

## **Isolation, Cloning, Bioinformatics Analysis of Protein Properties and Gene Expression Analysis of Dihydrosanguinarine Oxidase (*DBOX*) from Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.)**

Kamran Samiei<sup>1</sup>, Ahmad Ismaili<sup>2\*</sup>, Farhad Nazarian Firoz-abadi<sup>3</sup> and Seyyed Mohsen Sohrabi<sup>4</sup>

- 1- Ph.D. Student of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 2- **\*Corresponding Author:** Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (ismaili.a@lu.ac.ir)
- 3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 4- Ph.D. Student of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 9 May, 2017

Accepted: 11 October, 2017

---

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Opium poppy (*Papaver somniferum* L.) is one of the important medicinal plants considered the only source for several high-value pharmaceutically BIAs. Benzylisoquinoline alkaloids (BIAs) are a very large and complex group of plant alkaloids. Today's various methods of genetic engineering are applied to improve the biosynthetic pathways in medicinal plants. For successful implementation of techniques such as gene silencing and over-expression, it is important to get accurate and complete information about genetic characteristics of related genes in the biosynthesis of secondary metabolites. *DBOX* is one of the important genes in biosynthesis of sanguinarin and papaverin alkaloids of poppy. According to the cause, the present study was performed on *DBOX* to explain genetic characteristic and gene expression pattern.

#### **Materials and Methods**

Specific primers were designed based on databases, and complete sequences of *DBOX* gene were amplified using DNA and cDNA as a template, and then were cloned in pTZ57R/T plasmid. After sequencing of cloned fragments, CDD, CELLO and ProtParam tools were used to determine ORFs, domains and the location of protein accumulation. Phylogenetic relationship between the gene in this plant with other plants was determined. Finally, the pattern of gene expression in different tissues was assessed using real time RT-PCR technique and RNA-seq data derived from SRA data bank.

#### **Results**

Sequencing results showed the 1614-bp fragment that has 100% identity with the *DBOX* gene of *P. somniferum*. The protein encoded by this gene was analyzed by bioinformatics methods. Three domains including FAD binding, Berberine and FAD/FMN-containing dehydrogenase in the protein sequence were identified and the existence of an N-terminal signal peptide was also determined in this protein. The results also showed that the highest concentration of protein was present in the plasma membrane and highest function of this protein was in the extracellular. In order to analyze and determine the expression pattern of *DBOX* gene in different tissues, 5-gene

libraries of RNA-seq data of opium poppy (with ERX651037, ERX651023, ERX651056, ERX651082 and ERX651062 access numbers) derived from NCBI-SRA were analyzed. The numbers of sequences from the alignment between different tissues were compared using the Fisher exact test and Chi-squared 2X2 tests. Results of the gene expression analysis showed that the highest level of gene expression of this gene performed in roots and the lowest level of gene expression occurred in the stems. In addition, results of the real-time RT-PCR experiment were similar to *in silico* tests and the present results demonstrated that *DBOX* gene transcript levels in root were significantly more than other plant tissues.

### **Discussion**

Results showed that *DBOX* gene is an intron less gene. According to existing domains, this gene is a member of a *FADOX* gene family. Due to the presence of FAD and berberin like domains in protein sequence of this gene, its key function in biosynthesis of BIA alkaloids was confirmed. Different expression patterns of *DBOX* gene in root confirmed accumulation of high value sanguinarin alkaloid in this tissue.

**Keywords:** Functional domain, Gene expression pattern, Opium poppy, Sequencing, Transcriptome

## جداسازی، همسانه‌سازی، بررسی بیوانفورماتیکی ویژگی‌های پروتئینی و تحلیل بیان ژن دی هیدروبنزوفنانتراپیدین اکسیداز (DBOX) گیاه دارویی شقایق (*Papaver somniferum* L.)

کامران سمیعی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۳</sup> و سید محسن سهرابی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- \*نویسنده مسئول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (ismaili.a@lu.ac.ir)

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

### چکیده

گیاه شقایق *P. somniferum* از مهم‌ترین گیاهان دارویی به شمار رفته و تنها منبع بسیاری از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی (BIAs) محسوب می‌گردد. آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی گروه بزرگ و پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده که از خواص دارویی و درمانی قابل توجهی برخوردار هستند. در مطالعه حاضر (در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه لرستان در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۵) به منظور جداسازی و همسانه‌سازی ژن *DBOX* ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق، ابتدا توالی موردنظر با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، تکثیر و سپس قطعه تولیدشده به پلاسمید pTZ57R/T منتقل گردید. نتایج توالی‌یابی قطعه ۱۶۱۴ جفت‌بازی را معین نمود که با ۱۰۰ درصد همسانی با ژن *DBOX* گیاه شقایق شباهت داشت. توالی پروتئینی کدشده توسط این ژن مورد تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی قرار گرفت و سه دامنه عملکردی FAD binding، Berberine و FAD/FMN-containing dehydrogenase در توالی پروتئینی و وجود یک سیگنال پپتید در انتهای آمینی آن مشخص گردید. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین تجمع پروتئین کدشده توسط ژن *DBOX* در ناحیه غشای سلولی و بلاسمایی بوده و بیشترین عملکرد این پروتئین در ناحیه خارج سلولی می‌باشد. جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن *DBOX* و تعیین الگوی بیانی آن در بافت‌های مختلف گیاهی، تعداد ۵ کتابخانه ترنسکرپتومی حاصل از داده‌های RNA-seq گیاه شقایق با شماره‌های دسترسی ERX651037، ERX651023، ERX651056، ERX651082 و ERX651062 از پایگاه SRA سایت NCBI دریافت شد. تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی بین بافت‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های آماری Fisher exact test و Chi-squared 2X2 مقایسه گردید. نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از تکنیک real time RT-PCR و آزمون‌های *In silico* نشان داد که بیشترین سطح بیان این ژن در ریشه و کمترین آن در ساقه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: الگوی بیان ژن، ترنسکرپتوم، توالی‌یابی، دامنه عملکردی، شقایق

### مقدمه

گذشته همواره مورد توجه بشر بوده است. در این گیاه تعدادی از آلکالوئیدهای منحصر به فرد از گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی (BIAs) با

گیاه دارویی شقایق (*P. somniferum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی محسوب می‌گردد که از دوران

متعددی از جمله نوسکاپین، بربرین، سنگونارین و پاپاورین در گیاه شقایق برخوردار هستند. همولوگ‌های مختلفی از این گروه آنزیمی نظیر BBE1, BBE2, STOX و DBOX تاکنون شناسایی شده است که عموماً در ساخت نهایی حلقه آروماتیکی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی دخیل هستند. آنزیم DBOX با عمل اکسیداسیونی بر روی سوبسترای آلکالوئیدهای بنزوفانتزیدین، پروتوبربرین و ساختارهای بنزیل ایزوکوینولینی نوع یک، سبب تولید محصول نهایی این گروه از آلکالوئیدها می‌گردد (Hagel and Facchini, 2013).

این آنزیم علاوه بر نقش کلیدی در تولید سنگونارین و پاپاورین، سنتز آلکالوئید دیگری به نام نوسکاپین را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hagel et al., 2012). یکی از مهم‌ترین دستاوردها و توانایی‌های مهم کاربرد مهندسی ژنتیک، دست‌ورزی مسیرهای متابولیت‌های ثانویه گیاهی و غیرساختار تولید متابولیت‌های تولیدشده می‌باشد. با آن‌که تحقیقات متعددی در زمینه‌های مختلف گیاه دارویی شقایق بویژه در زمینه ریشه موئین آن صورت گرفته است، ولیکن نیاز به پژوهش‌های بیشتری در زمینه شناسایی ژن‌های مسیرهای متابولیت‌های ثانویه این گیاه می‌باشد. در پژوهش حاضر جداسازی و همسانه‌سازی ژن کلیدی و مؤثر در انتهای مسیر بیوسنتزی دو آلکالوئید سنگونارین و پاپاورین یعنی DBOX در گیاه شقایق مورد توجه قرار گرفته است. به‌علاوه به بررسی ویژگی‌های پروتئینی و الگوی بیانی این ژن نیز پرداخته شده است و برخی اطلاعات جدید در این خصوص گزارش می‌شود.

### مواد و روش‌ها

#### استخراج اسیدهای نوکلئیک و سنتز cDNA

بذور ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق در گلدان‌هایی با قطر ۳۰ سانتی‌متر در گلخانه گیاهان تراریخت دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند و دمای رشد

عملکردهای مختلف بیولوژیک و درمانی سنتز می‌گردد. از جمله مهم‌ترین آلکالوئیدها موجود در این گیاه می‌توان به پاپاورین، نوسکاپین، سنگونارین، کدئین، تبائین و بربرین اشاره کرد (Desgagne-Penix and Facchini, 2012; Srivastava et al., 2011).

بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی با متراکم شدن دو ترکیب شیمیایی از مشتقات تیروزین (۴-هیدروکسی فیل استالدید (4HPAA) و دوپامین) از طریق دکربوکسیله شدن، متاهیدروکسیله شدن و انتقال آمین صورت می‌گیرد. این دو ترکیب اولیه در مرحله بعد به S-norcoclaurine تبدیل خواهند شد که این ترکیب به‌عنوان پیش‌ساز تمام آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی محسوب می‌شود. در مرحله دوم مسیر بیوسنتزی گیاه شقایق، S-norcoclaurine به ترکیب دیگری به نام S-coclaurine تبدیل می‌گردد. آلکالوئید S-coclaurine در طی چندین واکنش آنزیمی به ماده میانی و اصلی دیگری به نام S-reticuline تبدیل خواهد شد که کلید اصلی تولید آلکالوئیدهای مهم شقایق از جمله آلکالوئیدهای گروه مورفینان، آلکالوئیدهای پروتوبین (بربرین)، آلکالوئیدهای بنزوفانتزیدین (سنگونارین) و آلکالوئیدهای دیگری مانند نوسکاپین محسوب می‌گردد (Beaudoin and Facchini, 2014; Hagel and Facchini, 2013).

در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی گیاه شقایق تعداد متعددی آنزیم از خانواده‌های پروتئینی مختلف حضور دارند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به سیتوکروم‌های P450، متیل ترانسفرازها، دهیدروژناز-ردوکتازهای وابسته به NADPH، استیل ترانسفرازها، دی‌اکسیژنازها، کربوکسیل استرازها و اکسیدو ردوکتازهای مرتبط با FAD (FADOXs) اشاره کرد (Beaudoin and Facchini, 2014; Hagel and Facchini, 2013). آنزیم‌های خانواده FADOXs به دلیل قابلیت منحصر به فرد در ایجاد اتصالات کربن-کربن بین گروه‌های متیلی، نقش کلیدی مهمی در چرخه بیوسنتزی آلکالوئیدهای

دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد طی ۳۵ چرخه تکثیر گردید. ضمن این که واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، قطعات تکثیر شده از روی DNA و cDNA به طور جداگانه از روی ژل جدا گردید. پس از خالص سازی، قطعات مورد نظر با استفاده از کیت همسانه سازی (Thermo Fisher scientific, Germany) به درون پلاسمید pTZ57R/T قرار داده شدند و نهایتاً پلاسمیدهای نو ترکیب (pTZ-DBOX)، جهت تکثیر به درون سلول های مستعد *DH5a* باکتری *E.coli* به روش شوک کلسیمی منتقل گردید. پس از تکثیر باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب بر روی محیط LB حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین به عنوان گزینشگر، تعدادی کلونی سفید انتخاب و جهت تأیید همسانه سازی، از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی و هضم آنزیمی استفاده شد. پس از انتخاب کلونی های مثبت حاوی ژن *DBOX*، استخراج پلاسمید کلونی های نو ترکیب انجام گرفت و توالی یابی قطعه همسانه سازی شده در دو جهت با استفاده از آغازگرهای M13 موجود در پلاسمید pTZ57R/T اجرا گردید.

### تجزیه و تحلیل توالی ژن همسانه سازی شده

با استفاده از نرم افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 10.3 نتایج به دست آمده از توالی یابی ۲ کلونی انتخاب شده حاوی توالی کد کننده و توالی ژنومیک ژن *DBOX* مورد بررسی قرار گرفت. توالی های خوانش شده در دو جهت سر هم بندی شد و جهت وجود چارچوب قرائت باز (ORF) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. دو توالی به دست آمده اولیه با استفاده از ابزار BlastN موجود در پایگاه NCBI بر علیه کل بانک اطلاعاتی موجود در پایگاه مورد همردیفی قرار گرفت. پس از تأیید توالی های مورد نظر، به منظور تعیین جهت قرائت اصلی، توالی در شش قاب با استفاده از ابزار CDD موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند.

روزانه و شبانه به ترتیب ۲۰ و ۱۸ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. DNA ژنومی با روش پیشنهادی ادواردز و همکاران جداسازی گردید (Edwards et al., 1991) و RNA کل نیز با استفاده از کیت از بافت های مختلف گیاه شقایق استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی احتمالی، نمونه های RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (Fermentase, Germany) تیمار شدند.

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده، از تکنیک ژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده شد. پس از تأیید کمیت و کیفیت DNA و RNA، رشته های اولیه cDNA از روی RNA استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت ساخته شد. برای این منظور برنامه تکثیر بر اساس چرخه دمایی ۴۲ درجه سانتی گراد برای ۹۰ دقیقه با استفاده از ۲/۵ میکرو مولار از آغازگرهای تصادفی ۶ نوکلئوتیدی (هگزامر) و آغازگر عمومی Oligo dT، ۵۰۰ میکرو مولار dNTPs و ۵۰ واحد از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس پس از واسرشت سازی مخلوط واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

### تکثیر، همسانه سازی و توالی یابی ژن *DBOX*

به منظور طراحی آغازگرها، ابتدا تمام توالی های نوکلئوتیدی ژن *DBOX* در خانواده Papaveraceae شامل توالی های کد کننده کامل، ناقص و EST ها از پایگاه NCBI دریافت شد. پس از همردیفی توالی های دریافت شده در نرم افزار Vector NTI 10.3 بر اساس نواحی محافظت شده این توالی ها، با استفاده از نرم افزار Allele.ID 7.0 یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). به منظور همسانه سازی ژن *DBOX*، ابتدا کل توالی ژن هدف به طول ۱۶۱۴ جفت باز انتخاب و با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده (جدول ۱)، قطعه مورد نظر توسط آنزیم *Pfu* از روی DNA و cDNA با استفاده از برنامه دمایی شامل واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی گراد و گسترش ۲

**Table 1. Sequence of used primers and their size of amplified fragments**

Goal	Length of fragment (bp)	Sequence (5' -3')	Primer
Amplification and cloning	1614	ATGATGATGAGTTCATCTAATATTCTCC GGCCATCTCTACTGCTTGCC	<i>DBOX</i> -F <i>DBOX</i> -R
Run RT-PCR reactions	117	AACCTTCTCATCCAATCAATCTGC TTCGGAATTTGAAACTCCTTACCC	D/RT-F D/RT-R
Internal control in RT-PCR	124	CGATAGGCGATCTGGAAAGG AGGTGGATACTGAGCGAAGG	<i>EF1</i> -F <i>EF1</i> -R

### بررسی دامنه عملکردی و محل تجمع پروتئین

با استفاده از نرم‌افزار NTI 10.3 Vector توالی نوکلئوتیدی چارچوب قرائت اصلی به توالی پروتئینی ترجمه و در مرحله بعدی با استفاده از ابزار CDD، دامنه‌های عملکردی توالی پروتئینی معین شدند. پس از مشخص شده دامنه‌های عملکردی پروتئین مورد مطالعه، از ابزار SignalP جهت بررسی وجود سیگنال پپتید (توالی راهنما) در پروتئین استفاده گردید. در مرحله بعد از ابزار CELLO برای تعیین محل تجمع پروتئین‌های تولیدشده توسط ژن *DBOX* استفاده و مشخصات پروتئینی شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک، وزن مولکولی و فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از ابزارهای ProtParam و Protein Calculator 3.4 محاسبه شد.

### بررسی روابط فیلوژنتیکی

توالی نهایی ژن جداسازی شده *DBOX* با استفاده از برنامه BlastN بر علیه تمام توالی‌های گیاهان گلدار موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف گردید. پس از بررسی اولیه نتایج به دست آمده از نظر میزان همسانی و نوع گیاه، توالی‌هایی با بیش از ۶۰ درصد همسانی با توالی ژن مورد نظر انتخاب شدند. در مرحله بعد، توالی ژن *DBOX* با تمامی توالی‌های انتخاب شده با استفاده از ابزار ClustalW موجود در نرم‌افزار MEGA 6.0 هم‌ردیف (Thompson et al., 2002) و از نتیجه به دست آمده جهت رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. جهت رسم درخت از روش Neighbor-Joining و آزمون Bootstrap استفاده شد. پس از رسم درخت، به منظور بررسی عملکرد و محل فعالیت پروتئین حاصل از بیان ژن *DBOX*، از نرم‌افزار Blast2GO 2.8 استفاده گردید.

### تجزیه و تحلیل بیان ژن با داده‌های RNA-seq

جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن *DBOX* و تعیین الگوی بیانی آن در بافت‌های مختلف گیاهی، ابتدا تعداد ۵ کتابخانه ژنی حاصل از داده‌های RNA-seq گیاه شقایق با شماره‌های دسترسی ERX651023، ERX651037، ERX651056، ERX651082 و ERX651062 به ترتیب مربوط به ترانسکریپتوم گل، برگ، میوه (کپسول)، ساقه و ریشه از پایگاه SRA سایت NCBI دریافت شد. از کتابخانه‌های دریافت شده، پایگاه داده اختصاصی در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 ایجاد شد. توالی جداسازی شده ژن *DBOX* علیه این ۵ پایگاه مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی به طور جداگانه برای هر پایگاه یادداشت شد و در نهایت توسط نرم‌افزار تحت وب IDEG6 تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی بین بافت‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های آماری Fisher exact test و Chi-squared 2X2 مقایسه گردید.

### واکنش‌های real-time RT-PCR

جهت بررسی میزان نسبی بیان ژن *DBOX* از تکنیک real-time RT-PCR استفاده گردید. برای اجرای واکنش‌ها، هر تیوب شامل ۱۰ نانوگرم cDNA از بافت‌های مختلف، ۳۰۰ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱) و ۷/۵ میکرولیتر از محلول پایه کیت axima<sup>TM</sup> SYBR Green/ROX (Fermentase, Germany) بود به طوری که حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. تمامی واکنش‌ها توسط دستگاه Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) اجرا و تجزیه و تحلیل نمودارها به دست آمده

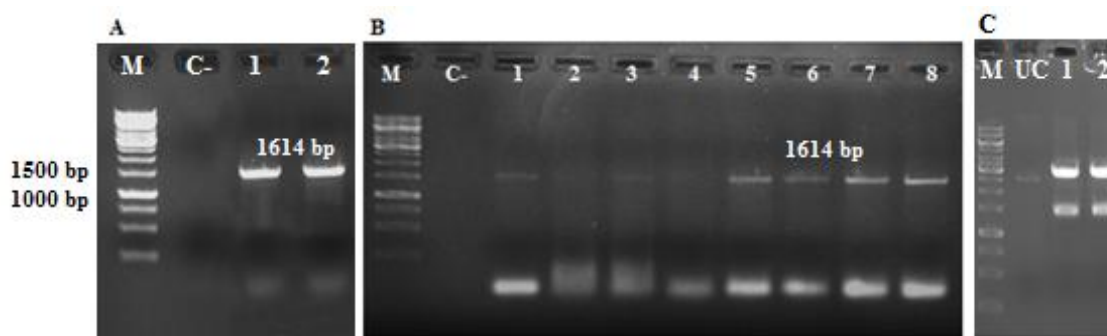
توسط نرم افزار Vector NTI 10.3 سرهم بندی شدند که در مجموع سبب تولید قطعه‌ای به طول ۱۶۱۴ جفت باز در هر دو نوع پلاسمید گردید. نتایج هم‌ردیفی بین توالی کد کننده و توالی ژنومیک ژن *DBOX* نشان داد که هر دو قطعه با ۱۰۰ درصد همسانی، یکسان بودند که بیانگر عدم وجود اینترون در ژن *DBOX* می‌باشد. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی بر روی ژن‌های فاقد اینترون و اهمیت ساختاری آن‌ها صورت گرفته و چندین پایگاه اطلاعاتی مختلف نیز برای آن‌ها طراحی شده است (Kishore, Sakharkar and Kanguane, 2004). ژن‌های فاقد اینترون از خانواده‌های ژنی مختلفی بوده و غالباً عملکردهای ضروری در فرایندهای مختلف بیولوژیک از جمله تنظیم رشد و تکثیر بر عهده دارند (Yan et al., 2014). در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی شقایق صورت گرفت، مشخص گردید که دو ژن *TYDC-1* و *4* از کتابخانه ژنومیک شقایق فاقد اینترون هستند (Facchini and De Luca, 1994). شناسایی و بررسی ژن‌های فاقد اینترون نظیر ژن *DBOX* می‌تواند اطلاعات مفیدی برای مطالعات ژنومیک و تکاملی در این ژن‌ها را می‌توان به علت تخصصی شدن برخی از اعضای یک خانواده ژنی دانست (Yang et al., 2009).

با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  صورت گرفت (Livak and Schmittgen, 2001). از آغاز گره‌های ژن *EF1* (جدول ۱) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز و اسپکتوفتومتری نشان داد که DNA و RNA استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار بودند. در واکنش PCR با استفاده از آغاز گره‌های طراحی شده و DNA و cDNA به عنوان الگو، قطعاتی به طول ۱۶۱۴ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۱A). پس از تخلیص از روی ژل، قطعات مورد نظر به پلاسمید pTZ57R/T منتقل گردید. نتایج PCR بر روی کلونی‌های سفید نشان داد که از مجموع ۸ کلونی انتخاب شده برای هر یک قطعات همسانه‌سازی شده از روی DNA و cDNA، تعداد ۶ کلونی مثبت و حاوی قطعه‌ای به طول ۱۶۱۴ جفت باز بودند (شکل ۱B). پس از جداسازی پلاسمیدهای نو ترکیب از کلونی‌های مثبت اولیه، هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *BamHI* و *EcoRI* نیز حضور قطعه ۱۶۱۴ جفت بازی را برای هر دو نوع پلاسمید نو ترکیب تأیید نمود (شکل ۱C).

از مجموع کلونی‌های نو ترکیب برای هر یک از توالی‌های ژنومیک و کد کننده، یک کلونی انتخاب و جهت مطالعات بعدی با استفاده از خوانش از دو طرف، توالی‌یابی شد. پس از توالی‌یابی، قطعات خوانش شده



**Figure 1. Amplification and cloning of *DBOX* gene in pTZ57R/T plasmid. A) Amplification of *DBOX* gene using specific primers. M: 1kb ladder, C-: negative control and 1 and 2 represent amplification using the cDNA and genomic DNA, respectively. B) Colony PCR of target fragment in pTZ57R/T plasmid. M: 1kb ladder, C-: negative control and numbers represent the selected colonies. C) Enzymatic digestion of pTZ57R/T contain *DBOX* gene. M: 1kb ladder, UC: uncut plasmid and numbers represent the selected colonies contain pTZ-*DBOX* plasmid**

توالی موردنظر حاوی یک چارچوب قرائت باز به طول ۱۶۱۴ با کدون شروع ATG و کدون پایان TAG بود. نتایج همردیفی توالی جداسازی شده با استفاده از ابزار BlastN نشان داد که توالی موردنظر با ۱۰۰ درصد همسانی با ژن FAD-dependent oxidoreductase (*FADOX5*) گیاه شقایق و ۸۰ درصد همسانی با ژن *Argemone* (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase گیاه *Mexicana* (از خانواده شقایق) مشابهت دارد.

پس از ترجمه چارچوب قرائت باز توالی ژن *DBOX* به توالی پروتئینی، مشخص شد که این ژن پروتئینی به طول ۵۳۷ اسید آمینه را کد می‌کند. علاوه بر این پروتئین به دست آمده دارای وزن مولکولی حدود ۵۸ کیلو دالتون، pH ایزوالکتریک ۹/۳، شاخص آلفاتیکی ۸۰/۹ و میانگین نسبی آبدوستی یا آبگریزی ۰/۲۱۶- است. پروتئین تولیدی با دارا بودن شاخص ناپایداری ۳۵/۸ از پایداری مناسبی برخوردار بود که این موضوع می‌تواند به دلیل حضور اسیدهای آمینه آلفاتیکی متعدد در ساختار شیمیایی این آنزیم باشد. اسیدهای آمینه سرین، والین، گلیسین و لوسین به ترتیب با ترکیب حدود ۹، ۸ و ۷ درصد، بیشترین فراوانی را در ساختار شیمیایی پروتئین کدشده توسط ژن *DBOX* داشتند. نیمه عمر پروتئین تولیدشده بیش از ۲۰ ساعت برآورد گردید که این موضوع فعالیت خارج سلولی و انتقال این آنزیم را در مکان‌های دیگری غیر از محل سنتز را پیشنهاد می‌کند.

پروتئین موردنظر حاوی ۳ دامنه عملکردی (domain) FAD binding، Berberine و FAD/FMN-containing dehydrogenase بود (شکل ۲). آنزیم *DBOX* عضوی از فلاووپروتئین‌ها و آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته به FAD است و یکی از مشخصه‌های اصلی این خانواده آنزیمی وجود دامنه عملکردی FAD binding است که برای عملکرد صحیح این آنزیم‌ها حیاتی است. در مسیر بیوسنتزی تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی، اعضاء خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته به FAD دارای نقش‌های حیاتی بوده و در بخش‌های مختلف این مسیر و

در تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی مختلفی مانند نوسکاپین و سنگونارین نقش دارند (Dastmalchi et al., 2017). آنزیم *DBOX* با دارا بودن دامنه عملکردی FAD binding از FAD به‌عنوان کوفاکتور استفاده نموده و عملکرد آن بیشتر شبیه اکسید ردوکتازهای اکسیژن می‌باشد. دامنه عملکردی دوم (Berberine domain) که مربوط به خانواده آنزیمی بربرین و شبه‌بربرین‌ها می‌باشد، در بیوسنتز تعداد زیادی از آلکالوئیدهای گروه بنزیل ایزوکوئینولینی گیاه شقایق دخیل بوده و مهم‌ترین عملکرد این گروه آنزیمی، تبدیل S-Ritculine به S-Scoulerin در مسیر بیوسنتز سه آلکالوئید مهم سنگونارین، بربرین و نوسکاپین است (Beaudoin and Facchini, 2014). سومین دامنه عملکردی FAD/FMN-containing dehydrogenase بوده که با فعالیت هیدروژنازی نقش فعالی در تولید ذخیره انرژی سلولی بر عهده دارد. حدود ۱ درصد پروتئین‌های تولیدشده توسط یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها حاوی دامنه عملکردی متصل شونده به FAD بوده و قادرند که دامنه وسیعی از واکنش‌های شیمیایی از جمله اکسیداسیون و هیدروکسیلاسیون را کاتالیز کنند. بر اساس شباهت‌های ساختاری و موتیف‌های حفاظت‌شده، دامنه‌های عملکردی متصل شونده به FAD (-FAD binding domain) به چندین خانواده اصلی گروه‌بندی می‌شوند. یکی از زیر گروه‌های دامنه‌های متصل شونده به FAD، دامنه عملکردی FAD/FMN بوده که علاوه بر FAD از FMN به‌عنوان کوفاکتور استفاده نموده و به دلیل دارا بودن آدنوزین مونوفسفات (AMP) به فلاوین مونو نوکلئوتید (FMN) توسط یک باند پیروفسفات متصل شده و به همین دلیل قادر است در واکنش‌های کاهش و اکسایش فعالیت داشته باشد. به‌طور کلی آنزیم‌های فعال با دارا بودن دامنه عملکردی FAD/FMN قادرند علاوه بر اتصال به جایگاه‌های مختلف پروئین‌های هدف، در کاهش یا افزایش الکترون و نهایتاً تغییر ساختار و فعالیت بیوشیمیایی آن‌ها نقش مهمی داشته باشند (Fraaije and Mattevi, 2000).



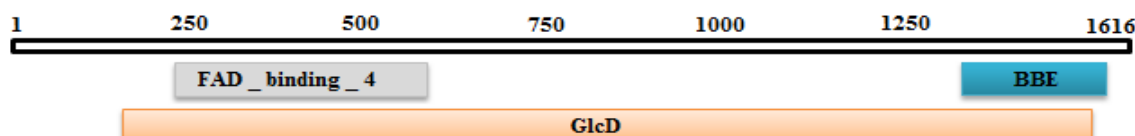


Figure 2. Domains of *DBOX* gene. Numbers represent of nucleotides

اساس نتایج به دست آمده از پایگاه SignalP، مشخص گردید که توالی پروتئین کدشده توسط ژن *DBOX* دارای سیگنال پپتیدی به طول ۲۷ اسید آمینه در انتهای آمینی خود می باشد (شکل ۳). وجود سیگنال پپتید در توالی پروتئین های یوکاریوتی و پروکاریوتی به طور معنی داری در انتقال این پروتئین ها نقش دارد (Nielsen et al., 1997).

در مطالعه حاضر، نتایج بررسی محل تجمع پروتئینی نشان داد که محصول پروتئینی ژن *DBOX* بیشتر در غشای سلولی و پلاسمایی تجمع داشته و وجود سیگنال پپتید نیز دلیلی بر فعالیت غشایی این پروتئین می باشد. تجمع پلاستییدی و سیتوسلی نیز از سایر محل های تجمع بالای این پروتئین بود (شکل ۴). علاوه بر این نتایج نشان دادند که بیشترین عملکرد این پروتئین در خارج سلول بود و عملکرد آن به طور کلی به فعالیت کاتالیتیکی و اتصال نوکلئوتیدی تقسیم می گردد (شکل ۴) که هر دو نقش مهم و کلیدی در بیوسنتز آلکالوئیدها داشته ضمن این که در فرآیندهای زیستی دیگری نظیر فعالیت های کاتابولیکی و پاسخ به تنش ها نیز مؤثر است. اعتقاد بر این است که عملکرد یک پروتئین به محل تجمع آن در سطح سلولی وابسته است زیرا محیطی که پروتئین در آن حضور دارد، نقش قابل توجهی در اجرای وظایف بیولوژیک و عملکرد شیمیایی پروتئین بر عهده دارد. با توجه به اهمیت این موضوع، مطالعه محل تجمع، نوع فعالیت ها و مسیر انتقال پروتئین های کدشده توسط یک ژن، می تواند به درک صحیح مطالعات مهندسی متابولیک کمک قابل توجهی کند (Yu et al., 2014).

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن *DBOX* جداسازی شده نشان داد که این ژن با بیشترین قرابت در گروه ژن های *FADOXs* گیاهان متعلق به راسته *Ranunculales* و خانواده *Papaveraceae* قرار می گیرد (شکل ۵). گروه های

تعیین دامنه های عملکردی حفاظت شده یکی از مهم ترین راه کارها برای شناسایی عملکرد سلولی و مولکولی پروتئین ها می باشد و با استفاده از آن می توان به شباهت بین ساختارهای پروتئینی مختلف پرداخت و از اطلاعات به دست آمده در گروه بندی خانواده های پروتئینی استفاده نمود (Marchler-Bauer et al., 2014). تنوع ساختاری قابل توجه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی به صورت گسترده ای به وسیله افزودن گروه های عملکردی مختلف افزایش می یابد. تغییر شکل ساختار آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی گیاه شقایق عمدتاً بوسیله آنزیم های اکسید کننده نظیر *FADOXs* انجام می شود. در متابولیسم آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی، *FADOX* ها تنها در تشکیل پیوندهای کربن-کربن و کربن-نیتروژن دخیل هستند، ولی به نظر می رسد همولوگ های *FADOX* در سایر گیاهان تنها در تشکیل پیوندهای اکسیژن-کربن و تشکیل متابولیت های خاص غیر آلکالوئیدی نقش دارند (Custers et al., 2004).

آنزیم *DBOX* همانند بسیاری از اعضای خانواده اکسید ردوکتازهای وابسته به *FAD* (*FADOXs*) از ژن های پایه ای حیات بوده و به واسطه داشتن دامنه عملکردی *FAD/FMN*، در واکنش های اکسیداسیون-احیاء و تولید انرژی دخیل می باشد. این آنزیم به علت داشتن دامنه عملکردی *Berberine Bridge* در چرخه تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی گیاه شقایق از جمله سنگوینارین و پاپاورین نقش داشته و با توجه به نقش این دسته از آنزیم ها در فرایند تولید انرژی و تغییر ساختارهای حیاتی، از جمله ژن هایی با میزان حفاظت شدگی بالا محسوب می گردد.

یکی از موفق ترین و پرکاربردترین روش ها که از مدل های مخفی مارکوف استفاده می کند، نرم افزار تحت وب *SignalP 4.0* می باشد (Petersen et al., 2011). بر

خانواده ژنی *FADOXs* صورت گرفت ( Gesell et al., 2011)، ارتباط تکاملی بین توالی *STOX* گیاه *Argemone Mexicana* با استفاده از ساخت یک درخت فیلوژنتیکی بررسی گردید. نتایج نشان داد که *STOX* با سایر همولوگ‌های خود در گیاهان هم‌خانواده و هم‌راسته در یک گروه قرار می‌گیرد که بررسی دقیق‌تر نشان داد علت اصلی این موضوع به دلیل وجود دامنه‌های عملکردی و اسیدهای آمینه مشابه و نهایتاً عملکرد مشابه محصول این ژن‌ها در بیوسنتز آلکالوئیدها می‌باشد.

تشکیل شده در یک درخت فیلوژنتیک براساس توالی‌های کدکننده آنزیم‌های مختلف مربوط به خانواده‌های ژنی مشترک، به دلیل وجود حفاظت شدگی بالای توالی آن‌ها، در یک گروه با بیشترین قرابت قرار می‌گیرند ( Goldstein et al., 2009). در مطالعه حاضر توالی ژن *DBOX* گیاه شقایق در گروهی از گیاهانی قرار گرفت که تولید متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها به حضور گروهی از خانواده‌های آنزیمی با فعالیت اکسیدازی از جمله فلاوپروتئین‌ها بستگی دارد. در مطالعه‌ای که بر روی

1	MMSS SNILP LVTFE VLVFF SSGSW AANNLS LNGDF LQCIK KNEYS SIPIP IFTPD NSSFT TIFRS SARNL RFLTP
76	NSTQT PQFII TPHE SHVQS AVVCS QKHGF DLKVR SGGHD VEGLS YVSDT PYVLV DLINF RNIIV DLKEK TAWIQ
151	AGASL GEVYY QAANK SNNTL GFPAG FCPTV GVAGH ISGGG FGALV RKYGL ASDQV IDARI VTVDG KIYTK ETMGK
226	DLYWA IRGGG ANNFG VLLSW KVKLV PVTPV VTVAT ISRTL EQGAT DLVHK WQFVA DRLHE DVYIG LTFVS ANSSR
301	AGGKT VSVQF AFLFL GGS DR LLELM EESFP ELGLK RNETT EMKWV ESHVY FYARG RPIEL LWDRD HATKS FLKIK
376	ADYVR EPISK SGLA IWRRF VGGDS PAMLW TPFGG RMNEI SEFET PYPHR AGNIY NIMYV GNWMM ETESE KQIDW
451	MRRFY NSMAR YVSKN PRSAY INYKD LDLGV NRNNV SEAVG YVQAR SWGRK YFKSN FERLV KVKSM VDPGN FFRNK
526	QSIPP VSTWG KQ*

Figure 3. Protein sequence of *DBOX* gene that signal peptide identified using green color

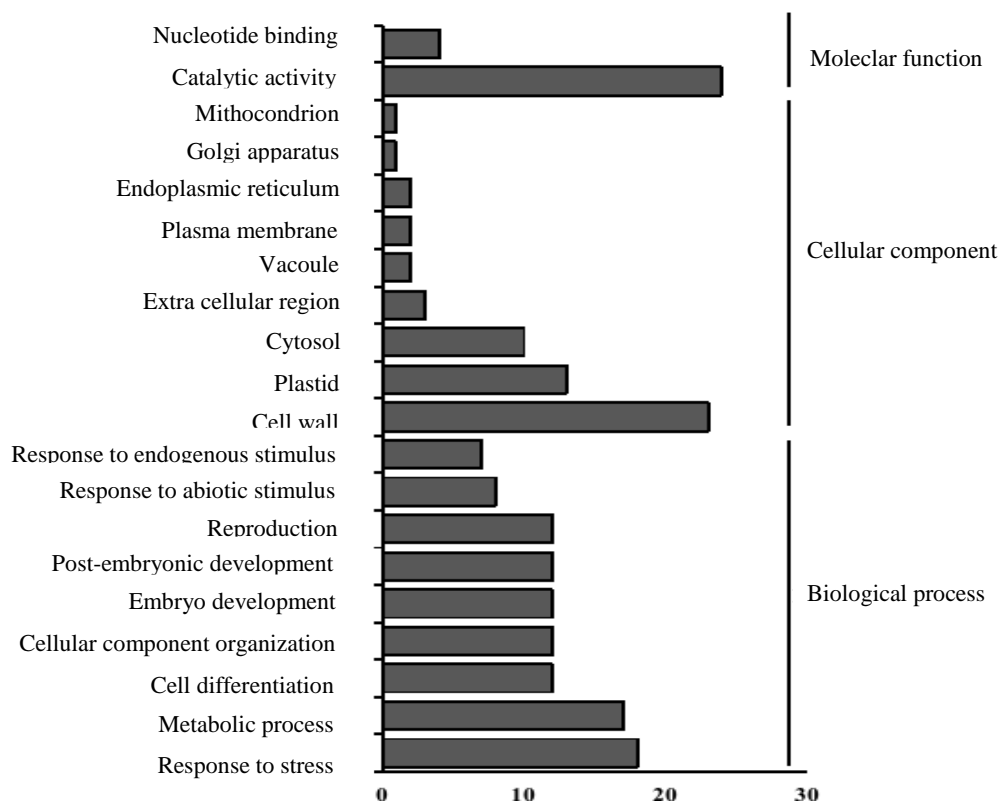


Figure 4. Molecular function, cellular component and biological process of protein coded by *DBOX* gene

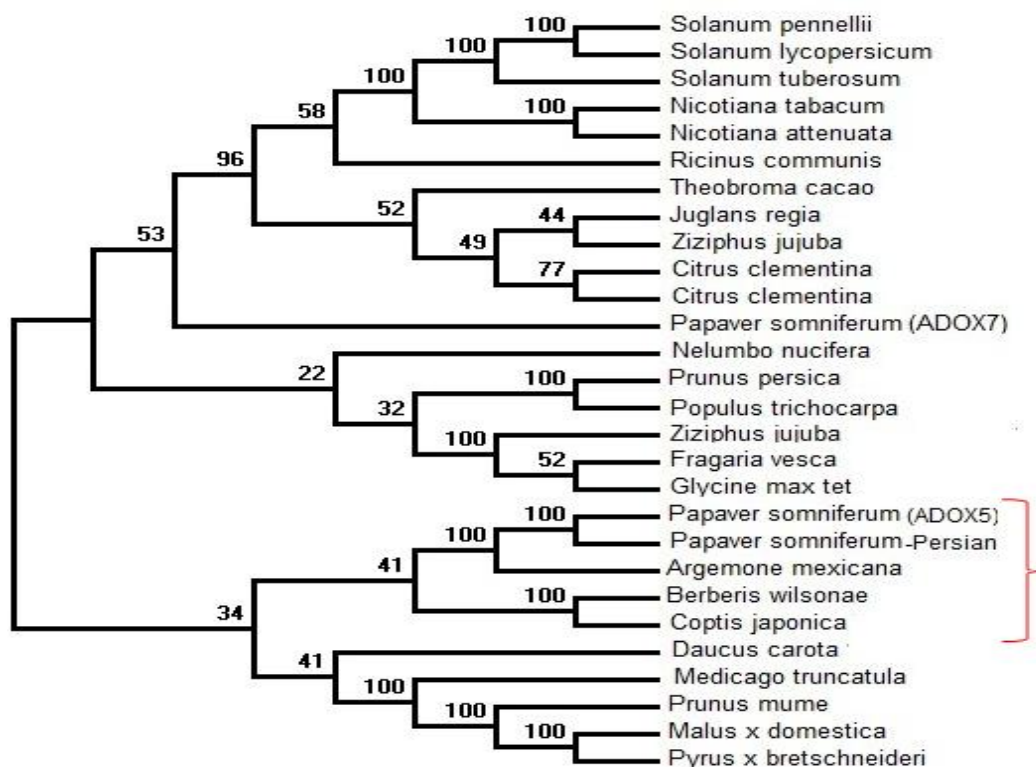


Figure 5. Phylogenetic tree for *DBOX* gene

*silico* مشابه بود. علاوه بر این در روش *real time RT-PCR* میزان بیان در کپسول بیشتر از ساقه بود و در تجزیه و تحلیل *In silico* نیز همین نسبت تفاوت تا حدودی مشاهده شد. میزان بیان در برگ در تجزیه و تحلیل *In silico* بیشتر از کپسول و ساقه بود و تفاوت کمی با بیان در گل داشت؛ در صورتی که در تکنیک *real time RT-PCR* میزان بیان در برگ تفاوت چندانی با کپسول نداشت. در مجموع در هر دو روش میزان بیان در ساقه نسبت به سایر بافت‌ها کمتر بود. (شکل ۶B). نتایج به دست آمده بر اساس نقشه حرارتی نیز در دو وضعیت مختلف ترسیم شد (شکل ۶C و ۶D). بر اساس این نقشه دیده می‌شود که الگوی بیان بین بافت‌های مختلف تفاوت دارد و سطح بیان در ریشه نسبت به بافت‌های هوایی اختلاف معنی داری دارد. در مطالعه‌ای که بر روی الگوی بیان ژن‌های *DBOX* و *BBE* بر روی کتابخانه *cdna* ساخته شده از روی *RNA* بافت‌های مختلف گیاه شقایق تجاری صورت گرفت، مشخص شد که بیان هر دو ژن در بافت ریشه بیشترین مقدار بود و کمترین بیان

با جمع آوری و تهیه اطلاعات لازم از بانک‌های اطلاعاتی می‌توان به صورت *In silico* به بررسی الگوی بیان یک ژن خاص در بافت‌ها و شرایط مختلف پرداخت (Murray et al., 2007). در همین راستا با استفاده از تجزیه و تحلیل *In silico* بیان ژن *DBOX* در بافت‌های ریشه، ساقه، کپسول (میوه)، برگ و گل گیاه شقایق، مشخص شد که این ژن از الگوی بیانی متفاوتی در بافت‌های مختلف برخوردار است. بیشترین میزان بیان در ریشه و کمترین میزان تعداد نسخه‌های آن در ساقه بود و در مجموع بافت‌های هوایی از بیان کمتری برخوردار بودند (شکل ۶A). آزمون‌های آماری Fisher exact test و  $\chi^2$  نیز تفاوت معنی داری بین الگوی بیان در بافت‌های مختلف نشان داد.

در تحقیق حاضر، نتایج به دست آمده از واکنش‌های *real-time RT-PCR* بر روی سطوح بیان ژن *DBOX* در بافت‌های مختلف برگ، ساقه، کپسول و ریشه نشان داد که بیشترین سطوح رونوشت‌های این ژن در ریشه بود و این نتایج با نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل *In*

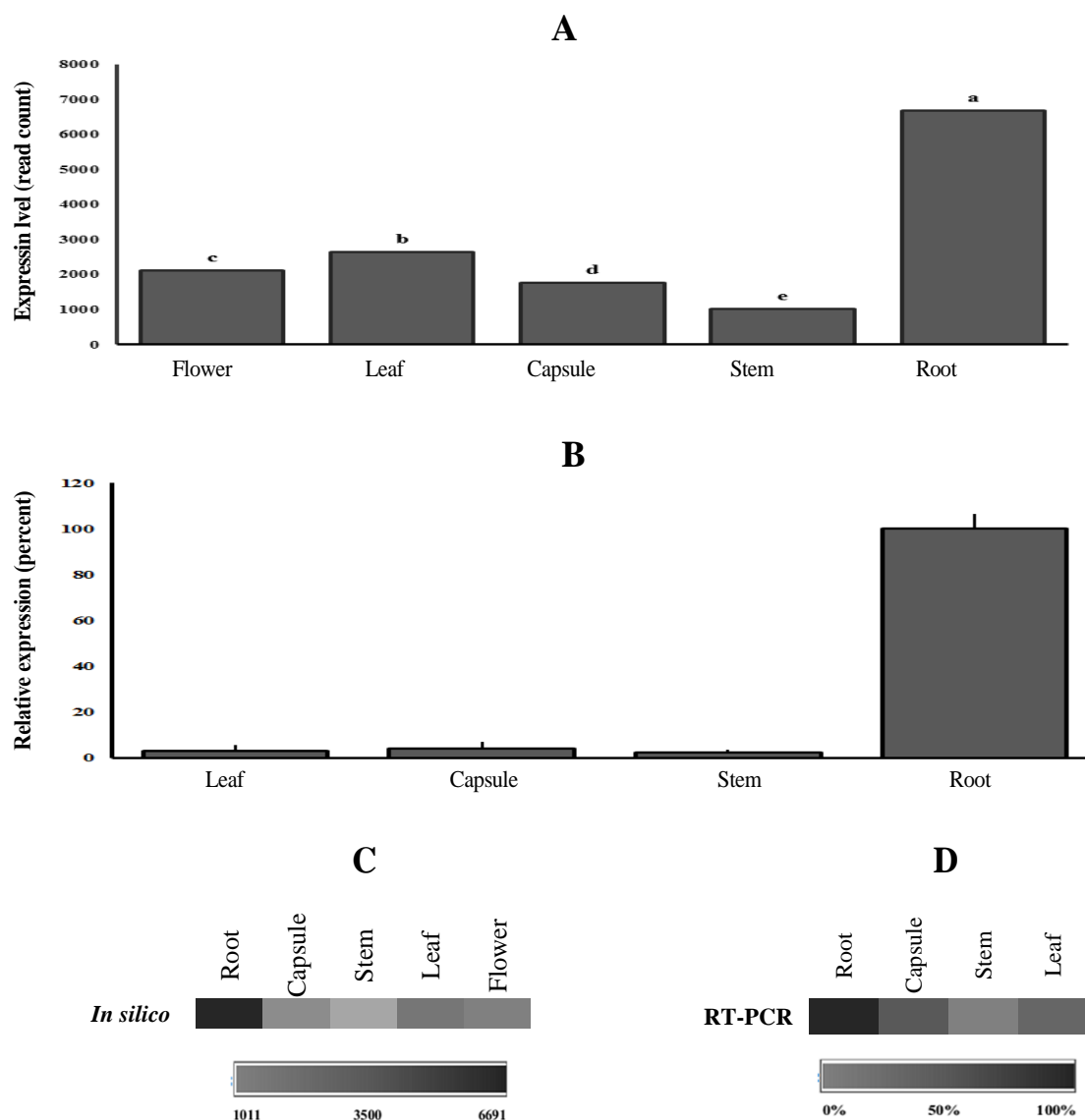


Figure 6. *DBOX* gene expression analysis in different plant tissues of *P. somniferum*. A) *In silico* analysis, B) real-time RT-PCR analysis, C) heat map of *in silico* analysis, D) heat map of real-time RT-PCR

رونوشت‌های ژن *DBOX* در ریشه دور از انتظار نیست (Beaudoin and Facchini, 2014).

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به‌طور موفقیت آمیزی توالی ژن کدکننده آنزیم دی هیدرو بنزوفنانتیریدین اکسیداز (*DBOX*) در ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق براساس اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی جداسازی گردید. به‌طور کلی نتایج بررسی توالی پروتئین کدشده توسط این ژن نشان داد که پروتئین مورد نظر عضوی از

نیز در ساقه مشاهده شد (Hagel et al., 2012). در فرایند بیوسنتز و ذخیره آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی ۳ گروه مختلف سلولی دخالت دارند. مطالعات متعدد نشان داده که نسخه‌های ژن‌های بیوسنتزی در سلول‌های همراه (*companion cells*) قرار دارند و این در حالی است که آنزیم‌های کدشده توسط این رونوشت‌ها در عناصر آبکشی قرار دارند. آلکالوئید سنگوینارین به‌طور معمول در لاتکس و آوندهای آبکشی دیده نمی‌شود و در ساختار ریشه ذخیره می‌شود و به همین دلیل سطوح بالاتر

در شقایق، به دلیل پیچیدگی‌های بالا و ارتباطات گسترده آنزیم‌ها و محصولات آن‌ها، ضروری به نظر می‌رسد که مطالعات آینده بر روی شناسایی و جداسازی سایر ژن‌های این مسیر متمرکز گردد.

### سپاس‌گزاری

از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به سبب فراهم آوردن شرایط تحقیق سپاس‌گزاری می‌شود.

خانواده فلاووپروتئین‌های حاوی FAD می‌باشد که این گروه از آنزیم‌ها نقش مهمی در تولید پروتئین‌های فعال زیستی داشته و با اعمال اکسیداسیون و احیاء در تغییر ساختار ترکیبات شیمیایی مؤثرند (Hagel et al., 2012). اطلاعات دقیق از ژن‌های مهم در مسیرهای بیوسنتزی و خصوصیات پروتئین‌های کدشده توسط آن‌ها، اولویت اصلی به کارگیری تکنیک‌های افزایش یا کاهش بیان ژن‌ها در این مسیرها می‌باشد. علیرغم شناسایی بسیاری از ژن‌های مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوینولینی

### References

- Beaudoin, G. A. and Facchini, P. J. (2014). Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19-32.
- Custers, J. H., Harrison, S. J., Sela Buurlage, M. B., Van Deventer, E., Lageweg, W., Howe, P. W., Van Der Meijs, P. J., Ponstein, A. S., Simons, B. H. and Melchers, L. S. (2004). Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *The Plant Journal*, 39(2), 147-160.
- Dastmalchi, M., Park, M. R., Morris, J. S. and Facchini, P. (2017). Family portraits: The enzymes behind benzyloquinoline alkaloid diversity. *Phytochemistry Reviews*, 17(2), 1-29.
- Desgagne-Penix, I. and Facchini, P. J. (2012). Systematic silencing of benzyloquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *The Plant Journal*, 72(2), 331-344.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349.
- Facchini, P. J. and De Luca, V. (1994). Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26684-26690.
- Fraaije, M. W. and Mattevi, A. (2000). Flavoenzymes: Diverse catalysts with recurrent features. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(4), 126-132.
- Gesell, A., Chavez, M. L. D., Kramell, R., Piotrowski, M., Macheroux, P. and Kutchan, T. M. (2011). Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta*, 233(6), 1185-1197.
- Goldstein, P., Zucko, J., Vujaklija, D., Krisko, A., Hranueli, D., Long, P. F., Etchebest, C., Basrak, B. and Cullum, J. (2009). Clustering of protein domains for functional and evolutionary studies. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 335-346.
- Hagel, J. M. and Facchini, P. J. (2013). Benzyloquinoline alkaloid metabolism a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647-672.
- Hagel, J. M., Beaudoin, G. A., Fossati, E., Ekins, A., Martin, V. J. and Facchini, P. J. (2012). Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42972-42983.
- Jalilian, A., Ismaili, A., Nazarian Firouzabadi, F. and Hosseini, S. Z. (2017). Induction of transgenic hairy

- roots in medicinal plant poppy (*Papaver somniferum* L.) by agrobacterium rhizogenes-mediated transformation. *Plant Productions*, 39(4), 1-14. [In Farsi]
- Kishore Sakharkar, M. and Kanguane, P. (2004). Genome SEGE: A database for 'intronless' genes in eukaryotic genomes. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 1-5.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D. I. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 28(43), 222-226.
- Murray, D., Doran, P., MacMathuna, P. and Moss, A. C. (2007). In silico gene expression analysis an overview. *Molecular Cancer*, 6(1), 50-60.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and Von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10(1), 1-6.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G. and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.
- Siahmansour, Sh., Ismaili, A. and Nazarian Firouzabadi, F. (2018). Effect of different elicitor treatments on hairy root of medicinal plant poppies (*Papaver somniferum* L.). *Plant Productions*, 41(1), 29-42. [In Farsi]
- Srivastava, V. K., Agrawal, S. and Sahu, S. (2011). Association of acute onset hypertension and tachycardia following intracisternal papaverine administration during intracranial aneurysm surgery: A case report and review of the literature. *Journal of Clinical Anesthesia*, 23(3), 224-226.
- Thompson, J. D., Gibson, T. and Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using Clustal W and Clustal X. *Current Protocols in Bioinformatics*. USA: WILEY Press.
- Yan, H., Jiang, C., Li, X., Sheng, L., Dong, Q., Peng, X., Li, Q., Zhao, Y., Jiang, H. and Cheng, B. (2014). PIGD: A database for intronless genes in the Poaceae. *BMC Genomics*, 15(1), 832-839.
- Yang, X., Jawdy, S., Tschaplinski, T. J. and Tuskan, G. A. (2009). Genome-wide identification of lineage-specific genes in Arabidopsis, Oryza and Populus. *Genomics*, 93(5), 473-480.

