ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحه ۱۲۰-۱۰۵

همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری یک ژن تیوردوکسین نوع *h*، متعلق به زیرگروه 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،۲و۳- به ترتیب دانش‌آموخته 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

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. در مقایسه با سایر موجودات زنده، گیاهان دارای ٦ نوع تیوردوکسین مختلف *f*، *h*، *m*، *o*، *x* و *y* می‌باشند 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 می‌نماید. همسانه‌سازی ژن تیوردوکسین نوع *h* از بافت حبه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) انجام شده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و فیلوژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی چارچوب باز خوانی این ژن، تحت عنوان VvTrx *h*4، به طول ۳٤٥ bp بوده و یک پروتئین با ۱۱٤ اسیدآمینه را رمز نموده و دارای جایگاه فعال معمول WCGPC می‌باشد. وزن مولکولی تخمین زده شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۱۲/۷٦ کیلودالتون و ۵/۲۲ بوده و پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی آن با استفاده از ساختار کریستالی ژن AtTrx *h*1 از آرابیدوپسیس نشان داد که این پروتئین با سایر تیوردوکسین‌های بررسی شده مطابقت داشته و با داشتن ۵ صفحه β و ٤ مارپیچ α، ساختار سه‌بعدی از نوع Thioredoxin Fold را نشان می‌دهد. توالی پروتئینی بدست آمده شباهت زیادی را با تیوردوکسین‌های نوع *h* سایر گیاهان، از قبیل صنوبر (۸۹ درصد تشابه با تیوردوکسین *Pth3*) و رقم Shiranuhi از جنس مرکبات (۸٦ درصد مشابه با تیوردوکسین *Csh*) نشان داده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از ژن‌های تیوردوکسین از گیاهان دیگر نشان داد که ژن VvTrx *h*4، تیوردوکسین نوع *h* بوده و متعلق به زیرکلاس IA از زیرگروه I می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

انگور، تیوردوکسین نوع *h*، جداسازی، ساختار سه‌بعدی، همسانه‌سازی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 اکسنده (۴۳ و ۵۳)، جوانه‌زنی بذور غلات (۲)، خوداسازگاری (۵، ۱۶ و ۲۱) و کاهش حساسیت و سمیّت 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[1] (FTR) احیاء شده و یک انتهای آمینو با طول زیاد دارند که احتمالاً یک پپتید راهنما[2] 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[3] (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 گلوتاتیون/گلوتاردوکسین[4] 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 همسانه‌سازی 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 همسانه‌سازی 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 اکسنده به میزان زیادی در بافت‌های مختلف القا می‌شود. Peterson و همکاران (۴۷) ساختار سه‌بعدی یک پروتئین تیوردوکسین نوع *h*، تحت عنوان AtTrx *h*1، از گیاه آرابیدوپسیس را در وضعیت اکسید شده و به روش NMR[5] تعیین نمودند. بررسی آن‌ها نشان داد که این پروتئین دارای ساختار سه‌بعدی مختص تیوردوکسین‌ها[6] بوده به طوری که حاوی پنج صفحه β و

[1] Ferredoxin thioredoxin reductase
[2] Signal peptide
[3] NADPH thioredoxin reductase
[4] Glutathione/glutaredoxin system
[5] Nuclear magnetic resonance
[6] Thioredoxin fold

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 اکسنده (H_2O_2) در بذور گندم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده الگوی متفاوت بیان سه آیزوفرم در بذور تیمار شده بود. Park و همکاران (٤٦) 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 Vv*h*10 (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 *h*4، می‌باشد، توضیح داده می‌شود. سپس ویژگی-های 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[7] 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 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 (٤٩) 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 pH ،۳۰۰ mM Tris-HCl ،۸ pH ۲۵ mM EDTA، NaCl دو مولار، PVP دو درصد، CTAB دو درصد و بتا-مرکاپتواتانول[8] دو درصد) اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (Techne-FTE10AE، انگلستان) با دمای ٦٥ 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 (٢٤:١ v/v) حذف گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردیده و ۰/۱ حجم سدیم استات M ۳ 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 لیتیوم کلراید ۸ مولار به نمونه‌ها اضافه گردیده و تیوب‌ها به مدت یک طول شب (۱۲-۸ 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، ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

[7] Veraison

[8] β-mercaptoethanol

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 Oligo dT (18 mer) (Qiagen) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس مخلوط واکنش به همراه آنزیم نسخه‌بردار معکوس RevertAid™ M-MuiV (Fermentas) در دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تیمار شده و پس از آن، عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه-بردار 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 *h*4 با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی 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-های 5'-TACGGATCCATGGCGGAAGAGGGACAA-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 *Bam*HI 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 (pH ۸/۸) mM Tris-HCl ۲۰، ۱۰ mM $(NH_4)_2SO_4$، ۱۰ mM KCl، ۲ mM $MgSO_4$، Triton X-100 ۰/۱ درصد، mg/ml BSA ۰/۱، µM ۵۰۰ از هر dNTP، pM ۵۰ از هر آغازگر (رفت و برگشت)، ng ۱۰۰ 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 ٩٤ 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 ٩٤ درجه سانتی-گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی 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 *Bam*HI (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 ١٦ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی-های 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 همسانه‌سازی شده روی ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Hinf*I (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[9] آلمان، انجام شد.

[9] Sequence laboratories gottingen

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 همردیف-سازی 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 *h*4 با همشکل‌های 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	پروتئین		DNA	شماره دستیابی
				درصد یکسانی	درصد تشابه		
۱	انگور	*Vitis vinifera*	Vv*h*1	٦٨	٨٠	٧٧	HM370524
			Vv*h*2	٩٨	٩٩	٩٩	HM370525
			Vv*h*3	٩٦	٩٩	٩٩	HM370526
			Vv*h*5	٥١	٧١	٦٥	CF513794
			Vv*h*6	٤٥	٧٣	٦٢	CB004453
			Vv*h*10	٧٦	٨١	٩١	HM622264
			Vv*CxxS*1	٤٢	٦١	٦٤	EU280164
			Vv*CxxS*2	٤٣	٦١	٦٥	HM370528
۲	انسان	*Homo sapiens*	H.sapiens	٥٠	٧٠	٦١	J04026
۳	برنج	*Oryza sativa*	Os*h*1	٥٥	٧٢	٦٤	D26547
٤	تنباکو	*Nicotiana spp.*	Nt*h*1	٧١	٨٥	٧٧	X58527
			Nt*h*2	٦٨	٨٣	٧٥	Z11803
			Nb*h*1	٧٢	٨٥	٧٧	GQ354821
٥	سویا	*Glycine max*	Gm*h*1	٦٧	٨٦	٧٥	EU144127
٦	صنوبر	*Populus trichocarpa*	P*th*3	٧٢	٨٩	٧٨	BU822062
٧	کرچک	*Ricinus comunis*	Rc*h*1	٧٢	٨٥	٧٧	XM_002534085
			Rc*h*2	٧٠	٨٥	٧٨	XM_002510410
٨	گلابی	*Prunus persica*	P*ph*	٧٣	٨٤	٧٥	AF323593
٩	یونجه	*Medicago sativa*	M*sh*	٧٢	٨٥	٨٠	DQ122787
١٠	رقم Shiranuhi از جنس مرکبات	*Citrus* cv. Shiranuhi	C*sh*	٧٣	٨٦	٧٨	EF122401

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 تیوردوکسین	نام اختصاصی ژن	شماره دستیابی
۱	آرابیدوپسیس	*Arabidopsis thaliana*	hI	At*h*1	Z14084
				At*h*3	Z35474
				At*h*4	Z35473
				At*h*5	Z35476
			hII	At*h*2	Z35475
				At*h*7	BT003140
				At*h*8	BT003670
			hIII	At*h*9	BT011728
				At*CxxS*1	AF144390
				At*CxxS*2	BT003671
				At*CxxC*2	NM_115500
			o	At*o*1	BT025773
				At*o*2	AF396650
			f	At*f*1	AY096721
				At*f*2	AY059086
			m	At*m*1	O48737
				At*m*2	AY079362
				At*m*3	BT025735
				At*m*4	AK227059
			x	At*x*	BT000355
			y	At*y*1	BT010965
				At*y*2	BT014871
۲	بادام زمینی	*Arachnis hypogaea*	hI	Ah*h*	CD038084
۳	برنج	*Oryza sativa*	hI	Os*h*2	Q9FRT3
٤	سویا	*Glycine max*	hI	Gm*h*2	BI699372
٥	سیب‌زمینی	*Solanum tuberosum*	hI	St*h*	BM111010
٦	سیب‌زمینی شیرین	*Ipomoea batatas*	hI	Ib*h*1	AY344230
۷	جو	*Hordeum vulgare*	hI	Hv*h*1	AY245454
				Hv*h*2	AY245455
۸	خال‌واش	*Mentha piperita*	hI	M*ph*	AW255457
۹	صنوبر	*Populus trichocarpa*	hI	Pt*h*1	AF483625
				Pt*h*3	BU822062
			hII	Pt*h*2	AF483266
				Pt*h*5	BU869308
			hIII	Pt*h*4	BU835000
				Pt*CxxS*1	CA823821
				Pt*CxxS*3	BU874060
			o	Pt*o*	XM_002326599
			f	Pt*f*	XM_002325871
			m	Pt*m*	XM_002337401
			x	Pt*x*	XM_002310030
			y	Pt*y*1	XM_002306666
				Pt*y*2	XM_002302134
۱۰	کلزا	*Brassica napus*	hI	Bn*h*1	U59379
				Bn*h*2	U59380
۱۱	گریپ فروت	*Citrus paradisi*	hI	C*ph*	AY271308
۱۲	گندم	*Triticum aestivum*	hI	Ta*h*1	AY072771
				Ta*h*2	AF286593
				Ta*h*3	AF420472
۱۳	فلفل قرمز	*Capsicum annuum*	hI	Ca*h*	AY496104
۱٤	نخود فرنگی	*Pisum sativum*	hI	Ps*h*1	AY170650
				Ps*h*2	AJ310990
۱٥		*Hevea brasiliensis*	hI	Hb*h*	CB377001
۱٦		*Ipomoea nil*	hI	In*h*	BJ561302

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

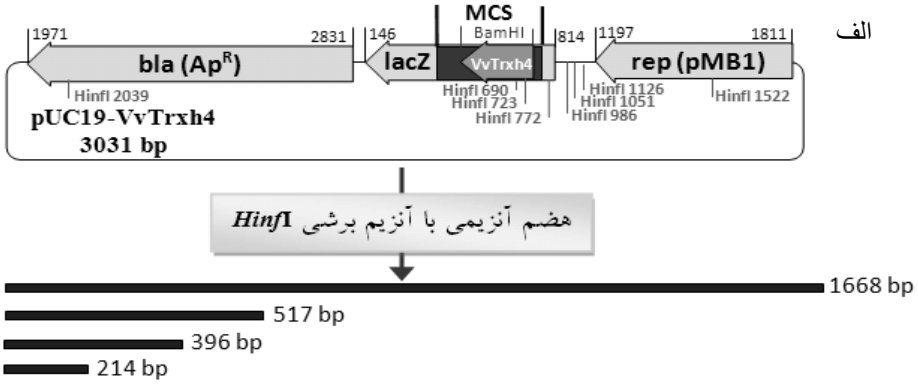
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

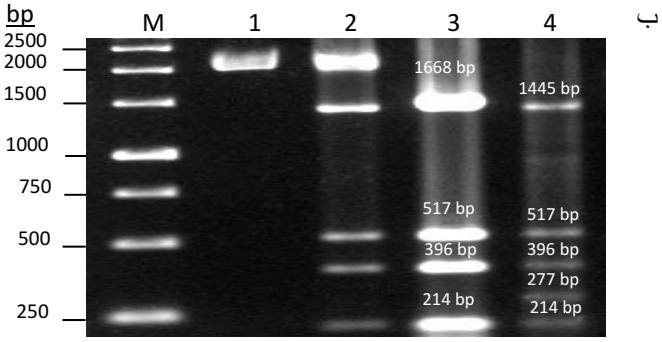
نتایج و بحث

جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی اسیدآمینه‌ای و ویژگی-های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین بدست آمده

cDNA رمز کننده VvTrx *h*4 با استفاده از تکنیک RT-PCR از بافت حبه انگور عسکری، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه‌سازی شده و نتایج توالی‌یابی DNA نشان داد که موقعیت قرارگیری آن روی جایگاه چندگانه همسانه‌سازی[10] ناقل در جهت معمولی می‌باشد که با نتایج بدست آمده توسط هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Hinf*I مطابقت داشت (شکل ۱).

[10] Multiple cloning site





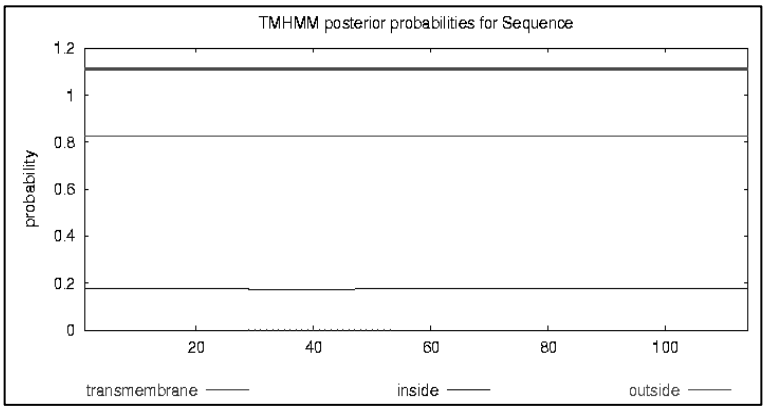
شکل ۱- ساختار ناقل نوترکیب pUC19-VvTrx *h*4 و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد به منظور تعیین جهت ژن همسانه‌سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Hinf*I. الف) ناقل نوترکیب حاوی ژن VvTrx *h*4 در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی (MCS) می‌باشد. همچنین توالی مسئول رونوشت‌برداری ناقل 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 Kb ۱، ۱) پلاسمید غیرنوترکیب هضم نشده، ۲) پلاسمید غیرنوترکیب هضم شده با *Hinf*I، ۳) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت معمولی، ٤) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت عکس.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

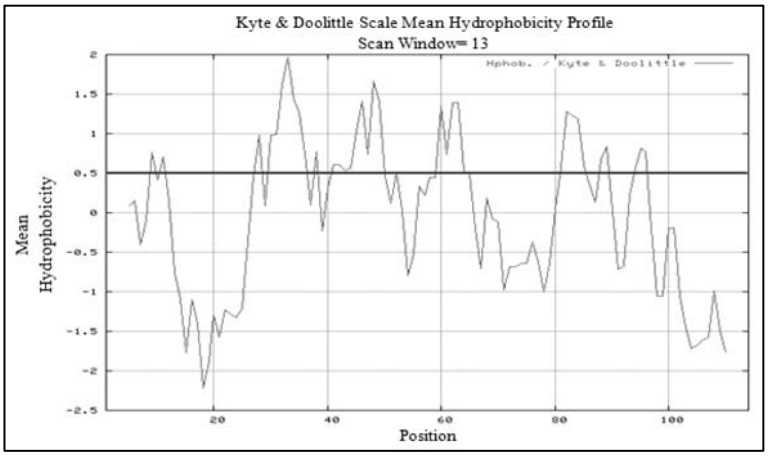
الف

```
1    ATGGCGGAAGAGGGACAAGTTGTCGGTTGCCACAGTGTGGAATCGTGGAAGGAGCAATTCCAGCATGGA
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   ATAGAGTCCAAGAAACTGGTGGTGGTGGATATCACTGCTTCATGGTGTGGGCCATGTCGTGTCATTAGC
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  CCATTTCTGGCAGAGCTTGCCAAGAAGATGCCTAATGTCGTATTTCTCAAGGTGGATGTGGATGAATTG
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  GAGACTGTTGCTAAGGAGTGGGAAGTGGAGGCCATGCCAACCTTTCTGTTCCTGAAAGAAGGAAACGTA
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 Hydropathic و TMHMM ژن VvTrx *h*4. 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 *h*4 با استفاده از شاخص TMHMM. پروتئین VvTrx *h*4 با داشتن بخش‌های غشائی و خارج سلولی، می‌تواند انتقال پلاسمودسمایی داشته باشد. ج) بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین VvTrx *h*4. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط قرمز رنگ قرار دارند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب باز خوانی cDNA رمز کننده VvTrx *h*4، ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HM370527، به طول ۳٤٥ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TGA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۱٤ اسیدآمینه (با ۹۹ درصد یکسانی و ۹۷ درصد شباهت نسبت به توالی اولیه) را رمز می‌نماید (شکل ۲ الف). برخلاف توالی پلی‌پپتیدی Vv*h*10 که دارای جایگاه فعال غیرمعمول RCGLC می‌باشد (۱)، توالی پروتئینی VvTrx *h*4 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 Vv*h*10 (۱)، در هر دو انتهای آمینو و کربوکسیل توالی پروتئینی VvTrx *h*4، 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 *h*4 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 *h*4 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 پروتئین)، محاسبه شده بوسیله برنامه ProtParam، به ترتیب ۹۱/۳۲ و حدوداً ۳۰ ساعت محاسبه گردید که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین VvTrx *h*4 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 *h*4، 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 زیرسلولی 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، ٤۰، ٤۳، ۵۳ و ٥٤)، پروتئین VvTrx *h*4 از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن درون سیتوزول قرار دارد.

بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین VvTrx *h*4

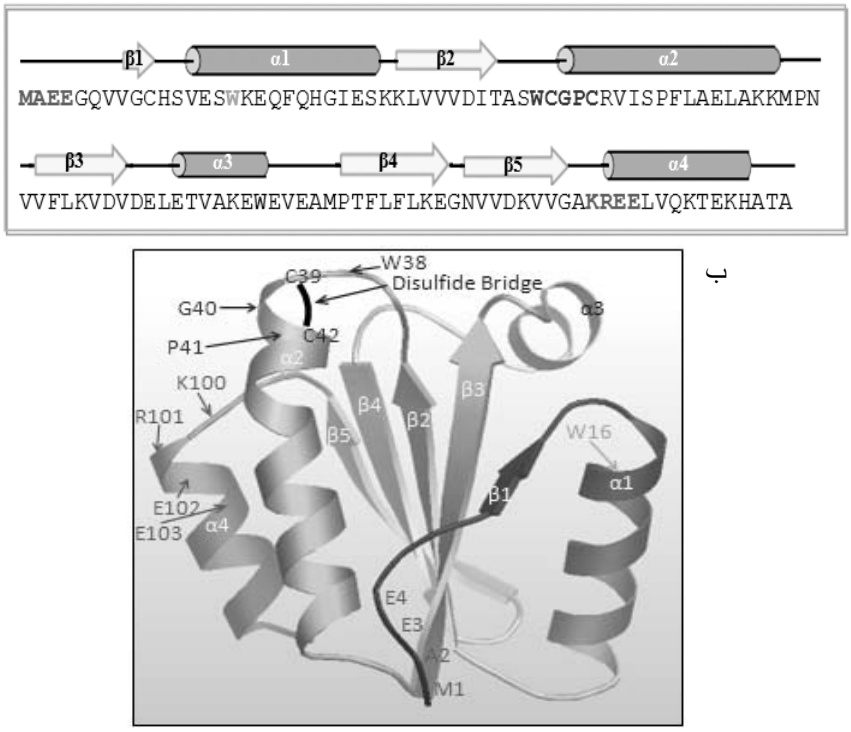
بررسی ساختار دوم پروتئین VvTrx *h*4 با استفاده از برنامه PSIpred نشان داد که این پروتئین مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها، حاوی ۵ رشته β و ۴ مارپیچ α بوده که به ترتیب β1، α1، β2، α2، β3، α3، β4، β5 و α4 در ساختار دوبعدی پروتئین قرار می‌گیرند (شکل ۳ الف). به هر حال، این نوع آرایش با آنچه که در Vv*h*10 (با ۶ رشته β و ۴ مارپیچ α) مشاهده گردید (۱)، اندکی تفاوت دارد. در پروتئین VvTrx *h*4، جایگاه فعال WCGPC مابین انتهای کربوکسیل صفحه β2 و انتهای آمینوی مارپیچ α2 قرار گرفته و اسیدآمینه ویژه تریپتوفان (Trp16)، چهارمین اسیدآمینه مارپیچ α1 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 β5 و مارپیچ α4 قرار گرفته که اسیدهای آمینه Arg101-Glu102-Glu103 انتهای آمینوی مارپیچ α4 را تشکیل می‌دهند (شکل ۳ الف). نحوه و مکان قرارگیری جایگاه فعال و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در ساختار دوبعدی پروتئین VvTrx *h*4 با سایر تیوردوکسین‌هایی که قبلاً گزارش شده‌اند، مشابه می‌باشد (۲۸، ۳۸ و ۴۷). پروتئین VvTrx *h*4 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 Vv*h*10 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 *h*4 شباهت زیادی را با ساختار دوبعدی پروتئین‌های N*th*2 از تنباکو، P*th*3 از صنوبر و O*sh*1 از برنج نشان داد. پروتئین N*th*2 حاوی ۵۷ مارپیچ α، ۱۲ دور β، ۲۴ رشته β و ۲۵ مارپیچ اتفاقی (۸)، پروتئین P*th*3 دارای ۵۹ مارپیچ α، ۸ دور β، ۲۵ رشته β و ۳۰ مارپیچ اتفاقی (۱۷) و پروتئین O*sh*1 نیز حاوی ۶۶ مارپیچ α، ۱۱ دور β متصل شده توسط ۲۲ رشته β و ۲۳ مارپیچ اتفاقی می‌باشند (۲۷).

ساختار سه‌بعدی پروتئین VvTrx *h*4 بوسیله برنامه‌های Swiss-MODEL و Swiss PDB-viewer و با استفاده از ساختار کریستالی ژن At*h*1 از آرابیدوپسیس (با شماره دستیابی 1xflA در پایگاه PDB[11]) به عنوان یک الگو، مورد پیش‌بینی قرار گرفت و مشاهده شد که ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده پروتئین VvTrx *h*4 مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها بوده (۲۸ و ۵۵) بطوری که صفحات β1، β2، β3 و β5 به صورت موازی و صفحه β4 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، اسیدآمینه تریپتوفان ویژه و سایر موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول به صورت مشخص در شکل ۳ (الف و ب) نشان داده شده‌اند.

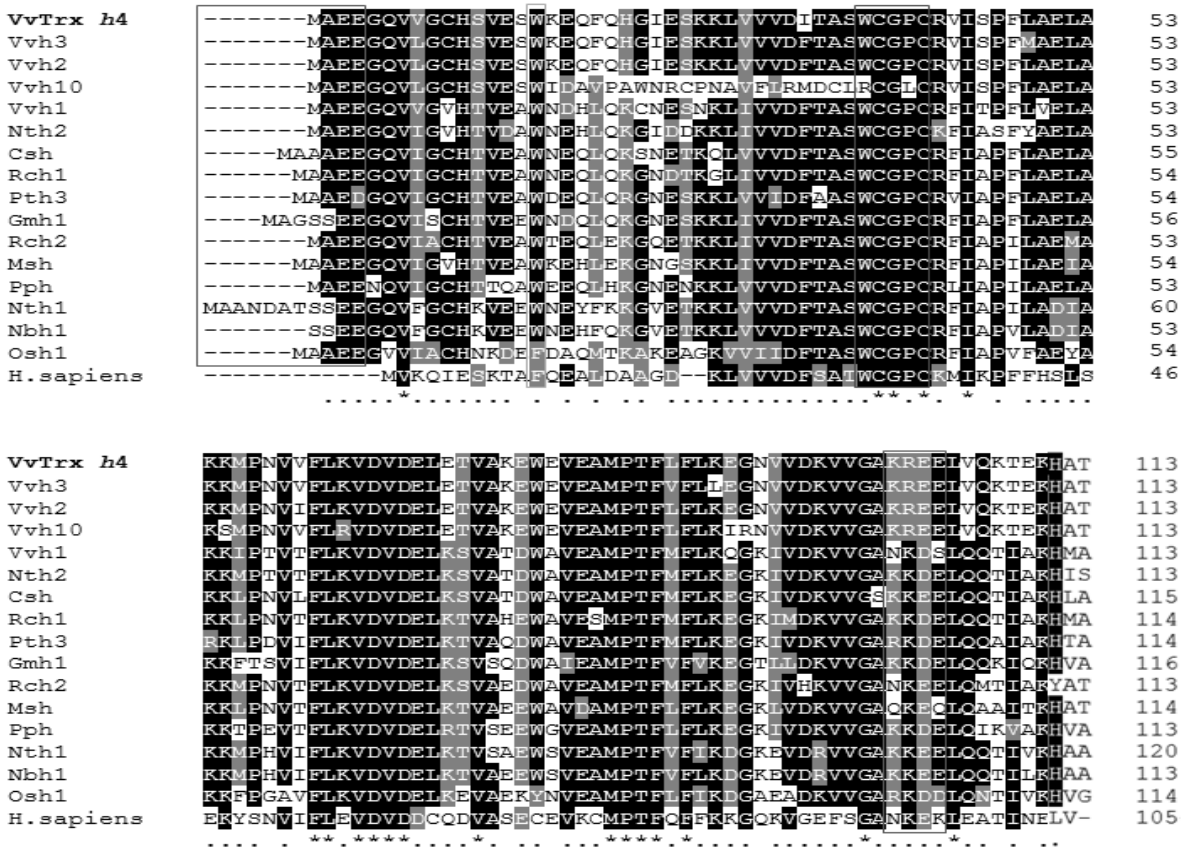
[11] Protein Data Bank



شکل ۳- ساختارهای دوبعدی و سه‌بعدی پروتئین VvTrx *h*4. الف) ساختار دوبعدی با استفاده از برنامه PSIpred. اسیدهای آمینه جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینه 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-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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



شکل ۴- همردیف‌سازی چندگانه ژن VvTrx *h*4 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 اسیدآمینه تریپتوفان 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 ۰ نمایان‌گر اسیدهای آمینه مشابه می‌باشد. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۱ آمده است.

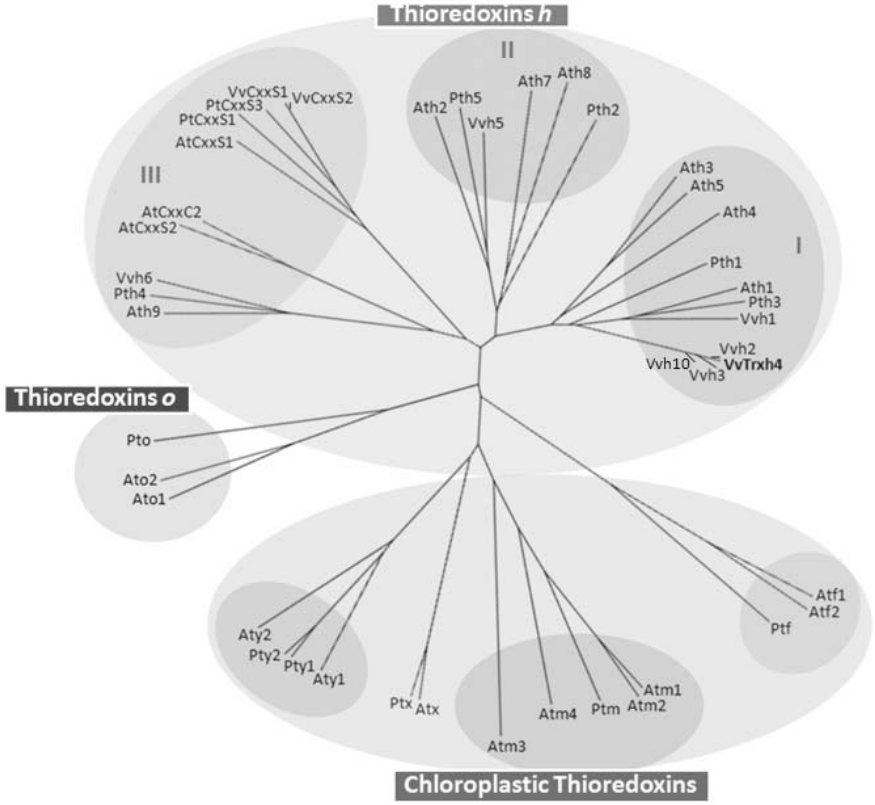
بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی ژن پروتئین VvTrx *h*4 با سایر تیوردوکسین‌ها

توالی پروتئینی بدست آمده VvTrx *h*4 با سایر تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاهان دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین تشابه را با ژن‌های Pt*h*3 از گیاه صنوبر (*Populus trichocarpa*)، Cs*h* از یک رقم مربوط به جنس مرکبات (*Citrus* cv. shiranuhi)، Nb*h*1 از گیاه تنباکو (*Nicotiana benthamiana*) و Rc*h*1 از گیاه کرچک (*Ricinus comunis*) به ترتیب به میزان ۸۹٪ (۷۲٪ یکسانی)، ۸۶٪ (۷۳٪ یکسانی)، ۸۵٪ (۷۲٪ یکسانی) و ۸۵٪ (۷۲٪ یکسانی) دارد (شکل ٤). همچنین میزان شباهت و یکسانی ژن VvTrx *h*4 با ژن تیوردوکسین انسانی به ترتیب برابر ۷۰ و ۵۰ درصد مشاهده شد. در مقایسه با تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور، ژن VvTrx *h*4 بیشترین تشابه را با همشکل‌های زیرگروه I (*h*I)، از ۸۰ تا ۹۹ درصد و کمترین تشابه را با همشکل‌های زیرگروه III (*h*III) به میزان ۶۰ تا ۷۲ درصد دارد. از بین همشکل‌های *h*I، بیشترین تشابه را با همشکل Vv*h*2 به میزان ۹۹ درصد (۹۷ درصد یکسانی) و کمترین تشابه را با همشکل Vv*h*1 به میزان ۸۰ درصد (٦٧ درصد یکسانی) دارد. بعلاوه ژن VvTrx *h*4 با همشکل Vv*h*10 از زیرگروه I (۱)، به ترتیب دارای ۸۱ درصد شباهت و ٧٦ درصد یکسانی می‌باشد (جدول ۱).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

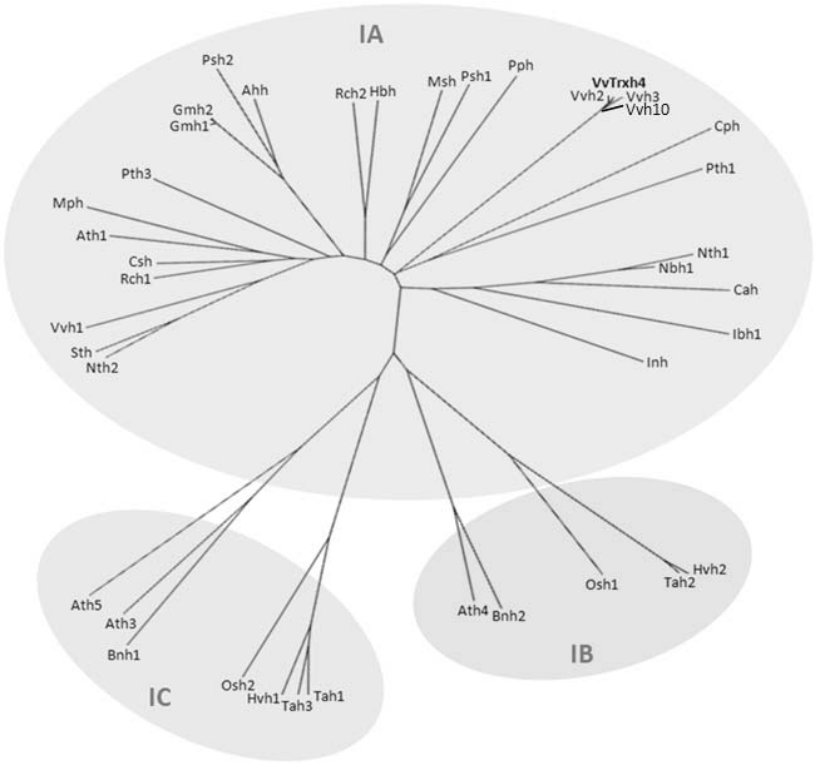
به منظور تعیین نوع و زیرگروه ژن همسانه‌سازی شده VvTrx *h*4، بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور به روش Unrooted-Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد و مشاهده گردید که تیوردوکسین‌ها به سه گروه اصلی شامل 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 (٤، ١٥ و ١٦). تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I (*h*I)، شامل همشکل‌های Vv*h*1، Vv*h*2، Vv*h*3، VvTrx*h*4 و Vv*h*10 انگور، At*h*1، At*h*3، At*h*4 و At*h*5 آرابیدوپسیس و Pt*h*1 و Pt*h*3 صنوبر بوده 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 (١٦ و ٢٦). تیوردوکسین‌های *h*II شامل همشکل‌های Vv*h*5 انگور، At*h*2، At*h*7 و At*h*8 آرابیدوپسیس و Pt*h*2 و Pt*h*5 صنوبر بوده و از نظر تکاملی، قرابت نزدیکی با تیوردوکسین‌های *h*I دارند (شکل ۵). سومین زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* شامل تیوردوکسین‌هایی با جایگاه فعال معمول WCGPC (Vv*h*6 انگور، At*h*9 آرابیدوپسیس و Pt*h*4 صنوبر) و تیوردوکسین‌های ناهنجار CxxS (Vv*CxxS*1 و Vv*CxxS*2 انگور، At*CxxS*1، At*CxxS*2 و At*CxxC*2 آرابیدوپسیس و Pt*CxxS*1 و Pt*CxxS*3 صنوبر) می‌باشند که ویژگی اصلی آن‌ها واکنش با سیستم گلوتاردوکسین/گلوتاتیون می‌باشد (١٥).



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن نوع و زیرگروه ژن VvTrx *h*4 با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن زیرکلاس ژن VvTrx *h*4 با استفاده از تیوردوکسین‌های *h*I انگور و سایر تیوردوکسین‌های *h*I. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.

بررسی فیلوژنتیکی تیوردوکسین‌های *h*I از گیاهان مختلف نشان داد که این زیرگروه می‌تواند به سه زیرکلاس مختلف IA، IB و IC تقسیم‌بندی شود (شکل ٦). زیرکلاس IA حاوی ژن VvTrx *h*4 به همراه همشکل‌های Vv*h*1، Vv*h*2، Vv*h*3 و Vv*h*10 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 *h*I 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 VvTrx *h*4 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 ٦).

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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

منابع

۱. موسوی ش، حداد ر، گروسی قع، و حسینی ر (۱۳۸۹) همسانه سازی و بررسی ساختار ژن تیوردوکسین *h* (*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.

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, Sautiere 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 redutase 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 *h*1 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'. 3nd ed. Vol:1-3. Cold

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, Grienenberger 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]

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 strutural 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.9.9]