مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار وتابستان ۱۴۰۰
صفحه ۵۷-۴۷

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1

DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

طراحی بیوانفورماتیکی و همسانه‌سازی ژن *rT1* چای ترش برای ساخت وکتور نوترکیب pBI121-*rT1* به منظور بیان در گیاهان

Bioinformatics design and cloning of *Hibiscus sabdariffa rT1* gene for construction of pBI121-*rT1* recombinant vector in order to expression in plants

امین سهندی خلیفه کندی و فاطمه دهقان نیری*

Amin Sahandi Khalifeh Kandy and Fatemeh Dehghan Nayeri*

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران
Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۹)

چکیده

بیماری‌های تنفسی و التهاب ریوی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که بیش از ۵۰ درصد مردم جهان را درگیر می‌کند. تاکنون داروهای مختلفی در زمینه پیشگیری و درمان این بیماری‌ها توسعه یافته است. پپتید rT1، متعلق به گیاه دارویی چای ترش با طول ۲۷ اسیدآمینه دارای خاصیت مهارکنندگی نوتروفیل الاستاز انسانی و پتانسیل بالقوه دارویی در زمینه پیشگیری و درمان بیماری-های التهابی ریه است. باتوجه به ارزش اقتصادی بالای ترکیبات با خاصیت مهارکنندگی نوتروفیل الاستاز، در این پژوهش برای اولین بار با هدف بیان این پپتید در گیاهان، همسانه‌سازی و ساخت وکتور بیانی نوترکیب pBI121-*rT1* انجام شد. باتوجه به نبودن توالی ژنی این پپتید در پایگاه-های داده، ابتدا توالی ژنی مناسب آن براساس ترجیح کدونی گیاه توتون، وکتورهای بکار برده شده در پژوهش، ساختار و پایداری رونوشت حاصل از آن و خصوصیات پروتئین تولید شده از آن طراحی و سنتز شد. شاخص سازگاری کدونی برای توالی طراحی شده برابر با ۰/۹۲ و فراوانی GC ۴۲/۳۲ درصد محاسبه شد. پایداری پپتید طراحی شده در سلول‌های انسانی نسبت به پپتید اصلی ۲۵ برابر افزایش یافت و شاخص ناپایداری برای پپتید طراحی شده برابر ۲۰/۹۰ محاسبه شد. به منظور همسانه‌سازی، توالی سنتز شده به وسیله واکنش PCR تکثیر و در وکتور pMCS5 همسانه‌سازی شد. سپس با هدف بیان این پپتید در گیاهان، زیرهمسانه‌سازی توالی طراحی شده، در وکتور بیانی pBI121 تحت پروموتر CaMV 35S انجام شد.

واژه‌های کلیدی

التهاب تنفسی،
پپتید rT1،
چای ترش،
مهارکننده نوتروفیل الاستاز،
pBI121-*rT1*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

مقدمه

گیاه دارویی چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) که به نام‌های Rosell یا red sorrel شناخته می‌شود درختچه‌ای متعلق به خانواده Malvaceae است و مصارف دارویی متنوعی دارد. این گیاه بومی آفریقای مرکزی و غربی است و بطور گسترده در مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری مانند هند و آسیای جنوب شرقی کشت می‌شود (Ali Badreldin H *et al*. 2005). از گلبرگ سرخ رنگ آن در نوشیدنی‌ها و برای رنگ‌آمیزی در صنایع غذایی استفاده می‌شود. به عنوان یک داروی سنتی، چای ترش در درجه اول برای درمان سرفه استفاده می‌شد (Wilson and Menzel 1964). از این گیاه به عنوان داروی ضد فشارخون (Herrera-Arellano *et al*. 2007)، ضد چربی (Ajay *et al*. 2007)، ضد دردهای عصبی، ضد تب‌خال، ضد التهاب (Ali Md Khadem *et al*. 2011) و عامل دیورتیک (Jiménez-Ferrer *et al*. 2012) نیز استفاده می‌شود. خواص چای ترش مربوط به تولید برخی متابولیت‌های ثانویه یا ترکیبات دیگری نظیر پپتیدهای گیاهی است. یکی از پپتیدهای مهمی که در چای ترش شناسایی شده است پپتیدی ۲۷ اسیدآمینه‌ای بنام rT1 است. این پپتید در سال ۲۰۱۶ و با فعالیت مهارکنندگی نوتروفیل الاستاز انسانی شناسایی شده است. براساس آنالیز NMR پپتید rT1 یک ساختار cysteine-knot است. آنالیز ترانسکریپتومی نیز نشان داده است که rT1 توسط آسپاراژین-اندوپپتیداز از یک پیش ماده سه دومینی تولید می‌شود. براساس بررسی‌های بیوشیمیایی، rT1 مقاومت بالایی در برابر تجزیه شدن توسط اندوپپتیداز و سرم انسانی دارد. بنابراین roseltide rT1 نوع جدیدی از مهارکننده‌های نوتروفیل‌الاستاز است که پتانسیل دارویی بالایی برای درمان بیماری‌های مرتبط با نوتروفیل‌الاستاز دارد (Loo *et al*. 2016). نتایج مربوط به فلوسایتومتری و بررسی سلول زنده نیز نشان داده است که rT1 از طریق اندوسیتوز وابسته به گلیکوزآمینوگلیکان وارد سلول می‌شود، از طریق پروتئین TOM20 که یک گیرنده میتوکندریایی است وارد میتوکندری شده و با افزایش پولاریزاسیون غشای میتوکندریایی باعث افزایش تولید ATP می‌شود (Kam *et al*. 2019). با توجه به ویژگی‌های بیان شده پپتید rT1 از جمله خاصیت مهار نوتروفیل‌الاستاز انسانی و کاهش التهاب‌های ریوی به عنوان یک داروی بالقوه، در این پژوهش برای اولین بار همسانه‌سازی و ساخت وکتور بیانی حامل ژن *rT1* به منظور بیان در گیاهان انجام شد.

مواد و روش‌ها

شناسایی پپتید rT1 و طراحی توالی نوکلئوتیدی آن

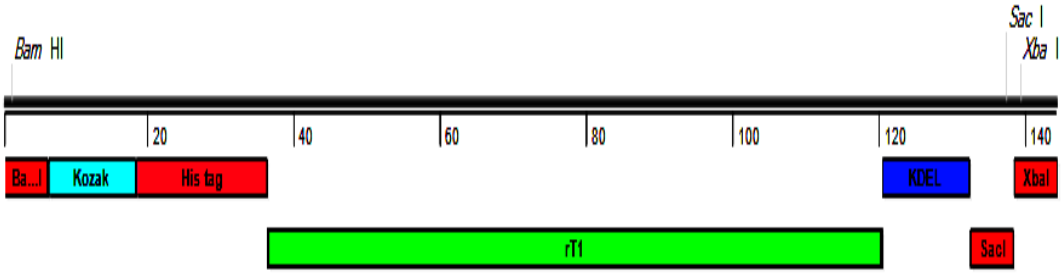
باتوجه به اینکه توالی نوکلئوتیدی برای این پپتید در پایگاه‌های داده مختلف ثبت نشده است توالی ۲۷ آمینواسیدی پپتید rT1 چای ترش با شماره دسترسی Accession 5GSF_A از سایت NCBI گرفته شد. بهینه‌سازی کدونی پپتید بدست آمده بوسیله نرم‌افزار برخط EMBOSS Backtranseq (https://www.ebi.ac.uk) و براساس ترجیح کدونی (Codon usage) گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) انجام شد. به ابتدای توالی ۸۱ جفت بازی بدست آمده از این نرم‌افزار، ۱۸ نوکلئوتید مربوط به نشانه هیس (His tag) و ۱۲ نوکلئوتید مربوط به توالی کزاک اضافه شد. همچنین به انتهای توالی بدست آمده، ۱۲ نوکلئوتید مربوط به توالی KDEL و ۳ نوکلئوتید مربوط توالی کدون خاتمه اضافه شد. برای سهولت در همسانه‌سازی، جایگاه برش آنزیم *Bam*HI در ابتدا و جایگاه‌های برش آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I در انتهای توالی قرار داده شدند (شکل ۱).

پیش‌بینی ساختار ثانویه RNA و پپتید طراحی شده، بررسی خصوصیات پپتید

پیش‌بینی ساختار ثانویه RNA حاصل از توالی طراحی شده با نرم‌افزار برخط RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) انجام شد. همچنین باتوجه به افزودن اسیدهای‌آمینه مربوط به نشانه Histag و توالی KDEL به ترتیب به ابتدا و انتهای پپتید، قبل از اقدام به همسانه‌سازی، خصوصیات پپتید موردنظر با استفاده از پایگاه ProtParam بررسی شد (Garg *et al*. 2016). پیش‌بینی ساختار سه بعدی پپتید نیز با استفاده از سرور I-TASSER انجام گرفت (Yang *et al*. 2015).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]



شکل ۱- شماتیک توالی طراحی شده ژن *rT1* به همراه توالی کزاک، نشانه هیس (His tag)، توالی KDEL و جایگاه‌های برشی در نرم‌افزار SeqBulilder.

Figure 1- Schematic of the *rT1* gene designed sequence including Kozak, His tag, KDEL sequences and enzymes restriction sites by SeqBulilder software

همسانه‌سازی توالی طراحی شده حامل ژن *rT1* در وکتور pMCS5

بعد از طراحی توالی موردنظر، پیش‌بینی ساختار ثانویه RNA حاصل از توالی و بررسی خصوصیات پپتید تولید شده از این توالی، همسانه‌سازی مجازی توالی بدست آمده بوسیله نرم‌افزار SeqBuilder در وکتور pMCS5 انجام و اختلال‌های احتمالی پیش‌بینی شده در نرم‌افزار رفع گردید. آغازگرهای اختصاصی برای ابتدا و انتهای توالی موردنظر جهت تکثیر بوسیله PCR و توالی نهایی بدست آمده به‌عنوان الگوی واکنش PCR برای سنتز بصورت یک‌طرفه به شرکت GenScript (چین) سفارش داده شدند. در این پژوهش از وکتور pMCS5 بعنوان وکتور پایه و از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I و آنزیم T4 DNA ligase (شرکت فرمنتاز، کانادا) برای همسانه‌سازی استفاده شد.

باکتری، محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده

در این مطالعه از باکتری *E. coli* سویه Top10، محیط کشت LB (Luria-Bertani) آگار، و آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کانامایسین استفاده شد. همچنین از روش شوک الکتریکی برای انتقال وکتورهای نوترکیب به داخل سلول‌های باکتری استفاده شد. برای این منظور ابتدا باکتری *E. coli* سویه Top10 به روش شوک الکتریکی مستعد شد. باکتری‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pMCS5 در محیط LB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند، گزینش اولیه باکتری‌های ترانسفورم شده بوسیله تست غربالگری سفید-آبی (Blue–white screening) صورت گرفت (Julin, 2018). سپس کلونی‌های انتخاب شده بوسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی وکتورهای استخراج شده تایید شدند.

زیرهمسانه‌سازی توالی ژن *rT1* در ناقل pBI121

ناقل pBI121 با ژن گزینشگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بعنوان ناقل بیانی جهت انتقال ژن *rT1* چای ترش به گیاه هدف انتخاب شد. برای زیرهمسانه‌سازی توالی درج شده در ناقل pMCS5 در ناقل بیانی pBI121 هر دو ناقل به روش شوک الکتریکی به باکتری *E. coli* سویه Top10 ترانسفورم شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌های تشکیل شده روی محیط گزینشی صورت گرفت. در این مرحله از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I و آنزیم T4 DNA ligase (شرکت فرمنتاز، کانادا) جهت انتقال توالی هدف از وکتور پایه pMCS5 به وکتور بیانی pBI121 استفاده شد. ابتدا پلاسمیدهای استخراج شده توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I برش یافت و محصول حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین (LMP) بارگذاری و الکتروفورز آنها انجام شد. بعد از تایید اندازه قطعات هدف، این قطعات توسط کیت سازنده شرکت Bioneer از روی ژل جداسازی شد. واکنش اتصال بین ناقل pBI121 و قطعه جدا شده از وکتور pMCS5 توسط آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد. محصول اتصال از طریق روش شوک الکتریکی به باکتری *E. coli* سویه Top10 ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک

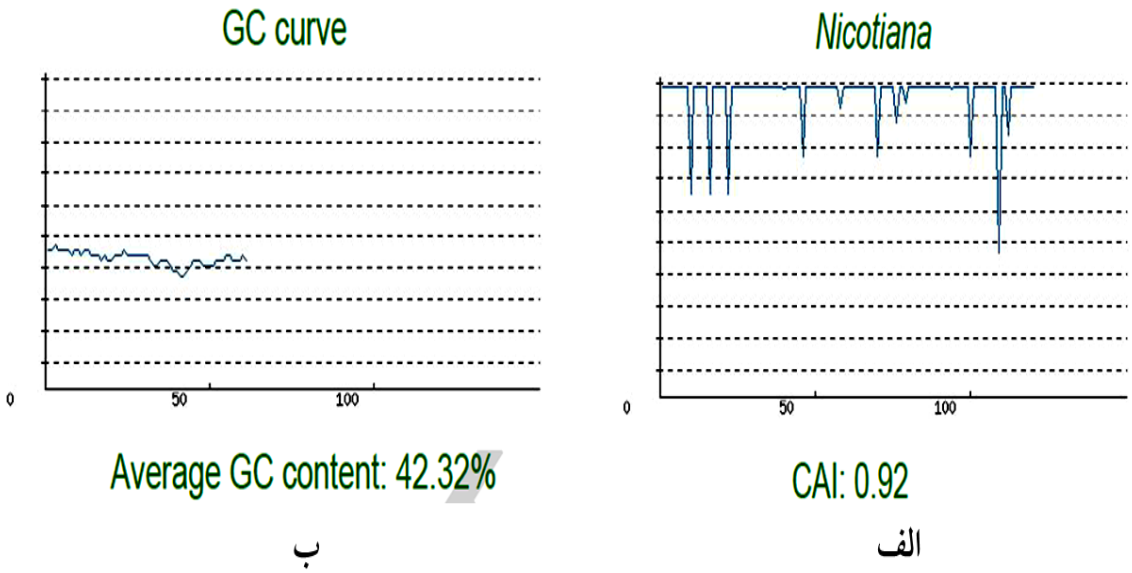
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

کانامایسین کشت شدند. پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده روی محیط گزینشی استخراج شد و پلاسمیدهای نوترکیب pBI121-*rT1* بوسیله واکنش PCR و هضم آنزیمی تایید شدند. در نهایت صحت همسانه‌سازی ژن *rT1* طراحی شده در ناقل pBI121 از طریق توالی‌یابی (شرکت فن‌آوران) تایید شد.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی کدون و طراحی توالی حاوی ژن *rT1*

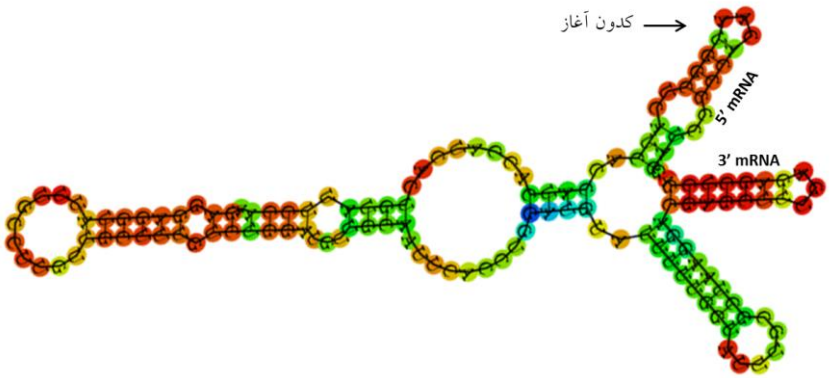
باتوجه به اینکه توالی نوکلئوتیدی ژن *rT1* چای ترش در پایگاه‌های داده ثبت نشده است، توالی پپتیدی ۲۷ اسیدآمینه‌ای این ژن (CIPRGGICLVALSGCCNSPGCIFGICA) به کمک نرم‌افزار برخط EMBOSS Backtranseq و براساس ترجیح کدونی گیاه توتون (*N. tabacum*) به توالی نوکلئوتیدی تبدیل شد. برای اطمینان، کدون‌های ایجاد شده توسط جدول فراوانی کدونی *N. tabacum* در سایت Genscript تطبیق داده شد. بعد از افزودن توالی‌های مربوط به نشانه هیس (His tag) با توالی CATCACCATCACCATCAC، توالی کزاک (GCCACAATGGCT)، توالی KDEL (AAGGACGAGCTT) و کدون خاتمه TGA، همسانه‌سازی مجازی در نرم‌افزار Seqbuilder به منظور اطمینان از مناسب بودن توالی طراحی شده انجام شد. با توجه به استفاده از سایت‌های برشی آنزیم‌های برشی *Bam*HI، *Xba*I و *Sac*I در همسانه‌سازی و زیر همسانه‌سازی، کدون‌هایی که باعث ایجاد سایت‌های برشی در داخل توالی می‌شدند با کدون‌های مناسب با ترجیح کدونی گیاه توتون جایگزین شدند. خصوصیات مربوط به شاخص سازگاری کدونی (Codon Adaptation Index) و درصد GC توسط نرم‌افزار Genscript محاسبه شد. براساس آن میزان CAI برابر با ۰/۹۲ بود که بهترین حالت باید بالای ۰/۸ باشد و میزان محتوای GC نیز که باید بین ۳۰ تا ۷۰ باشد ۴۲/۳۲ درصد محاسبه شد (شکل ۲). تعداد Negative CIS elements و Negative Repeat elements که باید صفر باشد در اینجا نیز برابر صفر محاسبه شد.



شکل ۲- نتایج بررسی توالی طراحی شده بوسیله سرور Genscript. شاخص سازگاری کدونی (CAI) برابر با ۰/۹۲ (الف) و محتوای GC برابر با ۴۲/۳۲ درصد است (ب).

Figure 2- Analysis of the designed sequence by Genscript server. The codon compatibility index (CAI) is 0.92 (a) and the GC content is 42.32% (b).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]



شکل ۳- ساختار ثانویه پیش‌بینی شده برای RNA حاصل از رونویسی ژن طراحی شده بوسیله نرم‌افزار RNA fold. موقعیت کدون آغاز و انتهای '۵ و '۳ مولکول mRNA روی شکل نشان داده شده است.

Figure 3- Predicted secondary structure of RNA transcribed from the designed gene by RNA fold software. The position of the start codon and 5' and 3' ends of mRNA molecule shown on the figure.

بررسی ساختار RNA و خصوصیات پپتید حاصل از ژن طراحی شده

پیش‌بینی ساختار ثانویه رونوشت تولید شده از ژن طراحی شده بوسیله نرم‌افزار RNA fold و براساس حداقل انرژی آزاد صورت گرفت، که میزان حداقل انرژی آزاد محاسبه شده برای RNA تولید شده ۳٤/۸۰- کیلوکالری بر مول اندازه‌گیری شد. ساختار RNA پیش‌بینی شده (شکل ۳) نشان می‌دهد که باتوجه به ایجاد ساختارهای سنجاق سری (Hairpin) و ساختار ساقه (Stem)، RNA تولید شده از پایداری خوبی برخوردار است. همچنین موقعیت قرارگیری کدون آغاز (AUG) در یک ساختار سنجاق سری با یک نوکلئوتید آزاد نیز بیانگر کارایی بالای ترجمه است.

بررسی خصوصیات پپتید حاصل از ژن *rT1* طراحی شده

خصوصیات پپتید حاصل از ترجمه ژن طراحی شده با استفاده از پایگاه ProtParam بررسی شد. در این بررسی ویژگی‌هایی نظیر وزن مولکولی، ترکیب اسیدهای‌آمینه تشکیل دهنده پروتئین، تعداد اسیدهای‌آمینه باردار مثبت و منفی، خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین، نیمه عمر، شاخص ناپایداری، انعطاف‌پذیری پروتئین، نقطه ایزوالکتریک و ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه ProtParam برای پپتید rT1 موجود در چای ترش و پپتید rT1 طراحی شده پیش‌بینی و مقایسه گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که وزن مولکولی پپتید طراحی شده با ۳۹ اسیدآمینه برابر ٤۱۳۷/۸۷ دالتون است که در مقایسه با وزن مولکولی پپتید موجود در چای ترش (۲٦۲۸/۲۱) با ۲۷ اسیدآمینه افزایش یافته است. نقطه ایزوالکتریک پپتید طراحی شده ٦/۹۸ و پپتید موجود در چای ترش ۷/۷۸ می‌باشد. در پپتید طراحی شده مجموع اسیدهای‌آمینه با بار منفی ۲ و مثبت ۲ عدد و در پپتید چای ترش به ترتیب صفر و یک عدد است. شاخص آلیفاتیک در دو پپتید طراحی شده و پپتید چای ترش به ترتیب برابر با ۸۵/۱۳ و ۱۰٤/۸۱ محاسبه شد. شاخص ناپایداری برای پپتید طراحی شده ۲۰/۹۰ و برای پپتید چای ترش ۲٤/۳۱ محاسبه شد. شاخص ناپایداری بیانگر میزان پایداری پروتئین است بطوریکه پروتئین-هایی با شاخص کمتر از ٤۰ جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند. همچنین بالا بودن شاخص آلیفاتیک حاکی از احتمال پایداری پروتئین در بازه دمایی وسیع است (Heffernan *et al.* 2015). بنابراین با کاهش شاخص ناپایداری در پپتید طراحی شده پایداری آن در سلول‌های یوکاریوتی و شرایط *in vitro* نسبت به پپتید اصلی چای ترش از ۱/۲ ساعت به ۳۰ ساعت افزایش یافته است. باتوجه به اینکه موضوع نیمه عمر و پایداری پروتئین یک چالش مهم برای بیان و ماندگاری پروتئین‌ها در سیستم‌های زیستی است، از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت پپتید طراحی شده قابلیت بیان و ماندگاری بالایی نسبت به پپتید اصلی در این سیستم‌ها دارد. این تفاوت‌ها بعلت اسیدهای‌آمینه‌ایی است که به ابتدا و انتهای پپتید طراحی شده اضافه شده‌اند. برخی از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

پارامترهای مهم مورد بررسی در پپتید طراحی شده و پپتید اصلی چای ترش در جدل ۱ آورده شده‌اند.

پیش‌بینی ساختار سوم پپتید طراحی شده

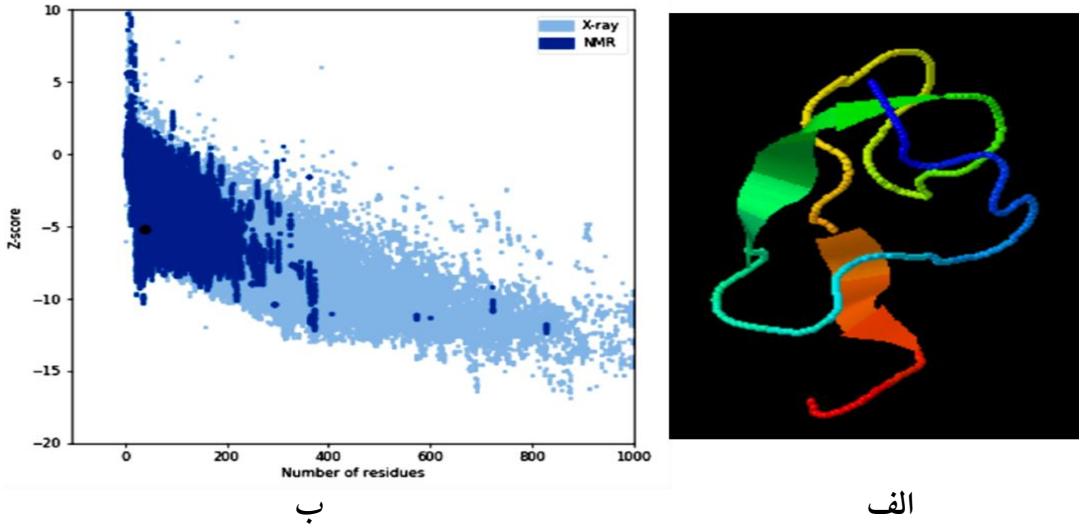
ساختار سوم پپتید طراحی شده با استفاده از سرورI-TASSER پیش‌بینی شد. تایید جهانی این سرور دلیل استفاده از آن برای پیش‌بینی ساختار سوم پپتید می‌باشد. اســـاس عملکرد سرور-I TASSERمدلســـازی ab initio است. این سرور با استفاده از بانک اطلاعاتی شبیه‌سازی خود، پایدارترین ساختار پروتئینی را با توجه به اطلاعات ذخیره شده در خود پیشنهاد می‌دهد (Yang *et al.* 2015). این سرور ۵ مدل مختلف را برای پپتید طراحی شده rT1 پیش‌بینی کرد، پایدارترین مدل پیشنهادی با C-score= -2.05 برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد (شکل ٤–الف). کیفیت مدل انتخاب شده نیز بوسیله برنامه PROSA تعیین گردید (Wiederstein and Sippl 2007). بر این اساس کیفیت ساختار پپتید در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR بود (شکل ٤–ب). همچنین سرور I-TASSER براساس پروتئین‌های موجود در PDB (Protein Data Bank)، ۱۰ پروتئین با بیشترین شباهت به خصوصیات پپتید مورد بررسی ارائه داد. پروتئین ارائه شده با بیشترین شباهت، براساس شرکت در فرایند بیولوژیکی، با شماره دسترسی P28782 و شماره GO (Gene Ontology) GO=P28782 یک پروتئین تنظیم کننده پاسخ‌های التهابی است که واکنش دفاعی فوری (توسط بافت مهره‌داران) را در برابر عفونت یا آسیب ناشی از عوامل شیمیایی یا فیزیکی تعدیل می‌کند.

جدول ۱– پیش‌بینی برخی پارامترهای مهم برای پپتید rT1 طراحی شده و پپتید اصلی گیاه چای ترش بوسیله برنامه ProtParam.

Table 1- Prediction of some important parameters for the designed peptide rT1 and the main peptide of *Hibiscus sabdariffa* by ProtParam program.

پپتید	توالی پپتید	HL(h)	PI	MW(D)	II
rT1 طراحی شده	MAHHHHHHCIPRGGICLVALSGCCNSPGCIFGICAKDEL	۳۰	٦/۹۸	٤۱۳۷/۸۷	۲۰/۹۰
rT1 اصلی	CIPRGGICLVALSGCCNSPGCIFGICA	۱/۲	۷/۷۸	۲٦۲۸/۲۱	۲٤/۳۱

HI: نیمه عمر پپتید، PI: نقطه ایزوالکتریک، MW: وزن مولکولی، II: شاخص ناپایداری.



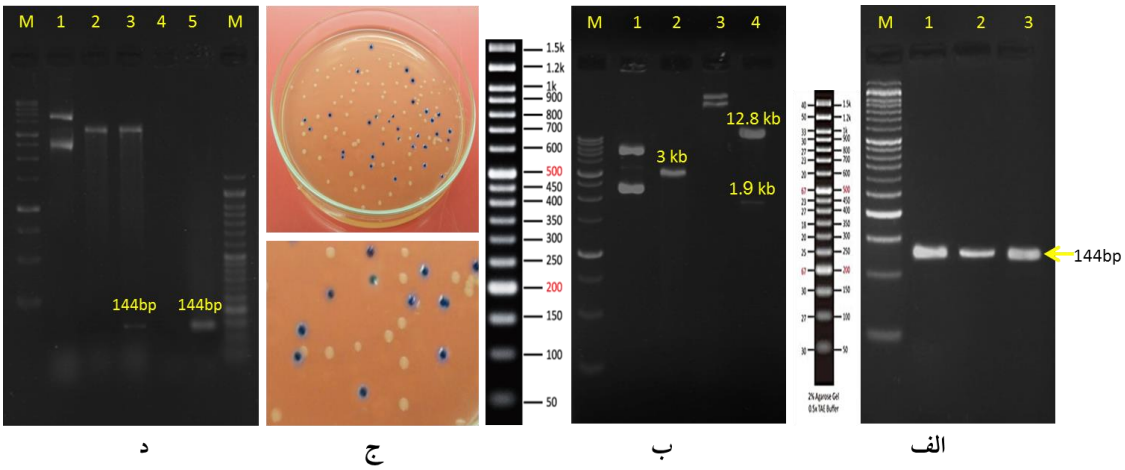
شکل ٤– پیش‌بینی ساختار سوم پپتید rT1 طراحی شده (الف)، کیفیت ساختار پپتید در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده یا تعیین ساختار شده به روش NMR (ب).

Figure 4- Predicting of third structure of the designed rT1 peptide (a), the quality of the peptide structure in the range of crystallographic proteins or structured determination by NMR method (b).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

همسانه‌سازی توالی سنتز شده ژن *rT1*

به منظور همسانه‌سازی توالی طراحی شده، ابتدا واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ابتدا و انتهای توالی (F: 5'GGATCCGCCACAATGGCTC' و R: 5'TCTAGAGGAGCTCTCAAAGC3') با هدف تکثیر توالی موردنظر انجام شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه موردنظر، محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد (شکل ۵- الف). حضور قطعه‌ای به اندازه ۱٤٤ جفت باز روی ژل بیانگر تکثیر درست این قطعه است. به منظور درج قطعه تکثیر شده در داخل حامل همسانه‌سازی pMCS5، این حامل و قطعه تکثیر شده توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I برش داده شد. به منظور اطمینان از برش حامل pMCS5، محصول واکنش هضم آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد (شکل ۵- ب). به منظور درج توالی طراحی شده در حامل pMCS5، محصول PCR و حامل pMCS5 برش یافته خالص‌سازی شدند. واکنش اتصال بین حامل همسانه‌سازی و قطعه موردنظر انجام و محصول این واکنش با روش شوک الکتریکی به باکتری *E. coli* Top 10 انتقال داده شد. برای گزینش اولیه باکتری‌های ترانسفورم شده از غربالگری آبی- سفید استفاده شد. برای این منظور باکتری‌های ترنسفورم شده روی محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر X-Gal و ۱۰۰ میلی‌مولار IPTG کشت داده شدند. از کلنی‌های سفید رشد کرده روی محیط کشت (شکل ٦- الف) استخراج پلاسمید انجام شد.



شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد، M: مارکر، ۱،۲ و ۳، قطعه ۱٤٤ جفت بازی مربوط به توالی طراحی شده را نشان می‌دهند (الف)، الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد، M: مارکر، ۱: وکتور pMCS5، ۲ وکتور pMCS5 برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I، ۳: وکتور بیانی pBI121، ٤: وکتور pBI121 برش یافته توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I (ب)، باکتری‌های *E. coli* Top 10 ترانسفورم شده با محصول اتصال، کلونی‌های سفید، کلونی‌های احتمالی حاوی وکتور نوترکیب pMCS5 (ج)، الکتروفورز محصول PCR و واکنش برش آنزیمی جهت تایید نهایی پلاسمیدهای نوترکیب pMCS5، M: مارکر، ۱: وکتور pMCS5 بدون هضم آنزیمی، ۲: وکتور pMCS5 خالی برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I، ۳: وکتور pMCS5 استخراج شده از کلونی‌های سفید برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I، ٤: محصول PCR از روی وکتور خالی pMCS5 و ۵: محصول PCR از روی وکتور pMCS5 استخراج شده از کلونی‌های سفید (د).

Figure 5- Electrophoresis of PCR product on 2% agarose gel, M: marker, 1, 2 and 3 indicate 144-bp fragment belonging to the designed sequence (a), electrophoresis of digested product by enzymatic reaction on 1% agarose gel, M: marker, 1: PMCS5 vector, 2 pMCS5 vectors digest with *Bam*HI and *Xba*I enzymes, 3: pBI121 expression vector, 4: pBI121 vector digesedt by *Bam*HI and *Sac*I enzymes (b), *E. coli* Top 10 transformed bacteria by ligation product, white colonies, potential colonies containing recombinant vector pMCS5 (c), PCR product electrophoresis and restriction enzyme digestion for final confirmation of recombinant pMCS5 plasmids, M: marker, 1: pMCS5 vector without restriction enzyme digestion, 2: nonrecombinant pMCS5 vector digested with *Bam*HI and *Xba*I enzymes, 3: extracted pMCS5 vector from white colonies digested by *Bam*HI and *Xba*I enzymes, 4: PCR product from nonrecombinant pMCS5 vector and 5: PCR product from pMCS5 vector isolated from white colonies (d).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

برای تایید نهایی پلاسمیدهای استخراج شده، از واکنش PCR و واکنش هضم آنزیمی بوسیله آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xba*I استفاده شد. محصول PCR و هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری گردید. حضور قطعه ۱٤٤ جفت بازی برای هر دو واکنش بیانگر درج توالی طراحی شده در ناحیه MCS (Multiple Cloning Site) حامل pMCS5 بود.

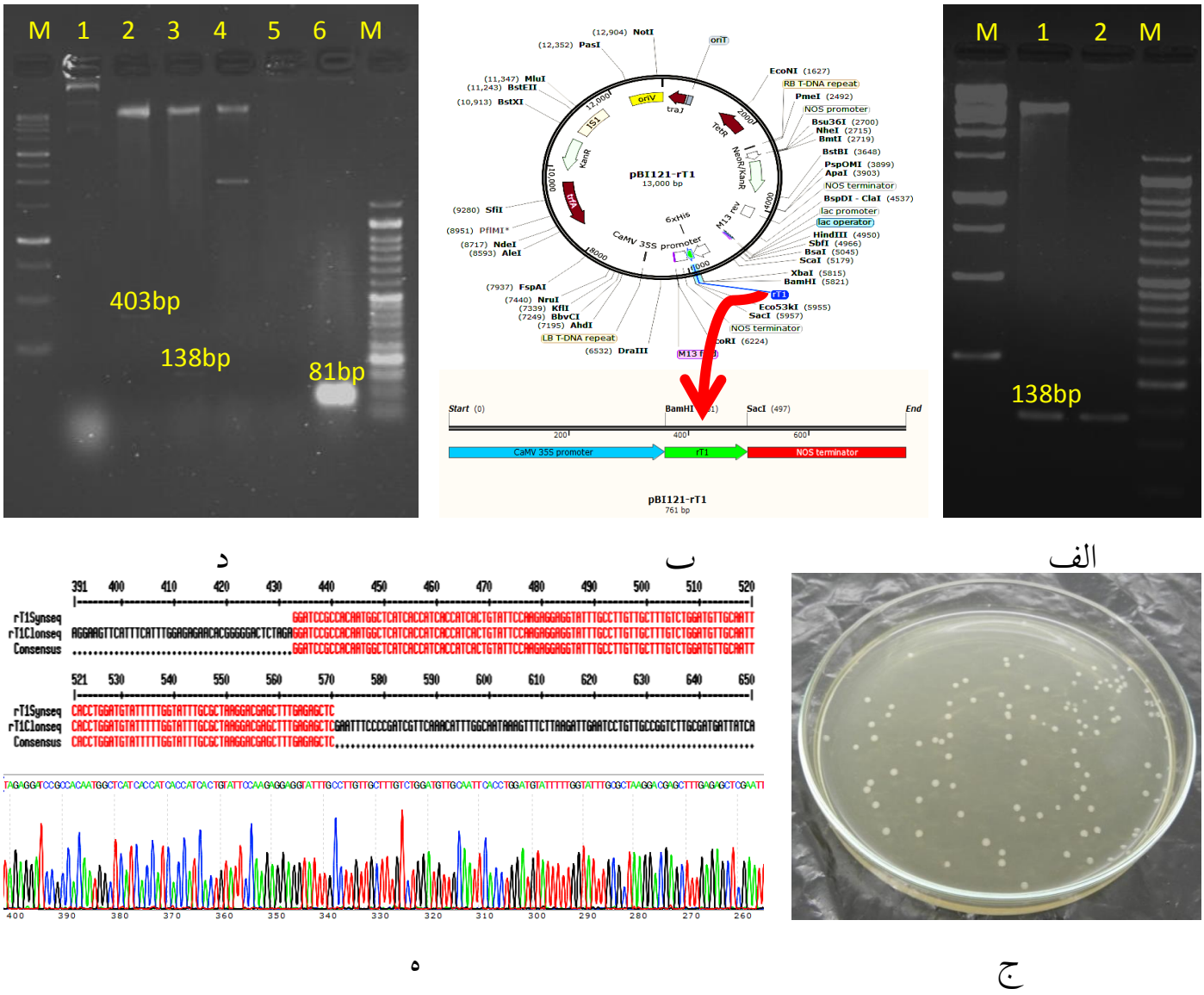
زیرهمسانه‌سازی توالی موردنظر در ناقل بیانی pBI121

زیر همسانه‌سازی توالی طراحی شده ژن *rT1* در ناقل بیانی pBI121 با هدف بیان این ژن در گیاه، بعنوان یک پپتید نوترکیب با پتانسیل دارویی بالا ارزشمند است. برای این منظور وکتور نوترکیب pMCS5 حاوی ژن *rT1* توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد با نقطه ذوب پایین بارگذاری شد (شکل ٦- الف). قطعه ۱٤٤ جفت بازی جدا شده از وکتور pMCS5 بوسیله کیت تخلیص DNA از ژل (شرکت بایونیر) از روی ژل جدا و خالص‌سازی شد. وکتور بیانی pBI121 نیز با آنزیم‌های مشابه برش داده شد (شکل ٥- ب- چاهک ٤). چارچوب وکتور بیانی pBI121 که بعد از جدا شدن قطعه ۱۸۹٤ جفت بازی حدود ۱۲/۸ کیلو باز باقی مانده بود مطابق قطعه ۱٤٤ جفت بازی از روی ژل جداسازی شد. به‌منظوز زیرهمسانه‌سازی و درج توالی طراحی شده ژن *rT1* جدا شده از وکتور pMCS5 در ناقل بیانی pBI121 واکنش اتصال بین ناقل بیانی و توالی موردنظر انجام شد. شکل ٦-ب واکنش اتصال توالی طراحی شده (ژن *rT1*) را در وکتور pBI121 نشان می‌دهد. مطابق مرحله همسانه‌سازی محصول واکنش اتصال به باکتری *E. coli* Top 10 به روش شوک الکتریکی ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB جامد حاوی ٥٠ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. از کلونی‌های رشد کرده روی محیط کشت (شکل ٦- ج) پلاسمید استخراج شد. برای تایید نهایی پلاسمیدهای استخراج شده، از واکنش PCR و واکنش هضم آنزیمی بوسیله آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I و *Bam*HI و *Eco*RI استفاده شد. محصول PCR و هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱/٥ درصد بارگذاری گردید. حضور قطعه ۱۳۸ جفت بازی در محصول واکنش PCR و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I و همچنین حضور قطعه ٤٠٣ جفت بازی در محصول واکنش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI بیانگر درج ژن *rT1* در داخل ناقل بیانی pBI121 و ساخت وکتور نوترکیب pBI121-*rT1* بود (شکل ٦-د). برای اطمینان از درج صحیح توالی ژن *rT1* در ناقل pBI121 وکتور نوترکیب ساخته شده برای توالی‌یابی به شرکت Gene script ارسال گردید. بررسی نتیجه توالی‌یابی بیانگر تکثیر درست، همسانه‌سازی و زیرهمسانه-سازی مناسب ژن *rT1* در ناقل pBI121 جهت انتقال و بیان آن بعنوان یک پپتید نوترکیب در گیاهان بود (شکل ٦-ه).

در آخر لازم به ذکر است که تا به امروز هیچ گزارشی از ثبت توالی ژنی و همچنین همسانه‌سازی ژن‌های خانواده roseltide از گیاه چای ترش ثبت نشده است و پژوهش حاضر را می‌توان اولین پژوهش در زمینه همسانه‌سازی یک ژن از این خانواده پپتیدهای گیاهی نام برد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]



شکل ٦- هضم آنزیمی وکتور pMCS5 توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I به منظور جدا کردن توالی ژن *rT1* (الف)، اتصال مجازی ژن *rT1* جدا شده از وکتور pMCS5 با وکتور بیانی pBI121 (ب)، باکتری‌های ترانسفورم شده رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (ج)، تایید پلاسمیدهای نوترکیب pBI121 توسط هضم آنزیمی و واکنش PCR، M: مارکر، ۱: پلاسمید خالی pBI121، ۲: پلاسمید نوترکیب pBI121-*rT1* برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI، ۳: پلاسمید نوترکیب pBI121-*rT1* برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I، ٤: پلاسمید خالی pBI121 برش یافته با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sac*I، ٥: محصول واکنش PCR از روی پلاسمید خالی pBI121، ٦: محصول واکنش PCR از روی پلاسمید نوترکیب pBI121-*rT1* (د)، همردیفی توالی طراحی شده برای سنتز و توالی کلون شده در وکتور pBI121، رنگ قرمز بیانگر تشابه ۱۰۰ درصدی توالی طراحی و کلون شده است (ه).

Figure 6- Restriction enzyme digestion of pMCS5 vector by *Bam*HI and *Sac*I enzymes to isolate *rT1* gene sequence (a), virtual ligation of *rT1* gene isolated from pMCS5 vector to pBI121 expression vector (b), transformed bacteria grown on LB medium containing 50 mg/L kanamycin (c), confirmation of pBI121 recombinant plasmids by restriction enzyme digestion and PCR reaction, M: marker, 1: pBI121 intact plasmid, 2: recombinant pBI121-*rT1* plasmid digested by *Bam*HI and *Eco*RI enzymes, 3: recombinant pBI121-*rT1* plasmid digested with *Bam*HI and *Sac*I enzymes, 4: intact pBI121 plasmid digested with *Bam*HI and *Sac*I enzymes, 5: PCR product from intact plasmid pBI121, 6: PCR product from recombinant pBI121-*rT1* plasmid (d), alignment of designed sequence for synthesis and cloned sequence in pBI121 vector, red color indicates 100% similarity between designed and cloned sequences (E).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

منابع

Ajay M, Chai H, Mustafa A, Gilani AH, Mustafa MR. 2007. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of Hibiscus sabdariffa L. calyces. Journal of Ethnopharmacology 109: 388-393.

Ali BH, Wabel NA, Blunden G. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 19: 369-375.

Ali MK, Ashraf A, Biswas NN, Karmakar UK, Afroz S. 2011. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic calyx extract of Hibiscus sabdariffa Linn.(Malvaceae) in mice. Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese integrative medicine 9: 626-631.

Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Jain PA, Ramkete PW, Kayastha AM, Singh VK. 2016. MFPPI–multi FASTA ProtParam interface. Bioinformation 12: 74.

Heffernan R, Paliwal K, Lyons J, Dehzangi A, Sharma A, Wang J, Sattar A, Yang Y, Zhou Y. 2015. Improving prediction of secondary structure, local backbone angles and solvent accessible surface area of proteins by iterative deep learning. Scientific reports 5: 1-11.

Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Ávila-Castro P, Herrera-Álvarez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A, Román-Ramos R, Ponce-Monter H, Tortoriello J. 2007. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of Hibiscus sabdariffa on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. Planta medica 73: 6-12.

Jiménez-Ferrer E, Alarcón-Alonso J, Aguilar-Rojas A, Zamilpa A, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M. 2012. Diuretic effect of compounds from Hibiscus sabdariffa by modulation of the aldosterone activity. Planta medica 78: 1893-1898.

Julin DA. 2018. Blue/White Selection. Pages 72-73 in Wells RD, Bond JS, Klinman J, Masters BSS, eds. Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference. New York, NY: Springer New York.

Kam A, Loo S, Dutta B, Sze SK, Tam JP. 2019. Plant-derived mitochondria-targeting cysteine-rich peptide modulates cellular bioenergetics. J Biol Chem 294: 4000-4011.

Loo S, Kam A, Xiao T, Nguyen GK, Liu CF, Tam JP. 2016. Identification and characterization of roseltide, a knottin-type neutrophil elastase inhibitor derived from Hibiscus sabdariffa. Scientific reports 6: 39401.

Wiederstein M, Sippl MJ. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic acids research 35: W407-W410.

Wilson F, Menzel MY. 1964. Kenaf (Hibiscus cannabinus), roselle (Hibiscus sabdariffa). Economic Botany 18: 80-91.

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature methods 12: 7-8.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

Bioinformatics design and cloning of *Hibiscus sabdariffa rT1* gene for construction of pBI121-*rT1* recombinant vector in order to expression in plants

Amin Sahandi Khalifeh Kandy and Fatemeh Dehghan Nayeri*

Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

*Corresponding Author, Email: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

Abstract

Respiratory diseases and pneumonia are among the most common diseases affecting more than 50% of the world's population. Various drugs have been developed to prevent and treat these diseases. rT1 peptide is a plant peptide isolated from the medicinal plant of *Hibiscus sabdariffa*. This 27-amino-acid peptide with inhibitory properties of human neutrophil elastase has been shown to have drug potential in the prevention and treatment of inflammatory lung diseases. Due to the high economic value of the compounds with neutrophil elastase inhibitory properties, in this study, for the first time, recombinant expression vector pBI121-*rT1* was constructed with the aim of expressing rT1 peptide in plants. Because of the lack of *rT1* gene sequence in databases, first, its appropriate gene sequence was designed and synthesized based on the *Nicotiana tubaccum* codon usage, the vectors used in this research, the structure and stability of its transcript and characteristics of the produced protein. For the designed sequence, the Codon Adaptation Index (CAI) and the GC frequency were 0.92 and 42.32%, respectively. In comparison to the main peptide, the stability of the designed peptide in human cells increased 25 times and its instability index calculated to be 20.90. Following amplification of the synthesized sequence by PCR reaction, it was cloned into pMCS5 vector. In order to express in plant-based systems, sub-cloning was performed in the expression vector pBI121 under the CaMV 35S promoter.

Keywords: respiratory inflammation, rT1 peptide, *Hibiscus sabdariffa*, neutrophil elastase inhibitor, pBI121-*rT1*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.1.1]