



Cloning, Sequencing, and Bioinformatics Study of CYP81Q1 Gene of Iranian Sesame (*Seamum indicum* L.) Cultivar

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hemati S.¹ MSc,

Dehghan Nayeri F* PhD

How to cite this article

Hemati S, Dehghan Nayeri F. Cloning, Sequencing, and Bioinformatics Study of CYP81Q1 Gene of Iranian Sesame (*Seamum indicum* L.) Cultivar. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):277-284.

*Agricultural Biotechnology Department, Agricultural & Natural Sciences Faculty, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

¹Agricultural Biotechnology Department, Agricultural & Natural Sciences Faculty, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Correspondence

Address: Agricultural Biotechnology Department, Agricultural & Natural Sciences Faculty, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Postal Code: 3414896818
Phone: +98 (28) 33901819
Fax: +98 (21) 33780074
nayeri@ut.ac.ir

Article History

Received: November 7, 2016

Accepted: July 23, 2017

ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims Antioxidants in sesame oil, including tocopherols and sesamin have greatly increased the shelf life of it against heat. Following the increase in the expression of the cytochrome P450 enzyme encoder (*CYP81Q1*), the content of sesame is increased in different stages of development of sesame seeds. The aim of this study was cloning, sequencing, and bioinformatics study of *CYP81Q1* gene of Iranian sesame (*Seamum indicum* L.) cultivar.

Materials & Methods In the present experimental research, DNA was extracted from leaves and stems of Karaj1 sesame cultivar and the target gene was amplified by PCR. Gene was cloned in binary vector pBI121 and confirmed by 3 methods, including enzymatic digestion, PCR, and sequencing. Then bioinformatics characterization of this gene was studied and the Ramachandran plot was drawn on the three-dimensional structure of the gene.

Findings Cloning was confirmed. DNA sequencing results confirmed the cloned segment. Molecular weight and predicted isoelectric point of the protein were 57021.3 Dalton and 8.46, respectively. The three-dimensional structure of the protein had a good stroke chain. The sequencing result of this gene showed a difference in the 23 nucleotides of this gene in sesame seeds of Karaj 1 (access number KP771974.1) with a reported sequence in the NCBI gene bank (access number AB194714.1), which resulted in the sequencing of the *CYP81Q1* gene in Iranian sesame (Karaj 1) at this database.

Conclusion Based on nucleotide sequencing, the target gene has 1521 base pairs, and differs from 23 nucleotides with the sample registered at the NCBI World Bank. This gene encodes a protein length of 506 amino acids. This protein is very similar with the registered protein in NCBI.

Keywords Sesame; Sesamin; Gene Cloning; Bioinformatics

CITATION LINKS

[1] An investigation of physical and chemical characteristics of seed in ten sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties [2] Oilseeds & vegetable oils [3] Effects of sesame oil on blood glucose and lipid profile in type II diabetic patients referring to the Yazd diabetes research center [4] The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis [5] Role of mammalian lignans in the prevention and treatment of prostate cancer [6] Formation of two methylenedioxy bridges by a *Sesamum* CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin [7] Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung [8] Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin [9] Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents [10] Identification of methanol-soluble compounds in sesame and evaluation of antioxidant potential of its lignans [11] Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (*Sesamum indicum* L.) [12] Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis--a review [13] Comparative effects of sesame seed lignan and flaxseed lignan in reducing the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen in athymic mice [14] Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction [15] Molecular cloning: A laboratory manual [16] Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [17] SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [18] Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds [19] Furanofuran lignan metabolism as a function of seed maturation in *Sesamum indicum*: Methylenedioxy bridge formation [20] Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture

همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیک ژن CYP81Q1 رقم ایرانی کنجد

صبیحه همتی MSc

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران

فاطمه دهقان‌نیری PhD

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران

چکیده

اهداف: آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن کنجد شامل توکوفرول‌ها و سزامین ماندگاری آن را در برابر حرارت بسیار افزایش داده است. به دنبال افزایش بیان ژن رمزکننده آنزیم سیتوکروم P450 (*CYP81Q1*)، محتوای سزامین در مراحل مختلف توسعه دانه کنجد افزایش می‌یابد. هدف این پژوهش همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیک ژن *CYP81Q1* رقم ایرانی کنجد بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، DNA کل از برگ و ساقه‌های گیاه کنجد رقم کرج ۱ استخراج و ژن هدف به وسیله PCR تکثیر شد. همسانه‌سازی ژن *CYP81Q1* در ناقل دوتایی pBI121 انجام شد و درستی همسانه‌سازی به سه روش هضم آنزیمی، PCR، توالی‌یابی نوکلئوتیدی و خصوصیات بیوانفورماتیک این ژن مورد بررسی قرار گرفت و نمودار رامچاندان مربوط به ساختار سه‌بعدی این ژن رسم شد.

یافته‌ها: درستی همسانه‌سازی تایید شد. نتایج توالی‌یابی DNA، صحت قطعه همسانه‌سازی شده را تایید نمود. وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب ۵۷۰۲۱/۳ دالتون و ۸/۴۶ بود. ساختار سه‌بعدی پروتئین دارای زنجیره استروکیمی خوبی بود. نتیجه توالی‌یابی این ژن تفاوت در ۲۳ نوکلئوتید این ژن در کنجد رقم کرج ۱ (شماره دسترسی KP771974.1) با توالی گزارش شده در بانک ژن NCBI (شماره دسترسی AB194714.1) را نشان داد که منجر به ثبت توالی ژن *CYP81Q1* در رقم ایرانی کنجد (کرج ۱) در این پایگاه شد.

نتیجه‌گیری: براساس توالی‌یابی نوکلئوتیدی، ژن هدف دارای ۱۵۲۱ جفت‌باز است و در ۲۳ نوکلئوتید با نمونه ثبت شده در بانک جهانی NCBI تفاوت دارد. این ژن، پروتئینی به طول ۵۰۶ اسیدآمینه را رمز می‌کند. پروتئین مورد نظر بسیار شبیه با پروتئین ثبت شده در پایگاه اطلاعات NCBI است.

کلیدواژه‌ها: کنجد، سزامین، همسانه‌سازی، بیوانفورماتیک

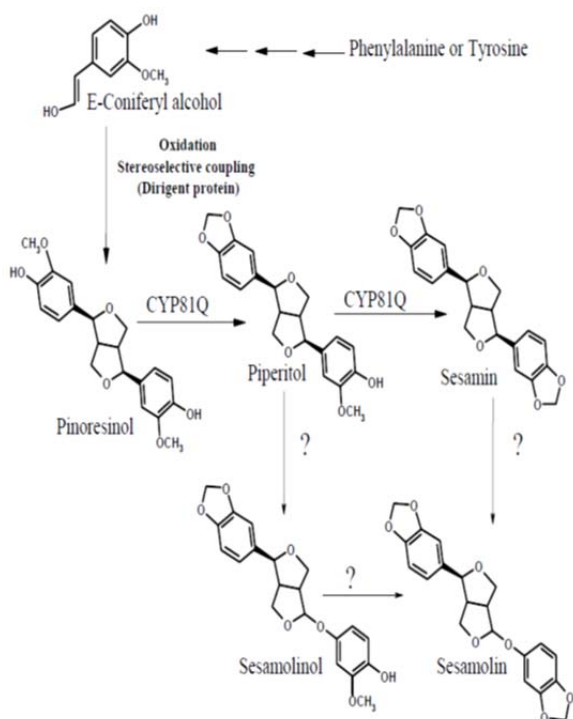
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱

نویسنده مسئول: nayeri@ut.ac.ir

سزامین مربوط بوده است که از نوع لیگنان هستند. مقدار ماده غیرصابونی روغن کنجد (حدود ۲٪) نسبت به سایر روغن‌های نباتی بیشتر بوده و مقدار سزامین موجود همواره بیشتر از مقدار سزامولین است. ارتباط مثبت و قابل ملاحظه‌ای بین مقدار روغن دانه و مقدار سزامین آن وجود داشته است [2, 5].

مسیر بیوسنتز فنیل‌پروپانویدها مسئول فراهم کردن پیش‌ماده‌های لازم برای سنتز لیگنین‌ها، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و برخی ترکیبات دیگر بوده و ترکیب کلی ایجاد شده زیر واحد سازنده لیگنان‌ها و لیگنین‌ها است. مسیر متابولیک فورفوران لیگنان‌های کنجد و تولید سزامین، اصلی‌ترین فورفوران لیگنان دانه کنجد تحت تاثیر آنزیم سیتوکروم P450 است (شکل ۱) [3, 6].



شکل ۱) مسیر متابولیک فورفوران لیگنان‌های کنجد

امروزه نام سیتوکروم P450 به عنوان نام اصلی خانواده بزرگ هموپروتئین‌ها یعنی پروتئین‌های دارای آهن شناخته شده است که آنها را به صورت مخفف CYP یا CYP450 هم نمایش می‌دهند [7, 8]. آنزیم سیتوکروم P450 موجود در کنجد، سنتز سزامین را طی دو مرحله از پینورزینول و پایپریتول و با تشکیل دو پل متیلن‌دی‌اکسی، کاتالیز می‌کند. به دنبال افزایش بیان ژن رمزکننده این آنزیم (*CYP81Q1*)، محتوای سزامین در مراحل مختلف توسعه دانه کنجد افزایش می‌یابد. این ماده اولین بار در سال ۱۸۹۰ جداسازی شده است [6]. سزامین دارای کاربردهای بالینی بسیاری شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد اکسیداتیوی و حفاظت از کبد در برابر اکسیداسیون الکل، چربی و رادیکال‌های اکسیژن، حفاظت از کبد در برابر تتراکلریدکربن و اتانول، اثر ضد التهابی، اثر ضد سرطانی، اثر ضد توموری و کاهش رشد تومور، اثر ضد فشار خون، اثر محافظت نورونی، اثر ضد موتازنی و پیشگیری از آسیب اکسیداتیو DNA، افزایش فعالیت ویتامین E، بازدارنده تولید سوپراکسید در عروق و القای نیتریک اسید، جلوگیری از پراکسیداسیون چربی، بهبود متابولیسم اسیدهای چرب و بهبود

کنجد یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که توسط انسان کشت می‌شود. از حدود ۲۰ گونه وحشی جنس سزاموم که در آسیا و آفریقا کشت می‌شود، گونه هندی (*Sesamum indicum* L.) از نظر اقتصادی ارزش بیشتری دارد [1]. شهرت روغن کنجد به خاطر مقاومت بالای آن در برابر اکسید شدن است [2]. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن کنجد شامل توکوفرول‌ها و سزامین، ماندگاری آن را در برابر حرارت در مقایسه با سایر روغن‌ها بسیار افزایش داده‌اند. مقاومت اکسیداتیو روغن کنجد در برابر حرارت ۱۱۰°C، ۱۷/۵ ساعت است که این روغن را در گروه روغن‌های با مقاومت بالا قرار می‌دهد. همچنین نقطه دود این روغن ۲۲۶°C است [3, 4]. روغن حاصل از دانه‌های کنجد مقدار زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده دارد که شامل ۴۶-۴۳٪ اسیداولئیک، ۴۲٪ اسیدلینولئیک، ۹٪ اسیدپالمیتیک و ۴٪ اسیداستئاریک است و به طور مشخصی با سایر روغن‌های نباتی از نظر بسیاری از خواص شیمیایی، بیولوژیک و فیزیولوژیک تفاوت دارد. بیشتر این خواص انحصاری به وجود ترکیبات غیرصابونی خاص این روغن شامل سزامول، سزامولین و

در پایان، کمیت و کیفیت DNA کل استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتر UVD3200 (Labomed؛ انگلستان) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

آغازگرهای اختصاصی براساس توالی ژن *CYP81Q1* گیاه کنجد در بانک اطلاعاتی NCBI (با شماره دسترسی AB194714.1) [6] با توالی

5'-GACGGATCCATGGAAGCTGAAATGCTATATTC-3'
(آغازگر رفت شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Bam*HI و توالی 5'-
5'-ACTGAGCTCTCAAACGTTGGAAACCTGACG-3' (آغازگر برگشت شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Sac*I طراحی و سنتز (Bioneer؛ کره جنوبی) شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از PCR مسترمیکس (Amplicon؛ دانمارک) حاوی ترکیبات دزوکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات (dNTP) ۱۰ میلی‌مولار، کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، تگ DNA پلیمرز ۵ واحد بر میکرولیتر، بافر 10x PCR، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر اختصاصی (رفت و برگشت) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی مدل TC512 (Techne؛ انگلستان) در ۳۵ چرخه دمایی و زمانی و هر چرخه شامل واسرشتگی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۶۰°C، توسعه به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲°C انجام شد. همچنین واسرشتگی اولیه ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C و گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی: ژن *CYP81Q1* با حذف ژن *pBI121* بتا‌گلوکورونیداز (*GUS*) در پلاسمید بیان دوتایی *pBI121* همسانه‌سازی شد. بدین منظور محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) خالص‌سازی و با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Sac*I هضم دوگانه شد و مجدداً به‌وسیله کیت استخراج DNA از لوله‌هایی که هضم درون آنها انجام شده بود، خالص‌سازی شد. پلاسمید *pBI121* نیز که به روش لیز قلیایی با سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) استخراج شده بود با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Sac*I، هضم دوگانه و به‌وسیله کیت استخراج DNA از ژل آگارز (دنازیست، ایران- مشهد) خالص‌سازی شد. سپس واکنش اتصال پلاسمید به DNA ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم *T4-DNA* لیگاز (Fermentas؛ ایالات متحده)، انجام و محصول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *Escherichia coli* (XL1blue؛ در چگالی نوری ۰/۵ به روش قلیایی کلریدکلسیم تهیه شده بودند، انتقال داده شد.

در مرحله بعد باکتری‌های تراریخت روی محیط کشت جامد سوپرانتیمال‌براث (SOB) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و پس از ۱۶ ساعت تیمار در ۳۷°C، تعدادی از کلونی‌ها به‌عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب شد و با استفاده از تکنیک کلونی-PCR مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند.

در نهایت، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی با SDS انجام گرفت. کلونی‌های نوترکیب هضم آنزیمی شدند و به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تایید، صحت توالی همسانه‌سازی‌شده از طریق توالی‌یابی DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در دو جهت رفت و برگشت (Bioneer؛ کره جنوبی) بررسی شد.

پروفایل چربی خون است [8-14]. بنابر مطالب ذکرشده، هدف این پژوهش همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیک ژن *CYP81Q1* رقم ایرانی کنجد بود.

مواد و روش‌ها

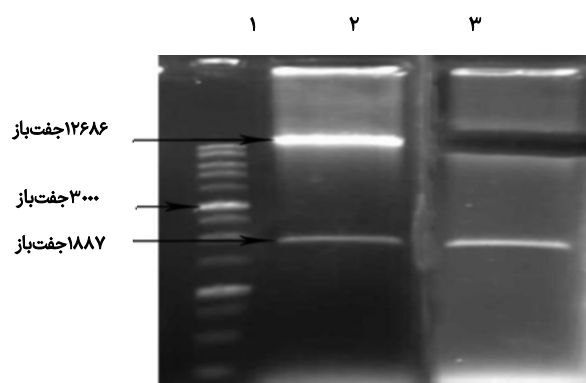
در پژوهش تجربی حاضر، دانه‌های کنجد رقم کرج ۱ از بخش دانه‌های روغنی (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج؛ ایران) تهیه و پس از ضدعفونی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) قرار داده شدند. بعد از ۴ هفته، اندام‌های رویشی شامل برگ و ساقه، جمع‌آوری و درون ورقه‌های آلومینیومی، بسته‌بندی شدند و بلافاصله در ازلت مایع، تثبیت و نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند (شکل ۲).



شکل ۲) گیاه کنجد در محیط کشت MS

برای استخراج DNA ژنومی از روش سمبروک و راسل [15] استفاده شد. بافت مورد نظر با استفاده از هاون و ازلت مایع به‌صورت پودر درآمد و به میزان ۱/۱ گرم به یک تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس- هیدروکلریک‌اسید ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸، اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸، سدیم‌کلرید ۱/۴ مولار و ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌بروماید ۲٪) اضافه شد. تیوب‌ها به‌مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در حمام بن‌ماری مدل FTE10AE (Techne؛ انگلستان) در دمای ۷۵°C قرار داده شدند و هر ۵ دقیقه به‌آرامی با دستگاه مدل FVORTECE (Techne؛ انگلستان) ورتکس شدند. سپس پروتئین‌ها دو بار با یک حجم برابر (یک میلی‌لیتر) از کلروفرم-ایزوپانول الکل (حجمی/حجمی ۱:۲۴)، حذف و فاز روئی پس از سانتریفیوژ با دستگاه D78532 (Hettich؛ آلمان) به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به تیوب جدید منتقل شد. مقدار ۰/۶ حجم فاز روئی ایزوپانول خالص، سرد و ۰/۱ حجم آن، استات‌سدیم به تیوب افزوده شد و نمونه‌ها به‌منظور رسوب بهتر DNA به‌مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰°C- نگهداری شدند.

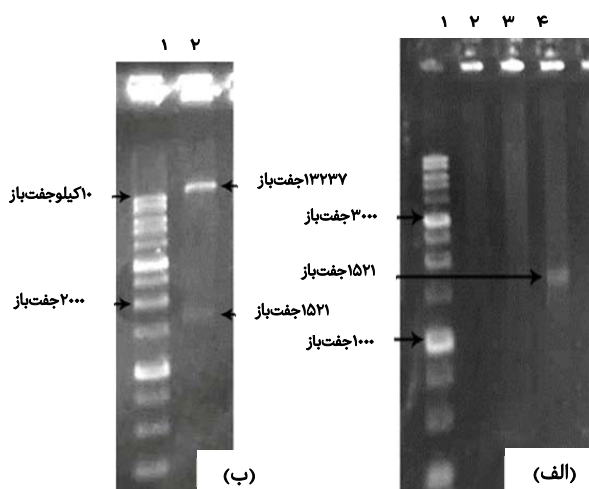
اسیدهای نوکلئیک به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴°C رسوب داده شده، با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ شسته و در مقدار مناسب آب دیونیزه حل شدند.



شکل ۴) نتیجه الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی پلاسمید

(۱) مارکر مولکولی 1KB
(۲) باندهای حاصل پس از هضم دوگانه آنزیمی پلاسمید غیرنوترکیب pBI 121 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I
(۳) تصویر ژل پس از جداسازی باند مورد نظر از ژل آگارز

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب، درستی ساخت پلاسمید نوترکیب را تایید کرد. نتایج حاصل از PCR پلاسمید نوترکیب، قطعه‌ای به طول ۱۵۲۱ جفت‌بازی را ایجاد کرد که مطابق با طول قطعه مورد انتظار بود (شکل ۵- الف). درستی همسانه‌سازی ژن هدف در ناقل دوتایی pBI121 با استخراج پلاسمید و هضم آن با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I با ایجاد دو قطعه با اندازه‌های تقریبی ۱۳۲۵۰ و ۱۵۵۰ جفت‌بازی به اثبات رسید (شکل ۵- ب).



شکل ۵) الکتروفورز پلاسمید نوترکیب

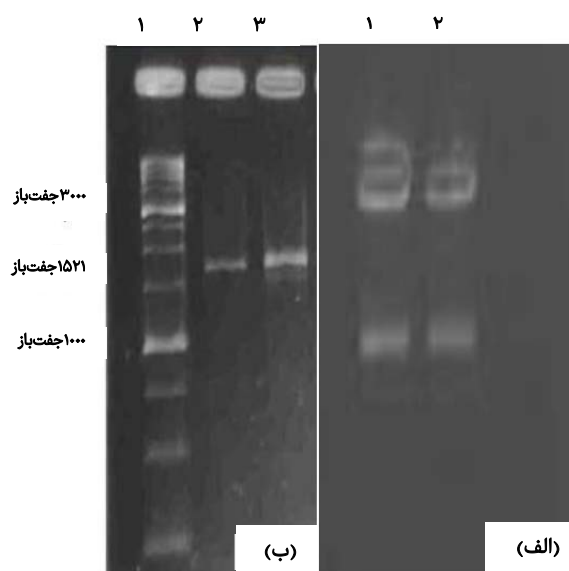
الف) محصول PCR پلاسمید نوترکیب با آغازگرهای اختصاصی ژن *CYP81Q1*
ب) باندهای حاصل پس از هضم دوگانه آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBI121 (حاوی ژن *CYP81Q1*) با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sac*I
۱) مارکر مولکولی 1kb: ۲ و ۳) پلاسمید غیرنوترکیب به‌عنوان کنترل منفی: ۴) پلاسمید نوترکیب

نتایج توالی‌یابی DNA، صحت قطعه همسانه‌سازی شده را تایید نمود. پس از توالی‌یابی و بلاست مشخص شد که توالی ژن *CYP81Q1* در کنجد رقم کرج ۱ با توالی موجود این ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی AB194714.1 در ۲۳ نوکلئوتید تفاوت داشت. از این رو ژن *CYP81Q1* رقم ایرانی کنجد در این پایگاه به‌عنوان ژن جدید با شماره دسترسی KP771974.1 ثبت شد. در مقایسه توالی قطعه ژن مورد نظر از گیاه کنجد با

بررسی توالی و مطالعات بیوانفورماتیک: پس از توالی‌یابی ژن *CYP81Q1* ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پروتئین به‌دست‌آمده با استفاده از سرور ProtParam و نرم‌افزار TMHMM 2.0 و ساختارهای دوم و سوم پروتئین به‌وسیله سرورهای PSIPred و Swiss-Model، Sopma، 3.0، ESYPred3D 1.0 و Weblab به‌منظور نمایش این مدل از نرم‌افزارهای ViewerLite 4 و RASmol 2.7.2.1 استفاده و همچنین نمودار رامچاندران مربوط به ساختار سه‌بعدی ژن *CYP81Q1* رسم شد. توالی پروتئینی به‌دست‌آمده به‌منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده (NCBI) جست‌وجو شد و سپس برای همدیفری چندگانه نرم‌افزارهای ClustalW 1.83 و Tcoffee مورد استفاده قرار گرفتند. برای پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین از نتایج نرم‌افزارهای آنلاین Psipred 3.0 و Sopma موجود در Expasy استفاده شد^[16]. با استفاده از پایگاه Translate موجود در سایت Expasy توالی پروتئینی ژن مورد نظر به دست آمد. آنالیز توالی پروتئینی *CYP81Q1* به‌وسیله SignalP 3.0 انجام گرفت^[17].

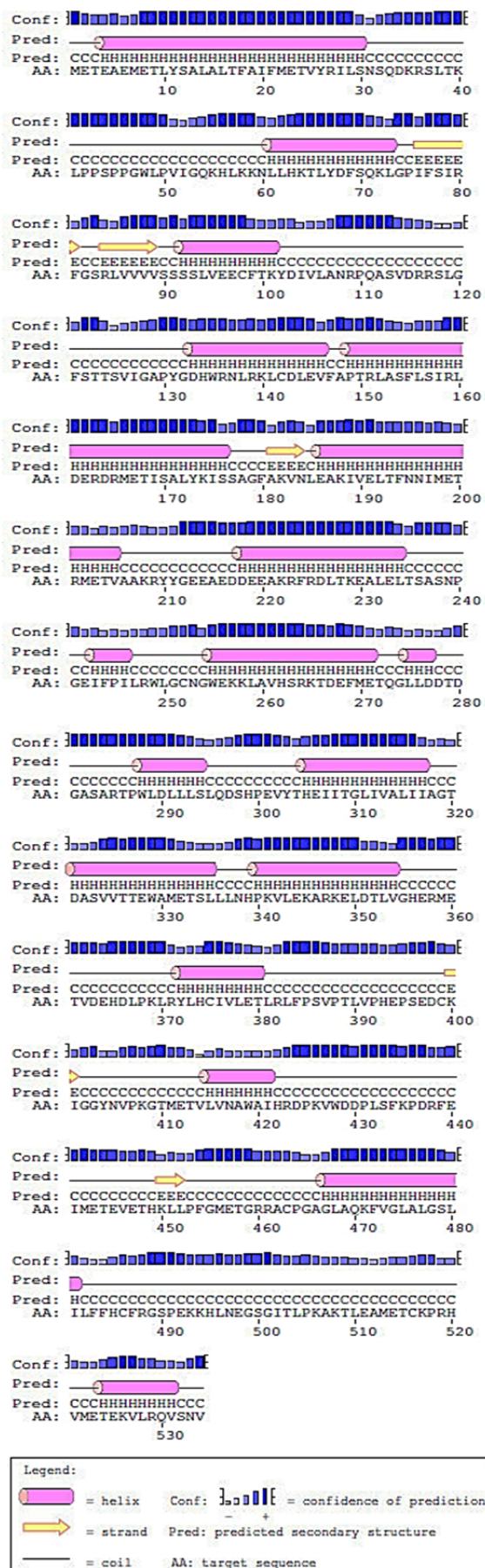
یافته‌ها

استخراج DNA از بافت برگ و ساقه گیاه کنجد از کمیت (۷/۰ میکروگرم به‌ازای هر میکرولیتر) و کیفیت قابل قبولی برخوردار بود (شکل ۳). برای حصول بهترین نتیجه و تکثیر از دو دمای ۶۰ و ۶۲°C در مرحله اتصال آغازگرها به قطعه الگو استفاده شد. قطعه هدف به طول ۱۵۲۱ جفت‌باز در هر دو دما تکثیر یافت و در دمای ۶۰°C از شدت باند بیشتری برخوردار بود (شکل ۴). پلاسمید پس از هضم دوگانه تبدیل به دو قطعه ۱۲۶۸۶ و ۱۸۸۷ جفت‌بازی شد که قطعه کوچک‌تر مربوط به ژن *GUS* بود که در محل برش مابین دو آنزیم واقع است (شکل ۴).



شکل ۳) نتایج الکتروفورز محصولات DNA

الف) DNA ژنومی استخراج شده از (۱) بافت برگ، (۲) بافت ساقه گیاه کنجد، ب) تکثیر ژن *CYP81Q1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش PCR
۱) خط‌کش مولکولی 1KB، ۲) قطعه تکثیرشده در دمای ۶۰°C، ۳) قطعه تکثیرشده در دمای ۶۲°C



شکل ۶) ساختار دوم پروتئین CYP81Q1 پیش‌بینی شده با نرم‌افزار Psipred 3.0

شماره دسترسی KP771974.1 با توالی ژن *CYP81Q1* با شماره دسترسی AB194714.1 مشخص شد که این ژن با توالی‌های ثبت‌شده در NCBI، ۹۸٪ تشابه توالی داشت. در بررسی میزان همولوژی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI، توالی به‌دست‌آمده با توالی موجود در NCBI، ۹۴٪ همپوشانی داشت.

توالی پیش‌بینی‌شده پروتئین ژن هدف دارای فرمول مولکولی $C_{2572}H_{4089}N_{695}O_{723}S_{22}$ ، ۵۰۶ اسیدآمینه، وزن مولکولی ۵۷۰۲۱/۳ دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/۴۶ بود. بیشترین درصد اسیدآمینه مربوط به لوسین با ۱۳٪ بود و تعداد کل اسیدهای آمینه با بار منفی ۶۱ و تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت ۶۵ عدد بود. ضریب خاموشی محاسبه‌شده برای اسیدآمینه سیستئین موجود در توالی ۶۰۸۹۰ و میزان جذب نور آن در ۲۸۰ نانومتر، ۰/۱٪ بود. این معیار هنگام خالص‌سازی پروتئین برای سنجش مقدار آن مفید است (جدول ۱).

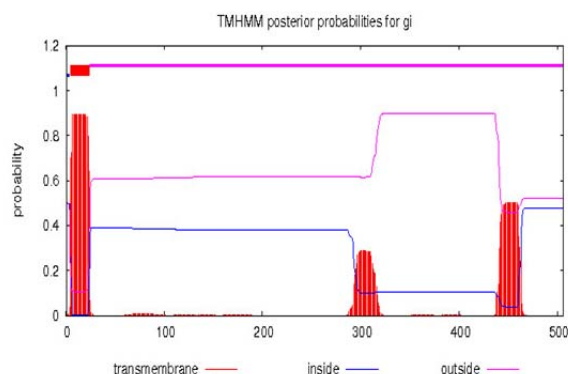
جدول ۱) تعداد و درصد اسیدهای آمینه موجود در پروتئین CYP81Q1 رقم کرج ۱ حاصل از آنالیزهای ProtParam

اسیدآمینه‌ها	تعداد (درصد)
آلانین (A)	۳۵ (۶/۹)
آرژنین (R)	۳۱ (۶/۱)
آسپارژین (N)	۱۴ (۲/۸)
اسیدآسپارتیک (D)	۲۶ (۵/۱)
سیستئین (C)	۸ (۱/۶)
گلوتامین (Q)	۸ (۱/۶)
اسیدگلوتامیک (E)	۳۵ (۶/۹)
گلیسین (G)	۲۹ (۵/۷)
هیستیدین (H)	۱۶ (۳/۲)
ایزولوسین (I)	۲۵ (۴/۹)
لوسین (L)	۶۶ (۱۳/۰)
لیزین (K)	۳۴ (۶/۷)
متیونین (M)	۱۴ (۲/۸)
فنیل‌آلانین (F)	۲۲ (۴/۳)
پرولین (P)	۲۸ (۵/۵)
سرین (S)	۳۶ (۷/۱)
ترئونین (T)	۲۵ (۴/۹)
تریپتوفان (W)	۸ (۱/۶)
تیروزین (Y)	۱۱ (۲/۲)
والین (V)	۳۵ (۶/۹)
پیرولیزین (O)	۰ (۰/۰)
سلنوسیتئین (U)	۰ (۰/۰)

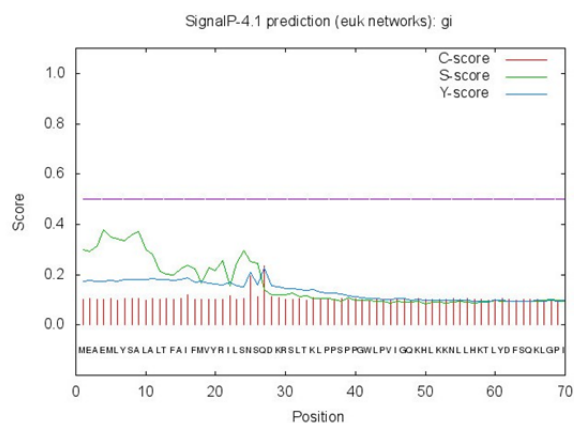
ساختار دوم پروتئین هدف شامل ۴۴/۰۷٪ مارپیچ آلفا، ۱۵/۸۱٪ رشته ممتد، ۸/۷۰٪ صفحات بتا و ۳۱/۴۲٪ مارپیچ تصادفی بود. این نتایج با ساختار دوم توالی پروتئینی ژن در NCBI (شماره دسترسی AB194714.1) که دارای ۴۸/۶۲٪ مارپیچ آلفا، ۱۴/۰۳٪ رشته ممتد، ۷/۷۱٪ صفحات بتا و ۲۹/۶۴٪ مارپیچ تصادفی بود، بالاترین تشابه را داشت (شکل‌های ۶ و ۷).

مدل سه‌بعدی پروتئین رسم شد (شکل ۸) و این ساختار دارای زنجیره استروکیمی خوبی بود (نمودار ۱). پروتئین CYP81Q1 یک دمین گذرنده از غشا داشت (نمودار ۲). در آنالیز توالی پروتئینی CYP81Q1، این پروتئین فاقد سیگنال برای جابه‌جایی پروتئین در سیتوپلاسم بود (نمودار ۳). همدیفی چندگانه توالی‌های پروتئینی، همولوژی بالایی را بین توالی پروتئینی رقم موجود در NCBI و رقم کرج ۱ نشان داد (شکل ۹).

```
# gi Length: 506
# gi Number of predicted TMMs: 1
# gi Exp number of AAs in TMMs: 34.89085
# gi Exp number, first 60 AAs: 17.26982
# gi Total prob of N-in: 0.50308
# gi POSSIBLE N-term signal sequence
gi TMMV2.0 inside 1 4
gi TMMV2.0 TMhelix 5 24
gi TMMV2.0 outside 25 506
```



نمودار (۲) دمن‌های گذرنده از غشا



# Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	27	0.233		
max. Y	27	0.229		
max. S	4	0.377		
mean S	1-26	0.268		
D	1-26	0.244	0.500	NO

Name=gi SP="NO" D=0.244 D-cutoff=0.500 Networks=SignalP-TM

نمودار (۳) بررسی توالی برای وجود سیگنال پپتید در پروتئین CYP81Q1

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
gi MEAEMLYSALALTFAIFMVYRILSNSQDKRSLTKLPSPPGWLPVIGQKHLKKNLLHKTLYDFSQKLGPIFSIRFGSRLV
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| MEAEMLYSALALTFAIFMVYRILSNSQDKRSLTKLPSPPGWLPVIGQKHLKKNLLHKTLYDFSQKLGPIFSIRFGSRLV
*****

gi VVSSSSLVVEECFTKYDIVLANRPQASVDRRLGFTTSVIGAPYGDHWRNLRLKCDLEVFAPTRLASFLSIRLDERDRM
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| VVSSSSLVVEECFTKYDIVLANRPQASVDRRLGFTTSVIGAPYGDHWRNLRLKCDLEVFAPTRLASFLSIRLDERDRM
*****

gi ISALYKISSAGFAKVNLEAKIVELTFNNIMRMVAARKRYGEEAEDDEAKRFRDLTKEALELTSASNPGEIFPILRWLGC
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| ISALYKISSAGFAKVNLEAKIVELTFNNIMRMVAARKRYGEEAEDDEAKRFRDLTKEALELTSASNPGEIFPILRWLGC
*****

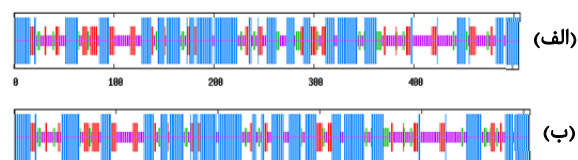
gi NGWEKKLAVHSRKTDEFMQGLLDDTDGASARTPWLDLLSLQDSHPVEVYTHEIITGLIVALIIAGTDASVVTTEWAMSLL
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| NGLEKKLAVHSRKTDEFMQGLLDEHRRGERQNTMVDHLLSLQESQPEYYTDEIITGLIVALIIAGTDASVVTTEWAMSLL
*****

gi LNHPKVLEKARKELDTLVGHERMVDEHDLPLKRLYLHCIVLETLRLFPSVPTLVPHEPSEDCKIGGVNVPKGTMLVNAWA
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| LNHPKVLEKARKELDTLVGHERMVDEHDLPLKRLYLHCIVLETLRLFPSVPTLVPHEPSEDCKIGGVNVPKGTMLVNAWA
*****

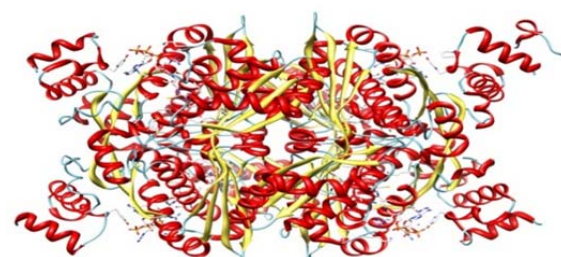
gi IHRDPKVWDDPLSFKPDRFEIMEVETHKLLPFGMGRRACPGAGLAQKFVGLALGSLILFFHCFRGSPEKKHLNEGSGITL
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| IHRDPKVWDDPLSFKPDRFEIMEVETHKLLPFGMGRRACPGAGLAQKFVGLALGSLIQCFDERTSPEKIDLNEGSGITL
*****

gi PKAKTLEAMCKPRHVMKVLKQVSNV
gi|81157968|dbj|BAE48234.1| PKAKTLEAMCKPRHVMKVLKQVSNV
*****
```

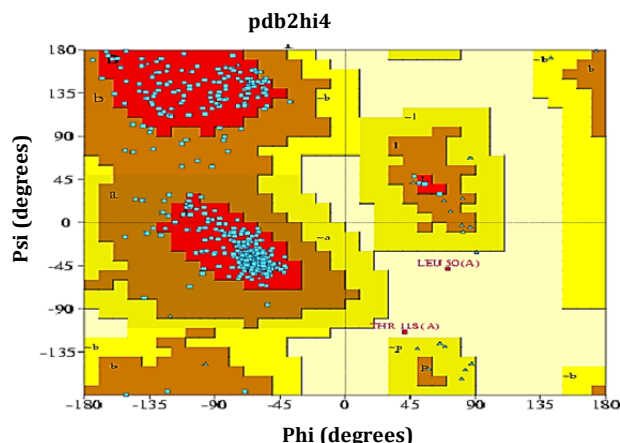
شکل (۹) نتیجه هم‌ردیفی پروتئین با نرم‌افزار ClustalW 1.83



شکل (۷) ساختار دوم پروتئین CYP81Q1 با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی پروتئینی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI (الف) رقم کرج ۱، (ب) سراموم/بندیکوم موجود در بانک اطلاعاتی NCBI (مارپیچ آلفا-خطوط آبی)، صفحه بتا-خطوط قرمز)، پیچ بتا-خطوط سبز) و مارپیچ تصادفی (خطوط بنفش) هستند)



شکل (۸) ساختار سه‌بعدی پروتئین CYP81Q1



نمودار (۱) نمودار رامانچاندران پروتئین CYP81Q1

کلی انتقال یافت و آزمون‌های تراریختی مختلف برای شناسایی کلونی‌های تراریخت انجام و وجود قطعه در ناقل بیانی pBI121 تایید شد.

پژوهش حاضر محدودیتی نداشت. از آنجایی که ژن CYP81Q1 در مسیر سنتز ماده آنتی‌اکسیدانی مهم سزامین نقش کلیدی دارد، پیشنهاد می‌شود با افزایش بیان آن، افزایش احتمالی میزان سزامین در کنجد مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

براساس توالی‌یابی نوکلئوتیدی، ژن CYP81Q1 دارای ۱۵۲۱ جفت‌باز است و در ۲۳ نوکلئوتید با نمونه ثبت‌شده در بانک جهانی NCBI تفاوت دارد. این ژن، پروتئینی به طول ۵۰۶ اسیدآمینه را رمز می‌کند. پروتئین مورد نظر بسیار شبیه با پروتئین ثبت‌شده در پایگاه اطلاعات NCBI است.

تشکر و قدردانی: این تحقیق در گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی انجام شده است. از همه عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، به‌ویژه کارشناس آزمایشگاه آقای حیدری صمیمانه سپاس‌گزاریم.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان این مقاله وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: صبیحه همتی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۵۰٪)، فاطمه دهقان‌نیری (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: این تحقیق با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی انجام شده است.

منابع

- 1- Dini Torkamani MR, Carapetian J. An investigation of physical and chemical characteristics of seed in ten sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties. Iran J Biol. 2008;20(4):327-33. [Persian]
- 2- Malek F. Oilseeds & vegetable oils. Tehran: Publishing and Promoting Agricultural Training; 2010. [Persian]
- 3- Mosallaiepour Yazdi M, Eghtesadi Sh, Kaseb F, Afkhami Ardakani M, Hoseini F. Effects of sesame oil on blood glucose and lipid profile in type II diabetic patients referring to the Yazd diabetes research center. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2008;16(2):15-23.
- 4- Fraser CM, Chapple C. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. Arabidopsis Book. 2011;9:e0152.
- 5- Mc Cann MJ, Gill CI, Mc Glynn H, Rowland IR. Role of mammalian lignans in the prevention and treatment of prostate cancer. Nutr Cancer. 2005;52(1):1-14.
- 6- Ono E, Nakai M, Fukui Y, Tomimori N, Fukuchi-Mizutani M, Saito M, et al. Formation of two methylenedioxy bridges by a Sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(26):10116-21.
- 7- Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. Crit Rev Toxicol. 2002;32(5):391-411.
- 8- Hirose N, Inoue T, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, et al. Inhibition of cholesterol absorption and

بحث

پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیک ژن CYP81Q1 رقم ایرانی کنجد انجام گرفت. در این پژوهش هدف نهایی، افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان سزامین موجود در دانه کنجد بود. برای دستیابی به این هدف ابتدا همسانه‌سازی ژن CYP81Q1 رمزکننده آنزیم سیتوکروم P450 و آنزیم نهایی در تبدیل پیش‌ماده‌های پینورزینول و پایپریتول به سزامین موجود در گیاه کنجد رقم کرج ۱ انجام شد که انتظار می‌رفت سبب القای بیان بالاتر و اختصاصی این ژن و افزایش مقدار سزامین دانه شود. تاکنون پژوهشی برای افزایش مقدار ماده انجام نشده است، بنابراین با توجه به خواص بالینی زیاد این ماده، پژوهش‌هایی از این دست در خور اهمیت هستند. سزامین اصلی‌ترین فورفوران لیگنان تشکیل‌دهنده دانه کنجد است که تحت تأثیر آنزیم سیتوکروم P450 موجود در این گیاه، طی دو مرحله از پینورزینول و پایپریتول و با تشکیل دو پل متیلن‌دی‌اکسی، سنتز می‌شود. این ماده به‌دلیل کاربردهای بالینی ارزشمندی همچون خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدتومورهای مغزی و بهبود اکسیداسیون اسیدهای چرب و کلسترول بسیار مورد توجه است.

کاتو و همکاران آنزیمی که پینورزینول را به‌ترتیب به پایپریتول و سزامین تبدیل می‌کند، در میکروزم‌های دانه کنجد شناسایی کرده‌اند^[18]. جیاتو و همکاران آنزیم شناسایی‌شده توسط آنها را در دسته سیتوکروم p450 وابسته به مونواکسیژناز طبقه‌بندی کرده‌اند که تشکیل پل متیلن‌دی‌اکسی روی حلقه آروماتیک در هر دو انتهای پینورزینول را کاتالیز می‌کند^[19]. این آنزیم به‌سبب تسریع تشکیل پل متیلن‌دی‌اکسی دارای فعالیت منحصر به فرد است. تولید سزامین به‌وسیله این آنزیم به دو صورت احتمالی صورت می‌گیرد، یا پینورزینول پس از تشکیل اولین پل، داخل جایگاه فعال آنزیم معکوس می‌شود تا پل دوم در طرف مقابل پایپریتول تشکیل و سزامین ساخته شود یا پایپریتول پس از تشکیل اولین پل رها و مجدداً برای ایجاد پل متیلن‌دی‌اکسی دوم متصل می‌شود^[7].

ژن CYP81Q1 توسط ونو و همکاران^[6] شناسایی شده و بیان آن در مخمر، فعالیت این ژن را به‌صورت تشکیل پل در (+) - پینورزینول تایید کرده و در نتیجه این آنزیم (+) - پایپریتول/ (+) - سزامین‌سنتاز (PSS) نام گرفته است^[6]، در حالی که در ابتدا دو آنزیم سیتوکروم p450 با نام‌های سنتاز (+) - پایپریتول (PS) و سنتاز (+) - سزامین (SS) برای این واکنش پیشنهاد شده بودند^[19].

همچنین همولوگ‌های ژن CYP81Q1 در گونه‌های *indicum* (شیزیانوم (*shinzianum*), *radiatum*), *latifolium*) جنس سزاموم شناسایی شده‌اند^[6].

در پژوهش‌های بعدی کیم و همکاران با استفاده از تکنیک RNA مداخله‌گر مانع بیان ژن رمزکننده متایرینول (*matairesinol*) لیگنان اصلی یاس زرد (*Forsythia viridissima*) در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه شدند و با انتقال ژن CYP81Q1 مسیر بیوسنتز این لیگنان را به‌دلیل وجود پیش‌ماده پینورزینول به سمت تولید سزامین هدایت کردند^[20].

در این پژوهش نیز ژن مربوط به آنزیم سیتوکروم P450 (CYP81Q1) که از آنزیم‌های کلیدی سنتز سزامین است، از کنجد رقم کرج ۱ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌وسیله PCR تکثیر شد. پس از برش قطعه ژن و ناقل بیانی pBI121 با آنزیم‌های *BamHI* و *SacI*، طی واکنش اتصال قطعه ژن به ناقل بیانی متصل شد. سپس ناقل نو ترکیب به سلول مستعد باکتری *شریشیا*

- Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem.* 1991;266(17):11078-82.
- 15- Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Long Island: CSHL Press; 2001.
- 16- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. *The proteomics protocols handbook*. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2005. pp. 571-607.
- 17- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8(10):785-6.
- 18- Kato MJ, Chu A, Davin LB, Lewis NG. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. *Phytochemistry.* 1998;47(4):583-91.
- 19- Jiao Y, Davin LB, Lewis NG. Furanofuran lignan metabolism as a function of seed maturation in *Sesamum indicum*: Methylenedioxy bridge formation. *Phytochemistry.* 1998;49(2):387-94.
- 20- Kim HJ, Ono E, Morimoto K, Yamagaki T, Okazawa A, Kobayashi A, et al. Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture. *Plant Cell Physiol.* 2009;50(12):2200-9.
- synthesis in rats by sesamin. *J Lipid Res.* 1991;32(4):629-38.
- 9- Akimoto K, Kitagawa Y, Akamatsu T, Hirose N, Sugano M, Shimizu S, et al. Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents. *Ann Nutr Metab.* 1993;37(4):218-24.
- 10- Kuo PC, Lin MC, Chen GF, Yiu TJ, Tzen JT. Identification of methanol-soluble compounds in sesame and evaluation of antioxidant potential of its lignans. *J Agric Food Chem.* 2011;59(7):3214-9.
- 11- Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E, Satake H, Kobayashi A. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Environ Exp Bot.* 2012;75:212-9.
- 12- Dar AA, Arumugam N. Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis--a review. *Bioorg Chem.* 2013;50:1-10.
- 13- Truan JS, Chen JM, Thompson LU. Comparative effects of sesame seed lignan and flaxseed lignan in reducing the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen in athymic mice. *Nutr Cancer.* 2012;64(1):65-71.
- 14- Shoun H, Tanimoto T. Denitrification by the fungus