

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهراء (س) است.

چکیده

سیکلوتیدها خانواده بزرگی از پپتیدهای گیاهی هستند که در خانواده‌های گیاهی *Violaceae*، *Rubiaceae*، *Cucurbitaceae* و *Fabaceae* بیان می‌شوند. ساختار این پپتیدهای کوچک به طور متوسط از ۳۰ اسیدآمینو تشکیل شده و شامل موتیف گره سیستینی حلقوی (CCK) می‌باشد. باور بر اینست که سیکلوتیدها به واسطه اثرات حشره کشی، نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان ایفا می‌کنند. سیکلوتیدها به دلیل فعالیت‌های زیستی متعدد از جمله ضد ویروس، ضد قارچ، ضد باکتری، ضد کرم، ضد آفات، ضد سرطان و... و نیز ساختار منحصر به فرد خود مورد علاقه‌ی محققین برای مهندسی پروتئین به منظور کاربردهای دارویی و کشاورزی می‌باشند. این پپتیدهای حلقوی محصولات ژنی طبیعی بوده و سنتز ریبوزومی دارند. از این رو مطالعه و توالی‌یابی ساختارهای ژنتیکی این پپتیدها حائز اهمیت است. در این مطالعه شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی از گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor*)، با استفاده از غربالگری cdNA و همسانه سازی قطعات به دست آمده، صورت گرفته است. نتایج حاصل از این بخش، شناسایی پیش ساز ژنی سیکلوتیدی جدیدی را در پی داشت که تاکنون شناخته نشده بود. استخراج و خالص سازی نسبی سیکلوتیدها از گیاه مورد مطالعه نیز با استفاده از روش *Solid Phase Extraction* انجام شده و با روش‌های برادفورد و *tricine-SDS PAGE* بررسی و تایید گردید. اثرات ضد میکروبی عصاره‌های تام و سیکلوتیدهای خالص شده نیز به روش انتشار شعاعی از چاهک روی سویه‌های استاندارد بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین تاثیر روی باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد.

فهرست

۱	فصل اول مقدمه.....
۲	۱-۱ پتیدهای گیاهی.....
۲	۱-۱-۱ پتیدهای حلقوی در گیاهان.....
۴	۲-۱-۱ پتیدهای ضد میکروبی گیاهی.....
۵	۳-۱-۱ ساختار و فعالیتهای پتیدهای حلقوی طبیعی.....
۵	۲-۱ سیکلوتیدها.....
۶	۱-۲-۱ تاریخچه کشف سیکلوتیدها.....
۷	۲-۲-۱ مطالعات پیشسازهای زنی سیکلوتیدی.....
۹	۳-۲-۱ مطالعه ساختار و توپولوژی سیکلوتیدها.....
۱۱	۱-۳-۲-۱ چارچوب سیکلوتیدی و تغییر در پتانسیل درمانی.....
۱۲	۲-۳-۲-۱ چارچوب های سیکلوتیدی کاهش یافته.....
۱۵	۴-۲-۱ فعالیتهای زیستی سیکلوتیدها.....
۱۶	۱-۴-۲-۱ فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها.....
۱۷	۲-۴-۲-۱ فعالیت ضد-HIV.....
۱۸	۳-۴-۲-۱ فعالیت ضد سرطانی.....
۱۹	۴-۴-۲-۱ فعالیت کرمکشی.....

- ۲۰.....۵-۲-۱ سنتز شیمیایی و بیولوژیکی سیکلوتیدها
- ۲۱.....۶-۲-۱ بررسی انعطاف پذیری ساختاری سیکلوتیدها
- ۲۳.....۷-۲-۱ سیکلوتیدهای پیوندی دارویی
- ۲۵.....۱-۳-۱ گونه گیاهی بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor L.*)
- ۲۶.....۱-۱-۳-۱ گیاه شناسی
- ۲۷.....۲-۱-۳-۱ ترکیبات شیمیایی
- ۲۷.....۳-۱-۳-۱ خواص دارویی
- ۲۸.....۲-۳-۱ پیشینه مطالعات سیکلوتیدی و ضد میکروبی گونه بنفشه سهرنگ
- ۲۹.....۴-۱ همسانه سازی ژن
- ۳۰.....۱-۴-۱ همسانه سازی با استفاده از وکتور pUC19
- ۳۱.....۵-۱ استخراج سیکلوتیدها
- ۳۲.....۶-۱ اهداف و اهمیت پژوهش
- ۳۵ فصل دوم
- ۳۵ مواد و روشها
- ۳۶.....۱-۲ بخش اول: شناسایی ژنهای سیکلوتیدی
- ۳۶.....۱-۱-۲ ابزار، وسایل، کیت ها و مواد مورد استفاده در این بخش:
- ۳۸.....۲-۱-۲ گونه‌ی گیاهی مورد مطالعه

- ۳۸..... ۳-۱-۲ پرایمرهای مورد استفاده.....
- ۴۰..... ۴-۱-۲ مراحل انجام مطالعات مولکولی.....
- ۴۰..... ۱-۴-۱-۲ استخراج RNA تام از بافت زنده گیاهی.....
- ۴۱..... ۲-۴-۱-۲ سنجش غلظت و خلوص RNA به وسیله اسپکتروفوتومتر.....
- ۴۲..... ۳-۴-۱-۲ ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز.....
- ۴۳..... ۴-۴-۱-۲ واکنش نسخه برداری معکوس و سنتز cDNA.....
- ۴۴..... ۵-۴-۱-۲ تکثیر cDNA مورد نظر و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
- ۴۶..... ۶-۴-۱-۲ تخلیص باند اختصاصی از ژل آگاروز.....
- ۴۸..... ۷-۴-۱-۲ همسانه سازی ژن خالص شده.....
- ۵۷..... ۲-۲ بخش دوم: استخراج سیکلوتید.....
- ۵۷..... ۱-۲-۲ ابزار، وسایل و مواد مورد استفاده در این بخش:.....
- ۵۹..... ۲-۲-۲ گونه گیاهی مورد استفاده.....
- ۵۹..... ۳-۲-۲ مراحل تخلیص پپتید به صورت گام به گام.....
- ۵۹..... ۱-۳-۲-۲ استخراج سیکلوتید.....
- ۶۳..... ۲-۳-۲-۲ سنجش پروتئین به روش بردفورد.....
- ۶۴..... ۳-۳-۲-۲ تعیین میزان خلوص نمونه پپتیدی با روش Tricine-PAGE:.....
- ۶۸..... ۳-۲ بخش سوم: بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها.....

۶۸.....	۲-۳-۱ ابزار و تجهیزات لازم.....
۶۸.....	۲-۳-۲ مواد مورد نیاز.....
۶۹.....	۲-۳-۳ سویه‌های به کار رفته در سنجش اثرات ضد میکروبی.....
۷۱.....	۲-۳-۴ روش کار تعیین اثرات ضد میکروبی.....
۷۳	فصل سوم.....
۷۳	نتایج.....
۷۳.....	۳-۱ شناسایی ژن.....
۷۳.....	۳-۱-۱ استخراج RNA تام از برگ و گل‌های گونه‌ی مورد مطالعه.....
۷۴.....	۳-۱-۲ شناسایی ژنهای مورد نظر.....
۷۵.....	۳-۱-۳ همسانه سازی ژنهای تکثیر یافته.....
۷۶.....	۳-۱-۳-۱ نتایج ایجاد سلول مستعد از سویه <i>Escherichia coli</i> DH5α.....
۷۶.....	۳-۱-۳-۲ آماده سازی حامل پلاسمیدی pUC19 و انجام واکنش الحاق.....
۷۶.....	۳-۱-۳-۳ نتایج حاصل از انتقال حامل درون سلول مستعد.....
۷۸.....	۳-۱-۳-۳ تایید انجام نو ترکیبی و استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب.....
۷۸.....	۳-۱-۴ تحلیل نتایج حاصل از تعیین توالی پلاسمیدهای ارسالی.....
۹۲.....	۳-۱-۴-۱ نتایج مقایسه توالی به دست آمده با سیکلوتیدها.....
۹۳.....	۳-۱-۴-۲ مطالعه مدل سازی بر پایه شباهت توالی.....

۲-۳	جداسازی و تخلیص سیکلوتید.....	۹۶
۱-۲-۳	بررسی وزن مولکولی سیکلوتید استخراج شده.....	۹۶
۲-۲-۳	تعیین مقدار پپتید با روش بردفورد (Bradford).....	۹۷
۳-۲-۳	بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها.....	۹۸
۱۰۳	فصل چهارم.....	
۱۰۳	بحث و نتیجه گیری.....	
۱-۴	شناسایی ژنهای سیکلوتیدی.....	۱۰۴
۲-۴	روشهای استخراج سیکلوتیدها.....	۱۱۰
۳-۴	مطالعات انجام شده روی فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها.....	۱۱۴
۴-۴	پیشنهادها.....	۱۱۸
۱۲۱	منابع.....	

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

۳پپتیدهای حلقوی طبیعی	شکل ۱-۱
۷توالی و ساختار Kalata B1	شکل ۲-۱
۹مطالعه‌ی مقایسه‌ای پیش‌سازهای ژنی سیکلوتیدی	شکل ۳-۱
۱۰bracelet و mobius ساختار و توالی سیکلوتیدهای	شکل ۴-۱
۱۳توپولوژی‌های چارچوب عمومی سیکلوتیدی	شکل ۵-۱
۲۴خلاصه‌ای از برخی تغییرات انجام شده در MCoTI-I و kalata B1	شکل ۶-۱
۲۶گونه‌ی بنفشه سه‌رنگ (<i>Viola tricolor</i>)	شکل ۷-۱
۳۰پلاسمید pUC19	شکل ۸-۱
۳۲مراحل انجام عصاره‌گیری و تخلیص سیکلوتیدها	شکل ۹-۱
۶۳اشکال مختلف رنگ کوماسی بلو G-250	شکل ۱-۲
۷۳بارگذاری RNA تام گل بر روی ژل آگارز	شکل ۱-۳
۷۴بارگذاری ژن‌های سیکلوتیدی تکثیر یافته با آنزیم Pfu	شکل ۲-۳
۷۵بارگذاری قطعات DNA تکثیر یافته با آنزیم Taq	شکل ۳-۳
۷۷پلیت حاوی کلونی‌های سفید شامل پلاسمید نوترکیب	شکل ۴-۳
۷۷کشت تاییدی مجدد از کلونی‌های سفید انتخاب شد	شکل ۵-۳
۷۸باند مشخص شده با فلش سفید رنگ مربوط به PCR تایید کننده	شکل ۶-۳
۸۳همترازی توالی پروتئینی به دست آمده از این پژوهش	شکل ۷-۳
۸۴نمای گرافیکی پروتئین فرضی ناشناخته از گونه‌ی انگور قرمز	شکل ۸-۳

۸۵ همترازی ژن تعیین توالی شده در این پژوهش با ژن همسان	شکل ۳-۹
۸۶ توالی پروتئینی حاصل از ژن به دست آمده در این پژوهش	شکل ۳-۱۰
۸۷ همترازی ساختار مربوط به دو موتیف انگشت روی از توالی ما	شکل ۳-۱۱
۸۸ همترازی چندگانه پروتئین فرضی حاصل از ژن مورد مطالعه ما	شکل ۳-۱۲
۹۲	هم ترازی پروتئین مفروض ما (Query) با پیش ساز سیکلوتیدی تریسیکلون	شکل ۳-۱۳
۹۲	هم ترازی پروتئین مفروض ما (Query) با سیکلوتید سیکلوویولاسین O24	شکل ۳-۱۴
۹۳ هم ترازی ناحیه سیکلوتید مانند از پروتئین مورد بررسی ما	شکل ۳-۱۵
۹۴ مدلسازی با استفاده از الگوی سیکلوتیدی سیکلوویولاسین O14	شکل ۳-۱۶
۹۵ پیتید مدلسازی شده	شکل ۳-۱۷
۹۶ تصویر Tricine-PAGE ستون	شکل ۳-۱۸
۹۹ اثر ضد میکروبی عصاره های تام اتانولی	شکل ۳-۱۹
۱۰۰ تاثیر فاز بوتانولی و برخی محلول های حاصل از شستشوی ستون	شکل ۳-۲۰
۱۱۰ پروتئین پیش ساز فرضی حاصل از این مطالعه	شکل ۴-۱
۱۱۲ غربالسازی سیکلوتیدها	شکل ۴-۲
۱۱۳ مراحل استخراج سیکلوتیدها در این پژوهش	شکل ۴-۳
۶ ابزار مورد استفاده در بخش پژوهش مولکولی	جدول ۲-۱
۳۷ کیت های مورد استفاده در بخش مولکولی	جدول ۲-۲
۳۷ آنزیم های مورد استفاده در بخش مولکولی پژوهش	جدول ۲-۳
۳۷ مواد مورد استفاده	جدول ۲-۴

جدول ۲-۵	سویه مورد استفاده در بخش مطالعات مولکولی	۳۸
جدول ۲-۶	توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده	۳۹
جدول ۲-۷	مقادیر و ترکیبات واکنش PCR به منظور شناسایی ژن سیکلوتیدها	۴۵
جدول ۲-۸	برنامه زمانی و دمایی PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده	۴۶
جدول ۲-۹	دستگاه‌های مورد استفاده در تخلیص پپتید	۵۷
جدول ۲-۱۰	مواد مورد استفاده در تخلیص پپتید	۵۸
جدول ۲-۱۱	بافرهای لازم جهت انجام Tiricine SDS PAGE	۶۶
جدول ۲-۱۲	مقادیر مورد نیاز از محلول‌ها و بافرهای تهیه شده برای ژل کوچک	۶۷
جدول ۲-۱۳	دستگاه‌های مورد استفاده در بررسی اثرات ضد میکروبی	۶۸
جدول ۲-۱۴	مواد و محلول‌های مورد استفاده در بررسی اثرات ضد میکروبی	۶۸
جدول ۲-۱۵	سویه‌های به کار رفته جهت تعیین اثرات ضد میکروبی	۶۹
جدول ۳-۱	کیفیت RNA استخراج شده	۷۳
جدول ۳-۲	قطر هاله عدم رشد برحسب (mm)	۱۰۱
نمودار ۳-۱	منحنی استاندارد لگاریتم وزن مولکولی بر حسب Rf	۹۷
نمودار ۳-۲	منحنی استاندارد سنجش میزان پروتئین	۹۷
پیوست-۱	نمودار مربوط به تعیین توالی	۱۱۹

جدول اختصارات

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumin
CCK	Cyclic Cystine Knot
CDD	Conserved domains database
cDNA	Complementary DNA
CFU	colony-forming unit
CK	Cystine Knot
DCM	Dichloromethane
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dT₂₀	Deoxy Timidine ₂₀
EtOH	Ethanol
E-value	Expect-value
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High-performance liquid chromatography
LB	Lauria Bertany
LE	Low electrodensity
MCoTI	<i>Momordica cochinchinensis</i> trypsin inhibitor
MCS	multiple cloning site
MHA	Muller Hinton Agar
MHB	Muller Hinton Broth
mRNA	Messenger RNA
NA	Nutrient Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTR	N-terminal Repeat Fragments
PCR	Polymerase chain reaction
Pdb	Protein data bank
PE	Phosphatidylethanolamine
Pfu	Pyrococcus furiosus-polymerase
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RDA	Radial diffusion assay
RMSD	root-mean-square deviation
RNA	ribonucleic acid

RT	Reverse Transcriptase
RTD1	Rhesus theta defensin1
SAR	Structure activity relationship
SFTI	sunflower trypsin inhibitor
SPE	Solid phase extraction
Taq	Thermus aquaticus- polymerase
TBE	Tris/Borate/EDTA
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

فصل اول

مقدمه

۱-۱ پتیدهای گیاهی

از جمله پتیدهای گیاهی مورد بررسی پتیدهای حلقوی و پتیدهای ضد میکروبی گیاهی می‌باشند. پتیدهای حلقوی در همه سلسله‌های موجودات بیان و در ریپوزوم ساخته می‌شوند (شکل ۱-۱). اندازه آنها بین ۷ تا ۷۸ اسیدآمینو متفاوت است. بسیاری از این پتیدها علاوه بر دارا بودن ساختار حلقوی سر- دم، شامل یک یا چند پیوند دی‌سولفید نیز هستند. ویژگی‌های عمومی آنها پایداری استثنایی در برابر عوامل شیمیایی و حرارتی است و در سیستم دفاعی موجود میزبان نیز نقش دارند. پتیدهای حلقوی به دلیل پایداری منحصر به فرد خود می‌توانند در محیط‌های بیولوژیک بسیار سخت فعال بمانند به همین دلیل گزینه‌های مناسبی برای طراحی دارو هستند.

پتیدهای ضد میکروبی یک نوع سیستم دفاعی ذاتی در همه اشکال حیات هستند که در موجودات زنده از باکتری‌ها تا گیاهان، بی‌مهرگان، مهره دارن و انسان وجود دارند. پتیدهای ضد میکروبی در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها، بعضی انگل‌ها و ویروس‌ها فعالیت ضد میکروبی نشان می‌دهند اما ممکن است اهمیت این فعالیت‌ها در دفاع از میزبان، بین موجودات مختلف یا حتی در بخش‌های مختلف درون یک موجود، متفاوت باشد. پتیدهای ضد میکروبی ممکن است به طور دائم بیان شوند یا اینکه در شرایط خاص و در پاسخ به عامل بیماری‌زا تولید شوند (موسوی نژاد و همکاران، ۱۳۹۰).

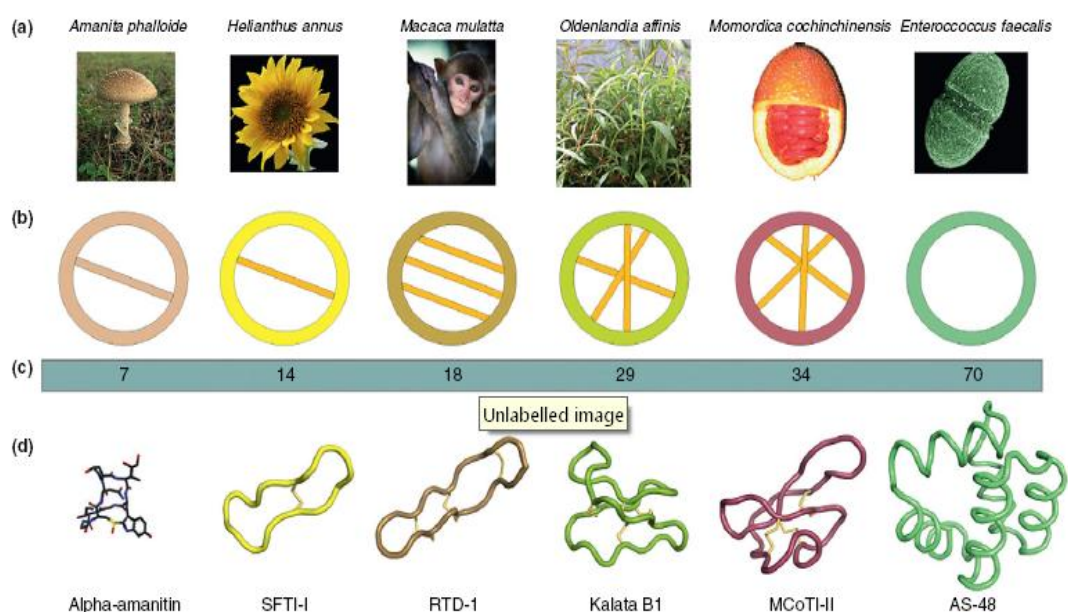
۱-۱-۱ پتیدهای حلقوی در گیاهان

پتیدهای حلقوی در گیاهان را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد:

۱- بازدارنده‌های تریپسین آفتابگردان

۲- سیکلوتیدها

بازدارنده تریپسین آفتابگردان (SFTI-1) یک پپتید ۱۴ اسیدآمینه‌ای و واجد یک پیوند دی سولفیدی است که از دانه گیاه آفتاب جدا شده و توانایی بازدارندگی تریپسین را دارد. سیکلوتیدها بزرگترین دسته پپتیدهای حلقوی گیاهی هستند و در بیش از ۲۰ گونه از خانواده‌های *Violaceae*، *Rubiaceae*، *Cucurbitaceae* و *Fabaceae* گزارش شده‌اند (Thorstholm and Craik., 2011).



شکل ۱-۱. پپتیدهای حلقوی طبیعی. (a) نام و تصویر موجوداتی که پپتیدهای حلقوی در آنها بیان می‌شود. (b) نمای شماتیک اسکلت حلقوی و اتصالات درون مولکولی شامل پیوندهای دی سولفید نشان داده شده است. آرایش سه پیوند دی سولفید در *kalata B1* و *MCoTI-II* به فرم سیستمین نوت است ولی در *RTD-1* به فرم سیستمین لدر است. شایان ذکر است که *alpha-amanitin* پیوند دی سولفید ندارد ولی به جای آن اتصالات کووالانسی بین سیستمین و تریپتوفان دارد (c) تعداد آمینواسیدها در اسکلت (d) شمای سه بعدی پپتیدهای حلقوی انتخاب شده (Thorstholm and Craik., 2011).

۲-۱-۱ پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی

گروه دیگری از ترکیبات ضد میکروبی گیاهان، پپتیدهای کوچکی هستند که تعداد زیادی پیوند دی سولفیدی دارند. در سال ۱۹۹۷ Broekaert این پپتیدها را بر اساس شباهت توالی، پیوندهای دی سولفید و ویژگی‌های ساختاری به ۵ خانواده بزرگ تقسیم کرده است. این گروه شامل پپتیدهای Knottin-type بوده که بر خلاف سیکلوتیدها، ساختار غیرحلقوی دارند. مشخص‌ترین عضو این خانواده، پپتیدهای ضد میکروبی هستند که در دانه *Amaranthus caudatus* و *Mirabilis jalapa* تولید می‌شوند. این پپتیدها طیف وسیعی از بازدارندگی علیه قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت را دارند و فعالیت آنها با افزودن کاتیون‌های دو ظرفیتی متوقف می‌شود. برخلاف این پپتیدها، سیکلوتیدها فعالیت ضد میکروبی وسیعی ندارند (Gruber et al., 2007).

برخی از این پپتیدها به طور ویژه‌ای روی باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی فعالیت دارند، اما اغلب آنها قادر به مهار فعالیت هر دو گروه باکتریایی می‌باشند. بنابراین، در حال حاضر هیچ راهی برای پیش‌بینی ویژه بودن فعالیت هر پپتید ضد میکروبی ارائه شده وجود ندارد. گزارش اندکی پیرامون ساختارهای سوم چنین پپتیدهایی صورت گرفته است. با این وجود، مطالعات نرم افزاری و کامپیوتری (*in silico*) نشان داده است که پپتیدهای ضد-میکروبی گیاهی علی‌رغم اختلافات در توالی اسیدآمینه‌ای اولیه مربوط به اعضای خانواده پروتئینی خود، شباهت‌هایی را در ساختار سه-بعدي نشان می‌دهند. دانش ساختار سوم، می‌تواند بینش‌های جدیدی در مکانیسم عملکرد علیه باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد کند. به علاوه، توصیف مکانیسم عملکرد برای این پپتیدهای ضد میکروبی پیشنهاد کننده اینست که این پپتیدها

ممکن است یک برهمکنش قوی با فسفولیپیدهای غشایی باکتری‌های بیماری‌زا داشته باشند. عواملی نظیر حجم مولکولی، توانایی تجمع و خودگرایی روی سطح غشا برای فعالیت علیه باکتری‌ها ضروری هستند (Pelegriani *et al.*, 2007).

۳-۱-۱ ساختار و فعالیت‌های پپتیدهای حلقوی طبیعی

پپتیدهای حلقوی طبیعی در ساختار و اندازه بسیار متفاوت هستند، کوچکترین آنها در قارچ‌ها شامل ۷ اسیدآمینو و بزرگترین آنها در باکتری‌ها شامل ۷۸ اسیدآمینو است (شکل ۱-۱). ولی ویژگی‌های عمومی متعددی در این پپتیدها وجود دارد از جمله ساختارهای کاملاً معین، پایداری بسیار بالا و فعالیت‌های زیستی که نقش محوری در دفاع موجود میزبان دارند. دفاع میزبانی، در باکتری‌ها باعث محافظت باکتری در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها می‌شود و ایمنی قارچ‌ها و گیاهان را نسبت به مهاجم‌ها موجب شده و جانوران را علیه بیماری‌ها مصون می‌کند (Thorsthalm and Craik., 2011).

۲-۱ سیکلوتیدها

در حال حاضر بیش از ۲۰۰ توالی سیکلوتیدی در Cybase، پایگاه اطلاعاتی اختصاص داده شده به پروتئین‌های حلقوی (<http://www.cybase.org.au/>) فهرست شده است، اما تخمین زده می‌شود که تعداد سیکلوتیدهای موجود در طبیعت ممکن است به ۵۰۰۰۰۰ برسد (Wang *et al.*, 2008). با وجود این تنوع بالقوه بزرگ، می‌توان سیکلوتیدها را به عنوان یک الگوی ترکیبی طبیعی که در آن تغییرات توالی در شش حلقه ساختمانی ما بین شش باقیمانده سیستمی حفاظت شده رخ می‌دهد در نظر گرفت (Craik *et al.*, 2006). شکل ۲-۱ این تنوع ترکیبی را نشان می‌دهد.

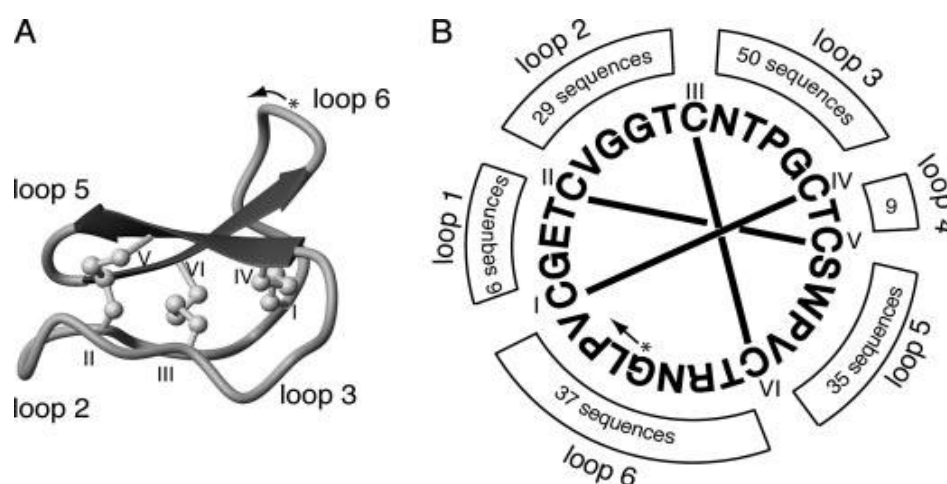
۱-۲-۱ تاریخچه کشف سیکلوتیدها

سیکلوتیدها برای اولین بار به عنوان یک خانواده منحصر به فرد از پروتئین ها در سال ۱۹۹۹ تعریف گردیدند، با نامی که از تلفیق واژگان سیکلو (cyclo) و پپتید بدست آمده و نشان دهنده‌ی ویژگی اصلی آنها یعنی ساختمان پپتیدی حلقوی از سر به دم متصل می باشد. سیکلوتیدها به علاوه یک موتیف گره سیستینی (cystine knot) ساخته شده از سه پیوند دی سولفید حفاظت شده را شامل می شوند. دو پیوند از این پیوندهای دی سولفیدی و بخش‌های ساختمان اصلی متصل کننده آنها حلقه ای را تشکیل می دهند که در ساختار پپتید جاسازی شده و توسط باندهای دی سولفیدی سوم احاطه می گردد (شکل ۱-۲). سیکلوتیدها تنها خانواده شناخته شده از پپتیدهایی هستند که ترکیبی از یک اسکلت حلقوی و یک گره سیستینی می باشند، که با هم به عنوان یک موتیف گره سیستینی حلقوی^۱ (CCK) شناخته می شوند. این موتیف ساختاری موجب پایداری استثنایی سیکلوتیدها شده و این ثبات و پایداری یک دلیل اصلی برای علاقه به این پپتیدها به عنوان داربست دارویی می باشد (Craik *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2009).

مشاهدات اولیه از کاربردهای بالقوه سیکلوتیدها به عنوان عوامل درمانی، از مطالعات غربالگری دارویی گیاهان و از گزارش‌های استفاده‌ی آنها در طب بومی آفریقا بدست آمده است. در هر دو مورد، فعالیت های دارویی قبل از شناخته شدن ساختارهای آنها کشف شده بود و علاوه بر آن، در آن زمان مشخص نبود که این مولکول های فعال زیستی، بعدها به عنوان اعضای یک خانواده بزرگ و منحصر به فرد از پپتیدهای حلقوی به رسمیت شناخته خواهند

^۱ cyclic cystine knot

شد (Gustafson *et al.*, 1994 ; Witherup *et al.*, 1994). نمونه اصلی سیکلوتیدی kalata B1 (شکل ۱-۲) است، که در ابتدا در برگ‌های گیاه آفریقایی *Oldenlandia affinis* کشف گردید. این پپتید ماده فعال در جای دارویی استفاده شده توسط زنان کنگویی برای سرعت بخشیدن به کار و تسهیل زایمان می‌باشد. Gran در اوایل دهه ۱۹۷۰ این پپتید محرک عضلات رحمی^۲ را جدا و تا حدی ترکیب اسیدآمینهای آن را مشخص نمود، اما توالی اولیه و ترتیب موتیف CCK این سیکلوتید تا ۲۰ سال بعد مشخص نشده بودند (Gran., 1970; Gran *et al.*, 1973).



شکل ۱-۲. توالی و ساختار Kalata B1. (A) نمودار ریون Kalata B1 (B) نمای شماتیک

توالی و پیوندهای دی سولفید kalata B1 (Simonsen *et al.*, 2008).

۲-۲-۱ مطالعات پیش‌سازهای ژنی سیکلوتیدی

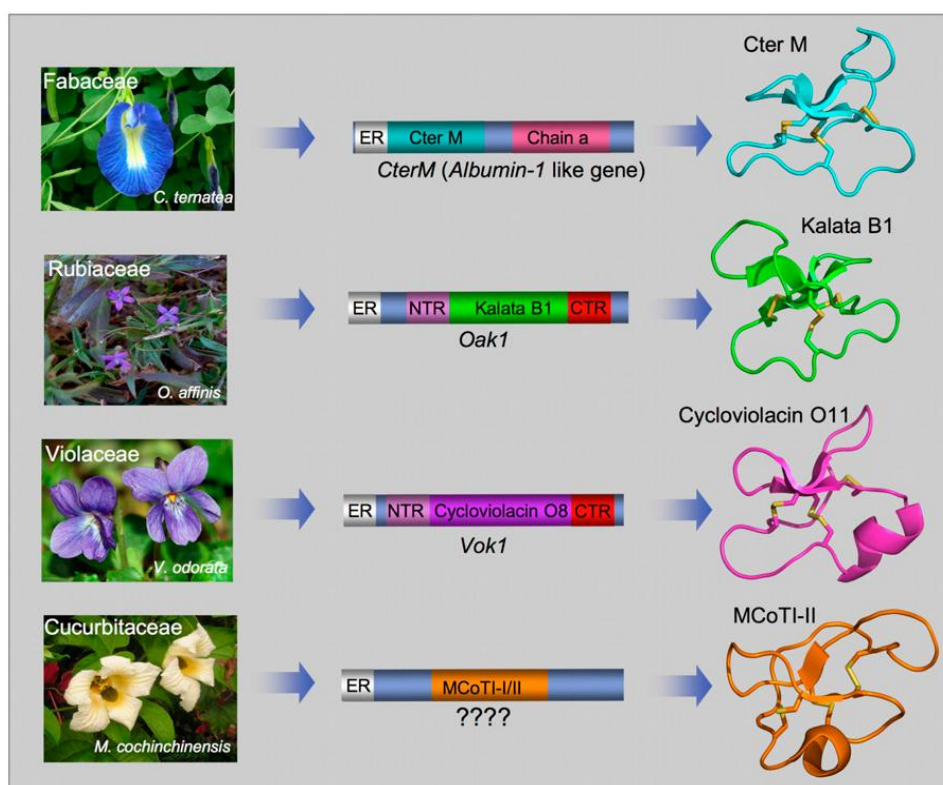
سیکلوتیدها توسط ژن‌هایی کد گذاری شده و با سیکلوتیدهای بالغی که به طور بیوسنتتیک از پروتئین‌های پیش‌ساز بزرگتر در یک فرایندی که شامل فعالیت آنزیمی مشابه با آنزیم آسپاراژینیل اندوپپتیداز می‌گردد، بریده و برداشته می‌شوند (Dutton *et al.*, 2004;)

² Uterotonic

(Saska *et al.*, 2007). نمونه هایی از این پپتیدها، در حال حاضر در گونه هایی از گیاهان خانواده های Rubiaceae (قهوه)، Violaceae (بنفشه)، Cucurbitaceae (کدو) و Fabaceae (نخود یا حبوبات)، با گیاهان منفرد شامل ده ها تا صدها سیکلوتید مختلف گزارش شده است (Gruber *et al.*, 2008; Poth *et al.*, 2011).

تمام سیکلوتیدهای گزارش شده تا کنون از خانواده های Rubiaceae و Violaceae همگی از طریق روندی مشابه از روی ژن های اختصاصی سیکلوتیدی، که در برخی موارد چندین نسخه از یک سیکلوتید و در برخی دیگر ترکیبی از توالی های سیکلوتیدی مختلف را کد می کنند، بیوسنتز می گردند (شکل ۱-۳). Poth و همکاران اخیراً نشان داده اند که توالی کد کننده سیکلوتید Cter M مجزا شده از گیاه *Clitoria ternatea*، از خانواده ی گیاهی Fabaceae، درون ژن آلومین-۱ این گیاه قرار گرفته است (شکل ۱-۳). مطالعات گونه های دیگر از این خانواده نیز وجود ژن های مشابه در برگیرنده توالی سیکلوتیدی را تایید می نماید. آلومین های گیاهی بخشی از منابع ذخیره ای مواد مغذی بوده، اما در دفاع میزبان نیز نقش دارند. ژن های عمومی آلومین-۱ در برگیرنده ی توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی و به دنبال آن یک توالی کدکننده زنجیره-b آلومین، یک رابط، و یک توالی کدکننده زنجیره-a آلومینی می-باشند. در پیش ساز کدکننده Cter M توالی سیکلوتیدی جایگزین زنجیره-b آلومینی شده است (Camarero., 2011). پیش سازهای ژنی از یک خانواده ی گیاهی شباهت های بسیاری با یکدیگر داشته و توالی های حفاظت شده ای را در برمی گیرند. توالی های پیش ساز سیکلوتیدی در خانواده بنفشه اغلب شامل توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی مشابهی می باشند که به منظور مطالعه و شناسایی هم زمان چندین توالی از اعضای این خانواده به ویژه در جنس بنفشه

(Viola) پرایمر دژنره ویژه ای برای این ناحیه طراحی می‌گردد که در این مطالعه نیز به کار رفته است (Simonsen *et al.*, 2005).

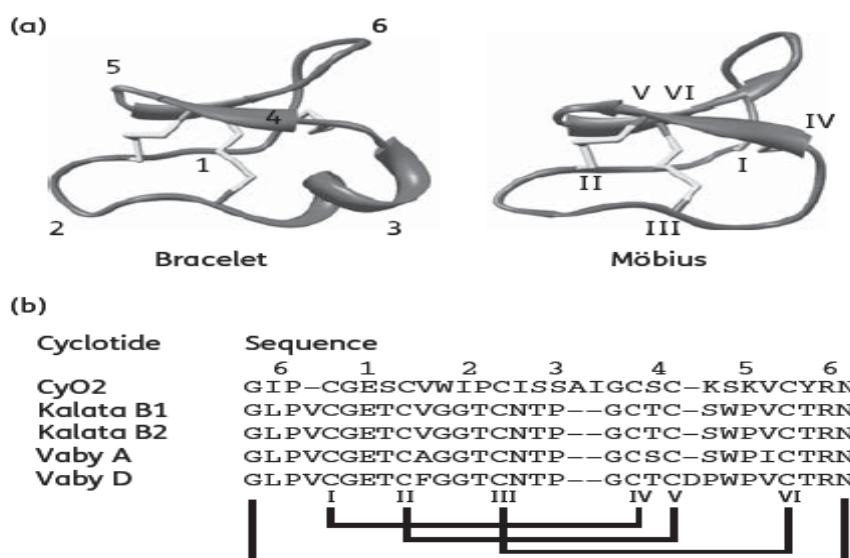


شکل ۱-۳. مطالعه‌ی مقایسه‌ای پیش‌سازهای ژنی سیکلوتیدی از خانواده‌های مختلف گیاهی و سیکلوتیدهای مربوطه (Camarero., 2011).

۱-۲-۳ مطالعه ساختار و توپولوژی سیکلوتیدها

سیکلوتیدهای شناخته شده بر اساس شباهت توالی و معیارهای توپولوژیکی به دو زیر خانواده اصلی تقسیم می‌شوند. این تقسیم بندی بر اساس حضور یا غیاب اسید آمینه سیس-پرولین در حلقه ۵ صورت می‌گیرد. به طوری که حضور پرولین دلالت بر زیر خانواده mobius دارد (شکل ۱-۴) و غیاب آن سیکلوتیدهای bracelet را باعث می‌شود. اگر چه حضور و عدم حضور cis-Proline ویژگی دو زیر خانواده را نشان می‌دهد، ولی همچنین تمایل

به شباهت بالای توالی را برای ساختارهای حلقه‌ای مختلف در این زیر خانواده‌ها با وجود تفاوت‌های جزئی موجود آشکار می‌سازد. البته تقسیم بندی در این زیرگروه‌ها با ظهور سیکلوتیدهای سنتزی مبهم شده است، چرا که ساختار و عملکرد آنها ترکیبی از ویژگی‌های سیکلوتید mobius و bracelet است. زیرخانواده کوچکتر سوم سیکلوتید بازدارنده تریپسین یا cyclic knottin می‌باشد، که تقریباً نسبت به mobius و bracelet متفاوت بوده و همچنین شامل موتیف CCK است. دو عضو این زیرخانواده هم‌سانی توالی کمی با اعضای سایر زیرخانواده‌ها دارند (Daly *et al.*, 2009; Craik *et al.*, 2006).



شکل ۱-۴. ساختار و توالی سیکلوتیدهای mobius و bracelet. (a) ساختار سیکلوتید تیبیک bracelet (cyO2; PDB 2KNM) و mobius (kalata B1; PDB 1PT4). سیستم‌های حفاظت شده از شماره ۱ تا ۶ حلقه‌ها را تشکیل می‌دهند (اتصال I-IV, II-V, III-VI). (b) توالی cyO2 و چهار سیکلوتید mobius دیگر. ویژگی mobius‌ها حضور Cis-Proline در حلقه ۵ است، در حالیکه bracelet‌ها این ویژگی را ندارند (Pränting *et al.*, 2010).

شکل ۱-۵ یک مرور کلی از توپولوژی سیکلوتیدها و مولکول های شامل گره سیستمی مرتبط که دارای پتانسیل درمانی هستند را فراهم می آورد. چارچوب CCK اصلی در مرکز نمودار برجسته شده است، که به دو بخش تقسیم می گردد؛ بخش بالایی چارچوب های سیکلوتیدی درست را ارائه می دهد و بخش پایین تر چارچوب های سیکلوتیدی "کاهش یافته یا ناقص" را نشان می دهد. واژه "کاهش یافته" به این معنی به کار می رود که این چارچوب ها فاقد یک یا چند مورد از ویژگی های کلیدی چارچوب CCK کامل می باشند (Kolmar *et al.*, 2009). آنها به این دلیل در اینجا ذکر می گردند که، به عنوان مثال بسیاری از مولکول های حاوی گره سیستمی غیر حلقوی برای پتانسیل دارویی خود مورد مطالعه قرار گرفته اند و این سودمند است که سیکلوتیدها را به عنوان بخشی از یک سلسله پتیدهای متغیر در پیچیدگی توپولوژیک بازبینی کنیم (Craik *et al.*, 2012).

۱-۲-۳-۱ چارچوب سیکلوتیدی و تغییر در پتانسیل درمانی

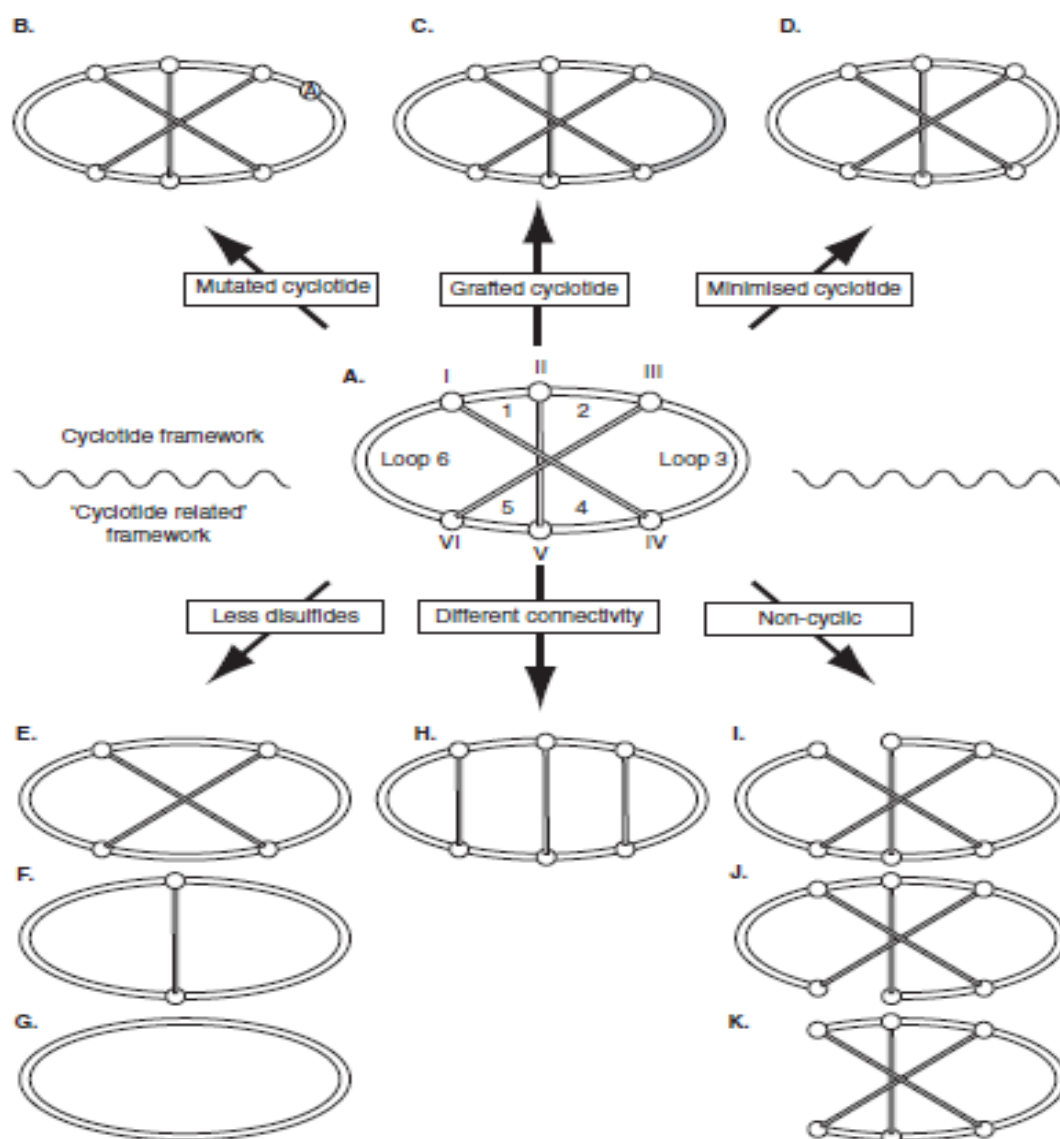
فلش های خارج شده از چارچوب اصلی CCK (گروه A در شکل ۱-۵) نشان می دهد که سیکلوتیدها به طور بالقوه ای می توانند به طرق مختلفی تغییر پیدا کنند تا پتانسیل درمانی و دارویی جدیدی اقتباس کنند. این تغییرات شامل جهش های نقطه ای در باقی مانده های منفرد برای بهینه سازی فعالیت، پیوند شدن یک توالی پتیدی فعال زیستی خارجی به درون یک ناحیه از حلقه در چارچوب سیکلوتیدی و یا کوچک ساختن یک یا چند حلقه سیکلوتیدی می گردد. مطالعات جهش زایی های نقطه ای (قسمت B) توسط یک سری گزارشات اخیر از اسکن های آلانین و لیزین مستند گردیده است که در آن ها هر باقی مانده غیر سیستمی منفرد از چارچوب سیکلوتیدی به طور متوالی با آلانین و یا لیزین جایگزین شده است (Simonsen

(*et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). این مطالعات قطعاتی از باقی مانده های در معرض سطح پپتید را نشان داده اند که برای فعالیت همولیتیک و / یا فعالیت حشره کشی سیکلوتیدها مهم هستند. جهش در هر یک از این باقیمانده ها این فعالیت های سمی را از بین می برد، از این رو پتانسیل درمانی سیکلوتیدها را بهبود می بخشد. استراتژی پیوند زدن^۳ با این اصل که یکی از شش حلقه موجود در چارچوب سیکلوتیدی می تواند با یک توالی پپتیدی فعال زیستی خارجی دارای اثرات درمانی مطلوب جایگزین گردد، در قسمت C نشان داده شده است. در نمونه نشان داده شده حلقه ۳ جایگزین گردیده است (*Kolmar et al.*, 2009).

۲-۳-۲-۱ چارچوب های سیکلوتیدی کاهش یافته

مفهوم تقلیل چارچوب سیکلوتیدی، اگر چه تا کنون هیچ مطالعه ای که این نوع چارچوب CCK را گزارش کند، صورت نگرفته است؛ اما به طور کامل در قسمت D در شکل ۵-۱ ارائه شده است. با این حال چارچوب های گره سیستینی غیر حلقوی در معرض چنین مطالعات مهندسی قرار گرفته اند. نیمه پایینی شکل ۵-۱ بسیاری از دیگر مولکول های درمانی سودمند را نشان می دهد که به طور مفهومی می توان آنها را مرتبط با چارچوب سیکلوتیدی در نظر گرفت. اینها آنالوگ هایی را شامل می شوند که در آن ها یک یا چند پیوند دی سولفیدی حذف شده است (گروه های E-G)، آنالوگ هایی که در آن پیوندهای دی سولفیدی متفاوتی از موتیف CCK تشکیل شده (قسمت H) و آنالوگ هایی که در آن ساختمان حلقوی سیکلوتیدی شکسته شده است (گروه های K-I)، که جهش یافته ی غیر حلقوی نامیده می شوند (*Daly et al.*, 2000).

³ grafting



شکل ۱-۵. توپولوژی های چارچوب عمومی سیکلوتیدی و آنالوگ های تغییر یافته. ساختارهای نیمه بالایی شکل شامل یک چارچوب CCK بوده و ساختارهای نیمه پایینی شکل چارچوب های مرتبطی هستند که پیوندهای دی سولفید کمتری داشته یا همچنین فاقد گره سیستینی یا ساختمان حلقوی می باشند. (A) توپولوژی عمومی سیکلوتیدی. باقی مانده های سیستین علامت VI-I گرفته و ساختارهای حلقه ای با ۱-۶ شماره گذاری شده اند. (B) جهش نقطه ای سیکلوتید. (C) آنالوگ پیوند زده سیکلوتیدی که در آن حلقه ۳ توسط یک توالی پپتیدی فعال زیستی خارجی جایگزین شده است. (D) سیکلوتید جهش یافته ای که در آن اندازه یکی از حلقه ها کاهش یافته است. (E-G) جهش یافته هایی با تعداد پیوندهای دی سولفیدی کاهش یافته. (H) پپتید حلقوی با سه باندهای دی سولفیدی با یک توپولوژی ساده نسبت به سیکلوتیدهای حاوی گره سیستینی. توپولوژی نردبانی نشان داده شده مربوط به θ -defensins (I-K) پیش جهش یافته های غیر حلقوی سیکلوتیدی که در آن اسکلت مربوطه در حلقه های مختلف شکسته شده است.

این نوع نمایش بدین منظور طراحی شده است که مفهوم ارتباطات توپولوژیک بین مشتقات مختلف و چارچوب اصلی CCK را بیش از توالی‌های همانند برساند. به عنوان مثال، حذف باند دی‌سولفید II-V در چارچوب CCK منجر به توپولوژی γE می‌شود، که با توپولوژی کونوتوکسین حلقوی شده Vc1.1 مطابقت دارد و اخیراً نشان داده شده است که در مدل حیوانی درد نوروپاتی به صورت خوراکی فعال می‌باشد. حذف باند دی‌سولفیدی دوم منجر به توپولوژی معادل با توپولوژی بازدارنده تریپسین-1 آفتابگردان (SFTI-1)، نشان داده شده در قسمت γF می‌گردد. این پپتید به عنوان یک چارچوب برای طراحی داروهای علیه پپتیداز 4 وابسته به کالیکرین (kallikrein) (KLK4)، پروتئازی که در سرطان پروستات بیش از حد بیان می‌گردد، استفاده می‌شود. در نهایت، حذف باند دی‌سولفید سوم منجر به ایجاد یک پپتید حلقوی معمولی (قسمت G) می‌شود (Clark et al., 2010; Swedberg et al., 2009). قسمت H شکل 1-5 به طور شماتیک اثرات اتصالی متفاوت دی‌سولفیدی را به تصویر می‌کشد که توپولوژی مربوط به تتا دیفنسین-1 میمون رزوس (1-RTD) را نشان می‌دهد؛ در این مورد اتصال دی‌سولفیدی در یک آرایش «نردبانی»⁴ به جای آرایش گره دار در چارچوب CCK دیده می‌شود. پپتید RTD1-1 اخیراً به خاطر فعالیت ضد میکروبی و همچنین فعالیت ضد-HIV مورد توجه قرار گرفته است. در نهایت، در قسمت های K-I، دسته ای از پپتیدهای جهش داده شده غیر حلقوی نشان داده شده است که بیانگر این است که، اسکلت حلقوی سیکلوتیدی ممکن است شکسته شده و مولکول‌هایی را ایجاد کند که هنوز هم حاوی

⁴ laddered

گره سیستمی بوده اما یک توپولوژی متعارفی از اسکلت خطی را در بر می گیرند. (Tang et al., 1999; Daly et al., 2007).

۱-۲-۴ فعالیت‌های زیستی سیکلوتیدها

طیف متنوعی از فعالیت‌های سیکلوتیدی که در مطالعات غربالگری گزارش شده است عبارتند از ضد-HIV، انقباض عضلات رحمی^۵، ضد میکروبی، پاد هم‌آوردی نوروتنسین^۶، کرم‌کشی^۷ و فعالیت‌های سمیت سلولی شامل فعالیت همولیتیک. اگر چه برخی از جنبه‌های فعالیت سمیت سلولی^۸ سیکلوتیدها از نقطه نظر توسعه دارو نامطلوب است، اما سمیت انتخابی آنها نسبت به برخی از رده‌های سلولی سرطانی امکان کاربردهای ضد سرطانی آنها را تسهیل می‌کند (Gustafson et al., 1994 ; Witherup et al., 1994; Gran et al., 1973; Tam et al., 1999; Hermann et al., 2008; Lindholm et al., 2002; Burman et al., 2010; Gerlach et al., 2010).

به طور طبیعی، به نظر می‌رسد که تولید سیکلوتیدها توسط گیاهان برای فعالیت‌های فوق نیست، بلکه عملکرد طبیعی آنها بیشتر به نظر می‌آید که دفاع از گیاهان در برابر آفات می‌باشد. همچنین گزارش شده است که سیکلوتیدها علیه نماتدها و نرم تنان فعال می‌باشند (Gruber et al., 2007). این فعالیت‌های زیست‌کشی^۹ به نظر می‌رسد که مبنای عملکردی در برگیرنده تعاملات سیکلوتیدها با غشاهای در موجودات هدف را در بردارند. به عنوان مثال، مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که kalata B1 باعث اختلال غشاء در روده لارو کرم

⁵ Uterotonic

⁶ Neurotensin antagonist

⁷ anthelmintic

⁸ Cytotoxic

⁹ Biocidal functions

ابریشم شده، و مطالعات مختلف بیوفیزیکی اتصال سیکلوتیدها به مدل و/ یا غشای سلولی را تایید کرده اند (Colgrave *et al.*, 2008; Colgrave *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009).

۱-۲-۴-۱ فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها

اولین گزارش از فعالیت ضد میکروبی در سیکلوتیدها در سال ۱۹۹۹ بوده است و بعد از آن تنها چند مورد گزارش گردیده است. مطالعات اخیر تا حدی نتایج ضد و نقیضی را با توجه به مطالعات اولیه ارائه می دهند و بنابراین پتانسیل واقعی سیکلوتیدها به عنوان عوامل ضد میکروبی هنوز روشن نشده است (Daly *et al.*, 2011). به نظر می رسد که برخی از سیکلوتیدها در شرایط آزمایشی خاص فعالیت ضد میکروبی نشان می دهند، اما این فعالیت لزوماً تحت شرایط نمک بالا که ممکن است در یک سامانه فیزیولوژیکی مشاهده شود، حفظ نمی گردد. سیکلوتید Cycloviolacin O2 به نظر می رسد در میان فعالترین سیکلوتیدهای با خاصیت ضد میکروبی باشد (Pränting *et al.*, 2010).

در تحقیقی که به وسیله Tam و همکاران در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت چهار سیکلوتید کاملاً به روش شیمیایی سنتز گردیده و فعالیت آنها علیه باکتری های مختلف (چهار گرم منفی و دو گرم مثبت) با استفاده از RDA^{۱۰} بررسی شد. سیکلوتیدهای سنتزی شامل kalata B1 است که علیه باکتری های گرم مثبت مثل *Staphylococcus aureus* در غلظت های زیر میکرومولار فعال بوده، ولی علیه باکتری های گرم منفی نسبتاً غیر فعال است. برخلاف این نتیجه Gran و همکاران در سال ۲۰۰۸، kalata B1 طبیعی را پیدا کردند که علیه *S. aureus* غیر فعال است، ولی علیه سویه های گرم منفی فعال می باشد. ممکن است سیکلوتیدهای

¹⁰ Radial Diffusion Assay

سنتزی که توسط Tam و همکاران بررسی شده‌اند ویژگی های متفاوتی نسبت به سیکلوتیدهایی که مستقیماً از گیاه استخراج می‌شوند داشته باشد، این مسئله ممکن است، به دلیل تفاوت در ساختار یا ارتباط پل‌های دی‌سولفیدی، یا به دلیل تفاوت در حساسیت سویه-های *S. aureus* استفاده شده در تحقیقات آنها باشد بنابراین می‌توان صریحاً نتیجه گرفت که فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها وابسته به زمان و غلظت آنها است. این نتیجه غیرمنتظره نیست چرا که سیکلوتیدها غشای سلول را تخریب می‌کنند و تخریب غشایی سازوکار اصلی فعالیت همه AMPs¹¹ به دست آمده از موجودات مختلف است (Tam *et al.*, 1999).

سیکلوتیدهای بررسی شده رابطه ساختار- عملکرد را علیه بیماری‌زا های بالینی به خوبی نشان می‌دهند و بین موجودات هدف، به صورت کاملاً تخصصی عمل می‌کنند. با استفاده از این نتایج و بررسی سیکلوتیدهای سنتزی و تاخوردگی¹² اکسیداتیو سیکلوتیدها، چنین بر می‌آید که ساختار منحصر به فرد سیکلوتیدها نقطه قوتی برای طراحی آنتی بیوتیک‌های پپتیدی باشد (Pränting *et al.*, 2010).

۱-۲-۴-۲-۱ فعالیت ضد-HIV

فعالیت ضد-HIV یکی از اولین فعالیت‌هایی است که در سیکلوتیدها مورد مطالعه قرار گرفته و در تعدادی از مقالات نیز تایید گردیده است. مطالعات ارتباط ساختار-عملکرد¹³ (SAR) انجام شده و ثابت کردند که یک قطعه از باقی مانده های اسید آمینه‌ای واقع در سطح kalata B1 برای فعالیت ضد-HIV اهمیت دارد (Simonsen *et al.*, 2008; Gustafson *et al.*)

¹¹ Antimicrobial peptides

¹² Folding

¹³ Structure activity relationship

(*al.*, 1994). همچنین نشان داده شده است که ساختمان حلقوی برای داشتن فعالیت ضد-HIV ضروری است. در یک مطالعه جدید مشخص شد که برهمکنش‌های اتصال به غشاء برای فعالیت‌های ضد-HIV حائز اهمیت است، که به نظر می‌رسد ناشی از توانایی انتخابی سیکلوتید kalata B1 برای مورد هدف قرار دادن و تخریب پوشش غشای ذرات HIV باشد. بنابراین، بر خلاف دیگر پپتیدهای ضد HIV که مانع از ورود ویروس به سلول میزبان می‌شوند، به نظر می‌رسد kalata B1 دارای فعالیت مستقیم کشندگی ویروس به واسطه هدف قرار دادن پوشش ویروس که شامل غشاهای قایق مانند بسیار غنی از فسفولیپیدهای فسفاتیدیل اتانول آمین است، می‌باشد. مطالعات حسگر زیستی^{۱۴} و NMR نشان داده‌اند که kalata B1 تعامل خاصی با گروه‌های سر فسفولیپید PE دارد، اما بیشتر توسط برهمکنش‌های آبگریز پپتیدی لیپیدی خاص که در نواحی قایق-مانند^{۱۵} به چشم می‌خورد، تاثیر خود را می‌گذارد. سیکلوتید Kalata B1 به طور ویژه ای فسفولیپیدهای با بار منفی را مانند بسیاری از پپتیدهای غشایی فعال متعارف مورد هدف قرار نمی‌دهد (Henriques *et al.*, 2011).

۱-۲-۳-۴ فعالیت ضد سرطانی

سیکلوتیدها در برابر تعدادی از رده‌های سلولی سرطانی مشتق شده از انواع سرطان‌های مختلف از جمله میلوم (RPMI-8226)، لوسمی سلول-T (CCRF-CEM)، سرطان ریه (NCI H69 -)، لنفوم (U-937GTB) و سرطان غده (ACHN) دارای سمیت سلولی هستند. فعالیت ضد سرطانی بالقوه سیکلوتیدها ناشی از توانایی آنها برای مورد هدف قرار دادن انتخابی

¹⁴ biosensor

¹⁵ Raft-like

سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم، به دلیل میانکنش پپتیدها با غشاء می‌باشد. شاخص درمانی در شرایط آزمایشگاهی برای سلول‌های لوسمی لنفوسیتی مزمن اولیه در حدود ۱۰ هست، که شبیه به تیمارهای قابل مقایسه مانند دوکسوروبیسین می‌باشد. اگر چه تعدادی از مطالعات، سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی را نشان داده اند، اما فقدان کنترل در فرمی از سلول‌های غیرسرطانی، قیاس با تیمارهای فعلی را دشوار می‌سازد. تا کنون، فعالیت‌های امیدوار کننده‌ای در سنجش‌های مبتنی بر سلول، به ارزیابی در مدل‌های توموری موش که در آن سمیت قابل توجهی مشاهده می‌گردد، مبدل نشده است. در نتیجه، سمیت سلولی سیکلوتیدها در برابر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی نیاز به ارزیابی بیشتری دارد (Lindholm et al., 2002; Burman et al., 2010; Svangard et al., 2007).

۱-۲-۴-۴ فعالیت کرم‌کشی

سیکلوتیدها علیه انواعی از انگل‌های دام و انسانی آزمایش گردیده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که سیکلوتیدها دارای فعالیت علیه *Haemonchus contortus* و *Trichostrongylus colubriformis*، دو نماتود مهم دستگاه گوارش در گوسفند می‌باشند. اخیراً، نشان داده شده است که برخی سیکلوتیدها روی کرم قلابدار سگ *Ancylostoma caninum* و لارو *Necator americanus* کرم قلابدار انسانی اثر می‌گذارند. این یک بخش جدید امیدوار کننده و شایسته بررسی است، زیرا که پتانسیلی برای گیاهان تولید کننده سیکلوتیدی وجود دارد که به عنوان داروهای طبیعی موثر در برابر انگل‌هایی که عمدتاً کشورهای جهان سوم را تحت تاثیر قرار می‌دهند، مورد استفاده قرار گیرند (Colgrave et al., 2008; Colgrave et al., 2009).

اگرچه پایه‌های مولکولی فعالیت کرم کشی یا ضدانگلی سیکلوتیدها مشخص نیست، ولی گفته می‌شود این فعالیت به دلیل بازدارندگی آنزیم‌های گوارشی مهمی مانند تریپسین و کیموتریپسین یا آلفا-آمیلاز نیست. درحالی که بعضی از پروتئین‌های حاوی گره سیستئینی گیاهی بازدارنده تریپسین هستند و از این طریق می‌توانند در رشد حشرات و انگل‌ها تأخیر ایجاد کنند. این نوع از فعالیت شامل خانواده squash از پتیدهای حاوی گره سیستئینی و سیکلوتیدهای بازدارنده تریپسین، MCoTI-I و MCoTI-II از *Momordica cochinchinensis* است. همچنین بازدارنده آلفا-آمیلاز از *Amaranthus hypocondriacus* می‌تواند با متوقف کردن هضم نشاسته تأخیر در رشد بعضی از حشرات ایجاد کند (Gruber et al., 2007).

۱-۲-۵ سنتز شیمیایی و بیولوژیکی سیکلوتیدها

سیکلوتیدها را می‌توان به طور شیمیایی سنتز کرد، به علاوه مسیرهای تاخوردن موتیف گره سیستئینی نیز مشخص گردیده است، از اینرو راه برای مسیرهای سنتز پتیدی فاز جامد به منظور تولید سیکلوتیدهای دارویی مربوطه هموار می‌باشد. بررسی‌های اخیر جنبه‌های تولیدی سیکلوتیدها را پوشش داده‌اند و اخیراً مطالعاتی بر روی سنتز بیولوژیکی آنها صورت گرفته است (Tam et al., 1998; Daly et al., 2003; Craik et al., 2007; Goransson et al., 2003). به طور جالب توجهی، مشاهده اخیر که سیکلوتیدها به طور طبیعی در گیاهانی از خانواده بقولات^{۱۶} تولید می‌شوند، برای کشت در مقیاس بزرگ به طور بالقوه ای قابل بررسی بوده و امکان تولید سیکلوتیدهای دارویی فعال در گیاهان زراعی تراریخته را فراهم می‌آورد (Poeth et al., 2011). بعضی از گیاهان تولید کننده ی سیکلوتید به صورت طبیعی، برخی از

¹⁶ fabaceae

این پیپتیدها را با بازده ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم از بافت گیاهی، به طور بسیار کارآمدی می-سازند.

سلول های گیاهی کشت داده شده *O. affinis* نیز برای تولید سیکلوتیدهای طبیعی با بازده عالی مورد استفاده قرار گرفته اند و روش های بیان با مداخله اینتئین نیز برای بیان سیکلوتیدها در اشرشیاکلی، با بازده تا بیش از ۱-۰/۵ mg/l از باکتری کشت داده شده، توسعه یافته اند (Dornenburg et al., 2010; Seydel et al., 2006). این تولید می تواند به طور بالقوه ای حتی با استفاده از فرمانتورهای باکتریایی بیشتر افزایش یابد. یک رویکرد آزمایشگاهی حلقوی شدن با واسطه آنزیم نیز ایجاد شده است که در آن سنتز شیمیایی برای گرد آوری پیش ساز سیکلوتیدی خطی مورد استفاده قرار می گیرد و پس از آن توسط آنزیم تریپسین حلقوی می گردد. این حلقوی شدن با واسطه آنزیم تا حدی بیوسنتز طبیعی سیکلوتیدها را تقلید می کند، اگر چه آنزیم متفاوتی را شامل می شود، که به جای آنزیم اندوپیتیداز اسپاراژینیل، تریپسین به کار می رود (Camarero et al., 2007; Jagadish et al., 2010; Marx et al., 2003).

۱-۲-۶ بررسی انعطاف پذیری ساختاری سیکلوتیدها

درک مقاومت چارچوب سیکلوتیدها به تغییر چندین حلقه اهمیت زیادی دارد، به خصوص اگر ما بخواهیم از آن به عنوان داربستی برای طراحی دارو استفاده کنیم. اولین قدم در فهم این نکته بررسی نقش قطعات با خاصیت آبگریزی در ساختار و پیچ خوردگی سیکلوتیدها می باشد. در تحقیقی که توسط Clark و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، با سنتز دو نوع مختلف از kalata B1 انعطاف پذیری ساختمان سیکلوتید بررسی گردید. در هر دو آنالوگ

اسیدآمینه‌های باردار و قطبی به جای بخشی از اسیدآمینه‌های قطعه هیدروفوب وارد حلقه ۵ شدند. سیکلوتید سنتزی [W19K/P20N/V21K] Kalata B1 در حلقه ۵ سه اسیدآمینه (KNK) از سیکلوتید bracelet به جای سیکلوتید mobius دارد، درحالی که در kalata B1 سنتزی [P20D/V21K] در حلقه ۵ دو اسیدآمینه باردار (DK) جایگزین گردیده است. توالی KNK از این جهت انتخاب شده است که توالی حفاظت شده در حلقه ۵ سیکلوتیدهای bracelet بوده و دوام این توالی در سیکلوتیدهای mobius مورد بررسی می‌باشد. در جهش یافته دوم، اسیدآمینه‌های DK به این دلیل انتخاب شده‌اند که تأثیر میان‌کنش بین اسیدآمینه‌های باردار مثبت و منفی مجاور که موجب تخریب قطعه آبگریز می‌گردد، بر ناپایداری سیکلوتید مورد مطالعه قرار گیرد. با وارد کردن اسیدآمینه‌های قطبی و باردار در حلقه ۵ اندازه قطعه هیدروفوب کاهش می‌یابد و در نتیجه می‌توان اثر آن را روی فعالیت زیستی و تاخوردگی بررسی کرد. این مسئله درک روشنی از پایداری چارچوب CCK (Cyclic Cystine Knot) را به ما می‌دهد و توانایی بهبود آن به عنوان پپتید درمانی را آشکار می‌سازد (Clark *et al.*, 2006).

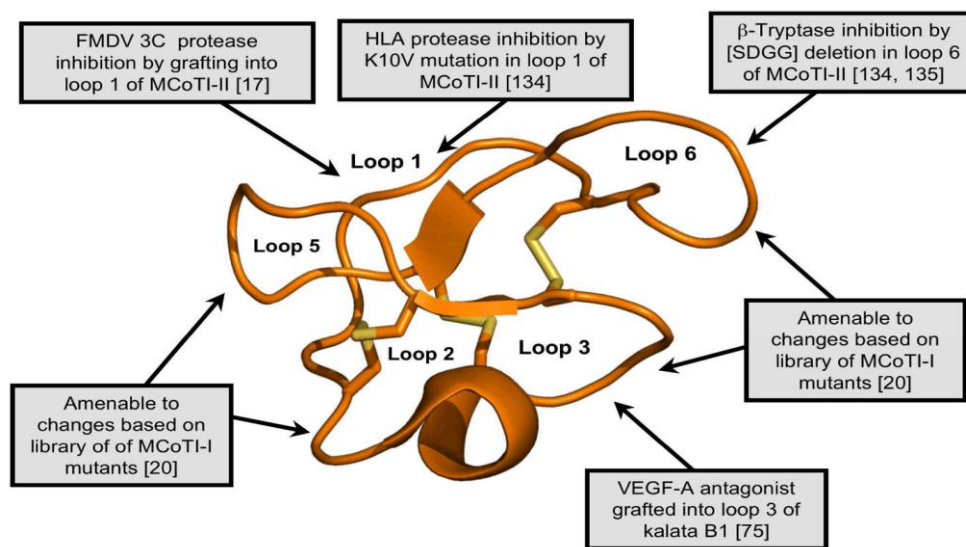
Clark و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند که هر دو پپتید ساخته شده علی‌رغم اینکه تغییرات جایگزینی در اسیدآمینه‌ها و ویژگی‌های آب‌گریزی آنها ایجاد شده بود، پیچش طبیعی خود را حفظ نموده‌اند، در حالیکه افزایش قطبیت و بار سطحی در این سیکلوتیدها فعالیت همولیتیک را در آنها حذف کرده است. از اینرو نتیجه می‌گردد که چارچوب سیکلوتیدها در مقابل جهش‌ها انعطاف‌پذیر می‌باشند و این ویژگی قابلیت کاربرد دارویی آنها را افزایش می‌دهد (Clark *et al.*, 2006).

۱-۲-۷ سیکلوتیدهای پیوندی دارویی^{۱۷}

مفهوم پیوند زدن در چندین مقاله اخیر نشان داده شده است. انعطاف پذیری بالا و پذیرش جایگزینی‌های داربست سیکلوتیدی نخست به واسطه جایگزینی چند باقیمانده‌ی اسیدآمینه‌ای آبگریز در حلقه ۵ سیکلوتید kalata B1 با باقیمانده‌های اسیدآمینه‌ای قطبی و باردار اثبات گردیده است (Clark *et al.*, 2006). سیکلوتیدهای جهش یافته با وجودی که تاخوردگی طبیعی kalata B1 را حفظ نموده‌اند، اما دیگر فعالیت همولیتیک ندارند (Clark *et al.*, 2006). اخیراً یک مطالعه مشابه روی سیکلوتید MCoTI-I انجام شده است، که در اینجا باقیمانده‌های اسیدآمینه‌ای واقع در حلقه‌های ۱ از ۵ حلقه با اسیدآمینه‌های مختلف جایگزین گردیده‌اند. در این مطالعه تنها ۲ جهش یافته از ۲۶ مورد قادر به تاخوردن به طور کارآمد نبودند (Austin *et al.*, 2009). این مطالعات مشخص کننده انعطاف پذیری بالای داربست سیکلوتیدی به جهش‌ها بوده و بنابراین امکان القاء یا پیوند زدن توالی‌های پپتیدی خارجی به درون ساختار اسیدآمینه‌ای سیکلوتیدی را بدون اثر گذاری روی تاخوردگی طبیعی آنها نشان می‌دهد. شکل ۱-۶ چندین مطالعه را نشان می‌دهد که در آنها داربست مولکولی سیکلوتیدی برای پیوند زدن توالی‌های پپتیدی به کار رفته و کتابخانه‌هایی به منظور مهندسی سیکلوتیدهایی با عملکردهای زیستی جدید ایجاد نموده‌اند. در هر حال بایستی مورد توجه قرار بگیرد که به علت پایداری و استحکام بالای چارچوب سیکلوتیدی، پیوند زدن توالی پپتیدی جدید به داربست پپتیدی لازمه دقت بیشتری است. اطمینان حاصل نمودن از اینکه ساختار پپتیدی ارائه شده به چارچوب سیکلوتیدی، تحت تغییرات ساختاری هنگام تاخوردن

¹⁷ pharmaceutical Grafted cyclotides

مناسب سیکلوتیدها اختلالی در فعالیت قطعه‌ی پیوند شده از نظر بیولوژیک ایجاد نمی‌کند، بسیار حائز اهمیت است. نمونه‌های درمانی مربوطه اخیر شامل پیوند زدن یک توالی ضد-رگ زایی بر روی سیکلوتید kalata B1 برای برنامه‌های کاربردی در درمان سرطان و توسعه یک مهارکننده پروتئاز برای ویروس بیماری پا و دهان از طریق مطالعه پیوند زدن در چارچوب سیکلوتید MCoTI-II می‌باشد (Thongyoo *et al.*, 2008). این کاربرد‌های دارویی بالقوه سیکلوتیدهای پیوندی نخست طی مطالعات اخیر که با هدف ایجاد عوامل درمانی ضد-سرطانی جدید و ضد ویروس‌های مبتنی بر پپتید طراحی گردیده‌اند، در زیر با جزئیات بیشتر شرح داده شده است (شکل ۱-۶).



شکل ۱-۶. خلاصه‌ای از برخی تغییرات انجام شده در kalata B1 و MCoTI-II برای ظهور فعالیت‌های بیولوژیک جدید. تغییرات شامل پیوند زدن پپتیدهایی درون حلقه‌های مختلف این دو سیکلوتید می‌شود. کتابخانه‌های مبتنی بر سیکلوتید همچنین با استفاده از حلقه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ MCoTI-I برای مطالعه اثر جهش‌های منفرد روی فعالیت بیولوژیک و توانایی فولدینگ جهش‌یافته‌های MCoTI-I ایجاد شد. موقعیت تغییرات القا شده به چارچوب سیکلوتیدی با استفاده از ساختار MCoTI-II (pdb ID: 1IB9) در تصویر نشان داده شده است.

۳-۱ مشخصات خانواده بنفشه به عنوان یکی از منابع سیکلوتیدها

خانواده بنفشه (Violaceae) از ۲۲ جنس و حدود ۹۰۰ گونه تشکیل شده است که همه جازی^{۱۸} و معمولاً به صورت علفی و یا درختچه‌ای بوده و عمدتاً در مناطق معتدل متمرکز می‌باشند. این گیاهان برگ‌های متناوب، گوشوارک‌دار داشته و گل‌هایی مرکب از ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ نامساوی و ۵ پرچم دارند. جنس بنفشه (*Viola*) شامل گونه‌هایی یکساله یا چندساله علفی یا درختچه‌ای می‌باشد (عیدی و همکاران، ۱۳۸۵؛ خاتم ساز، ۱۳۶۹). گونه‌های دارویی تیره بنفشه، بنفشه معطر و بنفشه سه‌رنگ یا بنفشه فرنگی هستند (شبعی، ۱۳۷۳). جنس بنفشه با حدود ۲۰ گونه در نواحی مختلف ایران مخصوصاً شمال ایران متمرکز شده است.

همه گونه‌های بررسی شده خانواده بنفشه حاوی سیکلوتید بوده‌اند. اما گونه‌های بررسی شده خانواده روناس (*Rubiaceae*) ۵-۱۰٪ گونه‌ها سیکلوتید دارند (Daly et al., 2009). مطالعات انجام گرفته تاکنون نشان داده‌اند که تنها دو گونه از خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) حاوی سیکلوتید بوده‌اند و در خانواده بقولات (*Fabaceae*) نیز در چندین گونه حضور سیکلوتیدها تایید گردیده است.

۱-۳-۱ گونه گیاهی بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor* L.)

نام فارسی: بنفشه سه رنگ

نام علمی: *Viola tricolor*

نام خانواده: (بنفشه) Violaceae

نام انگلیسی: The Pansy or three colored violet

¹⁸ Cosmopolitan

نام عربی: زهره الثالوت (zahralsalut)



شکل ۷-۱. گونه‌ی بنفشه سه‌رنگ (*Viola tricolor*)

۱-۱-۳-۱ گیاه شناسی

گیاه بنفشه سه رنگ (شکل ۷-۱) یا بنفشه فرنگی (Pansy) گیاهی علفی، یکساله، دو ساله و چند ساله بوده و ارتفاع آن معمولا حدود ۲۵ سانتی متر بوده و برخی مواقع بلند بوده و به ۸۰ سانتی متر می رسد. ساقه ها کمی زاویه دار و به رنگ سبز مایل به زرد می باشند. برگ ها بیضی شکل، دانه دار و بدون دمبرگ هستند و به طور متناوب بر روی ساقه قرار می گیرند. گل های کوچک این گیاه رنگ های مختلفی از جمله بنفش روشن و تیره، سفید، آبی، ارغوانی و زرد دارند که در بهار و تابستان ظاهر شده و به میوه پوشینه تبدیل می شوند. میوه، حاوی تعدادی دانه کوچک بیضی شکل و سفید رنگ می باشد (عیدی و همکاران، ۱۳۸۵؛ خاتم ساز، ۱۳۶۹).

این گیاه به طور خودرو و گسترده در اروپا می روید و در آمریکای شمالی نیز گسترش یافته است. بنفشه سه رنگ در نقاط مختلف ایران و به خصوص در نواحی شمالی رویش دارد. گل و تمام قسمت های گیاه مورد استفاده دارویی است (خاتم ساز، ۱۳۶۹).

۲-۱-۳-۱ ترکیبات شیمیایی

ترکیبات مهم این گیاه اسید سالیسیلیک و مشتقات آن، از جمله متیل استر، فنوکربوکسیلیک اسید، مانند ترانس کافئیک اسید و پی کوماریک اسید و گلوکوزید و یولوزید است. ترکیبات دیگری چون موسیلاژ، تانن، فلاونوئیدها (از جمله اوری یتین، اسکوپارین، ویولانتین، ساپونارین و وی سری نین) و گلیکوزیدهای آنتوسیانینی نیز در گیاه وجود دارند (عیدی و همکاران، ۱۳۸۵؛ شبعی، ۱۳۷۳؛ زرگری، ۱۳۲۹).

۳-۱-۳-۱ خواص دارویی

بسیاری از افراد بنفشه سه رنگ را به عنوان یک گیاه زینتی می‌کارند و از زیبایی آن استفاده می‌کنند و افراد کمی از خواص دارویی و با ارزش این گونه از بنفشه آگاهی دارند. از بنفشه سه رنگ در طب سنتی و عامیانه ملل مختلف در انواع بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های تنفسی مانند برونشیت، آسم، سیاه سرفه، زکام و علائم دیگر سرما خوردگی و تنفسی استفاده می‌شود. همچنین، به صورت خوراکی یا موضعی برای درمان بیماری‌های پوستی (مانند اگزما، سبوره، زرد زخم، آکنه)، روماتیسم، ورم مثانه و دفع دردناک ادرار حاصل از آن، شب ادراری، بی‌خوابی، آرتروز و سفت شدن رگها به کار می‌رود. یکی دیگر از موارد استفاده این گیاه که سالیان دراز معمول بوده، به عنوان ادرار آور، معرق، آرامبخش و تسکین دهنده است. چون بنفشه سه رنگ دارای موسیلاژ می‌باشد، خاصیت ضد سرفه دارد. همچنین، اثر پاک‌سازی و تصفیه کننده خون را برای آن قائل بوده‌اند. این گیاه به خاطر وجود اسید سالیسیلیک و روتین، ضد التهاب و ضد درد است. همچنین روتین موجود در آن باعث مقاومت جدار مویرگ‌ها شده و از پارگی و خون‌مردگی آنها جلوگیری می‌کند. در پژوهش‌های

جدید خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد پیری بنفشه سه رنگ تا حدی به اثبات رسیده و اثر ضد میکروبی آن مورد تایید قرار گرفته است. این گیاه همچنین خاصیت مسهلی دارد. نام بنفشه سه رنگ در دارونامه بعضی کشورها، از جمله آمریکا، وجود دارد و از آن بیشتر در فرآورده های پوستی (اگزما) و تنفسی (برونشیت) استفاده می شود (عیدی و همکاران، ۱۳۸۵؛ شبعوی، ۱۳۷۳؛ زرگری، ۱۳۲۹؛ اردکانی شمس و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۳-۲ پیشینه مطالعات سیکلوتیدی و ضد میکروبی گونه بنفشه سه رنگ

بررسی های انجام گرفته تاکنون چندین سیکلوتید از گونه ی بنفشه سه رنگ مجزا و شناسایی نموده اند، که عبارتند از سیکلوتیدهای تریسیکلون A و B، سیکلوتیدهای vitri A-F، سیکلوویولاسین O2 و O12، kalata S و سیکلوتیدهای varv (A, D, E, F, H, Hm & He) که برخی منحصر به این گونه بوده و برخی نیز برای اولین بار از این گونه استخراج و شناسایی شده اند. پیش ساز ژنی تریسیکلون بنفشه سه رنگ نیز پیشتر به عنوان پیش ساز ژنی کدکننده سیکلوتیدی شناسایی و مطالعه گردیده است و توالی آن در بانک ژنی وجود دارد (Daly et al., 2009; Svangård et al., 2004; Mulvenna et al., 2005; Gruber et al., 2008).

فعالیت ضد میکروبی گیاه بنفشه سه رنگ با استفاده از عصاره های تام اتانولی و جوشانده و خیسانده و نیز فراکشن های حاصل از عصاره های دی کلرومتان، اتیل استات و متانولی گیاه مورد نظر در لهستان مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مطالعه عصاره های تام اتانولی و جوشانده و خیسانده بیشترین تاثیر را روی میکروارگانیسم های مورد بررسی داشته اند. ترکیبات فعال ضد میکروبی از عصاره های فوق تاکنون شناسایی نشده اند. اما غربالگری های

فیتوشیمیایی انجام شده در این مطالعه تست‌های مثبتی برای حضور ترپنوئیدها در عصاره دی-کلرومتان، فلاونوئیدها و فنولیک اسید در عصاره‌ی اتیل استات و ساپونین‌ها و فلاونوئید در عصاره متانولی نشان می‌دهد (Witkowska-Banaszczak et al, 2005). از نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌آید که ترکیبات مقاوم به دما نظیر سیکلوتیدهای موجود در این گیاه، توام با سایر ترکیبات به صورت هم‌افزایی^{۱۹} می‌توانند عمده تأثیرات ضد میکروبی به دست آمده از این پژوهش را به خود اختصاص دهند.

۱-۴ همسانه سازی ژن^{۲۰}

همسانه سازی ژن مهمترین مرحله در مهندسی ژنتیک است. هدف از همسانه سازی ژن به دست آوردن مقادیر زیادی از ژن‌های خاص به صورت خالص می‌باشد. در این فرایند ژن مورد نظر از داخل یک ژنوم بزرگ و پیچیده به داخل یک حامل ساده و کوچک انتقال داده می‌شود و تکثیر صورت می‌پذیرد. مراحل اصلی در آزمایشات همسانه سازی ژن به شرح زیر است (Ausubel, et al., 1995).

۱- جداسازی و تکثیر قطعه مورد نظر

۲- اتصال قطعه به یک حامل همسانه سازی^{۲۱} و شکل‌گیری مولکول DNA نو ترکیب و

وارد کردن حامل به داخل میزبان

۳- تکثیر حامل در سلول میزبان و تکثیر ژن مورد نظر به همراه آن

۴- انتقال مولکول DNA نو ترکیب به سلول‌های جدید در حین تقسیم سلولی

¹⁹ Synergism

²⁰ cloning

²¹ Cloning Vector

۵- ایجاد یک کلون از سلول‌های یکسان پس از تقسیمات متعدد سلول میزبان. هر سلول

در کلون حاوی نسخه‌های متعددی از مولکول DNA نو ترکیب است. در چنین حالتی

گفته می‌شود که ژن مورد نظر همسانه سازی شده است (Brown, 2010).

۱-۴-۱ همسانه سازی با استفاده از وکتور pUC19

در این پژوهش جهت همسانه سازی ژن‌های استخراج شده سیکلوتیدی و تعیین توالی

این ژن‌ها، پلاسمید pUC19 به عنوان حامل یا ناقل^{۲۲} همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت.

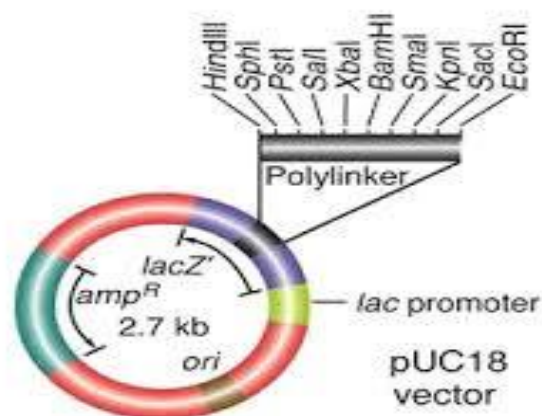
این پلاسمید طول ۲۶۸۶ جفت باز داشته و حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و ژن بتا-

گالاکتوزیداز مورد استفاده برای غربالگری کلونی‌های نو ترکیب و جایگاه همسانه سازی

MCS^{۲۳} دربرگیرنده توالی‌های برشی آنزیم‌های اندونوکلازی برشی یا محدودکننده^{۲۴}

اختصاصی می‌باشد (شکل ۸-۱). آنزیم برشی استفاده شده در این پژوهش، آنزیم Sma I با

پایانه برشی صاف^{۲۵} در جایگاه برش CCC↓GGG می‌باشد.



شکل ۸-۱. پلاسمید pUC19

²² vector

²³ Multiple cloning site

²⁴ Restriction endonuclease enzymes

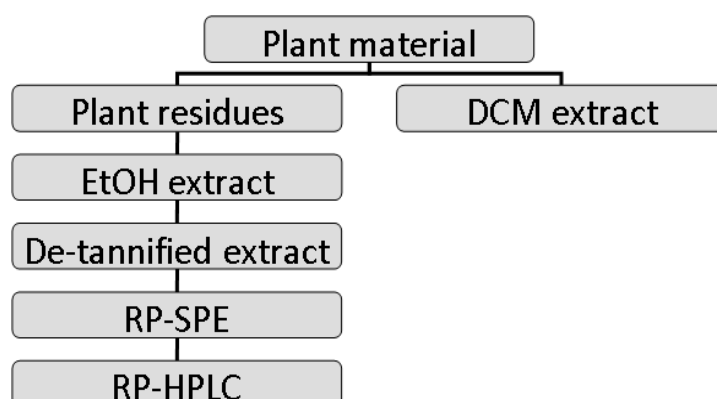
²⁵ blunt

۱-۵ استخراج سیکلوتیدها

سیکلوتیدها از جمله ترکیبات مهم گیاهی هستند که امروزه هم از نظر فعالیت‌های ذاتی خود و هم قابلیت پذیرش تغییرات مطلوب در طراحی داروهای مبتنی بر پپتید بسیار مورد توجه می‌باشند. روش‌های متفاوتی برای جداسازی سیکلوتیدها وجود دارد از جمله: استفاده از سفادکس LH20، کروماتوگرافی تعویض یونی و ستون SPE. به منظور جداسازی این پپتیدها ابتدا عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف غیر قطبی و قطبی به روش‌های مختلف می‌تواند انجام پذیرد. در بیشتر مطالعات عصاره‌گیری با ترکیبی از حلال‌های دی کلرومتان، اتانول یا متانول و آب، و یا حلال آبی-استونیتریل صورت می‌گیرد. فاز غیر قطبی دی کلرومتان در این مرحله ترکیبات لپیدی و چربی دوست نظیر غشاها و کلروفیل و ... را در خود حل نموده و دور ریخته می‌شود. عصاره تام به دست آمده با حلال قطبی مانند اتانول یا متانول، حاوی عمده ترکیبات پپتیدی بوده و می‌تواند برای تخلیص نسبی و یا حتی کامل این پپتیدها، مستقیماً به روش عصاره‌گیری فاز جامد (SPE) روی ستون‌های مربوطه بارگذاری شود.

اصل روش عصاره‌گیری فاز جامد بر جداسازی فیزیکی استوار است بدین صورت که فاز جامد درون لوله کوچکی قرار داده شده است و در تماس با فاز مایع که شامل نمونه می‌باشد قرار می‌گیرد. معمولاً بر روی فاز جامد سیلیکایی، ۸ یا ۱۸ کربن پیوند داده می‌شود. این نوع فاز جامد می‌تواند با تقریباً تمام مواد غیر قطبی میانکنش دهد. جداسازی و شستشوی ترکیبات دلخواه از ستون با توجه به نمونه مورد نظر و عصاره دربرگیرنده آن، با حلال‌ها یا بافرهای مختلفی عمدتاً به صورت گرادیانی و با تغییر در میزان قطبیت آنها و زمان و میزان شستشو صورت می‌گیرد.

مراحل انجام عصاره‌گیری و استخراج سیکلوتیدها در شکل ۱-۹ نشان داده شده است.



شکل ۱-۹. مراحل انجام عصاره‌گیری و تخلیص سیکلوتیدها

۱-۶ اهداف و اهمیت پژوهش

گیاهان از منابع غنی ترکیبات طبیعی متنوع با خاصیت‌های دارویی و درمانی مطلوب می‌باشند. از جمله ترکیبات طبیعی مفید و حائز اهمیت به دست آمده از گیاهان، سیکلوتیدها هستند. کشف سیکلوتیدها به دلیل تنوع عظیم این خانواده پپتیدی و فعالیت‌های زیستی ذاتی متعدد آنها از جمله فعالیت ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد باکتری، ضد انگلی، ضد آفات، ضد سرطانی و و همچنین دارا بودن ساختار پپتیدی منحصر به فردی که پایداری حرارتی و آنزیمی بی نظیری به آنها می‌بخشد، بسیار مورد توجه می‌باشد. سیکلوتیدها با دارا بودن ساختار کوچک بسیار پایدار خود، به عنوان داربست ساختمانی در طراحی داروهای پپتیدی مطرح هستند.

از آنجائیکه سیکلوتیدها اغلب دارای فعالیت‌های زیست‌کشی به ویژه روی بسیاری از حشرات و آفات گیاهی و میکروارگانیسم‌ها هستند، بیشتر به عنوان عوامل دفاعی گیاهان در نظر گرفته می‌شوند. امروزه با توجه به مشکلاتی که در استفاده و یا عدم استفاده از حشره

کش‌ها و آفت‌زدهای سمی شیمیایی به ویژه در بخش محصولات کشاورزی وجود دارد، پژوهشگران به مقاوم‌سازی و بهسازی ژنتیکی گیاهان علاقه و توجه فراوانی نشان می‌دهند. این ترکیبات طبیعی گیاهی با حضور خود در چندین گونه از خانواده حبوبات (Fabaceae) مانند سویا و لوبیا و حضور پپتیدهای مشابه سیکلوتیدی در گونه‌ی خوراکی ذرت (Zea mays)، امکان به‌نژادی با ایجاد گیاهان نو ترکیب تولید کننده سیکلوتیدها را به منظور مقاوم‌سازی و همچنین القای اثرات درمانی مطلوب به مواد خوراکی گیاهی، بسیار حائز اهمیت می‌سازد. به علاوه مبنای ژنتیکی این پپتیدها قابلیت بیان سیکلوتیدهای با خاصیت ذاتی مطلوب و نیز سیکلوتیدهای مهندسی شده، در میگروارگان‌ها و همچنین تولید و دسترسی به میزان انبوهی از این پپتیدها را در پی دارد. از اینرو مطالعات مولکولی و ساختاری ژن‌های تولید کننده این پپتیدها، همانند مطالعات و غربالگری‌های انجام یافته روی پپتیدهای سیکلوتیدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف از پژوهش حاضر، مطالعه ساختار ژنتیکی برخی از پیش‌سازهای ژنی کد کننده سیکلوتید و همچنین تخلیص و اثر سنجی ضد میکروبی این پپتیدها از گیاه بنفشه سه‌رنگ می‌باشد که پیشتر نیز چندین سیکلوتید در مطالعات مختلف از این گیاه شناسایی شده است. گیاه بنفشه سه‌رنگ از گیاهان دارویی بوده و خواص درمانی بسیاری برای آن ذکر شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای جهت ارتباط این ویژگی‌های مفید درمانی و دارویی، با سیکلوتیدهای موجود در این گیاه انجام نشده است. در یک مطالعه فعالیت ضد میکروبی چندین عصاره مختلف به دست آمده از این گیاه بدون برقراری ارتباط فعالیت مذکور با سیکلوتیدهای موجود در بنفشه سه‌رنگ و یا مشخص نمودن ترکیبات فعال مرتبط ارائه شده است (Witkowska-

(Banaszczak et al, 2005). در این پژوهش علاوه بر مطالعات مولکولی، عصاره‌گیری از بخش‌های هوایی گیاه (برگ‌ها و گل‌ها) با حلال اتانول صورت گرفته و تخلیص نسبی سیکلوتیدها به روش عصاره‌گیری فاز جامد با استفاده از ستون فاز معکوس SPE C18-ec انجام گردیده و فعالیت ضد میکروبی آنها روی باکتری‌های بیماریزای *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفته است.

بخش مولکولی به منظور جداسازی پیش سازهای ژنی کدکننده سیکلوتیدی با استفاده از غربالگری cDNA با پرایمر دژنره طراحی شده برای ناحیه سیگنال شبکه آندوپلاسمی این پیش سازهای ژنی در خانواده بنفشه انجام گردیده است.

فصل دوم

مواد و روش‌ها

۱-۲ بخش اول: شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی

۱-۱-۲ ابزار، وسایل، کیت‌ها و مواد مورد استفاده در این بخش:

جدول ۱-۲ ابزار مورد استفاده در بخش پژوهش مولکولی

نام ابزار	مدل	شرکت سازنده
آب مقطر گیری	-	P.T.N international
اتوکلاو	WAC-47	Wise clave
اینکوباتور ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$)	INE500	Memmert
بن ماری	W 350S	Fater electronics
الکتروفورز	-	EPS-Akhtarian
ترازو	TE1535	Sartorius
اسپکتروفوتومتر	-	Ependorf-Biophotometer
میکروفیوژ	-	Spectrafuge 16M
ترموسایکلر دارای بلوک شیب حرارتی	PeqSTAR 96 Universal	peQlab
ترانس لومیناتور	-	Labnet
ژل داک	-	Uvidoc
شیکر اینکوباتور	311DS	Labnet
فریزر -70°C	U570-86	New Brunswick
منبع تغذیه (Power supply)	R-120	Beckman
سانتریفوژ یخچال دار	MIKRO 220R	Hettich

جدول ۲-۲ کیت‌های مورد استفاده در بخش مولکولی

شرکت سازنده	نام کیت	کیت‌های مورد استفاده
Ambions	RNAqueous®-Midi Kit	کیت استخراج RNA
Roche	Expand Reverse Transcriptase	کیت سنتز cDNA
Solis BioDyne	M-MLV Reverse Transcriptase RNase H	کیت سنتز cDNA
Metabion	mi-Pfu Set	کیت PCR
Viogene	Gel/ PCR DNA isolation system	کیت استخراج DNA از ژل
Bioneer	Nano-Plus Plasmid mini Extraction Kit	کیت استخراج DNA پلاسمیدی

جدول ۳-۲ آنزیم‌های مورد استفاده در بخش مولکولی پژوهش

شرکت سازنده	آنزیم‌های مورد استفاده
ژن فناوران	DNA-Taq Polymerase
Cinnagen	آنزیم محدود کننده (Rapid digest Sma I)
ABS	آنزیم T4 ligase

جدول ۴-۲ مواد مورد استفاده

شرکت سازنده	مواد مورد نیاز
ژن فناوران	بافر PCR (10X)، کلرید منیزیم (50 mM)، مخلوط dNTP (10Mm)
Viogene	100 bp plus DNA Ladder
MERK	تریس بازی، EDTA، بوریک اسید، سدیم کلرید، گلیسرول، آگار-آگار،

	عصاره مخمر، کلسیم کلرید، گلوکز، تریپتون، برموفنل بلو
Biotium	Gel red
Cinna gene	X-gal, DNA safe stain
Sigma	آگارز، آمپی سیلین

جدول ۲-۵ سویه مورد استفاده در بخش مطالعات مولکولی

کاربرد	نام سویه
میزبان همسانه سازی	سویه استاندارد <i>Escherichia coli</i> DH5 α

مطالعات مولکولی در این پژوهش در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی در دانشگاه تهران انجام گرفته است.

۲-۱-۲ گونه‌ی گیاهی مورد مطالعه

گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor*) به صورت کامل و با گل‌های شکوفا از ارتفاع ۲۰۰۰ متری منطقه آسرد واقع در شرق استان تهران به صورت زنده در گلدان به آزمایشگاه انتقال یافت و در مدت انجام مطالعات مولکولی در شرایط مساعد نگهداری گردید.

۳-۱-۲ پرایمرهای مورد استفاده

شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی در این مطالعه، مطابق با مطالعات اخیر روی این ژن‌ها با استفاده از پرایمر دژنره طراحی شده برای ناحیه‌ای حفاظت شده در اغلب پیش سازهای ژنی سیکلوتیدی به ویژه در خانواده گیاهی Violaceae صورت گرفت. این ناحیه قسمتی از توالی سیگنال شبکه‌ی آندوپلاسمی در mRNA پیش سازهای سیکلوتیدی بوده و بسیار حفاظت شده

است و توالی پپتیدی AAFALPA را کد می‌نماید (Simonsen *et al.*, 2005). شناسایی ژن-های سیکلوتیدی با استفاده از این پرایمر دژنره²⁶ از روی پروفایل بیانی گیاه زنده صورت گرفته و به همین منظور به جای استخراج DNA گیاهی، استخراج RNA تام از بافت‌های زنده گیاهی انجام شد. توالی پرایمر دژنره حفاظت شده در جدول ۲-۶ آمده است و بازهای H و Y بازهای دژنره می‌باشند که به ترتیب با بازهای A, C, T و بازهای C, T می‌توانند جفت شوند. شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی از طریق غربالگری cDNA با پرایمرهای الیگو dT₂₀ و پرایمر دژنره حفاظت شده مذکور انجام گردید.

پرایمرهای B1 F و B1 R که توالی آنها در جدول ۲-۶ ارائه شده است، مربوط به پلاسمید pUC19 می‌باشند که در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشگاه تهران طراحی شده و استفاده می‌شوند. با استفاده از این پرایمرها باندی در حدود ۱۰۰۰ جفت باز در برگیرنده ناحیه همسانه سازی این پلاسمید حاصل می‌شود. در اینجا به منظور تایید ورود ژن‌های همسانه سازی شونده به جایگاه همسانه‌سازی در حامل pUC19 مورد استفاده قرار می‌گیرند. به جای این دو پرایمر می‌توان از پرایمرهای عمومی M13-pUC نیز استفاده کرد.

جدول ۲-۶ توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	Tm(°C)	طول قطعه تکثیری
------------	-------	--------	-----------------

²⁶ Degenerated primer

Degenerate conserve	5'-GGGCHGCHTTYGCHCTTCCHGC-3'	۶۷/۵	متفاوت می‌باشد
Oligo dT ₂₀	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	۳۸/۵	-
B1 R	5'-CACATTTCCCGAAAAGTGC-3'	۵۹	-
B1 F	5'-ACGTTCTGCCTTTTGC-3'	۵۶	-

۲-۱-۴ مراحل انجام مطالعات مولکولی

۲-۱-۴-۱ استخراج RNA تام از بافت زنده گیاهی

مطالعات شناسایی ژن با استفاده از پروفایل بیانی این ژن‌ها و پرایمر دژنره صورت می‌گیرد. از این رو استخراج RNA تام گیاهی از بافت‌های زنده و تازه گیاه مورد نظر (برگ‌ها و گل‌ها به صورت مجزا) از طریق کیت RNAqueous[®]-Midi Kit انجام می‌شود.

روش کار:

۱- ابتدا به میزان ۱۰۰ mg از بافت گیاهی تازه در هاون قرار داده شد و با نیتروژن مایع پودر گردید.

۲- قبل از آب شدن بافت ۱/۲ ml از محلول lysis/ binding به آن اضافه شد و خوب هموژن شد.

۳- باقی مراحل مطابق پروتوکل کیت انجام شد.

۴- رسوب دهی و تغلیظ RNA استخراج شده با LiCl به صورت زیر انجام شد:

۱. RNA با نیم حجم از سوسپانسیون سرد LiCl مخلوط گردید.

۲. در دمای 20°C - به مدت حداقل ۳۰ دقیقه انکوبه شد.
 ۳. در سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) و دمای 4°C ، به مدت ۱۵ دقیقه میکروسانتریفیوژ شد.
 ۴. سوپرناتانت به دقت خارج و دور ریخته شد.
 ۵. رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شد و مجدداً سانتریفیوژ گردیده و سوپرناتانت دور ریخته شد.
 ۶. رسوب RNA در حجم مناسبی از بافر Elution (حجم ۵۰ μl) حل گردید. با گرما و استفاده از ورتکس راحتتر مخلوط می شود.
- ۲-۴-۱-۲ سنجش غلظت و خلوص RNA به وسیله اسپکتروفوتومتر جذب و خلوص اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm اندازه گیری می شود. نسبت جذب در ۲۶۰ nm به جذب در ۲۸۰ nm در محدوده ۱.۸ تا ۲/۱ بیانگر خلوص RNA می باشد.
- روش کار:
- ۱- ابتدا دستگاه اسپکتروفوتومتر برای سنجش RNA تک رشته ای تنظیم شد.
 - ۲- سپس حداقل ۷۰ μl از آب مقطر استریل در یک کووت ریخته و دستگاه با آن کالیبره (صفر) شد.
 - ۳- سپس RNA استخراج شده به میزان یک دهم رقیق شد و میزان جذب آن اندازه گیری شد.

۲-۱-۴-۳ ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز

ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده همانند DNA به دلیل دارا بودن گروه های باردار فسفات در ساختمان خود از طریق الکتروفورز ممکن می‌گردد. اسیدهای نوکلئیک به دلیل دارا بودن یون‌های فسفات، بار منفی زیادی دارند و به همین دلیل به طرف قطب مثبت حرکت می‌کنند. باندهای مربوط به RNA در الکتروفورز با ژل آگاروز به صورت دو باند پشت سر هم می‌باشد.

مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگارز:

بافر TBE 1X، بافر بار گذاری، رنگ red safe، پودر آگارز، شاخص وزن مولکولی

*طرز تهیه TBE 10X (pH = 8):

۱۰۸gr تریس بازی، ۵۵gr بوریک اسید و ۴۰ml از EDTA (۰.۵M، pH=8) در حجم ۱۰۰۰

میلی لیتر آب مقطر حل شد و در دمای اتاق نگهداری شد.

روش کار:

۱- ابتدا قالب و شانه با الکل ۷۰٪ تمیز شد و شانه در محل مخصوص قرار داده شد.

۲- مقدار ۰.۲۵gr پودر آگاروز به ۵۰ml بافر TBE 1X اضافه شد و با حرارت دادن در

دستگاه مایکروویو کاملاً حل شد.

۳- آگاروز مذاب پس از افزودن رنگ ژل رد بایوتیوم به آرامی در داخل قالب ژل ریخته شد.

پس از بسته شدن کامل ژل و برداشتن شانه، ژل در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE

1X قرار گرفت.

- ۴- نمونه‌های RNA استخراج شده از گل و برگ گیاه مورد نظر و نیز شاخص وزن مولکولی پس از مخلوط شدن با بافر رنگی بارگذاری به آرامی و با ملایمت داخل چاهک‌های ژل قرار داده شد. تانک الکتروفورز به منبع تغذیه با ولتاژ ۹۰ متصل شد.
- ۵- پس از پایان یافتن الکتروفورز باندهای مربوطه توسط دستگاه ترنس لومیناتور یا UV Doc مشاهده و نتیجه عکسبرداری شد.

۲-۱-۴ واکنش نسخه برداری معکوس و سنتز cDNA

- انجام واکنش نسخه برداری معکوس (RT) و سنتز کتابخانه cDNA با استفاده از پرایمر Oligo-dT و استفاده از کیت های Expand Reverse Transcriptase (Roche) و کیت M-MLV Reverse Transcriptase RNase H (Solis BioDyne) مطابق دستور العمل کیت های مربوطه انجام شد.

روش کار:

- ۱- با توجه به غلظت RNA استخراج شده میزان حدود ۱ میکروگرم از RNA مرحله قبل به یک میکروتیوب ۰/۲ منتقل و به آن ۱ μl از پرایمر Oligo-dT (۲۰ pmole) اضافه شد و با افزودن آب مقطر تزریقی به حجم ۱۱ میکرولیتر رسانده شد.
- ۲- سپس در دمای 65°C (Lid temperature 75°C) به مدت ۱۰ min انکوباسیون شد.
- ۳- سپس میکروتیوب‌ها به روی یخ انتقال یافتند و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. (سایر مراحل بروی یخ انجام می‌شود).
- ۳- اجزاء زیر به میکروتیوب اضافه گردید.

dNTP (۰/۰۱ M).....۲ μ l

Buffer RT (1X).....۴ μ l

DTT (۱۰۰ mM).....۲ μ l

RT enzyme.....۱ μ l

۵- میکروتیوب‌ها برای مدت ۶۰ min در دمای 42°C انکوبه شدند. (در این مرحله Lid temp دستگاه در حالت خاموش قرار می‌گیرد).

۶- سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۲ min در دمای 95°C (Lid temp: 110°C) به منظور غیر فعال کردن آنزیم قرار داده می‌شوند.

۷- محصول cDNA بدست آمده در این مرحله می‌تواند مستقیماً برای PCR به کار برده شود.

۲-۱-۴-۵ تکثیر cDNA مورد نظر و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

به منظور غربالگری cDNA سنتز شده جهت شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی، تکثیر cDNA با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و به واسطه پرایمرهای الیگو dT_{20} و پرایمر دژنره ارائه شده، در واکنش‌های مجزا با آنزیم‌های پلیمرز Pfu و Taq به صورت زیر انجام پذیرفت.

واکنش PCR نهایی در مخلوط واکنش $25\mu\text{l}$ انجام شد. مقادیر و ترکیب اجزا واکنش برای شناسایی ژن سیکلوتیدها در جدول ۲-۷ و برنامه واکنش در جدول ۲-۸ آورده شده است. نمونه فاقد cDNA الگو به عنوان شاهد منفی بررسی شد. پس از انجام PCR به میزان $4\mu\text{l}$ از

محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ به همراه شاخص مولکولی، الکتروفورز گردید و باند اختصاصی مشاهده شد.

جدول ۲-۷ مقادیر و ترکیبات واکنش PCR به منظور شناسایی ژن سیکلوتیدها

غلظت نهایی در واکنش	حجم مورد استفاده (μl)	اجزا تشکیل دهنده مخلوط واکنش
۳۰-۱۰ ng/μl	۱/۵-۳	cDNA
۱ X	۲/۵	بافر (10X) PCR
۰/۴ μM	۱	پرایمر دژنره
۰/۴ μM	۱	پرایمر الیگو dT
۰/۲ μM	۰/۵	دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات
۱ mM	۰/۵	منیزیم کلراید
۲/۵ U	۰/۲۵	آنزیم Taq- DNA Pol
	تا حجم نهایی ۲۵	آب مقطر دیونیزه (تزریقی)
	۲۵	حجم نهایی

غلظت نهایی در واکنش	حجم مورد استفاده (μl)	اجزا تشکیل دهنده مخلوط واکنش
۱۰ ng/μl	۳-۱/۵	cDNA
۱ X	۲/۵	بافر (10X) Pfu حاوی منیزیم
۰/۵ μM	۱/۲۵	پرایمر دژنره
۰/۵ μM	۱/۲۵	پرایمر الیگو dT
۰/۴ μM	۱	دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات
۱/۲۵ U	۰/۲۵	آنزیم Pfu- DNA Pol
	تا حجم نهایی ۲۵	آب مقطر دیونیزه (تزریقی)
	۲۵	حجم نهایی

جدول ۲-۸ برنامه زمانی و دمایی PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (ستون اول زمانی برای Pfu و ستون دوم برای Taq-polymerase می‌باشد)

مرحله	نام مرحله	دما	زمان		تعداد تکرار
اول	واسرشتی اولیه	۹۵°C	۵ دقیقه		۱
دوم	واسرشتی	۹۵°C	۳۰ ثانیه	۴۵ ثانیه	۲۰
	اتصال	۶۰°C	۱ دقیقه	۴۵ ثانیه	
	گسترش	۷۲°C	۱/۵ دقیقه	۲ دقیقه	
سوم	واسرشتی	۹۵°C	۳۰ ثانیه	۴۵ ثانیه	۲۰
	اتصال	۴۰°C	۱ دقیقه	۴۵ ثانیه	
	گسترش	۷۲°C	۱/۵ دقیقه	۲ دقیقه	
چهارم	گسترش نهایی	۷۲°C	۱۰-۱۵ دقیقه		۱

۲-۱-۴-۶ تخلیص باند اختصاصی از ژل آگاروز

باند مربوط به پرایمر اختصاصی دژنره جهت تعیین توالی بایستی تخلیص گردیده و کلون شود. تخلیص باند اختصاصی از روی ژل آگاروز پس از انجام الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج از ژل Gel/ PCR DNA isolation system شرکت Viogene انجام گردید. برای این منظور واکنش PCR با حجم زیاد تکرار شده و تمام محصول واکنش روی ژل بارگذاری شد.

روش کار:

۱- DNA روی ژل آگارز دو درصد بارگذاری و سپس الکتروفورز شد. قطعه‌ای از ژل که دارای باند DNA مورد نظر است، بریده شده و در یک ویال ۲ ml قرار گرفت.

* نکته: تا جایی که امکان دارد زمان در معرض قرار گرفتن ژل در برابر UV باید کوتاه باشد.

- ۲- برای استخراج DNA از ژل آگارز، متناسب با وزن قطعه بریده شده از ژل ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر بافر GP فراهم شده درون کیت به ویال های حاوی ژل افزوده شد.
- ۳- ویال ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه انکوبه شدند تا زمانیکه ژل کاملاً حل شود (با تکان دادن و سر و ته کردن ویال ها اینکار سریعتر صورت می گیرد).
- ۴- ستون GPTM فراهم شده در کیت به ویال های مخصوص جمع آوری متصل شده و هر بار حدود ۰/۷ ml از مخلوط حل شده از مرحله قبل در ستون بارگذاری گردید. برای ۳۰ الی ۶۰ ثانیه ستون متصل به ویال با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm و دمای اتاق سانتریفیوژ گردیده و مایع خارج شده از ستون دور ریخته شد. این کار برای تمام محلول شامل ژل انجام گرفت.
- ۵- مقدار ۵۰۰ µl بافر شستشوی WN به ستون متصل به ویال اضافه شد و سپس به مدت ۱ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده و دوباره مایع خارج شده از ستون دور ریخته شد.
- ۶- مشابه مرحله ۵ برای بافر شستشوی WS انجام گردید.
- ۷- ستون به منظور حذف اتانول باقیمانده با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm و دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد.
- ۸- ستون را به یک ویال تمیز و استریل ۱/۵ ml جهت جمع آوری ژن تخلیص شونده، وصل شده و ۱۵ الی ۳۰ میکرولیتر بافر Elution درست به مرکز غشای ته ستون افزوده شد.
- ۹- پس از ۲ الی ۳ دقیقه، در سرعت بالای سانتریفیوژ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه محتویات DNA ستون شسته شده و جمع آوری گردید. غلظت DNA تخلیص شده نیز با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

*ژن خالص شده به این روش به منظور تعیین توالی برای کارهای کلونینگ در فریزر $^{\circ}\text{C} -20$ نگهداری و مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۱-۴-۷ همسانه سازی 27 ژن خالص شده

به منظور انجام تعیین توالی ژنی به علت استفاده از پرایمر دژنره در تکثیر ژنی بایستی همسانه سازی انجام شده و پلاسمیدهای حاوی DNA نو ترکیب به صورت مجزا تعیین توالی گردند (پلاسمیدهای حاصل از کلونی های سفید متفاوت ممکن است توالی یکسان یا متفاوت داشته باشند). تهیه و آماده سازی محیط های کشت و محلول آنتی بیوتیکی و سلول های مستعد در زیر ارائه می شود.

۲-۱-۴-۷-۱ آماده سازی محیط های کشت

• محیط LB مایع (Lauria Bertany):

تریپتون (Tryptone)	۱۰ g
عصاره مخمر (Yeast extract)	۵ g
کلرید سدیم	۵ g
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ ml

مواد فوق پس از توزین در یک ارلن ریخته شد و با افزودن آب مقطر، حجم آن به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از حل شدن کامل مواد در آب مقطر، محیط کشت حاصله توسط اتوکلاو و در دمای $^{\circ}\text{C} 121$ ، به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید (Sambrook, and Russell., 2001).

²⁷ cloning

در صورتی که نیاز به افزودن آنتی بیوتیک باشد، پس از استریل شدن محیط کشت در اتوکلاو و پایین آمدن دمای محیط کشت تا 40°C آنتی بیوتیک مورد نظر با غلظت مناسب به آن افزوده می‌شود. در پژوهش حاضر از غلظت $50-100 \mu\text{g/ml}$ آمپی سیلین استفاده شد.

• آماده سازی محیط کشت LB جامد:

تریپتون	10 g
عصاره مخمر	5 g
سدیم کلرید	5 g
پودر آگار	10 g
آب مقطر	تا 1000 ml

مواد فوق ابتدا توزین و در ارلن ریخته شد، سپس تا حجم 1000 میلی لیتر آب به آن اضافه شد. برای حل شدن مواد در آب مقطر به خاطر وجود آگار در ترکیبات محیط کشت، نیاز به حرارت می‌باشد. بعد از حل شدن کامل مواد درون آب محیط کشت، طبق شرایط ذکر شده استریل شد. در صورت نیاز به افزودن آنتی بیوتیک، پس از استریل شدن و پایین آمدن دما تا حدود 40°C آنتی بیوتیک اضافه و در نهایت محیط کشت در ظروف پتری استریل در زیر هود بیولوژیک و در کنار شعله تقسیم شد.

۲-۱-۴-۷-۲ تهیه محلول آنتی بیوتیک

در این پژوهش از آنتی بیوتیک آمپی سیلین استفاده شد زیرا وکتور مورد استفاده برای کلون کردن (pUC19) حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین می‌باشد. برای تهیه محلول ذخیره آنتی بیوتیک مقدار 500 میلی گرم پودر آمپی سیلین در 2 میلی لیتر آب مقطر تزریقی حل شد

و به این ترتیب محلول ۲۵۰ میلی گرم در یک میلی لیتر از آن تهیه شد و با کمک فیلتر استریل گردید. سپس به غلظت نهایی ۱۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به محیط‌های کشت باکتری اضافه شد.

۲-۱-۴-۷-۳ تهیه محلول X-gal

۱۰۰ میلی گرم پودر X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) را در ۵ میلی لیتر حلال DMF (dimethylformamide) حل نموده (۲۰ mg/ml) و در ظروف تیره یا ویال‌های فویل پیچیده شده در دمای 20°C در فریزر نگهداری می‌کنیم. از استوک تهیه شده X-gal به میزان $40\ \mu\text{g/ml}$ همانند افزودن آنتی بیوتیک به محیط اضافه می‌کنیم (می‌توان X-gal را در سطح پلیت افزوده و با استفاده از گوی شیشه ای استریل همگن نمود).

۲-۱-۴-۷-۴ مستعد کردن باکتری *Escherichia coli* (DH5 α) به روش کلرید کلسیم

(Hanahan, D., 1983)

باکتری مستعد باکتری است که توانایی تراریخت شدن با یک قطعه DNA خارجی را داشته باشد.

مواد و محلول‌های مورد نیاز:

کلسیم کلرید ۷۵ mM (غلظت بهینه)، گلیسرول

روش کار:

۱- یک کلنی از پلیت LB آگار در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و کشت شبانه گردید.

- ۲- روز بعد ۱ میلی لیتر از این محیط کشت در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت جدید تلقیح و تا رسیدن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳ تا ۰/۵ در ۳۷°C گرماگذاری شد.
- ۳- محیط مزبور در دو فالكون سرد استریل توزیع و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد.
- ۴- محلول رویی دور ریخته و رسوب آن به آرامی در ۱۰ میلی لیتر کلسیم کلرید ۷۵ میلی مولار سرد و استریل حل شد. سپس لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و مطابق شرایط قبلی سانتریفیوژ تکرار گردید.
- ۵- محلول رویی دور ریخته و رسوب در ۳/۴ میلی لیتر کلسیم کلرید سرد به آرامی حل شد. سپس به آن ۱ میلی لیتر گلیسرول سرد استریل اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید.
- ۶- ۱۰۰ µl از محلول فوق به ویال‌های ۰/۲ سرد و استریل اضافه شد و بلافاصله به فریزر ۷۰°C منتقل شد.

۲-۱-۴-۷-۴ همسانه‌سازی محصول PCR با استفاده از ناقل pUC19

به منظور تسهیل در امر همسانه‌سازی از محصول PCR با آنزیم Pfu که انتهای کور یا صاف ایجاد می‌کند و همچنین آنزیم محدود کننده یا برشی که ایجاد پایانه صاف در ناقل پلاسمیدی مذکور می‌نماید، استفاده می‌شود. آنزیم برشی Sma I در اینجا مورد استفاده قرار گرفت که دارای یک جایگاه برش (CCC↓GGG) در MCS پلاسمید pUC19 می‌باشد. کلون کردن قطعه استخراج شده از ژل شامل چهار مرحله است.

- ایجاد برش در پلاسمیدهای حلقوی pUC19

- الحاق (Ligation)

• انتقال (Transformation)

• آنالیز کلونی‌های نوترکیب (Analysis of Recombinant Clones)

روش کار:

I ایجاد برش در پلاسمیدهای حلقوی pUC19

با استفاده از آنزیم محدود کننده Rapid Digest Sma I تهیه شده از شرکت سیناکلون، برشی با انتهای صاف در جایگاه برشی CCCGGG در ناقل pUC19 به صورت زیر ایجاد می‌شود.

اجزای زیر به منظور برشی آنزیمی مذکور به ویال ۰/۲ استریل افزوده شده، به آرامی و با اسپین کردن مخلوط گردید. سپس در دمای ۲۵°C به مدت ۳۰ تا ۹۰ دقیقه انکوبه شد. برای غیر فعال سازی آنزیم حرارت دهی در دمای ۶۵°C به مدت ۲۰ دقیقه لازم است.

RD restriction Sma I 1 µl
 10X RD Buffer..... 2 µl
 pUC19 uncut DNA..... 1 µg
 DNase free water..... up to 20 µl

II واکنش الحاق

جهت شرکت در واکنش الحاق، با توجه به میزان جذب نوری و طول قطعه DNA تخلیص شده و طول ناقل پلاسمیدی، نسبت‌های مولاری ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ (DNA الحاقی:ناقل) محاسبه و استفاده می‌شود. واکنش الحاق یا اتصال به واسطه آنزیم T4 DNA ligase تهیه شده از شرکت ABS به صورت زیر انجام می‌گردد.

ترکیبات زیر در ویال‌های ۰/۲ افزوده شده و به مدت ۲ ساعت در دمای 22°C انکوبه می‌شوند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C برای غیر فعال کردن آنزیم T4 ligase حرارت دهی صورت می‌گیرد. اندازه پلاسمید (۲۶۸۶ bp) ۳۸ برابر اندازه باند ژنی ۷۰۰ جفت بازی می‌باشد.

10X buffer A1 μl
 10X buffer B1 μl
 cutted pUC1950 ng
 insert DNA(13, 26 & 39 ng)
 T4 ligase1 μl
 dH₂O.....up to 10 μl

III. مرحله انتقال

برای انتقال ناقل پلاسمیدی به درون سلول‌های مستعد (*Escherichia coli* (DH5 α)) از روش شوک حرارتی استفاده می‌شود (Sambrook, and Russell., 2001).

- ۱- ابتدا باکتری‌های مستعد از فریزر -70°C خارج شده و سریع درون یخ قرار گرفتند. پس از ذوب شدن روی یخ، محصول واکنش الحاق به آن افزوده و به خوبی مخلوط گردید.
- ۲- ویال‌های حاوی باکتری و DNA پلاسمیدی به مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار گرفتند.
- ۳- سپس برای ایجاد شوک حرارتی ویال‌ها ۱.۵ دقیقه در دمای 42°C در ترموسایکلر یا حمام آب قرار گرفتند.
- ۴- ویال‌ها بلافاصله و به آرامی روی یخ انتقال یافته و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند.
- ۵- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB بدون آنتی بیوتیک به هر کدام از ویال‌ها اضافه شده و ۱ ساعت در 37°C گرماگذاری شدند.

۶- پس از آن باکتری‌ها بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک و X-Gal مناسب کشت داده شده و پلیت‌ها یک شب در 37°C گرماگذاری گردیدند.

واکنش شاهد

شاهد مثبت: سلول مستعد به همراه ناقل حلقوی (uncutted pUC19)

IV. آنالیز کلونی‌های نو ترکیب

تمام سلول‌های رشد کرده در محیط انتخابی، پلاسمید را (به صورت نو ترکیب یا غیر نو ترکیب) دریافت کرده‌اند. جهت تشخیص سلول‌های دریافت کننده پلاسمید نو ترکیب از سایر سلول‌ها مراحل زیر انجام می‌شود.

به کمک تیپ‌های استریل یا خلال دندان استریل کلنی‌های سفید را جداگانه برداشته و هر کدام را در ۱ میلی لیتر LB مایع حاوی میزان مناسب آنتی بیوتیک تلقیح نموده و به مدت سه تا چهار ساعت در دمای 37°C انکوبه می‌کنیم تا باکتری‌ها رشد کنند. پس از رسیدن ویال‌ها به کدورت مناسب مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آن را به ویال ۰/۲ استریل ریخته و سانتریفیوژ می‌نماییم. رسوب باکتری دو بار با آب مقطر استریل شسته می‌شود و سپس در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی استریل سوسپانسیون می‌گردد. این سوسپانسیون‌های باکتری در دمای 95°C در ترموسایکلر (با Lid temp روشن) به مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه انکوبه گردیده و سپس به عنوان DNA الگو جهت تایید ورود ژن مورد نظر، در واکنش PCR با پرایمرهای مربوط به پلاسمید pUC19 (دمای اتصال برای پرایمرهای B1R و B1F 57°C می باشد) مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلونی‌های حاوی پلاسمیدهای تایید شده به واسطه PCR، در محیط‌های LB مایع

حاوی آنتی بیوتیک مناسب کشت شبانه شده و جهت استخراج DNA پلاسمیدی به کار می‌روند.

۲-۱-۴-۵-۷-۵ استخراج DNA پلاسمیدی

استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Miniprep) Bioneer (Plasmid Mini Extraction Kit) انجام می‌شود. کیت شامل بافر ۱، بافر ۲، بافر ۳، بافر D، بافر ۴، بافر ۵ و ستون‌های اتصال به DNA است.

روش کار:

- ۱- مقدار ۱-۵ میلی لیتر از کشت شبانه با دور >8000 (rpm) به مدت ۲ دقیقه رسوب داده شد.
- ۲- مقدار ۲۵۰ میکرولیتر بافر ۱ به سلول‌ها اضافه و با ورتکس به صورت سوسپانسیون درآمد.
- ۳- مقدار ۲۵۰ میکرولیتر بافر ۲ اضافه و به آرامی محلول با وارونه کردن مخلوط شد.
- ۴- مقدار ۳۵۰ میکرولیتر بافر ۳ اضافه و فوراً ۴-۳ بار با وارونه کردن به آرامی مخلوط شد.
- ۵- ویال‌ها در دور ۱۳۰۰۰ (rpm) و دمای 4°C به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ شد.
- ۶- مایع رویی به ستون اتصال DNA منتقل و سانترفیوژ گردید. مایع درون ویال تخلیه و ستون مجدداً سرهم بندی شد.
- ۷- مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر ۴ به ستون اضافه و سانترفیوژ شد.
- ۸- فیلتر به ویال ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شد.
- ۹- مقدار ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به فیلتر اضافه و ۱ دقیقه به حال خود رها شد.

۱۰- DNA پلاسمیدی سانترفیوژ شد.

تعیین غلظت پلاسمید با استفاده از خواندن جذب در طول موج ۲۸۰nm توسط اسپکتروفوتومتر صورت گرفته و تایید مجدد با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز مطابق با الکتروفورز انجام شده در پاراگراف ۲-۱-۴-۳ و یا تایید توسط PCR مجدد از پلاسمید های استخراج شده، انجام می گردد. پس از تایید نهایی پلاسمیدها جهت تعیین توالی به شرکت 1st BASE Sequencing INT ارسال گردید.

۲-۲ بخش دوم: استخراج سیکلوتید

در این پژوهش عصاره‌گیری و استخراج سیکلوتیدها، روش‌های تایید و سنجش اثرات ضد میکروبی از گیاه مورد مطالعه در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهرا انجام گرفته است.

۲-۲-۱ ابزار، وسایل و مواد مورد استفاده در این بخش:

جدول ۲-۹ دستگاه‌های مورد استفاده در تخلیص پتید

نام دستگاه	شرکت سازنده
pH متر (±۰/۰۱)	Heidolph- LABOROTA 4001-efficient
تانک الکتروفورز پروتئین	AKHTARIAN
پمپ پرستاتیک	Fulka- 02395
منبع الکتریسیته الکتروفورز	AKHTARIAN- CO:8312428
UV- اسپکتروفتومتر	LABOMED

جدول ۲-۱۰ مواد مورد استفاده در تخلیص پپتید

شرکت سازنده	مواد و محلول‌ها
MERK- 1.01990.1000	۱- بوتانول
Dr.mojallali chemical laboratories- 17103	دی‌کلرومتان
MERK	اتانول
MERK- 1.06009.2500	متانول
MERK- 1.00056.2500	استیک اسید
Fulka- 02395	پلی‌آمید
MERK	بافر استات آمونیوم
MERK	کوماسی بلو G-250
MERK	اتانول
MERK	اسید فسفریک ۸۵٪
MERK	آلبومین سرم گاوی (BSA)
MERK	دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)

۲-۲-۲ گونه گیاهی مورد استفاده

گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor*) از خانواده بنفشه *Violaceae* می‌باشد که در این پژوهش گل‌ها و برگ‌های آن به صورت مجزا عصاره‌گیری و مطالعه گردید.

۲-۲-۳ مراحل تخلیص پتید به صورت گام به گام

۱-۳-۲-۲ استخراج سیکلوتید

۱- نمونه گیاهی *Viola tricolor* از ارتفاع ۲۰۰۰ متر از سطح دریا از منطقه آبسرد، کیلان واقع در شرق استان تهران توسط گیاه‌شناس دانشگاه الزهرا جمع‌آوری شد. خاک و برگ‌های پوسیده جدا گردید و در دمای محیط خشک شد. عصاره‌گیری به صورت مجزا از برگ‌ها و گل‌های گیاه مورد نظر صورت پذیرفت، لذا گل‌ها و برگ‌ها جداگانه جمع‌آوری شده، پودر گردیده و وزن شدند. حدود ۱۴/۵ گرم برگ خشک گیاه و ۹ گرم گل خشک و پودر شده گیاه به ترتیب با افزودن ۱۷۵ و ۱۱۰ میلی لیتر حلال دی کلرومتان جهت حذف مواد چربی دوست عصاره‌گیری گردیدند. بدین صورت که ارلن‌های حاوی نمونه‌های گیاهی پس از افزودن حلال به مدت ۱ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفتند. این مرحله ۵ بار و هر بار با حلال تازه برای هر دو نمونه تکرار گردید. نمونه‌های گیاهی تیمار شده با دی کلرومتان در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز خشک شدند (دی کلرومتان در هر مرحله دور ریخته شد).

۲- به منظور حذف پلی پتیدها، باقیمانده خشک شده گیاه برای نمونه‌های برگ و گل گیاه، به ترتیب با ۲۵۰ و ۱۵۰ میلی لیتر از محلول آبی اتانول ۵۰٪ مشابه مرحله قبل عصاره‌گیری شد. این مرحله ۳ بار تکرار شده و هر بار محلول‌های اتانولی جمع‌آوری گردید.

در این مرحله سیکلوتیدها در حلال اتانولی حل شده‌اند. عصاره های اتانولی بدست آمده از این مرحله با استفاده از جریان هوا به مدت یک شب تغلیظ و در پایان با اضافه کردن استیک اسید به میزان ۲٪ حجم نهایی عصاره، اسیدی شدند.

۳- با استفاده از ستون یا صافی پلی آمید می‌توان پلی فنل‌های (تانن‌ها) موجود در عصاره های اتانولی را حذف کرد. به این ترتیب که ۳۱ گرم پودر پلی‌آمید در استیک اسید ۲٪ به مدت دو شبانه روز خیسانده و سپس روی ۸ کاغذ صافی واتمن توزیع شد به گونه‌ای که لایه یکنواختی روی صافی‌ها را بگیرد. در نهایت هر صافی با ۱۰۰ ml محلول اتانول ۵۰٪ در استیک اسید ۲٪ شسته شد.

۴- نمونه‌ها به طور مساوی روی صافی‌های حاوی پلی آمید قرار گرفت. زمانی که نمونه از صافی خارج می‌شود تا حدودی رنگ قهوه‌ای خود را به صافی پلی‌آمید می‌دهد. این نمونه‌ها عاری از تانن هستند. حجم نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش قبل کاهش داده شد و سپس با استفاده از روتاری حلال اتانولی نمونه‌ها تبخیر شده و در نهایت عصاره غلیظ و خشکی بدست آمد (برای گل و برگ رنگ این عصاره‌ها اندکی متفاوت می‌باشد و هر دو قهوه‌ای تیره می‌باشند).

۵- برای تکمیل مراحل خالص سازی ۱ گرم از عصاره های خشک بدست آمده در مرحله قبل (مجزا برای برگ و گل) در ۱۰۰ ml آب مقطر حل شد و ۳ بار با ۱۰۰ ml بوتانول عصاره‌گیری شد. فاز بوتانولی بیشتر پپتیدهای آبگریز را در خود حل می‌کند. فاز بوتانولی جمع‌آوری شده در این سه مرحله با هم مخلوط شده و مجدداً حجم نمونه کاهش داده شد. سپس با استفاده از روتاری حلال بوتانول تبخیر گردیده و نهایتاً به صورت پودر در ویال‌ها

جمع آوری و در فریزر نگهداری شد. فاز آبی نیز به همین روش تغلیظ و نگهداری شد. زیرا تمام سیکلوتیدها وارد فاز بوتانولی نمی‌شوند.

۶- تخلیص نسبی سیکلوتیدها به روش جداسازی فاز جامد SPE با استفاده از ستون CHROMABAND® C18-ec کارتریج جداسازی فاز معکوس (۳ ml، ۵۰۰ mg) تهیه شده از شرکت MN (MACHERY-NAGEL) مطابق با روش‌های شستشوی عمومی مورد استفاده برای ستون‌های فاز معکوس در استخراج ترکیباتی نظیر سیکلوتیدها، انجام گردید. به این ترتیب که حدود ۲۵ میلی گرم از نمونه‌های بدست آمده از فاز بوتانولی در ۸ ml بافر استات آمونیوم (یا بی کربنات آمونیوم) ۰/۱ مولار و pH برابر ۸ حل شد. ابتدا ستون C18 SPE ۲ بار با ۳ ml متانول شسته شد تا ستون فعال شود. سپس با ۳ ml بافر آمونیوم استات شسته شد تا به تعادل برسد. سرعت جریان در این دو مرحله شستشو ۱ ml/min می‌باشد. سپس نمونه روی ستون بارگذاری شد. سرعت جریان در این مرحله ۰/۶ ml/min می‌باشد. سپس برای حذف ناخالصی‌ها از ۳ ml بافر استات آمونیوم استفاده شد. در نهایت برای اینکه نمونه از ستون خارج شود ستون با ۴ ml (۲×۲ml) از هر یک از محلول‌های مختلف اتانول-آبی در نسبت‌های ۰/۲۰، ۰/۵۰ و ۰/۸۰ شسته شد.

* برای آماده سازی کارتریج SPE باید به نکات زیر توجه داشت:

ظرفیت ستون: ظرفیت هر ستون SPE شرکت MN، ۵-۳٪ ماده خشک هر ستون می‌باشد و از هر ستون نهایت ۱ لیتر می‌تواند عبور کند.

pH نمونه: فاز جامد پیوند زده شده در مقابل حلال‌های آلی و pH بین ۲ تا ۸ پایدار است. در pH بالای ۸ سیلیکا آمادگی حل شدن را دارد. در pH کمتر از ۲ گروه‌های عامل

وظیفه خود را انجام نمی‌دهند. اگر چه در عمل از سیلیکاهای پیوندی در pH بین ۱ الی ۱۴ نیز استفاده می‌شود و شیمیدان‌ها معتقدند که به علت سریع بودن فرآیند عمل تخریب فاز جامد صورت نمی‌گیرد (پایان نامه هاشم پور، ۱۳۸۷).

از طرف دیگر برای ستون‌های "فاز معکوس" بهتر است نمونه بار خالصی برابر با صفر و یا اینکه حداقل مقدار بار را داشته باشند. لذا pH محلول باید به گونه‌ای تنظیم شود که برابر یا نزدیک به نقطه ایزوالکتریک سیکلوتیدها باشد. بر اساس گزارشات موجود، pH برابر ۸ برای این کار مناسب می‌باشد.

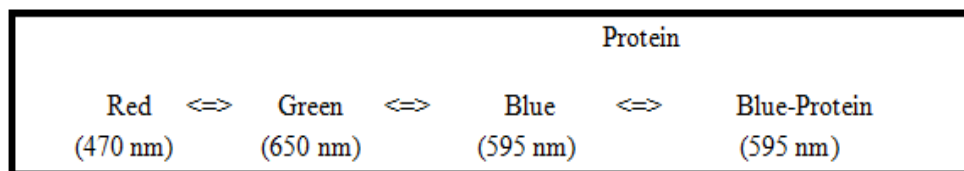
حلال مناسب: حلال مناسب حلالی است که در آب ممزوج شود و pH آن در حدود ۸ ثابت باشد، پپتیدها در آن محلول باشند و ویژگی هیدروفوبی آن به گونه‌ای باشد که در اتصال به ستون با پپتیدها رقابت نکند. بافر استات آمونیوم تمام این ویژگی‌ها را دارا می‌باشد (پایان نامه هاشم پور، ۱۳۸۷ و Cleanson *et al.*, 1998).

سرعت جریان: سرعت عبور نمونه از ستون حداکثر ۳ ml/min می‌باشد. سرعت مرحله شستشو نباید خیلی زیاد باشد. سرعت در این مرحله باید حداکثر ۱ ml/min باشد.

بعد از انجام مراحل فعال سازی ستون با متانول، متعادل سازی ستون با بافر آمونیوم استات (حلالی که نمونه در آن حل شده است)، و بارگذاری نمونه روی ستون نوبت به شستشوی ستون می‌رسد. ابتدا برای خارج شدن ترکیبات ناخالص (ترکیباتی که به ستون متصل نشده‌اند) ستون با بافر آمونیوم استات شسته می‌شود. سپس پلی‌پپتیدها در سه مرحله با محلول‌هایی که به ترتیب قطبیت آنها افزایش می‌یابد از ستون خارج می‌شوند. نمونه‌های حاصل از شستن ستون با محلول‌های مختلف برای آنالیز بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۲-۳-۲-۲ سنجش پروتئین به روش بردفورد

سنجش بردفورد یک روش تعیین پروتئین است که در آن رنگ کوماسی بلو G-250 به پروتئین‌ها متصل می‌شود. این رنگ به شکل ۳ وجود دارد: کاتیونی (قرمز رنگ)، خشتی (سبز رنگ) و آنیونی (آبی رنگ). رنگ کوماسی بلو به رزیدوهای آروماتیک و بازی به ویژه آرژینین متصل می‌شود.



شکل ۱-۲ اشکال مختلف رنگ کوماسی بلو G-250.

طرز تهیه محلول رنگی:

۲۰ mg کوماسی بلو G-250 در ۱۰ ml متانول و ۲۰ ml اسید فسفریک ۸۵٪ حل شد و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰۰ ml رسید.

نکته: در تهیه محلول بردفورد استفاده از متانول به جای اتانول، باعث می‌شود محلول به اختلاف غلظت حساس‌تر شود و اندک تفاوت‌ها را نیز نشان دهد.

طرز تهیه محلول پروتئین استاندارد BSA:

۱۰ mg پروتئین استاندارد در ۱۰ ml آب مقطر حل شد.

سنجش میکرو پروتئین:

حجم محلول پروتئینی حاوی ۱ تا ۱۰ میکروگرم پروتئین با بافر مناسب به ۰/۱ ml رسانده شد. سپس ۱ ml از محلول رنگی به هر لوله اضافه شد و خوب مخلوط شد. جذب نمونه پپتیدی در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد (Bradford., 1976).

۲-۳-۳ تعیین میزان خلوص نمونه پپتیدی با روش Tricine-PAGE:

روش Tricine SDS PAGE برای پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۱-۱۰۰ kDa کارایی بالایی دارد که از دو سیستم بافری Running یعنی کاتد بافر و آند بافر استفاده می‌شود (جدول ۲-۱۱).

این سیستم ژل الکتروفورز دارای یک بخش ژل متراکم کننده (Stacking) است که پروتئین‌ها در آن متمرکز و متراکم می‌شوند. همچنین یک بخش میانی به نام ژل فاصله انداز (Spacer) و یک بخش ژل جداکننده (Separating) دارد که در آن پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی از یکدیگر جدا می‌شوند. ابتدا ژل جدا کننده، سپس ژل فاصله انداز و بعد از آن ژل متراکم کننده تهیه می‌شود. میزان درصد ژل، بستگی به شرایط اجزای پروتئینی نمونه‌ی مجهول دارد، هرچه وزن مولکولی پروتئین‌ها بیشتر باشد، ژل با غلظت کمتر تهیه می‌شود (جدول ۲-۱۲).

به منظور تهیه‌ی ژل به صورت صفحه‌ای (slab gel) ابتدا دو شیشه مخصوص ساخت ژل، کاملاً با الکل پاک و چربی زدایی شدند. سپس فاصله اندازها (spacer) در دو طرف شیشه قرار داده شد، ولی در قسمت پایین ژل از فاصله انداز استفاده نگردید که آن هم به دلیل دادن

فضای بیشتر طولی برای حرکت پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین می‌باشد. منافذ بین دو شیشه و فاصله دهنده‌ها با آگار مذاب ۰/۷٪ مسدود و با گیره محکم شد. برای اطمینان از عدم نشست سیستم، قبل از ریختن ژل بین دو شیشه آب مقطر ریخته می‌شود.

در ابتدا محتویات ژل جدا کننده مخلوط و در بین دو شیشه ریخته شد و پس از آن ایزوپروپانول روی آن اضافه شد (جدول ۲-۱۲). پس از بستن ژل که حدود ۳۰ دقیقه طول می‌کشد، ایزوپروپانول دور ریخته شد و با آب مقطر شستشو داده شد.

همانند مرحله‌ی فوق، ژل فاصله انداز روی ژل جداکننده اضافه شد به طوری که ارتفاع ژل از ۱-۲ سانتیمتری تجاوز نکند و تا ۱ سانتیمتری زیر شانه را بپوشاند. پس از بستن ژل فاصله انداز، ژل متراکم کننده ریخته و شانه روی آن قرار داده شد. پس از پلیمریزه شدن ژل متراکم کننده، شانه به آرامی خارج و چاهک‌ها با آب مقطر شسته شدند.

طرز تهیه بافرهای مورد نیاز:

جدول ۱۱-۲ بافرهای لازم جهت انجام Tricine SDS PAGE

بافرهای لازم	اجزای تشکیل دهنده	غلظت نهایی
Gel buffer 1x	Tris	3 M
	SDS	0.3%
	pH	8.45
Anode buffer 1x	Tris	0.2 M
	pH	8.9
Cathode buffer 1x	Tris	0.1 M
	Tricine	0.1 M
	SDS	0.1%
	pH	8.25 not needed
Sample buffer 1x	SDS	4%
	Glycerol	12% w/v
	Tris	50 mM
	Mercaptoethanol	2%
	Serva Blue G	0.01%
	pH	6.8, 40, 30 min
Gel (49.5% T, 3% C)	Acrylamide	48% w/v
	Bisacrylamide	1.5%
Fixing Solution	Methanol	50% v/v
	Acetic acid	10% v/v
Staining Solution	Brilliant Blue G250	0.025g
	Acetic acid	10%
Destaining Solution	Acetic acid	10%
Ammonium persulfate	APS	10% w/v
Tetramethylene diamine	TEMED	

جدول ۲-۱۲ مقادیر مورد نیاز از محلول‌ها و بافرهای تهیه شده برای ژل کوچک

Mini gel (10×10 cm)	
Stacking gel 4% T, 3% C (2cm)	
Acrylamide A	0.32 ml
Gel buffer	0.992 ml
Water	To 4 ml
Ammoniumper sulphate 10%	32 µl
TEMED	3.2 µl
Spacer gel 10% T, 3% C (2 cm)	
Acrylamide A	0.813 ml
Gel buffer	1.33 ml
Water	To 4 ml
Ammoniumper sulphate 10%	13.33 µl
TEMED	1.33 µl
Seperating gel 16.5% T, 3% C	
Acrylamide A	2.17 ml
Gel buffer	2.17 ml
Glycerol	0.87 g
Water	To 6.5 ml
Ammonium per sulphate 10%	21.7 µl
TEMED	2.17 µl

۲-۳ بخش سوم: بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها

۲-۳-۱ ابزار و تجهیزات لازم

جدول ۲-۱۳ دستگاه‌های مورد استفاده در بررسی اثرات ضد میکروبی مجموعه پپتیدهای

استخراج شده

نام دستگاه	شرکت سازنده
هود لامینار فلو	JTLVC2
انکوباتور (Incubator)	Memmert- INE500
شیکر انکوباتور (Shaker- Incubator)	Labnet - 311DS
اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer)	LABOMED
میکرو سانترفیوژ (Microcentrifuge)	Eppendorf- AG

۲-۳-۲ مواد مورد نیاز

جدول ۲-۱۴ مواد و محلول‌های مورد استفاده در بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدهای استخراج شده

مواد و محلول‌ها	شرکت سازنده
مولر هیتون آگار (Muller Hinton agar)	MERK
مولر هیتون برات (Muller Hinton broth)	MERK
آگارز (Agarose)	Roche
توئین ۲۰ (Tween 20)	MERK
بافر فسفات سدیم	MERK
اسید سولفوریک (H ₂ SO ₄)	MERK

۳-۳-۲ سویه‌های به کار رفته در سنجش اثرات ضد میکروبی

جدول ۲-۱۵ سویه‌های به کار رفته جهت تعیین اثرات ضد میکروبی

<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	سویه‌های بیماری زای انسانی
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	

طرز تهیه بافر فسفات سدیم:

محلول ذخیره A: ۲۷/۸ گرم از مونو سدیم دی هیدروژن فسفات بدون آب در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود تا محلول ۰/۲ مولار NaH_2PO_4 حاصل شود. محلول ذخیره B: ۲۸/۴ گرم از دی سدیم مونوهیدروژن فسفات بدون آب در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود تا محلول ۰/۲ مولار Na_2HPO_4 بدست آید. سپس برای pH برابر ۷/۴، ۱۹ ml از استوک A و ۸۱ ml از محلول ذخیره B را با هم مخلوط کرده و حجم آن را با آب مقطر به ۲۰۰ ml رسانده می‌شود. تا این مرحله محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات سدیم ساخته شده است. برای تهیه بافر ۰/۰۱ مولار (با استفاده از $M_1V_1=M_2V_2$) باید آن را ۱۰ برابر رقیق نمود.

طرز تهیه محیط‌های کشت

محیط کشت MHA^{۲۸}:

۳۴ گرم از پودر این محیط کشت را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و پس از استریل

کردن آن در پلیت های استریل توزیع شد.

²⁸ Muller Hinton agar

محیط کشت ^{29}NA :

۲۰ گرم از پودر آماده نوترینت آگار را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و استریل شد و برای رشد و نگهداری باکتری‌ها به منظور انجام آزمایشات سنجش فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت تغییر یافته:

این محیط کشت حاوی ^{30}MHB (w/v) ۳/۴٪، آگارز LE (w/v) ۱٪ و (v/v) ۰/۰۲٪ توئین ۲۰ می‌باشد که با بافر فسفات سدیم (۰/۰۱ مولار و pH برابر با ۷/۴) به حجم مورد نظر می‌رسد. به دلیل این که پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی سیکلوتیدها باردار هستند، برای کاهش میان کنش الکترواستاتیک میان آنها و اجزای سولفات رزیدوهای قند آگاروپکتین به جای آگار از آگاروز LE به عنوان ماده ژلاتینی استفاده شد (Lehrer et al., 1991).
تهیه استاندارد ۰.۵ مک فارلند:

۰.۰۵ میلی لیتر از محلول کلرید باریم ۱٪ به ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ اضافه گردید. تراکم تقریبی سلول‌ها در این کدورت $10^8 \times 1/5$ CFU/ml می‌باشد. سوسپانسیون ایجاد شده چنانچه در ظرف سر بسته و در مکانی تاریک نگهداری شود، به مدت ۶ ماه جهت مقایسه و تنظیم کدورت مایه میکروبی قابل استفاده می‌باشد (پایان نامه بابائی پور تبریزی نژاد، ۱۳۷۲).

²⁹ Nutrient agar

³⁰ Muller Hinton Broth

۲-۳-۴ روش کار تعیین اثرات ضد میکروبی

- ۱- با استفاده از لوپ تلقیح استریل از پلیت‌های ۲۴ ساعته در سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد.
- ۲- پس از تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی یک سواب استریل داخل لوله سوسپانسیون باکتری وارد کرده و با فشردن سواب بر لبه داخلی لوله مقادیر اضافی سرم حاوی باکتری خارج شد.
- ۳- با استفاده از سواب سطح محیط کشت آگار به طور کامل کشت داده شد. (هر بار پلیت حدود ۶۰ درجه چرخانده شد) سواب دور تا دور لبه آگار کشیده شد تا از پوشیده شدن سطح آگار توسط باکتری مطمئن شویم.
- ۴- پلیت‌ها زیر هود لامینار فلو به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا سطح آن در دمای اتاق خشک شود.
- ۵- چاهک‌های به قطر ۶ mm با فاصله مناسب از هم و نیز از دیواره پلیت‌ها تعبیه گردید و نمونه‌های مورد بررسی به مقادیر مشخص درون چاهک ریخته شد. به منظور اجازه انتشار ماده از درون چاهک به محیط کشت میکروبی پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در یخچال گذاشته شدند.
- ۶- در نهایت پلیت‌ها به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرما گذاری شد. و قطر هاله‌های شفاف اطراف چاهک‌ها اندازه گیری شد.

فصل سوم

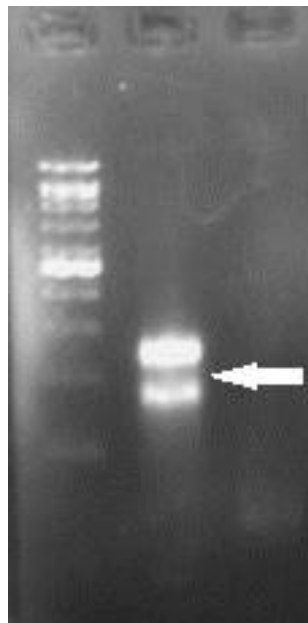
نتایج

۱-۳ شناسایی ژن

۱-۱-۳ استخراج RNA تام از برگ و گل های گونه ی مورد مطالعه

RNA تام از بافت های تازه گونه مورد مطالعه پس از استخراج با استفاده از کیت، روی

ژل آگارز بارگذاری و خلوص آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شد.



شکل ۱-۳. بارگذاری RNA تام گل بر روی ژل آگارز ۱٪. باندهای نشان داده شده مربوط به نمونه RNA می باشد شاخص وزن مولکولی (1000 bp) می باشد.

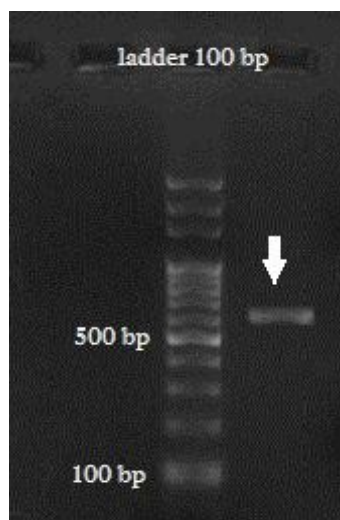
جدول ۱-۳ کیفیت RNA استخراج شده

نام بافت	غلظت (ng/μl) RNA	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰
گل	۶۱۷	۲/۰۱	۲/۴۶
برگ	۲۵۰	۱/۹۵	۱/۹۲

۳-۱-۲ شناسایی ژنهای مورد نظر

شناسایی ژن‌ها در واقع از روی mRNA ها و پروفایل بیانی گیاه صورت می‌گیرد. در جستجوی ژنهای پیش ساز سیکلوتیدی از گیاه بنفشه سه رنگ در این پژوهش، غربالگری cDNA با استفاده از پرایمر طراحی شده برای قسمتی از توالی حفاظت شده AAFALPA از توالی پپتید نشانه شبکه آندوپلاسمی در پیش سازهای سیکلوتیدی یافت شده از این خانواده گیاهی، صورت گرفت. پرایمر طراحی شده به صورت دژنره بوده و همزمان می‌تواند ژن‌های مختلفی را که قابلیت اتصال به آنها را دارد، تکثیر نماید.

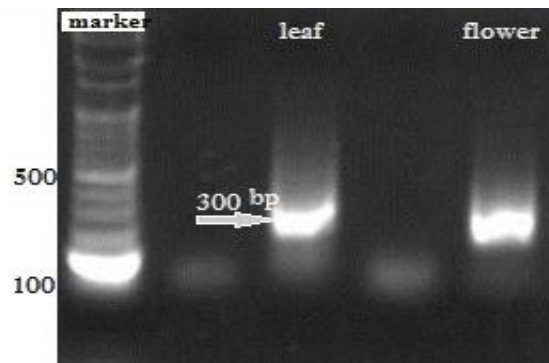
انجام واکنش PCR با استفاده از cDNA سنتز شده نمونه‌ی گل و پرایمرهای الیگو dT₂₀ و پرایمر دژنره مذکور و آنزیم pfu مطابق با برنامه‌ی پرایمرها پیش رفت و بانندی در ناحیه ۷۰۰ جفت بازی مشاهده و با استفاده از کیت از روی ژل استخراج گردید و جهت انجام همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که باند فوق در واکنش PCR انجام یافته با cDNA تهیه شده از نمونه برگ گیاه مورد مطالعه به عنوان DNA الگو مشاهده نشد.



شکل ۳-۲. بارگذاری ژنهای سیکلوتیدی تکثیر یافته با آنزیم Pfu از نمونه گل، شاخص وزن

مولکولی ۱۰۰bp

انجام واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq-DNA polymerase و هر دو cDNA سنتز شده حاصل از واکنش Reverse transcriptase از نمونه‌های گل و برگ بنفشه سه‌رنگ باندی در حدود ۳۰۰ جفت باز را در شرایط زمانی و دمایی متناسب با پرایمرهای استفاده شده نتیجه داد. تصویر باندهای مربوطه در شکل ۳-۳ نشان داده شده است.



شکل ۳-۳. بارگذاری قطعات DNA تکثیر یافته با آنزیم Taq از نمونه گل و برگ، شاخص وزن مولکولی ۱۰۰bp

۳-۱-۳ همسانه سازی ژن‌های تکثیر یافته

جهت تعیین توالی و شناسایی ژن‌های مورد مطالعه، از آنجایی که پرایمر دژنره مورد استفاده قرار گرفته است، قطعات ژنی پس از بارگذاری با حجم زیاد از روی ژل آگاروز ۱/۵٪ با استفاده از کیت از روی ژل استخراج و خالص سازی گردید. خلوص و غلظت قطعات ژنی به دست آمده جهت انجام همسانه سازی تعیین شد تا با استفاده از ناقل پلاسمیدی همسانه-سازی صورت گرفته و قطعات ژنی به صورت خالص تکثیر و تعیین توالی گردند. بدین ترتیب از پلاسمید pUC19 جهت همسانه سازی ژن‌های فوق استفاده شد و پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن‌های موبوطه برای تعیین توالی ارسال گردید. قطعات ژنی حاصل از آنزیم Taq به

منظور ایجاد پایانه صاف مجدداً با Pfu تکثیر شد اما باندهای مناسبی نتیجه نشد، لذا محصول PCR واکنش آنزیمی Taq نیز مستقیماً جهت انجام همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت.

۱-۳-۱-۳ نتایج ایجاد سلول مستعد از سویه *Escherichia coli* DH5α

تهیه سلول‌های مستعد با استفاده از روش کلرید کلسیم سرد با موفقیت به انجام رسید و در نتیجه سلول‌های *E. coli* حاصل به خوبی مستعد دریافت DNA خارجی شدند و سپس درون اپندورف به فریزر -70°C برای ذخیره سازی و سپس انجام انتقال یا ترانسفورماسیون منتقل شدند.

۲-۳-۱-۳ آماده سازی حامل پلاسمیدی pUC19 و انجام واکنش الحاق

برای انجام همسانه سازی از پلاسمید pUC19 به عنوان حامل انتقال ژن استفاده گردید که پلاسمید حلقوی با استفاده از آنزیم برشی Sma I جهت انجام واکنش الحاق و نوترکیبی با قطعات ژنی مورد مطالعه، به صورت پایانه صاف در جایگاه برشی آنزیم مذکور بریده شد. واکنش الحاق با انجام محاسبات تعداد پایانه های حامل و قطعه وارد شونده به صورت نسبت های ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ (قطعه DNA: حامل) انجام گرفت.

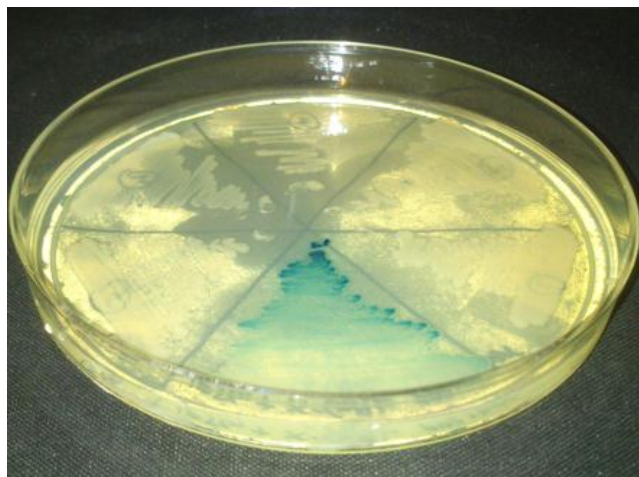
۳-۳-۱-۳ نتایج حاصل از انتقال حامل درون سلول مستعد

بعد از اتصال قطعات DNA خالص به حامل نوبت به وارد کردن حامل به درون سلول مستعد می‌رسد. حامل با استفاده از تکنیک شوک حرارتی به درون سلول مستعد وارد گردید. بعد از رشد باکتری‌ها به مدت یک ساعت در محیط LB مایع فاقد آمپی سیلین و بیان شدن ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک، باکتری‌ها به محیط LB-agar حاوی آمپی سیلین و X-Gal

انتقال داده شدند و به مدت یک شب گرماگذاری انجام شد. پس از تشکیل کلنی‌ها روی محیط کشت انتخابی، کلونی‌های سفید به عنوان کلنی‌های واجد حامل نوترکیب تشخیص داده شدند.



شکل ۳-۴. پلیت حاوی کلونی‌های سفید شامل پلاسمید نوترکیب و کلونی‌های آبی غیر نوترکیب

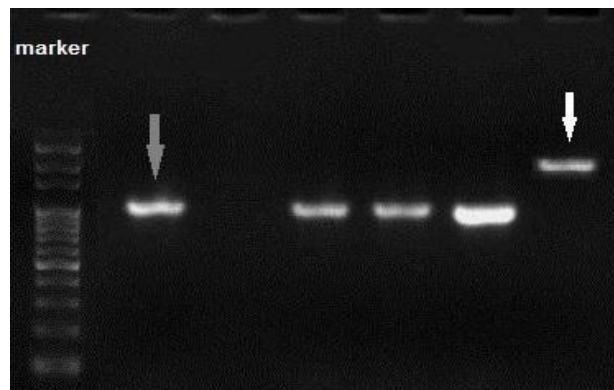


شکل ۳-۵. کشت تاییدی مجدد از کلونی‌های سفید انتخاب شده روی پلیت حاوی آنتی

بیوتیک و X-gal

۳-۱-۳-۳ تایید انجام نو ترکیبی و استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب

از تک کلونی‌های سفید کشت مایع تهیه گردید و برای آنها تست تایید کلونی PCR انجام شد. DNA پلاسمیدی کلونی‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها مثبت بود با استفاده از کیت استخراج گردیده و برای تعیین توالی به شرکت 1st BASE Sequencing INT ارسال گردید.



شکل ۳-۶. باند مشخص شده با فلش سفید رنگ مربوط به PCR تایید کننده ورود ژن به ناحیه MCS پلاسمید pUC19 می باشد. باند نشان داده شده با فلش خاکستری مربوط به کنترل می باشد که پلاسمید غیر نو ترکیب است. باند های دیگر مربوط به عدم تایید برخی دیگر از کلونی های سفید است که سفید کاذب می باشند.

۳-۱-۴ تحلیل نتایج حاصل از تعیین توالی پلاسمیدهای ارسالی

از کلونی‌های سفید حامل پلاسمید نو ترکیب که با انجام PCR مورد تایید قرار گرفتند، نتیجه تعیین توالی قطعه ۷۰۰ جفت بازی از نمونه گل تایید و مورد بررسی قرار گرفت. چندین پلاسمید نو ترکیب دیگر نیز جهت انجام تعیین توالی به شرکت مذکور ارسال گردیده است که فعلاً نتایج قابل ارائه نمی باشند.

همترازی دو توالی پس و پیش در خوانش دو سویه پلاسمید ارسالی، توالی وارد شده به جایگاه برش با آنزیم محدود کننده SmaI (CCC↓GGG) را که حدود ۷۰۰ جفت باز است

نشان می دهد که در زیر این توالی با رنگ دیگر نشان داده شده است. قسمت های متمایز شده با رنگ زرد مربوط به جایگاه MCS و کتور pUC19 می باشد و رنگ سبز نیز مربوط به جایگاه برش است. قسمتی که زیر آن خط کشیده شده است توالی اتصال شونده ی پرایمر دژنره طراحی شده برای شناسایی پیش سازهای ژنی سیکلوتیدی می باشد، که توالی این پرایمر در زیر آمده است.

```
>1st_BASE_1577689_khosh_pUC19_plasmid_M13F_pUC__40_
NNANNNCNTGATCGAGCTCGGTACCCGGCAGCATTTGCTCTTCCAGCCAAATCACAAGGC
TACAATGCTGGAAAATCCAAGAAATATGTGCAGTATAAGAACAACAACCAGCAAACGAAA
TGGAAGAGGTAACACTCAAGCTTTTCCACCTTGCTCTTACTGTAAGAAAACCAATCACTCAC
AAAAAAGGTGTTGGTGGAGGCCAGATATAAAATGCAACAATGTAAACAGTTAGGACATATG
GAAAAAATATGCAAAATCTTTTCAGGGAGAAGCTAATGCTGTTCAAGATCCACAAGATGGTGA
GCAAAATGTTTGTGGCATCATGCTTCACCATTGGCAGCTCAACCGAAAGTTGGCTGATAGACA
GTGGTTGCACAAACCACATGACCTATGATCGTGAACCTTTCAAAGAGCTTCACCAAACTACT
GTCTCCAGAGTCAGAATTGGAAAATGGAGTATATATCAATGTGGAAGGCAAAGGAACCATTC
AATTGAAGGTTCCACAGGTTTAAAACCTATTTCTGATGTTTTATATGTACCTGAAATTGATC
AAAACTTTTGGAGTGTTCCTCAGTTGCTGGAAAAGGGCTATAAAGTGTGTTTGAAGATAAA
AGTTGCATAATCAAAGATGCAGAAGGTCAAGACTTGTTTAAAGTTAAAATGAAAAACAAGTG
CTTTCCTTAGACTTACTGCAGGAAGTGCGAATGCTGCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGC
AGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTTGTGAAATTGTTATCCGCT
CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCG
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG
TGAACAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA
AAGGCTCCGCCCCCTGACAAACTTCCCAAAAATCGACGCTCAAGTCAAAGGTGCGAAACC
CGCCAGGACTATAAAAATACCAGGGGTTTTCCCCCTGGAAACTCCCCTGGGGGCTCTCTGT
TTCCAACACTGGCCCTTTACCGGAA
```

توالی کد کننده پروتئینی حاصل از این بخش (AAFALPA) مربوط به قسمتی از توالی

نشانه شبکه آندوپلاسمی در پیش سازهای سیکلوتیدی در خانواده گیاهی بنفشه (Violaceae)

می باشد که در اینجا نیز همین توالی با خوانش قالب (+۲) پروتئینی را کد می کند که ابتدای

توالی پپتیدی آن در برگیرنده ی همین توالی مذکور است که تاکنون تنها در توالی های ژنی و

پروتئینی پیش سازهای سیکلوتیدی به ویژه در خانواده بنفشه گزارش شده است. ترجمه و

خوانش پروتئینی از روی توالی بدست آمده ما در این پایان نامه، با دیگر قالب های خوانش نیز بررسی گردید که تمام قطعات پپتیدی حاصل از آنها در Blast بانک اطلاعاتی NCBI عمدتاً فاقد نتیجه بوده و هیچ گونه شباهتی با سایر ژن های گیاهی و بویژه ژن های سیکلوتیدی مورد نظر ما بدست نیامد. اما خوانش قالب (+2) از روی توالی ژنی کلون شده فوق، پلی پپتیدی با ۲۳۰ اسیدآمین، وزن مولکولی ۲۵۹۰۹/۵۵ دالتون که همانند دیگر پیش-سازهای سیکلوتیدی فاقد کدون خاتمه است، را نتیجه می کند. توالی این پپتید در زیر آمده است:

Our hypothetical protein:

AAFALPAKSQGYNAGKSKKYVQYKKNKQPANENGRGNTQAFPPCPYCKKTNHSQKR
 CWWRPDIKCNKCKQLGHMEKICKSFQGEANAVQDPQDGEQMFVASCFTIGSSTES
 WLIDSGCTNHMTYDRELFKELHQTTVSRVRIGNGVYINVEGKGTIAIEGSTGLKL
 ISDVLYVPEIDQNLLSVPQLLEKGYKVLFEKSCIIKDAEGQDLFKVKMKNKCFAL
 LDLLQEVRL: 25909.55 Dalton

با استفاده از Blast ژنی در nBlast و نیز BLASTx (جستجوی توالی های پروتئینی از روی توالی نوکلئوتیدی) در بانک اطلاعات ژنی NCBI، توالی ژنی بدست آمده با درصد بالایی از شباهت (۷۷٪ در چندین مورد) با قطعات مشابهی از ژن ها و پروتئین های کد شونده ی مربوطه در چندین گونه گیاهی با E-value ما بین $2e-42$ و $9e-87$ مقایسه گردید، که گونه های مذکور و آماری از نتایج Blast در زیر گزارش می گردد.

Lineage Report:

[Pentapetalae](#) [[eudicots](#)]
 . [rosids](#) [[eudicots](#)]
 ... [Vitis vinifera](#) -----275 [80 hits](#) [[eudicots](#)] [PREDICTED: uncharacterized protein](#)
 ... [Glycine max](#) (soybeans) 270 [13 hits](#) [[eudicots](#)] [PREDICTED: uncharacterized protein](#)
 ... [Phaseolus vulgaris](#) (string bean) 236 [1 hit](#) [[eudicots](#)] [gag-pol polyprotein](#)
 ... [Cucumis melo](#) (Oriental melon)....211 [1 hit](#) [[eudicots](#)] [PREDICTED: uncharacterized protein](#)
 ... [Medicago truncatula](#) 198 [1 hit](#) [[eudicots](#)] [T-complex protein 1 subunit delta](#)
 ... [Theobroma cacao](#) (cocoa) 171 [6 hits](#) [[eudicots](#)] [Uncharacterized protein](#)
 ... [Solanum demissum](#) ----- 204 [2 hits](#) [[eudicots](#)] [Gag-pol polyprotein, putative](#)

گیاهانی از خانواده‌های Vitaceae، Malvaceae، Cucurbitaceae و سه گونه از Fabaceae که همگی از رزیدها (Rosids) و یک گونه از خانواده Solanaceae از آستریدها (Asterids) می‌باشند و همگی جز گیاهان دولپه ای بوده، که در برگیرنده این ژن و پروتئین می‌باشند. همین ساختار ژنی و پروتئینی در نوعی اوومیسیت تخریب کننده‌ی گیاهی و نیز برخی دیگر از قارچ‌ها گزارش شده است. با توجه به مقایسه‌ی قسمت‌های پس و پیش توالی پروتئین مورد مطالعه در اغلب این پلی‌پپتیدهای بزرگ احتمالاً نوعی پروتئین مشابه Gag-pol پلی‌پروتئین (پروتئینی از پوشش ویروس HIV) را رمز می‌کنند. این پلی‌پپتیدهای بزرگ، شامل دومین‌ها و نواحی‌های حفاظت شده‌ای (conserved domains) هستند. این دومین‌ها به ویژه pfam 14227 (UBN2-2)، مربوط به خانواده‌ی پلی‌پپتید gag از نوع LTR copia یا رتروترانسپوزون‌های copia type، و نیز PTZ00368 (universal minicircle sequence binding protein) که این ناحیه به عنوان مدلی که ممکن است بیش از یک دومین را در برگیرد، می‌باشد. لازم به ذکر است که دومین PTZ00368 به هیچ ابرخانواده‌ای از دومین‌ها اختصاص داده نشده است و تا حدودی با قسمتی از توالی بدست آمده ما نیز هم خوانی دارد که در قسمت‌های بعدی بیشتر توضیح داده خواهد شد. سایر دومین‌های گزارش شده در

برخی از این توالی های پروتئینی مرتبط با نواحی gag-pre integrase (مرتبط با عناصر ورودی رتروویروسی) و rve (integrase core domain) می باشند. تا کنون چنین ساختار ژنی و یا پروتئینی در خانواده Violaceae گزارش نشده است. نمای گرافیکی مربوط به یکی از این پروتئین ها از گونه ی انگور قرمز (*Vitis vinifera*) در شکل ۳-۸ آورده شده است، که نواحی مرتبط با دومین های حفاظت شده در آن مشخص می باشند، ناحیه ی قرمز رنگ نیز قسمتی از این پروتئین است که ۸۷٪ از توالی پروتئینی ما را با E-value برابر با $4e-74$ و ۵۷٪ همسانی در نتیجه همترازی پوشش می دهد که هم ترازوی مربوطه نیز در شکل ۳-۷ آورده شده است.

از میان این ژن های تعیین توالی شده و پروتئین های فرضی مربوطه شان، کوچکترین ژن و پروتئینی که از نظر طول توالی تنها با اندکی اختلاف کاملاً منطبق با قطعه شناسایی شده ما می باشد، از گونه ی *Glycine max* (گیاه سویا) بوده و ژن مربوطه از روی mRNA شناسایی شده است که ۷۷۱ جفت باز طول دارد و پروتئین مرتبط با این ژن نیز دارای ۲۵۶ اسید آمینه است. نتیجه همسانه سازی بزرگترین قطعه ی هم تراز شده از این ژن با ژن تعیین توالی شده ما در شکل ۳-۹ ارائه شده است.

با توجه به این مقایسه به نظر می رسد، احتمال تولید پروتئینی با ساختار فوق در گیاهان مذکور و نیز در گونه ی مورد مطالعه ما (*Viola tricolor*) و شاید در سایر گونه های گیاهی که تاکنون مطالعه نشده اند، وجود داشته باشد که اندازه آن منحصرأ نزدیک به پروتئین حاصل از ترجمه ی ژن کلون شده ما می باشد. مطالعات مقایسه ای بیشتر، با استفاده از همترازی چندگانه (multiple alignment) تقریباً روی این پروتئین های ناشناخته در تمامی داده های حاصل از Blast ژنی و پروتئینی به دست آمده ی ما، قسمت ها و باقیمانده های اسید آمینه ای

بسیار حفاظت شده در اکثر این توالی های حاصل (بیش از ۹۰ درصد در برخی قسمت ها) را نشان می دهد. نتیجه ی همترازی چندگانه بسیاری از توالی های انتخاب شده از همترازی فوق در شکل ۳-۱۰ ارائه شده است.

```

Query 189 AEGA FQARMQKFNAGHKNGKVNNGKSCGXNQKNGV FPPCPH CKRTINHS PQKC WWRPDKCN 248
++G + +K +KN + N+ G Q FPPCP+ CKRTINHS ++C WWRPD+KCN
subjec 9 SQGYNAGKSKKTVQYKKNKQPANENGRGNTQ---A FPPCPY CKRTINHS QKRC WWRPDIKCN 65

Query 249 KCGKQGNXERICFNQQQEETSAAVDYCQEEQLFAATCFANKSTSKSWLVDSGCTNHMTNN 308
KC + G+ E+ICK+ Q E +A D EQ+F A+CF S+++SWL+DSGCTNHMT +
Sbjct 66 KCKQLGHMEKICKSPQGE-ANAVQDPQDGEQMFVASCPTIGSSTESWLIDSGCTNHMTYD 124

Query 309 QDLFRELDRITISKVRIGNGEYIPVHGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDI DQNL LSVGQ 368
++LF+EL +TT+S+VRIGNG YI V+GKGT+AIE TGLKLI DVL+VP+IDQNL LSV Q
Sbjct 125 RELFKELHQTTVSRVRIGNGVYINVEGKGTIAIEGSTGLKLISDVLVPE IDQNL LSVPQ 184

Query 369 LVEKEFKVYFEDRNCCI IKDAEGKEM 393
L+EK +KV FED++CIIKDAEG+++
Sbjct 185 LLEKGYKVLFEKSCCIIKDAEGQDL 209

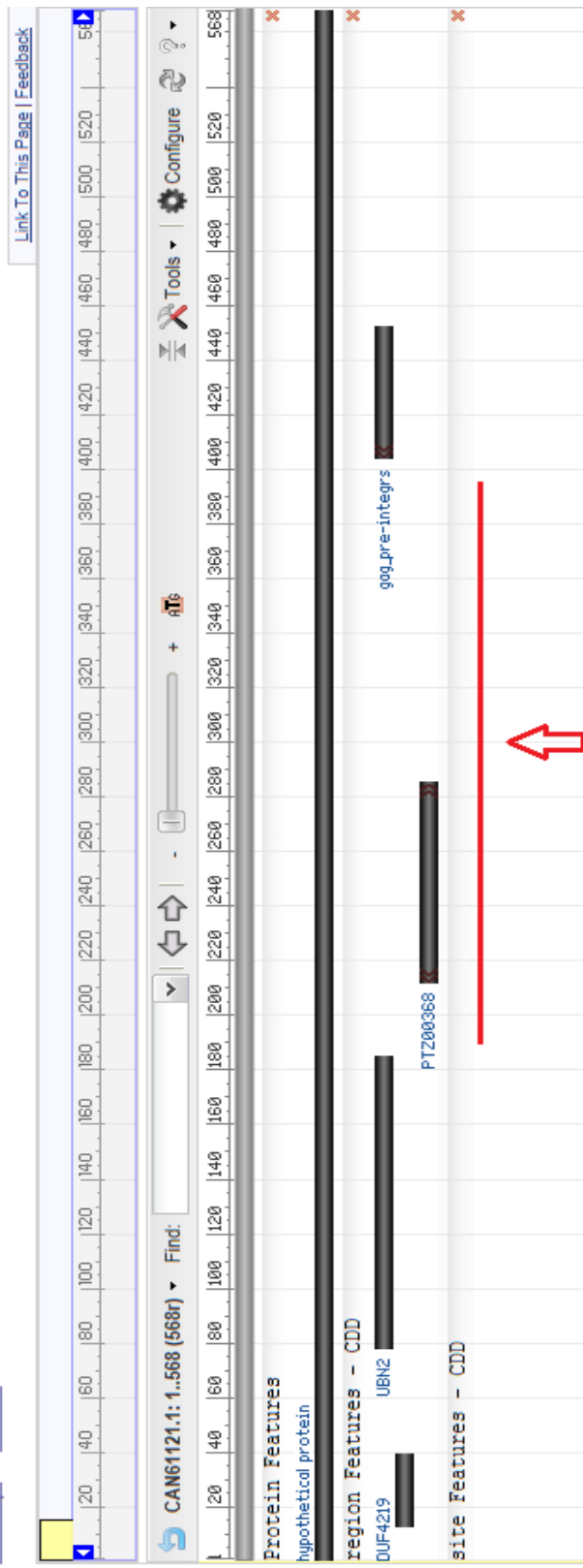
```

شکل ۳-۷. همترازی توالی پروتئینی به دست آمده از این پژوهش (Subject) و پروتئین مشابه آن از گونه انگور قرمز (Query: VITISV_028334)؛ یکسانی (identity) ۵۷٪ باقیمانده های اسیدآمینة ای. کادر قرمز بخش مرتبط با ناحیه حفاظت شده PTZ00368 می باشد که به تفصیل توضیح داده خواهد شد. کادر سبز رنگ بخش منطبق با سیکلوتیدها می باشد.

hypothetical protein VITISV_028334 [Vitis vinifera]

GenBank: CAN61121.1

[GenPept](#) [FASTA](#)



شکل ۳-۸. نمای گرافیکی پروتئین فرضی ناشناخته از گونه‌ی انگور قرمز که همسانی بالایی با پروتئین ترجمه شونده از ژن به دست آمده ما دارد (ناحیه مشخص شده با فلش). توضیحات مربوط به نواحی حفاظت شده در متن ارائه شده است.

سیستین‌های حفاظت شده تقریباً در تمام این پروتئین‌های فرضی و ناشناخته و همچنین در پروتئین مورد بررسی ما در این مطالعه دیده می‌شود که در زیر ارائه می‌گردد.

AAFALPAKSGYNAKSKKYVDYRNRUPANENGRGNTQAFPPCPYCKKTNH
 SQRRCWWRPDIKCNKCKQLGHMEKICKSFGGEANAVQDPQDGEQMFVASCFTIGS
 STE SWLIDSGCTNHMTYDRE LFKELHQTTVSRVRIGNGVYINVEGKGTIAIEGST
 GLKLI SDVLYVPEIDQNLLSVPQLLEKGYKVLFEKDKSCI IKDAEGQD LFKVKMKN
 KCFALDLLQEVRL

شکل ۳-۱۰. توالی پروتئینی حاصل از ژن به دست آمده در این پژوهش. قسمت ابتدایی برابر با ناحیه سیگنال شبکه آندوپلاسمی بوده، نواحی مشخص شده با رنگ آبی برابر با ناحیه NTR در پیش‌سازهای سیکلوتیدی می‌تواند باشد و ناحیه قرمز رنگ با ساختار بسیار حفاظت شده در تمام پروتئین‌های همسان مربوط به دو موتیف انگشت روی می‌باشد. قسمتی که زیرش خط کشیده شده است با طولی برابر روی بخشی از پیش‌ساز سیکلوتیدی تریسیکلون در بنفشه سه رنگ هم تراز می‌شود.

در ناحیه ای از توالی فوق که با رنگ قرمز مشخص شده است، شش اسید آمینه‌ی سیستین نزدیک به هم در این ناحیه، به صورت حفاظت شده در پروتئین‌های همسان مذکور مشاهده می‌شود که با دقتی تر شدن در این ساختار توالی مشابه زیر به دست می‌آید.

xxx Cxx CxxxxHxxxx Cxxxxxxxx Cxx CxxxxHxxxx Cxx

باقیمانده‌های هیستیدین نیز در تمامی این پروتئین‌ها حفاظت شده می‌باشند، البته باقیمانده‌های حفاظت شده دیگری نیز در توالی مورد اشاره در تمام یا اکثر این پروتئین‌ها دیده می‌شود. همین ساختار در توالی gag-pol پلی پروتئین ویروس HIV-1 نیز به صورت زیر وجود دارد و همترازی این پروتئین با پروتئین مذکور ما در شکل زیر گزارش می‌گردد.

```

Query 392 CFNCGKEGHTARNCRAPRRKGCWKCQKCGKEGHQMKDCTERQA 431
          C C K H+ + C          C KC + GH K C Q
Sbjct 35 PYCKKTNHSQKRCWWRPDIRNKCKQLGHMEKICKSFGG 74

```

شکل ۳-۱۱. همترازی ساختار مربوط به دو موتیف انگشت روی از توالی ما (Subject) با

همین دو موتیف تعیین ساختار شده از gag-pol پلی پروتئین ویروس HIV-1

این بخش در ویروس HIV-1 مربوط به دو ناحیه ی انگشت روی می باشد که مطالعه روی قسمت مذکور اتصال بخش فوق به یون های روی و تشکیل موتیف انگشت روی در پروتئین مذکور از پوشش این ویروس را تایید می نماید (قسمتی از پروتئین فوق در این ویروس، که در برگیرنده ی این دو موتیف مذکور است تعیین ساختار گردیده و دارای کد pdb 1AAF:A می باشد). مطالعات نشان داده است که این ساختار در اتصال به اسید نوکلئوئیک تک رشته ای ژنوم ویروس اهمیت ویژه ای دارد. (توالی حفاظت شده با موتیف CCHC؛ CX₂CX₄HX₄C، مربوط به انگشت روی یا zinc finger می باشد که طبق تعریف این موتیف X می تواند هر اسید آمینه ای باشد)، در برخی پروتئین های همسان با پروتئین مفروض ما در این مطالعه نیز، این توالی مرتبط با ناحیه ی حفاظت شده (universal miniircle) PTZ00368 (sequence binding protein) در نظر گرفته می شود که با توالی های مشابه با موتیف انگشت روی که چندین توالی مکرر از این موتیف را در بر می گیرد انطباق دارد. اغلب این توالی ها در پایگاه توالی های حفاظت شده (CDD)، مرتبط با پروتئین هایی از انگل های تریپانوزومی هستند که به توالی های اسید نوکلئوئیک تک رشته ای حلقوی در ناحیه ی شروع همانندسازی در DNA کایتوپلاست های موجود در این انگل ها متصل می شوند.

XP_003634637	221	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--NAVVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	282
CAN62449	287	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--NAVVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	348
CAN60312	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	315
CAN72134	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	315
CAN63989	235	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAVIDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	296
XP_003632949	221	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	282
XP_002284438	221	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	282
CAN81397	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	315
CAN73455	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	315
CAN60644	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	315
CAN68520	233	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	294
CBI23128	144	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QEEI--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	205
CAN78883	227	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	-----	-EET--SATVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	278
AAF20282	254	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKINS	RKKL--VQQLTIARR--SNLQQRVL--ANKST-SFSW	315
CAN76402	243	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	VERICKNQ	QKEL--SAAVDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	304
CAN66250	206	-HSPQFCWRRPDKCNK--CGKQGH	-----	HEET--SAVIDYQE--EQLFAATCF--ANKST-SFSW	249
CAN64172	114	-HFQRRK-----	-----	QQGE--KVVVEELQ--dEQLFVVSQF--ATSNS-LEIW	151
CAN64779	126	-HFQRRKXWXPDRCHK--CGQLGH [3]	-----	QQGE--KAAVEXLP--dEQLFVVSQF--ATS-SPETW	188
CAN77122	245	-HAELDCWHKGLPLFNChfCNKLGH	SEKYCRACK [4]	HQPE--qHASVTEEDKmdHFLMASQA-----LSSH-INTW	316
CAN77815	261	-HFQRRKXWXPDRCHK--CGQIGH	MERICKS-- [1]	QHEE--aKASTEQHQ--eEQLFVATCF--IT-----	315
CAN78208	116	-HFQRRKXWXPDRCHK--CGQIGH	MERICKSQ	HE--E--KASTEQHQE--EQLFVATCF--TTSNSFSDSW	178
31286	51	-HSQRRKXWXPDRCHK--CKQLGH	MEKICKSFQ	G-----ANAVQDFQD--gEQMFAVSCF--IGS-TEIW	111
XP_006589975	260	-HFERRKXWXPDRCHK--CGNMGH	VERICKSKS	-E--E--eKVVAEQED--EQLFVATCF--ATSNS-SDLW	321
XP_006598641	131	-HFHNKXWXPDRCHKf--GQLGH	VERICKIQ	QQGK--aKAEDQPME--EQLFVASFF--ADNTI-TESW	193
XP_006603233	64	xHPPFCWRRPDKCK--CNKLGH	HVERICKSNE	QQRN--vAQVAYQEE--EQLFEATCF--TSSSS-SEGW	127
XP_006601552	201	-HPPFCWRRPNAKCNK--CNQMGH	EAVICHNEN	HQGE--zAQIANQEEE--DQLFVAAGY--LSSSS-SESW	263
XP_006582716	62	-HPPFCWRRLDKCSK--CNQLGH	KAVICKSKF	QQPE--anQVVVEQDVE--DYIFAAATCY--SMRSS-SEGW	125
XP_006606650	264	-HAPFCWRRPDAKCNK--CNQIGH	EAVICPNKN	HHDE--gAQIANQEEE--DQLFVATCF--LSSSS-SESW	326
XP_007014929	264	-HIERYCYRPFVKCRA--CNQKGH	VEKVCNK-[1]	NRVE--eKVAIVEQKEdaeETLFMVI--e-NDSSKkds-IW	329
XP_007028335	241	-HYEAYCFRPFVKCNA--CKQLGH	VEKVCNKA [4]	KKQQ--iAKQVEKAeVa-eVLFMTIED--SNSSN-YMHW	309
AAI38797	372	-HLEKYCWRRVDALCGN--CKQTGH	ISKVCKSRA [1]	ASGS--lQAQVADAADaheDQLFVSYF----SINE-SDSW	438
AAI13313	199	-HPPFCWRRPDAKCNK--CNQLGH	EAVICRNQ	EQQD--vDAQIANEEE--DVLFEATGF--SNIS-SASW	261
XP_008447689	243	-HPPFCWRRPDAKCTK--CNQMGH	EAVICRNKN	QQGGeAKIADQEEE--DQLFVATCF--MGGES-NESW	306
XP_003630997	219	-HLDKFCWYRPFVKCRA--CNQLGH	VEKVCNKI [1]	QEQE--qARVVEHHQEd-eQLFRASCY--lA-SSK-ETW	284

شکل ۱۲-۳. ادامه

XP_003634637	283	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	362
CAN62449	349	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	428
CAN60312	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	395
CAN72134	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	395
CAN63989	297	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	376
XP_003632949	283	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	362
XP_002284438	283	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	362
CAN81397	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	395
CAN73455	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVXQ	395
CAN60644	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	395
CAN68520	295	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	374
CB123128	206	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	285
CAN78883	279	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	358
AAF20282	316	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	395
CAN76402	305	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	366
CAN66250	250	LVDSSG	TNHMTNNQDLFRELDR	TSKVRIGNGEYIPVKGKGTVAIESQTGLKLIYDVLVFPDIDQ	NLLSVGQ	320
CAN64172	152	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	231
CAN64779	189	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	244
CAN77122	317	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	396
CAN77815	316	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	358
CAN78208	179	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	258
31286	112	LIDS	GTINHMTYDQRLFKELN	KTIISKVRIGNGAYLAVKKGKGTVAIEGHTGLKLIISNVLV	YPEINQ	191
XP_006589975	322	LIDNG	TNYMTNDLNFKELDRT	IVKVKIGNGDFISVKGKGTVAIESLITGLKIITDALYV	PDIDQ	401
XP_006598641	194	LIDS	GTINHMTYDREFFKELN	ETISKVKIGNRALIAVKKGTVAIEGHSGLKLIISNVLV	YPEINQ	273
XP_006603233	128	QVDS	GTINHMTDQELLRELD	RSQSVKVRIGNGDLIIVERKGTVAIESCAGTKLIYDVLV	YPEIHQ	207
XP_006601552	264	LIDS	GTINHMTFKALFRLRPT	NIITKVGIGNGD8ILAVKGRRTVAIISYAGTKLIIPNVL	FITEIDQ	343
XP_006582716	126	LIDS	GTINHMTYDKSAFKDL	KPIDVLNIIKIGNGDYIQAKKGTILIAITISGAKLIISDVL	YPEIDQ	205
XP_006606650	327	LIDS	GTINHMTYDKTLFKDL	KPTNVKVRIGNGGYIPVKKGTVAISTCSDASL-SALLWI	HDLGLN---	401
XP_007014929	330	LIDS	GTINHMTGKIFNFLD	LNKAYKSTVEIGDGNLLKIEGRGTIGITTRKGIKTIANVCF	APEVTQ	409
XP_007028335	310	LIDST	GNHMTSKAELF9ELDT	DRCSVKKIGNGFILNAVGGKGTVAIQTTSGTRYV	LNVLVPEITQ	389
AAF38797	439	LIDSG	THHLCDNAEMFKFLD	DTYKSKVKVGNGEAVEVKKRGTMSISIIISGIKTIPDIL	YTPDMSQ	518
AAI13313	262	LIDSG	GTINHMTDQKELFKEL	RITDQVRRVRIENGHEHLTVKGRDITAITSYKGIKIITDVL	FVEIDQ	341
XP_008447689	307	LIDSG	GTINHMTDQKELFKDL	KPTNIITKVRIGNGDYISVKKGTVAIASCKGTGHIQDVL	FVPDINQ	386
XP_003630997	285	LIDSG	GTINHMTNVVFFKEL	DESFSYKVVFGNGQHVKKVKGKGVAVETLLGIKVIIDVL	VPEINQ	364

شکل ۱۲-۳. ادامه.

XP_003634637	363	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	419
CAN62449	429	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEBXH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VX-HF	485
CAN60312	396	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	452
CAN72134	396	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTI I-----	443
CAN63989	377	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TTIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	433
XP_0036232949	363	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	419
XP_002284438	363	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	452
CAN81397	396	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDKH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	419
CAN73455	396	VYFEDRN	IIMDAEGKEMFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	452
CAN60644	396	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	452
CAN68520	375	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FTLN	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	431
CB123128	286	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	F--D	PLF----	-----	-----	317
CAN78883	359	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IFMK--	----	--DEH	AAVL----	QEDSTIMFWDRR--LG-HF	405
AAF20282	396	VYFEDRN	IIKDAEGKEVFN-IKMKGKS	FALD	LLEDEH	TAIL----	QQDSTIMFWDRR--VE-HF	452
CAN76402	367	VYFEDRN	IIKDVEGKVFN-IKMKGKS	FALN	LLEDEH	VAIL----	QQDSTIMLWDRR--LE-HF	423
CAN66250	321	VLFEDNH	MIADAQREGFI-VQMKGKS	-PFD	LLGDEH	ATVL----	QQDSTIMLWDRR--LR-HF	349
CAN64172	232	-----	-----	FHHT [73]	IXSDNG [21]	ITXPYt	PQQXVVKRNRT--LMeMT [16]	430
CAN64779	245	-----	VQMKGK [29]	FHHS [114]	IRSDNG [21]	ITPYt	PQQGVVERPNRT--LMeMT [16]	464
CAN77122	397	VSPKRN	FISDVHSTKIAK-IFMNGNS	[29]FNLK [114]	LRTDNG [21]	TAPYs	PQQGVSEKRNRT--VMeMA [16]	636
CAN77815	359	VIFEDRW	MIFDAKGRDVFK-VKMRKKS	[29]FHHV [82]	IRSNNG [21]	ITPYt	PQQNG	537
CAN78208	259	VIFEDIW	MIFDAKGRDVFK-MKMRKKS	FALN	IME----	-----	-----	292
31286	192	VLFEDKS	IIKDABGQDLFK-VKMKNK	FALD	LLQEVr	ML----	-----	230
XP_006589975	402	VIFEENW	LIFDAKGRDVFV-VKMRKAK	LC--	-----	-----	-----	430
XP_006598641	274	FKYDVID	IFMRFKAWVETQSeCFMqVIR [2]	----	-----	TRALq	-----	308
XP_006603233	208	VIFENKY	LIFDVKDKEIFN-IFMKGKS	FSPD	PLK----	-----	-----	241
XP_006601552	344	VVFEDKY	LIFDAATGQDIFK-VKMRKKS	FTLN	PLE----	-----	-----	377
XP_006582716	206	LSFAYQH	LIYDIADQKVLr-VKMRKKS	FSPD	PIE----	-----	-----	239
XP_006606650	402	IDVE----	-----	-SIN	NPK----	-----	-----	411
XP_007014929	410	LLFKDEI	IFIDPSGREIAT-VKMRKNC	[29]INYQ [114]	LRSDNG [21]	ITVYs	PQQGVSEKRNRT--IMeMI [16]	649
XP_007028335	390	LVFKRNA	IVYDFSAVYMS-VKMKSE [1]	FSVF [17]	LRTNNG [21]	TAPYc	PEQNGVSEKRNRT--IleMS [16]	504
AAT38797	519	LHFKNHE	VVDFSGVELFY-VKMSNIM	[30]FNLR [114]	LRSDNG [21]	ITPYt	PQQGVSEKRNRT--VMeMA [16]	759
AAR13313	342	VMFENKH	LIFDVGADLFLK-VEMKGS	[12]FKSK [14]	ILSMGK	LLESvea	KFDNLEKRFKFL--EE-RY [16]	443
XP_008447689	387	VIFENEY	LIFDVAQ--	----	-----	-----	-----	402
XP_003630997	365	LHFKNKH	IFIDPSGKIMI-VEMRGS	[20]FLAQ [3]	TLDDNY [13]	TEAAm	FEgCKVTMQEERK--II-- [11]	468

شکل ۱۲-۳. ادامه.

۱-۴-۱-۳ نتایج مقایسه توالی به دست آمده با سیکلوتیدها

مطالعات مقایسه‌ای پروتئین فرضی تعیین توالی شده، در Blast منحصر شده به خانواده‌ی violaceae، پروتئین ما را با دو پروتئین پیش‌ساز سیکلوتیدی تریسیکلون موجود در گونه‌ی *Viola tricolor* و پیش‌ساز تریسیکلون A از *Viola arvensis* و چندین سیکلوتید دیگر به ویژه (B, G, H & M) Varv peptide و سیکلوتیدهای Cycloviolacin-O14, -O24 مقایسه می‌کند. هر چند شاخص E-value و میزان ترادف آمینواسیدی پایین می‌باشد، اما وجود این توالی به نسبت تغییر یافته از بخش منطبق با سیکلوتیدها در تمامی این پروتئین‌ها و همچنین حفظ شدگی برخی اسیدهای آمینه منحصر به تمام یا اغلب سیکلوتیدها و شبه سیکلوتیدهای خطی شناخته شده و نیز حفظ شدگی این باقیمانده‌های آمینواسیدی در ناحیه مذکور از این پروتئین‌های ناشناخته، مشهود بوده و نیاز به بحث و تفصیل دقیق تری دارد.

```

Query  93  GEQMFVASCFTIGSSSTESWLDISGCTNHM---TYDRELFKELHQITVSRVRIGNGVYINV  149
          GE P+ +C+T G S W + G TN + ++ + L + ++R Y N+
Sbjct  80  GESCF LGTCYTRKGCSCGWNKLCYG-TNBLPESNNEKAMVASLEKDVITRA-----AYENL  133

Query  150  EGRGTIAIEGSTGLKLI SDVLYVPEIDQNLLS  181
          G I G+ + ++ P +++ L+S
Sbjct  134  VNSGAIQ-----GITMKTIIISNPIL EEALVS  160

```

شکل ۳-۱۳. هم‌ترازی پروتئین مفروض ما (Query) با پیش‌ساز سیکلوتیدی تریسیکلون (Subject) از

Viola arvensis. قسمت مشخص شده با کادر مربوط به توالی سیکلوتیدی تریسیکلون می‌باشد.

```

Query  90  PQDGEQMFVASCFTIGSSSTESWLDISGCTNH  120
          P GE F +C T G + + W + CT++
Sbjct  3    PTCGETCFGGICNTPGCTCDFWV---CTHN  30

```

شکل ۳-۱۴. هم‌ترازی پروتئین مفروض ما (Query) با سیکلوتید سیکلوویولاسین O24

از همترازی مربوط به سیکلوویولاسین O24 که در شکل ۳-۱۴ ارائه شده است و نیز سایر هم ترازی ها، وجود دو باقیمانده ی آمینواسیدی سیستمین حفاظت شده در این ناحیه از پروتئین ما و سایر پروتئین های همسان ناشناخته، معمولاً مرتبط با باند دی سولفیدی میانی در اغلب سیکلوتیدها، تایید می گردد. دو مورد از سیستمین ها تقریباً در اکثر موارد با سرین یا ترئونین جایگزین شده اند و یک سیستمین در پروتئین ما با متیونین جایگزین شده است، جالب توجه است که تنها در یک مورد از این پروتئین ها این سیستمین حفظ شده و در اغلب پروتئین های مربوطه با لوسین جایگزین شده است. در اغلب پروتئین های فوق الذکر از گونه ی انگور قرمز قبل از دی پتید حفاظت شده ی GE (هم در سیکلوتیدها و هم در این پروتئین ها)، سیستمین حفاظت شده ی سوم نیز دیده می شود.

62654	1	--PQDGEQMPVASEFTIASSSTFSWLIdeggTNH[14]	45
<u>P58453</u>	1	GLFVCSGTCTGGTGNTPSCSCETWPV---SRN	30
<u>P85231</u>	1	GLFVCSGTCTGTGTYINACTCDPWPV---SRN	30

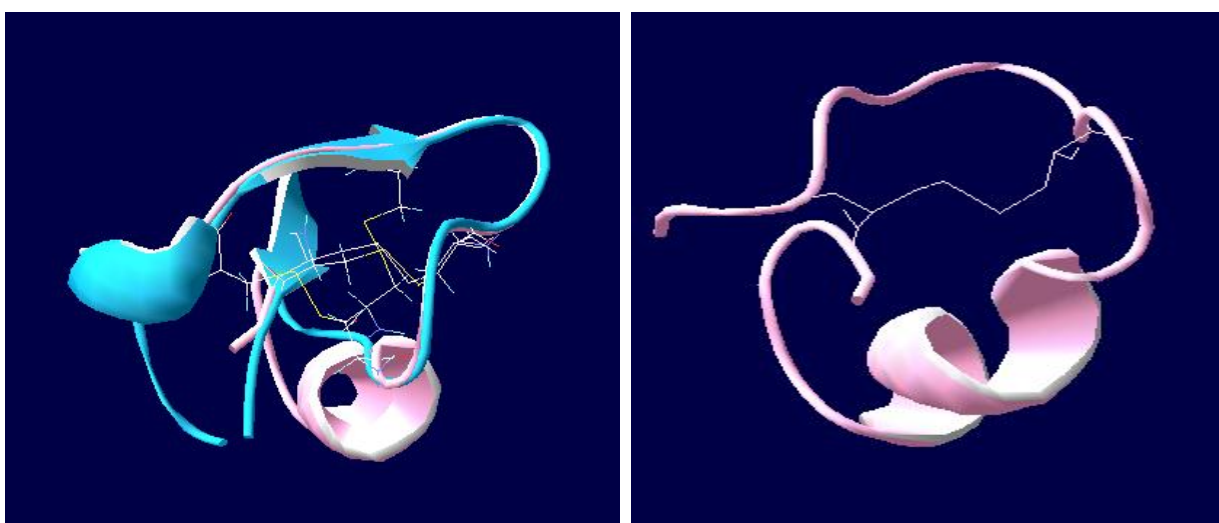
شکل ۳-۱۵. هم ترازی ناحیه سیکلوتید مانند از پروتئین مورد بررسی ما (62654) با دو سیکلوتید varv peptide H از گونه ی *Viola arvensis* و سیکلوتید vhl-2 از گونه ی *Viola hederacea*. باقیمانده های اسید آمینه ی حفاظت شده در این هم ترازی با رنگ سبز متمایز شده اند.

۳-۱-۴-۲ مطالعه مدل سازی بر پایه شباهت توالی^{۳۱}

به منظور بررسی و مقایسه بیشتر ناحیه ی منطبق با توالی سیکلوتیدی، مدل سازی این ناحیه با استفاده از سرور مدل سازی پروتئین swiss model در سایت ExPasy و الگوهای سیکلوتیدی هم تراز شونده و دارای کد pdb انجام گردید. به عنوان الگوی مدل سازی با استفاده از هم ترازی

³¹ Homology modeling

سیکلوویولاسین O14 انتخاب گردید که دارای کد pdb ID: 2GJ0 می باشد. تصاویر مرتبط با این ساختار مدل سازی شده و الگوی سیکلوتیدی مربوطه در شکل ۳-۱۶ ارائه شده است. از مقایسه ساختار مدل سازی شده با ساختار الگو RMSD برابر با 0.63 \AA می باشد. پایین بودن RMSD وجود شباهت ساختاری بالا در این دو پپتید را تایید می کند. در ساختار مدل سازی شده باندهای سولفیدی منطبق با باندهای سولفیدی میانی در سیکلوتید الگو مشاهده می گردد.

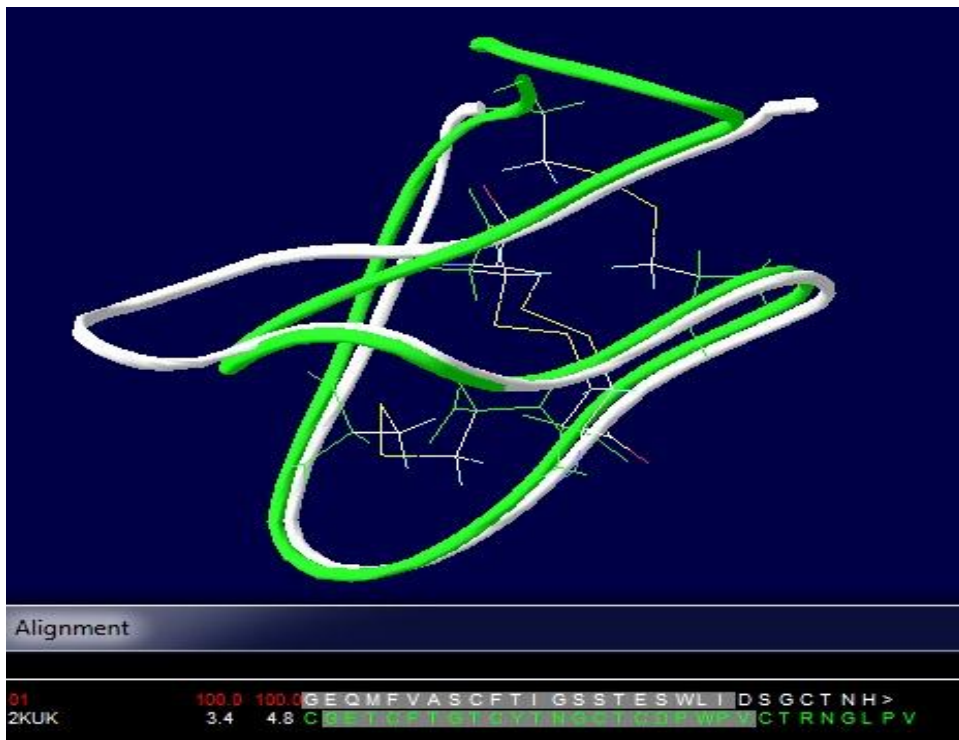
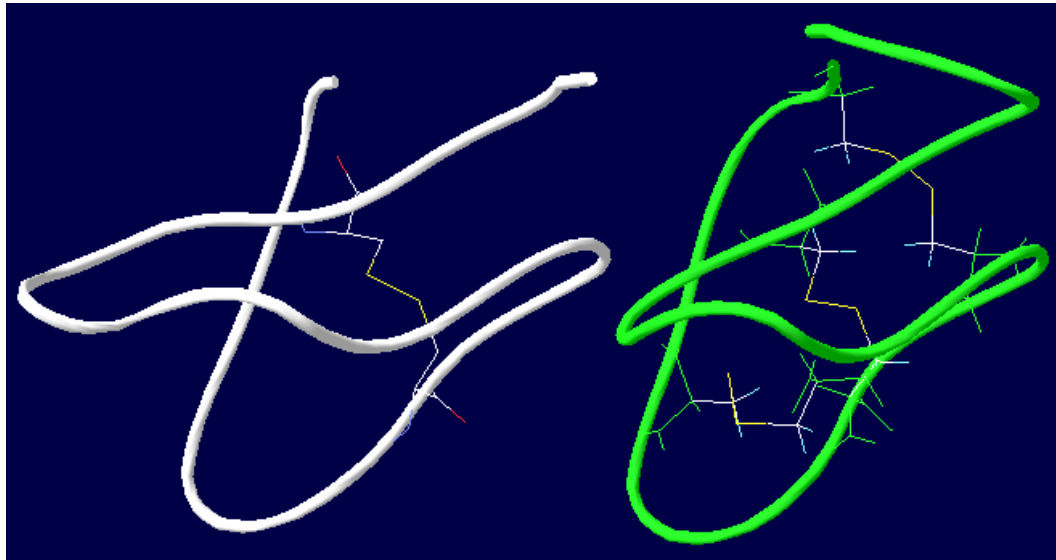


شکل ۳-۱۶. مدل سازی با استفاده از الگوی سیکلوتیدی سیکلوویولاسین O14. تصویر سمت راست پپتید مدل سازی شده را نشان می دهد و تصویر سمت چپ تصویر روی هم انداخته شده الگو و مدل می باشد.

مدل سازی دیگر با الگوی سیکلوتیدی vhl-2 از بنفشه معطر دارای کد pdb ID: 2KUK

می باشد. که همترازی و نتیجه مدل سازی ناحیه پروتئینی مربوطه و ساختارهای مدل و الگو در شکل ۳-۱۷ ارائه شده است. این مدل سازی بیشترین تعداد باقیمانده اسید آمینه ای در همترازی مربوطه و در نتیجه در ساختار مدل به دست آمده را در بر می گیرد. RMSD محاسبه شده برای ساختار مدل و الگو برابر با 1.77 آنگستروم می باشد. وجود باندهای سولفیدی در این مدل

ارائه شده نیز تایید می‌گردد. لازم به ذکر است که در مدل‌سازی پروتئین‌ها، تنها زمانی مدل‌سازی قابلیت انجام را دارد که هم‌ترازی مطلوبی بین دو ساختار وجود داشته باشد.



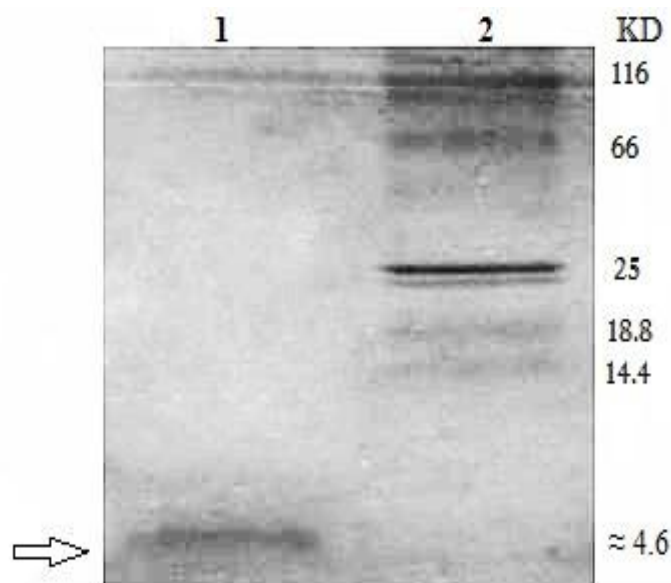
شکل ۳-۱۷. در تصویر بالایی ساختار پپتیدی سفید رنگ مربوط به پپتید مدل‌سازی شده و ساختار سبز رنگ پپتید الگوی سیکلوتیدی vhl-2 می‌باشد. باندهای دی‌سولفیدی زرد رنگ در هر دو ساختار قابل مشاهده است. تصویر پایین هم‌ترازی و فیت شدن دو ساختار با RMSD برابر با 1.77 \AA را نشان می‌دهد.

۲-۳ جداسازی و تخلیص سیکلوتید

با انجام مراحل اولیه تخلیص که در فصل پیشین توضیح داده شد، به ازای هر گرم ماده اولیه خشک حدود ۰/۴ گرم ماده خشک فاقد تانن به دست آمد. بازده مرحله عصاره گیری با بوتانول به ازای هر گرم ماده خشک فاقد تانن تولید حدود ۰/۱ تا ۰/۲ گرم ماده خشک است.

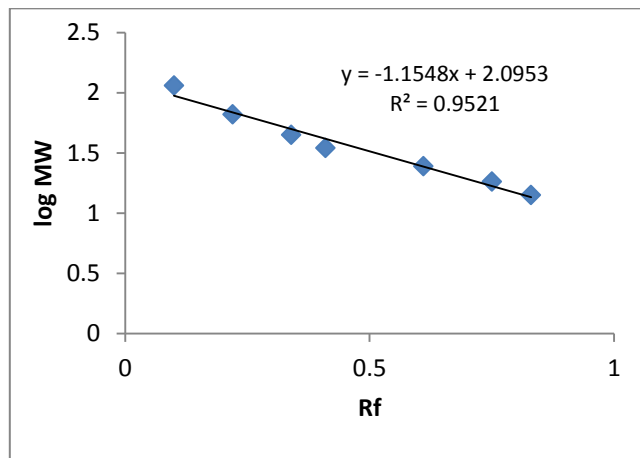
۱-۲-۳ بررسی وزن مولکولی سیکلوتید استخراج شده

طبق نتایج حاصل از پژوهش دلیر و همکاران (۱۳۹۰) و هاشم پور و همکاران (۱۳۸۷) بیشترین غلظت سیکلوتید در محلول اتانولی ۵۰٪ حاصل از شست شوی ستون SPE، وجود دارد. برای تایید حضور سیکلوتید در این محلول از روش Tricine-SDS-PAGE استفاده شد. وزن مولکولی سیکلوتیدها در باز ۲۸۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون قرار دارد.



شکل ۱۸-۳ تصویر Tricine-PAGE ستون ۱: مارکر وزن مولکولی، ستون ۲: محلول حاصل از شستشو با اتانول ۵۰٪.

نمودار ۳-۱: منحنی استاندارد لگاریتم وزن مولکولی بر حسب Rf



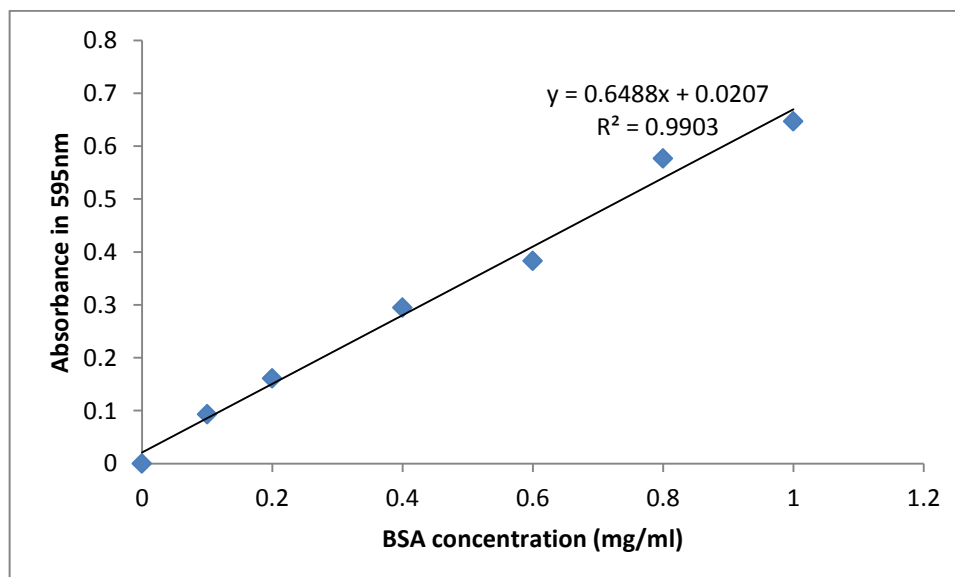
بر اساس معادله به دست آمده وزن مولکولی پروتئین مورد نظر ۴۶۰۰ دالتون است.

۲-۲-۳ تعیین مقدار پپتید با روش بردفورد (Bradford)

ابتدا بر اساس بازه غلظت‌های پروتئین استاندارد (پروتئین سرم گاوی) نمودار استاندارد

رسم شد (نمودار ۳-۲) و از روی معادله آن مقدار پروتئین نمونه‌های مورد نظر محاسبه شد.

نمودار ۳-۲: منحنی استاندارد سنجش میزان پروتئین



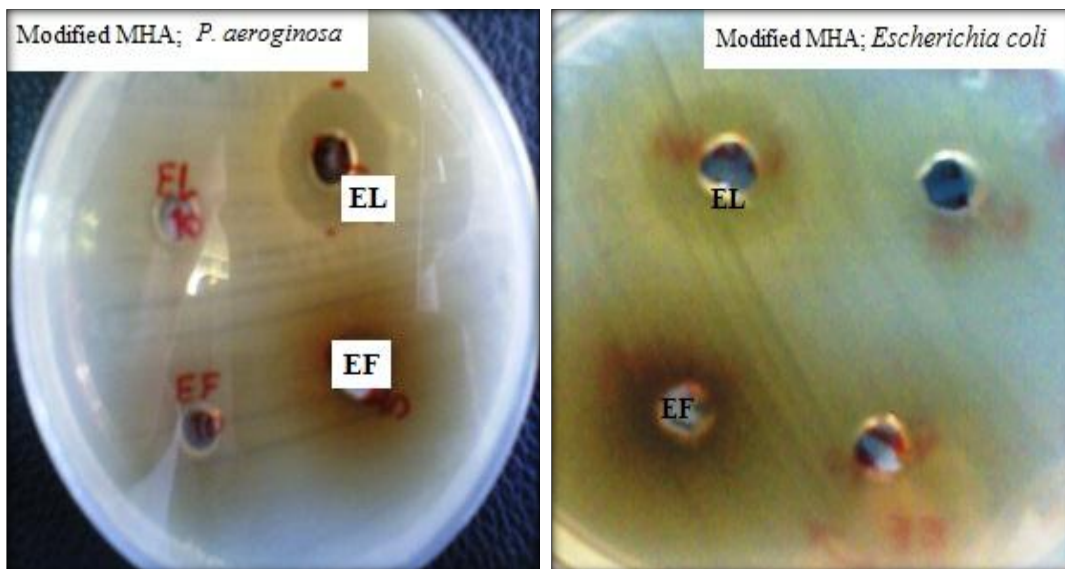
بر اساس معادله غلظت پروتئین استاندارد مقدار پروتئین نمونه در عصاره‌های تام اتانولی، آبی و بوتانولی و محلول‌های حاصل از شستشوی ستون محاسبه گردید، برخی محلول‌ها به ویژه در شستشو با حلال اتانول آبی ۲۰٪ فاقد نمونه پروتئینی بودند و یا میزان بسیار کمی پروتئین داشتند که در Tricine-PAGE نیز همین نتیجه تایید گردید. نتایج برادفورد در جدول ۲-۳ قابل مشاهده است.

۳-۲-۳ بررسی اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدها

به منظور تعیین اثرات ضد میکروبی مجموعه سیکلوتیدهای استخراج شده و میزان حساسیت باکتری‌های مورد آزمایش، تأثیر عصاره‌های تام و محلول‌های حاصل از شستشوی ستون SPE روی *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* ATCC25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 و ATCC25923 با استفاده از روش انتشار چاهک (well Diffusion Assay) و محیط کشت استاندارد سنجش‌های ضد میکروبی (مولر هیتون آگار) و محیط تغییر یافته (حاوی مولر هیتون برات و آگاروز LE و توئین ۲۰ که طرز تهیه آن در فصل قبل توضیح داده شده است) بررسی گردید. محلول‌های اتانولی و عصاره‌های فوق حاصل به روش انتشار شعاعی از چاهک روی باکتری‌ها اثر داده شده و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. نتایجی از تأثیر عصاره‌ها و فراکشن‌های SPE در جدول ۲-۳ گزارش می‌گردد.

در این مطالعه علاوه بر سنجش میزان حساسیت باکتری‌ها به عصاره‌های مورد بررسی، مقایسه‌ی دو محیط کشت مورد استفاده نیز انجام گردید. محیط کشت تغییر یافته بر مبنای محیط کشت اولیه، با توجه به محیط انتخابی استفاده شده در مطالعات Lehrer و همکاران

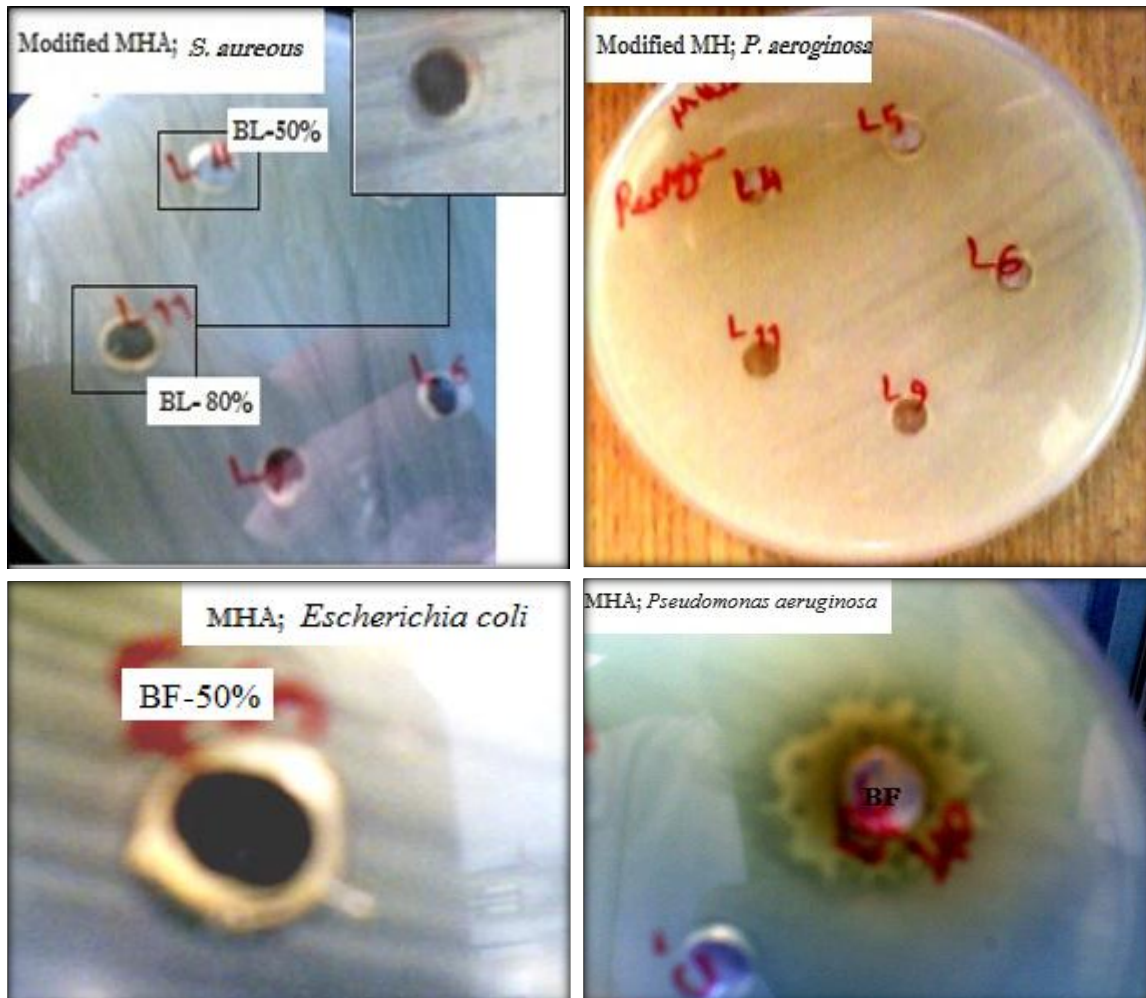
بدین صورت تهیه گردید که در این محیط به دلیل این که پلی پپتیدهای ضد میکروبی سیکلوتیدها باردار هستند، برای کاهش میان کنش الکترواستاتیک میان آنها و اجزای سولفات رزیدوهای قند آگاروپکتین به جای آگار از آگاروز LE به عنوان ماده ژلاتینی استفاده شد و به جای آب با بافر فسفات به حجم رسانده شد.



شکل ۳-۱۹ اثر ضد میکروبی عصاره‌های تام اتانولی برگ (EL) و گل (EF) روی *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* روی محیط تغیر یافته (Modified MHA).

عصاره تام اتانولی به دست آمده از برگ و به میزان اندکی عصاره‌ی اتانولی گل بر رشد *E. coli* و *P. aeruginosa* موثر ولی علیه *S. aureus* بی تاثیر بوده و یا تاثیر بسیار کمی دارند. قطر هاله عدم رشد در جدول ۳-۲ نشان داده شده است. تاثیر و قطر هاله عدم رشد در محیط تغیر یافته نسبت به محیط کشت مولر هیتتون آگار بیشتر است.

تاثیر محلول‌های حاصل از شستشوی ستون با حلال‌های اتانولی ۵۰٪ و ۸۰٪ و نیز فاز بوتانولی و فاز آبی به دست آمده از عصاره‌های تام اتانولی روی باکتری‌های مورد مطالعه و در هر دو محیط کشت بررسی گردید.



شکل ۳-۲۰. تاثیر فاز بوتانولی و برخی محلول‌های حاصل از شستشوی ستون با حلال اتانولی ۵۰٪ و ۸۰٪ روی باکتری‌های مورد مطالعه (BF: فاز بوتانولی گل، L4-11: محلول‌های ۵۰٪ و ۸۰٪، BL: بوتانولی برگ).

جدول ۳-۲ قطر هاله عدم رشد برحسب (mm)

بakterی	محیط کشت	عصاره	قطر ناحیه مهارکننده رشد (mm)	میزان ماده درون چاهک	میزان پروتئین تام موجود
<i>Escherichia coli</i>	Modified MHA	EL	۱۵	۱۰mg	٪۰/۲۵
	MHA	WF	۸/۵	۱۰mg	٪۰/۱۸
		BF-F 50%	۱۳	۱۵μL	۰/۰۲mg/ml
		EL	۸/۵	۱۰mg	٪۰/۲۵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Modified MHA	EL	۱۶/۵	-	-
		EF	۸/۵	-	٪۰/۶۶
	MHA	EL	۱۳	-	٪۰/۲۵
		BL	۱۰	۴mg	Nd
		BF	۱۷	۴mg	Nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	Modified MHA	BL-F 80%	۹	۱۵μL	-
		BL-F 50%	۹/۵	۱۵μL	۰/۰۲mg/ml
	MHA	BF	۱۰	-	-
		BL	۸	-	-
* مواردی که فاقد اثر بودند گزارش نشده اند.					

* EL: اتانولی برگ، EF: اتانولی گل؛ BF: بوتانولی گل، BL: بوتانولی برگ؛ WF: فاز آبی گل، WL: آبی برگ؛

F50% و F80% محلول‌های شسته شده با حلال اتانولی ۵۰٪ و ۸۰٪ می‌باشند.

فصل چہارم

بحث و نتیجہ گیری

۴-۱ شناسایی ژن‌های سیکلوتیدی

سیکلوتیدها از روی پیش‌سازهای ژنی رمزگذاری شده، و با سیکلوتیدهای بالغی که به طور بیوسنتتیک از پروتئین‌های پیش‌ساز بزرگتر در یک فرایندی که شامل فعالیت آنزیمی مشابه با آنزیم آسپاراژینیل اندوپپتیداز می‌گردد، بریده و برداشته می‌شوند (Dutton *et al.*, 2007; Saska *et al.*, 2004). تمام سیکلوتیدهای گزارش شده تا کنون از خانواده‌های *Rubiaceae* و *Violaceae* همگی از طریق روندی مشابه از روی ژن‌های اختصاصی سیکلوتیدی، که در برخی موارد چندین نسخه از یک سیکلوتید و در برخی دیگر ترکیبی از توالی‌های سیکلوتیدی مختلف را رمز می‌کنند، بیوسنتز می‌گردند (رجوع شود به شکل ۱-۴ از فصل اول).

اولین مطالعه روی ژن‌های سیکلوتیدها توسط Dutton و همکاران روی گیاه *O. affinis* از خانواده *Rubiaceae* انجام گرفت و مطالعه بعدی آنها بر روی *Viola odorata* صورت پذیرفت (Dutton *et al.*, 2004). در سال ۲۰۰۵ نیز پیش‌ساز ژنی تریسیکلون از بنفشه سهرنگ به عنوان پیش‌ساز ژنی کدکننده سیکلوتید توسط Mulvenna و همکاران شناسایی و مطالعه گردید (Mulvenna *et al.*, 2005).

در سال ۲۰۰۶، Ireland و همکاران گزارش نمودند که شناسایی سیکلوتیدها در سطح نوکلئوتید دلیلی بر امکان شناسایی در سطح پپتید نیز می‌باشد. همین گروه برای اولین بار سیکلوتید خطی طبیعی را گزارش کردند. مطالعات cDNA این پپتید نشان داد که در اثر یک جهش نقطه‌ای رمز اسیدآمینوی کلیدی آسپاراژین به رمز پایان تبدیل شده است، گفته می‌شود

این اسیدآمین به برای حلقوی شدن ضروری است. بررسی پایداری آنزیمی این پپتید نشان داد که با وجود افزایش انعطاف پذیری، گره سیستینی (CK) پایداری کلی مولکول در مقابل آنزیم را حفظ می کند.

Gruber و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیش از ۲۰۰ گونه از خانواده Rubiaceae را مورد مطالعه قرار دادند، که در ۲۲ گونه آن سیکلوتید حضور داشت (Gruber et al., 2008). آنها ادعا کردند تکامل سیکلوتیدها مستقل از تنوع خانواده های گیاهی است که ۱۲۵ میلیون سال پیش انشقاق یافته اند (دوره های Asterids و Rosids)، اتفاق افتاده است. Zhang و همکاران در ۲۰۰۹ از ریشه *Viola baoshanensis* با استفاده از تکنیک RACE^{۳۲} و RT-PCR ژن های رمز کننده سیکلوتید را شناسایی کردند (Zhang et al., 2009).

Poth و همکاران اخیراً نشان داده اند که توالی کدکننده سیکلوتید Cter M مجزا شده از گیاه *Clitoria ternatea*، از خانواده ی گیاهی Fabaceae، درون ژن آلبومین-۱ این گیاه قرار گرفته است (شکل ۱-۴). مطالعات گونه های دیگر از این خانواده نیز وجود ژن های مشابه در برگیرنده توالی سیکلوتیدی را تایید می نماید. آلبومین های گیاهی بخشی از منابع ذخیره ای مواد مغذی بوده، اما در دفاع میزبان نیز نقش دارند. ژن های عمومی آلبومین-۱ در برگیرنده ی توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی و به دنبال آن یک توالی کدکننده زنجیره-b آلبومین، یک رابط و یک توالی کدکننده زنجیره-a آلبومینی می باشند. در پیش ساز کدکننده Cter M توالی سیکلوتیدی جایگزین زنجیره-b آلبومینی شده است (Camarero., 2011).

³² Rapid amplification cDNA ends

مطالعات انجام یافته در ایران روی ژن‌های سیکلوتیدی تاکنون در مطالعات دلیر و همکاران در سال ۱۳۹۰، روشن و همکاران در سال ۱۳۹۱، رویینی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی گونه‌هایی از جنس بنفشه انجام گردیده است.

پیش‌سازهای ژنی از یک خانواده‌ی گیاهی شباهت‌های بسیاری با یکدیگر داشته و توالی‌های حفاظت شده‌ای را در برمی‌گیرند. توالی‌های پیش‌ساز سیکلوتیدی در خانواده بنفشه اغلب شامل توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی مشابهی می‌باشند که به منظور مطالعه و شناسایی هم‌زمان چندین توالی از اعضای این خانواده به ویژه در جنس بنفشه (*Viola*) پرایمر دژنره ویژه‌ای برای این ناحیه طراحی می‌گردد که در این مطالعه نیز به کار رفته است (Simonsen *et al.*, 2005). ثابت شده است که سیکلوتیدها از نظر زمانی و موقعیت بافتی در گیاهان و همچنین موقعیت جغرافیایی و فصلی برای گیاهان دربرگیرنده آنها، بیان متفاوتی از خود نشان می‌دهند و حضور یک ژن حتماً دلیل بر بیان محصول آن نخواهد بود. به همین دلیل از آنجائیکه این پرایمر دژنره‌ی فراگیر برای غربالگری cDNA به کار می‌رود، لذا بایستی مورد توجه قرار داد که تنها امکان شناسایی پیش‌سازهایی با این روش وجود دارد که در میان mRNA های بیان شده و موجود در زمان سنتز cDNA حضور دارند.

همانطور که گفته شد در سیکلوتیدها وجود اسیدآمینو اسپاراژین (N) در انتهای پپتید، تاییدی بر حلقوی شدن این نوع پپتیدها می‌باشد، زیرا پیش‌سازهای سیکلوتیدی تحت تاثیر نوعی اسپاراژینیل اندوپپتیداز اختصاصی سیکلوتید بالغ را ایجاد می‌کنند. شبه سیکلوتیدهای خطی فاقد این اسیدآمینو در انتهای خود می‌باشند. در اغلب سیکلوتیدها اسیدآمینو‌ی آغازی

گلیسین می‌باشد، اما این شامل تمام پپتیدهای حلقوی از نوع سیکلوتیدی نمی‌گردد و ممکن است اسیدآمینو آغازی پرولین یا چندین باقیمانده‌ی دیگر باشد. در اغلب این پروتئین‌ها و همچنین پروتئین مفروض ما نیز پس از سیستئین آخر و درست در قسمت منطبق با انتهای سیکلوتیدها، اسیدآمینو آسپاراژین دیده می‌شود.

از نظر منابع گیاهی سیکلوتیدها تاکنون در خانواده‌های *Fabaceae*، *Violaceae*، *Cucurbitaceae* و *Rubiaceae* کشف و شناسایی شده‌اند. در خانواده *Fabaceae* به ویژه گونه‌های *Glycine max* و *Phaseolus vulgaris* و همچنین در سایر گونه‌های لگوم‌ها وجود و تولید سیکلوتیدها از پیش‌سازهای ژنی و پروتئینی مربوط به آلبومین-۱ در این گیاهان کشف شده است.

پروتئین فرضی حاصل از ترجمه ژن به دست آمده در این مطالعه از خانواده *Violaceae* بوده و برخی پروتئین‌های همسان نیز متعلق به خانواده‌های گیاهی *Fabaceae* (به ویژه همین دو گونه‌ی مذکور یعنی گیاه سویا و لوبیا) و گونه‌ای از خانواده *Cucurbitaceae* توام با دو خانواده دیگر می‌باشند؛ وجود پیش‌سازهای سیکلوتیدی و تولید سیکلوتیدها نیز در گیاهانی از همین خانواده‌های گیاهی تایید گردیده است (به جز انگور قرمز از خانواده *Vitaceae*). با توجه به مطالعات مربوطه احتمال اینکه این پروتئین‌ها نیز منجر به تولید نوعی سیکلوتید تغییر یافته شده و یا پیش‌ساز این نوع سیکلوتیدها یا شبه سیکلوتیدها باشند، وجود دارد که نیاز به بررسی بیشتر و تایید این مطلب وجود دارد. مطالعه روی این ژن‌ها و پروتئین‌ها از

نظرگاه تکاملی و پی بردن به خاستگاه آغازین این نوع ژنها و پپتیدهای حلقوی نیز حائز اهمیت است.

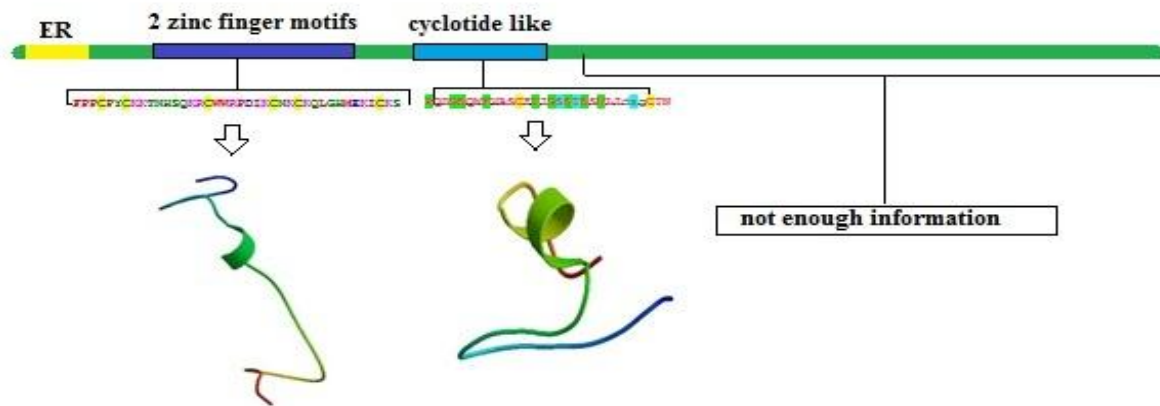
نکته ای پیرامون ژنها و پیش سازهای آلومین گیاهی در Fabaceae یا لگوم ها که تولید سیکلوتیدها از روی توالی آنها قبلاً تایید شده است، اینست که همترازی پروتئین های مفروض مورد بررسی در این مطالعه با این نوع پروتئین ها ترادف توالی نشان نمی دهد. به علاوه این پروتئین ها منحصرأ از پروتئین های دانه های گیاهی در خانواده ی لگوم می باشند. اما mRNA توالی یابی شده و تولید کننده پروتئین فرضی مورد بررسی ما در این مطالعه از گل های گونه ی *Viola tricolor* استخراج و شناسایی گردیده است.

نتایج این پژوهش در واقع پنجره ای تازه رو به گسترش احتمالی خانواده های پپتیدی سیکلوتید مانند باز می کند که نیاز به مطالعه و تفصیل بیشتری دارد. در صورت اثبات بیان چنین پپتیدی از میان ساختارهای ژنی ناشناخته در گونه ی مورد مطالعه ی ما و نیز سایر گونه های دربرگیرنده این ژنها، نیاز به مطالعات بیشتر به ویژه تعیین حلقوی یا غیر حلقوی بودن این نوع پپتیدها و همچنین مطالعات مقایسه ای فعالیت های ذاتی مرتبط با سیکلوتیدهای شناخته شده وجود دارد. البته با توجه به اندازه کوچک این ناحیه از پپتید فرضی در حال حاضر سنتز شیمیایی این پپتید بهترین راه برای برداشتن گام های اولیه در اثبات این احتمالات خواهد بود. این پپتیدها ضمن سنتز شیمیایی فاز جامد حتی اگر تنها جزئی از ساختار پروتئینی بزرگتر از ناحیه ی سنتز شده باشند، باز هم با مطالعه و بررسی خواصی نظیر سمیت سلولی، فعالیت همولیتیک و نیز سایر فعالیت ها، افزون بر مقایسه ی آنها با سیکلوتیدها در صورت

مطلوب بودن فعالیت‌های مذکور از آنجائیکه آرایش گره سیستمی موجود در سیکلوتیدها در این پپتید وجود ندارد می‌توان پپتید سنتز شده را در مطالعات طراحی دارو به عنوان داربستی جدید معرفی و مطالعه کرد. لازم به ذکر است که سیکلوتیدها با داشتن ساختار CCK پایداری آنزیمی و حرارتی فوق العاده‌ای دارند و نیز با داشتن اندازه‌ی کوچک و امکان سنتز شیمیایی و سنتز زیستی و همچنین امکان دستکاری با روش‌های مهندسی پروتئین و مهندسی ژنتیک به عنوان یک داربست عالی در طراحی دارو مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. مبنی بر حذف شدن دو پیوند دی‌سولفید و عدم وجود آرایش گره سیستمی در این پپتید در مقایسه با سیکلوتیدها، احتمال بسیار می‌رود که این پپتید انعطاف پذیری ساختاری بیشتری در مقایسه با سیکلوتیدها داشته باشد که این امر در زمینه طراحی دارو بسیار حائز اهمیت است.

تاکنون پروتئینی مرتبط با این ژن‌ها از هیچ کدام از گیاهان فوق به دلایل عدم مطالعه‌ی کامل پروتئوم در گیاهان مذکور و شاید سخت بودن دسترسی به چنین ساختاری، همانند شناسایی سخت سیکلوتیدها به علت پایداری آنزیمی آنها در مقابل پروتئازها، به دست نیامده است. با توجه به ناشناخته بودن این ژن‌ها و پروتئین‌های فرضی حاصل از آنها، تنها با مطالعات مقایسه‌ای انجام یافته و نیز تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش تا به حال، احتمال تولید دو پپتید بالغ از روی این توالی ژنی و پیش‌ساز رمز شونده از آن می‌رود که یکی همین ناحیه سیکلوتید مانند بوده و دیگری قسمتی از توالی در برگ‌گیرنده دو موتیف انگشت روی می‌باشد که در تمام این پپتیدها شش باقیمانده‌ی سیستمی حفاظت شده و ساختار بسیار مشابهی دارد. تایید این مطالب تاحدی با بیان این ژن و القای شرایط مناسب آزمایشی جهت

پردازش پیش ساز پروتئینی مربوطه و متعاقباً استخراج و شناسایی پپتیدهای بالغ حاصل از پردازش آنزیمی یا شیمیایی مقدور و مفید خواهد بود. سایر قسمت‌های این ژن به دلیل فقدان اطلاعات کافی در مورد این ژن‌ها از حوصله بحث خارج است. تحلیل نتایج فرضی انجام گرفته در شکل ۴-۱ با تصویر سازی نشان داده می‌شود.



شکل ۴-۱. پروتئین پیش ساز فرضی حاصل از این مطالعه و نواحی احتمالی حاصل از پردازش پیش بینی شده. ساختارهای سه بعدی پپتیدهای فوق هر دو از طریق مدل سازی به دست آمده اند. مدل سازی موتیف مربوط به دو انگشت روی با استفاده از الگوی مشابه موجود در پروتئین gag-pol در HIV-1 که قبلاً تعیین ساختار شده و همترازی قابل ملاحظه ای با این ناحیه در پروتئین مورد مطالعه ما دارد، انجام شده است.

۴-۲ روش های استخراج سیکلوتیدها

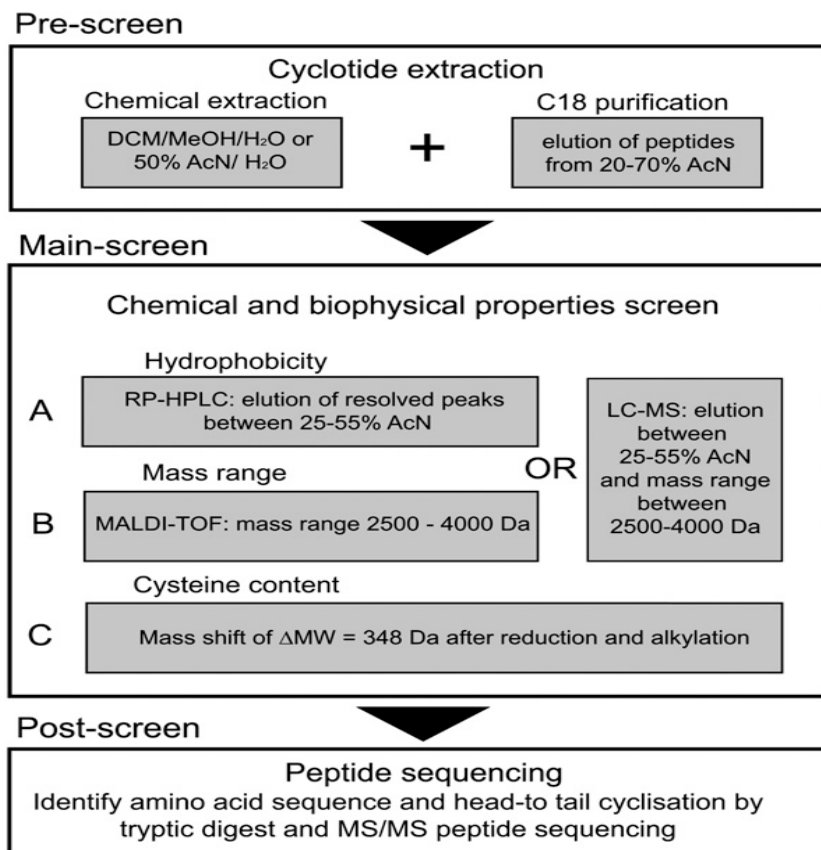
روش های مختلفی برای استخراج سیکلوتیدها از گیاه به کار می‌رود. تا سال ۲۰۰۵ روش Cleason با کمی تغییرات مورد استفاده قرار می‌گرفت (Cleason *et al.*, 1998). روش کروماتوگرافی سفادکس LH20 در سال ۱۹۹۹ توسط Goransson، روش جزءبندی حلال-

حلال^{۳۳} در سال ۲۰۰۱ توسط Broussalis و همکاران و روش کروماتوگرافی تعویض یونی در سال ۲۰۰۳ توسط Svangard و عصاره‌گیری فاز جامد در بسیاری از مطالعات دیگر روش‌هایی بود که در سال‌های بعد مورد استفاده قرار گرفت. در سال ۲۰۰۸، روش جدیدی برای غربالسازی سیکلوتیدها به کار رفت (Gruber et al., 2008). هدف اصلی این روش این بود که بتواند روشی موثر برای شناسایی سیکلوتیدها ایجاد کند به گونه‌ای که تعداد نتایج کاذب مثبت و کاذب منفی کاهش دهد.

در بیشتر مطالعات عصاره‌گیری اولیه با ترکیبی از حلال‌های دی کلرومتان، اتانول یا متانول و آب، و یا حلال آبی-استونیتریل صورت گرفته است. عصاره تام به دست آمده با حلال قطبی مانند اتانول یا متانول، حاوی عمده ترکیبات پپتیدی بوده و می‌تواند جهت تخلیص نسبی و یا حتی خالص این پپتیدها، مستقیماً با روش‌های اشاره شده به کار رود و نیز در عصاره‌گیری فاز جامد (SPE) روی ستون‌های مربوطه بارگذاری شود.

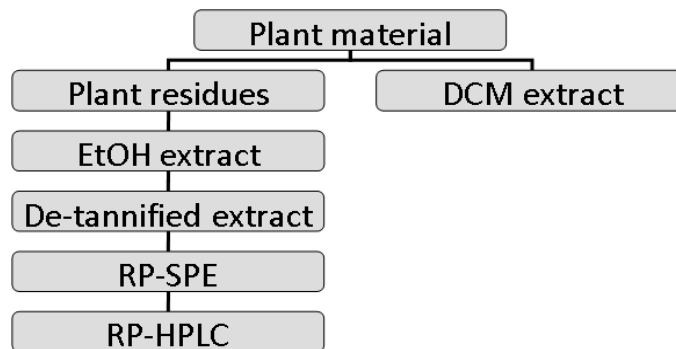
مطالعات مربوط به استخراج سیکلوتید در ایران توسط هاشم پور در سال ۱۳۸۷ روی گونه *Viola ignobilis*، دلیر در سال ۱۳۹۰ روی گونه *V. odorata* و روشن در سال ۱۳۹۱ مجدداً روی گونه‌ی *V. ignobilis* و روئینی در سال ۱۳۹۲ روی گونه‌ی *V. spathulata* انجام گرفته است. در این پژوهش عصاره‌گیری اتانولی از گیاه *V. tricolor* مطابق با روش ارائه شده Cleason به دلیل ارجاع پذیری این روش در مطالعات دلیر، روشن و روئینی و تأیید نتایج حاصل از استخراج نسبی سیکلوتیدها به روش فوق انجام گردید (شکل ۴-۳).

³³ Solvent-Solvent partitioning



شکل ۴-۲. غربالسازی سیکلوتیدها، این روش سه مرحله دارد: در pre-screen مواد گیاهی با استفاده از دی کلرومتان/ متانول/ آب (۱:۱:۱ v/v/v) و یا استونیتریل/ آب (۱:۱ v/v) عصاره گیری می شوند و سپس در ستون های C18 Solid Phase Extraction خالص می شود. در مرحله main screen مشخص می شود فرکشن هایی که از ستون خارج شده اند آیا دارای سیکلوتید هستند یا خیر. مرحله main screen: در این مرحله ۳ ویژگی فیزیکی و شیمیایی سیکلوتیدها شامل ویژگی آبگریزی، جرم مولکولی و محتویات Cys اندازه گیری می شود. سطوح هیدروفوبی سیکلوتیدها باعث می شود که زمان خارج شدن آنها از ستون کروماتوگرافی فاز معکوس دیر باشد و بازه جرمی آنها بین ۲۵۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون می باشد. مرحله post screen: تایید نهایی سیکلوتیدها در این مرحله صورت می گیرد.

تست Tricine-SDS-PAGE وجود پپتیدهایی در محدوده اندازه سیکلوتیدها را در محلول‌های حاصل از شستشوی ستون هر دو نمونه برگ و گل تایید می‌کند که نیاز به شناسایی و بررسی دقیق تر دارند. میزان پپتید تعیین شده با روش سنجش پروتئین بردفورد در محلول اتانولی ۵۰٪ درصد حاصل از شستشوی ستون SPE نسبت به دو محلول دیگر بیشتر است. مطالعه اثرات ضد میکروبی این محلول‌ها نیز نشان داد اثر ضد میکروبی محلول اتانولی ۵۰٪ بیشتر است که تأیید کننده یافته‌های هاشم پور و نیز دلیر و سایرین است.



شکل ۴-۳. مراحل استخراج سیکلوتیدها در این پژوهش.

با استفاده از روش فوق تنها در صورتی می‌توان سیکلوتیدها را خالص کرد که محلول‌های حاصل از شستشوی ستون فاز جامد C18 که قابلیت اتصال به HPLC را دارد، مجدداً روی ستون بارگذاری کرده و با توجه به زمان تاخیری مربوط به خروج سیکلوتیدها، محلول‌های مرتبط با هر کدام از پیک‌های سیکلوتیدی را در شستشوی ستون با حلال مناسب جمع‌آوری نمود.

۳-۴ مطالعات انجام شده روی فعالیت ضد میکروبی سیکلوتیدها

فعالیت‌های مختلف سیکلوتیدها از جمله فعالیت‌های ضد ویروس، ضد میکروب، ضد کرم، ضد سرطان و... موضوع بسیاری از پژوهش‌ها قرار گرفته است.

اولین گزارش از فعالیت ضد میکروبی در سیکلوتیدها در سال ۱۹۹۹ بوده است و بعد از آن تنها چند مورد گزارش گردیده است. مطالعات اخیر تا حدی نتایج ضد و نقیضی را با توجه به مطالعات اولیه ارائه می دهند و بنابراین پتانسیل واقعی سیکلوتیدها به عنوان عوامل ضد میکروبی هنوز روشن نشده است (Daly et al., 2011). به نظر می رسد که برخی از سیکلوتیدها در شرایط آزمایشی خاص فعالیت ضد میکروبی نشان می دهند، اما این فعالیت لزوماً تحت شرایط نمک بالا که ممکن است در یک سامانه فیزیولوژیکی مشاهده شود، حفظ نمی گردد. سیکلوتید Cycloviolacin O2 به نظر می رسد در میان فعالترین سیکلوتیدهای با خاصیت ضد میکروبی باشد (Pränting et al., 2010).

در تحقیقی که به وسیله Tam و همکاران در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت چهار سیکلوتید کاملاً به روش شیمیایی سنتز شدند و فعالیت آنها علیه باکتری‌های مختلف (چهار گرم- منفی و دو گرم- مثبت) با استفاده از RDA بررسی شد. سیکلوتیدهای سنتزی شامل kalata B1 است که علیه باکتری‌های گرم مثبت مثل *S. aureus* در غلظت‌های زیر میکرومولار فعال است، ولی علیه باکتری‌های گرم- منفی نسبتاً غیر فعال است. برخلاف این نتیجه Gran و همکاران در سال ۱۹۷۳ kalata B1 طبیعی را پیدا کردند که علیه *S. aureus* غیر فعال است، ولی علیه سویه‌های گرم منفی فعال است. ممکن است سیکلوتیدهای سنتزی که توسط Tam و

همکاران بررسی شده‌اند ویژگی‌های متفاوتی نسبت به سیکلوتیدهایی که مستقیماً از گیاه استخراج می‌شوند داشته باشد، مثلاً به دلیل تفاوت در ساختار یا ارتباط پل‌های دی-سولفیدی.

Pränting و همکاران در سال ۲۰۱۰ از cycloviolacin O2 علیه طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده کردند و اعلام کردند این سیکلوتید علیه سویه‌های گرم منفی اثر بیشتری دارد. *Staphylococcus aureus* در حضور cycloviolacin مانند غیاب آن رشد می‌کند و *Escherichia coli* بیشترین حساسیت را به این پپتید نشان داد.

مطالعه روی اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها در ایران در برگیرنده پژوهش‌های دلیر، روشن و روئینی است که هر سه به روش RDA انجام گرفته است. در این پژوهش‌ها اثرات ضد میکروبی سیکلوتیدهای تخلیص شده نسبی علاوه بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی مانند *Xanthomonas oryzae* نیز مطالعه شده است که بیشترین تاثیر ضد میکروبی روی این سویه و در محلول حاصل از شستشوی اتانولی ۵۰٪ به دست آمده است.

اثرات ضد میکروبی چندین عصاره تام به دست آمده از گیاه بنفشه سه‌رنگ در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ صورت گرفته است. در این مطالعه عصاره‌های تام اتانولی و جوشانده و خیسانده بیشترین تاثیر را روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی داشته‌اند که شامل سویه‌های میکروبی گرم مثبت، گرم منفی و نیز مخمر می‌گردد. ترکیبات فعال ضد میکروبی از عصاره‌های فوق تاکنون شناسایی نشده‌اند. اما غربالگری‌های فیتوشیمیایی انجام شده در این مطالعه

تست‌های مثبتی برای حضور ترپنوئیدها در عصاره دی‌کلرومتان، فلاونوئیدها و فنولیک اسید در عصاره‌ی اتیل استات و ساپونین‌ها و فلاونوئید در عصاره متانولی نشان می‌دهند (Witkowska-Banaszczak *et al*, 2005). از نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌آید که ترکیبات مقاوم به دما نظیر سیکلوتیدهای موجود در این گیاه، توام با سایر ترکیبات به صورت هم‌افزایی^{۳۴} می‌توانند عمده تأثیرات ضد میکروبی به دست آمده از این پژوهش را به خود اختصاص دهند.

با توجه به نتایج ضد و نقیض سنجش‌های ضد میکروبی در برخی از پژوهش‌های انجام یافته روی سیکلوتیدها، در این پژوهش روش انتشار چاهک با استفاده از محیط کشت استاندارد در سنجش‌های ضد میکروبی (MHA) و محیط تغییر یافته با پایه‌ی مولر هیتون شامل آگاروز LE ۱٪ و توئین ۲۰ که با بافر فسفات به حجم رسانده شده است، انجام گردید. عصاره تام اتانولی برگ (حاوی ۰/۲۴٪ پروتئین تام) و گل (حاوی ۰/۶۶٪ پروتئین تام) با میزان ۱۰ میلی‌گرم در چاهک در هر دو محیط کشت روی سویه‌های گرم منفی *E. coli* و *P. aeruginosa* موثر بوده و تأثیر آنها در محیط تغییر یافته بیشتر می‌باشد. روی *S. aureus* هیچ اثری نشان ندادند. عصاره‌ی تام اتانولی حاصل از برگ نسبت به گل تأثیر زیادتری دارد. اثر ضد میکروبی فازهای آبی و بوتانولی جدا شده از عصاره تام اتانولی برای برگ و گل نیز به همین روش مستقیماً روی سویه‌های مورد بررسی مطالعه شد. تنها در فاز آبی گل روی سویه *P. aeruginosa* و فقط در محیط MHA هاله عدم رشد کوچکی وجود داشت و فاز آبی برگ

³⁴ Synergism

بی تاثیر بود که احتمالاً مؤید این مطلب است که ماده موثر ضد میکروبی وارد فاز بوتانولی شده است. تاثیر مستقیم فاز بوتانولی باز هم بیشترین اثر را روی سویه *P. aeruginosa* اما تنها در محیط مولر هیتتون آگار معمولی داشت، و در محیط تغییر یافته هیچ گونه اثر ضد میکروبی نشان نداد. اما روی *E. coli* نیز برخلاف عصاره تام اتانولی در هر دو محیط کشت بی تاثیر بود. فاز بوتانولی برگ و گل روی *S. aureous* نیز فقط در محیط MHA هاله عدم رشد کوچکی اطراف چاهک نشان می دهد. عصاره حاصل از فاز بوتانولی درون چاهک ها در محیط MHA حاوی ماده ای است که تقریباً روغنی بوده و درون محیط کشت نفوذ نمی کند و از لبه های چاهک در سطح پلیت پخش می شود این ماده اطراف خود هاله ای عدم رشد ایجاد می کند. در محلول های اتانولی ۵۰٪ و ۸۰٪ حاصل از شستشوی ستون اثر ضد میکروبی حتی پس از تغلیظ از آنجائیکه باز هم میزان مواد موثر پایین است، کم می باشد و از میان این فراکشن های حاصل از شستشو، فراکشن ۵۰٪ نمونه گل تنها روی *E. coli* و در محیط MHA تاثیر داشته و فراکشن های ۵۰٪ و ۸۰٪ برگ نیز تنها روی *S. aureous* در محیط تغییر یافته هاله ای عدم رشد کوچکی داشتند.

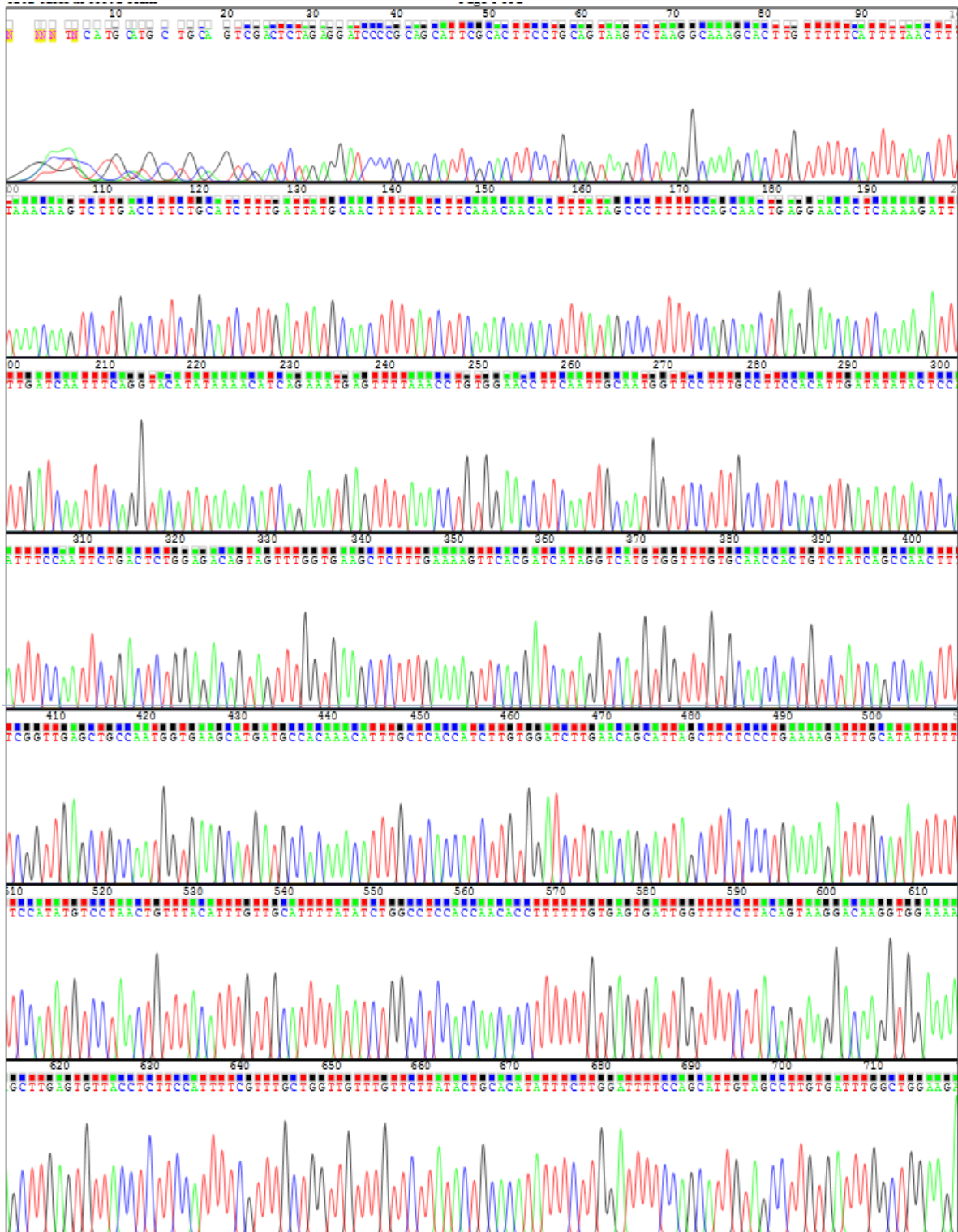
این اثرات تکرار پذیر بودند و دلیل احتمالی به این پاسخ های به ظاهر متناقض جدا شدن و وجود ترکیبات مختلف با خاصیت آبگریزی و قطبیت متفاوت در عصاره ها و فراکشن های خارج شده از ستون، با توجه به تغییر در میزان قطبیت حلال شستشو دهنده و همچنین وجود مقادیر متفاوتی از آنها در عصاره های مورد مطالعه می تواند باشد. سیکلوتیدها از نظر خاصیت های آب گریزی و آب دوستی در باقیمانده های خود تا حدی متفاوت می باشند. با توجه به

نتایج این مطالعه به نظر می آید محیط کشت های سنجش ضد میکروبی برای سیکلوتیدها چندان بهینه نشده است.

۴-۴ پیشنهادها

۱. استخراج تک تک سیکلوتیدهای موجود در محلول با روش preparative HPLC و بررسی اثر هر کدام به طور مجزا.
۲. سنتز شیمیایی پتیدهای فرضی حاصل از این مطالعه و بررسی فعالیت آنها.
۳. مطالعه سایر فعالیت های سیکلوتیدها از جمله فعالیت ضد سرطانی و همولیتیک.
۴. بررسی بیشتر ژن جدید حاصل از این پژوهش و پروتئین های بالغ حاصل.
۵. تعیین حداقل غلظت مؤثر سیکلوتیدهای به کار رفته در این پژوهش.
۶. مهندسی پروتئین سیکلوتیدها جهت از بین بردن خواص نامطلوب برای کاربردهای درمانی.

پیوست-۱ نمودار مربوط به تعیین توالی



منابع

منابع:

اردکانی شمس، محمدرضا و همکاران (۱۳۸۷). مروری بر تاریخ و مبانی طب سنتی اسلام و ایران. انتشارات ملائک، تهران.

خاتم ساز، محبوبه (۱۳۶۹). فلور ایران، تیره بنفشه، شماره ۵، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

دلیر فردویی، راضیه (۱۳۹۰). مطالعه اثر ضد میکروبی سیکلوتید موجود در *Viola odorata* بومی ایران و تعیین توالی ژنی و آمینواسیدی این پپتید. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا (س).

روشن، اکرم (۱۳۹۱). شناسایی ژن سیکلوتید در یکی از گونه‌های بنفشه در ایران و آنالیز بیوانفورماتیکی توالی ژن و پروتئین آن. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا (س).
روبینی، مهسا (۱۳۹۲). مطالعه ژنهای بیان کننده پپتیدهای ضد میکروبی در بنفشه ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا (س).

زرگری، علی (۱۳۲۹). گیاهان دارویی ایران. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

شبعی، اسماعیل (۱۳۷۳). میوه‌ها و گیاهان شفابخش. انتشارات باربد مشهد.

عیدی، اکرم؛ عیدی، مریم (۱۳۸۵). گیاهان دارویی ایران، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات.

موسوی نژاد، سیده زهرا؛ موسوی، سید فضل الله؛ شکیب، هیوا. (۱۳۹۰). پپتیدهای ضد میکروب.

هاشم پور، ابراهیم (۱۳۸۷) پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

Austin J., Wang W., Puttamadappa S., Shekhtman A., Camarero J.A. (2009). Biosynthesis and biological screening of a genetically encoded library based on the cyclotide MCoTI-I. *Chembiochem*. 10:2663–2670.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd edition. John Wiley Sons.

Brown T.A. (2010). *Gene cloning and DNA analysis*. 6th edition. Wiley-Blackwell 7.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.

Burman R., Svedlund E., Felth J. (2010). Evaluation of toxicity and anti-tumour activity of cycloviolacin O2 in mice. *Biopolymers Peptide Science*. 94:626-34.

Camarero J.A. (2011). Legume cyclotides shed light on the genetic origin of knotted circular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), USA*. 108: 10025–10026.

Camarero J.A., Kimura R.H., Woo Y.H., Shekhtman A., Cantor J. (2007). Biosynthesis of a fully functional cyclotide inside living bacterial cells. *ChemBioChem*, 8: 1363-6.

Claeson P., Göransson U., Johansson S., Lujendijk T., and Bohlin L. (1998). Fractionation Protocol for the Isolation of Polypeptides from Plant Biomass. *Journal of Natural Product*. 61: 77-81.

Clark R.J., Daly N.L., Craik D.J. (2006). Structural plasticity of the cyclic-cystine-knot framework: implications for biological activity and drug design. *Biochem Journal*. 394: 85–93.

Clark R.J, Jensen J, Nevin S.T, Callaghan B.P., Adams D.J and Craik D.J. (2010). The engineering of an orally active conotoxin for the treatment of neuropathic pain. *Angewandte Chemie International Edition*. 49: 6545-8.

Colgrave M.L., Kotze A.C., Ireland D.C., Wang C.K., Craik D.J. (2008) The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity. *ChemBioChem*; 9:1939-45.

Colgrave M.L., Kotze A.C., Kopp S., McCarthy J.S., Coleman G.T., Craik D.J. (2009). Anthelmintic activity of cyclotides: In vitro studies with canine and human hookworms. *Acta Tropica*; 109:163-6.

Craik D.J., Cemazar M., Wang C.K., Daly N.L. (2006). The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymer (Peptide science)*. 84:250-266.

Craik D.J., Daly N.L., Bond T., Waine C. (1999). Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif". *Journal of Molecular Biology*. 294:1327-1336.

Craik D.J., Cemazar M., Daly N.L. (2007). The chemistry and biology of cyclotides. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 10:176-84.

Craik D.J., Swedberg J.E., Mylne J.S., Cemazar M. (2012). Cyclotides as a basis for drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 7:179-194.

Daly N.L., Rosengren K.J., Craik D.J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 918–930.

Daly N.L., Chen Y.K., Rosengren K.J., Marx, U.C., Phillips, M.L., Waring, A.J., Wang, W., Lehrer, R.I., Craik, D.J. (2007) Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry*. 46:9920-8.

Daly N.L., Clark R.J., Craik D.J. (2003) Disulfide folding pathways of cystine knot proteins. Tying the knot within the circular backbone of the cyclotides. *Journal of Biological Chemistry*. 278:6314-22.

Daly N.L., Craik D.J. (2000) Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins. Characterization of cystine knot and beta -sheet formation in the macrocyclic polypeptide kalata B1. *Journal of Biological Chemistry*. 275:19068-75.

Daly N.L., Craik D.J. (2011) Bioactive cystine knot proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*. 15: 362-8.

Dornenburg H. (2010) Cyclotide synthesis and supply: from plant to bioprocess. *Biopolymers (Peptide science)*. 94: 602-10.

Dutton J.L., Renda R.F., Waine C., Clark R.J., Daly N.L., Jennings C.V., Anderson M.A., and Craik D.J. (2004). Conserved structural and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins. *Journal of Biology and Chemistry*. 279: 46858- 46867.

Gerlach S.L., Rathinakumar R., Chakravarty G., Göransson U., Wimley W.C., Darwin S.P., Mondal D. (2010). Anticancer and chemosensitizing abilities of Cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. *Biopolymers (Peptide Science)*. 94: 617-25.

Göransson U., Craik D.J. (2003). Disulfide mapping of the cyclotide kalata B1. Chemical proof of the cyclic cystine knot motif. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 48188-96.

Gran L. (1970). An oxytocic principle found in *Oldenlandia affinis* DC. *Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap*. 12: 173-80.

Gran L. (1973). On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. 33: 400-8.

Gruber C.W., Cemazar M., Clark R.J., Horibe T., Renda R.F., Anderson M.A., and Craik D.J. (2007). A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *The Journal of biological Chemistry*. 28: 20435-20446.

Gruber C.W., Elliott A.G., Ireland D.C., Delprete P.G., Dessein S., Göransson U., Trabi M., Wang C.K., Kinghorn A.B., Robbrecht E., Craik D.J. (2008). Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. *The plant cell*. 20: 2471-2483.

Gruber C.W., Cemazar M., Anderson M.A., Craik D.J. (2007). Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. *Toxicon*. 49: 561-575.

Gustafson K.R., Sowder R.C.I., Henderson L.E., Parsons I.C., Kashman Y., Cardellina J.H.I., McMahon J.B., Buckheit R.W.J., Pannell L.K., Boyd M.R. (1994). Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 116: 9337-8.

Henriques S.T., Huang Y.H., Rosengren K.J., Franquelim H.G., Carvalho F.A., Johnson A., Sonza S., Tachedjian G., Castanho M.A., Daly N.L., Craik D.J.

(2011). Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 24231-41.

Herrmann A., Burman R., Mylne J., Karlsson G., Gullbo J., Craik D.J., Clark R.J., Göransson U. (2008). The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich source of novel cyclotides with potent cytotoxicity. *Phytochemistry*. 69(4): 939-952.

Huang Y.H., Colgrave M.L., Clark R.J., Kotze A.C., Craik D.J. (2010). Lysine-scanning mutagenesis reveals an amendable face of the cyclotide kalata B1 for the optimization of nematocidal activity. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 10797-805.

Huang Y.H., Colgrave M.L., Daly N.L., Keleshian A., Martinac B., Craik D.J. (2009). The biological activity of the prototypic cyclotide kalata B1 is modulated by the formation of multimeric pores. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 20699-707.

Jagdish K., Camarero J.A. (2010). Cyclotides, a promising molecular scaffold for peptide-based therapeutics. *Biopolymers (Peptide Science)*. 94:611-16.

Kolmar H. (2008). Alternative binding proteins: Biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *Federation of European Biochemical Societies*. 275: 2684–2690.

Kolmar H. (2009). Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Current Opinion in Pharmacology*. 9: 608-14.

Lindholm P., Göransson U., Johansson S., Claesson P., Gullbo J., Larsson R., Bohlin L., Backlund A. (2002) Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1: 365-9.

Marx U.C., Korsinczky M.L., Schirra H.J., Jones A., Condie B., Otvos L.J., Craik D.J. (2003). Enzymatic cyclization of a potent Bowman-Birk protease inhibitor, sunflower trypsin inhibitor-1, and solution structure of an acyclic precursor peptide. *Journal of Biological Chemistry*. 278:21782-9.

Pelegri P.B., Quirino B.F., Franco O.L. (2007). Plant cyclotides: An unusual class of defense compounds. *Peptides*. 28: 1475-1481.

Poth A.G., Colgrave M.L., Philip R., Kerenga B., Daly N.L., Anderson M.A., Craik D.J. (2011). Discovery of cyclotides in the fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution and distribution of circular proteins. *American chemical society*. 6:345-355.

Poth A.G., Colgrave M.L., Lyons R.E., Daly N.L., Craik D.J. (2011). Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 10127-32.

Pränting M., Lööv C., Burman R., Göransson U., Anderson I. (2010). The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access*. 65: 1964-71.

Sambrook J., Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saska I., Gillon A.D., Hatsugai N., Dietzgen R.G., Hara-Nishimura I., Anderson M.A., Craik D.J. (2007). An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclisation. *Journal of Biological Chemistry*. 282:29721-8.

Seydel P., Dornenburg H. (2006). Establishment of in vitro plants, cell and tissue cultures from *Oldenlandia affinis* for the production of cyclic peptides. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 85:247-55.

Simonsen S.M., Sando L, Rosengren K. J, Wang C.K., Colgrave M.L., Daly N.L., Craik D.J. (2008). Alanine Scanning Mutagenesis of the Prototypic Cyclotide Reveals a Cluster of Residues Essential for Bioactivity. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 9805–9813.

Simonsen S.M., Sando L., Ireland D.C., Colgrave M.L., Bharathi R., Göransson U., Craik D.J. (2005). A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae). *Plant Cell*. 17: 3176–3189.

Svangård E., Burman R., Gunasekera S., Lövborg H., Gullbo J., Göransson U. (2007). Mechanism of action of cytotoxic cyclotides: cycloviolacin O2 disrupts lipid membranes. *The Journal of Natural Products*. 70: 643-647.

Svangård E., Göransson U., Hocaoglu Z., Gullbo J., Larsson R., Claeson P., Bohlin L. (2004). Cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor* *The Journal of Natural Products*. 67(2): 144-7.

Tam J.P., Yi-Anlu., Yang J.L., Chiu K.W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 8913–8918.

Tam J.P, Lu Y.A. (1998). A biomimetic strategy in the synthesis and fragmentation of cyclic protein. *Protein Science*. 7: 1583-92.

Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 286: 498-502.

Thongyoo P., Roque-Rosell N., Leatherbarrow R.J., Tate E.W. (2008). Chemical and biomimetic total syntheses of natural and engineered MCoTI cyclotides. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 6:1462-70.

Thorsthalm L, and Craik D.J. (2011). Discovery and application of naturally occurring cyclic peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*. 278: e1-e9.

Wang C.K., Kaas Q., Chiche L., Craik D. J. (2008). CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Research*. 36: D206-10.

Witherup K.M., Bogusky M.J., Anderson P.S., Ramjit H., Ransom R.W., Wood T., Sardana M. (1994). Cyclopsychotride A, A biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *Journal of Natural Products*. 57: 1619-25.

Witkowska-Banaszczak E., Bylkaa W., Matławska I., Goślińska O., Muszyński Z. (2005). Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. *Fitoterapia*. 76: 458–461.

Abstract:

The cyclotides are the largest known family of cyclic proteins which have been found in plants from the Rubiaceae, Violaceae, Cucurbitaceae and Fabaceae families. The complex structure of these small proteins consists of approximately 30 amino acid residues and the cyclic cystine knot motif. The cyclotides are believed to have an important role in plants defense system by their insecticidal effects. Due to their multiple bioactivities, specially antiviral, antifungal, antibacterial, anthelmintic, anticancer &..., and also their exclusive structure; with exceptional stability cyclotides have attracted interest as templates for protein engineering and drug design applications. These circular peptides have been natural gene products and to have ribosomal synthesis. Therefore the study and sequencing of genetic structures of these peptides are very important. In this study the main content and genetic structure of cyclotides from Iranian *Viola tricolor*, have been studied by cDNA screening and cloning of resulted DNA fragments. This study resulted in relatively new gene sequence. Extraction and purification of cyclotides from Iranian *Viola tricolor* was performed and their antimicrobial effects were studied against several bacterial strains using diffusion assay. By the aim of our study extraction and purification of cyclotides were done by fractionation and solid phase extraction methods. Also, attendance of cyclotide in extract was verified by tricine-SDS page and spectroscopic studies. Examination of antimicrobial effects of partially purified cyclotides, also was performed by WDA method and was defined that *P.aeruginosa* is most susceptible bacteria.