

تجزیه و تحلیل پروتئوم پیازچه در گونه‌های *Allium stipitatum* و *A. scabriscapum* ایرانی برای شناسایی پروتئین‌های با بیان متفاوت

مهسا اسدی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}، محمدرضا نقوی^۳ و احمد اسماعیلی^۴

۱- دانش آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان

پست الکترونیک: nazarian.f@lu.ac.ir

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۴- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

چکیده

جنس *Allium* شامل بیش از ۹۲۰ گونه در سراسر جهان است. ایران زیستگاه اصلی بسیاری از گونه‌های وحشی *Allium* می‌باشد. در این مطالعه از بافت پیازچه دو گونه *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* از دو زیرجنس *Melanocrommyum* و *Reticulotubulosa* با هدف ارزیابی و شناسایی الگوی بیانی پروتئین‌های ذخیره‌ای حاصل از روش SDS-PAGE استفاده شد. برای شناسایی لکه‌های پروتئینی و مشاهده تغییرات بیانی دو گونه از الکتروفورز ژل دوبعدی و طیف‌سنجی جرمی MALDI TOF/TOF استفاده گردید. آنالیز ژل‌های حاصل از الکتروفورز دوبعدی منجر به شناسایی ۱۳۸ لکه پروتئینی شد. نتایج حاصل بیانگر شباهت اندک میان ژل‌ها و الگوی بیانی متفاوت در بین نمونه‌ها بود که بر این اساس تعداد کمی لکه مشابه در هر دو ژل حاصل شد. نتایج نشان داد در پروفایل بیانی پروتئین‌های بافت پیازچه این نمونه‌ها تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت که با استفاده از آزمون T تعداد ۹ لکه پروتئینی دارای بیشترین تغییرات معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ شناسایی شدند و از بین آنها ۳ لکه متفاوت با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی برای شناسایی انتخاب شد. نتایج آزمایش طیف‌سنجی جرمی و تطبیق داده‌های حاصل با پایگاه داده‌های NCBI و Uniprot و ابزارهای بیوانفورماتیکی مشخص کرد که لکه‌های مورد آزمایش با پروتئین‌های Maturase k، Agmatine و coumaroyltransferase-1 و یک پروتئین با عملکرد نامشخص بنام Hypothetical Protein مطابقت داشت. یافته‌های این مطالعه نشان داد با توجه به اینکه نمونه‌های متعلق به دو گونه *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* از یک جنس هستند اما الگوی بیانی پروتئین‌های ذخیره‌ای آنها در بافت پیازچه بسیار متفاوت از یکدیگر است.

واژه‌های کلیدی: آلیم، آنالیز طیف‌سنجی جرمی، بیان ژن، بیوانفورماتیک

مقدمه

داروسازی هستند، همچنین نقش مهمی در سبب غذایی انسان دارند. این گونه‌ها سرشار از ترکیباتی مانند ارگانوسولفورها و فلاونوئیدها هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی،

گونه‌های جنس *Allium* به دلیل تولید ترکیبات منحصر به فرد دارویی ارزشمند، قرن‌ها است که مورد مصرف صنایع

ارائه می‌دهد، به گونه‌ای که پروفایل پروتئین بذریک ابزار قدرتمند برای دستیابی به درک واضح از سیستماتیک مولکولی و همچنین شناسایی صحیح ژنوتیپ‌هاست (Rabani et al., 2001). تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان داد که روش SDS-PAGE یک ابزار قدرتمند و کاربردی برای تمایز دو گونه *Vigna radiata* و *Vigna mungo* است (Ghafoor et al., 2002). بنابراین انتظار می‌رود توانایی طیف‌سنجی جرمی در شناسایی دقیق هزاران پروتئین از نمونه‌های پیچیده، منجر به پیشرفت علوم زیست‌شناسی و پزشکی شود (Aebersold and Mann 2003). مطالعه‌ای دقیق بر منابع علمی نشان می‌دهد که اطلاعات زیادی تاکنون در مورد تفاوت پروفایل الگوی بیانی پروتئین‌های ذخیره‌ای در گونه‌های وحشی خانواده *Liliaceae* در دسترس نیست، بنابراین با توجه به اهمیت گونه‌های وحشی جنس *Allium* انتظار می‌رود تا با بررسی پروفایل پروتئومیکس این گونه‌ها بتوان به ماهیت تفاوت‌ها و شباهت‌های آنها در الگوی بیانی پی برد و گامی برای شناسایی پروتئین‌ها و ترکیبات تشکیل دهنده آنها برداشت. با توجه به پلی‌مورفیسم بالای پروتئین‌های ذخیره‌ای و پایداری این پروتئین‌ها، عوامل محیطی (هرچند که عوامل محیطی بر مقدار پروتئین‌های ذخیره‌ای در اندام بذریک پیازچه تأثیر دارند) تأثیر کمی بر روی مقدار پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذریک پیازچه گیاهان می‌گذارند (Farshadfar, 2004). در مطالعه‌ای که بر روی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای انجام شد، به دلیل ماهیت چندزنی موجود در پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت ذخیره‌ای گونه‌های گیاهی از این روش می‌توان برای شناسایی گونه‌های گیاهی استفاده کرد (Moradipour et al., 2012). بیوسنتز ترکیبات دارویی و متابولیت‌های گیاهی، در مسیرهای بیوسنتزی مختلف و با همکاری تعداد زیادی پروتئین و آنزیم انجام می‌شود. میزان بیان، محل بیان و زمان و کیفیت بیان پروتئین‌های مختلف درگیر در بیوسنتز یک ترکیب شیمیایی خاص در گیاهان، نه تنها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار می‌گیرند، بلکه عوامل محیطی نیز در تغییر پروفایل بیان این پروتئین‌ها تأثیر

ضد التهابی و ضد سرطان‌زایی قوی دارند (Ahiabor et al., 2001; Krogh et al., 2016). جنس *Allium* با بیش از ۹۲۰ گونه شناخته شده در سراسر جهان (Seregin et al., 2015)، یکی از جنس‌های متنوع، مهم و اقتصادی در تجارت جهانی است. تولید ترکیبات بسیار مهم مانند آلیسین (Allicin)، تیوسولفینات‌ها (Thiosulfonates) و مشتقات آنها سبب شده است تا مطالعه روی گیاهان زراعی خانواده *Liliaceae* به سمت مطالعه خویشاوندان وحشی آنها سوق پیدا کند تا شاید بتوان از ظرفیت این گونه‌ها برای به‌نژادی گیاهان مهم زراعی خانواده *Liliaceae* استفاده کرد (Kyung, 2012). برخلاف پیشرفت‌های فراوان حاصل از مطالعات ژنتیکی گیاهان زراعی و دارویی مهم دیگر، مطالعات ژنتیکی و به‌نژادی در مورد گیاهان جنس *Allium* به دلایلی مانند (۱) ژنوم‌های بزرگ، (۲) پیچیدگی ژنوم به دلیل وجود توالی‌های تکراری فراوان، (۳) هتروزیگوسیتی بالا و (۴) پسروی‌های حاصل از اینبردینگ با مشکلاتی فراوانی همراه است؛ به گونه‌ای که هنوز توالی ژنوم هیچ‌یک از گیاهان پیاز، سیر، موسیر و تره‌فرنگی به‌طور کامل در دسترس محققان قرار ندارد (Barboza et al., 2018).

البته، از دهه ۱۹۶۰ میلادی از پروفایل پروتئین کل اندام‌های ذخیره‌ای مانند دانه برای مطالعات طبقه‌بندی و تکاملی در گیاهان استفاده شده است (Ladizinsky and Hymowitz, 1979). با استفاده از روش‌های مولکولی، تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی بسیاری از گونه‌ها و جنس‌ها، از جمله گونه *Opuntia ficus-indica* از تیره کاکتوسان (Samah et al., 2015)، نخود شنی با نام علمی *Crotalaria L* (Raj et al., 2011)، گونه فلفل آنوم با نام علمی *Capsium L* از تیره بادنجانیان (Kumar and Tata, 2010)، جنس خلر *Lathyrus L* (Emre et al., 2010) و جو با نام علمی *Hordeum vulgare L* (El Rabey et al., 2014) بررسی شده است. برای نمونه، بررسی پروفایل پروتئین کل بذریک گونه از جنس بادنجانیان بوسیله روش SDS-PAGE نشان داد که اطلاعات مفیدی برای شناسایی گونه‌ها، روابط گونه‌ها و وضعیت طبقه‌بندی آنها

فراوانی دارند (Mujib et al., 2012).

تاکنون مطالعات پروتئومی محدودی در گیاهان جنس *Allium* انجام شده است. بیشتر مطالعات انجام شده پیرامون چگونگی واکنش به تنش‌های زنده و غیر زنده (Sfaxi et al., 2012; Karasinski et al., 2017; Qin et al., 2016; Chen et al., 2013; Dufoo-Hurtado et al., 2015) بوده‌اند. در مطالعه‌ای از روش طیف‌سنجی، الکتروفورز تک بعدی و 2D برای شناسایی و تعیین کمی ترکیبات موجود در پیازچه *Allium cepa* استفاده شد. در این مطالعه، وزن مولکولی سه ساکارید اصلی (Suc, Fru, Glc)، ۱۷ آمینواسید و پنج اسید آلی برای بافت پیاز بررسی شد. به طور کلی، این مطالعه تأیید کرد که یکی از مزایای بزرگ طیف‌سنجی جرمی تشخیص همزمان و مستقیم همه ترکیبات با وزن مولکولی پایین است (Tardieu et al., 2010). در تحقیقی که توسط Zolfaghari و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد، تجزیه و تحلیل شیمیایی بر روی *Allium atroviolaceum* با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی جرمی منجر به جداسازی ترکیب ساپونین جدیدی به نام آتروویولازین شد، این ترکیب نقش مؤثری در درمان اسپاسم‌های عصبی دارد. همچنین مطالعه‌ای توسط Klozov و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. در این پژوهش پروتئین‌های ذخیره‌ای تعدادی از گونه‌های متعلق به زیرجنس‌های مختلف از جنس *Allium* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تفاوت‌هایی در الگوی بیانی پروتئین‌های ذخیره‌ای متعلق به زیرجنس‌های مختلف وجود دارد. البته، تاکنون در گونه‌های وحشی از جنس *Allium* مطالعات بسیار اندکی در زمینه بررسی و مشاهده الگوی بیانی پروتئین‌ها انجام شده است. از آنجا که بروز و عملکرد یک ژن با بیان و تولید محصولات پروتئینی آن همراه است وجود پلی‌مورفیسم در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای پیازچه و بذر گیاهان می‌تواند حکایت از میزان شباهت‌ها و اختلافات ژنتیکی موجود در بین گونه‌های گیاهی و معیار مناسبی برای مقایسه جمعیت‌های گیاهی باشد (Yousefzadeh et al., 2012).

از این رو، هدف از این مطالعه مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های الگوی بیانی پروتئین‌های ذخیره‌ای در بین دو گونه از جنس *Allium* و شناسایی برخی از پروتئین‌های آنها با روش‌های مبتنی بر پروتئومیکس است. با توجه به موفقیت‌های اخیر، نقش پروتئومیکس مبتنی بر طیف‌سنجی جرمی و الکتروفورز 2D، انتظار می‌رود به‌عنوان ابزاری ضروری برای زیست‌شناسی سلولی-مولکولی و زمینه‌های در حال ظهور سیستم بیولوژی باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشی با هدف بررسی تغییرات الگوی الکتروفورزی در بافت پیازچه دو گونه *Allium tipitatum* و *Allium scabriscapum* انجام شد. پیازچه‌ها در مزرعه بانک گیاهی مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی البرز کشت و آبیاری هر ۱۰ روز یکبار به‌طور یکسان انجام گردید. پس از سبز شدن گیاهان و رشد کافی تا مرحله حدود ۳-۴ برگ، از هرگونه سه نمونه از اندام پیازچه به صورت تصادفی انتخاب و برداشت شد.

استخراج پروتئین‌ها و انجام SDS-PAGE

استخراج پروتئین‌های دو گونه به روش Laemmli (۱۹۷۰) با اندکی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌ها در حضور ازت مایع در هاون پودر شدند. از هر یک از نمونه‌ها ۰/۳ گرم به یک سی‌سی بافر استخراج (5mM 2mM PMSF, DTT, 100 mM Tris, pH: 6.8) به همراه ۵۰ میلی‌گرم کوماسی برلیانت بلو در ۷۲/۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۶۰ میلی‌لیتر گلیسرول اضافه شد. سپس نمونه‌ها در سانتریفوژ یخچال‌دار با ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در مدت زمان یک ساعت ۴ مرتبه و هر بار در مدت زمان ۲ دقیقه ورتکس شدند. قبل از انجام آخرین ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. قبل از تزریق نمونه‌ها در چاهک، عمل یکسان‌سازی نمونه‌ها انجام شد و میزان ۱۵ میکرولیتر

از هر نمونه در داخل هر چاهک ریخته شد. سپس نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ الکتروفورز شدند. ژل پلی‌اکریل‌آمید شامل ژل تحتانی ۱۰٪ و ژل فوقانی ۵٪ (شرکت Bio Rad) بود. الکتروفورز در جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر به مدت ۵ ساعت انجام شد. پس از خارج کردن ژل از دستگاه، رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی بلو به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر انجام گردید. وزن مولکولی باندهای پروتئینی حاصل از استخراج پروتئین‌ها توسط سائز مارکر (شرکت Fermentsz) محاسبه شد (شکل ۱). در مرحله بعد با روش الکتروفورز دوبعدی و طیف‌سنجی جرمی نمونه‌ها ارزیابی شدند.

استخراج پروتئین‌ها از بافت گیاه به روش TCA/Acetone ابتدا با استفاده از روش Görg و همکاران (۲۰۰۰) مقدار یک گرم از بافت پیازچه هر گونه در حضور ازت مایع پودر شد و پودر حاصل به میکروتیوب‌ها منتقل گردید. سپس با اضافه کردن محلول TCA/Acetone ۱۰ درصد (w/v) سرد همراه با بتامرکاپتواتانول یا DTT (۰/۰۷ درصد) به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس انجام و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شد و رسوب‌های حاصل با یک سی‌سی استون سرد حاوی بتامرکاپتواتانول (۰/۰۷ درصد) یا DTT شستشو داده شدند و دوباره برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. این مرحله سه تا چهار بار تکرار شد. سپس رسوب خشک شده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر جداسازی (اوره ۸ مولار-تیواوره ۲ مولار- تریس اسیدکلریدریک ۲۰ میلی مولار با pH: ۷/۵، CHAPS ۲٪ و PMSF ۱ میلی مولار به کمک ورتکس حل شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد مایع رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای سنجش کمی پروتئین‌ها و

مطالعه پروتئومی از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش کمی پروتئین‌ها

برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. برای تهیه محلول سنجش، یک حجم از محلول استوک رنگ، با ۴ حجم آب مقطر رقیق شده برای آزمون استفاده شد. محلول ذکر شده به صورت تازه تهیه شد. برای تهیه محلول استوک رنگ، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم پودر Coomassie Brilliant Blue G-250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵٪ (H₃PO₄) اضافه گردید. پس از مخلوط شدن، حجم نهایی آن توسط آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل، محلول ۵ برابر سنجش برادفورد بوده و پس از عبور از کاغذ صافی در ظرفی تیره رنگ در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این آزمایش از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد (غلظت ۱g/μl). برای ترسیم منحنی استاندارد با توجه به رابطه C1V1=C2V2 محلول غلظت‌های مختلف هریک از استانداردها تهیه شد. محلول BSA برای به دست آوردن غلظت پروتئین در عصاره نمونه‌های کنترل و تیمار، ۲۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت مجهول به ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد افزوده و بعد از ۵ دقیقه میزان جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر analytikjena (مدل SPECORD200) قرائت شد. منحنی استاندارد (روش رگرسیون) ترسیم شد و غلظت نمونه‌ها براساس میکروگرم بر میکرولیتر محاسبه گردید.

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول از ژل‌های نواری IPG دارای طول ۷ سانتی‌متر با دامنه pH در محدوده بین ۴ تا ۷ استفاده شد. برای شروع الکتروفورز دوبعدی بازآبدهی ژل‌های نواری خشک انجام شد. در این مطالعه ۱۲۵ میکرولیتر پروتئین وارد ژل‌های نواری شد. برای انجام بازآبدهی، ابتدا سینی آن را با آب

Amersham GE Healthcare Ettan IPGphor 3 انجام گردید. در این مرحله برای ژل‌های نواری، طی مراحل نشان داده شده در جدول (۲) برنامه‌ای برای دستگاه تعریف شد و براساس آن الکتروفورز بعد اول انجام شد. سینی مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. سپس روی ژل‌ها با ۸ میلی-لیتر Mineral oil به‌طور کامل پوشانده شد. ژل‌ها به‌ترتیب در دستگاه مخصوص Run کردن ژل‌ها (IPGphor) قرار گرفتند. پس از تکمیل بعد اول، ژل‌ها برای انجام بعد دوم آماده شدند (O'Farrell, 1975).

دیونیزه به خوبی شسته و در محل مناسبی تراز شد. با توجه به غلظت نمونه، پروتئین مورد نیاز در تیوب ریخته شد و بعد با محلول بازآبدی (جدول ۱) به حجم ۱۲۵ میکرولیتر رسانده شد. آمفولیت یا بافر IPG و DTT بلافاصله قبل از استفاده به محلول استوک بازآبدی اضافه شد. مخلوط آماده شده داخل شیار موجود در سینی بازآبدی پیپت و دقت لازم برای پرهیز از ایجاد حباب زیر ژل اعمال شد (O'Farrell, 1975).

آبگیری به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از تکمیل این مرحله، الکتروفورز بعد اول انجام شد. ایزوالکتروفوکوسینگ با استفاده از دستگاه

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده بافر مورد استفاده در الکتروفورز دوبعدی

Table 1- Components of recombination buffer used for two-dimensional electrophoresis

ماده شیمیایی chemical	غلظت Density
Urea	8 Molar
Thiourea	2 Molar
DTT	50 Molar
CHAPS	4 % (W/V)
pH ampholyte (3-10)	0.2 %
Bromophenol blue	0/001 %

جدول ۲- برنامه اعمال ولتاژ و زمان انجام الکتروفوکوسینگ برای الکتروفورز بعد اول

Table 2- Voltage programming and time spent for electrofocusing during electrophoresis of the first dimension

مراحل Steps	ولتاژ (ولت) Voltage (volts)	زمان Time	توان (وات) Power (watts)	جریان الکتریکی (میلی‌آمپر) Electric current (mA)
Step	300	30 minute	5	2
Gradient	1000	30 minute	5	2
Step	1000	1 hour	5	2
Gradient	5000	14 hour	5	2
Step	5000	3 hour	5	2

همچنین یک چاهک برای لود کردن مارکر وزن مولکولی توسط یک فاصله‌انداز ایجاد شد و مارکر وزن مولکولی (Sinaclon PR901641) که به‌صورت آماده خریداری شده بود به میزان ۴ میکرولیتر در یکی از چاهک‌ها ریخته شد. پس از آماده شدن ژل بعد دوم، ژل بعد اول در دو مرحله در

الکتروفورز در بعد دوم

برای انجام بعد دوم از تانک الکتروفورز عمودی Bio-Rad استفاده شد. کاست ژل را بسته و از ژل اکریلامید با غلظت ۱۰٪ ژل جداکننده استفاده شد (جدول ۳). پس از ریختن ژل، سطح آن با آب پوشانده شد تا صاف گردد.

حاوی یدواستامید 5 درصد (W/V) به جای DTT بود، به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر انجام شد. پس از تکمیل مرحله متعادل سازی، آب روی ژل خالی و با بافر الکتروود شستشو داده شد. نوارهای ژل که در بافر متعادل کننده به تعادل رسیده بودند، ابتدا داخل آب دیونیزه فرو برده شده و بعد آب اضافی آن گرفته شد. نوار ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) با پنس به نحوی بر روی ژل متراکم کننده قرار داده شد که بین آن و ژل متراکم کننده حباب هوا تشکیل نشود و تماس کامل بین دو ژل ایجاد شود (O'Farrell, 1975).

محلول متعادل کننده قرار داده شد. قبل از آن برای حذف روغن معدنی از روی سطح ژل، نوارهای ژل داخل آب دیونیزه فرو برده شد و بعد آب اضافی آن گرفته شد. در مرحله اول متعادل سازی، ژل نواری به طوری که سمت ژل رو به پائین باشد در سینی مخصوص به مدت 20 دقیقه در محلول حاوی بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۸/۸، SDS ۴ درصد (W/V)، اوره ۶ مولار، DTT یک درصد (W/V)، گلیسرول ۳۰ درصد (W/V) و برموفنل بلو ۰/۰۰۲ درصد قرار داده شد و بر روی شیکر قرار گرفت. مرحله دوم متعادل سازی به مدت 20 دقیقه دیگر در همان محلول که

جدول ۳- اجزای به کاررفته در حجم مورد نیاز برای ساخت ژل بعد دوم

Table 3- Components used in the required volume to make the second dimension gel

اجزای ژل	ژل جداکننده ۸-۱۰٪ (میلی لیتر)
Gel components	Separating gel 8-10% (mL)
Deionized water	3
Acrylamide solution (30%)	7.2
Tris 8/8 pH	2
Ammonium persulfate (10%)	0.08
SDS(10%)	0.08
TEMED	0.0032

Imagr Master 2D Plantinum of Melanie 6.0 (Gene Switzerland) برای شناسایی کمی و کیفی لکه های پروتئینی استفاده شد. پس از جفت شدن لکه ها و ژل های مربوط به تکرارهای مختلف، اختلاف درصد حجمی (Vol%) لکه های پروتئینی با استفاده از آزمون t-استیودنت آنالیز و لکه هایی که بیان آنها تغییر یافت و در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری داشتند به عنوان لکه های کاندید انتخاب شدند.

هضم پروتئین ها و طیف سنجی جرمی

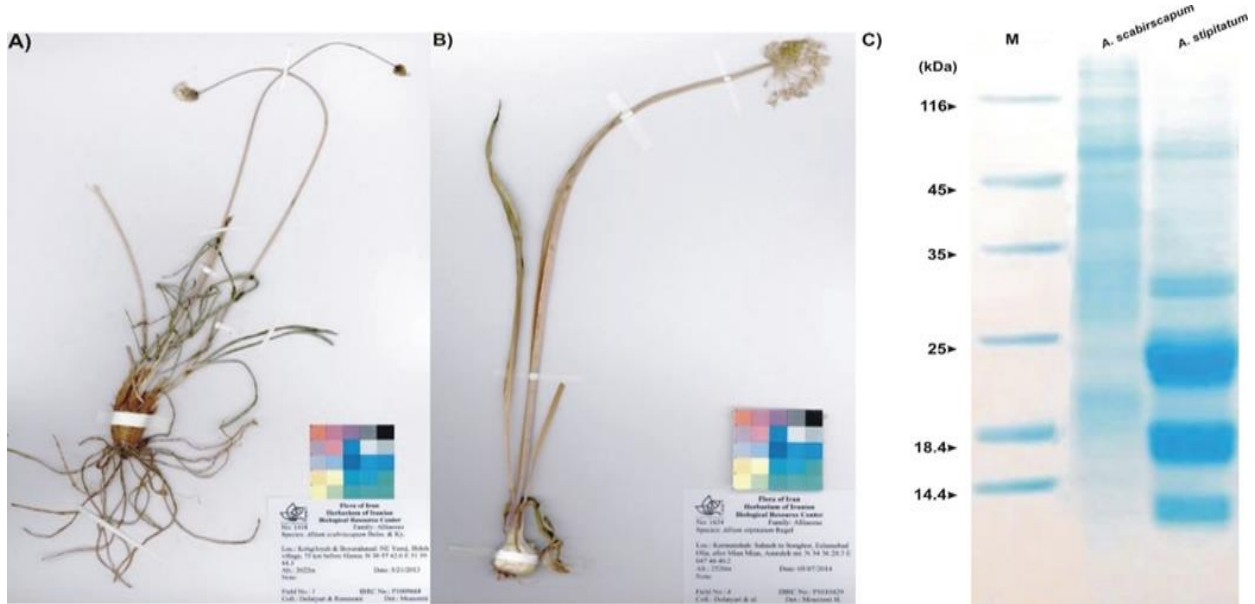
برای شناسایی پروتئین ها توسط آنالیز طیف سنجی جرمی، تعداد ۳ لکه به شماره های ۳۷۴، ۳۵۹ و ۳۷۰ از گونه های *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* در ۲ تکرار در ژل ها شناسایی و پس از جداسازی لکه های انتخابی از ژل رنگ آمیزی شده به آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی منتقل گردید، لکه ها ۳ مرتبه با آب خالص شستشو

پس از قرار دادن نوار ژل روی سطح ژل بعد دوم، روی آن با آگارز رنگی مذاب ۰/۵ درصد که حاوی ۰/۰۰۲ درصد از پودر برموفنل بلو بود، پوشانده و نوار IEF بالای ژل متراکم کننده ثابت شد. پس از برقراری جریان، الکتروفورز در ولتاژ ثابت 80 ولت انجام گردید. ژل ها با کوماسی بلو R250 رنگ آمیزی شدند. به این ترتیب ژل ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ قرار گرفتند تا رنگ زمینه کاملا سفید گردد و لکه های پروتئینی نمایان شود (Rabbani et al., 2001).

پس از آماده سازی، اسکن ژل ها با دستگاه Image Scanner III ساخت شرکت فارماسیا با فرمت Tiff اسکن و ذخیره سازی شد و مقایسه بین پروتئین های بیانی در دو گونه *Allium* انجام شد. برای بررسی تغییرات کمی بیان لکه های پروتئینی از مقدار درصد حجمی هر لکه پروتئینی استفاده و برای شناسایی اختلاف بین لکه های حاصل از آزمون t-استیودنت در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار

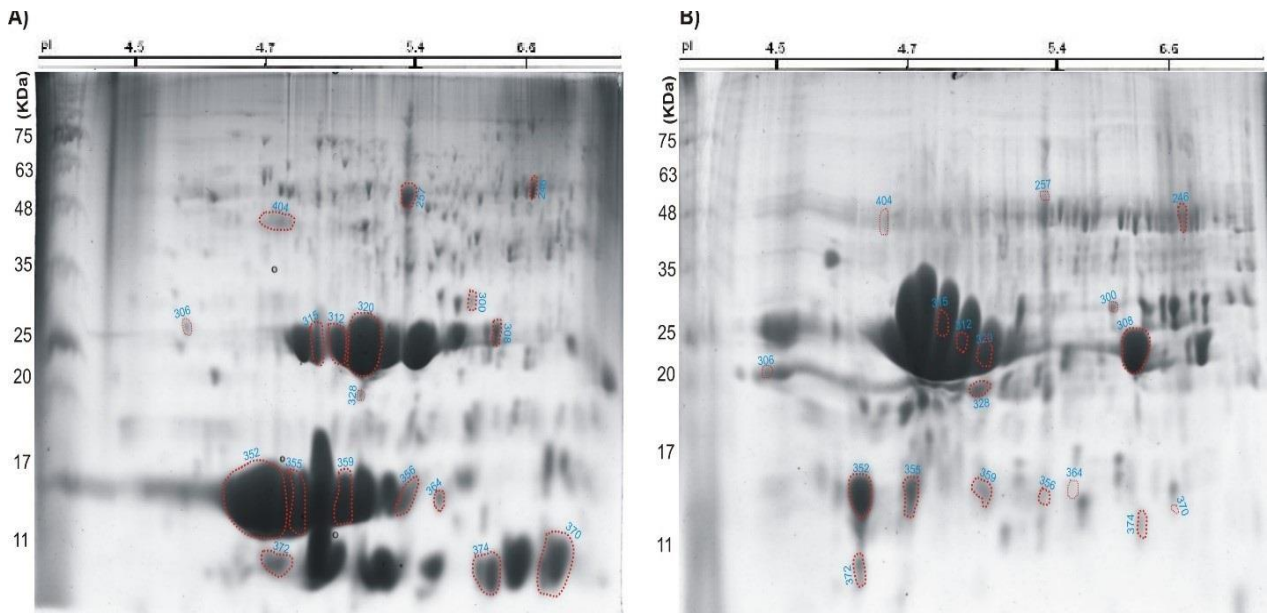
جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBI و Uniprot آنالیز شدند.

شدند و بعد برای تجزیه و تحلیل از MALDI TOF/TOF MS استفاده شد. داده‌های بدست آمده بوسیله موتور



شکل ۱- مقایسه الگوی باندی پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت پیازچه بین دو گونه *A. scabriscapum* و *A. stipitatum* با روش SDS-PAGE. *A. stipitatum* (B) و *A. scabriscapum* (A) PAGE

Figure 1. Comparison of the band pattern of bulb tissue storage proteins between *A. stipitatum* and *A. scabriscapum* by using SDS-PAGE method. (A) *A. scabriscapum*, (B) *A. stipitatum*



شکل ۲- شناسایی و تعیین جایگاه قرارگیری لکه‌های پروتئینی روی ژل الکتروفورز دوبعدی با استفاده از نرم‌افزار Melanie (A) *A. scabriscapum* و (B) *A. stipitatum*

Figure 2 - Identification and determining the position spots on two-dimensional gel electrophoresis using Melanie software (A) *A. scabriscapum* and (B) *A. stipitatum*

نتایج

در این پژوهش، برای مطالعه و شناسایی میزان مشابهت و اختلافات در الگوی بیانی پروتئین‌های دو گونه، ابتدا استخراج پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE انجام شد. پس از ارزیابی اولیه و مشاهده الگوی بیانی متفاوت در پروتئین‌های حاصل از SDS-PAGE (شکل ۱)، برای شناسایی پروتئین‌ها از روش الکتروفورز دوبعدی استفاده شد و پس از اسکن ژل‌های حاصل از

الکتروفورز دوبعدی تصاویر حاصل توسط نرم‌افزار Melanie 6.0 آنالیز گردید (شکل ۲). محدوده نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی پروتئین‌ها و محل قرارگرفتن لکه‌های پروتئینی در ژل‌ها با انجام الکتروفورز همزمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد مشخص شد. میانگین درصد حجمی لکه‌های متعلق به هر دو نمونه محاسبه و لکه‌های با بیان معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ با آزمون t-student شناسایی شدند (جدول ۴).

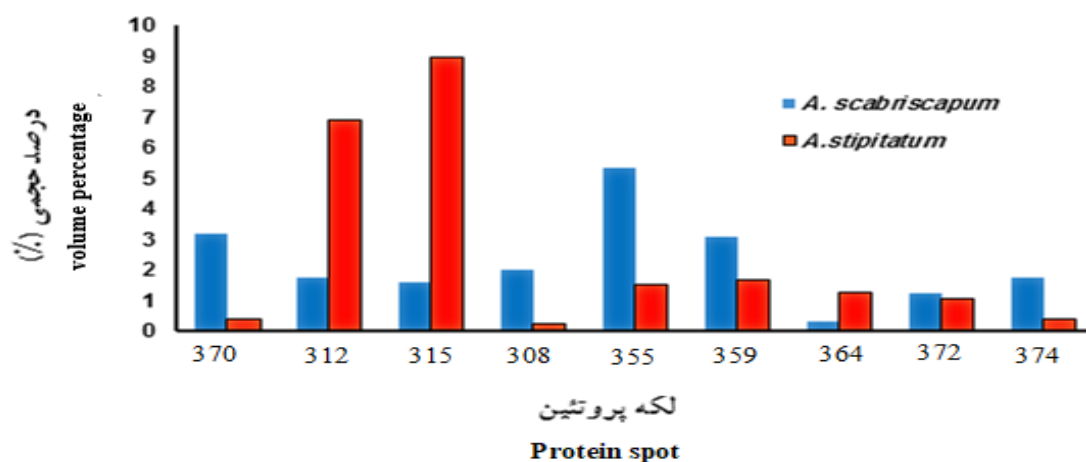
جدول ۴- لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ طی الکتروفورز دوبعدی پیازچه در دو گونه

Table 4: Protein spots with significant expression change at 5% probability level following 2D electrophoresis of bulbs in two species

لکه‌های پروتئینی Protein spots Match ID	وزن مولکولی Molecular Weight (kDa)	نقطه ایزوالکتریکی Isoelectric Point	میانگین درصد حجمی Average volume % <i>A. scabriscapum</i>	میانگین درصد حجمی Average volume % <i>A. stipitatum</i>	مقدار احتمال P value
308	20-25	5.4-6.6	0.37	5.78	0.023
312	20-25	4.7- 5.4	2.08	6.92	0.029
315	20-25	4.7- 5.4	1.24	8.93	0.020
355	11-17	4.7- 5.4	5.01	1.52	0.030
359	11-17	4.7- 5.4	3.07	1.65	0.022
364	11-17	5.4- 6.6	0.33	1.25	0.006
370	11-17	6.6-7.0	3.19	0.38	0.059
372	0-11	4.5- 4.7	1.26	1.05	0.265
374	17-11	5.4- 6.6	1.36	0.41	0.039

نتایج این مطالعه نشان داد که الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های پیازچه در گونه‌های *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* تفاوت بسیار زیادی با یکدیگر دارند. از مجموع 138 لکه پروتئینی شناسایی شده توسط الکتروفورز 2D تنها در 9 لکه پروتئینی در سطح احتمال 5٪ تغییر بیان معنی‌دار مشاهده شد. نمودار داده‌های بدست آمده از درصد حجمی لکه‌های پروتئینی پیازچه در دو گونه *A. scabriscapum* و *A. stipitatum* نشان داد که بیشترین و کمترین تفاوت بیان به ترتیب مربوط به لکه‌های ۳۱۵ و ۳۷۲ است. لکه‌های شماره ۳۶۴، ۳۱۲، ۳۰۸ و ۳۱۵ در گونه *A. stipitatum* نسبت به گونه *A. scabriscapum* افزایش بیان و لکه‌های شماره ۳۵۹، ۳۷۰، ۳۷۲ و ۳۷۴ در *A. stipitatum* نسبت به *A. scabriscapum* کاهش بیان داشتند (شکل 3). نتایج نشان داد از مجموع ۹ لکه پروتئینی انتخابی توسط نرم‌افزار Melanie تعداد یک لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۱۱-۰ کیلودالتون، ۵ لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۱۱ تا ۱۷ کیلودالتون و ۳ لکه پروتئینی دیگر با وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۲۵ کیلودالتون بودند. همچنین 4 لکه پروتئینی دارای نقطه ایزوالکتریکی بین ۴/۷-۵/۴، ۳ لکه دارای pI ۴/۶-۵/۶ و یک لکه دارای نقطه ایزوالکتریک ۶/۶-۷ بود (جدول ۴).

نتایج این مطالعه نشان داد که الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های پیازچه در گونه‌های *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* تفاوت بسیار زیادی با یکدیگر دارند. از مجموع 138 لکه پروتئینی شناسایی شده توسط الکتروفورز 2D تنها در 9 لکه پروتئینی در سطح احتمال 5٪ تغییر بیان معنی‌دار مشاهده شد. نمودار داده‌های بدست آمده از درصد حجمی لکه‌های پروتئینی پیازچه در دو گونه *A. scabriscapum* و *A. stipitatum* نشان داد که بیشترین و کمترین تفاوت بیان به ترتیب مربوط به لکه‌های ۳۱۵ و ۳۷۲ است. لکه‌های شماره ۳۶۴، ۳۱۲، ۳۰۸ و ۳۱۵ در گونه *A. stipitatum* نسبت به گونه *A. scabriscapum* افزایش بیان و لکه‌های شماره ۳۵۹، ۳۷۰، ۳۷۲ و ۳۷۴ در *A. stipitatum* نسبت به *A. scabriscapum* کاهش بیان داشتند (شکل 3). نتایج نشان داد از مجموع ۹ لکه پروتئینی انتخابی توسط نرم‌افزار Melanie تعداد یک لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۱۱-۰ کیلودالتون، ۵ لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۱۱ تا ۱۷ کیلودالتون و ۳ لکه پروتئینی دیگر با وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۲۵ کیلودالتون بودند. همچنین 4 لکه پروتئینی دارای نقطه ایزوالکتریکی بین ۴/۷-۵/۴، ۳ لکه دارای pI ۴/۶-۵/۶ و یک لکه دارای نقطه ایزوالکتریک ۶/۶-۷ بود (جدول ۴).



شکل ۳- مقایسه درصد حجمی (Vol%) لکه‌های پروتئینی پیازچه در دو گونه مورد مطالعه میزان هر ستون بیانگر درصد حجمی لکه‌ها بر شماره لکه‌های پروتئینی انتخابی است.

Figure 3 - Comparison of volume percentage (Vol%) of bulb protein spots in both species, the amount of each column expresses the volume percentage of spots on the number of selected protein spots

و متابولیت‌های ثانویه و (۳) سیگنال پتیدها تقسیم‌بندی شدند (جدول ۵). با توجه به نتایج طیف‌سنجی جرمی و بررسی با ابزارهای بیوانفورماتیکی، فعالیت و جایگاه قرارگیری هریک از پروتئین‌های انتخابی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برخی از پارامترهای مهم مانند شماره دسترسی در سایت NCBI و Uniprot، محل فعالیت سلولی، طول توالی اسید آمینه و شاخص بی‌ثباتی برای هریک از پروتئین‌های مورد مطالعه بررسی شد. از ۳ پروتئین مورد مطالعه، ۲ پروتئین *Maturase K* و *Agmatine coumaroyltransferase-1* فاقد توالی سیگنال بودند و به نظر می‌رسد در سلول‌های سیتوپلاسمی فعالیت داشته باشند. با توجه به نتایج حاصل، شاخص بی‌ثباتی (II) Instability Index برای پروتئین‌ها از ۴۹/۱۵ تا ۳۱/۹۷ متغیر بود. بنابراین پروتئین *Agmatine coumaroyltransferase-1* پایدار و پروتئین‌های *Maturase K* و *Hypothetical Protein* در گروه پروتئین‌های ناپایدار قرار گرفتند.

نتایج طیف‌سنجی جرمی

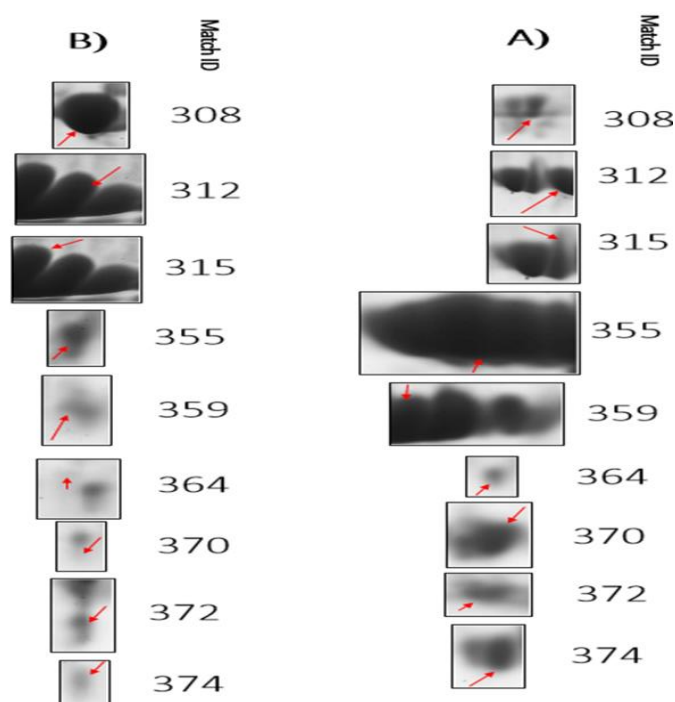
از میان ۹ لکه با بیان معنی‌دار تنها ۳ لکه پروتئینی ۳۷۰، ۳۵۹ و ۳۷۴ از هر نمونه انتخاب و پس از جداسازی لکه‌ها از ژل الکتروفورز دوبعدی و هضم پروتئین‌ها به وسیله تریپسین، هریک از قطعات بوسیله آنالیز MALDI-TOF MS تجزیه و تحلیل و شناسایی شدند. به این ترتیب، با توجه به نتایج بدست آمده از موتور جستجوگر Mascot لکه‌های پروتئینی ۳۷۰ با پروتئین *Maturase K* و شماره دسترسی AZQ21213.1، لکه پروتئینی ۳۵۹ با پروتئین فرضی *hypothetical protein* با شماره دسترسی EXC28055.1 و لکه پروتئینی ۳۷۴ با پروتئین *Agmatine coumaroyltransferase-1* و شماره دسترسی AGCT1_HORVU در پایگاه اطلاعاتی NCBI مطابقت داشتند. با بررسی لکه‌های پروتئینی در پایگاه داده‌های NCBI و Uniprot، مشخص شد که این لکه‌ها براساس عملکردهای بیولوژیکی در سه گروه: (۱) متابولیسم عمومی سلول، (۲) پروتئین‌های مرتبط با سازوکار دفاعی

جدول ۵- بررسی لکه‌های پروتئینی براساس عملکردهای بیولوژیکی، طول توالی اسید آمینه و محل سلولی با استفاده از ابزار

(web.expasy.org/protparam) Proparam

Table 5: Evaluation of protein spots based on biological functions, amino acid sequence length and cell localization using Proparam tool (web.expasy.org/protparam)

مشخصات Characteristics	شماره لکه Spot ID		
	370	359	374
شماره دسترسی Accession number	AZQ21213.1	EXC28055.1	AGCT1_HORVU
نام پروتئین Protein Name	Maturase K	Hypothetical Protein	Agmatine coumaroyltransferase-1
شناسه Uniprot Uniprot ID	A0A3S9LMW0	W9S678_9ROSA	A9ZPJ6
تعداد اسیدهای آمینه Number of Amino Acids	179	131	439
جایگاه سلولی Localization	Cytoplasm	EndoplasR	Chloroplast
ضریب استهلاک Extinction coefficients ($M^{-1}cm^{-1}$)	41035	20970	44390
شاخص بی ثباتی Instability Index (II)	79/44 Unstable	15/49 Unstable	97/31 Stable



شکل ۴- نمای نزدیک تصویر دوبعدی از لکه‌های پروتئینی با بیان معنی دار در دو گونه *A. scabriscapum* (A)، *A. stipitatum* (B)

Figure 4 – A close-up of the two-dimensional images of protein spots with significant expression in both species (A) *A. scabriscapum*, (B) *A. stipitatum*

بحث

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها یکی از راه‌های مفید برای شناخت بیشتر پروتئین‌هاست. شناسایی پروتئین‌ها و الگوهای بیانی آنها در شرایط فیزیولوژیکی و تجزیه و تحلیل پروتئومی اهمیت اساسی را برای مطالعه عملکردی فرایندهای سلولی در سال‌های اخیر ایجاد کرده است. به طوری که طیف‌سنجی جرمی به یک عنصر اصلی برای تجزیه و تحلیل پروتئوم تبدیل شده است (Aebersold et al., 2003). این روش در ترکیب با سایر روش‌های مختلف جداسازی پروتئین و ابزارهای بیوانفورماتیکی برای شناسایی و توصیف پروتئین در مقیاس بزرگ موجودات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chen et al., 2013).

پروتئین‌های *Maturase K* از بیان ژن کلروپلاستی *matK* هستند که به RNAهای خودپیرایشگر در فرایند حذف اینترون‌های گروه II کمک می‌کنند و با اسپلیسوزوم‌های هسته‌ای در فرایند تکاملی نقش دارند (Barthet et al., 2020). به دلیل پایداری این ژن و درصد پائین جهش در آن، از ژن *matK* برای شناسایی گونه و مطالعات فیلوژنتیکی استفاده می‌شود (Group., 2009). بنابراین با توجه به اهمیت ژن کلروپلاستی *matK* می‌توان از توالی این ژن به عنوان نشانگر برای مطالعات تبارشناسی جنس *Allium* استفاده کرد. منطقه *matK* به دلیل قدرت مؤثر در تفکیک، بازیابی توالی با کیفیت بالا و روش‌های آزمایشی آسان به عنوان بارکد DNA انتخاب شده است. البته، ادغام توالی‌های *matK* در فیلوژنی *Allium* می‌تواند در بازسازی فیلوژنتیک این جنس تأثیر بسزایی داشته باشد (Ipek et al., 2014). در مطالعات مختلف بر روی گونه‌های گیاهی از این ژن، بارها برای کشف روابط فیلوژنی و تقسیم‌بندی بین گونه‌ای از آن استفاده شده است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Noormand و همکاران (2021) انجام شد، با توجه به نقش مهم ژن *matK* برای شناسایی روابط فیلوژنتیکی، از این ژن کلروپلاستی برای مطالعه در گونه‌های مختلف مرزه استفاده شد.

لکه 374 به‌عنوان پروتئین *Agmatine*

coumaroyltransferase-1 پیش‌بینی شد. در تحقیقی که توسط Fu و همکاران (2019) برای مقایسه رونویسی در گونه *Allium* انجام شد، نتایج نشان داد که *Agmatine coumaroyltransferase-1* در چرخه متابولیکی فنیل پروپانوئید نقش داشته، این چرخه شامل مسیرهای بسیار پیچیده از واکنش‌های شیمیایی بوده که در سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و لیگنین‌ها نقش دارد. با توجه به مطالعات مشخص شد که این پروتئین همچنین در مقاومت گونه‌های *Allium* در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی نقش بسزایی دارد. نتایج تحقیقات بر روی جو نشان داد *ACT* یک *N-acyltransferase* متعلق به یک خانواده بزرگ از آسپیل ترانسفرازها با عملکردهای بیولوژیکی بسیار متنوع است و یکی از مهمترین آنزیم‌های موجود در متابولیسم ثانویه بعضی از گیاهان زراعی می‌باشد. در تحقیقی بر روی نهال‌های جو آلوده به عوامل بیماری‌زای قارچی با طیف‌سنجی جرمی، مشاهده شد که *ACT*‌ها در پاسخ به تنش‌های بیماری‌زایی نقش دفاعی دارند (Burhenne et al., 2003). به‌نحوی که تنها اطلاعات بدست آمده از *Hypothetical Protein* وجود توالی سیگنال پپتید در دنباله N-ترمینال این پروتئین است. البته، *Hp*‌ها به‌عنوان پروتئین‌های فرضی با عملکرد ناشناس شناخته می‌شوند (Uhlen et al., 2010).

Hps‌ها از مناطقی در ژنوم که به‌عنوان ژن یتیم شناخته می‌شوند، حاصل شده‌اند، برای این مناطق هیچ خاصیت بیوشیمیایی یا خویشاوندی آشکار در پایگاه داده‌های پروتئین و اسید نوکلئیک وجود ندارد و هیچ پیوند عملکردی برای آنها کشف نشده است (Galperin., 2001). مطالعات انجام شده بیانگر اهمیت بسیار زیاد *Hps*‌هاست، زیرا این نوع از پروتئین‌ها اغلب ممکن است با برخی از بیماری‌های موجودات زنده در ارتباط باشند. علیرغم عدم اطلاعات کافی از خصوصیات عملکردی آنها، مشخص شده که نقش مهمی در درک مسیرهای بیوشیمیایی - فیزیولوژیکی و یافتن ساختارها و عملکردهای پروتئینی جدید دارند (Nimrod et al., 2008). در گذشته نه چندان دور،

فیتوشیمیایی و بکارگیری ابزارهای بیوانفورماتیکی پیشرفته موانع و ابهامات موجود در فرایند مطالعه گونه‌های مختلف این جنس برطرف گردد.

منابع مورد استفاده

- Aebersold, R. and Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422:198-207.
- Ahiabor, C., Gordon, A., Ayithey, K. and Agyare, R., 2016. In vitro assessment of antibacterial activity of crude extracts of onion (*Allium cepa* L.) and shallot (*Allium aescalonicum* L.) on isolates of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Salmonella typhi* (ATCC 19430). *International Journal of Applied Research*, 2:1029-1032.
- Barboza, K., Beretta, V., Kozub, P.C., Salinas, C., Morgenfeld, M.M., Galmarini, C.R. and Cavagnaro, P.F., 2018. Microsatellite analysis and marker development in garlic: distribution in EST sequence, genetic diversity analysis, and marker transferability across Alliaceae. *Molecular genetics and genomics*, 293:1091-1106.
- Barthet, M.M., Pierpont, C.L. and Tavernier, E.K., 2020. Unraveling the role of the enigmatic MatK maturase in chloroplast group IIA intron excision. *Plant direct*, 4:00208.
- 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.
- Burhenne, K., Kristensen, B.K. and Rasmussen, S.K., 2003. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases: purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3. 1.64). *Journal of Biological Chemistry*, 278:13919-13927.
- Chen, K., Renaut, J., Sergeant, K., Wei, H.U.I. and Arora, R., 2013. Proteomic changes associated with freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion (*Allium cepa* L.) scales. *Plant, cell & environment*, 36:892-905.
- Cvjetko, P., Zovko, M. and Balen, B., 2014. Proteomika u istraživanjima toksičnosti teških metala u biljaka. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 65:1-17.
- Dufoo-Hurtado, M.D., Huerta-Ocampo, J.Á., Barrera-Pacheco, A., Barba de la Rosa, A.P. and Mercado-Silva, E.M., 2015. Low temperature conditioning of garlic (*Allium sativum* L.) "seed" cloves induces

رویکردهای کارآمد بسیاری وجود داشته و ابزارهایی برای پیش‌بینی عملکرد *HP*ها در دسترس عموم بوده است (Murakami *et al.*, 2005). از آنجا که پیش‌بینی عملکرد یک پروتئین براساس همسانی با سایر پروتئین‌ها یا حتی ساختار سه بعدی آنها اغلب دشوار است، تعیین اجزای یک مجموعه پروتئینی یا یک ساختار سلولی در تجزیه و تحلیل عملکردی آنها ضروریست. این جنبه از مطالعات پروتئومیکس نویدی در زیست‌شناسی مولکولی برای سهولت درک محققان از بیوشیمی پروتئین‌ها، فرایندها و مسیرهای بیوسنتزی آنها برای سالهای آینده است. البته، شناسایی تمام پروتئین‌ها و مستندسازی عملکرد آنها برای گیاهان غیر مدل فاقد ژنوم مرجع تا حدودی مشکل است، زیرا یک پروتئین خاص با توجه به محل سلولی، تغییرات پس از ترجمه یا شرکای متقابل آن می‌تواند منجر به عملکردهای بسیار متنوعی شود و معمولاً تلفیقی از روش‌های پروتئومیکس و ابزارهای بیوانفورماتیکی متعدد برای پیش‌بینی عملکرد و جایگاه قرارگیری پروتئین‌ها در اندامک‌های سلولی گیاهان غیر مدل می‌تواند مؤثر واقع شود (Cvjetko *et al.*, 2014). با توجه به پلی‌مورفیسم بالای پروتئین‌های ذخیره‌ای در بافت پیازچه و مقاومت پروتئین‌های ذخیره‌ای در برابر عوامل محیطی، در این تحقیق از پروتئین بافت پیازچه دو گونه *A. stipitatum* و *A. scabriscapum* برای مشاهده و بررسی تغییرات الگوی بیانی آنها استفاده شد. با بررسی الگوی بیانی پروتئین‌های بافت پیازچه در بین این دو نمونه، مشاهده شد که با وجود انتظار هر دو گونه مورد مطالعه متعلق به یک جنس (*Allium*) بوده اما الگوی بیانی پروتئینی بسیار متفاوتی را نسبت به یکدیگر بروز دادند. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در زمینه تحقیقات ژنتیکی بر روی گیاهان زراعی و به‌ویژه گیاهان دارویی، همچنان مطالعات ژنتیکی و به‌زادگی در گونه‌های متعلق به جنس *Allium* با مشکلاتی فراوانی مواجه بوده که منجر به عدم دسترسی کامل به توالی ژنوم گونه‌های متعلق به آن شده است، از این رو امید است در آینده نه چندان دور با بهره‌مندی از روش‌های مولکولی -

- molecular biology, 305(3):567-580.
- Kumar, O.A. and Tata, S.S., 2010. SDS-PAGE seed storage protein profiles in chili peppers (*Capsicum L.*). *Notulae Scientia Biologicae*, 2(3):86-90.
 - Kyung, K.H., 2012. Antimicrobial properties of allium species. *Current opinion in biotechnology*, 23(2):142-147.
 - Ladizinsky, G. and Hymowitz, T., 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54(4):145-151.
 - Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227:680-685.
 - Moradipour Jirandeh, S. Ghamari Zare, A. Mousavi, A. and Mirjani, L., 2012. Study of morphological and seed storage proteins characteristics of Chelcheragh lily (*Lilium ledebourii*) populations in Iran. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 20(1): 172-182 (In Persian).
 - Mujib, A., Ilah, A., Aslam, J., Fatima, S., Siddiqui, Z.H. and Maqsood, M., 2012. Catharanthus roseus alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant growth regulation*, 68(2):111-127.
 - Murakami, M., Shimada, K., Kawai, M. and Koga, H., 2005. InCeP: Intracellular Pathway Based on mKIAA Protein-Protein Interactions. *DNA Research*, 12(5):379-387.
 - Nimrod, G., Schushan, M., Steinberg, D.M. and Bentel, N., 2008. Detection of functionally important regions in "hypothetical proteins" of known structure. *Structure*, 16(12):1755-1763.
 - Noormand Moaied, F., Bihamta, M.R., Tabaei Aghdai, S.R. and Naghavi, M.R., 2021. Study of phylogenetic relationships of different species of *Satureja* spp. based on nuclear ITS region and chloroplast matK gene. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 28(2): 173-190 (In Persian).
 - O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250(10): 4007-4021.
 - Qin, R., Ning, C., Björn, L.O. and Li, S., 2016. Proteomic analysis of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. roots under copper stress. *Plant and soil*, 401:197-212.
 - Rabbani, M.A., Qureshi, A.A., Afzal, M., Anwar, R. and Komatsu, S., 2001. Characterization of mustard (*Brassica juncea* L.) Czern. & Coss.] germplasm by SDS-PAGE of total seed proteins. *Pakistan Journal of Botany*, 33(2):173-179.
 - alterations in sprouts proteome. *Frontiers in plant science*, 6: 332.
 - El Rabey, H.A., Al-Malki, A.L., Abulnaja, K.O., Ebrahim, M.K., Kumosani, T. and Khan, J.A., 2014. Phylogeny of ten species of the genus *Hordeum* L. as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis. *Molecular biology reports*, 41:365-372.
 - Emre, I., Turgut-Balik, D., Genc, H. and Sahin, A., 2010. Total seed storage protein patterns of some *Lathyrus* species growing in Turkey using SDS-PAGE. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5):3157-3163.
 - FARSHADFAR, E. and Farshadfar, M., 2004. Evaluation of genetic diversity in chickpea lines using physiological and RAPD molecular markers. *Pajouhesh-Va-Sazandegi jurnal*, 13: 63-69 (In Persian).
 - Fu, J., Zhang, H., Guo, F., Ma, L., Wu, J., Yue, M., Zheng, X., Qiu, Z. and Li, L., 2019. Identification and characterization of abundant repetitive sequences in *Allium cepa*. *Scientific reports*, 9(1):1-7.
 - Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S. and Bashir, M., 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. *Euphytica*, 123(3): 367-378.
 - Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis:Wiley Analytical Science An International Journal*, 21(6):1037-53.
 - Group, C.P.W., Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L. and Fazekas, A.J., 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):12794 -12797.
 - Ipek, M., Ipek, A. and Simon, P.W., 2014. Testing the utility of matK and ITS DNA regions for discrimination of *Allium* species. *Turkish journal of botany*, 38(2):203-212.
 - Karasinski, J., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A.R., Konopka, A., Bulska, E. and Wrobel, K., 2017. *Allium cepa* L. response to Sodium Selenite (Se (IV)) studied in plant roots by a LC-MS-based proteomic approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(19):3995-4004.
 - Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of*

- one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) quantitative proton (^1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) for the identification and quantification of taste compounds in raw onion (*Allium cepa* L.) bulbs and in aqueous solutions where onion tissues are soaked. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(7):3139-3153.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S. and Wernerus, H., 2010. Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nature biotechnology*, 28(12):1248-1250.
 - Yousefzadeh, H. Hosseinzadeh Colagar, A. Tabari, M. Sattarian, A and Assadi, M. 2012. Utility of the ITS region sequence and structure for molecular identification of the *Tilia* species from Hyrcanian forest, *Plant Systematics and Evolution*, 298: 947-961.
 - Zolfaghari, B. Barile, E. Capasso, R. Izzo, AA. Sajjadi, SE. Lanzotti, V. 2006. The Sapogenin Atroviolacegenin and Its Diglycoside Atroviolaceoside from *Allium a troviolaceum*. *Journal of natural products* 69 (2):191-195.
 - Raj, L.J.M., Britto, S.J., Prabhu, S. and Senthilkumar, S.R., 2011. Phylogenetic relationships of *Crotalaria* species based on seed protein polymorphism revealed by SDS-PAGE. *Plant Science*, 2:119-128.
 - Samah, S., Ventura-Zapata, E. and Valadez-Moctezuma, E., 2015. Fractionation and electrophoretic patterns of seed protein of *Opuntia* genus. A preliminary survey as a tool for accession differentiation and taxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58:187-194.
 - Seregin, A.P., Anačkov, G. and Friesen, N., 2015. Molecular and morphological revision of the *Allium saxatile* group (Amaryllidaceae): geographical isolation as the driving force of underestimated speciation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 178(1):67-101.
 - Sfaxi, I.H., Ezzine, A., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T. and Marzouki, M.N., 2012. Combined proteomic and molecular approaches for cloning and characterization of copper-zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD2) from garlic (*Allium sativum*). *Molecular biotechnology*, 52(1):49-58.
 - Tardieu, A., De Man, W. and This, H., 2010. Using

Scallion proteome analysis in Iranian *A. stipitatum* and *A. scabriscapum* species to identify proteins with different expression

M. Asadi¹, F. Nazarian-Firouzabadi^{2*}, M. R. Naghavi³, A. Ismaili⁴

1. PhD graduated, Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

2* Corresponding Author, Prof., Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran, Email; nazarian.f@lu.ac.ir

3. Prof., Dept. Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

4. Prof., Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

Received: 02.08.2021

Accepted: 13.12.2021

Abstract

Allium includes more than 920 species worldwide. Iran is the main habitat of many wild *Allium* species. In this study, onion tissue of two species *A. stipitatum* and *A. scabriscapum* from two subspecies *Melanocrommyum* and *Reticulatobulbosa* were used to evaluate and identify the expression pattern of storage proteins obtained by the SDS-PAGE method. Two-dimensional gel electrophoresis and MALDI TOF/TOF MS mass spectrometry were used to identify protein spots and to observe the expression changes of the two species. Analysis of gels by two-dimensional electrophoresis revealed 138 protein spots. The results showed a slight similarity between the gels and a different expression pattern between the samples, based on which a small number of similar spots were obtained in both gels. The results showed that there were significant differences in the expression profile of onion tissue proteins of these samples. Using the T-test, 9 protein spots with the most significant changes were identified at the 5% probability level, and among them, 3 different spots were identified using Mass spectrometry was selected for identification. The results of mass spectrometry experiments and matching of the obtained data with NCBI and Uniprot databases and bioinformatics tools showed that the tested spots were consistent with Maturasek proteins, Agmatine coumaroyltransferase-1, and a protein with the unknown function called Hypothetical Protein. The findings of this study showed that since the samples belonging to *A. stipitatum* and *A. scabriscapum* are of the same genus, but the expression pattern of their stored proteins in onion tissue is very different from each other.

Keywords: *Allium*, Mass spectrometry analysis, Gene expression, Bioinformatics