



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

Molecular Identification and Characterization of Some Knottin Antimicrobial Peptides From White Mustard (*Sinapis alba* L.) Plant

Nastaran Bahramnejad¹ | Seyyed Mohsen Sohrabi² | Mohsen Mohammadi^{1,*}

1- Department Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabd, Iran

2- Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author : moahamadi.m@lums.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: August 19, 2025;
Received in revised form: November 14, 2025;
Accepted: November 24, 2025;
Available online: December 30, 2025

Keywords:

Bioinformatics,
Anti-microbial peptides,
Sinapis alba L.,
Knottin,
PCR

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are a diverse group of low-molecular-weight bioactive molecules that serve as the primary defense line of the innate immune system against infections in all multicellular organisms. In plants, these peptides exhibit high biodiversity and belong to several families, being produced both constitutive and inducible in response to environmental stresses. Knottin antimicrobial peptides are a class of peptides found in plants, animals, and insects which are cysteine-rich peptides. This study aimed to identify and characterize some Knottin antimicrobial peptides from white mustard (*Sinapis alba* L.). In this research, the gene sequences of seven Knottin antimicrobial peptides from white mustard were predicted and identified using bioinformatics and laboratory techniques. Initially, bioinformatics methods were used to predict the encoding sequences of the target peptides from the transcriptome of white mustard. Subsequently, these encoding sequences were isolated and identified using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were sequenced and analyzed using various bioinformatics tools. The physicochemical properties of the seven identified Knottin peptides from white mustard were predicted, with molecular weights ranging from 9.92 to 11.05 kDa, isoelectric pH values from 4.46 to 7.89, instability index from 38.06 to 63.9, aliphatic index from 62.36 to 81.82, and GRAVY values ranging from -0.249 to 0.18. It was also found that the Knottin peptides of white mustard contain four intramolecular disulfide bonds formed by eight conserved cysteine residues, contributing to their unique structure and stability. Additionally, bioinformatics analysis revealed that all the identified Knottin peptides in white mustard have potentially antimicrobial activities. Given that plants produce a wide range of antimicrobial peptides, and considering that purification methods can be complex, costly, and time-consuming, these peptides can be identified, designed, and chemically synthesized or produced recombinantly using bioinformatics tools and after validation through further experiments, could be a promising therapeutic potential to develop as new antimicrobial agents against drug-resistant pathogens.



Cite this article: Bahramnejad, N., Sohrabi, M.S. and Mohammadi, M. (2025). Molecular identification and characterization of some knottin antimicrobial peptides from white mustard (*Sinapis alba* L.) plant. *Plant Genetic Research*, 12(2): 101–116.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2082488.1028>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

All living organism from animal (mammals, insects and amphibians) to plants is constantly exposure with attacks by a vast array of pathogens. Hence, in response to biotic infection all organisms produce antimicrobial peptides (AMPs) as a major component of their immediately innate defenses mechanisms. Many AMPs are cationic, hydrophobic and amphipathic molecules that have a wide spectrum of activity and high selectivity. Interestingly, in compared to conventional antibiotics which have specific molecular targets, AMPs not only interact with the cell plasma membrane and causing the increase of permeability and loss of membrane function but also minimize the development of microbial resistance. AMPs can be protecting the host against various pathogens such as gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, yeast, fungi and viruses. Plants contain high concentrations of secondary metabolites such as AMP, phenols, terpenoids and others. Plants immune system, in addition structural barriers such as cell walls, have ability the production of AMP compounds to protect against pathogens. Plant antimicrobial peptides (PAMPs) evolve differently from classical AMPs of other life types. They are generally cysteine-rich peptides (CRPs) that form multiple disulfide bonds (4,6 or 8) that can be contribute to stabilize conserved scaffolds. PAMPs are classified into families according their sequence similarity, cysteine motifs. Cystine-rich PAMPs families including defensins, knottins, snakins, lipid transfer proteins, thionins and hevein-like peptides. Knottins can be found in plants, animals, and insects, serving different functions.

Material and Methods

In this study, the gene sequences of 7 knottins of white mustard plant were identified for the first time using bioinformatics and laboratory approaches, and their various structural and functional characteristics were analyzed. This work was carried out in three stages. In the first stage, the coding sequences of multiple knottins peptides were predicted from the transcriptome of white mustard using bioinformatics methods. In the next stage, the gene sequences of these peptides were isolated and identified using polymerase chain reaction (PCR). In the third stage, PCR products were sequenced and thorough various bioinformatics tools were analyzed for the structural, functional and antimicrobial properties.

Results and Discussion

Our results showed that multi knottin gene family of white mustard plant, exhibit identity amino acid sequence and structural and functional properties with Knottin of other plants. Moreover, the analysis of the physicochemical properties of knottins indicated that a molecular weight between 9.92 to 11.05 kDa, an isoelectric point (PI) of 4.46 to 7.89, with the instability index ranging from 38.06 to 9.63, an aliphatic index of 62.36 to 81.82, and a GRAVY of -0.249 to 0.18. It was found that knottins in its structure has four intramolecular disulfide bonds, which is mediated by 8 certain residues of the cysteine with the various patterns. The results also revealed that knottins 1, 2 and 5 and Knottins 4 and 7 had similar disulfide patterns while knottin3 and Knottin6 was displayed a specific binding pattern. Therefore, it increases the strength of their interaction with biological membranes of pathogens, thereby forming transmembrane channels and cell death. The instability index for knottins showed that these peptides have different stability, which could affect their antimicrobial activity in the external environment. The presence of only one intron in the gene structure of plant Knottins eliminates the possibility of alternative splicing in them, and therefore these genes generally lack different isoforms in the cell. The results of this research also determined

that knottins of the *Sinapis alba* plant potentially have antimicrobial properties. Knottins which are naturally found in plants have potential antimicrobial activity due to their specific characteristics such as hydrophobicity, high positive charge, specific secondary and three-dimensional structures, and other properties. Today new antimicrobial drug compounds are in increasing demand. Therefore, our results broaden a fundamental insight of research in the field of plant antimicrobial peptides especially knottins AMPs. In other hand the large volume of molecular biological data (including genomic, transcriptomic, and proteomic data) related to various plants that are available to researchers, as well as the existence of various bioinformatics software, can assist various biotechnologists to extract valuable information from biological data bank to identify and examine the gene and protein characteristics of Knottin antimicrobial peptides from plant various sources.

Conclusion

Today, the indiscriminate use of antimicrobial agents led to the emergence of new microbial strains. Therefore, due to the rapid increase in drug-resistant that is serious challenge to antimicrobial therapies, hence need to discover novel antimicrobial agents seems necessary. Therefore, according to the results of this experiment considering the potential antimicrobial properties of the *S. alba* plant knottins could be by extracting them from various plant or by generation of recombinant form in eukaryotic and prokaryotic expression systems thereby it may have been regarded as a promising novel treatment for pharmaceutical (various antibiotic-resistant bacteria) and agricultural (protection of crops via transgenic methods) applications.

Author Contributions

N. Bahramnejad performed the experiments and analyzed data, SM. Sohrabi Participated in the experimental work, analyzed data ,provided consultation and drafting the manuscript, M. Mohammadi supervised the study and prepared and wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

We thank Lorestan University of Medical Sciences, for moral support and services provided during this study as a main part of Pharm.D thesis.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This work was partially supported by a grant from Lorestan University of Medical Sciences.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی ملکولی و بررسی خصوصیات برخی پپتیدهای ضد میکروبی Knottin از گیاه خردل سفید (*Sinapis alba* L.)

نسترن بهرام‌نژاد^۱ | سید محسن سهرابی^۲ | محسن محمدی^{۱*}

۱- گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۲- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) گروه متنوعی از ملکول‌های زیستی با وزن مولکولی پایین هستند که به عنوان خط دفاعی اولیه سیستم ایمنی ذاتی در برابر عفونت‌ها توسط همه موجودات پرسلولی تولید می‌شوند. در گیاهان این پپتیدها تنوع زیستی بالایی دارند و دارای چندین خانواده می‌باشند و به دو صورت دائمی و القایی در پاسخ به تنش‌های محیطی تولید می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی نوتین (Knottin) دسته‌ای از پپتیدهایی غنی از سیستمین هستند که در گیاهان، حیوانات و حشرات یافت می‌شوند. این مطالعه با هدف شناسایی و بررسی خصوصیات برخی از پپتیدهای ضد میکروبی Knottin از گیاه خردل سفید (*Sinapis alba* L.) انجام شد. در این پژوهش، توالی‌های ژنی هفت پپتید ضد میکروبی Knottin از گیاه خردل سفید با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی پیش‌بینی و شناسایی گردید. بدین صورت که در مرحله اول، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، توالی کدکننده پپتیدهای مورد نظر از ترنسکرپتوم گیاه خردل سفید پیش‌بینی شد. در مرحله بعد، توالی کدکننده این پپتیدها با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) جداسازی و شناسایی شدند. سپس محصولات PCR توالی‌یابی شده با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج خصوصیات فیزیکوشیمیایی هفت Knottin گیاه خردل سفید، شناسایی شده، وزن مولکولی بین ۹/۹۲ تا ۱۱/۰۵ کیلو دالتون، pH ایزوالکتریک ۴/۴۶ تا ۷/۸۹، شاخص ناپایداری ۳۸/۰۶ تا ۶۳/۹، شاخص آلفاتیکی ۶۲/۳۶ تا ۸۱/۸۲ و GRAVY ۰/۲۴۹- تا ۰/۱۸ را برای آن‌ها پیش‌بینی کرد. همچنین مشخص شد که پپتیدهای Knottin گیاه خردل سفید در ساختار خود دارای چهار پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی هستند که از طریق اتصال هشت اسید آمینه‌ی سیستمین محافظت شده شکل گرفته و باعث می‌شود این پپتید ساختار ویژه و پایداری داشته باشد. همچنین آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داد که تمامی Knottin گیاه خردل سفید به‌طور بالقوه دارای خاصیت ضد میکروبی هستند. با توجه به اینکه گیاهان انواع مختلفی از پپتیدهای ضد میکروبی تولید می‌کنند و روش‌های خالص‌سازی می‌تواند بسیار پیچیده، پرهزینه و زمان‌بر باشد، می‌توان با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک آن‌ها را شناسایی، طراحی و به روش شیمیایی سنتز و یا به صورت نو ترکیب تولید کرد تا پس از اعتبارسنجی از طریق آزمایش‌های بیشتر، می‌تواند یک پتانسیل درمانی امیدوارکننده برای توسعه به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو باشند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

واژگان کلیدی:

بیوانفورماتیک،

پپتیدهای ضد میکروبی،

خردل سفید،

Knottin.

PCR

* نویسنده مسئول: moahamadi.m@lums.ac.ir



DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2082488.1028>

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه لرستان

مقدمه

جهت شناسایی انواع جدیدی از پپتیدهای ضد میکروبی از منابع مختلف برای توسعه نسل جدید پپتیدهای آنتی‌بیوتیک با مقاومت بیشتر در برابر پپتیدازها و اثربخشی بیشتر در برابر میکروارگانیسم‌ها بسیار پر اهمیت می‌باشد (Li *et al.*, 2017; Palmer *et al.*, 2021; Zasloff, 2002). در ابتدا تصور بر این بود که مکانیسم اولیه‌ای که توسط آن پپتیدهای ضد میکروبی پاتوژن‌ها را غیرفعال می‌کنند، از طریق نفوذپذیری در غشاهای پلاسمایی است، که طی آن با ایجاد اختلال در تعادل بار الکتریکی دو طرف غشاء و از فقدان یون‌های حیاتی و سایر اجزای سلولی، باعث لیز و مرگ سلول می‌شود. با این حال، امروزه مشخص شده که آن‌ها از مکانیسم‌های متعددی دیگری نیز برای عمل ضد میکروبی استفاده می‌کنند (Bahar and Ren, 2009; Brogden, 2005; Lohner, 2013). با توجه به این‌که پپتیدهای ضد میکروبی کشف شده تاکنون، از نظر ساختاری و عملکردی بسیار ناهمگون هستند؛ بنابراین نمی‌توان بر اساس یک یا چند ویژگی واحد آن‌ها را به‌طور منسجم طبقه‌بندی کرد. اکثر پپتیدهای ضد میکروبی علی‌رغم تنوع در منبع آن‌ها، پارامترهای بیوفیزیکی مشترکی دارند که احتمالاً برای فعالیت آن‌ها ضروری هستند. از جمله ویژگی مشترک و متداول آن‌ها داشتن اندازه کوچک، کاتیونی (بار مثبت) و آمفی پاتیک بودن است که بر این اساس دارای ساختارهای مارپیچ آلفا، مارپیچی تصادفی، صفحات بتا و یا ترکیبی از ساختارها هستند (Nguyen *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2019).

گیاهان برای مقابله با عوامل بیمارگر دارای سیستم ایمنی چندلایه‌ای هستند که شامل ساختار سلولزی دیواره سلولی (سد فیزیکی)، متابولیت‌ها و تولید ترکیبات ضد میکروبی است که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های دفاعی ایمنی ذاتی گیاهان علیه حمله انواع مختلفی از بیمارگرها مثل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها عمل کرده و در گیاهان به دو صورت بیان همیشگی و القایی تولید می‌شوند (Saboki Ebrahim and Singh, 2011; Sels *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2014). پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی با انواع جانوری در برخی جنبه‌ها تفاوت دارد. آن‌ها به‌طور کلی غنی از اسیدهای آمینه سیستمین هستند که پیوندهای دی‌سولفیدی متعددی با الگوهای متنوع تشکیل می‌دهند، در نتیجه تعداد و موقعیت سیستمین و همچنین الگوهای پیوند دی‌سولفیدی، ویژگی خاصی به ساختار آن‌ها می‌دهد که باعث

پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides)، یکی از اجزای مهم دفاعی سیستم ایمنی ذاتی هستند که در گیاهان و جانوران (پستانداران، دوزیستان و حشرات) یافت می‌شوند و به‌عنوان خط اول دفاع میزبان علیه پاتوژن‌هایی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و ویروس‌ها عمل می‌کنند. به‌طوری‌که، در سال‌های اخیر بسیاری از آن‌ها شناسایی شده‌اند و فرآیند کشف آن‌ها همچنان ادامه دارد (Egorov *et al.*, 2005). پپتیدهای ضد میکروبی که دارای فعالیت ضد میکروبی چندگانه و چندوجهی هستند، توانسته‌اند از نظر سیر تکاملی قدرت خود را در مواجهه با میکروارگانیسم‌های هدف حفظ کنند و علیه پاتوژن‌های مختلف شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و پروتوزوئر عمل کنند؛ بنابراین، با توجه به تنوع زیستی و عملکردی، پپتیدهای ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Andersson *et al.*, 2003; Yeaman and Yount, 2003). پپتیدهای ضد میکروبی در شروع حمله‌ی بیمارگرهای متنوع به‌عنوان بخشی از مکانیسم دفاعی ایمنی ذاتی سریع وارد عمل شده و به‌طور مستقیم آن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند (Holaskova *et al.*, 2015). پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، به‌طور عمده غنی از سیستمین بوده و در پیوندهای دی‌سولفیدی متعدد (معمولاً دو تا شش پیوند) را ایجاد می‌کنند. این ویژگی باعث می‌شود آن‌ها ساختاری مستحکمی داشته باشند که در برابر عوامل نامساعد محیطی، عوامل شیمیایی و هضم پروتئولیتیک مقاوم باشند (Hammami *et al.*, 2009). با توجه به این‌که مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی و دامپزشکی باعث به وجود آمدن باکتری‌های مقاوم به دارو می‌شود، که این خود تهدیدی فزاینده برای سلامت عمومی جهانی است؛ بنابراین، رویکرد جدیدی برای توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای غلبه بر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ضروری به‌نظر می‌رسد (Organization, 2014). مزیت این پپتیدها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتی این است که از طریق مکانیسم‌های چندگانه عمل می‌کنند؛ بنابراین برای غلبه بر سویه‌های مقاوم به دارو می‌توانند مفید باشند زیرا آن‌ها به‌طور معمول غشای پاتوژن‌ها را مورد هدف قرار داده و ایجاد مکانیسم‌های مقاومت را برای بیمارگر دشوار می‌کنند (Hancock and Sahl, 2006; Kang *et al.*, 2019; Mookherjee *et al.*, 2020). درک این مکانیسم‌ها و تلاش

از گیاهان مختلف باشد. به علت عدم وجود ژنوم مستندسازی شده گیاه خردل سفید و وجود اطلاعات ترنسکرپتومیک مختلف برای آن، این مطالعه با هدف شناسایی چندین ژن پپتید ضد میکروبی Knottin از گیاه مذکور صورت گرفت. به این صورت که در مرحله اول، توالی ژنی برخی از پپتیدهای ضد میکروبی Knottin گیاه خردل سفید به روش بیوانفورماتیک از ترنسکرپتوم این گیاه شناسایی و سپس در شرایط آزمایشگاهی و با روش PCR تکثیر، جداسازی و تعیین توالی شد. پپتیدهای جدا شده از نظر خواص ساختاری و خواص ضد میکروبی با استفاده از روش‌های محاسباتی و بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شرایط رشد و استخراج DNA: در این تحقیق، بذور گیاه خردل سفید (*S. alba*) از مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان تهیه و برای کشت و استخراج DNA و جداسازی ژن پپتیدهای ضد میکروبی Knottin مورد استفاده قرار گرفت. بذور با استفاده از محلول هیپوکلریت سه درصد به مدت پنج دقیقه ضد عفونی شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند تا باقی مانده هیپوکلریت حذف شود. بذور ضد عفونی شده درون پتری‌دیش و روی کاغذ صافی مرطوب کشت شده و به مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. در مدت دو هفته، پتری‌ها به طور مداوم بررسی شده تا مرطوب باقی بمانند. پس از گذشت مدت زمان دو هفته، گیاهچه‌های حاصل به طور کامل برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB صورت گرفت (Doyle and Doyle 1987). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد تعیین گردید.

شناسایی ژن‌های Knottin از ترنسکرپتوم گیاه خردل سفید: برای شناسایی ژن‌ها، ابتدا توالی پروتئینی مربوط به ژن Knottin گیاهان مختلف از پایگاه NCBI دریافت شد و برای آن‌ها به طور جداگانه هم‌ردیفی (Alignment) چندگانه در نرم‌افزار VectorNTI (نسخه ۱۰/۳) ایجاد شد. سپس دو توالی پروتئینی مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی‌های چندگانه، که در تمامی Knottin محافظت شده‌اند، با استفاده از ابزار tBLASTn موجود در پایگاه NCBI با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ در برابر

می‌شود در برابر شرایط سخت شیمیایی، حرارتی و پروتئولیتیک مقاومت بیشتری داشته باشند (Zeynivand *et al.*, 2024; Saffar *et al.*, 2025). از این رو، بر اساس خصوصیات ذکر شده و همچنین شباهت توالی، پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی به خانواده‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند که شامل تیونین‌ها (Thionins)، دیفنسین‌ها (Defensins)، شبه‌هوئین‌ها (Hevein-like)، نوئین‌ها (Knottin)، پروتئین‌های انتقال چربی (LTPs)، سیکلوتیدها (Cyclotides) و اسنیکین‌ها (Snakins) هستند (Cools *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2009; Tam *et al.*, 2015).

پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی Knottin متعلق به یک ابرخانواده هستند که اعضای آن تقریباً از ۳۰ تا ۷۰ اسید آمینه تشکیل شده و دارای عملکردهای متنوعی هستند. این پپتیدها معمولاً حاوی شش تا هشت اسید آمینه سیستئین با الگوی پیوندهای دی‌سولفیدی محافظت شده هستند که تشکیل ساختار دومی به نام موتیف سیستئینی knot می‌دهند که متمایز از موتیف knot موجود در برخی از پپتید ضد میکروبی گیاهی دیگر مثل دیفنسین‌ها و شبه هوئین‌ها است (MIR Drikvand *et al.*, 2022; Tam *et al.*, 2015). اعتقاد بر این است که Knottin‌های گیاهی از نظر تعداد، تنوع توالی و نوع ساختار مولکولی می‌توانند متمایز از دیگر خانواده‌ها باشند (Moore and Cochran, 2012; Phazang *et al.*, 2020). همچنین مطالعات مختلف نشان می‌دهند که اثرات ضد میکروبی Knottin‌ها توسط برهمکنش با غشای سیتوپلاسمی میزبان صورت گرفته و از این طریق عمل ضد میکروبی خود انجام می‌دهند. از طرفی، مشخص شده که این پپتیدها دارای خواص فیزیولوژیکی دیگری نیز در گیاه هستند (Attah *et al.*, 2022; Cools *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2023; Kintzing and Cochran, 2016; Li *et al.*, 2022).

خردل گیاهی علفی یک‌ساله یا دوساله از خانواده Brassicaceae است که شامل گونه‌های زیادی از جمله خردل قهوه‌ای، خردل سفید است. خردل سفید (*Sinapis alba* L.) دارای اثرات ضدباکتری، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدانی است (Maiti *et al.*, 2007). با در نظر گرفتن خصوصیات منحصر به فرد Knottin‌ها از قبیل پایداری پروتئولیتیک، حرارتی و شیمیایی و تنوع توالی نوکلئوتیدی، این پپتید می‌تواند گزینه مناسبی برای شناسایی آن

شده از گیاهچه‌ها و آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱) انجام شد. محصولات واکنش PCR ژن‌های Knottin گیاه خردل سفید به صورت جداگانه با استفاده از ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز شده و پس از پایان الکتروفورز و بررسی اندازه، باندهای الکتروفورزی ژن‌های Knottin با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل شرکت کیژن (QIAquick Gel Extraction Kit #28704) خالص‌سازی شدند. قطعات خالص‌سازی شده‌ی ژن‌های Knottin گیاه خردل سفید به منظور توالی‌یابی به شرکت ماکروژن ارسال شدند. تعیین توالی قطعات به صورت رفت و برگشتی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر ژن انجام گرفت. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، این نتایج به صورت جداگانه برای هر ژن و با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی: نتایج توالی‌یابی هر ژن Knottin گیاه خردل به طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 سرهم‌بندی و آنالیز شدند. توالی‌های تجزیه و تحلیل شده‌ی مربوط به هر ژن با استفاده از BLASTn سایت NCBI در برابر پایگاه nr هم‌دیف شده و صحت جداسازی و توالی‌یابی آن‌ها تأیید گردید. اگزون‌ها و اینترون‌های موجود در ساختار ژن‌های Knottin گیاه خردل بر اساس هم‌دیفی نتایج توالی‌یابی توالی‌های ژنومی با توالی mRNA و همچنین سرور FGESH شناسایی شدند.

ترنسکریپتوم گیاه خردل سفید مورد هم‌دیفی قرار گرفتند. نتایج tBLASTn با استفاده از دو نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 3.6.5 (۳/۶/۵) و Vector NTI 10.3 (نسخه ۱۰/۳) سرهم‌بندی شدند. قطعات حاصل از سرهم‌بندی (شامل کانتیگ‌ها (Contigs) و سینگلتون‌های (Singletons) با استفاده از ابزارهای CDD و ORF finder موجود در پایگاه NCBI برای وجود چارچوب خوانش‌باز کامل Knottin مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌های دارای چارچوب خوانش‌باز کامل برای ژن‌های Knottin، با استفاده از ابزار BLASTn پایگاه NCBI در برابر بانک ژن مورد هم‌دیفی قرار گرفته و صحت جداسازی آن‌ها ارزیابی شد. از توالی‌های دارای چارچوب خوانش‌باز کامل ژن‌های Knottin به عنوان الگو برای طراحی آغازگرها استفاده شد.

طراحی آغازگرها، تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های Knottin: به منظور تکثیر توالی کدکننده کامل، از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی‌های دارای چارچوب خوانش‌باز (Open Reading Frame: ORF) کامل Knottin که با استفاده از نرم‌افزار Allele ID (نسخه ۶) طراحی شده بودند، استفاده شد (جدول ۱). بهینه‌سازی دمای اتصال با استفاده از دمای اتصال پیشنهادی نرم‌افزار Allele ID و همچنین گرادیانت دمایی صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر ژن‌های Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از DNA استخراج

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن‌ها

Table 1. The properties of designed primers to amplify genes

| نام آغازگر Primer name | توالی آغازگر Primer sequence | طول محصول تکثیری (جفت‌باز) Product length (bp) | دمای اتصال (°C) Annealing temperature |
|---------------------------|----------------------------------|---|--|
| Knottin1-F | 5'-TCCAAAAGTTCAGACATAGAGAG-3' | 552 | 54 |
| Knottin1-R | 5'-ATTTATTATTACACAAACCAAGGC-3' | | |
| Knottin2-F | 5'-GCCACAAGGATAAAACATAAAATACC-3' | 754 | 57 |
| Knottin2-R | 5'-ACAGCACCCTTGAATCG-3' | | |
| Knottin3-F | 5'-GCATTCACAACGAAATCACTTAC-3' | 561 | 54 |
| Knottin3-R | 5'-TGGGAGCCTCAGTTACTACC-3' | | |
| Knottin4-F | 5'-AACAAAAGAGAGTAGAGAGAAGATG-3' | 756 | 53 |
| Knottin4-R | 5'-ACGACATTACATTACTTGGAC-3' | | |
| Knottin5-F | 5'-AAAGAGTGGTTCCTATAATATCGG-3' | 495 | 55 |
| Knottin5-R | 5'-GGTGTCTGCGTCTGCTAC-3' | | |
| Knottin6-F | 5'-CATCACAGGCAGATACATCTCCAC-3' | 464 | 58 |
| Knottin6-R | 5'-GGGCGGTTGCGTTTAGCG-3' | | |
| Knottin7-F | 5'-ATAGCAAAAAGTGGCAATGGC-3' | 403 | 56 |
| Knottin7-R | 5'-ATAGTGTATTAGCGATGGTTTGG-3' | | |

Neural Network و Discriminant Analysis مورد بررسی قرار گرفته و وجود یا عدم وجود خاصیت ضد میکروبی در آن‌ها مشخص گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی محصول PCR ژن‌های Knottin1 تا Knottin7 گیاه خردل سفید با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر کدام از آن‌ها مشخص کرد که این ژن‌ها از چارچوب‌های خوانش‌باز به طولی بین ۳۵۰ تا ۷۷۴ جفت‌باز تشکیل شده‌اند (شکل ۱) که دارای یک ایترون و دو آگزون به طول‌های متفاوتی بوده و پپتیدهایی با طول بین ۸۸ تا ۹۹ اسیدآمینو را کد می‌کنند (جدول ۲).

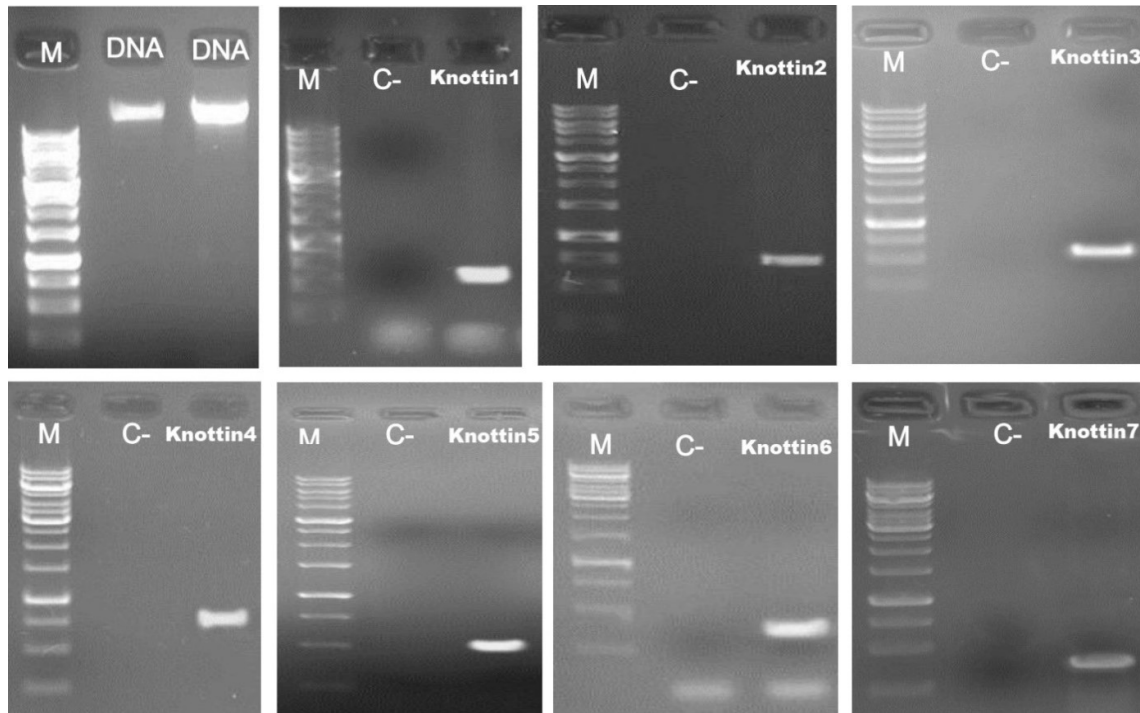
نتایج تجزیه و تحلیل دمین‌های عملکردی محافظت شده مشخص کرد که در Knottin1 و Knottin2 گیاه خردل سفید یک دمین عملکردی به نام Toxin3 به طول ۶۱ اسیدآمینو قرار دارد که از اسیدآمینو گلوتامین شماره ۳۰ تا اسیدآمینو پرولین شماره ۹۰ در ساختار این پروتئین را در بر گرفته است. همچنین نتایج تجزیه و تحلیل سیگنال‌پپتید و محل تجمع سلولی هر دو در گیاه خردل سفید نشان داد که پپتیدهای مذکور توسط یک سیگنال‌پپتید به طول ۲۹ اسیدآمینو به محیط خارج سلول ترشح می‌شود. نتایج بررسی Knottin3 نشان داد که این پپتید در ساختار خود دارای یک دمین عملکردی Toxin3 به طول ۵۹ اسیدآمینو است که از اسیدآمینو هیستیدین شماره ۳۰ تا اسیدآمینو آسپارتیک اسید شماره ۸۸ در ساختار این پروتئین شامل می‌شود همچنین در پپتید مذکور یک سیگنال‌پپتید ترشحی به طول ۲۹ اسیدآمینو شناسایی شد که باعث ترشح پپتید به محیط خارج سلولی می‌شود.

چارچوب‌های خوانش‌باز (ORF) موجود در توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI به پروتئین ترجمه شدند. توالی‌های پروتئینی حاصل با به‌کارگیری سه پایگاه داده Interproscan, Pfam و CDD سایت NCBI برای وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده مورد بررسی قرار گرفتند. تنها دمین‌های عملکردی محافظت شده‌ای که توسط سه پایگاه مذکور تأیید شده بودند، به‌عنوان دمین‌های اصلی پپتیدهای knottin گیاه خردل سفید انتخاب شدند. بررسی وجود یا عدم وجود توالی سیگنال و همچنین محل تجمع Knottin گیاه خردل سفید به‌ترتیب با استفاده از ابزارهای تحت‌وب SignalP و CELLO2GO صورت گرفت. ترسیم ساختارهای سه بعدی Knottin‌های گیاه خردل سفید با استفاده از سرور Phyre2 انجام گرفت. مشخصات فیزیکوشیمیایی این پروتئین‌ها شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک، فراوانی اسیدهای آمینو با استفاده از نرم‌افزار ProtParam بررسی شد. وجود یا عدم وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از ابزار DiANNA مورد بررسی قرار گرفته شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و ترسیم درخت تکاملی Knottin‌های گیاه خردل سفید و گروه‌بندی آن‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار MEGA صورت گرفت. بررسی وجود یا عدم وجود خاصیت ضد میکروبی Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از نرم‌افزار CAMP انجام شد. در این نرم‌افزار مجموعه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی مختلف که به‌صورت محاسباتی و یا آزمایشگاهی وجود خاصیت ضد میکروبی در آن‌ها تأیید شده است، گردآوری شده است. در نرم‌افزار CAMP، توالی‌های پروتئینی Knottin‌های خردل سفید با استفاده از چهار روش محاسباتی Artificial, Random Forest, Support Vector Machine

جدول ۲- نتایج بررسی ژنی و پپتیدی Knottin‌های شناسایی شده گیاه خردل سفید

Table 2. Results of gene and peptide analysis of identified Knottins in white mustard plant

| نام | اندازه پپتید (اسیدآمینو) | اندازه ایترون (جفت‌باز) | اندازه آگزون‌ها (جفت‌باز) | اندازه ناحیه کدکننده روی ژنوم (جفت‌باز) |
|----------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---|
| Name | Peptide length (aa) | Intron length (bp) | Length of exons (bp) | Genomic coding region length (bp) |
| Knottin1 | 99 | 183 | (67) - (233) | 483 |
| Knottin2 | 99 | 376 | (67) - (233) | 676 |
| Knottin3 | 99 | 145 | (67) - (233) | 445 |
| Knottin4 | 99 | 374 | (67) - (233) | 774 |
| Knottin5 | 90 | 126 | (61) - (212) | 399 |
| Knottin6 | 89 | 82 | (58) - (210) | 350 |
| Knottin7 | 88 | 89 | (61) - (206) | 356 |



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های Knottin گیاه خردل سفید. M) نشانگر مولکولی 1Kbp و C-) کنترل منفی
Figure 1. Electrophoresis of PCR products of white mustard Knottin genes. M) 1Kbp molecular marker and C-) negative control

نتایج بررسی توالی پپتیدهای Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از BLASTp نشان داد که توالی‌های مذکور با میزان همسانی بین ۴۴ تا ۹۸ درصد به پپتیدهای Knottin گیاهان دیگر و به‌طور عمده گیاهان دولپه‌ای شباهت نشان دادند. این شباهت برای Knottin1 بین ۶۵ تا ۹۸ درصد، برای Knottin2 بین ۶۳ تا ۸۶ درصد، برای Knottin3 بین ۵۷ تا ۸۵ درصد، برای Knottin4 بین ۵۹ تا ۹۰ درصد، برای Knottin5 بین ۶۳ تا ۹۳ درصد، برای Knottin6 بین ۴۴ تا ۹۴ درصد گیاهان و برای Knottin7 بین ۶۲ تا ۹۶ درصد مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی Knottin‌های گیاه خردل سفید، جرم مولکولی بین ۹/۹۲ تا ۱۱/۰۵ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ۴/۴۶ تا ۷/۸۹، شاخص ناپایداری ۳۸/۰۶ تا ۶۳/۹، شاخص آلفاتیک ۶۲/۳۶ تا ۸۱/۸۲ و GRAVY ۰/۲۴۹- تا ۰/۱۸ را برای آن‌ها پیش‌بینی کرد (جدول ۳). عدد شاخص ناپایداری زیر ۴۰ نشان دهنده پایداری پروتئین و بالاتر از آن نشان دهنده ناپایداری آن می‌باشد که بر این اساس، پپتیدهای Knottin3، Knottin6 و Knottin7 دارای میزان پایداری بیشتری نسبت به دیگر Knottin‌ها بودند.

در پپتید Knottin4، دمین عملکردی Toxin3 به طول ۶۱ اسیدآمینه از اسیدآمینه گلوتامین ۳۰ تا اسیدآمینه آلانین ۹۰ قرار داشت و پپتید مذکور با استفاده از یک سیگنال‌پپتید ترش‌حی به طول ۲۹ اسیدآمینه به محیط خارج از سلول ترشح می‌شد. نتایج بررسی پپتید Knottin5 وجود یک سیگنال ترش‌حی خارج سلولی به طول ۲۷ اسیدآمینه و یک دمین عملکردی Toxin3 به طول ۶۳ اسیدآمینه را مشخص کرد که از اسیدآمینه گلوتامین ۲۸ تا اسیدآمینه پرولین ۹۰ امتداد یافته بود. در پپتید Knottin6، دمین عملکردی Toxin3 به طول ۵۸ اسیدآمینه از اسیدآمینه لایزین ۳۲ تا اسیدآمینه آسپارتیک اسید ۸۹ در ساختار این پروتئین قرار گرفته بود. همچنین، این پپتید دارای یک سیگنال ترش‌حی به طول ۱۹ اسیدآمینه بود که پپتید مذکور را به محیط خارج سلول هدایت می‌کرد. در نهایت برای پپتید Knottin7 یک سیگنال ترش‌حی خارج سلولی به طول ۲۷ اسیدآمینه و یک دمین عملکردی به طول ۶۱ اسیدآمینه که از اسیدآمینه گلوتامین ۲۸ تا اسیدآمینه پرولین ۸۸ امتداد داشت، مشخص گردید (شکل ۲).

| Knottin1 | |
|-----------------|---|
| 1 | MAMATKSVSS FTLIFILVLV IFEVPEIKAQ DSECLKEYGG DVGFFFCAPR |
| 51 | IFPTICYTRC RENKGAKGGR CRWEGTNVK CLCDYCNDSP FDQILRGGI |
| Knottin2 | |
| 1 | MAMTTRSISS FAIFFILFLV INEVPEIKAQ DSECLKEYGG DVGFSFCAPR |
| 51 | IFPTFCYRNC REEKGAKGGR CLWEDAGGVK CLCDYDDSP FDPPIPSGAV |
| Knottin3 | |
| 1 | MAFTTKSLTS FAIFILVLA IFEVAEIEAH DDECLKEYGG DVGFSFCAPE |
| 51 | IFPSFCYTRC RENKGAQGGT CIWGEDGVK CLCDYCS DIP NNKILSGRI |
| Knottin4 | |
| 1 | MVMSTKPVSS FAVLFILFLA IFEVPEIDAQ DRECLKEYGG DVGFSFCAPL |
| 51 | IYPSFCVRRC RADKGAKGGE CRWGEEFNVK CLCDFCSKA YDQILSTGI |
| Knottin5 | |
| 1 | MATKSVSSFP IFFILFLVII EVPETEAQDR KCLQEYGGDV GFRFCAPLIY |
| 51 | PSFCYRRCRE NKGAKGGR CR SGEAGAGSMK CLCDFCSDKP |
| Knottin6 | |
| 1 | MKSVYIFIAL FIFFLVVLGE SPEKIEGEEK FKCLEEYGGD VGPTFCNPKF |
| 51 | FPTLCRQNCR SFKGAKGGKC VKKHKNKPIK CFCDYCKDD |
| Knottin7 | |
| 1 | MAIKPLSIFV VFFIFSLVIS DVPEIEA QDS QCLREYGGDV GFSFCAPRIF |
| 51 | PTFCYTRCRE NKGAKGGR CR WGEGTNVKCL CDYCNDKP |

شکل ۲- نتایج تجزیه و تحلیل ساختار پروتئینی Knottin های گیاه خردل سفید. سیگنال پپتید در سمت N- ترمینال (پررنگ) ابتدای توالی و دامین عملکردی Toxin3 (کم‌رنگ) نشان داده شده‌اند.

Figure 2. Results of protein structure analysis of white mustard plant Knottins. The signal peptide at the N-terminal side (Highlight) of the sequence and the functional domain of Toxin3 (Lowlight).

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی Knottin های شناسایی شده گیاه خردل سفید

Table 3. The physicochemical properties of identified knottins from white mustard plant

| نام | شاخص ناپایداری میانگین نسبی آبدوستی یا آبگریزی | شاخص آلفاتیکی | pH ایزوالکتریک جرم مولکولی (کیلودالتون) | MW (kDa) | Name |
|----------|--|-----------------|---|----------|----------|
| | (GRAVY) | Aliphatic index | (pI) | | |
| Knottin1 | 0.058 | 77.78 | 7.47 | 10.99 | Knottin1 |
| Knottin2 | 0.06 | 68.99 | 4.68 | 10.95 | Knottin2 |
| Knottin3 | 0.175 | 81.82 | 4.46 | 10.92 | Knottin3 |
| Knottin4 | 0.18 | 78.79 | 4.85 | 11.05 | Knottin4 |
| Knottin5 | -0.084 | 62.89 | 8.46 | 10.05 | Knottin5 |
| Knottin6 | -0.249 | 62.36 | 8.79 | 10.19 | Knottin6 |
| Knottin7 | -0.025 | 68.64 | 7.48 | 9.92 | Knottin7 |
| | Instability index | | | | |
| | 57.39 | | | | |
| | 63.9 | | | | |
| | 39.16 | | | | |
| | 53.97 | | | | |
| | 53.53 | | | | |
| | 38.06 | | | | |
| | 39.56 | | | | |

گلیسین، فنیل آلانین و سیستین در ساختار Knottin5، اسیدهای آمینه لایزین، فنیل آلانین، گلیسین و سیستین در ساختار Knottin6 و اسیدهای آمینه لایزین، فنیل آلانین، گلیسین و سیستین در ساختار Knottin7. بالاترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داده‌اند. نتایج تجزیه و تحلیل پیوندهای دی‌سولفیدی درون‌مولکولی در Knottin های گیاه

نتایج تجزیه و تحلیل فراوانی اسیدهای آمینه مشخص کرد که اسیدهای آمینه گلیسین، سیستین و ایزولوسین در ساختار Knottin1، اسیدهای آمینه گلیسین، فنیل آلانین و سیستین در ساختار Knottin2، اسیدهای آمینه ایزولوسین، گلیسین و سیستین در ساختار Knottin3، اسیدهای آمینه فنیل آلانین، گلیسین و سیستین در ساختار Knottin4، اسیدهای آمینه

به سایت CAMP وارد شده و با استفاده از چهار روش محاسباتی مختلف (RF), Discriminant Analysis (DA), Support Vector Machine (SVM) و Random Forest (ANN) برای وجود و یا عدم وجود ویژگی ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی مشخص کرد که ویژگی ضد میکروبی در تمامی Knottin های گیاه خردل سفید وجود داشته و این خود تأییدی بر صحت شناسایی این ژن‌ها در گیاه خردل سفید بود (جدول ۵). در سایت CAMP، روش SVM، با احتمال بین ۹۸/۵ تا ۱۰۰ درصد ویژگی ضد میکروبی را برای تمامی Knottin های گیاه خردل سفید نشان داد. روش RF، با احتمال بین ۹۲/۴ تا ۹۹/۱۵ درصد ویژگی ضد میکروبی را برای Knottin های گیاه خردل سفید مشخص کرد. روش DA با احتمال بین ۹۵/۷ تا ۹۹/۹ درصد ویژگی ضد میکروبی را برای Knottin های گیاه خردل سفید نشان داد. در نهایت، روش ANN وجود ویژگی ضد میکروبی را در تمامی Knottin های مورد بررسی گیاه خردل سفید مورد تأیید قرار داد (جدول ۵).

خردل سفید، وجود تعداد ۴ پیوند دی‌سولفیدی با ترتیب اتصال متفاوت را در آن‌ها نشان داد (جدول ۴). نتایج بررسی پیوندهای دی‌سولفیدی درون مولکولی، الگوی اتصال یکسانی برای Knottin1، Knottin2 و Knottin5 نشان داد و همچنین مشخص کرد که Knottin4 و Knottin7 دارای الگوی اتصال یکسانی با هم هستند. این در حالی بود که، Knottin3 و Knottin6 هر کدام الگوی اتصال منحصر به فردی را نشان دادند (جدول ۴).

نتایج تجزیه و تحلیل ساختارهای سه بعدی Knottin های گیاه خردل سفید نشان داد که بخش اعظم ساختار ثانویه آن‌ها از مارپیچ آلفا (۶۰-۵۰ درصد) و بخش محدودی از رشته بتا (۱۰-۵ درصد) ساخته شده است و دیگر ساختارهای پروتئینی بین ۴۰ تا ۴۵ درصد را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۳).

نتایج تجزیه و تحلیل ویژگی‌های ضد میکروبی Knottin های گیاه خردل سفید: پروتئین‌های Knottin کامل گیاه خردل سفید پس از حذف توالی سیگنال پپتید از انتهای N

جدول ۴- نتایج تجزیه و تحلیل پیوندهای دی‌سولفیدی درون مولکولی در Knottin های گیاه خردل سفید

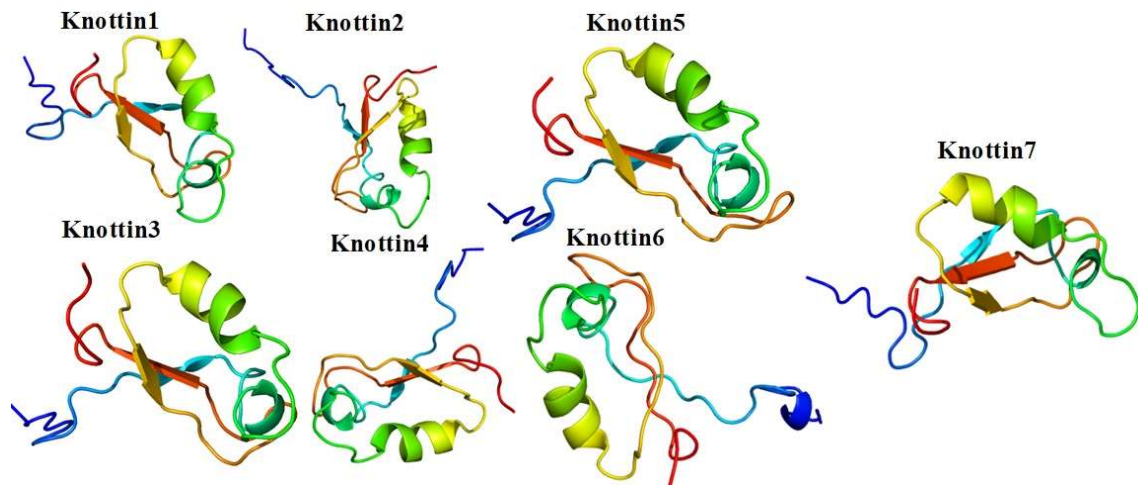
Table 4. Results of analysis of intramolecular disulfide bonds in white mustard plant knottins

| نام | تعداد پیوندها | پیوند ۱ | پیوند ۲ | پیوند ۳ | پیوند ۴ |
|----------|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| Name | Number of bonds | Bond 1 | Bond 2 | Bond 3 | Bond 4 |
| Knottin1 | 4 | C1-C2 | C3-C7 | C4-C5 | C6-C8 |
| Knottin2 | 4 | C1-C2 | C3-C7 | C4-C5 | C6-C8 |
| Knottin3 | 4 | C1-C2 | C3-C5 | C4-C7 | C6-C8 |
| Knottin4 | 4 | C1-C8 | C2-C5 | C3-C7 | C4-C6 |
| Knottin5 | 4 | C1-C2 | C3-C7 | C4-C5 | C6-C8 |
| Knottin6 | 4 | C1-C5 | C2-C8 | C3-C7 | C4-C6 |
| Knottin7 | 4 | C1-C8 | C2-C5 | C3-C7 | C4-C6 |

جدول ۵- نتایج تجزیه و تحلیل ویژگی‌های ضد میکروبی Knottin های گیاه خردل سفید

Table 5. Results of the analysis of the antimicrobial properties of Knottins from white mustard plant

| نام | Support vector machines (SVM) | Random Forest (RF) | Artificial Neural Network (ANN) | Discriminant Analysis (DA) |
|----------|-------------------------------|--------------------|--|----------------------------|
| Name | | | | |
| Knottin1 | 100% | 98.7% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.9% |
| Knottin2 | 99.9% | 98.65% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.3% |
| Knottin3 | 99.9% | 95.65% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.6% |
| Knottin4 | 100% | 96.6% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.6% |
| Knottin5 | 99.6% | 99.15% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.2% |
| Knottin6 | 100% | 92.4% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 99.4% |
| Knottin7 | 98.5% | 95.1% | تأیید ویژگی ضد میکروبی Validation of Antimicrobial Activity | 95.7% |



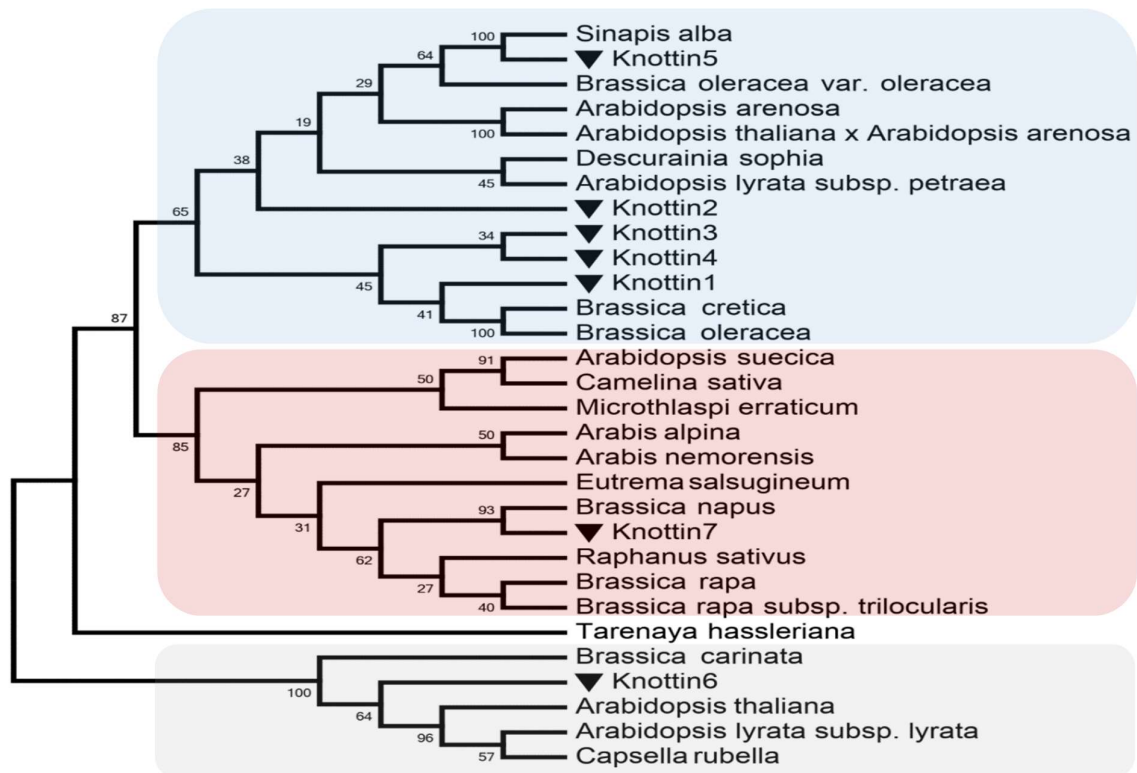
شکل ۳- ساختار سه بعدی Knottin های گیاه خردل سفید

Figure 3. Three-dimensional structure of white mustard knottins

سیستین‌های متعدد و اسیدهای آمینه خاص هستند که بر اساس خصوصیات مختلفی به خانواده‌های مجزا طبقه‌بندی می‌شوند (Silverstein *et al.*, 2007). پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی Knottin، پپتیدهای کوچک که متعلق به یک ابرخانواده هستند حاوی شش تا هشت باقی‌مانده سیستین حفاظت‌شده می‌باشند که تشکیل ساختار موتیف سیستینی knot می‌دهند. یکی از ویژگی‌های این خانواده این است که طیف بسیار وسیعی از عملکردهای زیست‌فعال را نشان داده که شامل عملکردهای شبه‌هورمونی و همچنین فعالیت‌های مهار آزمی، سیتوتوکسیک، ضد میکروبی، حشره‌کشی و ضد ویروسی می‌شود (Pallaghy *et al.*, 1994). به‌طور کلی، اعتقاد بر این است این خانواده در مقایسه با سایر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، دارای تعداد اشکال مولکولی، تنوع توالی و عملکردی بیشتری هستند. برخی از اعضای خانواده‌ی Knottin گیاهی از پروتئین‌های پیش‌ساز تولید می‌شوند و در بیوسنتز آن‌ها تغییراتی شکل می‌گیرد (McDonald and Hendrickson, 1993). این پپتیدها بر اساس وجود یا عدم وجود ساختار حلقه‌ای در داربست آن به دو شکل مولکولی، حلقوی و خطی یافت می‌شوند. نوع خطی که فرم غالب است نه تنها در گیاهان، بلکه در سایر منابع زیستی، از جمله قارچ‌ها، حشرات و عنکبوت‌ها نیز یافت شده و انواع حلقوی آن‌ها فقط در گیاهان با توزیع گسترده و فراوان پیش‌بینی شده یافت می‌شوند (Ireland *et al.*, 2006; Mylne *et al.*, 2012).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و ترسیم درخت تکاملی Knottin های گیاه خردل سفید و گروه‌بندی آن‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار MEGA صورت گرفت. درخت تکاملی ترسیم شده برای Knottin های گیاه خردل سفید، این پروتئین‌ها را در سه گروه کلی و مجزای از هم تقسیم‌بندی کرد. در درخت تکاملی مذکور، پروتئین‌های Knottin1, Knottin2, Knottin3, Knottin4 و Knottin5 با هم در یک گروه و پروتئین‌های Knottin6 و Knottin7 هر کدام در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند (شکل ۳). همچنین، در درخت تکاملی Knottin های گیاه خردل سفید تنها همراه با گیاهان دولپه‌ای در گروه‌های اختصاصی خود قرار گرفتند و در هر سه گروه، تنها گیاهان دولپه‌ای حضور داشتند (شکل ۴).

پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی که معمولاً غنی از سیستین هستند، ویژگی‌های تکاملی حفظ‌شده‌ای را در سیستم ایمنی ذاتی گیاهان داشته و نقش مهمی در دفاع سریع و گسترده آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا و آفات بر عهده دارند. در کنار این ویژگی‌ها، طیف گسترده‌ای از خواص بیولوژیک نیز برای آن‌ها گزارش شده است. از طرفی دیگر آن‌ها به علت ویژگی‌های منحصر به فردی که دارند، می‌توانند جهت استفاده به جای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در شرایط خاص برای درمان بیماری‌های عفونی مورد توجه قرار گیرند (Elsbach, 2003; Holaskova *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021; Polanco, 2015; Tang *et al.*, 2018). آن‌ها بر خلاف سایر پپتیدهای دیگر موجودات دارای تنوع ساختاری قابل‌توجهی مثل وجود



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی Knottin های گیاه خردل سفید
Figure 4. The phylogenetic tree of white mustard Knottins.

در این پژوهش، توالی‌های ژنی هفت Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی متعدد، برای اولین بار شناسایی شد. پپتیدهای ضد میکروبی Knottin جدا شده از گیاه خردل سفید در ساختار خود دارای تعداد هشت اسید آمینه‌ی سیستئین محافظت شده هستند که باعث ایجاد تعداد چهار پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی در آن‌ها خواهد شد. همچنین همه آن‌ها دارای یک دمین عملکردی Toxin3 هستند. پپتیدهای ضد میکروبی Knottin گیاه خردل سفید نیز مانند سایر Knottin های گیاهی، با ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی، ساختار دوم و سه بعدی ویژه‌ای به آن می‌دهد که در نتیجه آن بیشترین قابلیت برهمکنش با غشاء دولایه میکروبی‌های هدف را داشته باشد (Moore and Cochran, 2012; Moore et al., 2012). این پپتیدها، خانواده‌های چندژنی را در گیاهان مختلف تشکیل می‌دهند و ابتدا به صورت پیش‌ساز ساخته شده و پس از بالغ شدن، فرم فعال ایجاد شده و از خود فعالیت ضد میکروبی را نشان می‌دهند. اولین پپتید ضد میکروبی Knottin از گیاه لاله عباسی (*Mirabilis jalapa*) جدا سازی شد (De Bolle et al., 1996). پس از آن از گیاهان سرخاب کولی (*Phytolacca americana*) و گیاه یخی (*Mesembryanthemum*) نیز جدا سازی شدند (Arguelles et al., 2023; Shao et al., 1999). در مطالعات اخیر، نگوین و همکارانش سه عضو از این خانواده را از برگ‌ها و گل‌های میخک هندی (*Wrightia religiosa*) (Nguyen et al., 2014) و پنج عضو دیگر را از برگ‌های گل شیپور طلایی (*Allamanda cathartica*) جدا کردند (Nguyen et al., 2015). در مطالعه‌ای دیگر چندین پپتید ضد میکروبی Knottin از دانه‌های گیاه سرخاب کولی (*Phytolacca americana*) شناسایی شد که دارای موتیف سیستئینی knot بوده و خواص ضد قارچی را از خود نشان داده اند (Gao et al., 2001). همچنین در مطالعه‌ای دو پپتید ضد میکروبی Knottin به نام Mj-AMP1 و Mj-AMP2 از بذور لاله عباسی شناسایی شدند که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی علیه سبزه پاتوزن قارچی آزمایش شده و دو باکتری گرم مثبت بودند (Cammue et al., 1992). مطالعه‌ای دیگر گزارش کرد پپتید ضد میکروبی Knottin جدا شده از لارو حشره سوسک شاخکدار (*Psacotha hilaris*) دارای خاصیت ضد قارچی علیه *Candida albicans* است. همچنین نتایج نشان داد که این پپتید باعث دپلاریزه شدن غشای پلاسمایی این قارچ می‌شود (Hwang et al., 2010). پژوهش‌ها

در این پژوهش، توالی‌های ژنی هفت Knottin گیاه خردل سفید با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی متعدد، برای اولین بار شناسایی شد. پپتیدهای ضد میکروبی Knottin جدا شده از گیاه خردل سفید در ساختار خود دارای تعداد هشت اسید آمینه‌ی سیستئین محافظت شده هستند که باعث ایجاد تعداد چهار پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی در آن‌ها خواهد شد. همچنین همه آن‌ها دارای یک دمین عملکردی Toxin3 هستند. پپتیدهای ضد میکروبی Knottin گیاه خردل سفید نیز مانند سایر Knottin های گیاهی، با ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی، ساختار دوم و سه بعدی ویژه‌ای به آن می‌دهد که در نتیجه آن بیشترین قابلیت برهمکنش با غشاء دولایه میکروبی‌های هدف را داشته باشد (Moore and Cochran, 2012; Moore et al., 2012). این پپتیدها، خانواده‌های چندژنی را در گیاهان مختلف تشکیل می‌دهند و ابتدا به صورت پیش‌ساز ساخته شده و پس از بالغ شدن، فرم فعال ایجاد شده و از خود فعالیت ضد میکروبی را نشان می‌دهند. اولین پپتید ضد میکروبی Knottin از گیاه لاله عباسی (*Mirabilis jalapa*) جدا سازی شد (De Bolle et al., 1996). پس از آن از گیاهان سرخاب کولی (*Phytolacca americana*) و گیاه یخی (*Mesembryanthemum*) نیز جدا سازی شدند (Arguelles et al., 2023; Shao et al., 1999). در مطالعات اخیر، نگوین و همکارانش سه عضو از این خانواده را از برگ‌ها و گل‌های میخک هندی (*Wrightia religiosa*) (Nguyen et al., 2014) و پنج عضو دیگر را از برگ‌های گل شیپور طلایی (*Allamanda cathartica*) جدا کردند (Nguyen et al., 2015). در مطالعه‌ای دیگر چندین پپتید ضد میکروبی Knottin از دانه‌های گیاه سرخاب کولی (*Phytolacca americana*) شناسایی شد که دارای موتیف سیستئینی knot بوده و خواص ضد قارچی را از خود نشان داده اند (Gao et al., 2001). همچنین در مطالعه‌ای دو پپتید ضد میکروبی Knottin به نام Mj-AMP1 و Mj-AMP2 از بذور لاله عباسی شناسایی شدند که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی علیه سبزه پاتوزن قارچی آزمایش شده و دو باکتری گرم مثبت بودند (Cammue et al., 1992). مطالعه‌ای دیگر گزارش کرد پپتید ضد میکروبی Knottin جدا شده از لارو حشره سوسک شاخکدار (*Psacotha hilaris*) دارای خاصیت ضد قارچی علیه *Candida albicans* است. همچنین نتایج نشان داد که این پپتید باعث دپلاریزه شدن غشای پلاسمایی این قارچ می‌شود (Hwang et al., 2010). پژوهش‌ها

و تحقیقات اولیه نشان داده‌اند که Knottin‌های گیاهی خانواده‌های کوچک با ژن‌های بسیار کمی را تشکیل می‌دهند. این در حالی است که پژوهش‌های بعدی نشان دادند که Knottin‌های گیاهی دارای خانواده‌های بزرگ چند ژنی در ژنوم گیاهان هستند (Lima et al., 2022).

پپتیدهای ضد میکروبی Knottin شناسایی شده از گیاه خردل سفید در ساختار ژنی خود دارای تنها یک ایترون GT-AG با محدوده‌ی طولی متفاوت و متغیر بودند. ایترون‌های مشخص شده اغلب در سمت 5' ساختار ژنی پپتیدهای ضد میکروبی Knottin گیاه خردل سفید قرار داشتند. این مورد در سایر گیاهان نیز مشاهده شده است و مشخص شده که Knottin‌های گیاهی اغلب در ساختار ژنی خود دارای تنها یک ایترون هستند. وجود تنها یک ایترون در ساختار ژنی Knottin‌های گیاهی امکان وجود پیرایش متناوب را در آن‌ها از بین برده و بنابراین این ژن‌ها عموماً فاقد ایزوفروم‌های مختلف در سلول هستند (Chiche et al., 2004; Moore et al., 2012). پپتیدهای ضد میکروبی Knottin گیاهی همانند سایر پپتیدهای ضد میکروبی جرم مولکولی پایینی دارند که باعث سرعت تولید بالا، انتقال و عملکرد سریع آن‌ها خواهد شد. مقدار pH ایزوالکتریک پیش‌بینی شده برای Knottin‌های گیاه خردل سفید نشان دهنده خاصیت اسیدی تا بازی در آن‌ها بوده که به علت وجود فراوانی متفاوت اسیدهای آمینه‌ی بازی و اسیدی در ساختار آن‌ها می‌باشد. شاخص ناپایداری پیش‌بینی شده برای Knottin‌های گیاه خردل سفید، میزان پایداری متفاوت آن‌ها را در محیطی که در آن فعالیت می‌کنند و نشان می‌دهد و یکی از عوامل تأثیرگذار بر ویژگی ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد. شاخص‌های آلفاتیک محاسبه شده برای Knottin‌های گیاه خردل سفید، مقاومت دمایی مناسب آن‌ها را نشان داد، که این مقاومت به علت وجود ساختارهای ثانویه، درصد بالای اسیدهای آمینه‌ی خاص و وجود پیوندهای دی‌سولفیدی درون مولکولی صورت می‌گیرد. این شاخص آلفاتیک در واقع مشخص کننده حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های آلفاتیک اسیدهای آمینه است و معیاری برای میزان آب‌گریزی و پایداری پروتئین‌ها می‌باشد. در نتیجه پپتیدهای Knottin گیاه خردل سفید بر اساس ویژگی آب‌گریزی بودن آن‌ها می‌توانند به غشای دولایه و آب‌گریز پاتوژن‌ها متصل و پاسخ مناسب و قوی علیه آن‌ها ایجاد کند.

آنچنان‌که بررسی Knottin‌های گیاه خردل سفید در سرور CAMP، ویژگی ضد میکروبی را با میزان احتمال بسیار بالایی برای تمامی آن مشخص نمود (Thomas et al., 2010). از طرفی دیگر همانند سایر پروتئین‌های موجود در سلول، همواره بین محل تولید، تجمع و فعالیت دفاعی Knottin‌های گیاهی رابطه مستقیمی وجود دارد. این گروه از پپتیدها همانند سایر پپتیدهای ضد میکروبی به منظور برهم‌کنش بهتر و مناسب‌تر با غشاهای هدف خود در ساختار میکروب‌ها و همچنین انجام صحیح و بهینه فعالیت ضد میکروبی خود، باید از درون سلول به محل تجمع میکروب‌ها یعنی محیط خارج سلولی منتقل گردند؛ بنابراین، به این علت است که Knottin‌های گیاهی پس از تولید و شکل‌گیری ساختارهای ویژه در آن‌ها با استفاده از سیگنال‌پپتید ترشحی خود به محیط خارج از سلول منتقل می‌شوند تا به دفاع از سلول در برابر میکروب‌ها بپردازند. پپتیدهای ضد میکروبی در مقایسه با داروهای آنتی‌بیوتیک فعلی مزایای متعددی دارند، زیرا آن‌ها یک مکانیسم دفاعی طبیعی هستند که هزاران سال توسط گیاهان در مبارزه با چالش‌های بیماری‌زای خارجی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به دلیل اینکه دارای بار مثبت و غنی از باقی‌مانده‌های اسید آمینه آبرگیز هستند در نتیجه می‌توانند غشاهای پلاسمایی غنی از آنیون میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا را به‌طور موثری مورد هدف قرار دهند. مزیت اصلی آن‌ها این است که به دلیل حمله به غشاهای سلولی، ایجاد مقاومت برای میکروارگانیزم‌ها بسیار دشوار است. از آن‌جا که گیاهان انواع مختلفی از آن‌ها تولید می‌کنند، روش‌های خالص‌سازی می‌تواند بسیار پیچیده و زمان‌بر باشد با این حال می‌توان با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک، پپتیدهای مصنوعی با مقاومت بیشتر در برابر پپتیدازها را به روش شیمیایی سنتز یا به‌صورت نوترکیب تولید کرد. پیش‌بینی می‌شود که پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی بسیار بیشتری، چه از نظر شکل مولکولی و چه از نظر توالی، در آینده نزدیک کشف شوند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر نتیجه یک پایان‌نامه دکتری داروسازی با شماره کد طرح 1397-1-99-1971 و کد تأیید اخلاق IR.LUMS.REC.1400.085 مصوب دانشگاه علوم پزشکی لرستان بوده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Andersson, M., Boman, A. and Boman, H. (2003). Ascaris nematodes from pig and human make three anti-bacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(3): 599-606. <https://doi.org/10.1007/s000180300051>
- Arguelles, J., Lee, J., Cardenas, L.V., Govind, S. and Singh, S. (2023). In silico analysis of a Drosophila parasitoid venom peptide reveals prevalence of the cation-polar-cation clip motif in knottin proteins. *Pathogens*, 12(1): 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010143>
- Attah, F.A., Lawal, B.A., Yusuf, A.B., Adedeji, O.J., Folahan, J.T., Akhigbe, K.O., Roy, T., Lawal, A.A., Ogah, N.B. and Olorundare, O.E. (2022). Nutritional and pharmaceutical applications of under-explored knottin peptide-rich phytomedicines. *Plants*, 11(23): 3271. <https://doi.org/10.3390/plants11233271>
- Bahar, A.A. and Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12): 1543-1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology*, 3(3): 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Cammue, B., De Bolle, M., Terras, F., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S.B., Vanderleyden, J. and Broekaert, W.F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4): 2228-2233. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45866-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45866-8)
- Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.C., Gracy, J., Chau, P.T., Ha, P.T., Hernandez, J.F. and Le-Nguyen, D. (2004). Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current Protein and Peptide Science*, 5(5): 341-349. <https://doi.org/10.2174/1389203043379477>
- Cools, T.L., Struyfs, C., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2017). Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future microbiology*, 12(5): 441-454. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0181>
- De Bolle, M.F., Osborn, R.W., Goderis, I.J., Noe, L., Acland, D., Hart, C.A., Torrekens, S., Van Leuven, F. and Broekaert, W.F. (1996). Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant molecular biology*, 31(5): 993-1008. <https://doi.org/10.1007/BF00040718>
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A. and Grishin, E.V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26(11): 2064-2073. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.007>
- Elsbach, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *The Journal of clinical investigation*, 111(11): 1643-1645. <https://doi.org/10.1172/JCI200318761>
- Gao, G.H., Liu, W., Dai, J.X., Wang, J.F., Hu, Z., Zhang, Y. and Wang, D.C. (2001). Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry*, 40(37): 10973-10978. <https://doi.org/10.1021/bi010167k>
- Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G. and Fliss, I. (2009). PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1): D963-D968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>
- Han, X., Zhou, T., Hu, X., Zhu, Y., Shi, Z., Chen, S., Liu, Y., Weng, X., Zhang, F. and Wu, S. (2023). Discovery and characterization of MaK: a novel knottin antimicrobial peptide from *Monochamus alternatus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24): 17565. <https://doi.org/10.3390/ijms242417565>
- Hancock, R.E. and Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12): 1551-1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I. and Oz, M.T. (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology advances*, 33(6): 1005-1023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>
- Hwang, J.S., Lee, J.Y., Hwang, B.M., Nam, S.H., Yun, E.Y., Kim, S.R. and Lee, D.G. (2010). Isolation and characterization of psacothecin, a novel knottin-type antimicrobial peptide, from *Psacotheca hilaris*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(4): 708-711. <https://doi.org/10.4014/jmb.1002.02003>
- Ireland, D.C., Colgrave, M.L., Nguyencong, P., Daly, N.L. and Craik, D.J. (2006). Discovery and characterization of a linear cyclotide from *Viola odorata*: implications for the processing of circular proteins. *Journal of molecular biology*, 357(5): 1522-1535. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.051>
- Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., Li, H., Xu, H., Lao, X. and Zheng, H. (2019). DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Scientific data*, 6(1): 148. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0154-y>
- Kintzing, J.R. and Cochran, J.R. (2016). Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Current opinion in chemical biology*, 34: 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.08.022>
- Li, C.Y., Rehm, F.B., Yap, K., Zdenek, C.N., Harding, M.D., Fry, B.G., Durek, T., Craik, D.J. and de Veer, S.J. (2022). Cystine knot peptides with tuneable activity and mechanism. *Angewandte Chemie*, 134(19): e202200951. <https://doi.org/10.1002/ange.202200951>
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. and Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
- Li, J., Koh, J.J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C.S. and Beuerman, R.W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11: 73. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00073>
- Lima, A.M., Azevedo, M.I., Sousa, L.M., Oliveira, N.S., Andrade, C.R., Freitas, C.D. and Souza, P.F. (2022). Plant antimicrobial peptides: An overview about classification, toxicity and clinical applications. *International journal of biological macromolecules*, 214: 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2022.06.043>
- Lohner, K. (2009). New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General physiology and biophysics*, 28(2): 105-116. https://doi.org/10.4149/gpb_2009_02_105

- Maiti, S., Purakayastha, S. and Ghosh, B. (2007). Thermal characterization of mustard straw and stalk in nitrogen at different heating rates. *Fuel*, 86(10-11): 1513-1518. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.11.016>
- McDonald, N.Q. and Hendrickson, W.A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 73(3): 421-424. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90127-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90127-C)
- Mir Drikvand, R., Sohrabi, S.S., Sohrabi, S.M. and Samiee, K. (2022). Identification, isolation and expression study of the huain gene family in barley. *Plant Genetic Research*, 8(2), 83-102 (In Persian). <http://dx.doi.org/10.52547/pgr.8.2.7>
- Mookherjee, N., Anderson, M.A., Haagsman, H.P. and Davidson, D.J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature reviews Drug discovery*, 19(5): 311-332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Moore, S.J. and Cochran, J.R. (2012). Engineering knottins as novel binding agents. In *Methods in enzymology* (Vol. 503, pp. 223-251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00009-4>
- Moore, S.J., Leung, C.L. and Cochran, J.R. (2012). Knottins: disulfide-bonded therapeutic and diagnostic peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(1): e3-e11. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.07.003>
- Mylne, J.S., Chan, L.Y., Chanson, A.H., Daly, N.L., Schaefer, H., Bailey, T.L., Nguyencong, P., Cascales, L. and Craik, D.J. (2012). Cyclic peptides arising by evolutionary parallelism via asparaginyl-endopeptidase-mediated biosynthesis. *The Plant Cell*, 24(7): 2765-2778. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099085>
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. and Vogel, H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, 29(9): 464-472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Nguyen, P.Q., Luu, T.T., Bai, Y., Nguyen, G.K., Pervushin, K. and Tam, J.P. (2015). Allotides: proline-rich cystine knot α -amylase inhibitors from *Allamanda cathartica*. *Journal of natural products*, 78(4): 695-704. <https://doi.org/10.1021/np500866c>
- Nguyen, P.Q., Wang, S., Kumar, A., Yap, L.J., Luu, T.T., Lescar, J. and Tam, J.P. (2014). Discovery and characterization of pseudocyclic cystine-knot α -amylase inhibitors with high resistance to heat and proteolytic degradation. *The FEBS journal*, 281(19): 4351-4366. <https://doi.org/10.1111/febs.12939>
- Organization, W.H. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.
- Pallaghy, P.K., Norton, R.S., Nielsen, K.J. and Craik, D.J. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein science*, 3(10): 1833-1839. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031022>
- Palmer, N., Maasch, J.R., Torres, M.D. and de la Fuente-Nunez, C. (2021). Molecular dynamics for antimicrobial peptide discovery. *Infection and Immunity*, 89(4): 10.1128/iai.00703-00720. <https://doi.org/10.1128/IAI.00703-20>
- Phazang, P., Negi, N.P., Raina, M. and Kumar, D. (2020). Plant antimicrobial peptides: next-generation bioactive molecules for plant protection. In *Phyto-microbiome in stress regulation* (pp. 281-293). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_14
- Polanco, D.D.C. (2015). The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. *Microbiology Series*.
- Saboki Ebrahim, K.U. and Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci. Against Microb. Pathog*, 2: 1043-1054.
- Saffar, Z., Sohrabi, S.M., Motamedi, M. and Panji, A. (2025). Identification and sequencing of defensin genes in barley (*Hordeum vulgare* L.): bioinformatics analysis and expression changes in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Genetic Research*, 11(2), 47-64 (In Persian). <https://doi.org/10.22034/pgr.2024.11.2.4>
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P. and De Bolle, M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry*, 46(11): 941-950. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>
- Shao, F., Hu, Z., Xiong, Y.M., Huang, Q.Z., Wang, C.G., Zhu, R.H. and Wang, D.C. (1999). A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430(2): 262-268. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00013-8)
- Silverstein, K.A., Moskal Jr, W.A., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D. and VandenBosch, K.A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*, 51(2): 262-280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x>
- Sinha, M., Singh, R.P., Kushwaha, G.S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S. and Singh, T.P. (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*, 2014(1): 543195. <https://doi.org/10.1155/2014/543195>
- Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H. and Tan, W.L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8(4): 711-757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tang, S.S., Prodhon, Z.H., Biswas, S.K., Le, C.F. and Sekaran, S.D. (2018). Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, 154: 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.002>
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R.S., Jayaraman, V.K. and Idicula-Thomas, S. (2010). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1): D774-D780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1021>
- Torres, M.D., Sothiselvam, S., Lu, T.K. and de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide design principles for antimicrobial applications. *Journal of molecular biology*, 431(18): 3547-3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1): 27-55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870): 389-395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zeynivand, M., Ismaili, A., Sohrabi, S.S. and Armand, N. (2024). Identification, isolation and characterization of some members of the Snakin/GASA genes family in *echinacea purpurea*. *Plant Genetic Research*, 11(2), 99-118 (In Persian). <https://doi.org/10.22034/pgr.2024.11.2.7>