



دانشگاه گوارز، منابع گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هفتم، شماره اول، ۱۳۹۹

۲۷۹-۲۸۸

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2020.16363.2486

همسان‌سازی و توالی‌یابی ژن *p-انسولین* جدا شده از گیاه دارویی *Momordica charantia* و تحلیل بیوانفورماتیکی ساختار سه‌بعدی پروتئین

مریم رحیمی^۱، * مجید عزیزی^۲، احد یامچی^۳ و مجید شهبازی^۴

^۱ دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،

^۲ استاد گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،

^۳ استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

^۴ استاد گروه پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: کارلا با نام علمی *Momordica charantia* از خانواده Cucurbitaceae می‌باشد. بذره‌های کارلا دارای پلی‌پپتیدی ضد دیابت به نام *p-انسولین* می‌باشد. مقدار *p-انسولین* بسته به بافت گیاه، رقم، محل کشت و فصل برداشت بسیار متغیر است و در مجموع مقدار آن نسبتاً پایین می‌باشد به طوری که این میزان برای تولید صنعتی داروها بر پایه این ترکیب کافی نیست. کلون کردن ژن *p-انسولین* و بیان هترولوگ آن در ریزجانداران، راه‌حلی سریع و مفید برای حل این مشکل است. بدین منظور در این پژوهش توالی ژن *p-انسولین* از گیاه کارلا از طریق RT-PCR شناسایی و سپس توالی‌یابی شد.

مواد و روش‌ها: به منظور استخراج RNA، در دو مرحله نارس و رسیده از فرابر، آریل بذر و بذر گیاه کارلا نمونه‌گیری انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از طریق دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل 1% TBE تعیین شد. سپس جهت کلونینگ ژن *p-انسولین*، RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *p-انسولین* انجام شد. سپس محصول RT-PCR ژن *p-انسولین*، از طریق ژل الکتروفورز خالص‌سازی و همسان‌سازی ژن *p-انسولین* در تی وکتور صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید نوترکیب و تایید حضور ژن *p-انسولین* در تی وکتور، پلاسمید نوترکیب تعیین توالی شد. در ادامه ساختار سه‌بعدی پروتئین *p-انسولین* از طریق شبیه‌سازی به کمک نرم‌افزار Phyre 2.0 (بررسی شد).

یافته‌ها: در نتایج به دست آمده از الکتروفورز RNA از بافت‌های مختلف کارلا، وجود دو باند مربوط به 28SrRNA و 18SrRNA نشان‌دهنده استخراج موفق RNA بود. نتایج RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *p-انسولین* باند اختصاصی ۷۵۰bp بیانگر تکثیر صحیح cDNA بود. هم‌چنین، بیان ژن *p-انسولین* در بافت آریل بذر رسیده بیش‌تر از سایر بافت‌های میوه بود. پس از خالص‌سازی باند مربوط به ژن *p-انسولین*، واکنش لیگاسیون ژن هدف در داخل تی وکتور و ترانسفورماسیون آن به داخل میزبان *E. coli* صورت گرفت که نتایج مثبت بیانگر انجام موفق کلونینگ بود. در ادامه تعیین توالی ژن *p-انسولین*، از گیاه دارویی کارلا برای اولین بار در ایران انجام شد. نتایج بیوانفورماتیک نشان داد که دومین‌های فعال منواکسیژناز متصل‌شونده به FDA در بخش N ترمینال و پرولیپوپروتئین دی‌آسیل گلیسرید ترانسفراز در C ترمینال پروتئین *p-انسولین* وجود دارد.

* مسئول مکاتبه: azizi@um.ac.ir

نتیجه‌گیری: بیان کم پروتئین *p*-انسولین در گیاه کارلا و وجود ترکیبات مداخله‌کننده مانند پلی‌ساکاریدها ممکن است باعث کاهش تأثیر ماده مؤثره کاهنده قند خون می‌شود. بنابراین، در این پژوهش ژن *p*-انسولین از گیاه کارلا کلون و تعیین توالی شد. تعیین توالی ژن *p*-انسولین امکان بیان هترولوگ آن در ریزجاندران و تولید فراوان و خالص پروتئین *p*-انسولین را به‌عنوان دارو فراهم خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، توالی‌یابی، دیابت، کلونینگ، *Momordica charantia*

مقدمه

دیابت یا بیماری قند یک اختلال سوخت‌وسازی (متابولیک) در بدن است. پیش‌بینی شده است که در سال ۲۰۲۵ حدود ۳۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به دیابت خواهند بود (۱). در این بیماری توانایی تولید هورمون انسولین در بدن از بین می‌رود و یا بدن در برابر انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد. نقش اصلی انسولین پایین آوردن قند خون توسط سازوکارهای مختلف است. داروهای شیمیایی تجویز شده به‌منظور کاهش قند خون دارای اثرات سوء بسیار زیادی هستند و تزریق روزانه انسولین نیز برای بیماران مبتلا به دیابت دردناک و خسته‌کننده خواهد بود بنابراین تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن راه‌حلی مطمئن‌تر و مؤثرتر در دست اقدام است (۲). استفاده از داروهای گیاهی در این زمینه بسیار مؤثر بوده و هزینه مالی کم‌تری نیز دارند (۳). یکی از این گیاهان دارویی کارلا با نام علمی *Momordica charantia* و نام عمومی خیار تلخ است که متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitacea) می‌باشد (۴). ارزش دارویی کارلا برای تنظیم و کنترل دیابت، موجب شده تا توجه پژوهشگران را به خود جلب نماید. امروزه کارلا به‌علت داشتن سه گروه از ترکیبات مؤثر بر تنظیم قند خون به‌صورت علمی مورد بررسی قرار می‌گیرد. این ترکیبات عبارتند از چارانتین (چارانتین)، آلکالوئیدهای (Vicine و Momordicine) و پلی‌پپتید

(*p*-انسولین) می‌باشد. چارانتین، ترکیب غیرنیتروزنه کاهنده قند خون است آمیخته‌ای از دو ترکیب stigmasterylglucoside و sitosterylglucoside که هر دو ساپونین‌های استروئیدی هستند. آلکالوئیدهای Vicine و Momordicine به‌ترتیب پریمیدین و عامل تلخی کارلا هستند (۵). *p*-انسولین یک پلی‌پپتید غیرسمی با وزن مولکولی حدود ۱۱۰۰۰ دالتون است. Khanna و همکاران (۱۹۸۱) از بذره‌های خربزه تلخ، پلی‌پپتیدی *p*-انسولین را به‌منظور بررسی خواص کاهندگی قند خون، خالص‌سازی کردند و مشاهده کردند که بر روی حیوانات مدل دیابتی اثراتی شبیه انسولین داشت (۶). غلظت *p*-انسولین در گیاه کارلا بسته به نوع بافت، رقم، محل کشت و فصل برداشت بسیار متغیر است ولی در کل مقدار آن در گیاه کم می‌باشد (۷). کم‌تر از ۱ میلی‌گرم انسولین گیاهی خالص از هر ۱۰ گرم بذر خشک کارلا به‌دست می‌آید (۸). با توجه به مقدار بسیار کم این پلی‌پپتید در گیاه و وجود پلی‌ساکاریدها که ممکن است باعث کاهش تأثیر مواد مؤثره کاهنده قند خون گردد شناسایی و تعیین توالی ژن مسئول سنتز *p*-انسولین در پژوهش‌های به‌نژادی آینده و نیز امکان‌سنجی بیان آن در ریزجاندران در راستای تولید تجاری و صنعتی داروهای نو ترکیب در اولویت می‌باشد.

تاکنون چندین ژن با خاصیت ضد سرطانی از گیاهان دارویی شناسایی و تعیین توالی شده است که کاربرد پزشکی دارند (۱۰ و ۱۱) اما در مورد شناسایی

پس از تیمار با DNaseI جهت سنتز cDNA با کیت سنتز cDNA (شرکت فرمتاز) با روش پیشنهادی شرکت انجام شد. ۱۰ نانوگرم از cDNA در واکنش PCR ۱۰ میکرولیتری با پرایمر p-insulinF: 5'-ATGGGCTGCGATGAAGC-3' به عنوان آغازگر جلورونده و p-insulinR: 5'-TCATCGGTGTCGACTATCG-3' به عنوان آغازگر برگشتی شامل ۲۰ پیکومول از هر پرایمر و ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq DNA پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر شرکت SensoQuest و طبق برنامه ۱' / ۷۲°C x ۱ + [۱' / ۷۲°C + ۱ x ۹۵°C / ۵' + ۱' / ۵۵°C + ۱' / ۹۴°C] x ۳۴ + ۱ x ۹۵°C / ۵' انجام شد. آغازگرهای اشاره شده، توسط نرم افزار Oligo7.0 (<https://www.oligo.net/>) طراحی شد. مهم ترین شاخص ها در طراحی آغازگر شامل درصد GC، عدم تشکیل پرایمر دایمر و دمای اتصال مناسب که در این پژوهش به ترتیب ۴۰ درصد، ۳- کیلوکالری در مول و ۵۵ درجه سانتی گراد بودند.

پ) کلونینگ ژن *p-insulin* در تی وکتور: محصول RT-PCR ژن *p-insulin* روی ژل آگارز TAE ۱ درصد (تریس ۱۰۰ میلی مولار، استات ۵۰ میلی مولار، EDTA ۱۰ میلی مولار) الکتروفورز و باند مورد نظر توسط کیت خالص سازی DNA (فرمتاز- Gel extraction kit KO692) از روی ژل خالص گردید. ۱۰۰ نانوگرم از محصول خالص شده PCR با ۵۰ نانوگرم از پلاسمید خطی تی وکتور در واکنش ۱۰ میکرولیتری لیگاسیون شامل ۲ یونیت آنزیم T4DNA لیگاز (فرمتاز) استفاده شد. واکنش لیگاسیون به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری با دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام گرفت. ۵ میکرولیتر واکنش لیگاسیون جهت ترانسفورماسیون به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *E. coli* سویه DH5 α به روش شوک حرارتی استفاده شد (۱۲).

ژن هایی با اثرات ضد دیابتی گزارشی وجود ندارد و پژوهش های انجام شده بر روی کارلا فقط به منظور خالص سازی پلی پپتید P و اثرات ضد دیابتی آن بوده است. بنابراین در این پژوهش هدف کلونینگ و تعیین توالی cDNA مرتبط با ژن *p-insulin* بود. در ادامه، نتایج این پژوهش می تواند منتج به بیان هترولوگ ژن *p-insulin* در میزبان مناسب جهت تولید پروتئین نوترکیب دارویی خالص با غلظت بالا و بدون اثرات جانبی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

الف- تهیه بذور و کشت گیاه کارلا: به دلیل این که کارلا گیاه دگرگشن می باشد و از بذر هیبرید آن به صورت تجاری استفاده می گردد، بنابراین در این پژوهش بذر هیبرید 2213 گیاه کارلا از شرکت بین المللی تولید بذر (ADVANTA-India) تهیه شد. بذرها در اواخر فروردین ۱۳۹۷ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در گلدان حاوی خاک، پیت ماس و کوکوپیت با نسبت های ۲:۱:۱ و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت شد. در زمان میوه دهی به منظور استخراج RNA، در دو مرحله رسیده و نارس از فرابری، آریل بذر و بذر نمونه گیری انجام شد. به دلیل حساسیت RNA به حرارت، نمونه ها به کمک ازت مایع فریز شده و به فریز ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد.

ب) استخراج RNA و RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *p-insulin*: صد میلی گرم نمونه از برگ و سه ناحیه فرابری، آریل بذر و بذر جهت استخراج RNA کل به کمک کیت P-Biozol (شرکت بایوفولوکس ژاپن) به روش پیشنهادی شرکت استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از طریق دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل 1% TBE تعیین شد. یک میکروگرم RNA

Phyre 2.0 و پایگاه داده دومین‌ها از PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) شناسایی شد. جهت شناسایی ساختار سه‌بعدی و دومین‌های پروتئین *p-انسولین* توالی اسید آمینه آن در نرم‌افزار Phyre 2.0 قرار داده و این نرم‌افزار به کمک پایگاه داده پروتئین (<https://www.rcsb.org/>) و بر اساس مدل (template-based modeling) (۱۴) ساختار سه‌بعدی پروتئین را پیش‌گویی می‌کند. سپس از پایگاه داده دومین‌ها (PROSITE) و بر اساس مشابهت توالی و ساختار سه‌بعدی (Protein folding) دومین‌های فعال پروتئین پیش‌گویی و شناسایی شد.

نتایج و بحث

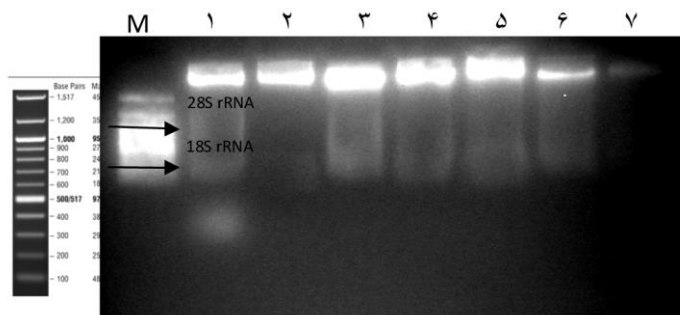
الف) استخراج RNA و تهیه cDNA و نتایج مربوط به PCR: به منظور بررسی بیان ژن *p-انسولین* در بافت‌های مختلف کارلا، استخراج RNA از برگ، بذر نارس، آریل بذر نارس، فرابر نارس، بذر رسیده، آریل بذر رسیده و فرابر رسیده انجام و روی ژل آگارز TBE یک درصد الکتروفورز گردید که دو باند مربوط به 28SrRNA و 18SrRNA نشان‌دهنده استخراج موفق RNA در شکل ۱ قابل مشاهده است.

ج) استخراج پلاسمید نوترکیب و تأیید ژن نوترکیب: ۱۰ کلونی ترانسفورم‌شده، هر کدام به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB (۱۰ gr/lit) عصاره مخمر، ۱۰ gr/lit NaCl، ۵ gr/lit پپتون) تلقیح گردید و در ادامه به روش آلکالین (۱۳) استخراج پلاسمید انجام گرفت. پلاسمید استخراج شده در ۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده حل شد.

جهت تأیید حضور ژن *p-انسولین* در تی وکتور، ۱۰ نانوگرم از پلاسمید نوترکیب در ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR حاوی ۱۰ پیکومول از یرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میکرومولار dNTP mix، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq DNA پلیمراز استفاده شد.

چ) تعیین توالی ژن *p-انسولین*: پس از تأیید حضور ژن *p-انسولین* در تی وکتور، پلاسمید نوترکیب به مقدار ۱ میکروگرم حل شده در ۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده به تیوپ ۰/۲ میکرولیتری اضافه و جهت تعیین توالی به شرکت بایونیر کره ارسال گردید. تعیین توالی بر اساس روش سانجر (۱۵) و به کمک نوکلئوتیدهای داکسی دوپل متصل به مواد فلورسانت و خاتمه‌دهنده واکنش همانندسازی انجام شد.

د) تحلیل بیوانفورماتیک: ساختار سه‌بعدی پروتئین *p-انسولین* و دومین‌های موجود در آن از طریق نرم‌افزار (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/)

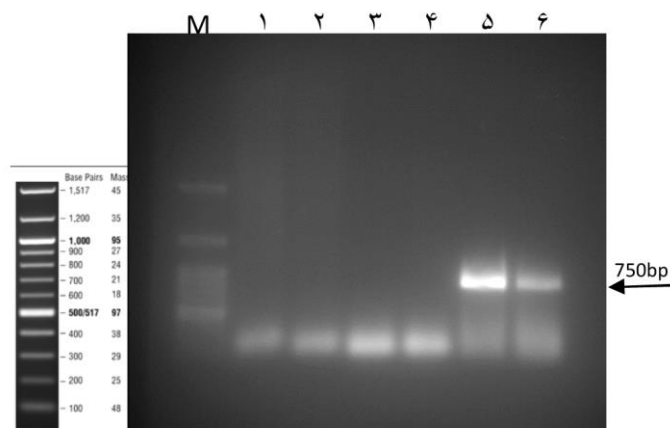


شکل ۱- استخراج RNA از بافت‌های گیاه کارلا: M- مارکر 100bp، ۱ الی ۷ به ترتیب مربوط به RNA استخراج شده از برگ، بذر نارس، آریل بذر نارس، فرابر نارس، بذر رسیده، آریل بذر رسیده، فرابر رسیده می‌باشد.

Fig. 1. Extraction of RNA from Karela tissues: M- marker 100bp, 1-7 wells respectively are RNA extracted from leaf, unripen seed, unripen aril, unripen pericarp, ripen seed, ripen aril, ripen pericarp.

رسیده بیش‌تر از سایر بافت‌ها بود زیرا واکنش RT-PCR فقط در این بافت جواب مثبت داشت (شکل ۲ چاهک‌های ۵ و ۶) که برای مقایسه میزان بیان این ژن در بافت‌های متفاوت نیاز به انجام واکنش q-RT-PCR می‌باشد.

به‌منظور تأیید تولید cDNA به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن *p-insulin* واکنش RT-PCR انجام گرفت که باند اختصاصی ۷۵۰bp بیانگر تولید صحیح cDNA بود (شکل ۲ چاهک‌های ۵ و ۶). نتایج نشان داد که بیان ژن *p-insulin* در بافت آریل بذر

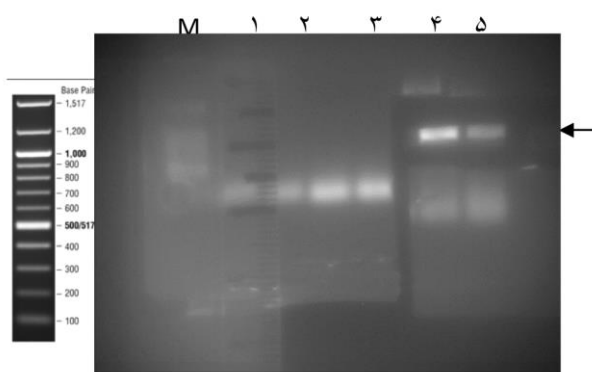


شکل ۲- محصول RT-PCR ژن *p-insulin* از بافت‌های متفاوت گیاه کارلا: M- مارکر ۱۰۰bp فرمنتاز؛ چاهک ۱ و ۲ واکنش‌های مربوط کنترل منفی در دو دمای اتصال ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۳ و ۴- واکنش‌های مربوط به بافت آریل بذر نارس در دو دمای اتصال ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۵ و ۶ چاهک‌های مرتبط با آریل بذر رسیده؛ به‌ترتیب در دمای اتصال ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 2. The RT-PCR production of *p-insulin* gene from different tissues of Karela: M- markaer 100 bp (Fermentas); well 1-2 negative control reaction at two 40 and 45-degree centigrade annealing temperature; well 3 and 4 unripen aril tissue reaction at two 40 and 45-degree centigrade annealing temperature; well 5 and 6 ripen aril tissue reaction at two 40 and 45-degree centigrade annealing temperature.

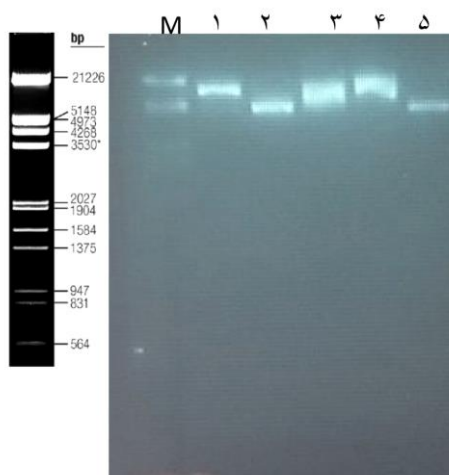
(چاهک‌های ۱، ۳ و ۴) به‌علت سنگین‌تر شدن بالاتر از وکتور خالی (چاهک‌های ۲ و ۵) در ژل الکتروفورز قرار گرفت. هم‌چنین PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *p-insulin* بر روی پلاسمیدهای استخراج‌شده از کلونی‌های ترانسفورم شده، باند اختصاصی تکثیر ژن *p-insulin* را در روی ژل آگارز ۱ TBE درصد نشان داد (شکل ۵).

(ب) همسان‌سازی ژن هدف در تی وکتور: پس از خالص‌سازی باند مربوط به تکثیر ژن *p-insulin* از روی ژل آگارز (شکل ۳)، واکنش لیگاسیون ژن هدف در داخل T/A کلونینگ وکتور و ترانسفورماسیون آن به داخل میزبان *E. coli* صورت گرفت که شکل ۴ نتیجه مثبت حاصل از انجام مراحل همسان‌سازی می‌باشد زیرا وکتور حاوی ژن *p-insulin*



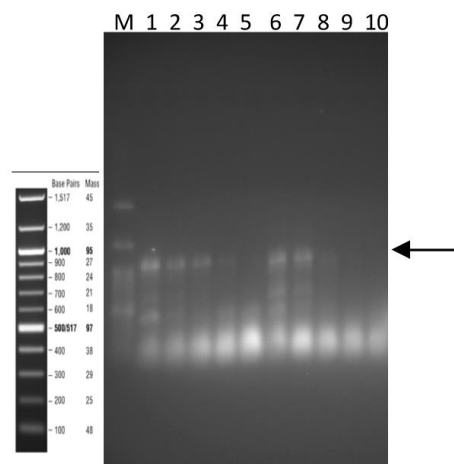
شکل ۳- چاهک ۴ و ۵ برش باند ۷۵۰bp مربوط به تکثیر ژن *p-insulin* از روی ژل آگارز.

Fig. 3. Well 4-5 the cutting of 750 bp band related to *p-insulin* gene from agarose gel.



شکل ۴- استخراج پلاسمید از کلونی‌های ترانسفورم شده *E. coli* حاوی ژن *p-insulin*. M- مارکر ۳ فرمنتاس، چاهک‌های ۱، ۳ و ۴ پلاسمیدهای تی وکتور حاوی ژن *p-insulin* و چاهک‌های ۲ و ۵- پلاسمید تی وکتور فاقد ژن *p-insulin*.

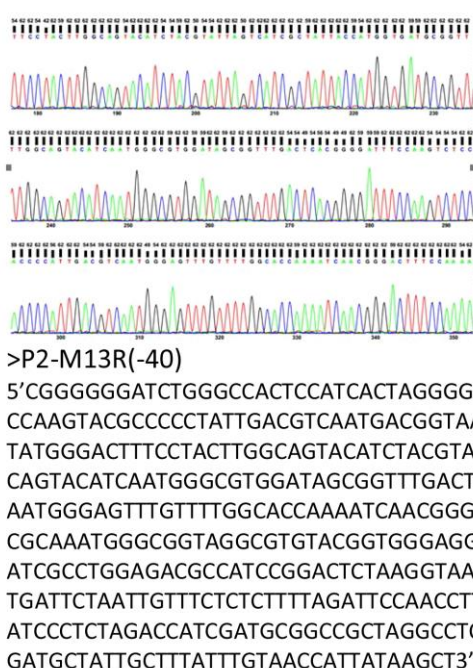
Fig. 4. Plasmid extraction from recombinant *E. coli* carrying *p-insulin* gene. M- marker 3-Fermentas; wells 1, 3 and 4 recombinant plasmids carrying *p-insulin* gene; wells 2 and 5 T-vector plasmid without gene.



شکل ۵- نتیجه PCR بر روی پلاسمید تی وکتور نو ترکیب حاوی ژن *p-insulin*.

Fig. 5. The PCR production of *p-insulin* gene was amplified from recombinant vector.

وضوح بالا در شکل ۶ نشان داده شده است. پیک‌های نشان داده شده با رنگ‌های قرمز، آبی، سبز و مشکی به ترتیب مربوط به بازهای آلی تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین می‌باشد. قابل ذکر که روش تعیین توالی بر اساس روش سانجر (۱۵) و به کمک نوکلئوتیدهای داکسی دوپل متصل به مواد فلورسانت و خاتمه‌دهنده واکنش همانندسازی انجام شد.



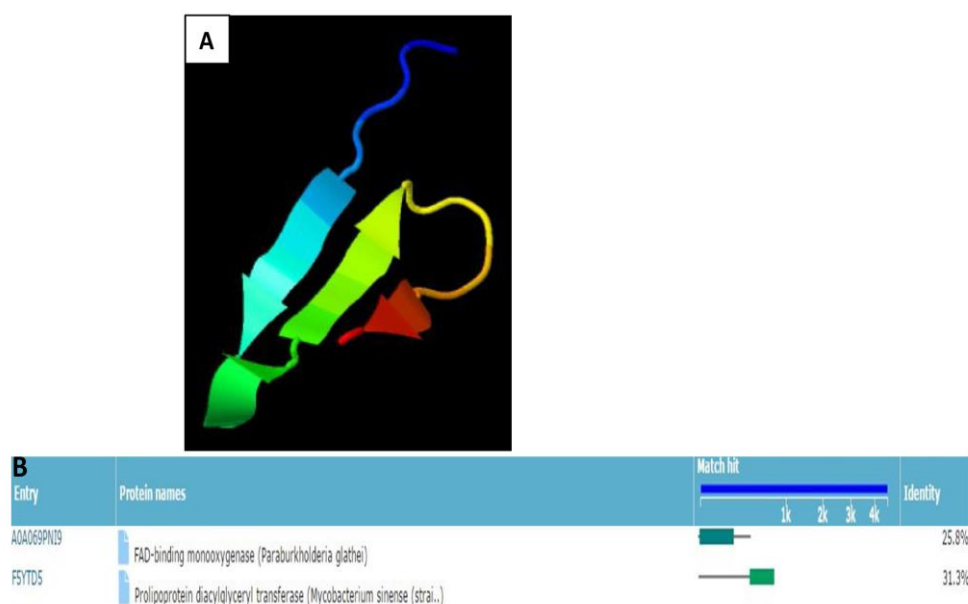
شکل ۶- نتیجه توالی‌یابی ژن *p-انسولین*: الکتروفروگرام ژن *p-انسولین* (شکل بالا)؛ توالی ژن *p-انسولین* (شکل پایین).

Fig. 6. Sequencing of *p-insulin* gene: electropherogram of *p-insulin* gene (up); the sequence of *p-insulin* gene (down).

مشابهت توالی و ساختار سه‌بعدی (Protein folding) دومین‌های فعال پروتئین پیش‌گویی و شناسایی شد. نتایج بیوانفورماتیک نشان داد که دومین‌های فعال منواکسیژناز متصل‌شونده به FDA را در بخش N ترمینال و پرولیپوپروتئین دی‌آسیل گلیسرول ترانسفراز را در C ترمینال پروتئین *p-انسولین* وجود دارد (شکل ۷b).

ج) تعیین توالی ژن *p-انسولین* جداشده از کارلا هیرید 2213: قطعه ۷۵۰bp مربوط به ژن *p-انسولین* پس از کلونینگ در پلاسمید تی وکتور به روش سانجر و همکاران (۱۹۷۷) از طریق کمپانی بایونیر (کشور کره) تعیین توالی شد که نتایج تعیین توالی برای نواحی ابتدایی ژن، وضوح بالایی نداشت بنابراین به‌وسیله نرم‌افزار chromas2 نواحی با وضوح کم حذف و از ناحیه ۳۰ تا ۶۹۰ نوکلئوتید از ژن با

د) تحلیل ساختار سه‌بعدی پروتئین *p-انسولین*: جهت شناسایی ساختار سه‌بعدی و دومین‌های پروتئین *p-انسولین* توالی اسید آمینه آن در نرم‌افزار Phyre 2.0 قرار داده و این نرم‌افزار به کمک پایگاه داده پروتئین (<https://www.rcsb.org/>) و بر اساس مدل (template-based modeling) (۱۴) ساختار سه‌بعدی پروتئین را پیش‌گویی می‌کند (شکل ۷a). سپس از پایگاه داده دومین‌ها (PROSITE) و بر اساس



شکل ۷- ساختار سه بعدی پروتئین *p-انسولین* (A) و دومین‌های شناسایی شده در ناحیه N و C ترمینال (B).
Fig. 7. 3D structure of *p- insulin* (up); Identified domains at C and N terminus of *p- insulin* protein (down).

رقم TGCB بیشترین مقدار پروتئین *p-انسولین* را در میوه داشت و ۱۲ رقم میزان متوسط و ۶ رقم از لحاظ آزمایش وسترن بلا تینگ منفی بود و پروتئین *p-انسولین* در میوه آن‌ها ردیابی نشد (۱۶). در پژوهش مورد نظر میزان پروتئین *p-انسولین* در بخش‌های مختلف گیاه و میوه بررسی نشده بود بنابراین در این پژوهش میزان بیان ژن در سطح mRNA در برگ و سه ناحیه فرابری، آریل بذر و بذر میوه در دو مرحله نارس (میوه سبز رنگ) و رسیده (میوه نارنجی رنگ) بررسی شد و نتایج نشان داد که ژن *p-انسولین* در برگ گیاه بیان نمی‌شود. هم‌چنین در بین بخش‌های مختلف میوه، بیان ژن در بافت پوشش آریل و در زمان رسیدگی میوه ردیابی شد. به دلیل بیان متفاوت ژن *p-انسولین* در بافت‌های مختلف می‌توان استنباط کرد که این ژن از نوع القایی است و بنابراین عامل یا عامل‌های رونویسی با غلظت متفاوت در بافت‌های مختلف گیاه باعث بیان متفاوت ژن *p-انسولین* در بافت‌های مختلف شده است. در تأیید این مطلب جعفری و دهقان نیری (۱۳۹۷) از

در دیابت سرعت و توانایی بدن در استفاده و سوخت‌وساز کامل گلوکز کاهش می‌یابد از این‌رو میزان قند خون افزایش می‌یابد هم‌چنین دیابت ارتباط تنگاتنگی با بیماری‌های قلبی- عروقی دارد. استفاده از گیاهان دارویی راه‌حلی مؤثر همراه با اثرات جانبی و هزینه کم‌تر می‌باشد.

یکی از گیاهان دارویی کاهنده قند خون کارلا است که حاوی ماده مؤثره پپتیدی به نام *p-انسولین* می‌باشد که مقدار آن بسته به بافت، رقم، محل کشت و فصل برداشت متغیر است ولی در کل مقدارش در گیاه کم است (۱۶). در پژوهش انجام شده از طریق تولید آنتی‌بادی پروتئین *p-انسولین* و آزمایش وسترن بلا تینگ نشان داده شد که مقدار پروتئین *p-انسولین* در میوه گیاه کارلا در ماه‌های گرم سال (تیر و مرداد) بیش‌تر بوده و با سرد شدن هوا در ماه‌های شهریور و مهر غلظت آن در میوه کاهش می‌یابد (۱۶). هم‌چنین در آن پژوهش، با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR، ۱۹ رقم کارلا در سه گروه طبقه‌بندی شد و آزمایش وسترن بلا تینگ نشان داد که

دی آسیل گلیسرل ترانسفراز در پروتئین *p-انسولین* شناسایی شد که افزایش فعالیت آن می‌تواند باعث کاهش مقاومت به انسولین در دیابتی‌های نوع II شود. برای اثبات این موضوع، نیاز به ایجاد موتاسیون در ژن *p-انسولین* برای دومین مربوطه و بیان هترولوگ و خالص پروتئین موتاسیون یافته و سپس تیمار آن بر روی حیوان دیابتی است.

تعیین توالی شامل تعیین توالی مستقیم محصول PCR و تعیین توالی ژن موردنظر از پلاسمید نو ترکیب (پلاسمید تی وکتور حاوی ژن هدف) می‌باشد. تعیین توالی مستقیم بر روی محصول PCR به دلیل وضوح پائین الکتروفورگرام در نواحی ابتدایی و انتهایی منتج به کوتاه شدن توالی می‌شود بنابراین در این پژوهش توالی محصول RT-PCR ژن *p-انسولین* ابتدا در تی وکتور کلون گردید.

نتیجه گیری

بیان کم پروتئین *p-انسولین* در گیاه کارلا وجود ناخالصی‌های پلی ساکاریدی باعث کاهش تأثیر ماده مؤثره کاهنده قند خون می‌شود. بنابراین در این پژوهش ژن *p-انسولین* از گیاه کارلا کلون و تعیین توالی شد. تعیین توالی ژن *p-انسولین* امکان بیان هترولوگ آن در ریزجانداران و تولید فراوان و خالص پروتئین *p-انسولین* را به‌عنوان دارو فراهم خواهد کرد.

گیاه دارویی تاکسول عامل رونویسی TbJAMYC را از طریق RT-PCR جداسازی و گزارش کردند که این عامل رونویسی یکی از عوامل افزایش تولید تاکسول می‌باشد (۱۷). همچنین عامل رونویسی دیگری به نام TeJAMYC از گیاه *Taxus cuspidate* شناسایی شده است که مسئول تحریک پروموتور ژن دخیل در سنتز تاکسول می‌باشد (۱۸). بنابراین به احتمال زیاد افزایش بیان ژن *p-انسولین* در بافت پوشش آریل رسیده کارلا مرتبط با افزایش بیان عامل رونویسی کنترل‌کننده این ژن باشد که برای تأیید آن نیاز به پژوهش‌های بیش‌تری می‌باشد.

نتایج بیوانفورماتیک وجود دومین پرولپوپروتئین دی آسیل گلیسرل ترانسفراز را در C ترمینال پروتئین *p-انسولین* شناسایی کرد که پژوهشگران قبلی نیز نشان دادند این دومین در بیماری دیابت نقش دارد (۱۹). در پژوهش مذکور، تیمار موش‌ها با روغن ماهی که غنی از اسید چرب غیراشباع (n-3) با سه پیوند دوگانه است باعث کاهش چربی‌های تری‌گلیسرید، فسفولیپید و استرهای کلسترول ولی افزایش قند خون در حیوان و در نتیجه باعث کاهش وزن حیوان شد. در ادامه مشخص شد که اسید چرب غیراشباع از طریق کاهش تولید آپولپوپروتئین B-48 باعث کاهش فعالیت آنزیم دی آسیل گلیسرل ترانسفراز در حیوان می‌گردد و از این طریق باعث مقاومت حیوان به هورمون انسولین و دیابتی شدن حیوان می‌شود (۱۹). در این پژوهش، از طریق بیوانفورماتیک دومین

منابع

1. King, H., Aubert, R. and Herman, W. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections. *Diab. Care*. 21: 1414-1431.
2. Tolman, K.G. and Chandramouli, J. 2003. Hepatotoxicity of the thiazolidinediones. *Clin. Liver. Dis*. 7: 369-379.
3. Venkatesh, S., Reddy, G.D., Reddy, B.M., Ramesh, M. and Rao, A.V. 2003. Antihyperglycemic activity of *Caralluma attenuata*. *Fitoterapia*. 74: 274-279.
4. Grover, J.K. and Yadav, S.P. 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review". *J. Ethnophar*. 93: 123-132.

5. Paul, A. and Raychaudhuri, S.S. 2010. Medicinal uses and molecular identification of two *Momordica charantia* varieties-a review Elec. J. Biol. 6: 43-51.
6. Khanna, P., Jain, S.C., Panagariya, A. and Dixit, V.P. 1981. Hypoglycemic activity of polypeptide-P from a plant source. J. Nat. Prod. 44: 648-655.
7. Wang, B.L., Zhang, W.J., Zhao, J., Wang, F.J., Fan, L.Q., Wu, Y.X. and Hu, Z.B. 2011. Gene cloning and expression of a novel hypoglycaemic peptid from *Momordica charantia*. J. Sci. Food. Agri. 91: 2443-2448.
8. Fu, Z.P., Liu, H.Y., Lu, L., Chen, Z.J., Zhou, J.Y. and Wang, F.J. 2009. Protection of protease inhibitor of *Momordica charantia* on activity of hypoglycemic peptides from *M. charantia*. Chin. Tradit. Herbal. Drugs. 40: 1259-1262.
9. Grover, J.K., Yadav, S. and Vats, V. 2002. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. J. Ethnopharmacol. 81: 81-100.
10. Croteau, R., Ketchum, R.E.B., Long, R.M., Kaspera, R. and Wildung, M.R. 2006. Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochem. Rev. 5: 75-97.
11. Jung, W., Yu, O., Lau, S.M.C., O'Keefe, D.P., Odell, J., Fader, G. and McGonigle, B. 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nat. Biotechnol. 18: 208-212.
12. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
13. Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition, Cold spring harbor, New York.
14. Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. and Sternberg, M.J.E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature Prot. 10: 845-858.
15. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5467.
16. Tian, M., Zeng, X.Q., Song, H.L., Hu, S.X., Wang, F.J., Zhaob, J. and Hu, Z.B. 2015. Molecular diversity and hypoglycemic polypeptide-P content of *Momordica charantia* in different accessions and different seasons. J. Sci. Food. Agri. 95: 1328-1335.
17. Jafari, D. and Dehgan-Nayeri, F. 2018. Isolation and bioinformatics study of TbJAMYC transcription factor involved in biosynthesis of Taxol from Iranian yew. Iranian J. Ran. Fores. Plant. Breed. Gen. Res. 26: 12-22.
18. Nims, E., Vongpaseuth, K., Roberts, S.C. and Walker, E.L. 2015. TcJAMYC: A bHLH transcription factor that activates paclitaxel biosynthetic pathway genes in yew. J. Biol. Chem. 14: 290.
19. Levy, E., Spahis, S., Ziv, E., Marette, A., Elchebly, M., Lambert, M., and Delvin, E. 2006. Overproduction of intestinal lipoprotein containing apolipoprotein B-48 in *Psammomys obesus*: impact of dietary n-3 fatty acids. Diabetol. 49: 1937-45.