# ارزیابی بیوانفورماتیکی موجودات تراریخته برای پتانسیل آلرژی زایی

**عباس سعیدی*، زهره حاجی برات، زهرا حاجی برات و مسعود توحیدفر**

**ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

## چکیده

یکی از مراحل ارزیابی ایمنی محصولات تراریخته پتانسیل آلرژی زا بودن آن است. بدین منظور بررسی آلرژی‌زا بودن پروتئین-های تولید شده توسط این محصولات با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، امری ضروری تلقی می‌شود. در این مطالعه برای ارزیابی بیوانفورماتیکی شش پروتئین مهم محصولات تراریخته از سه پایگاه داده آلرژنها (Allergenonline و SDAP و Allermatch) استفاده شد. توالی‌های ورودی (Query) محصولات برای بررسی مشابهت با توالی کامل و آمینواسیدهای ۸۰ تایی با شباهت بیشتر از ۵۰ و ۳۵ درصد بترتیب در پایگاه داده آلرژن مورد بررسی قرار گرفتند. از بین پروتئین-های مورد مطالعه، کیتیناز و PRP که مصرف انسانی دارند شباهت بالایی با پروتئین‌های آلرژن نشان دادند. این پروتئین‌ها منشا گیاهی داشته و بطور طبیعی آلرژن محسوب می شوند. درحالی که پروتئین هورمون رشد (Growth Hormone-1)، Cry1AC (پروتئین کریستال دفع آفات)، CspB (پروتئین تحمل به خشکی) و (Rpi-vnt1.2) شباهتی با پروتئین‌های آلرژن نشان ندادند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ارزیابی آلرژی‌زا بودن و آنالیزهای بیشتر (بررسی کل پروتئین ها) قبل از تجاری سازی این محصولات لازم است تا ایمنی محصولات تراریخته تایید شود.

**واژه های کلیدی**: حساسیت‌زایی، شباهت توالی، ارزیابی سلامت، محصولات تراریخته

* نویسنده مسئول، تلفن: 9822431664+ ، پست الکترونیکی: abbas.saidi@gmail.com

## مقدمه

با توجه به روند افزایش سریع جمعیت و براساس آمار جهانی، تقاضا برای غذا در سال ۲۰۵۰ نسبت به سال ۲۰۰۶ به اندازه‌ی ۷۰ درصد افزایش خواهد یافت (۳). بنابراین، برای تامین غذا برای این جمعیت استفاده از اصلاح کلاسیک و روش‌های موجود کافی نمی باشد، در نتیجه برای پاسخگوی به این نیاز، استفاده از محصولات تراریخته ضروری بنظرمی‌رسد. با توجه با اینکه کشت محصولات کشاورزی به دلیل استفاده ازآفت‌کش‌ها و علف کش‌ها بر محیط زیست اثر می‌گذارد و باعث تغییر در الگوی تنوع زیستی کشاورزی می‌شود. برای رفع این نگرانی‌ها می‌توان با استفاده از محصولات تراریخته این نگرانی‌ها را کاهش داد (۱۲). تولید این محصولات از طریق تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند یک روش تکمیلی در برنامه های اصلاح ژنتیک گیاهان جهت مقاومت در برابر پاتوژن‌ها، علف‌کش‌ها و استرس‌های محیطی باشد (۲۱).

قبل از تجاری سازی محصولات تراریخته، ارزیابی پتانسیل حساسیت‌زایی آنها بسیار مهم می‌باشد. یکی از روش های ارزیابی پتانسیل حساسیت‌زایی محصولات تراریخته استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی است. ماهیت و محتوای پایگاه‌های اطلاعاتی از محصولات تراریخته ارتباط مستقیمی با درجه تاثیر و کارایی تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی این پایگاه‌ها برای بررسی حساسیت‌زایی محصولات تراریخته دارد. اخیرا تعداد پایگاه‌های اطلاعاتی آلرژن‌ها افزایش یافته است و هر کدام برخی از نیازهای موردنظر را برآورده می‌سازند. این پایگاه‌های اطلاعاتی

درحجم داده، سازماندهی (Organization) و قابلیت (Capability) تفاوت دارند که مهم ترین آنها SDAP ، Allermatch و Allergenonline است(۱۷). گزارش Codex (۱) نشان داده است که برای بررسی تشابه بین توالی پروتئینی مورد نظر با توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی باید معیار خاصی در نظر گرفته شود. معمولا این معیار با در نظر گرفتن ۳۵ درصد شباهت توالی در ۸۰ یا بیش از ۸۰ آمینواسید توصیه می‌شود. براساس چندین گزارش، تطابق شش آمینو اسیدی با هر توالی آلرژن به تنهایی، به طور تصادفی اتفاق می‌افتد بنابراین استفاده از این معیار پیش‌بینی حساسیت‌زایی را محدود می‌کند (۱۰ و ۱۷). از الگوریتم های دیگری که در این خصوص استفاده می شود توالی کامل پروتئین است. در اینصورت شباهت بالای ۵۰ درصد با E-value کمتر $10^{-8}$ آلرژن در نظر گرفته می‌شود. این دو روش مود تایید سازمان جهانی همچون WHO است. سطح زیر کشت محصولات تراریخته در حال حاضر ۲۰۰ میلیون هکتار است که اکثر آنها پروتئین هایی به شرح زیر (به جزء پروتئین هورمون رشد برای ماهی تراریخته) می‌باشند. PRP و کیتیناز متعلق به پروتئین‌های مرتبط با پاتوژینسیتی مرتبط با عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند. این دو پروتئین با منشاء گیاهی، مورد توجه بیوتکنولوژیست‌ها است و برای ایجاد گیاه مقاوم در برابر قارچ های گیاهی اسفاده شده است (۱۶). ژن CspB با منشاء باکتریایی که در شوک گرمایی فعال شده، به ذرت انتقال یافت (۲۳). این ذرت تراریخته با نام تجاری MON87460 دارای ژن cspB (cold shock protein B) بوده که تحت پروموتر اکتین برنج، باعث ایجاد مقاومت به شرایط خشکی در ذرت شده است. اولین ماهی تراریخته سالمون، در سال ۲۰۱۵ به سرعت زیادی در آمریکا پرورش یافت. این ماهی حاوی ژن هورمون رشد (GH-1) است که نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای تنظیمی در بافت‌های مختلف مهره‌داران ایفا می‌کند(۱۹). منشاء این ژن از ماهی سالمون آتلانتیک (*Atlantic salmon*) *بود. این ماهی تراریخته در* سال ۲۰۱۵، توسط اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) برای تولید تجاری تایید شد (۸). همچنین، ژن‌های Rpi-vnt1.2 و *Cry* 1Ac به ترتیب به سیب‌زمینی و نیشکر انتقال یافته و مورد ارزیابی قرار گرفتند. سیب زمینی تراریخته حاوی ژن Rpi-vnt1.2 باعث ایجاد مقاومت به قارچ *Phytophthora infestans* می‌شود. ژن Cry 1Ac برای مقاومت به آفات حشره‌ای با منشا باکتریایی است. گیاهان زیادی همچون نیشکر، پنبه، سویا و کلزا با ژن *Cry* 1Ac برای مقاومت به آفت، تراریخته و تجاری شدند. علیرغم اینکه محصولات تراریخته نقش مهمی در افزایش عملکرد دارند، قبل از تجاری شدن باید ارزیابی‌های لازم در مورد ایمنی آنها صورت گیرد. یکی از این ارزیابی‌ها، آلرژی‌زایی پروتئین-های بیان شده در محصولات تراریخته است. هدف از این تحقیق ارزیابی آلرژی زایی موجودات تراریخته با استفاده از انالیز های بیوانفوماتیکی به عنوان یکی از روش های ارزیابی در راستای ایمنی محصولات تراریخته، قبل از تجاری شدن است.

## مواد و روشها

**انتخاب توالی‌های پروتئینی:** شش توالی پروتئینی (تراژن) مورد استفاده در این مطالعه شامل هورمون رشد (GH-1(Growth hormone-1) از ماهی (No. Q5SDS1)، کیتیناز (No. M13968) (۲۰)، ژن (Cry1Ac (Pesticidal crystal protein)) (No.P05068)، ژن CSPB(Cold shock protein) (uniprot No.P32081)، ژن Rpi-vnt1.2 با شماره (uniprot No.B7U1D8) و توالی ژن PRP(Pathegenesis- related protein) (No. X14065) (۱۳) از سایت NCBI و Uniprot دانلود شد (۱۱). ژن GH-1 فاکتورهورمون رشد است که از ماهی *AquAdvantage Salmon* گرفته شده است، کیتیناز ژنی است که باعث مقاومت به بیماری های قارچی می شود و منشاء گیاهی دارد و *cry*1AC ژنی است که منشاء باکتری دارد و باعث مقاومت به آفت می شود. ژن CSPB منشاء

باکتریایی داشته و باعث تحمل به خشکی می شود. ژن Rpi-vnt باعث مقاومت به بیماری بلایت سیب زمینی می شود که از سیب زمینی وحشی گرفته شده است.

**پایگاه‌های اطلاعاتی آلرژن:** بررسی شباهت توالی‌ها، با مقایسه توالی‌های پروتئینی با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی آلرژن انجام گرفت. در مطالعه حاضر از سه پایگاه اطلاعاتی مهم و مورد تایید سازمان های جهانی کدکس و WHO به نام‌های Allermatch، Allergenonline و پایگاه داده ساختاری پروتئین‌های آلرژنیک (SDAP) برای ارزیابی حساسیت‌زایی استفاده شدند.

**جستجوی پایگاه توالی برای همردیفی آمینواسیدها با توالی کامل:** توالی‌های موردنظر به فرمت FASTA با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی آلرژن با پروتئین های آلرژن مقایسه شدند و بدنبال آن همردیف‌سازی بین توالی‌ها بر اساس دو الگوریتم همردیفی کامل و ۸۰ تایی صورت گرفت. در همردیفی توالی کامل ، پروتئین های با 50 درصد شباهت و بیشتر از آن با پروتئین های آلرژن موجود در پایگاه اطلاعاتی، و E-Value کمتر از $10^{-8}$ آلرژن محسوب می شوند (1،2)، در غیر اینصورت آلرژن شناخته نمی شوند (۲۵).

در الگوریتم اسید آمینه ۸۰ تایی معیار همردیفی با آلرژن‌های شناخته شده مبتنی بر میزان ۳۵ درصد شباهت با استفاده از پنجره کشویی (sliding window) ۸۰ اسیدآمینه و E-Value کمتر از $10^{-8}$ است که این میزان باآلرژن شناخته شده استاندارد FAO/WHO نیز مطابقت دارد. در این روش بجای اینکه کل توالی با آلرژن های موجود مقایسه شود ۸۰ تا اسید آمینه از توالی مورد نظر، مورد مقایسه قرار می گیرد. در این روش پروتئین مورد نظر بصورت هم پوشان به قطعات ۸۰ تایی تقسیم می شود. هر قطعه ۸۰ آمینواسیدی با توالی‌های موجود در پایگاه داده بررسی می شود. ارزیابی حساسیت‌زایی پروتئین‌های مورد نظر براساس مقررات سازمان‌های بین المللی نظیر FAO و WHO بصورت شباهت بالای ۳۵ درصد و E-value کمتر از $10^{-8}$ می باشد.

**پایگاه اطلاعاتی Allergenonline:** پایگاه اطلاعاتی Allergenonline (http://www.allergenonline.org/) به سادگی امکان دسترسی به فهرست پروتئین‌های آلرژن را فراهم نموده است. این پایگاه اطلاعاتی امکان شناسایی پروتئین‌هایی که پتانسیل حساسیت‌زایی دارند را فراهم می‌آورد و میزان آن را تعیین می‌نماید. این وب سایت برای ارزیابی ایمنی پروتئین‌های جدیدی که به وسیله مهندسی-ژنتیک تولید شده اند، طراحی شده است. Allergenonline یکی از بهترین پایگاه‌های اطلاعاتی برای ارزیابی بیوانفورماتیکی حساسیت‌زایی پروتئین‌ها می‌باشد (۷).

**پایگاه اطلاعاتی Allermatch:** پایگاه اطلاعاتی Allermatch (http://allermatch.org) مطابق با توصیه‌های کنونی کنوانسیون FAO/WHO برای پیش‌بینی کارآمد و استاندارد حساسیت‌زایی احتمالی پروتئین‌ها است. Allermatch از ابزارهای مورد استفاده تحت وب می‌باشد که برای شناسایی قطعات ۸۰ آمینواسیدی با تشابه بیشتر از ۳۵ درصد بکار می رود (۴).

**پایگاه اطلاعاتی SDAP** : یکی از پرکاربردترین و معروف‌ترین پایگاه‌های اطلاعاتی مولکولی برای بررسی آلرژی زایی است (https://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_fas.html). این ابزار، اطلاعاتی را در زمینه وضعیت مولکولی و ساختاری، بویژه ساختار سه بعدی آلرژن‌ها در اختیار کاربر قرار می-دهد. همچنین در این وب سرور امکان مقایسه و تجزیه و تحلیل توالی‌های پروتئینی نوترکیب نیز وجود دارد. SDAP داده‌های مربوط به سایر پایگاه‌های اطلاعاتی و ابزارهای محاسباتی متعدد را برای مطالعه آلرژن‌ها گردآوری کرده است.

## نتایج

در مطالعه حاضر، پتانسیل حساسیت‌زایی شش توالی پروتئین بیان شده در محصولات تراریخته با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. جزئیات اطلاعات در مورد منابع، میزبان‌ها، عملکرد تراژن-های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خلاصه بررسی پتانسیل حساسیت‌زایی ژن های مورد نظر

Table1. Summary of evaluation of allergenicity potential of target transgene.

| ردیف | تراژن | منبع | میزبان | عملکرد و کاربرد | حساسیت‌زایی | منابع |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | هورمون رشد (GH-1) | *Oncorhynchus tshawytscha* | ماهی سالمون آتلانتیک | تنظیم کننده فرایندهای متابولیکی و رشدی در بافتهای مختلف مهره داران | - | (۸) |
| ۲ | کیتیناز | *Phaseolus vulgaris* | پنبه | درگیر در مقاومت به حمله قارچ و آفت | + | (۲۱) |
| ۳ | Cry1Ac | *Bacillus thuringiensis subsp. Kur staki strain HD73* | نیشکر | مقاومت در برابر حشرات لپیدوپترا با انتخاب مصنوعی پوشش میانی خود را تنظیم می کند | - | (۶) |
| ۴ | CspB | *Bacillus subtilis* | ذرت | نگهداری حفظ عملکرد سلولی طبیعی تحت شرایط تنش آب با حفظ ثبات RNA و ترجمه | - | (۲۴) |
| ۵ | Rpi-vnt1.2 | *Solanum venturii* | سیب زمینی | مقاومت به بیماری بلایت دیرهنگام | - | (۵) |
| ۶ | PRP | *Nicotiana tabacum* | پنبه | مقاومت گیاه به پاتوژنها | + | (۱۳) |

**ژن GH-1**: نتایج آنالیز آلرژی زایی ژن هورمون رشد نشان داد که بر اساس پایگاه اطلاعاتی Allergenonline هیچ شباهتی با توالی‌های آلرژن‌های شناخته شده مشاهده نشد(جدول۱). ارزیابی همردیفی توالی کامل در دو پایگاه آلرژن SDAP و Allermatch نشان داد که شباهت توالی مذکور با پروتئین‌های آلرژن Tri a 14 و Rice c 3 a به ترتیب ۷/۲ و ۳۶/۸ درصد بود. در نتیجه توالی GH-1 به دلیل شباهت پایین با توالی‌های Tria 14, Rice 3 a طبق **استاندارد** FAO/WHO نمی تواند آلرژن محسوب شود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن *GH-1* با استفاده از همردیفی توالی کامل و بررسی توالی ۸۰ آمینواسیدی

Table 2. Bioinformatics analysis of *GH-1* gene using full length alignment and 80 aa sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Tri a 14 *Triticum aestivum* | ۷,۲ | |
| Allergenonline | هیچ شباهتی مشاهده نشد | هیچ شباهتی بزرگتر از ۳۵ درصد مشاهده نشد |
| Allermatch | | |
| Ric c 3 *Ricinus communis* | ۳۶,۸ | |

**ژن کیتیناز**: بررسی همردیفی توالی کامل پروتئین کیتیناز با توالی‌های آلرژن نشان داد که این پروتئین با پروتئین آلرژن Pers a 1 در حدود ۶۷/۶۸ درصد شباهت دارد و می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا این پروتئین آلرژن است و با پروتئین آلرژن اندوکیتیناز ۷۴ درصد و با توالی Hev b در حدود ۷۳/۴ درصد، بالاترین شباهت در سه پایگاه آلرژن

نشان داد (جدول ۳). همچنین در بررسی سطح توالی ۸۰ آمینواسیدی درتوالی ورودی، شباهت بالای ۳۵ درصد با آلرژنهای Pers a 1 و اندوکیتیناز مشاهده شد. (جدول ۳). بنابراین طبق استاندارد FAO/WHO می‌توان کیتیناز را آلرژن در نظر گرفت .

جدول۳- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن کیتیناز با استفاده از همردیفی کامل و بررسی توالی ۸۰ آمینواسیدی.

Table 3. Bioinformatics analysis of *chitinase* gene using full length FASTA alignment and 80 aa sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Pers a 1 *(Persea Americana*) | ۶۷,۶۸ | ۷۶,۲۵ |
| Hev b 11 .0101 (*Hevea brasiliensis*) | ۶۵,۵۵ | ۷۳,۷۵ |
| Mus a 2 (*Musa acuminate)* | ۶۷,۳۸ | ۸۰ |
| Hev b 11 .0102 *(Hevea brasiliensis)* | ۶۴,۹۴ | ۷۵ |
| Allergenonline | | |
| Endochitinase *(Persea Americana)* | ۷۴ | ۸۱,۳ |
| Putative class I chitinase *(Heavea brasiliensis*) | ۷۳,۴ | ۸۴ |
| Putative chitinase (Musa acuminate) | ۷۲ | ۸۱,۳ |
| Class I chitinase (*Heavea brasiliensis subsp.brasilien*) | ۷۳ | ۸۲,۵ |
| Allermatch | | |
| Hev b 11 .0101 *(Hevea brasiliensis)* | ۷۳,۴ | ۸۳,۸ |
| Pers a *(Persea Americana)* | ۷۴,۷ | ۸۲,۵ |
| Mus a *(Musa acuminate*) | ۷۱,۹ | ۸۱,۲۷ |
| Hev b11 .0102 *(Hevea brasiliensis)* | ۷۲,۷ | ۸۱,۲۰ |

**ژن Cry1Ac**: پروتئین Cry1Ac با پروتئین های آلرژن Tri a gliadin از گیاه *Triticum aestivum* و توالی Anac 2از گیاه *Ananas comosu* شباهتی درحدود ۲-۳ درصد نشان داد. بررسی شباهت در سطح توالی ۸۰ آمینواسیدی در پایگاه Allergenonline نشان داد که هیچ بخشی از توالی پروتئینی Cry1Ac با توالی‌های آلرژن شناسایی شده در سایر پایگاه‌های آلرژن شباهتی نداشت، در نتیجه نمی توان که این پروتئین را آلرژن در نظر گرفت.

جدول۴- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن *Cry1Ac* با استفاده از همردیفی توالی کامل و بررسی با استفاده از توالی ۸۰ آمینواسیدی

Table 4. Bioinformatics analysis of *Cry1Ac* gene using full length FASTA alignment and 80 aa sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Tri a gliadin *(Triticum aestivum)* | ۳,۶۰ | ۲۶,۲۵ |
| Ana c 2 *(Ananas comosus)* | ۳,۶۰ | ۲۳,۷۵ |
| *(Phleum pretense*) Phl p 5 | ۲,۶۰ | ۱۲,۵ |
| Chi t 6 *(Chironomus thummi thummi*) | ۳,۵۰ | ۲۸,۷۵ |
| Allergenonline | هیچ شباهتی مشاهده نشد | هیچ شباهتی بزرگتر از ۳۵ درصد مشاهده نشد |
| Allermatch | | |
| Cor a 1.0102 *(Corylus avellana)* | ۲۷,۶ | |
| Cor a 1.0101 *(Corylus avellana)* | ۲۸,۶ | |

**ژن *CspB***: شباهت توالی پروتئین *CspB* با استفاده از همردیفی توالی کامل در سه پایگاه آلرژن، با پروتئین های آلرژن Que a 1.010 از گیاه *Quercus alba* و Orys1 از گیاه *Oryza sativa* و نیز با توالی Vig r 1 از گیاه *Vigna radiate* پایین بود. به دلیل اینکه توالی پروتئین *CspB* از طول کمتر از ۸۰ آمینواسید برخوردار بود. بنابراین، تجزیه و تحلیل در سطح توالی ۸۰ آمینواسیدی امکان پذیر نبود (جدول۵).

جدول ۵- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن *CspB* با استفاده از همردیفی کامل توالی و بررسی با استفاده از توالی ۸۰ آمینواسیدی

Table 5. Bioinformatics analysis of *CspB* gene using full length FASTA alignment and 80 aa sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Que a 1.0101 *Quercus alba* | ۱۴,۹۳ | |
| Ory s 1 (*Oryza sativa)* | ۲۵,۳۷ | |
| Asp o 13 *(Aspergillus oryzae*) | ۲۸,۳۶ | |
| Mer a 1 *(Mercurialis annua*) | ۱۹,۴۰ | |
| Allergenonline | هیچ شباهتی مشاهده نشد | هیچ شباهتی بزرگتر از ۳۵ درصد مشاهده نشد |
| Allermatch | | |
| Que a 1 *(Quercus alba)* | ۶۶,۷ | |
| Vig r1 *(Vigna radiate)* | ۶۶,۷ | |

**ژن *Rpi-vnt1.2***: در پایگاه اطلاعاتی Allermatch ، بیشترین شباهت در همردیفی توالی کامل این پروتئین با پروتئین آلرژن Hev b از گیاه *Hevea brasiliensis* در حدود ۳۸,۱ درصد و با پروتئین آلرژن Art v 1 از گیاه *Artemisia vulgaris* ۳۳,۳ درصد ارزیابی شد. در در پایگاه اطلاعاتی SDAP این ژن با الگوریتم ۸۰ آمینواسیدی با پروتئین آلرژن Tyr p 24 از گیاه *Tyrophagus putrescentiae* و پروتئین Alt a 10 از گیاه *Alternaria alternate* بترتیب شباهت ۲۷/۵ و ۲۲/۵ درصدی را نشان داده (جدول ۶).

جدول ۶- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن *Rpi-vnt1.2* با استفاده از همردیفی توالی کامل و توالی ۸۰ آمینواسیدی

Table 6. Bioinformatics analysis of *Rpi-vnt1.2* gene using full FASTA alignment and 80 amino acid sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Tyr p 24 *(Tyrophagus putrescentiae*) | ۳,۶۵ | ۲۷,۵ |
| Fra a 3 *(Fragaria ananassa*) | ۱,۷۷ | ۱۶,۲۵ |
| Alt a 10 *(Alternaria alternate*) | ۵,۱۹ | ۲۲,۵ |
| Mala s 6 *(Malassezia sympodialis*) | ۲,۲۱ | |
| Allergenonline | هیچ شباهتی مشاهده نشد | هیچ شباهتی بزرگتر از ۳۵ درصد مشاهده نشد |
| Allermatch | | |
| *(Myrmecia pilosula*) Myr p | ۲۷,۳ | |
| Hev b *(Hevea brasiliensis*) | ۳۸,۱ | |
| Art v 1 *(Artemisia vulgaris)* | ۳۳,۳ | |

پروتئین *Rpi-vnt1.2* در پایگاه اطلاعاتی آلرژن Allergenonline با الگوریتم ۸۰ آمینواسیدی هیچ شباهتی با توالی‌های آلرژن موجود در این پایگاه نشان نداد.

**ژن PRP**: با استفاده از بانک های اطلاعاتی آلرژن SDAP ، Allergenonline و Allermatch ، نتایج الگوریتم همردیفی توالی کامل پروتئین PRP با آلرژن *Cynodon dactylon* (Cyn d 24.01) بترتیب شباهتی در حدود ۳۳,۳۳ ، ۶۱,۳ و ۴۷,۳ نشان داد (جدول ۶). *آنالیز الگوریتم ۸۰ آمینواسیدی ، شباهت توالی پروتئین* PRP *با* توالی Cyn d 24.01 از گیاه *Cynodon dactylon* ۳۵ را درصد نشان داد (جدول ۷).

جدول۷- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن PRP با استفاده از همردیفی کامل و توالی ۸۰ آمینواسیدی

Table 7. Bioinformatics analysis of *PRP* gene using full FASTA alignment and 80 amino acid sliding window search.

| پایگاه های آلرژن | همردیفی توالی کامل %شباهت | همردیفی توالی ۸۰ اسیدآمینه ای شباهت% |
|---|---|---|
| SDAP | | |
| Cyn d 24.01 *(Cynodon dactylon*) | ۳۳,۳۳ | ۴۵,۰ |
| Vesp c 5 *(Vespa crabo*) | ۲۵,۴۲ | |
| Pol d 5 *(Polistes dominulus)* | ۲۵,۴۲ | |
| Allergenonline | | |
| pathogen-related protein1 [inodoru] | ۶۱,۳ | ۶۶,۷ |
| art v2 allergen (Artemisia Vulgaris) | ۴۵,۸ | ۵۴,۳ |
| allergen 5 protein (Vespa maginifa) | ۳۵,۸ | ۳۹,۵ |
| Venom allergen 5 (Ag5-1) | ۳۴,۹ | ۳۹,۵ |
| Allermatch | | |
| Cyn d 24.01 *(Cynodon dactylon)* | ۴۳,۷ | ۴۷,۰ |
| Vesp c 5 *(Vespa crabo*) | ۳۴,۹ | ۳۸,۵ |
| Vesp m (*Vespa mandarina*) | ۳۴,۴ | ۳۹,۵ |
| Vesp c *(Vespa crabo*) | ۳۴,۱ | ۳۷,۳ |

## بحث و نتیجه گیری

یکی از اهداف مهندسی ژنتیک تولید پروتئین‌های جدید در قالب موجودات تراریخته می‌باشد که اصلاح سنتی نمی‌تواند این نوع پروتئین‌ها را تولید نماید. مهم‌ترین مسئله در استفاده از محصولات تراریخته، تضمین ایمنی زیستی و عدم حساسیت زایی آنها است (۳). برای بررسی حساسیت‌زایی توالی‌های پروتئینی بیان شده در محصولات تراریخته قبل از هر چیز، استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی حائز اهمیت است . برای بررسی شباهت بین توالی‌های ورودی و توالی‌های شناخته شده آلرژن، از دستورالعمل‌های FAO / WHO (۲) و Codex (۱) استفاده می‌شود که مور تایید مجامع بین المللی است. تشابه توالی آمینواسیدی اولین قدم برای ارزیابی حساسیت‌زایی بوده که اطلاعات اولیه را درمورد توالی مورد نظر به ما می‌دهد (۱۹). نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین GH-1 شباهت پایینی با آلرژن های Tria 14, Rice 3 a دارد که حاکی از آلرژن نبودن این پروتئین است (جدول ۲). ژن کیتیناز با آلرژن Hev b 11.0101 و Hev b 11.0102 که دو ایزوفرم متعلق به خانواده پروتئینی پاتوژنسیس مرتبط با پروتئین PRP- ۳ و کلاس I کیتیناز خانواده GH19 هستند شباهت بالایی نشان داد (۱۴). در مطالعه‌ایی بر روی آلرژی زایی کیتیناز لوبیا، مشخص شد که این ژن به عنوان آلرژن محسوب می شود که با نتایج ما مطابقت داشت (۲۷). این ژن، در گیاهانی مثل گندم، جو و برنج بطور طبیعی موجود

بوده و از گذشته مورد استفاده انسانی قرار داشته است ولذا نمی تواند به عنوان یک نگرانی محسوب شود (۱۵).

همچنین آنالیز آلرژی زایی پروتئین Cry1Ac نشان داد که این پروتئین از پتانسیل حساسیت زایی برخوردار نمی‌باشد. این پروتئین از باکتری باسیلوس تورنجینسیس گرفته شده-است که یکی از شرایط آلرژی زایی بودن پروتئین، آلرژی زا بودن منشاء ژن است. نظر به اینکه باکتری باسیلوس غیر آلرژی زاست نهایتا نمی تواند ژن برگرفته از آن آلرژی زا باشد که این نتایج با نتایج Gao و همکاران مطابقت دارد(۶). در گزارشی نیز اشاره شد که آنالیز بیوانفورماتیکی این پروتئین در ذرت تراریخته حاوی Cry1Ac پتانسیل حساسیت‌زایی ندارد (۵). براساس مطالعه‌ایی که توسط سایر محققان انجام شده است پروتئین Cry (Cry1Ac) که در محصولات تراریخته تولید می‌شود هیچ شباهتی با توالی‌های آلرژن ندارد، در نتیجه پتانسیل حساسیت‌زایی در این محصول ایجاد نخواهد کرد (۲۳،۵).

در این مطالعه بررسی پروتئین CspB با استفاده از الگوریتم همردیفی توالی کامل، نشان داد که شباهت معنی‌داری بر اساس پروتکلFAO/ WHO با آلرژن های شناخته شده ندارد. همچنین طبق مطالعات پیشین، هیچ گونه همردیفی بین CspB با سایر پروتئین‌های موجود در پایگاه داده آلرژن مشاهده نشد (۱۳). بررسی پروتئین *Rpi-vnt1.2* در پایگاه اطلاعاتی آلرژن Allergenonline بر اساس الگوریتم توالی کامل و مقایسه‌ایی ۸۰ آمینواسیدی، نشان داد که هیچ شباهتی با توالی‌های آلرژن موجود در این پایگاه ندارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که توالی‌های پروتئین ( Cry1Acو CspB و*Rpi-vnt1*) ، که سطح زیادی از محصولات تراریخته در دنیا را بخود اختصاص داده اند، شباهتی با توالی‌های آلرژنهای شناسایی شده ندارند. لازم به یادآوری است که اینگونه گیاهان تراریخته، بعد از ارزیابی ایمنی و طی کردن کلیه مراحل انالیزها از جمله ارزیابی آلرژی زایی توانستند مجور تجاری شدن را دریافت کنند و به مصرف انسان برسند. بطورکلی، پایگاه های آلرژن نقش کلیدی در بررسی آلرژی زایی محصولات تراریخته بر اساس پروتکلFAO/ WHO دارند (۹).

مطالعات نشان داده است که با استفاده از مهندسی ژنتیک می‌توان ژن‌های تولید کننده پروتئین‌های آلرژن را با استفاده از خاموشی ژن نیز حذف نمود. به عنوان مثال با مهار ژن آنزیم ۵–متیل سیتوزین DNA گلوکوزیلاز در گندم، می-توان گندم تراریخته را با کاهش ۷۶/۴ درصد گلوتن در بذر بدست آورد (۲۵). بررسی شباهت توالی پروتئین جدید با آلرژن‌های شناخته شده یکی از مهمترین مراحل در فرایند ارزیابی ایمنی زیستی می‌باشد. در خصوص پروتئین‌های جدید که شباهت بالایی در توالی یا ساختار کنفورماسیون با پروتئین‌های آلرژن دارند، لازم است بررسی های بیشتری اعم از *in vivo* و *in vitro* صورت گیرد. بررسی حساسیت‌زایی پروتئین‌های جدید در محصولات تراریخته برای محققان اهمیت زیادی دارد. پروتئین‌های جدید ممکن است شباهت زیادی با هر آلرژن شناخته شده داشته باشند که در اینصورت ممکن است از نظر ایمونولوژیکی در بدن احتمال واکنش حساسیت‌زایی را به‌شدت بالا ببرند، اگرچه تا بحال چنین موردی مشاهده نشده است ولی ارزیابی آلرژی زایی بروش علمی، قبل از تجاری شدن محصولات تراریخته ضروری است. در این مطالعه، ژن‌های cry1Ac ، CspB و هورمون رشد GH-1 هیچ شباهتی به الرژن ها نداشتند. برعکس، پروتئین‌های کیتیناز و PRP شباهت بالایی را با آلرژن نشان دادند. گفتنی است که این ژن‌ها بطور طبیعی در گیاهان وجود داشته و لذا نمی‌تواند به عنوان نگرانی محسوب شوند، چراکه در طول تاریخ مصرف آن باعث شده تا سیستم ایمنی بدن آنرا به عنوان آنتی ژن در نظر نگیرد. در انتها لازم به یادآوری است در صورت جدید بودن پروتئین، لازم است ارزیابی‌های آزمایشگاهی تکمیلی نیز صورت گیرد.

## منابع


1- Codex Alimentarius Commission. (2003). "Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants" Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity,25th Session, 30 June–5 July, Rome, Italy. pp 47–60.

2- FAO. (2009). "Indigenous people; food systems: the many dimension of culture diversity and environment for nutrition and health". Rome, FAO, and Ste. Anne de Bellevue, Canada, Centre for Indigenous Peoples' Nutrition and Environment

3- Fard, N.A., Minuchehr, Z. and Mousawi, A. (2013). "Allergenicity study of genetically modified herbicide resistant crops (Bioinformatics Assessment)." *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci* 2.3: 24-32

4- Fiers, M. W., Kleter, G. A., Nijland, H., Peijnenburg, A. A., Nap, J. P., & Van Ham, R. C. (2004). Allermatch™, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. *BMC bioinformatics*, *5*(1), 133.

5- Foster, S.J., Park, T.H., Pel, M., Brigneti, G., Śliwka, J., Jagger, L., van der Vossen, E. and Jones, J.D. (2009). "Rpi-vnt1. 1, a Tm-22 homolog from Solanum venturii, confers resistance to potato late blight." *Molecular plant-microbe interactions* 22.5: 589-600

6- Gao, S., Yang, Y., Wang, C., Guo, J., Zhou, D., Wu, Q., Su, Y., Xu, L. and Que, Y. (2016). "Transgenic sugarcane with a cry1Ac gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer." *PLoS One* 11.4: e0153929

7- Goodman, R. E., Ebisawa, M., Ferreira, F., Sampson, H. A., van Ree, R., Vieths, S., ... & Taylor, S. L. (2016). AllergenOnline: a peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. *Molecular nutrition & food research*, *60*(5), 1183-1198.

8- Hevrøy, E.M., Tipsmark, C.K., Remø, S.C., Hansen, T., Fukuda, M., Torgersen, T., Vikeså, V., Olsvik, P.A., Waagbø, R. and Shimizu, M. (2015). "Role of the GH-IGF-1 system in Atlantic salmon and rainbow trout postsmolts at elevated water temperature." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 188: 127-138.

9- Hileman, R.E., Silvanovich, A., Goodman, R.E., Rice, E.A., Holleschak, G., Astwood, J.D. and Hefle, S.L. (2002). "Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database." *International archives of allergy and immunology*128.4: 280-291

10- Ladics, G.S., Bannon, G.A., Silvanovich, A. and Cressman, R.F. (2007)."Comparison of conventional FASTA identity searches with the 80 amino acid sliding window FASTA search for the elucidation of potential identities to known allergens." *Molecular nutrition & food research* 51.8: 985-998.

11- Mehdizadeh, V., Nassaghusseini, S. M., Safaei, N., Saidi, A. (2013). "NCBI: A Comprehensive Guide. Agricultural Education and Extension Publication". 186 pages. Tehran, Iran.

12- Rahman, M., Shaheen, T., Irem, S. and Zafar, Y. 2015**.** Biosafety risk of genetically modified crops containing CRY genes, Environmental Chemistry for a Sustainable World, 5, 307-334.

13- Raufi, A., Tohidfar, M., Soluki, M., Mohsenpour, M.(2012). "Isolation and Cloning of Two Genes from PR1 Family and Construction of Treble Plasmids Containing 3 Groups of Genes for Producing Transformed Plants Resistant to Fungal Diseases". Journal of Agricutural Biotechnology.2.27-46.

14- O'riordain, G., Radauer, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Adhami, F., Peterbauer, C.K., Blanco, C., Godnic-Cvar, J., Scheiner, O., Ebner, C. and Breiteneder, H. (2002). "Cloning and molecular characterization of the Hevea brasiliensis allergen Hev b 11, a class I chitinase." *Clinical & Experimental Allergy* 32.3: 455-462

15- Sánchez-Monge, R., Blanco, C., Perales, A. D., Collada, C., Carrillo, T., Aragoncillo, C., & Salcedo, G. (2000). Class I chitinases, the panallergens responsible for the latex-fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *106*(1), 190-195.

16- Sexton, A. C., & Howlett, B. J. (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryotic Cell*, *5*(12), 1941-1949.

17- Mishra, A., Gaur, S. N., Singh, B. P., & Arora, N. (2012). In silico assessment of the potential allergenicity of transgenes used for the

development of GM food crops. *Food and chemical toxicology*, *50*(5), 1334-1339.

18- Silvanovich, A., Nemeth, M.A., Song, P., Herman, R., Tagliani, L. and Bannon, G.A. (2005). "The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity." *Toxicological Sciences* 90.1: 252-258.

19- Singh, A.K., Singh, B.P., Prasad, G.B.K.S., Gaur, S.N. and Arora, N. (2008). "Safety assessment of bacterial choline oxidase protein introduced in transgenic crops for tolerance against abiotic stress." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.24: 12099-12104

20- Thompson, B.J., Shang, C.A. and Waters, M.J. (2000). "Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays." *Endocrinology* 141.11: 4321-4324.

21- Tohidfar, M., Hossaini, R., Bashir, N.S. and Meisam, T.(2012). "Enhanced resistance to Verticillium dahliae in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from Phaseolus vulgaris." *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 48.1: 33-41..

22- Van Montagu, Marc. (2011). "It is a long way to GM agriculture." *Annual review of plant biology* 62: 1-23.

23- Verma, A.K., Misra, A., Subash, S., Das, M. and Dwivedi, P.D. (2011) "Computational allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops." *Immunopharmacology and immunotoxicology*33.3: 410-422.

24- Wang, C., Burzio, L.A., Koch, M.S., Silvanovich, A. and Bell, E. (2015) "Purification, characterization and safety assessment of the introduced cold shock protein B in DroughtGard™ maize." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71.2: 164-173.

25- Wen, S., Wen, N., Pang, J., Langen, G., Brew-Appiah, R.A., Mejias, J.H., Osorio, C., Yang, M., Gemini, R., Moehs, C.P. and Zemetra, R.S. (2012) "Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.50: 20543-20548.

26- WHO. 2011. Global Environmental Monitoring System, Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food). http://www.who.int/ foodsafety/chem/gems/en/.

27- Zou, Z., He, Y., Ruan, L., Sun, B., Chen, H., Chen, D., ... & Tao, A. (2012). A bioinformatic evaluation of potential allergenicity of 85 candidate genes in transgenic organisms. *Chinese science bulletin*, *57*(15), 1824-1832.

# Bioinformatics evaluation of transgenic organisms for allergenicity potential

**Saidi A.*, Hajibarat Z., Hajibarat Z. and Tohidfar M.**

**Dept. of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C. Tehran, I.R. of Iran**

## Abstract

One of the evaluation steps in the safety of transgenic crops is the potential for allergenicity. Therefore, it is necessary to investigate the allergenicity of the produced proteins of transgenic organisms using bioinformatics analysis before anything else. In this study, three allergen databases (Allergenonline, SDAP and Allermatch) were used to evaluate the bioinformatics of six important proteins of transgenic products. Query sequences were analyzed for survey of allergen sequences by full FASTA and 80 amino acids with more than 50% and 35% similarity in allergen databases, respectively. Among the studied proteins, Chitinase and PRP (pathogenesis-related proteins) showed high homology with allergen proteins, that these proteins have plant origin and are naturally and are consumed by humans. In contrast, growth hormone protein (Growth Hormone-1), Cry1AC (resistant to insect pest), CspB (drought tolerance protein) and (Rpi-vnt1.2) has not shown any homology to allergenic proteins. The results showed that the evaluation of allergenicity and other analysis (study of total proteins) before commercialization of these products seems necessary to confirm the safety of transgenic products.

**Key words:** Allergenicity, Sequence homology, Safety assessments, Transgenic crops