

همسانه سازی و بررسی ویژگی های فیزیوشیمیایی و ساختاری یک

ژن تیوردوکسین نوع *h*، متعلق به زیر گروه I از بافت حبه انگور

(*Vitis vinifera* L.) رقم عسکری

رضا حیدری جاپلقی^۱، رحیم حداد^{۲*}، قاسمعلی گروسی^۳، سعید نواب پور^۴

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی

کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۴- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

گرگان، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

واژه های کلیدی

انگور،
تیوردوکسین نوع *h*،
جداسازی،
ساختار سه بعدی،
همسانه سازی

تیوردوکسین ها (Trxs)، دی سولفید ردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت ها تا یوکاریوت های عالی یافت شده و در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند. در مقایسه با سایر موجودات زنده، گیاهان دارای ۶ نوع تیوردوکسین مختلف *f*، *g*، *h*، *am*، *o* و *x* می باشند که تنها تیوردوکسین نوع *h* با اشکال متعدد، بطور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته و در فرآیندهای مختلفی از جمله محافظت سلولی در برابر تنش اکسیداتیو ایفای نقش می نماید. همسانه سازی ژن تیوردوکسین نوع *h* از بافت حبه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) انجام شده و ویژگی های فیزیوشیمیایی، ساختاری و فیلوژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی چارچوب باز خوانی این ژن، تحت عنوان VvTrx h4، به طول ۳۴۵ bp بوده و یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را رمز نموده و دارای جایگاه فعال معمول WCGPC می باشد. وزن مولکولی تخمین زده شده و نقطه آیزوالکتریک پیش بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۱۲/۷۶ کیلودالتون و ۵/۲۲ بوده و پیش بینی ساختار سه بعدی آن با استفاده از ساختار کریستالی ژن AtTrx h1 از آرکیدوپسیس نشان داد که این پروتئین با سایر تیوردوکسین های بررسی شده مطابقت داشته و با داشتن ۵ صفحه β و ۴ مارپیچ α ، ساختار سه بعدی از نوع Thioredoxin Fold را نشان می دهد. توالی پروتئینی بدست آمده شباهت زیادی را با تیوردوکسین های نوع *h* سایر گیاهان، از قبیل صنوبر (۸۹ درصد تشابه با تیوردوکسین *Pth3*) و رقم Shiranuhi از جنس مرکبات (۸۶ درصد تشابه با تیوردوکسین *Csh*) نشان داده و بررسی های فیلوژنتیکی با استفاده از ژن های تیوردوکسین از گیاهان دیگر نشان داد که ژن VvTrx h4، تیوردوکسین نوع *h* بوده و متعلق به زیر کلاس IA از زیر گروه I می باشد.

مقدمه

تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی‌سولفید ردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت شده و در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند (۱۶ و ۳۷). این پروتئین‌ها با داشتن یک گروه دی‌سولفیدی فعال، نقش تنظیم کننده‌ای را در بسیاری از فرآیندهای سلولی شامل: متابولیسم، تنفس نوری، ترجمه، بیوسنتز ویتامین‌ها (۲۰ و ۴۲)، فتوسنتز (۳)، نسخه‌برداری (۵ و ۲۴)، سنتز DNA (۳ و ۵۶)، محافظت سلولی در برابر تنش اکسید کننده (۴۳ و ۵۳)، جوانه‌زنی بذور غلات (۲)، خودناسازگاری (۵، ۱۶ و ۲۱) و کاهش حساسیت و سمیت پروتئین‌های حساسیت‌زا و سمی (۲۹) ایفا می‌نمایند. توالی جایگاه فعال تیوردوکسین‌ها در وضعیت اکسید شده یک پیوند دی‌سولفیدی را تشکیل می‌دهد، اما در حالت احیاء شده، گروه دی‌تیول تیوردوکسین‌ها می‌تواند فعالیت بسیاری از پروتئین‌های هدف را از طریق احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی‌شان تحت شعاع قرار دهد (۳۳ و ۳۷). در حالی که اغلب موجودات زنده دارای تعداد اندکی از ژن‌های تیوردوکسین می‌باشند، انواع مختلفی از ژن‌های تیوردوکسین در گیاهان مختلف یافت شده است. برای مثال، حداقل ۴۸ ژن تیوردوکسین در ژنوم گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شناسایی شده است (۴۲).

گیاهان عالی دارای دو سیستم تیوردوکسین، شامل سیستم وابسته به فردوکسین و سیستم وابسته به NADPH می‌باشند. سیستم وابسته به فردوکسین، درون کلروپلاست‌ها قرار داشته و شامل تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *x* و *y* می‌باشد. این تیوردوکسین‌ها در هسته کد شده و به وسیله آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز^۱ (FTR) احیاء شده و یک انتهای آمینو با طول زیاد دارند که احتمالاً یک پپتید راهنما^۲ برای ورود به درون کلروپلاست‌ها می‌باشد (۹، ۱۶ و ۴۵). سیستم وابسته به NADPH شامل تیوردوکسین‌های *o* (میتوکندریایی) و *h* (سیتوزولی) بوده که توسط آنزیم NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز^۳ (NTR) احیاء می‌شوند (۱۶، ۲۰ و ۵۱). تیوردوکسین‌های نوع *h*، بجز همشکل‌هایی

که جایگاه فعال‌شان به صورت CxxS است، با سایر گروه‌های تیوردوکسین در داشتن جایگاه فعال WC[G/P]PC مشابه می‌باشند. جایگاه فعال WCGPC در اکثر تیوردوکسین‌های نوع *h*، تیوردوکسین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی معمول است، در حالی که جایگاه فعال WCPPC فقط در تعدادی از همشکل‌های زیر گروه I وجود دارد (۱۶). تیوردوکسین‌های نوع *h* به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی شده و نقش مهمی را در محافظت سلولی در برابر تنش اکسیداتیو و به دنبال آن تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌نمایند (۱۶). اعضای زیرگروه‌های I و II به وسیله NTR احیاء شده در حالی که احیاء تیوردوکسین‌های *h* زیرگروه III توسط سیستم گلوکاتایون/گلوکاتاردوکسین^۴ انجام می‌شود (۱۵، ۱۶ و ۲۰).

Gautier و همکاران (۱۴) دو ژن تیوردوکسین نوع *h* را از کتابخانه cDNA بذور نارس گندم (*Triticum aestivum*) جداسازی و همسازسازی نموده و ویژگی‌های کاتالیتیکی پروتئین‌های تولید شده آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها مشاهده نمودند که پروتئین‌های تیوردوکسین قادر به احیاء پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گندم می‌باشند. Gelhaye و همکاران (۱۵) سه توالی رمز کننده تیوردوکسین نوع *h* را از کتابخانه EST بافت‌های برگ/ریشه گیاه صنوبر (*Populus trichocarpa*) جداسازی و همسازسازی نمودند. این محقق در گزارشی دیگر اعلام نمود که این همشکل‌ها حاوی توالی جایگاه فعال متفاوت بوده و به زیرگروه‌های مختلفی تعلق دارند. Laloi و همکاران (۳۳) نشان دادند که ژن *TRXh5* در گیاه آرابیدوپسیس در اثر آسیب بافت، پیری، آلودگی با عامل بیماری‌زای قارچی و شرایط تنش اکسید کننده به میزان زیادی در بافت‌های مختلف القا می‌شود. Peterson و همکاران (۴۷) ساختار سه‌بعدی یک پروتئین تیوردوکسین نوع *h* تحت عنوان *h1 AtTrx* از گیاه آرابیدوپسیس را در وضعیت اکسید شده و به روش NMR^۵ تعیین نمودند. بررسی آن‌ها نشان داد که این پروتئین دارای ساختار سه‌بعدی مختص تیوردوکسین‌ها^۶ بوده به طوری که حاوی پنج صفحه β و

^۴ Glutathione/glutaredoxin system^۵ Nuclear magnetic resonance^۶ Thioredoxin fold^۱ Ferredoxin thioredoxin reductase^۲ Signal peptide^۳ NADPH thioredoxin reductase

آزمایشگاه انتقال داده شده و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از روش CTAB بهینه شده روش Reid و همکاران (۴۹) در مقیاس کوچک استفاده شد. بافت مورد نظر با استفاده از هاون و ازت مایع به صورت پودر درآمده و به میزان ۰/۱ گرم به یک تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر استخراج (۸ mM Tris-HCl pH ۸، ۳۰۰ mM EDTA pH ۸، ۲۵ mM NaCl دو مولار، PVP دو درصد، CTAB دو درصد و بتا-مرکاپتواتانول^۸ دو درصد) اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (Techne-FTE10AE، انگلستان) با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و هر ۵ دقیقه به آرامی ورتکس (Techne-FVORTECE، انگلستان) گردیدند. سپس پروتئین‌ها دو مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۷/۱ v/v) حذف گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردیده و ۰/۱ حجم سدیم استات ۳ M و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اسیدهای نوکلئیک به وسیله سانتریفیوژ (Hettich-D78532، آلمان) با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شده و در آب DEPC شده حل گردید. در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتوم کلراید ۸ مولار به نمونه‌ها اضافه گردیده و تیوب‌ها به مدت یک طول شب (۸-۱۲ ساعت) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب و با استفاده از الکل اتانول ۷۰ درصد شسته شده و در مقدار مناسب آب DEPC شده حل گردید. در نهایت، کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed-UVD3200، انگلستان) در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

چهار مارپیچ α می‌باشد. Cazalis و همکاران (۱۱) همسانه‌سازی و بیان متفاوت سه همشکل ژن تیوردوکسین h را تحت تیمار با تنش‌های شوری (NaCl) و اکسند (H₂O₂) در بذور گندم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده الگوی متفاوت بیان سه آیزوفرم در بذور تیمار شده بود. Park و همکاران (۴۶) یک تیوردوکسین نوع h را از عصاره‌های سیتوزولی گیاه آرابیدوپسیس که تحت تیمار گرمایی بودند، جداسازی و همسانه‌سازی نموده و آن را *AtTrx-h3* نامیدند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که پروتئین رمز شده توسط این ژن موجب افزایش تحمل گرمایی در گیاه آرابیدوپسیس می‌شود.

از آنجائیکه ژن‌های تیوردوکسین در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند، لذا پیش‌بینی می‌شد که در انگور نیز باید بیان شوند. پس از جداسازی و شناسایی ژن *VvTrx h4* (با شماره دستیابی NCBI GenBank HM622264) از بافت حبه انگور یاقوتی (۱)، در این مطالعه، همسانه‌سازی و توصیف یک توالی کامل cDNA دیگر که رمز کننده تیوردوکسین نوع h از بافت حبه انگور عسکری، تحت عنوان *VvTrx h4* می‌باشد، توضیح داده می‌شود. سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختارهای دوبعدی و سه‌بعدی توالی پروتئینی بدست آمده با استفاده از برنامه‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و با استفاده از بررسی‌های همولوژی و فیلوژنتیکی با تیوردوکسین‌های سایر گیاهان نشان می‌دهیم که ژن همسانه شده، تیوردوکسین نوع h بوده و به زیرکلاس IA از زیرگروه I تعلق دارد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت حبه در مرحله تغییر رنگ حبه^۷ از انگور عسکری از تاکستان انگور در مرکز تحقیقات انگور، وابسته به مرکز تحقیقات وزارت جهاد کشاورزی، واقع در شهر تاکستان (استان قزوین)، جمع‌آوری و پس از توزین، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع قرار داده شد. نمونه‌ها سریعاً به

^۸ β -mercaptoethanol

^۷ Veraison

سنتز رشته اول cDNA و واکنش RT-PCR

به منظور سنتز رشته اول cDNA، ۵ µg از محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم DNase I (Fermentas)، به عنوان RNA الگو، به همراه آغازگرهای (Qiagen) Oligo dT (18 mer) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس مخلوط واکنش به همراه آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-RevertAid™ (Fermentas) MuiV در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تیمار شده و پس از آن، عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. بدین ترتیب رشته اول مولکول cDNA ساخته شده و از این مولکول RNA-DNA به عنوان الگو در واکنش RT-PCR استفاده گردید. واکنش RT-PCR به منظور تکثیر ژن VvTrx h4 با استفاده از آنزیم Pfu (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلوئیدی طراحی شده بر اساس توالی تظاهر یافته برچسب‌دار (EST: CB348011) شناسایی شده با برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) انجام شد (Goes da Silva و همکاران، منتشر نشده). آغازگرهای اختصاصی با توالی -5'-TACGGATCCATGCGGAAGAGGGACAA-3' (آغازگر رفت، مطابق با توالی اسیدآمینه‌ای MAEEGQ) و 5'-ATCGGATCCTCAAGCAGTTGCATGCTTCTC-3' (آغازگر برگشت، مطابق با توالی اسیدآمینه‌ای TEKHATA) که شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی BamHI در انتهای ۵' بودند (Goes da Silva و همکاران، منتشر نشده)، که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ µl حاوی ۵۰ mM Tris-HCl (pH ۸/۸)، ۲۰ mM (NH₄)₂SO₄، ۱۰ mM KCl، ۲ mM MgSO₄، Triton X-100 ۰/۱ درصد، ۰/۱ mg/ml BSA، ۵۰۰ µM از هر dNTP، ۵۰ pM از هر آغازگر (رفت و برگشت)، ۱۰۰ ng DNA الگو و ۱/۲۵ واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT-PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه،

مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

همسازسازی و توالی‌یابی DNA

پس از خالص‌سازی محصول RT-PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean Up Kit-Vivantis)، ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی BamHI (Fermentas) هضم گردیده و مجدداً بوسیله کیت استخراج اسید نوکلئیک از لوله‌هایی که واکنش هضم درون آن‌ها انجام شده، خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال پلاسمید به DNA ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) انجام گرفته (۵۲) و محلول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5α، انتقال داده شد (۱۲). در مرحله بعد باکتری‌ها روی محیط کشت جامد SOB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG به منظور انجام آزمون سفید-آبی کشت داده شده و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. در نهایت، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS انجام گرفته (۶) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که جهت قرارگیری ژن همسازسازی شده روی ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* (Fermentas) انجام گرفت. توالی‌یابی DNA پلاسمید نوترکیب پس از PCR با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab^۹ آلمان، انجام شد.

^۹ Sequence laboratories gottingen

بررسی توالی

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam, PSORT, ProtScale و TMHMM و ساختارهای دوم و سوم پروتئین به وسیله برنامه‌های PSIPred, Swiss-MODEL و Swiss PDB-viewer (لینک‌هایی در تارنمای ExPASy: <http://www.expasy.ch/tools/>) تعیین گردیدند. توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین

شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). همچنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های آرابیدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* گیاهان مختلف به منظور تعیین نوع، زیرگروه و زیرکلاس ژن همسانه‌سازی شده بوسیله نرم‌افزار ClustalW (<http://ClustalW.genome.ad.jp>) انجام شد. توالی‌های پروتئینی از گیاهان مختلف که برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه و ساخت درخت‌های فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دستیابی و منبع در جدول (۲) ذکر شده‌اند.

جدول ۱- میزان یکسانی و شباهت توالی پروتئینی *VvTrx h4* با هم‌مشکل‌های انگور و سایر توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه از گیاهان مختلف در سطح پروتئین و DNA.

ردیف	نام گیاه	جنس و گونه	نام اختصاصی ژن	درصد یکسانی	درصد تشابه	DNA	شماره دستیابی
۱	انگور	<i>Vitis vinifera</i>	Vvh1	۶۸	۸۰	۷۷	HM370524
			Vvh2	۹۸	۹۹	۹۹	HM370525
			Vvh3	۹۶	۹۹	۹۹	HM370526
			Vvh5	۵۱	۷۱	۶۵	CF513794
			Vvh6	۴۵	۷۳	۶۲	CB004453
			Vvh10	۷۶	۸۱	۹۱	HM622264
			VvCxxS1	۴۲	۶۱	۶۴	EU280164
			VvCxxS2	۴۳	۶۱	۶۵	HM370528
۲	انسان	<i>Homo sapiens</i>	H.sapiens	۵۰	۷۰	۶۱	J04026
۳	برنج	<i>Oryza sativa</i>	Osh1	۵۵	۷۲	۶۴	D26547
۴	تنباکو	<i>Nicotiana spp.</i>	Nth1	۷۱	۸۵	۷۷	X58527
			Nth2	۶۸	۸۳	۷۵	Z11803
			Nbh1	۷۲	۸۵	۷۷	GQ354821
۵	سویا	<i>Glycine max</i>	Gmh1	۶۷	۸۶	۷۵	EU144127
۶	صنوبر	<i>Populus trichocarpa</i>	Pth3	۷۲	۸۹	۷۸	BU822062
۷	کرچک	<i>Ricinus comunis</i>	Rch1	۷۲	۸۵	۷۷	XM_002534085
			Rch2	۷۰	۸۵	۷۸	XM_002510410
۸	گلابی	<i>Prunus persica</i>	Pph	۷۳	۸۴	۷۵	AF323593
۹	یونجه	<i>Medicago sativa</i>	Msh	۷۲	۸۵	۸۰	DQ122787
۱۰	رقم Shiranuhi از جنس مرکبات	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>	Csh	۷۳	۸۶	۷۸	EF122401

جدول ۲- توالی‌های پروتئینی مورد استفاده برای ساخت درخت‌های فیلوژنتیکی. توالی‌های پروتئینی از گیاهان مختلف به همراه شماره دستیابی و منبع از پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank بدست آمدند.

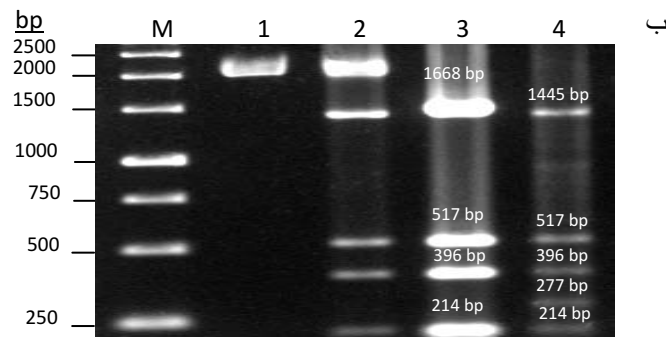
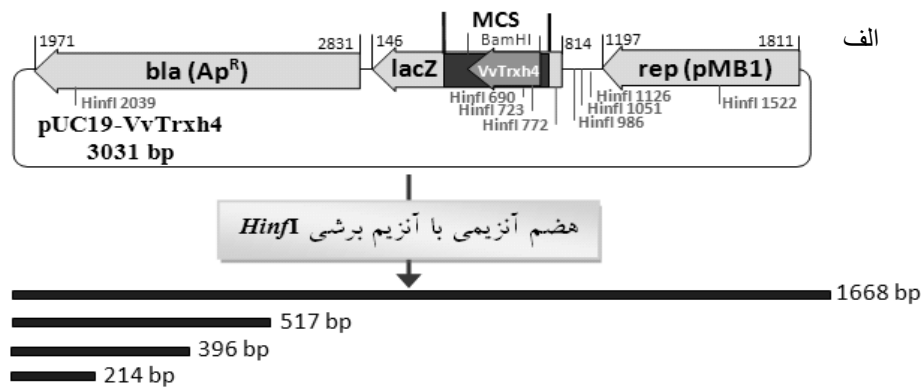
ردیف	نام گیاه	جنس و گونه	نوع تورددوکسین	نام اختصاصی زن	شماره دستیابی
			hI	Ath1	Z14084
				Ath3	Z35474
				Ath4	Z35473
				Ath5	Z35476
			hII	Ath2	Z35475
				Ath7	BT003140
				Ath8	BT003670
			hIII	Ath9	BT011728
				AtCxxS1	AF144390
				AtCxxS2	BT003671
				AtCxxC2	NM_115500
۱	آرابیدوپسیس	<i>Arabidopsis thaliana</i>	o	Ato1	BT025773
				Ato2	AF396650
			f	Atf1	AY096721
				Atf2	AY059086
			m	Atm1	O48737
				Atm2	AY079362
				Atm3	BT025735
				Atm4	AK227059
			x	Atx	BT000355
			y	Aty1	BT010965
				Aty2	BT014871
۲	بادام زمینی	<i>Arachnis hypogaea</i>	hI	Ahh	CD038084
۳	برنج	<i>Oryza sativa</i>	hI	Osh2	Q9FRT3
۴	سویا	<i>Glycine max</i>	hI	Gmh2	BI699372
۵	سیب زمینی	<i>Solanum tuberosum</i>	hI	Sth	BM111010
۶	سیب زمینی شیرین	<i>Ipomoea batatas</i>	hI	Ibh1	AY344230
۷	جو	<i>Hordeum vulgare</i>	hI	Hvh1	AY245454
				Hvh2	AY245455
۸	خال‌واش	<i>Mentha piperita</i>	hI	Mph	AW255457
			hI	Pth1	AF483625
				Pth3	BU822062
			hII	Pth2	AF483266
				Pth5	BU869308
			hIII	Pth4	BU835000
				PtCxxS1	CA823821
۹	صنوبر	<i>Populus trichocarpa</i>		PtCxxS3	BU874060
			o	Pto	XM_002326599
			f	Ptf	XM_002325871
			m	Ptm	XM_002337401
			x	Ptx	XM_002310030
			y	Pty1	XM_002306666
				Pty2	XM_002302134
۱۰	کلزا	<i>Brassica napus</i>	hI	Bnh1	U59379
				Bnh2	U59380
۱۱	گریپ فروت	<i>Citrus paradisi</i>	hI	Cph	AY271308
				Tah1	AY072771
۱۲	گندم	<i>Triticum aestivum</i>	hI	Tah2	AF286593
				Tah3	AF420472
۱۳	فلفل قرمز	<i>Capsicum annuum</i>	hI	Cah	AY496104
۱۴	نخود فرنگی	<i>Pisum sativum</i>	hI	Psh1	AY170650
				Psh2	AJ310990
۱۵		<i>Hevea brasiliensis</i>	hI	Hbh	CB377001
۱۶		<i>Ipomoea nil</i>	hI	Inh	BJ561302

pUC19 همسانه‌سازی شده و نتایج توالی‌یابی DNA نشان داد که موقعیت قرارگیری آن روی جایگاه چندگانه همسانه‌سازی^{۱۰} ناقل در جهت معمولی می‌باشد که با نتایج بدست آمده توسط هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* مطابقت داشت (شکل ۱).

¹⁰ Multiple cloning site

نتایج و بحث

جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی اسید آمینه‌ای و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین بدست آمده cDNA رمز کننده *VvTrx h4* با استفاده از تکنیک RT-PCR از بافت حبه انگور عسکری، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی



شکل ۱- ساختار ناقل نوترکیب pUC19-VvTrx *h4* و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد به منظور تعیین جهت ژن همسانه‌سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* (الف). ناقل نوترکیب حاوی ژن *VvTrx h4* در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی (MCS) می‌باشد. همچنین توالی مسئول رونوشت‌برداری ناقل نوترکیب (pMB1)، ژن‌های *lacZ* و مقاومت به آمپی‌سیلین (*Ap^R*) و جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی روی ناقل نوترکیب نشان داده شده‌اند. ب) نتیجه هضم آنزیمی نشان می‌دهد که همسانه‌سازی در جهت معمولی منجر به تولید ۴ باند شده و در جهت عکس ۵ باند تولید می‌کند. M نشانگر مولکولی ۱ Kb، ۱) پلاسمید غیرنوترکیب هضم نشده، ۲) پلاسمید غیرنوترکیب هضم شده با *HinfI*، ۳) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت معمولی، ۴) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت عکس.

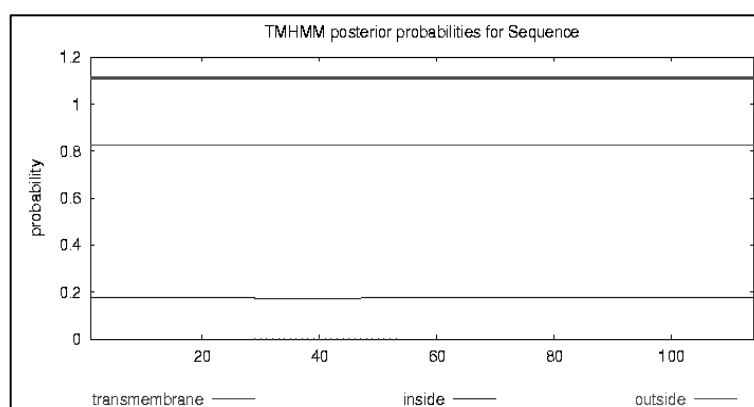
الف

```

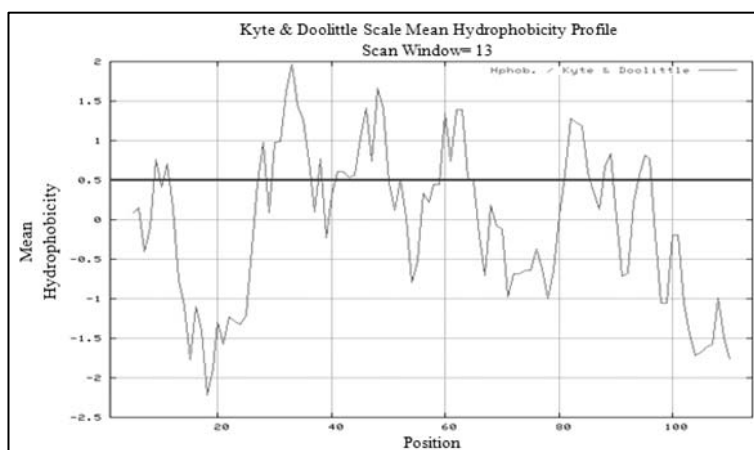
1  ATGGCGGAAGAGGGACAAGTTGTCGGTTGCCACAGTGTGGAATCGTGAAGGAGCAATTCAGCATGGA
1  M A E E G Q V V G C H S V E S W K E Q F Q H G
70  ATAGAGTCCAAGAACTGGTGGTGGATATCACTGCTTCATGGTGTGGGCCATGTCGTGTCATTAGC
24  I E S K K L V V V D I T A S W C G P C R V I S
139 CCATTCTGGCAGAGCTTGCCAAGAAGATGCCTAATGTCGTATTCTCAAGGTGGATGTGGATGAATTG
47  P F L A E L A K K M P N V V F L K V D V D E L
208 GAGACTGTTGCTAAGGAGTGGGAAGTGGAGGCCATGCCAACCTTCTGTTCTGAAAGAAGGAAACGTA
70  E T V A K E W E V E A M P T F L F L K E G N V
277 GTGGACAAGGTTGTGGGTGCAAAAAGAGAAGAACTGGTGCAGAAGACAGAGAAGCATGCAACTGCTTGA
93  V D K V V G A K R E E L V Q K T E K H A T A *

```

ب



ج



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و شاخص‌های Hydrophobic و TMHMM ژن *VvTrx h4*. الف) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی. اسیدهای آمینه آبی رنگ نشان دهنده موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، اسیدهای آمینه قرمز رنگ نشان دهنده توالی جایگاه فعال و اسیدآمینه نارنجی رنگ شامل اسیدآمینه تریپتوفان ویژه می‌باشند. همچنین کدون‌های آغاز و پایان چارچوب باز خواندنی به ترتیب با رنگ‌های سبز و قهوه‌ای نشان داده شده‌اند. ب) بررسی بخش‌های درون سلولی و برون سلولی پروتئین *VvTrx h4* با استفاده از شاخص TMHMM. پروتئین *VvTrx h4* با داشتن بخش‌های غشائی و خارج سلولی، می‌تواند انتقال پلاسمودسمایی داشته باشد. ج) بررسی شاخص Hydrophobic توالی پروتئین *VvTrx h4*. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط قرمز رنگ قرار دارند.

پروتئین)، محاسبه شده بوسیله برنامه ProtParam، به ترتیب ۹۱/۳۲ و حدوداً ۳۰ ساعت محاسبه گردید که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین VvTrx h4 و بطور کلی تیوردوکسین‌ها در برابر حرارت می‌باشد (۱۳، ۳۱). شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle (۳۲)، نشان داد که پروتئین VvTrx h4، به دلیل خاصیت احیاءکنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز بوده (۳۲) (شکل ۲ ج) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۱۹ اسیدآمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۱۴ می‌باشد. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسولولی این پروتئین با برنامه PSORT نشان داد که برخلاف تعدادی از تیوردوکسین‌های نوع h که محل فعالیت‌شان درون میتوکندری، هسته و شبکه آندوپلاسمی است (۳۰، ۴۰، ۴۳، ۵۳ و ۵۴)، پروتئین VvTrx h4 از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن درون سیتوزول قرار دارد.

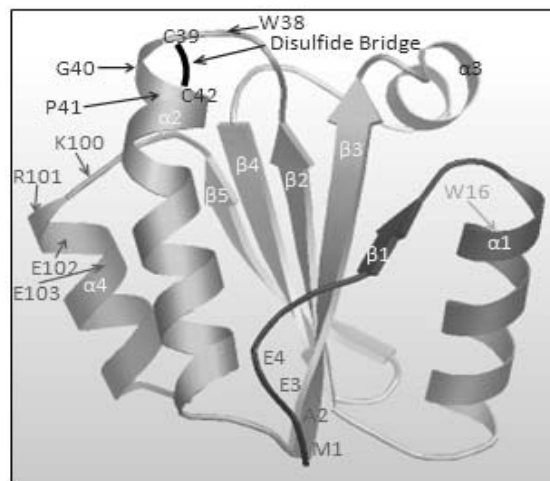
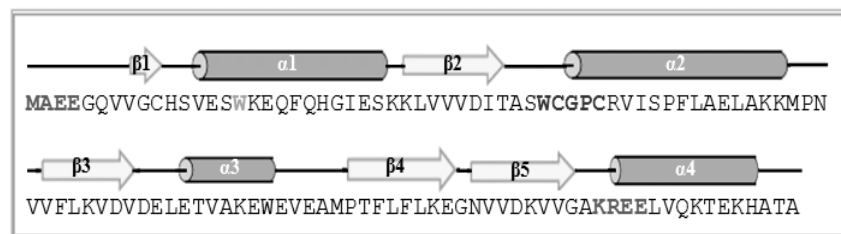
بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین VvTrx h4 بررسی ساختار دوم پروتئین VvTrx h4 با استفاده از برنامه PSIPred نشان داد که این پروتئین مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها، حاوی ۵ رشته β و ۴ مارپیچ α بوده که به ترتیب β_1 ، α_1 ، β_2 ، α_2 ، β_3 ، α_3 ، β_4 و α_4 در ساختار دوبعدی پروتئین قرار می‌گیرند (شکل ۳ الف). به هر حال، این نوع آرایش با آنچه که در VvTrx h4 (با ۶ رشته β و ۴ مارپیچ α) مشاهده گردید (۱)، اندکی تفاوت دارد. در پروتئین VvTrx h4، جایگاه فعال WCGPC مابین انتهای کربوکسیل صفحه β_2 و انتهای آمینوی مارپیچ α_2 قرار گرفته و اسیدآمینه ویژه تریپتوفان (Trp16)، چهارمین اسیدآمینه مارپیچ α_1 را تشکیل می‌دهد. همچنین موتیف ساختاری MAEE درون هیچ یک از صفحات β و مارپیچ‌های α قرار نگرفته و تنها یک ساختار مارپیچ پیچیده را در انتهای آمینو توالی پروتئینی تشکیل داده در حالی که موتیف ساختاری KREE به گونه‌ای در بین صفحه β_5 و مارپیچ α_4 قرار گرفته که اسیدهای آمینه Arg101-Glu102-Glu103 انتهای آمینوی مارپیچ α_4 را تشکیل می‌دهند (شکل ۳ الف). نحوه و مکان قرارگیری جایگاه فعال و

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب باز خوانی cDNA رمز کننده VvTrx h4، ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HM370527، به طول ۳۴۵ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TGA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۱۴ اسیدآمینه (با ۹۹ درصد یکسانی و ۹۷ درصد شباهت نسبت به توالی اولیه) را رمز می‌نماید (شکل ۲ الف). برخلاف توالی پلی‌پپتیدی VvTrx h4 که دارای جایگاه فعال غیرمعمول RCGLC می‌باشد (۱)، توالی پروتئینی VvTrx h4 دارای یک جایگاه فعال معمول WCGPC بوده و در موقعیت ۱۶ خود یک اسیدآمینه تریپتوفان دارد که یکی از مشخصه‌های ویژه تیوردوکسین‌های نوع h بوده و در طی تکامل حفظ شده است (۲۰) (شکل ۲ الف). همچنین مشابه با توالی پلی‌پپتیدی VvTrx h4 (۱)، در هر دو انتهای آمینو و کربوکسیل توالی پروتئینی VvTrx h4، به ترتیب موتیف‌های ساختاری MAEE و KREE مشاهده می‌شود (شکل ۲ الف) که برای انتقال پروتئین در لوله‌های بافت آبکش از طریق پلاسمودسماتا ضروری بوده (۲۶) و تنها در تیوردوکسین‌های گیاهان عالی یافت شده و در تیوردوکسین‌های باکتری‌ها، پستانداران و جلبک‌ها دیده نشده‌اند (۴۷). به هر حال بررسی‌ها با برنامه TMHMM نشان داد که پروتئین VvTrx h4 با داشتن بخش‌های غشائی و خارج سلولی می‌تواند با احتمال زیادی انتقال پلاسمودسمایی داشته باشد (شکل ۲ ب)، البته این فعالیت منحصر به فرد نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین VvTrx h4 با فرمول مولکولی $C_{573}H_{911}N_{147}O_{169}S_6$ ، به ترتیب برابر ۱۲/۷۶ کیلودالتون و ۵/۲۲ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۲/۵۶ می‌باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود (۱۳). همچنین شاخص Aliphatic (به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه عمر این پروتئین در محیط درون شیشه (با توجه به وجود یک اسیدآمینه حفظ شده متیونین در انتهای آمینوی

ساختار سه‌بعدی پروتئین *VvTrx h4* بوسیله برنامه‌های Swiss-Model و Swiss PDB-viewer و با استفاده از ساختار کریستالی ژن *Ath1* از آرآبیدوپسیس (با شماره دستیابی 1xfla در پایگاه PDB¹¹) به عنوان یک الگو، مورد پیش‌بینی قرار گرفت و مشاهده شد که ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده پروتئین *VvTrx h4* مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها بوده (۲۸ و ۵۵) بطوری که صفحات $\beta 1$ ، $\beta 2$ ، $\beta 3$ و $\beta 5$ به صورت موازی و صفحه $\beta 4$ به صورت غیرموازی، طوری کنار هم قرار می‌گیرند که یک صفحه چین‌دار مرکزی را تشکیل داده و توسط مارپیچ‌های α احاطه می‌شوند (شکل ۳ ب). جایگاه فعال، اسیدآمینو تریپتوفان ویژه و سایر موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول به صورت مشخص در شکل ۳ (الف و ب) نشان داده شده‌اند.

¹¹ Protein Data Bank

موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در ساختار دوبعدی پروتئین *VvTrx h4* با سایر تیوردوکسین‌هایی که قبلاً گزارش شده‌اند، مشابه می‌باشد (۲۸، ۳۸ و ۴۷). پروتئین *VvTrx h4* حاوی ۵۳ مارپیچ α (۴۶/۴۹٪)، ۱۰ دور β (۸/۷۷٪)، ۲۲ رشته β (۱۹/۳۰٪) و ۲۹ مارپیچ اتفاقی (۲۵/۴۴٪) می‌باشد که با پروتئین *Vvh10* از انگور با ۵۶ مارپیچ α ، ۱۳ دور β ، ۲۲ رشته β و ۲۳ مارپیچ اتفاقی (۱) به میزان زیادی مشابه می‌باشد. همچنین ساختار دوم پروتئین *VvTrx h4* شباهت زیادی را با ساختار دوبعدی پروتئین‌های *Nth2* از تنباکو، *Pth3* از صنوبر و *Osh1* از برنج نشان داد. پروتئین *Nth2* حاوی ۵۷ مارپیچ α ، ۱۲ دور β ، ۲۴ رشته β و ۲۵ مارپیچ اتفاقی (۸)، پروتئین *Pth3* دارای ۵۹ مارپیچ α ، ۸ دور β ، ۲۵ رشته β و ۳۰ مارپیچ اتفاقی (۱۷) و پروتئین *Osh1* نیز حاوی ۶۶ مارپیچ α ، ۱۱ دور β متصل شده توسط ۲۲ رشته β و ۲۳ مارپیچ اتفاقی می‌باشند (۲۷).



شکل ۳- ساختارهای دوبعدی و سه‌بعدی پروتئین *VvTrx h4*. (الف) ساختار دوبعدی با استفاده از برنامه PSIPred. اسیدهای آمینه جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینو تریپتوفان ویژه به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. (ب) ساختار سه‌بعدی با استفاده از برنامه‌های SWISS-MODEL و Swiss PDB-viewer. مارپیچ‌های α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده به طور مشخص در ساختار سه‌بعدی قابل مشاهده می‌باشند. همچنین اسیدهای آمینه جایگاه فعال، اسیدهای آمینه موجود در موتیف-

های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمین‌ه‌های تریتوفان ویژه با فلش و به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. نحوه تشکیل پیوند دی‌سولفیدی بین دو اسیدآمین‌ه‌های سیستئین جایگاه فعال پروتئین نیز در شکل ۳ ب قابل مشاهده می‌باشد.

VvTrx h4	-----MAEEGQVVGCHSVESWKEQFQHGIESKKLVVDITASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Vvh3	-----MAEEGQVLGCHSVESWKEQFQHGIESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Vvh2	-----MAEEGQVLGCHSVESWKEQFQHGIESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Vvh10	-----MAEEGQVLGCHSVESWIDAVPAWNRCPNATFIRMDICIRCGLCRVISPEFLAELA	53
Vvh1	-----MAEEGQVVGHTVEEWNDEHQLKCNESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Nth2	-----MAEEGQVIGVHTVEEWNDEHQLKQIDDKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Csh	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQSNETKQLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	55
Rch1	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQNDTKGLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	54
Pth3	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLQRGNESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	54
Gmh1	-----MAGSSEEGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQGNESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	56
Rch2	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQETTKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Msh	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQGNESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	54
Pph	-----MAEENQVIGCHTVEEWNDEHQLKQGNENKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	53
Nth1	MAANDATSSEEGQVIFGCHRVESWNEHFFKQGVETKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLADIA	60
Nbh1	-----SSEEGQVIFGCHRVESWNEHFFKQGVETKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLADIA	53
Osh1	-----MAAEAGQVIGCHTVEEWNDEHQLKQGNESKKLVVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	54
H.sapiens	-----MVKQIESKTAQCEALDAAGD--KLVDFTASWCGPCRVISPEFLAELA	46

VvTrx h4	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Vvh3	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Vvh2	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Vvh10	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Nth2	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Csh	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	115
Rch1	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	114
Pth3	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	114
Gmh1	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	116
Rch2	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Msh	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	114
Pph	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Nth1	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	120
Nbh1	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	113
Osh1	KKMPNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	114
H.sapiens	ERYSNVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFFFLKKEGNVVDKVVGAKEEELVQKTEKHAT	105

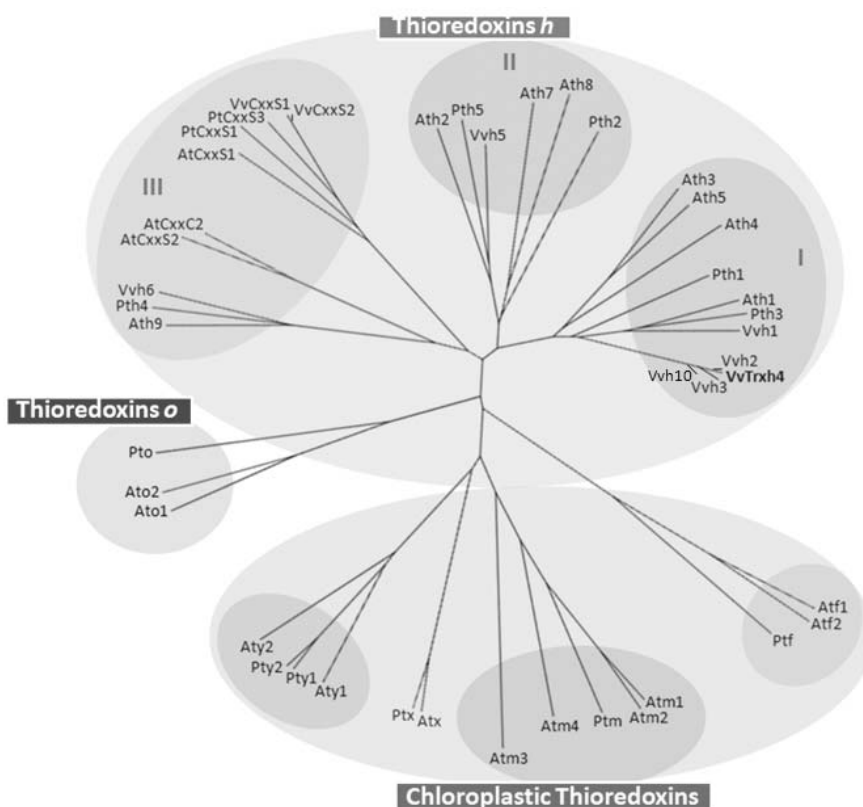
شکل ۴- هم‌دیف‌سازی چندگانه ژن VvTrx h4 با آیزوفرم‌های نوع h انگور، سایر گیاهان و ژن تیوردوکسین انسانی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW. جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمین‌ه‌های تریتوفان ویژه به ترتیب با کادرهای قرمز، آبی و نارنجی رنگ نشان داده شده‌اند. نواحی تیره و نیمه روشن به ترتیب نشان دهنده اسیدهای آمینه کاملاً محافظت شده و نیمه محافظت شده می‌باشد. همچنین علامت × نشان دهنده اسیدهای آمینه کاملاً یکسان و علامت * نمایانگر اسیدهای آمینه مشابه می‌باشد. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۱ آمده است.

یکسانی ژن VvTrx h4 با ژن تیوردوکسین انسانی به ترتیب برابر ۷۰ و ۵۰ درصد مشاهده شد. در مقایسه با تیوردوکسین‌های نوع h انگور، ژن VvTrx h4 بیشترین تشابه را با هم‌شکل‌های زیرگروه I (hI)، از ۸۰ تا ۹۹ درصد و کمترین تشابه را با هم‌شکل‌های زیرگروه III (hIII) به میزان ۶۰ تا ۷۲ درصد دارد. از بین هم‌شکل‌های hI، بیشترین تشابه را با هم‌شکل Vvh2 به میزان ۹۹ درصد (۹۷ درصد یکسانی) و کمترین تشابه را با هم‌شکل Vvh1 به میزان ۸۰ درصد (۶۷ درصد یکسانی) دارد. علاوه بر ژن VvTrx h4 با هم‌شکل Vvh10 از زیرگروه I (۱)، به ترتیب دارای ۸۱ درصد شباهت و ۷۶ درصد یکسانی می‌باشد (جدول ۱).

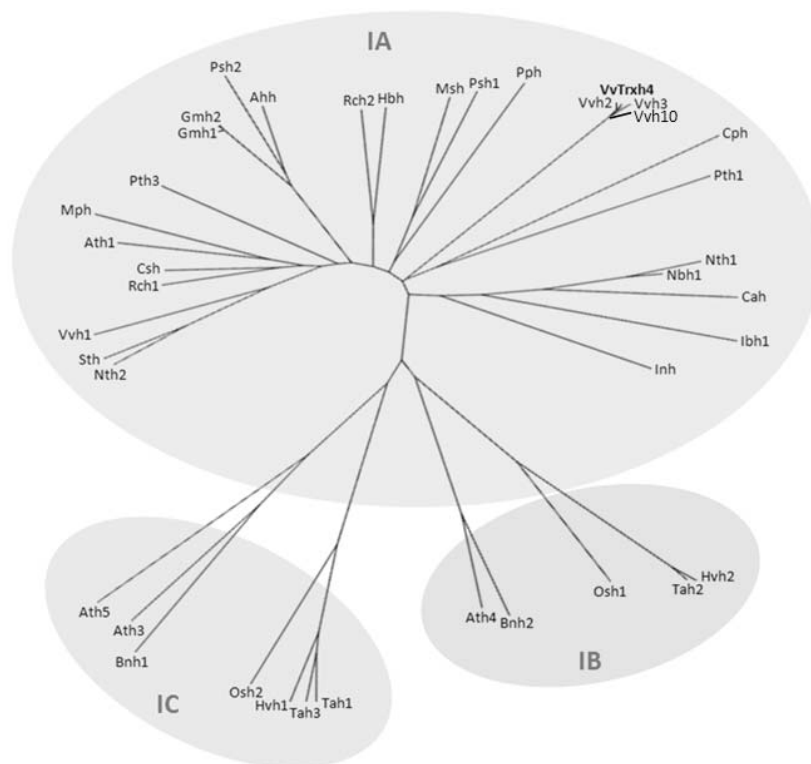
بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی ژن پروتئین VvTrx h4 با سایر تیوردوکسین‌ها
توالی پروتئینی بدست آمده VvTrx h4 با سایر تیوردوکسین‌های نوع h از گیاهان دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین تشابه را با ژن‌های Pth3 از گیاه صنوبر (Populus trichocarpa)، Csh از یک رقم مربوط به جنس مرکبات (Citrus shiranuhi)، Nbh1 از گیاه تنباکو (Nicotiana benthamiana) و Rch1 از گیاه کرچک (Ricinus comunis) به ترتیب به میزان ۸۹٪ (۷۲٪ یکسانی)، ۸۶٪ (۷۳٪ یکسانی)، ۸۵٪ (۷۲٪ یکسانی) و ۸۵٪ (۷۲٪ یکسانی) دارد (شکل ۴). همچنین میزان شباهت و

بررسی‌ها نشان داده‌اند که این زیرگروه با داشتن موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، در تنظیم ردوکس ترکیبات بافت آوندی دخالت دارند (۱۶ و ۲۶). تیوردوکسین‌های *hII* شامل همشکل‌های *Vvh5* انگور، *Ath2*، *Ath7* و *Ath8* آرابیدوپسیس و *Pth2* و *Pth5* صنوبر بوده و از نظر تکاملی، قرابت نزدیکی با تیوردوکسین‌های *hI* دارند (شکل ۵). سومین زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* شامل تیوردوکسین‌هایی با جایگاه فعال معمول WCGPC (*Vvh6* انگور، *Ath9* آرابیدوپسیس و *Pth4* صنوبر) و تیوردوکسین‌های ناهنجار (*CxxS* (*VvCxxS1* و *VvCxxS2* انگور، *AtCxxS1*، *AtCxxS2* و *AtCxxC2* و آرابیدوپسیس و *PtCxxS1* و *PtCxxS3* صنوبر) می‌باشند که ویژگی اصلی آن‌ها واکنش با سیستم گلوئاردوکسین/گلوئوتاتیون می‌باشد (۱۵).

به منظور تعیین نوع و زیرگروه ژن همسازسازی شده *VvTrx h4*، بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور به روش Unrooted-Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد و مشاهده گردید که تیوردوکسین‌ها به سه گروه اصلی شامل تیوردوکسین‌های کلروپلاستی (*f*، *m*، *x* و *y*)، تیوردوکسین‌های *o* و تیوردوکسین‌های نوع *h* تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۵). تیوردوکسین‌های نوع *h* نیز به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم شده که این گروه‌بندی بر اساس توالی اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی آن‌ها می‌باشد (۴، ۱۵ و ۱۶). تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I (*hI*)، شامل همشکل‌های *Vvh1*، *Vvh2*، *Vvh3*، *VvTrxh4* و *Vvh10* انگور، *Ath1*، *Ath3*، *Ath4* و *Ath5* آرابیدوپسیس و *Pth1* و *Pth3* صنوبر بوده و



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن نوع و زیرگروه ژن *VvTrx h4* با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن زیرکلاس ژن *VvTrx h4* با استفاده از تیوردوکسین‌های *hI* انگور و سایر تیوردوکسین‌های *hI*. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.

VvTrx h4 از نوع *h* بوده و به زیرگروه I تعلق داشته و به دلیل وجود یک اسیدآمینه باردار لیزین در موقعیت ۱۰۰، متعلق به زیرکلاس IA می‌باشد (شکل‌های ۵ و ۶).

با توجه به تنوع و دخالت تیوردوکسین‌ها در فرآیندهای متعدد سلولی گیاهان عالی، جداسازی، شناسایی، بررسی فعالیت کاتالیتیکی و بیان آن‌ها در سطوح RNA و پروتئین در بافت‌های مختلف، تحت تنش‌های زنده و یا غیرزنده توصیه شده تا بتوان دیدگاه مناسبی از این پروتئین‌های کوچک، فراوان و مقاوم در برابر حرارت بدست آورده و تحمل به تنش‌های محیطی گیاهان را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مدیریت محترم سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان

بررسی فیلوژنتیکی تیوردوکسین‌های *hI* از گیاهان مختلف نشان داد که این زیرگروه می‌تواند به سه زیرکلاس مختلف IA, IB و IC تقسیم‌بندی شود (شکل ۶). زیرکلاس IA حاوی ژن *VvTrx h4* به همراه همشکل‌های *Vvh1*, *Vvh2*, *Vvh3* و *Vvh10* انگور و سایر ژن‌ها از گیاهان دولپه‌ای بوده در حالی که زیرکلاس‌های IB و IC، که قرابت بیشتری از نظر تکاملی با یکدیگر دارند، علاوه بر تیوردوکسین‌هایی از آرابیدوپسیس و کلزا، شامل تیوردوکسین‌هایی از غلات نیز می‌باشند. تقسیم‌بندی بیشتر تیوردوکسین‌های *hI* بر اساس نوع اسیدآمینه موجود در موقعیت ۱۰۱ پیشنهاد شده است، بطوری که زیرکلاس‌های IA و IB دارای یک اسیدآمینه آب‌دوست یا باردار در این موقعیت بوده اما زیرکلاس IC حاوی یک اسیدآمینه آب‌گریز هستند (۲۰ و ۳۷). به هر حال بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از انواع تیوردوکسین‌ها از گیاهان مختلف نشان می‌دهند که ژن همسانه‌سازی شده

13. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.
14. Gautier MF, Lullien-Pellerin V, De Lamotte-Guery F, Guirao A and Joudrier P (1998) Characterization of wheat thioredoxin *h* cDNA and production of an active *Triticum aestivum* protein in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem., 252:314-2324.
15. Gelhaye E, Rouhier N and Jacquot JP (2003b) Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction. FEBS Lett., 555:443-448.
16. Gelhaye E, Rouhier N and Jacquot JP (2004a) The thioredoxin *h* system of higher plants. Plant Physiol. Biochem., 42:265-271.
17. Gelhaye E, Rouhier N, Gardikas AV, Girardet JM, Sautière PE, Sayzet M, Martin F and Jacquot JP (2003a) Identification and characterization of a third thioredoxin *h* in poplar. Plant Physiol. Biochem., 41:629-635.
18. Gelhaye E, Rouhier N, Gerard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y and Jacquot JP (2004b) A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. Plant Biol., 101(40):14545-14550.
19. Gelhaye E, Rouhier N, Laurent P, Sautière PE, Martin F and Jacquot JP (2002) Isolation and characterization of an extended thioredoxin *h* from poplar. Physiol. Plantarum, 114:165-171.
20. Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N and Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 62:24-35.
21. Haffani YZ, Gaude T, Cock JM and Goring DR (2004) Antisense suppression of thioredoxin *h* mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. Plant Mol. Biol., 55:619-630.
22. Hall M, Cabana AM, Akerlund H, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M and Kieselbach T (2010) Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. Proteomics, 10(5):987-1001.
23. Hasdai M, Elmaci C, Goldschmidt EE, Droby S and Porat R (2004) Isolation of a thioredoxin *h* cDNA from grapefruit peel tissue that is induced upon infection by *Penicillium digitatum* and elicitation of pathogen resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol., 65(6):277-283.
24. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K and Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. J. Biol. Chem., 274(39):27891-27897.
25. Huang DJ, Chen HJ, Hou WC and Lin YH (2004) Isolation and characterization of thioredoxin *h* cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage roots. Plant Sci., 166(2):515-523.

قزوین و مدیریت مرکز تحقیقات انگور تاکستان که ما را در امر نمونه‌برداری یاری نمودند ابراز می‌دارد.

منابع

۱. موسوی ش، حداد ر، گروسی ق، و حسینی ر (۱۳۸۹) همسازگی و بررسی ساختار ژن تیوردوکسین (*VvTrxh10*)، از بافت حبه انگور یاقوتی (*Vitis vinifera* L. cv. Yaquti)، مجله فن‌آوری زیستی در کشاورزی، ج ۹، ش ۱: ۱۷-۲۶.
2. Alkhaifioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB and Montrichard F (2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol., 144:1559-1579.
3. Arner ESJ and Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem., 267:6102-6109.
4. Baumann U and Juttner J (2002) Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 59:1042-1057.
5. Besse I and Buchanan BB (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. Bot. Bull. Acad. Sin., 38:1-11.
6. Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Aci. Res., 7:1513-1525.
7. Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ and Goring DR (1996) Two members of the thioredoxin-*h* family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. Plant Cell, 8(9):1641-1650.
8. Brugidou C, Marty I, Chartier Y and Meyer Y (1993) The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. Mol. Gen. Genet., 238(1-2):285-293.
9. Buchanan BB, Schürmann P, Wolosiuk RA and Jacquot JP (2002) The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. Photosyn. Res., 73:215-222.
10. Callahan AM, Morgens PH and Cohen RA (1993) Isolation and initial characterization of cDNAs for mRNAs regulated during peach fruit development. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 118:531-537.
11. Cazalis R, Pulido P, Aussenac T, Perez-Ruiz JM and Cejudo FJ (2006) Cloning and characterization of three thioredoxin *h* isoforms from wheat showing differential expression in seeds. J. Exp. Bot., 57:2165-2172.
12. Cohen SN, Chang ACY and Hsu L (1972) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 69:2110-2114.

27. Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H and Chino M (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, 195(3):456–463.
28. Jacquot JP, Lancelin JM and Meyer Y (1997) Thioredoxin: structure and function in plant cells. *New Phytol.*, 136:543–570.
29. Joudrier P, Gautier MF, de Lamotte F and Kobrehel K (2005) The thioredoxin *h* system: potential applications. *Biotech. Adv.*, 23:81–85.
30. Juttner J, Olde D, Langridge P and Baumann U (2000) Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *Eur. J. Biochem.*, 267:7109–7117.
31. Kim YJ, Shim JS, Krishna PR, Kim SY, In JG, Kim MK, Kim DC (2008) Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 26:335–349.
32. Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157:105–32.
33. Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y and Reichheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.*, 134:1006–1016.
34. Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienemberger JM, Bonnard G and Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:14144–14149.
35. Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D and Croteau R (2000) Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(6):2934–2939.
36. Lucas S, Hammon N, Glavina del Rio T, Detter J, Dalin E, Tice H, Pitluck S, Tuskan G, Chapman J, Putnam NH, Salamov AA, Terry A, Grigoriev IV and Rokhsar D (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Sci.*, 313(5793):1596–1604.
37. Maeda K, Finnie C, Ostergaard O and Svensson B (2003) Identification, cloning and characterization of two thioredoxin *h* isoforms, *HvTrxh1* and *HvTrxh2*, from the barley seed proteome. *Eur. J. Biochem.*, 270:2633–2643.
38. Maeda K, Hagglund P, Finnie C, Svensson B and Henriksen A (2008) Crystal structures of barley thioredoxin *h* isoforms *HvTrxh1* and *HvTrxh2* reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. *Prot. Sci.*, 17:1015–1024.
39. Martin JL (1995) Thioredoxin- a fold for all reasons: the thioredoxin fold is a characteristic protein structural motif that has been found in five distinct classes of proteins that have the common property of interacting with cysteine-containing substrates. *Curr. Biol.*, 3:245–250.
40. Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG and Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin
26. Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M and Lucas WJ (1998) Rice phloem thioredoxin *h* has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta*, 205:12–22. required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *PNAS*, 107(8):3900–3905.
41. Mestres-Ortega D and Meyer Y (1999) The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins *m* and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene*, 240 (2):307–316.
42. Meyer Y, Reichheld JP and Vignols F (2005) Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosyn. Res.*, 86:419–433.
43. Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F and Reichheld JP (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Act.*, 1783:589–600.
44. Montrichard F, Renard M, Alkhalfioui F, Duval FD and Macherel D (2003) Identification and differential expression of two thioredoxin *h* isoforms in germinating seeds from pea. *Plant Physiol.*, 132(3):1707–1715.
45. Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimar BG and Netto LES (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochem.*, 49(15):3317–3326.
46. Park SK, Jung YJ, Lee JR, Lee YM, Jang HH, Lee SS, Park JH, Kim SY, Moon JC, Lee SY, Chae HB, Shin MR, Jung JH, Kim MG, Kim WY, Yun DJ, Lee KO and Lee SY (2009) Heat-shock and redox-dependent functional switching of an *h*-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiol.*, 150:552–561.
47. Peterson FC, Lytle BL, Sampath S, Vinarov D, Tyler E, Shahan M, Markley JL and Volkman BF (2005) Solution structure of thioredoxin *h1* from *Arabidopsis thaliana*. *Prot. Struc. Rep.*, 14:2195–2200.
48. Piaz FD, Braca A, Belisario MA and De Tommasi N (2010) Thioredoxin system modulation by plant and fungal secondary metabolites. *Curr. Med. Chem.*, 17(5):479–494.
49. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F and Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.*, 6:27–37.
50. Rivera-Madrid R, Mestres D, Marinho P, Jacquot JP, Decottignies P, Miginiac-Maslow M and Meyer Y (1995) Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:5620–5624.
51. Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot JP (2002) Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973:520–528.
52. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual'. 3rd ed. Vol:1-3. Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

53. Serrato AJ and Cejudo FJ (2003) Type-*h* thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 217:392–399.

54. Serrato AJ, Crespo JL, Florencio FJ and Cejudo FJ (2001) Characterization of two thioredoxins *h* with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol. Biol.*, 46:361–371.

55. Shahpiri A, Svensson B and Finnie C (2009) From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barely seeds. *Mol. Plant*, 1–12.

56. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP and Kehrer JP (2004) Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol. Sci.*, 78: 3–14.

57. Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J and Fradeliz D (1988) Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, 263(30):15506-15512.