاخص ناپایداری آن ۱۴/۷۴ است.

بیشترین شاخص ناپایداری هم مربوط به پروتئین AAD09240.1 با شاخص ناپایداری ۴۲/۱۶ است. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به عنوان میزان نسبی زنجیره‌های آلیفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) یک پروتئین تعریف می‌شود و ممکن است به عنوان یک فاکتور مثبت در جهت افزایش مقاومت به گرما در پروتئین‌های کروی در نظر گرفته شود، که مشاهده شد در اینجا بیشترین شاخص آلیفاتیک مربوط به پروتئین XP_017226759.1 با عدد ۹۱/۴۹ است.

شاخص GRAVY بیانگر حلالیت پروتئین است که هر چه این شاخص منفی‌تر باشد پروتئین آب‌گریزتر است و آنالیز ما نشان داد پروتئین AAD09240.1 با عدد ۰/۴۳۴- آب‌گریزترین و پروتئین AAL35962.1 با عدد ۰/۰۳۷- آب دوست‌ترین پروتئین می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. شاخص‌های مورد بررسی RIP ها

Family	Species	RIPs name	Amino acid residues	Mw (kDa)	pI	(Asp + Glu)	(Arg + Lys)	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Protein_id
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i>	amaranthin	270	30	9.76	21	30	42.16	77.37	-0.434	AAD09240.1
	<i>Amaranthus tricolor</i>	amarandin-S	284	32	9.70	21	32	41.16	75.60	-0.407	AAB67746.1
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	RIP	321	35	9.49	29	41	24.36	87.51	-0.141	CAK22417.1
	<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	hypothetical protein	239	26	9.63	20	31	23.51	85.51	-0.141	KMT02560.1
	<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	hypothetical protein	314	35	5.66	36	34	33.18	91.27	-0.139	KMT02558.1
	<i>Chenopodium album</i>	CAP30B	279	31	9.48	24	34	14.74	91.22	-0.263	AAK28323.1
	<i>Chenopodium quinoa</i>	antiviral protein MAP-like	305	34	8.97	31	36	26.65	86.98	-0.247	XP_021735486.1
	<i>Chenopodium quinoa</i>	antiviral protein MAP-like	427	47	9.10	40	49	29.65	88.88	-0.142	XP_021750669.1
	<i>Spinacia oleracea</i>	hypothetical protein	319	35	5.88	36	34	33.50	88.06	-0.156	KNA20055.1

	<i>Spinacia oleracea</i>	antiviral protein MAP-like	318	35	6.23	35	34	33.97	86.79	-	XP_021841707.1
	<i>Spinacia oleracea</i>	antiviral protein MAP-like	318	35	7.59	39	40	24.90	85.47	0.146	XP_021841937.1
Apiaceae	<i>Daucus carota subsp. sativus</i>	RIP lychnin-like	288	32	8.20	32	34	34.15	91.49	0.185	XP_017226759.1
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	bouganin	305	34	5.16	38	32	27.47	99.31	0.037	AAL35962.1

۴.۳ آنالیز ساختار دوم RIP ها

آنالیز ساختار دوم RIP های نمونه های مورد مطالعه نشان داد ساختار دوم این پروتئین ها از راندوم کوئل و مارپیچ آلفا بیشتری تشکیل شده است (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج آنالیز ساختار دوم RIP ها

Plants	Accession no.	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
<i>A. viridis</i>	AAD09240.1	37.04%	17.14%	1.85%	43.70%
<i>A. tricolor</i>	AAB67746.1	38.03%	20.07%	2.11%	39.79%
<i>B. vulgaris</i>	CAK22417.1	37.69%	19.63%	2.18%	40.50%
<i>B. vulgaris subsp. Vulgaris</i>	KMT02560.1	33.05%	23.01%	2.93%	41.00%
	KMT02558.1	39.17%	17.83%	2.55%	40.45%
<i>Ch. album</i>	AAK28323.1	37.99%	20.07%	1.43%	40.50%
<i>Ch. quinoa</i>	XP_021735486.1	32.57%	22.04%	2.30%	43.09%
	XP_021750669.1	29.47%	26.00%	4.45%	39.81%
<i>S. oleracea</i>	KNA20055.1	37.62%	21.00%	2.82%	38.56%
	XP_021841707.1	34.91%	21.07%	2.83%	41.19%
	XP_021841937.1	34.59%	25.47%	2.83%	37.11%
<i>D. carota subsp. sativus</i>	XP_017226759.1	39.24%	18.06%	2.43%	40.28%
<i>B. spectabilis</i>	AAL35962.1	36.39%	22.30%	4.26%	37.05%

۴.۴ بررسی حضور یا عدم حضور پیوند دی سولفیدی

در طی این بررسی‌ها مشاهده شد که در توالی آمینواسیدی برخی از این پروتئین‌ها، اسیدآمینه‌ی سیستئین وجود دارد اما هیچکدام در پیوند دی سولفیدی شرکت نکردند. نتایج حاصل از تحقیقات توماس و همکاران در رابطه با RIP ها نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها از نظر فیلوژنتیکی با هم مرتبط هستند و RIP های خانواده‌های نزدیک، از نظر توالی اسیدآمینه همسانی بالایی دارند (۹). طبق بررسی رابطه‌ی تکاملی، این پروتئین‌ها به دو کلاستر اصلی تقسیم می‌شوند و نتایج هم‌ردیفی نشان داد دو پروتئین با شماره‌ی دسترسی KNA20055.1 و XP_021841707.1 در گیاه *Spinacia oleracea* بیشترین شباهت را با هم دارند به طوری که فاصله‌ی ژنتیکی بین آنها صفر می‌باشد و از نظر توالی اسیدآمینه‌ای هم به یکدیگر نزدیک‌اند. نتایج حاصل از تحقیقات حسینی و همکاران نشان می‌دهد که در ساختار دوم این پروتئین‌ها به ترتیب ماریچ آلفا، راندوم کوئل، صفحات بتا و دور بتا دارای بیشترین مقدار بود (۱۰). برخلاف نتایج آنها مطالعات ما نشان می‌دهد که در ساختار RIPها راندوم کوئل بیشتر از ماریچ آلفا بوده‌است. اخیراً در مهندسی ژنتیک، برای تولید پروتئینی با کاربرد بیولوژیکی مطلوب به بررسی خصوصیات آنها اعم از پایداری، شاخص آلیفاتیک و شاخص GRAVY پرداخته می‌شود (۱۰) و (۱۱). طبق بررسی انجام شده، پروتئین با شماره‌ی دسترسی AAK28323.1 پایدارترین RIP در بین RIP های مورد مطالعه می‌باشد.

۵. پیشنهادات

مطالعات نشان می‌دهد پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم دارای فعالیت ضدسرطانی، ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشند. بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک کاندید داروی جدید برای درمان سرطان و از بین بردن ویروس و باکتری مطرح گردد. مطالعات نشان می‌دهد این پروتئین در گیاهان مختلف وجود دارد. بنابراین قبل از جداسازی ژن مورد نظر از گیاهان موجود و بیان آن در میزبان مناسب باید آنالیزهای بیوانفورماتیکی به‌منظور بررسی خصوصیات ساختاری و فیزیکوشیمیایی گیاهان مختلف انجام گیرد. مطالعه ما نشان داد که این پروتئین در گونه‌های مختلف از نظر خصوصیات ذکر شده با هم فرق دارد و باید ابتدا قبل از شروع همسانه سازی و بیان، بهترین گیاه را بر اساس صفاتی نظیر پایداری، نقطه ایزوالکتریک، پیوند دی سولفیدی، شاخص آلیفاتیک و غیره مورد بررسی قرار گیرند.

۶. منابع

1. Roy, P. S., & Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*, 53(3), 441.
2. Ramirez, L. Y., Huestis, S. E., Yap, T. Y., Zyzanski, S., Drotar, D., & Kodish, E. (2009). Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents?. *Pediatric blood & cancer*, 52(4), 497-502.
3. Rust, A., Partridge, L. J., Davletov, B., & Hautbergue, G. M. (2017). The use of plant-derived ribosome inactivating proteins in immunotoxin development: Past, present and future generations. *Toxins*, 9(11), 344.

4. Zhu, F., Zhou, Y. K., Ji, Z. L., & Chen, X. R. (2018). The plant ribosome-inactivating proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Frontiers in Plant Science*, 9, 146.
5. Zhou, X. X., Ji, F., Zhao, J. L., Cheng, L. F., & Xu, C. F. (2010). Anti-cancer activity of anti-p185HER-2 ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 25(7), 1266-1275.
6. Gadadhar, S., & Karande, A. A. (2013). Abrin immunotoxin: targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. *PloS one*, 8(3), e58304.
7. Bortolotti, M., Bolognesi, A., & Polito, L. (2018). Bouganin, an attractive weapon for immunotoxins. *Toxins*, 10(8), 323.
8. Khakdan, F., Alizadeh, H., & Ranjbar, M. (2018). Molecular cloning, functional characterization and expression of a drought inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (ObPAL) from *Ocimum basilicum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 464-472.
9. Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., & Stirpe, F. (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini reviews in medicinal*
10. Hosseini, M., & Saidi, A. (2019). Phylogenetic and structural study of plant Polyamine Oxidases. *Crop Biotech*, 8, 19-36.
11. Habibzadeh, M. J., Dorani, E., Ziaratnia, S. M., & Valizadeh, M. (2020). Cloning and Bioinformatics Investigation on CCD4a and CCD4b Genes from Iranian Saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron agronomy and technology*, 8(2), 211-229.