

مقایسه خصوصیات ساختاری آنزیم بتا-گلوکوزیداز در حشرات Structural characteristics comparison of β -glucosidase enzyme in insects

ثمین صدیق

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۳

پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۰

چکیده

آنزیم بتا-گلوکوزیداز در همه گیاهان، جانوران، قارچها و باکتریها وجود دارد. بتا-گلوکوزیدازها هیدرولیز بتا-۱ و ۴ باقیمانده منوساکاریدها از گلیکوزیدها را کاتالیز کرده و گلوکز آزاد می کنند. از این رو با توجه به منوساکاریدی که از زنجیره جدا می شود، این آنزیم بتا-گلوکوزیداز نامگذاری می شود. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی آنزیم بتا-گلوکوزیداز (β -glucosidase) در سیزده گونه مختلف از حشرات متعلق به خانواده های مختلف انجام گرفت. تجزیه و تحلیل ساختار اولیه و ثانویه پروتئین بتا-گلوکوزیداز در سیزده گونه از حشرات انتخاب شده توسط ابزارهای ProtParam و SOPMA انجام شد. دامین های گذرنده از غشا و پپتید نشانه در هر یک از نمونه ها به ترتیب با ابزارهای TMHMM و SignalP تعیین گردیدند. تعداد اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، شاخص ناپایداری، متوسط آبدوستی و شاخص آلیفاتیک در هر یک از نمونه های به دست آمده و با هم مقایسه گردید. طبق نتایج به دست آمده تنها گونه *Trachymyrmex cornetzi* دارای دامین گذرنده از غشا بود، همچنین پپتید نشانه تنها در گونه های *Acyrtosiphon pisum*، *Bombyx mori* و *Cephus cinctus* وجود داشت. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل ساختاری، شباهت زیادی بین پروتئین های بتا-گلوکوزیداز در گونه های مختلف حشرات وجود دارند هر چند که در برخی گونه ها تفاوت هایی هم مشاهده گردید. داده های به دست آمده پیش زمینه ای را برای مطالعات آنزیم های گوارشی از جمله بتا-گلوکوزیداز و تعیین ساختار این پروتئین در حشرات فراهم می آورد.

واژگان کلیدی: آنزیم، بتا-گلوکوزیداز، حشرات، ساختار اولیه، ساختار ثانویه

مقدمه

گلوکوزیدازها شامل آنزیم‌هایی می‌باشند که الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کنند. گلیکوزیدازها معمولاً بر اساس نوع منوساکاریدهایی که از آن‌ها آزاد می‌شود، نامگذاری می‌شوند (Terra and Ferreira, 1994). اگر منوساکارید آزاد شده گلوکز باشد این آنزیم بتا-گلوکوزیداز (β -glucosidase, β glu) نامیده می‌شود (بندانی، ۱۳۹۲). موجودات زنده‌ای که کربوهیدرات مصرف می‌کنند (بعضی قارچ‌ها، باکتری‌ها و موربانه‌ها) و منابع غذایی آن‌ها دارای باندهای بتا- ۱ و ۴ است، به بتا- گلوکوزیدازها نیاز دارند و این آنزیم نقش مهمی را در هضم کربوهیدرات در حشرات بازی می‌کند. این آنزیم‌ها روی محدوده وسیعی از ترکیبات در گیاهان عمل می‌کنند. این ترکیبات در گیاهان مقاوم به حشرات و حشرات شکارگر از طریق گیاهخواری شرکت دارند. اکثر این ترکیبات ال-گلوکوزیدازها هستند که از طریق هیدرولیز کردن، سیانید (یا دیگر ترکیبات سمی) آزاد می‌کنند که برای بسیاری از حشرات گیاهخوار سمی هستند (Terra et al., 1996). بتا-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.21) آنزیمی است که روی گروه‌های بتا- ۱ و ۴ بین دو مولکول گلوکز یا زیر گروه‌های گلوکز فعالیت کرده و این گروه‌های بزرگ را هیدرولیز می‌کند (بتا- ۱ و ۴) مثل دی‌ساکارید سلوبیوز. نقش فیزیولوژیک گلوکوزیدازها آزاد کردن گلوکز از الیگوساکاریدهای کوچک است که سپس توسط اپیتلیوم معده جذب خواهد شد. گلیکوزیدازها آنزیم‌های خارجی هستند که گروه‌های O-glycosyl کربوهیدرات‌ها را هیدرولیز می‌کنند (Terra et al., 1979). به عبارت دیگر آلفا و بتا-گلوکوزیداز قسمت انتهایی هیدرولیز را بدون کاهش اتصالات آلفا- ۱ و ۴ گلوکز از آریل گلوکوزیدازها (مثل P-nitrophenyl β -D-glucoside و P-nitrophenyl α -D-glucoside)، دی‌ساکاریدها یا الیگوساکاریدها کاتالیز می‌کنند (Silva and Terra, 1995). محصولات گلوکز سپس به داخل همولنف جذب می‌شوند. بسیاری از حشرات از جمله کرم ساقه خوار برنج، که آفات مهم گندمیان را تشکیل می‌دهند (رژیم غذایی غنی از پلی ساکارید) برای بقا به گلوکوزیدازهای خود (آلفا آمیلاز، گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها) وابسته‌اند. در حشرات پنج گلوکوزیداز گوارشی شامل آلفا- گلوکوزیداز (مالتوز، ساکارز، تری هالوز، رافینوز و استاکیوز (Stachyose) را هیدرولیز می‌کند)، بتا- گلوکوزیداز (سلوبیوز، جنتوبیوز و متیل B- گلیکوزید را هیدرولیز می‌کند)، آلفا- گالاکتوزیداز (ملیبیوز، رافینوز و استاکیوز را هیدرولیز می‌کند)، بتا- گالاکتوزیداز (لاکتوز را هیدرولیز می‌کند) و بتا-فروکتوفرانوزیداز (ساکارز و رافینوز را هیدرولیز می‌کند) شناخته شده است (Mendiola-Olaya et al., 2000; Zibae et al., 2008). α و β -گلوکوزیداز از بسیاری از حشرات شامل *Dysdercus peruvianus* Herrich-Schaefer (Hemiptera: Pyrrhocoridae)، *Sitophilus zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae)، *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) و *Drosophila melanogaster* L. (Diptera: Drosophilidae)، *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) و *Eurygaster integriceps* (Lepidoptera: Notodontidae)، *Thaumetopoea pittocampa* Schiffer muller (Hemiptera: Scutelleridae)، *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) و *Haplothrips tritici* Baker, 1991, 1983; Siva and Terra, 1995;) (Thysanoptera: Phlaeothripidae) جداسازی و شناسایی شده است (Huber and Mathison, 1976; Prativiel-Sosa et al., 1986; Seddigh et al., 2012). Horie (1975) نشان داد که فعالیت گلوکوزیدازها در سن‌های Coreidae و Pentatomidae پائین بوده و در بعضی از گونه‌ها هیچ‌گونه فعالیت بتا- گلوکوزیداز وجود نداشت.

مطالعه بر روی آنزیم‌های گوارشی حشرات بسیار مهم است، زیرا لوله گوارش رابطی بین حشرات و محیط زیست آن‌ها است. بنابراین درک وظایف آنزیم‌های گوارشی به دلیل یافتن روش‌هایی برای کنترل حشرات، مثل استفاده از ممانعت کننده‌های آنزیمی و گیاهان ترانسژنیک برای کنترل حشرات آفت، مهم است (Morton et al., 2000; Bandani et al., 2009). با در نظر گرفتن اهمیت هضم کربوهیدرات به عنوان هدفی برای کنترل برخی آفات مانند سن گندم، مطالعه بر روی آنزیم‌های گوارشی قطعاً می‌تواند در اتخاذ روش‌های جدید کنترل مهم باشد. همچنین ثابت شده

که ممانعت کننده‌های آنزیم‌های حشرات، یک سیستم بیوتکنولوژی مهم در کنترل حشرات آفت (به‌ویژه از طریق استفاده از وارپته‌های مقاوم) بوده و می‌تواند به عنوان یک استراتژی کنترل به کار رود (Muralidharan and Pasalu, 2006). به علاوه گلوکوزیدازها به دلیل اهمیت آن‌ها در تجزیه متابولیت‌های ثانویه گیاهان نقش مهمی در رابطه تکاملی گیاه- گیاهخوار دارند (Hemming and Lindroth, 1999, 2000). از طرفی مطالعه بتا-گلوکوزیداز در حشرات گیاهخوار تنها برای درک بیوشیمیایی هضم نبوده، بلکه برای توسعه استراتژی‌های مدیریت حشرات آفت مهم است. روش‌های مهندسی ژنتیک خواهند توانست ژن‌هایی تولید کنند که ترکیبات سمی را به گیاهان هدف منتقل کنند به طوری که باعث مقاومت گیاه به حشرات گیاهخوار شود. کنترل آفات با وارپته‌های مقاوم قابل استفاده یکی از مهم‌ترین آزمایشاتی است که به ممانعت کننده‌ها در گیاهان وابسته است. از این رو شناسایی آنزیم‌های گوارشی و بخصوص آزمایش اثرات ممانعتی روی فعالیت آنزیم می‌تواند مفید باشد. نتایج موفقیت آمیز ممانعت کننده‌ها در گذشته ممانعت کامل آنزیم‌های هدف را نشان می‌دهد. گاهی حتی ممانعت جزئی می‌تواند باعث کنترل اساسی حشرات آفت شود (Ishimoto and Kitamura, 1989).

در این مطالعه تجزیه و تحلیل آنزیم β glu با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک در ۱۳ گونه مختلف حشرات برای پیش‌بینی ساختارهای اولیه و ثانویه و سایر خصوصیات ساختاری این آنزیم انجام گرفت. نتایج این بررسی می‌تواند پیش زمینه‌ای برای مطالعات آینده روی این آنزیم باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

به منظور تجزیه بیوانفورماتیکی و مقایسه ساختاری آنزیمی بتا-گلوکوزیداز (β -glucosidase) در حشرات، توالی داده‌های اصلی (Reference Sequences) با دو فرمت FASTA و GenBank در تمامی حشراتی که پروتئین مورد نظر در آن‌ها شناسایی شده است از سایت NCBI جستجو و جمع‌آوری گردید (تاریخ دریافت داده‌ها دی ۱۳۹۵، ژانویه ۲۰۱۷). با توجه به تعداد زیاد توالی‌های شناسایی شده از این پروتئین در هر گونه از حشرات امکان بررسی تمام توالی‌ها در یک بررسی امکان پذیر نیست، لذا از هر گونه از حشرات یک توالی انتخاب شده و به عنوان داده اولیه مورد استفاده قرار گرفت، به طوری که تعداد داده‌های نهایی ۱۳ عدد بود. حشرات مورد بررسی متعلق به خانواده‌های مختلف و از راسته‌های Homoptera، Diptera، Hymenoptera، Lepidoptera و Phthiraptera بود. به منظور سهولت در تشخیص داده‌ها در تجزیه‌های مورد نظر برای هر یک از آن‌ها یک مشخصه در نظر گرفته شد. به این صورت که ابتدا حرف اول جنس و گونه مورد نظر، سپس نام پروتئین (β glu) نوشته شد. در جدول ۱ مشخصات داده‌های مربوط به حشرات مورد استفاده در این تحقیق شامل نام علمی، خانواده، راسته، مشخصه مورد استفاده و شماره دسترسی (Accession number) آن داده پروتئینی در بانک NCBI ذکر شده است.

بررسی ساختاری آنزیم β -glucosidase

به منظور بررسی ساختار اولیه و ثانویه و خصوصیات مختلف آنزیم β glu در حشرات از ۱۳ گونه حشره که این پروتئین در آن‌ها توالی‌یابی شده است، استفاده گردید. ساختار این پروتئین به وسیله ابزارهای مختلف موجود در سایت <http://www.expasy.org> تعیین گردید. در بررسی ساختار اولیه پروتئین‌ها، نقطه ایزوالکتریک (مقدار PH خاص که در آن بار ناخالص یک مولکول آمفوتریک صفر است)، وزن مولکولی، نوع و تعداد اسیدهای آمینه، شاخص بی‌ثباتی، شاخص آلیفاتیک و متوسط آبدوستی (GRAVY) با استفاده از ابزار ProtParam تعیین گردید (Gasteiger, et al., 2005). ساختار دو بعدی پروتئین‌ها برای تعیین درصد مارپیچ آلفا، صفحه بتا و فنر مارپیچ تصادفی با ابزار SOPMA تعیین

گردید (Geourjon and Deleage, 1995). برای تشخیص وجود و مکان پپتید نشانه از ابزار SignalP استفاده شد (Petersen *et al.*, 2011). برای تشخیص دُمین‌های گذرنده از غشاء از ابزار TMHMM استفاده شد (Moller *et al.*, 2001). TMHMM یک ابزار اینترنتی مبتنی بر مدل مخفی مارکوف است. هنگامی که یک توالی مورد تقاضا اسکن می‌شود احتمال داشتن مارپیچ آلفا در آن محاسبه می‌شود و با کمک قانون مثبت-داخل جهت آن نیز معین می‌شود. این ابزار نتایج را به صورت گرافیکی نیز نمایش می‌دهد.

جدول ۱- سیزده گونه مختلف از حشرات متعلق به راسته-های مختلف که در این تحقیق استفاده شده است

Table 1. The list of thirteen insect species of different orders analyzed in the current study

ردیف Index	نام علمی حشرات Insect's Scientific Names	اختصار نویسی Abbreviation	خانواده Family	راسته Order	شماره دسترسی Accession Number
1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Aphididae	Homoptera	<i>Ap</i> -βglu	XP_016663400
2	<i>Apis florea</i>	Apidae	Hymenoptera	<i>Af</i> -βglu	XZP_012343697
3	<i>Bombus impatiens</i>	Apidae	Hymenoptera	<i>Bi</i> -βglu	XP_003493101
4	<i>Bombyx mori</i>	Bombycidae	Lepidoptera	<i>Bm</i> -βglu	NP_001037073
5	<i>Cephus cinctus</i>	Cephidae	Hymenoptera	<i>Cc</i> -βglu	XP_015601666
6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Culicidae	Diptera	<i>Cq</i> -βglu	XP_001864465
7	<i>Diachasma alloenum</i>	Braconidae	Hymenoptera	<i>Da</i> -βglu	XP_015125139
8	<i>Drosophila takahashii</i>	Drosophilidae	Diptera	<i>Dt</i> -βglu	XP_016996622
9	<i>Monomorium pharaonis</i>	Formicidae	Hymenoptera	<i>Mp</i> -βglu	XP_012541869
10	<i>Pediculus humanus corporis</i>	Pediculidae	Phthiraptera	<i>Ph</i> -βglu	XP_002426209
11	<i>Plutella xylostella</i>	Plutellidae	Lepidoptera	<i>Px</i> -βglu	XP_011567357
12	<i>Rhagoletis zephyria</i>	Tephritidae	Diptera	<i>Rz</i> -βglu	XP_017463641
13	<i>Trachymyrmex cornetzi</i>	Formicidae	Hymenoptera	<i>Tc</i> -βglu	XP_018367192

نتایج

در این بررسی تعداد ۱۳ توالی پروتئین βglu از گونه‌های مختلف حشرات متعلق به پنج راسته مختلف با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور شناسایی ساختار و وظایف پروتئین βglu سیزده گونه مختلف از حشرات که توالی این پروتئین در آن‌ها شناسایی شده بود انتخاب شده و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی ساختار اولیه با استفاده از ابزار Protparam انجام گرفت. طول توالی‌های انتخاب شده به عنوان نمایندگان رده حشرات بین ۲۶۹ تا ۷۶۰ بود. تغییرات وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک به ترتیب بین ۵۱/۸۶۰۰۹-۲۷۸۵۸/۸۱ دالتون و ۹/۱۴-۴/۵۲ مشاهده گردید. بررسی شاخص ناپایداری پروتئین βglu در حشرات مورد بررسی نشان داد که بیشترین این شاخص مربوط به خانواده Culicidae و گونه *Culex quinquefasciatus* و کمترین آن متعلق به خانواده Cephidae و گونه *Cephus cinctus* است. کمترین شاخص آلیفاتیک در *Cephus cinctus* با شاخص ۵۸/۸۱ و بیشترین آن در *Trachymyrmex cornetzi* با شاخص ۱۰۷/۰۸ مشاهده شد. نرخ شاخص GRAVY در حشرات مورد آزمایش بین ۰/۵۶۸- (Cephus cinctus) و ۰/۰۷۹ (Monomorium pharaonis) متغیر بود (جدول ۲).

پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین βglu در حشرات مورد آزمایش با استفاده از ابزار SOPMA انجام شد تا نسبت مارپیچ آلفا، صفحه بتا، فنر مارپیچ تصادفی و صفحات گسترده در توالی پروتئین تعیین گردد. پیش‌بینی ساختار ثانویه بر اساس شبکه‌های عصبی انجام گرفته (Combet, *et al.*, 2000) و نشان داد که بیشترین ساختار در گونه‌های مختلف حشرات متفاوت بوده و ممکن است متعلق به هر یک از مارپیچ‌های آلفا، فنرهای مارپیچ تصادفی و صفحات گسترده باشد در حالی که در تمام گونه‌ها کمترین ساختار مربوط به صفحات بتا است (جدول ۳).

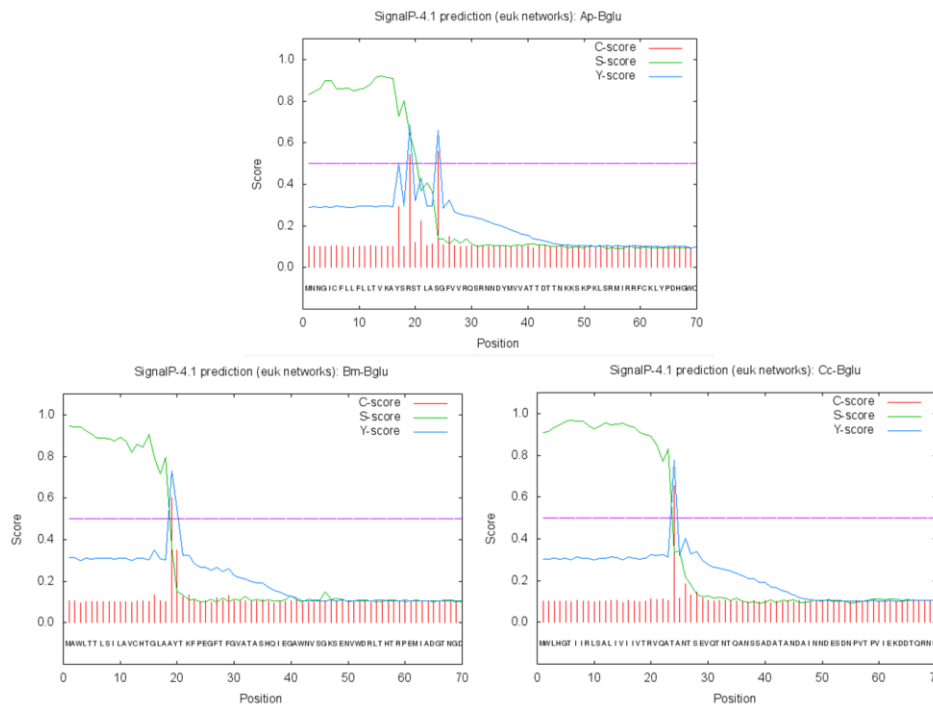
جدول ۲- ساختار اولیه آنزیم β glu در گونه‌های مختلف حشراتTable 2. Primary structure of β glu in different insect species

ردیف Index	نمونه Sample	مارپیچ آلفا Alpha helix	صفحات گسترده Extended strand	صفحات بتا Beta turn	فتر مارپیچ تصادفی Random coil
1	<i>Ap</i> - β glu	19.48	25.76	4.33	50.43
2	<i>Af</i> - β glu	45.74	18.89	9.44	25.93
3	<i>Bi</i> - β glu	38.49	20.29	11.92	29.29
4	<i>Bm</i> - β glu	38.29	17.92	9.78	34.01
5	<i>Cc</i> - β glu	18.59	21.56	6.69	53.16
6	<i>Cq</i> - β glu	40.78	19.22	11.37	28.63
7	<i>Da</i> - β glu	38.81	18.81	9.83	32.54
8	<i>Dt</i> - β glu	29.82	20.87	11.93	37.38
9	<i>Mp</i> - β glu	46.87	13.43	11.04	28.66
10	<i>Ph</i> - β glu	31.71	21.05	10.66	36.58
11	<i>Px</i> - β glu	45.00	15.66	12.63	26.71
12	<i>Rz</i> - β glu	34.76	18.39	9.57	37.28
13	<i>Tc</i> - β glu	56.57	19.34	9.12	14.96

جدول ۳- مشخصات ساختار ثانویه آنزیم β glu در گونه‌های مختلف حشراتTable 3. Secondary structure of β glu in different insect species

ردیف Index	نمونه Sample	طول Length	Gravy	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	شاخص ناپایداری instability index	وزن مولکولی Molecular weight	نقطه ایزوالکتریک Theoretical PI
1	<i>Ap</i> - β glu	462	-0.178	75.41	20.37	50521.08	4.72
2	<i>Af</i> - β glu	540	-0.304	93.43	38.75	59839.66	8.85
3	<i>Bi</i> - β glu	478	-0.334	80.38	28.99	54623.81	5.64
4	<i>Bm</i> - β glu	491	-0.375	77.11	31.89	55595.96	4.80
5	<i>Cc</i> - β glu	269	-0.568	58.81	37.69	27858.81	4.52
6	<i>Cq</i> - β glu	510	-0.302	85.06	42.75	58217.69	5.30
7	<i>Da</i> - β glu	590	-0.162	90.83	38.34	64697.12	5.43
8	<i>Dt</i> - β glu	503	-0.159	93.26	38.49	55419.98	5.37
9	<i>Mp</i> - β glu	335	0.079	98.54	37.21	35659.51	5.38
10	<i>Ph</i> - β glu	760	-0.415	77.49	32.95	85895.13	6.11
11	<i>Px</i> - β glu	760	-0.312	83.70	41.85	86009.51	5.40
12	<i>Rz</i> - β glu	397	-0.241	76.93	30.68	42431.12	4.53
13	<i>Tc</i> - β glu	274	0.043	107.08	23.78	32413.45	9.14

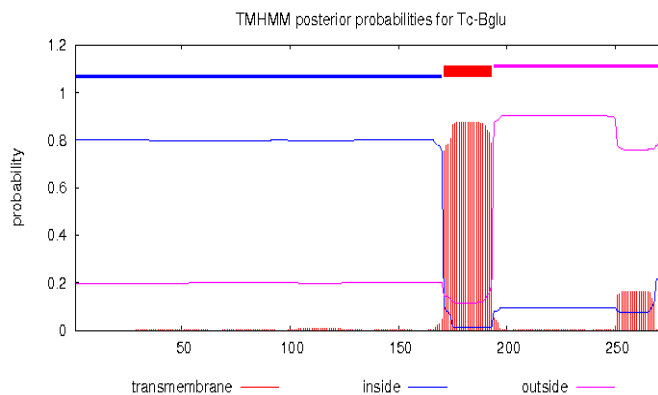
به منظور بررسی پپتید نشانه از ابزار SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) استفاده شد. نتایج بدست آمده بر اساس شبکه‌های عصبی (NN) و مدل‌های مخفی مارکوف (HMM) نشان داد که تنها گونه‌های *Cephus cinctus* و *Bombyx mori* دارای پپتید نشانه هستند (شکل ۱). همچنین محل پپتیدهای نشانه در ساختار پروتئینی نمونه‌های مورد بررسی تعیین گردید.



شکل ۱- تعیین پپتید نشانه در نمونه‌های *Ap*- β glu و *Bm*- β glu و *Cc*- β glu

Fig. 1. Signal peptide identification in *Ap*- β glu, *Bm*- β glu and *Cc*- β glu samples

به منظور بررسی دُمین‌های گذرنده از غشاء از ابزار TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده در میان گونه‌های مورد آزمایش تنها گونه *Trachymyrmex cornetzi* دارای دُمین گذرنده از غشاء می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- پیش‌بینی دُمین گذرنده از غشاء در *Tc*- β glu

Fig. 2. Prediction of transmembrane helices in *Tc*- β glu

بحث

امروزه توالی‌های مولکولی به دست آمده از موجودات مختلف بسیار زیاد بوده و تنها راه استفاده از این اطلاعات به کارگیری ابزارهای بیوانفورماتیک است (Teufel, 2006) به طوری که علم بیوانفورماتیک توانسته است نگرشی جدید را نسبت به فرآیندهای موجود در سلول‌ها و موجودات مختلف فراهم آورد (Darabi and Seddigh, 2015; Seddigh and Darabi, 2016).

در این بررسی، از ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی خصوصیات و ساختارهای مختلف آنزیم β glu در سیزده گونه مختلف حشرات، استفاده گردید. بتا-گلیکوزیدازها (EC 3.2.1) هیدرولیز منوساکاریدها را از قسمت انتهایی غیراحیا کننده که دارای پیوند بتا است، کاتالیز می‌کنند. بسته به نوع منوساکاریدی که آزاد می‌شود، بتا-گلیکوزیداز ممکن است بتا-گلوکوزیداز (در صورتی که منوساکارید آزاد شده گلوکز باشد)، بتا-گالاکتوزیداز (اگر منوساکارید آزاد شده گالاکتوز باشد) و بتا-گزیلوزیداز (اگر منوساکارید آزاد شده گزیلوز باشد) خوانده شود (بندانی ۱۳۹۲). (Esen (1993 نشان داد که بتا-گلوکوزیدازها در تمام گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و حیوانات و به خصوص در اغلب راسته‌های حشرات یافت شده‌اند. این آنزیم در حشراتی که از سلولز تغذیه می‌کنند حضور داشته و نقش مهمی در هیدرولیز ترکیبات همی سلولوتیک دارد. بتا-گلوکوزیدازها دارای وزن مولکولی ۳۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون، اِپتیمم pH حدود ۴/۵ تا ۶/۵ و نقطه ایزوالکتریک (PI) بین ۳/۷ تا ۶/۸ هستند (بندانی، ۱۳۹۲). بررسی ساختار اولیه پروتئین β glu در سیزده گونه حشره مورد مطالعه نشان داد که Cc - β glu با ۲۶۹ اسید آمینه دارای کمترین وزن مولکولی بوده و نمونه‌های Px - β glu و Ph - β glu هر دو با ۷۶۰ اسید آمینه دارای بیشترین تعداد اسید آمینه بودند. در حالی که بیشترین وزن مولکولی متعلق به نمونه Px - β glu با وزن مولکولی ۸۶۰۰۹/۵۱ دالتون بود. نقطه ایزوالکتریک، نقطه‌ای در pH است که در آن، پروتئین در میدان الکتریکی حرکت و مهاجرت نمی‌کند. این نقطه نقش مهمی در تخلیص پروتئین‌ها دارد. نقطه ایزوالکتریک کم‌تر از ۷ نشان دهنده پروتئین اسیدی و بیش‌تر از ۷ نشان دهنده بازی بودن پروتئین است. در تجزیه و تحلیل نقطه ایزوالکتریک توسط سرور Protparam نشان داده شد که بیشترین نقطه ایزوالکتریک متعلق به Tc - β glu (۹/۱۴) و کمترین آن متعلق به Cc - β glu با نقطه ایزوالکتریک ۴/۵۲ بود. در این بررسی مشخص گردید که نقطه ایزوالکتریک در گونه‌های *Apis florea* و *T. cornetzi* بالاتر از ۷ و در سایر گونه‌ها کم‌تر از ۷ بود. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که β glu به جز این دو گونه، در حشرات در طبیعت دارای خاصیت اسیدی است. این نتایج با آنچه قبلاً بندانی (۱۳۹۲) راجع به نقطه ایزوالکتریک در حشرات ذکر کرده بود تا حدی تفاوت داشت. معیار Gravy یک پروتئین از طریق تقسیم مجموع میزان هیدروپسی تمام اسیدهای آمینه بر تعداد اسیدهای آمینه موجود در توالی محاسبه می‌شود (Kyte and Doolittle, 1982). شاخص GRAVY پروتئین‌ها بین اعداد مثبت و منفی تغییر می‌کند. به طوری که اگر این شاخص منفی باشد پروتئین تقریباً کروی (دارای خاصیت آب‌دوستی) است و اگر بالاتر از صفر و مثبت باشد نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر غشایی (دارای خاصیت آب‌گریزی) می‌باشد. در بررسی انجام گرفته مشخص گردید که شاخص GRAVY در تمام حشرات مورد مطالعه به جز دو گونه از مورچه‌های Formicidae منفی می‌باشد. به عبارت دیگر این نتایج نشان می‌دهد که در بین حشرات مورد بررسی، به جز مورچه‌ها پروتئین β glu دارای خاصیت آب‌دوستی است. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین اندازه حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک اسیدهای آمینه آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین در پروتئین‌ها می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شد بیشترین و کمترین شاخص آلیفاتیک متعلق به حشرات راسته Hymenoptera است، به طوری که بیشترین آن متعلق به Tc - β glu و کمترین شاخص آلیفاتیک در Cc - β glu مشاهده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی بالا بودن شاخص آلیفاتیک در پروتئین β glu نشان دهنده پایداری ساختاری این پروتئین می‌باشد. ضریب ناپایداری یک پروتئین به منظور تعیین پایداری پروتئین در محیط لوله آزمایش به کار می‌رود. اگر این ضریب کم‌تر از ۴۰ باشد آن پروتئین احتمالاً در تیوب آزمایش پایدار و اگر

بیشتر از ۴۰ باشد ناپایدار خواهد بود (Guruprasad *et al.*, 1990). نتایج این بررسی نشان داد که تنها دو نمونه $Cq-\beta\text{glu}$ و $Px-\beta\text{glu}$ دارای ساختار ناپایدار بوده و سایرین دارای ساختار پایداری بودند. بررسی ساختار دوم پروتئین βglu در حشرات مورد آزمایش نشان داد که مارپیچ آلفا و فنر مارپیچ تصادفی دارای بیشترین درصد پراکندگی بوده و صفحات گسترده و صفحات بتا به ترتیب با بیشترین میزان فراوانی در بین این ساختارها پراکنده شده‌اند. در حالی که در نمونه‌های $Ap-\beta\text{glu}$ و $Cc-\beta\text{glu}$ بیشترین میزان فراوانی مربوط به فنر مارپیچ تصادفی و صفحات گسترده و در $Tc-\beta\text{glu}$ مارپیچ آلفا و صفحات گسترده بودند.

سیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی که به صورت پیش ساز سنتز می‌شوند برای فعال شدن دچار تغییرات پروتئولیتیکی شده و به بخش‌های ویژه غشاء دار مانند هسته، کلروپلاست، میتوکندری و پروکسی زوم‌ها منتقل می‌شوند. برای حمل این پروتئین‌ها پپتیدهای نشانه ویژه‌ای وجود دارند. یکی از ابزارهای شناسایی پپتیدهای نشانه و تعیین جایگاه آن‌ها در ساختار پروتئین، ابزار SignalP است. بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی، $Ap-\beta\text{glu}$ ، $Bm-\beta\text{glu}$ و $Cc-\beta\text{glu}$ دارای پپتید نشانه بودند که به ترتیب در دو نمونه اول بین اسید آمینه‌های ۱۸-۱ و در نمونه سوم بین اسید آمینه‌های ۲۳-۱ قرار داشت.

توالی حدود ۲۵ اسید آمینه آگریز به همراه یک اسید آمینه قطبی که از غشاء سلول‌ها عبور می‌کنند، تحت عنوان دُمین‌های گذرنده از غشاء نامیده می‌شوند. دُمین‌های گذرنده از غشاء بیش از ۳۰٪ کل پروتئین‌های سلولی را به خود اختصاص می‌دهند و مسئول عملکردهای بسیار مهمی از جمله انتقال مواد از غشاء، تبدیل انرژی و... می‌باشند (Ramasarma *et al.*, 2012). طبق نتایج به دست آمده از ابزار TNHMM از میان گونه‌های مورد بررسی، تنها $Tc-\beta\text{glu}$ دارای یک دُمین گذرنده از غشاء در فاصله اسید آمینه‌های ۱۹۳-۱۷۱ بود. این تحقیق نشان می‌دهد که پروتئین βglu در حشرات از نظر ساختاری بسیار به هم مشابه بوده و این مسأله می‌تواند یافتن توالی و ساختار این آنزیم را در سایر حشرات آسان‌تر نموده و رهنمون تحقیقات آینده باشد.

References

منابع

- بندانی، ع. ۱۳۹۲. فیزیولوژی حشرات، گوارش، دفع، میکروارگانیسم‌های همزیست، سوخت و ساز. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، ۳۶۲ صفحه.
- Baker, J. E. 1983.** Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochemistry* 13: 421-428.
- Baker, J. E. 1991.** Purification and partial characterization of α -amylase allozymes from the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry* 21(3): 303-311.
- Bandani, A. R., Kazzazi, M. and Mehrabadi, M. 2009.** Purification and characterization of midgut α -amylases of *Eurygaster integriceps*. *Entomological Science* 12(1): 43-50.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deleage, G. 2000.** NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 147-150.
- Darabi, M. and Seddigh, S. 2015.** Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. *Plant Systematics and Evolution* 301: 2399-2417.
- Esen, A. 1993.** Beta glucosidases: overview. Pp. 1-14. In: Esen A. (ed.) *Beta Glucosidase. Biochemistry and Molecular Biology*. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker J.M., (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ, USA: Humana Press, pp. 571-607.
- Geourjon, C. and Deleage, G. 1995.** SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* 11: 681-684.

- Guruprasad, K., Reddy, B. B. and Pandit, M. W. 1990.** Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering* 4: 155-161.
- Hemming, J. D. C. and Lindroth, R. L. 1999.** Effects of light and nutrient availability on aspen: growth, phytochemistry and insect performance. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1687–1714.
- Hemming, J. D. C. and Lindroth, R. L. 2000.** Effects of phenolic glycosides and protein on Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and Forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. *Environmental Entomology* 29: 1108–1115.
- Horie, K. 1975.** Digestive carbohydrate in the salivary gland and midgut of several phytophagous bugs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Comparative Biochemistry* 50(1): 145–151.
- Huber, R. E. and Mathison, R. D. 1976.** Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose on honey bees (*Apis mellifera*). *Canadian Journal of Biochemistry* 54(2): 153–164.
- Ishimoto, M. and Kitamura, K. 1989.** Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology and Zoology* 24: 281–286.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdes-Rodriguez, S., Delano-Frier J. and Blanco-Labra, A. 2000.** Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanustruncates* Horn. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry* 126: 425–433.
- Moller, S., Croning, M. D. and Apweiler, R. 2001.** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17: 646-653.
- Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong, E. and Higgins, T. J. V. 2000.** Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 97(8): 3820–3825.
- Muralidharan, K. and Pasalu, I.C. 2006.** Assessment of crop losses in rice ecosystems due to stem borer damage (Lepidoptera: Pyralidae). *Crop Protection* 25: 409-417.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. 2011.** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Pratviel-Sosa, F., Clemont, S., Percheron, F. and Chararas, C. 1986.** Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pityocampa* larvae. Part 1. Purification and some properties of the α -glucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 84: 77–81.
- Ramasarma, T., Joshi, N., Sekar, K., Uthayakumar, M. and Sherlin, D. 2012.** Transmembrane Domains. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Seddigh, S. and Darabi, M. 2016.** Proteomics comparison of aspartic protease enzyme in insects. *Turkish Journal of Biology* 40: 69-83.
- Seddigh, S., Masoudi-Nejad, A., Tafaghodinia, B. and Imani, S. 2012.** Comparing carbohydrate enzymes activity in *Eurygaster integriceps* putton (Hemiptera: Scutelleridae), *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae) and *Haplothrips tritici* Kurd. (Phlaeothripidae: Thysanoptera) as a complex pest on wheat. *Munis Entomology & Zoology* 7(1): 344-351.
- Silva, C.P. and Terra, W.R. 1995.** An alpha-glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells: purification and properties. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(4): 487–494.
- Terra, W. R. and Ferreira, C. 1994.** Insect digestive enzymes: Propertie compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology, B: Comparative Biochemistry* 109: 1–62.
- Terra, W. R., Ferreira, C. and De Bianchi, A. G. 1979.** Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25: 487-494.
- Terra, W. R., Ferreira, C., Jordao, B. P. and Dillon R. J. 1996.** Digestive enzymes. Pp. 153–193. In: Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (eds.) *Biology of the Insect Midgut*, Chapman and Hall, London.
- Teufel, A., Krupp, M., Weinmann, A. and Galle, P. R. 2006.** Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 17(6): 967-973.
- Zibae, A., Bandani, A. R., Kafil, M. and Ramzi, S. 2008.** Characterization of α -amylase in the midgut and the salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11(4): 201–205.