

مقایسه‌ی رایانه‌ای دومین ایزوفرم رمزکننده آنتیپورتر Na^+/H^+

واکوئلی گیاهی جدا شده از یک گیاه هالوفیت با همتای آن در گندم

عباس عالم‌زاده*

۱- استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alelmzadeh@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۰/۵/۸۸ - تاریخ پذیرش: ۹/۸/۸۹)

چکیده

طی این تحقیق ژن رمزکننده یک آنتیپورتر Na^+/H^+ واکوئلی به عنوان دومین ایزوفرم این خانواده ژنی از گیاه هالوفیت (*Zostera marina*) جدا گردید و توالي آن با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای با ژن همتای آن در گندم به عنوان یک گیاه غیر متحمل زراعی مورد مقایسه قرار گرفت. با استفاده از روش RACE توالي کامل ناحیه رمزکننده این ژن جداسازی گردید. ناحیه رمزکننده این ایزوفرم ۱۶۲۳ جفت باز است و یک پروتئین ۵۴۰ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند که دو اسید آمینه از پروتئین رمزکننده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه بلندتر است. ناحیه رمزکننده این ژن ۱۸ جفت باز از ناحیه رمزکننده ژن همتای آن در گندم کوتاه‌تر است. با مقایسه توالي اسیدآمینه‌ای پروتئین رمزکننده توسط این ژن با سایر آنتیپورتهای گیاهی مشخص گردید که این پروتئین بیشترین شباهت را با اولین ایزوفرم جدا شده از همین گیاه دارد و فاصله فیلوزنیکی آن با پروتئین رمزکننده توسط ژن همتای آن در گندم نسبتاً زیاد می‌باشد. داده‌ها نشان دادند که پروتئین‌های رمزکننده توسط این ایزوفرم و اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه نسبت به پروتئین رمزکننده توسط ایزوفرم جدا شده از گندم درصد بیشتری ترئونین، تیروزین و سرین دارند اما میزان سیستین بین این ایزوفرم‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد. به نظر می‌رسد برهمکنش این آنتیپورتر با سایر پروتئین‌ها در گیاه هالوفیت *Z. marina* بیشتر از یک گیاه معمولی مثل گندم باشد.

واژه‌های کلیدی

آنتمپورتر واکوئلی،
بیوانفورماتیک،
جداسازی ژن،
گندم،
Zostera marina

مقدمه

امروزه تقریباً در تمامی نقاط کره زمین تنش شوری سیستم تولیدات گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سبب کاهش عملکرد گیاهان می‌شود (۱، ۱۰، ۱۶). آثار عمدۀ ناشی از شوری در گیاهان بدليل افزایش غلظت یون‌های سمی در گیاه و ایجاد عدم تعادل یونی همراه با تنش کم آبی در گیاه است (۳). سدیم یکی از یون‌هایی است که با افزایش غلظت آن در سیتوپلاسم گیاهان تحت تنش شوری موجب اختلال در فرآیندهای بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی سلول و در نتیجه گیاه می‌شود (۴، ۱۶). در حقیقت افزایش یون سدیم سبب اختلال در جذب و عمل یون پتانسیم و کاهش نسبت Na^+/K^+ می‌شود که این موضوع اکثر

کننده توسط آن‌ها با توالی ایزوفرم‌های گیاهان معمولی می‌توان به تفاوت‌ها و شباهت‌های موجود پی برد و به بسیاری از سوالات در این زمینه پاسخ داد.

در این مقاله نحوه جداسازی یک ایزوفرم جدید رمز کننده آنتیپورتر Na^+/H^+ واکوئلی از گیاه seagrass و نتایج تجزیه و تحلیل رایانه‌ای توالی اسیدآمینه پروتئین رمز شده توسط آن گزارش گردیده است. توالی اسید آمینه‌ای این پروتئین با پروتئین‌های رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه و $\text{TaNHX}1$, ایزوفرم جدا شده از گندم, توسط برنامه‌های رایانه‌ای مورد مقایسه قرار گرفته و رابطه فیلوزنیکی آن با سایر آنتیپورترهای گیاهی تعیین گردیده است.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/> (ClastalW) با استفاده از برنامه top-e.html (top-e.html) توالی آنتیپورترهای واکوئلی گیاهان موجود در بانک ژن هم‌ردیف گردیدند. نواحی حفاظت شده در ژن‌های مذکور مشخص گردید و بر اساس آن یک جفت آغازگر هرز طراحی گردید. DNA ژنومی به روش سقایی معروف و همکاران (۱۹۸۴) از برگ‌ها استخراج گردیده و به ترتیب با استفاده از فنل، فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل و کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل خالص گردید و توسط اتانول مطلق رسوب داده شد. عمل تکثیر با استفاده از آغازگرهای هرز و DNA ژنومی به عنوان الگو (در حجم ۵۰ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل 10 mM تریس، $50\text{ }\mu\text{M}$ کلرید پتاسیم، $1/5\text{ mM}$ کلرید منیزیم، $200\text{ }\mu\text{M}$ از هر یک از dNTP پلیمراز و $1\text{ }\mu\text{M}$ از DNA ژنومی) تحت چرخه حرارتی 95°C به مدت 30 ثانیه، 58°C به مدت 30 ثانیه و 72°C به مدت 60 ثانیه انجام شد. 30 بار این چرخه تکرار گردید و بعد از آن قطعات برای تکثیر نهایی به مدت 10 دقیقه در 72°C قرار داده شدند.

قطعه تکثیر شده در مرحله قبل، از روی ژل جدا گردید، در ناقل T easy همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی گردید. با تعیین توالی

فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸، ۱۷). بنابراین جهت تحمل تنفس شوری، ضروری است گیاه بتواند غلظت یون سدیم را در سیتوپلاسم پایین نگه دارد.

در اثر فعالیت آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکوئلی در گیاهان، یون سدیم به درون واکوئل فرستاده می‌شود و بدین وسیله از آثار مخرب آن بر سیتوزول و آنزیم‌های موجود در آن ممانعت به عمل می‌آید. تحت شرایط تنفس شوری، بیان ژن رمز کننده آنتیپورترهای واکوئلی افزایش می‌یابد که نشان از اهمیت این پروتئین در مکانیسم‌های تحمل تنفس دارد (۷، ۱۴، ۱۵). با تحقیقات انجام شده در گیاهان مشخص گردیده است که آنتیپورترهای واکوئلی توسط یک خانواده چند ژنی رمز می‌شوند. برای مثال در ذرت و آریبلوپسیس به ترتیب پنج و شش ایزوفرم برای این ژن شناسایی شده است.

گزارش‌های متعددی دال بر اهمیت آنتیپورترهای واکوئلی در تحمل تنفس شوری وجود دارد که در این میان میان ژن‌های رمز کننده این پروتئین در گیاهان هالوفیت جایگاه ویژه‌ای دارند (۱۰، ۱۹، ۲۰). در حقیقت گیاهان هالوفیت قادر هستند در شرایط تنفس با کارایی بیشتری یون‌های سدیم را از سیتوزول خارج کنند (۱۰). حال سوال مطرح شده این است که آیا ساختمان آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکوئلی در گیاهان هالوفیت با گیاهان معمولی فرق می‌کند و این موضوع سبب افزایش کارایی آن‌ها تحت شرایط تنفس می‌شود و یا اینکه ساختار این آنتیپورترها در گیاهان هالوفیت به گونه‌ای است که با برهمنکش با سایر عوامل، ساختمان و عمل خود را تحت شرایط تنفس حفاظت می‌کنند؟ با بررسی و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها و توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های رمز کننده توسط آنها و مقایسه آنها در گیاهان هالوفیت و معمولی می‌توان به درک بیشتری نسبت به توانائی‌های این آنتیپورترها در مکانیسم‌های تحمل دست یافت.

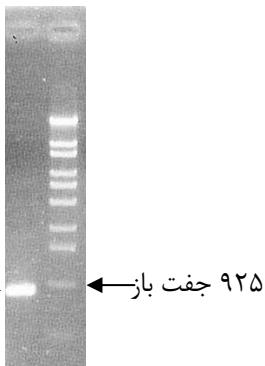
گیاه seagrass *Zostera marina* یک گیاه تک لپه‌ای دریائی است که قادر است در شوری $3-5^\circ\text{C}$ درصد آب دریا به خوبی رشد نموده و چرخه رشد خود را کامل کند (۱۱، ۱۸). با جداسازی ژن‌هایی که محصول آن‌ها در تحمل به شرایط تنفس نقش دارند از این گیاه و مقایسه توالی و ساختار پروتئین‌های رمز

نرمافزارهای رایانه‌ای مورد استفاده National Center for DNA Data Bank of Biotechnology Information (NCBI) با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی DDBJ و ExPASy Japan (DDBJ) و نرمافزارهای موجود در آنها توالی نوکلئوتیدی ژن جداسازی شده و پروتئین رمز شده توسط آن با سایر توالی‌ها به طور عام و با توالی ژن همتای آن در گندم به طور خاص مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل رایانه‌ای قرار گرفت.

نتایج و بحث

با استفاده از آغازگرهای هرز طراحی شده و DNA ژنومی گیاه *Z. marina* به عنوان الگو طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک قطعه ۸۴۷ جفت بازی تکثیر گردید (شکل ۲).

λ/Styl

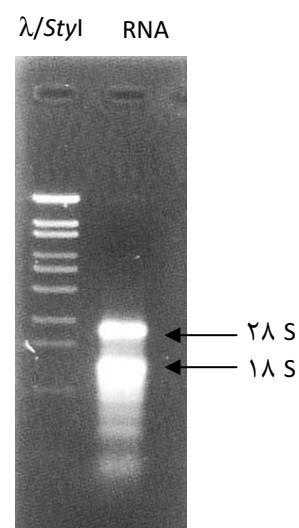


شکل ۲- تکثیر یک قطعه ۸۴۷ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای هرز از درون ژنوم گیاه *Z. marina*

با توالی‌یابی این قطعه مشخص گردید که توالی آن مربوط به ژن مورد نظر می‌باشد. بر اساس توالی مذکور دو آغازگر اختصاصی طراحی گردید. با استفاده از آغازگرهای پیش‌رو و $3'$ کیت انتهای $3'$ تکثیر گردید و با استفاده از آغازگرهای پس‌رو و $5'$ کیت مذکور انتهای $5'$ ژن مورد نظر تکثیر گردید. با توالی‌یابی دو قطعه‌ای تکثیر شده مشخص گردید که آنها مربوط به ژن مورد نظر می‌باشند. با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه بالا دست رمز شروع و پایین دست رمز پایان کل ناحیه رمز کننده ژن از درون cDNAs تهیه شده از RNA استخراج شده از برگ جداسازی و در درون ناقل T Easy الحاق و به درون باکتری کلی

قطعه فوق مشخص گردید که این قطعه مربوط به یک آنتیپورت واکتوالی می‌باشد. با استفاده از توالی این قطعه یک جفت آغازگر اختصاصی جهت انجام عمل RACE طراحی گردید و با استفاده از کیت (GeneRacerTM Kit, invitrogen) نواحی $3'$ و $5'$ ژن تکثیر و توالی‌یابی گردید.

استخراج RNA و تهیه cDNAs با استفاده از روش لیتیم کلرید تغییر یافته (۱) RNA کل از برگ‌های گیاه seagrass استخراج و به ترتیب با استفاده فنل، فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل و کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل خالص گردید و توسط اتانول مطلق رسوب داده شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده، $3'$ میکرولیتر از آن روی ژل آکارز یک درصد RevertA Ace کتروفورز گردید (شکل ۱). با استفاده از کیت (Toyobo, Japan) از روی RNA استخراج شده cDNAs تهیه گردید. با استفاده آغازگرهای اختصاصی که برای ناحیه بالا دست و پایین دست ژن طراحی شده بود ناحیه رمز کننده ژن از cDNAs جداسازی و توالی‌یابی گردید. ناحیه رمز کننده ژن به درون ناقل مناسب الحق و سپس به درون باکتری *Escherichia coli* سویه JM109 منتقل گردید.



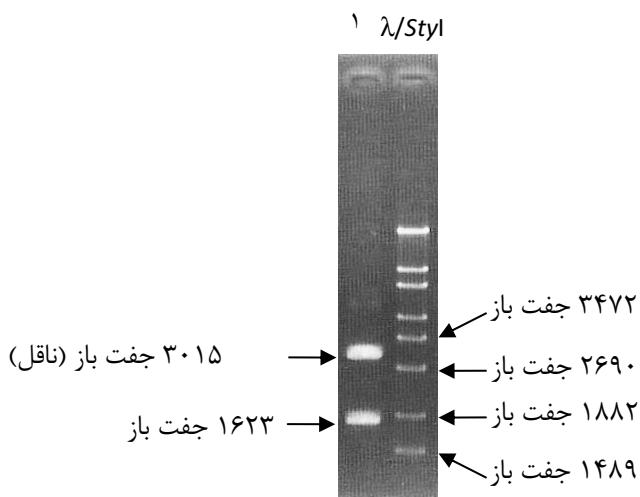
شکل ۱- بررسی کیفیت آرانای استخراج شده از برگ *Z. marina* روی ژل آکارز یک درصد

شده توسط ایزوفرم جدید از میان آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکنولی گیاهی بیشترین قرابت را با پروتئین رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از همین گیاه دارد (شکل ۵). این موضوع نشان دهنده این است که به احتمال زیاد، ژن‌های رمز کننده این دو پروتئین در ابتدای یکی بوده‌اند اما طی مسیر تکاملی در اثر مضاعف شدن تبدیل به دو ایزوفرم مختلف در دو ناحیه ژنوم شده‌اند. میزان تشابه این دو پروتئین با پروتئین رمز شده توسط *TaNHX1* چندان زیاد نیست و بر اساس دندروگرام ترسیم شده در دو دسته جدا از هم قرار می‌گیرند.

با توجه به اینکه فسفریله شدن سه اسیدآمینه ترئونین (T)، تیروزین (Y) و سرین (S) در پروتئین‌ها نقش مهمی در فعالیت پروتئین‌ها و برهمنکنش آنها با پروتئین‌های تنظیمی از قبیل ۳-۱۴-۲، ۶-۲، ۶، احتمال فسفریله شدن این سه اسیدآمینه در پروتئین‌های رمز شده توسط ژن مزبور و *TaNHX1* با استفاده از برنامه NetPhos مشخص گردید. بررسی رایانه‌ای نشان داد که در ایزوفرم جدید و *TaNHX1* به ترتیب تیروزین موقعیت ۲۸۸ و ۲۸۹ از ابتدای آمینی به احتمال حدود ۶۶ درصد فسفریله می‌شود.

این تیروزین در هر دو پروتئین در توالی حفاظت شده سایر آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکنولی در گیاهان در موقعیت ۲۸۶ تا ۲۹۲ از ابتدای آمینی گزارش شده است، قرار گرفته است (شکل ۶ الف). قبل از اینکه در گیاهان دو اسیدآمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ۲۹۸ تا ۳۰۲ از ابتدای آمینی در توالی حفاظت شده دارند که با احتمال نزدیک ۹۵ درصد فسفریله می‌گردند. این دو اسیدآمینه ترئونین در ایزوفرم جدید در موقعیت ۳۰۰ و ۳۰۱ از ابتدای آمینی در موتیف VTESSRITTKHTFA و در *TaNHX1* در موقعیت ۳۰۱ و ۳۰۲ از ابتدای آمینی در موتیف VTESSRVTTKHTFA قرار دارند که در هر دو پروتئین به احتمال بیش از ۹۰ درصد فسفریله می‌شوند (شکل ۶ ب). یک اسیدآمینه سرین در موقعیت ۱۳ تا ۲۱ اسیدآمینه از انتهای کربوکسیلی اکثر آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکنولی گیاهی در توالی

باسیل سویه JM109 منتقل گردید. با هضم آنزیمی، همسانه‌های مثبت حاوی DNA نوترکیب مشخص و انتخاب گردیدند. این همسانه‌ها حاوی ناحیه رمز کننده ژن بودند (شکل ۳).



شکل ۳- ناحیه رمز کننده دومین ایزوفرم به طول ۱۶۲۳ جفت باز که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از cDNAs تهیه شده از RNA استخراج شده از برگ *Z marina* تکثیر شده و در ناقل T Easy الحق یافته است.

با توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی شده مشخص گردید این ایزوفرم دارای یک ناحیه رمز کننده ۱۶۲۳ جفت بازی می‌باشد (شکل ۴) که یک پروتئین ۵۴۰ اسیدآمینه‌ای را رمز می‌کند. ناحیه رمز کننده این ایزوفرم و پروتئین رمز شده توسط آن به ترتیب ۶ جفت باز و ۲ اسیدآمینه بلندتر از اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه است. توالی ژن رمز کننده آنتیپورتر Na^+/H^+ واکنولی جدا شده از گندم به نام *TaNHX1* به شماره دستری ۵۴۰۲۴۵ AY۰۴۰۲۴۵ از سایت NCBI گرفته شد و با توالی ایزوفرم جدید مقایسه گردید. طول ناحیه رمز کننده ۱۶۴۱ *TaNHX1* جفت باز است و یک پروتئین ۵۴۶ اسیدآمینه‌ای را رمز می‌کند که ۶ اسیدآمینه بلندتر از ایزوفرم جدید جدا شده از گیاه *Z marina* می‌باشد.

با استفاده از برنامه ClustalW توالی اسیدآمینه‌ای آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکنولی در گیاهان هم‌دیف شدند و بر اساس آن با استفاده از برنامه TreeView 1.66 نمودار فیلوژنتیک رسم گردید (شکل ۵). بر اساس این نمودار مشخص گردید که پروتئین رمز

داشته باشند و بدین طریق در افزایش تحمل گیاه هالوفیت در برابر تنفس شوری دخالت داشته باشند. موضوع دیگری که سبب قوت بیشتر این احتمال می‌شود بالا بودن درصد این سه اسید آمینه در پروتئین رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه هالوفیت در مقایسه با ایزوفرم گندم می‌باشد. میزان اسید آمینه‌های سرین، ترئونین و تیروزین در پروتئین رمز شده توسط اولین ایزوفرم به ترتیب برابر $9/5$, $7/6$ و $2/4$ است (جدول ۱).

تحقیقات نشان داده است که ایجاد پیوندهای دی‌سولفید بین اسید آمینه‌های سیستئین (Cys) در یک رشته پلی‌پپتیدی و تشکیل سیستئین سبب افزایش مقاومت پروتئین به تنفس‌های محیطی می‌شود (۵) اما به نظر می‌رسد که تشکیل چنین پیوندهایی در آنتی‌پورترهای واکتوولی هالوفیت‌ها سبب استحکام و مقاومت آنها در برابر تنفس شوری نمی‌شود زیرا میزان سیستئین در پروتئین‌های رمز شده توسط $TaNHX1$ و دو ایزوفرم جدا شده از گیاه هالوفیت تفاوت معنی‌داری ندارند (جدول ۱).

با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که ساختمان اول آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکتوولی در گیاهان هالوفیت تفاوت مشخصی با گیاهان معمولی ندارد که سبب استحکام آنها در برابر تنفس شوری گردد، بلکه در گیاهان هالوفیت احتمالاً پروتئین‌های خاصی وجود دارند که با برهمکنش با آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکتوولی از ساختمان آنها در برابر تنفس محافظت می‌کنند.

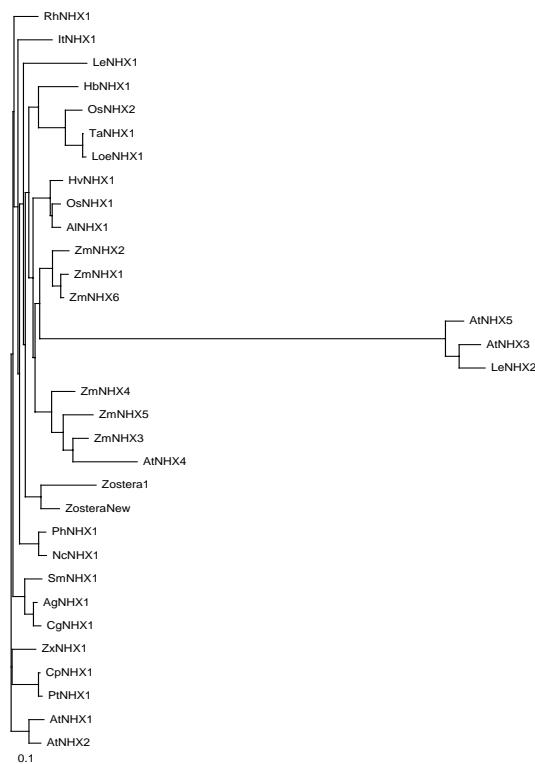
حافظت شده‌ی $\text{F}_{\alpha\beta}\text{G}_{\alpha\gamma}\text{G}_{\alpha\delta}\text{R}_{\alpha\gamma}\text{G}_{\alpha\delta}\text{F}_{\alpha\beta}\text{V}_{\gamma\delta}\text{P}_{\alpha\gamma}\text{F}_{\alpha\beta}\text{V}_{\gamma\delta}\text{P}_{\alpha\gamma}\text{G}_{\alpha\delta}\text{S}_{\alpha\beta}$ در قرار دارد که با احتمال حدود ۹۵ درصد فسفریله می‌گردد. این اسید آمینه سرین در ایزوفرم جدید در موقعیت ۱۱ از انتهای کربوکسیلی در متیوف FGGRGFVPFIPGSP و در $TaNHX1$ در موقعیت ۲۳ از انتهای کربوکسیلی در متیوف FGGRGFVPFVPGSP وجود دارد (شکل ۶ ج). به احتمال زیاد اسید آمینه‌های فسفریله شده مذکور نقش بسزایی در برهمکنش این پروتئین با سایر پروتئین‌ها و متعاقب آن کنترل فعالیت پروتئین موردنظر دارد. چنین نقشی در مورد سایر پروتئین‌ها نیز مشاهده شده است برای مثال در پمپ‌های پروتونی غشایی طی تحقیقات مختلف مشخص شده است یک ترئونین نزدیک به انتهای کربوکسیلی نقش بسزایی در تنظیم فعالیت این پمپ‌ها دارد (۶). در این زمینه نیز لازم است تا با انجام تحقیقات بیشتر نقش این اسید آمینه‌های فسفریله شده در تنظیم فعالیت آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکتوولی مشخص گردد.

با استفاده از سایت DOS مشخص گردید بر اساس شاخص کیت و دولیت (۹) تعداد دومین‌های درون غشایی برای پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید احتمالاً ۹ عدد و برای پروتئین رمز شده توسط $TaNHX1$ احتمالاً ۱۰ عدد می‌باشد (شکل ۷). تعداد دومین‌های درون غشایی تخمین زده برای سایر آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکتوولی گیاهی نیز در همین حدود است.

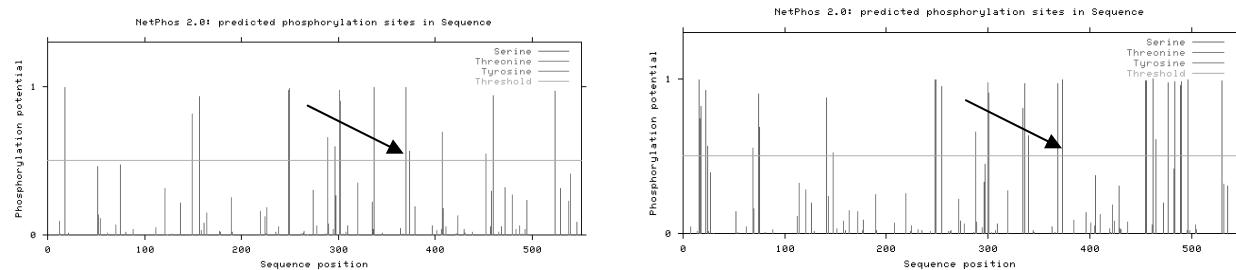
میزان اسید آمینه‌های سرین، ترئونین و تیروزین در پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید به ترتیب $10/4$, $7/4$ و $2/4$ درصد است در حالیکه در $TaNHX1$ به ترتیب برابر $7/6$, $7/9$ و $2/2$ است (جدول ۱). با توجه به اینکه این اسید آمینه‌ها فسفریله می‌شوند و پس از فسفریله شدن در برهمکنش با سایر پروتئین‌ها دخالت دارند از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۲, ۶). بررسی توالی دو پروتئین رمز شده توسط این دو ایزوفرم جدید بیشتر از گندم است این سه اسید آمینه در ایزوفرم جدید بیشتر از گندم است (جدول ۱). این می‌تواند بدین مفهوم باشد که پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید برهمکنش بیشتری با سایر پروتئین‌ها دارد که بعضی از این پروتئین‌ها ممکن است نقش حفاظت کننده از آنتی‌پورتر رمز شده در برابر غلظت‌های بالای نمک را به عنده

ATGGATTGGGTGTGATTACGGAGATGGCAAATCAAGTGACGGTCTCCACCTCCGACCATGCTTCGGTATCGTCGATAAGCTGTTCTCGGCTCTCTGTGCGGCTGCATTGTGATTGGTCATCTGTTGGAAGAGAACCGATGGGTCAACGAATCCATCACCGCACTTCTCATTGGGTTGGTACCGGAGTTGTCATCCTCTAAGCACAAGGGAAAGAGTTACATATTCTGGTGTTCAGTGAGGATCTGTTCTCATATACTTACTACCTCCTATTATCTTCAACGCTGGGTTCCAAGTCAGAAGAAGCAGTTTCAGAAATTCTAGACCACATCACGGTATTGCGAGTCGGCACATTGATATCATTCAATTATTCAATTGCGCTATTATTCTGTTAAAATGGACGTAAGCCTCACTGATATCGGAGATTACCTAGCCACTGGAGCCATCTTGCACTACAGATTCTGTATGCACATTACAGGTTCTTAATCAAGATGAGACTCCTCTGCTTACAGTTGGTGGAGAAGGTGTGGTCAATGATGCTACTTCAGTTGTGCTGTTCAATGCAATCCAGAACCTCGATCTGTTCACATAGACGGCACTATTGCCCTGAAATTTCGAAACTTCTCTATCTGTTCTGCTAGCACCGTTCTGGTGTGCAACTGGATTATAAAGTGCTTCTGTCATCAAGAAATTGTACTTCGGCAGGCATTCTACAGACCCTGAAGTTTCTTAATGATGCTCATGGCCTACCTCTCCTACTTGCTGGCAGAGTTATTCTATCTGAGTGGTATACTGACTGTGTTCTCTGTGGGATTGTAATGTCACATGGCACAATGTAACAGAGAGTTCAAGAATAACAACCAAGCATACTTTCGAAACACTGTCATTTCGCTGAATCTTCATCTTGATGTTGGGATGGATGCAATTGGGATATTGACAGATTGAGGAGTTCAAGAATAACAACCAAGCATACTTGGTAGGAAGGGCAGCTCGTGTTCACTGTCATTCTGTCACATTGTCAGAGTTCAAGAATAACAACCAAGCATAATGAAAAAAATTGAATTCAAGCAGCAGGTTACAATATGGTGGCGGGACTAATGAGAGGGTGCAGTATCAATGGCACTTGCTTACATCAGTTTACAGCGCAGGTACACGGAATTACCCGCAAATGCAATTATGATAACAGTACCATAACAGTTGTTCTTCAGCACAAAGTGTATTGGATTGCTGACTAAACCCCTGGTATTCTTCTTACTTCCTCACAAGGGATTAAGCAGCAGATGAGCAGTATTGATGACCCAAACAGTCCAAATCATTCTAGCTGCACTCCTGGGAGTGTGCATGGGTCTGAAATTGAAGAACCCACTAGTATTCCCTGACCGTCCAGCTACGTCATACTCGTCACCTACTCGCGCGTGCATTACTATTGGCGCAAATTGATGACCGCAGTCA TGAGACCTATGTTGGTGGTAGAGGTTGTTCCATTATTCCAGGATCACCAACAGAGGAACCAAGTGTGCATCCATTAGT

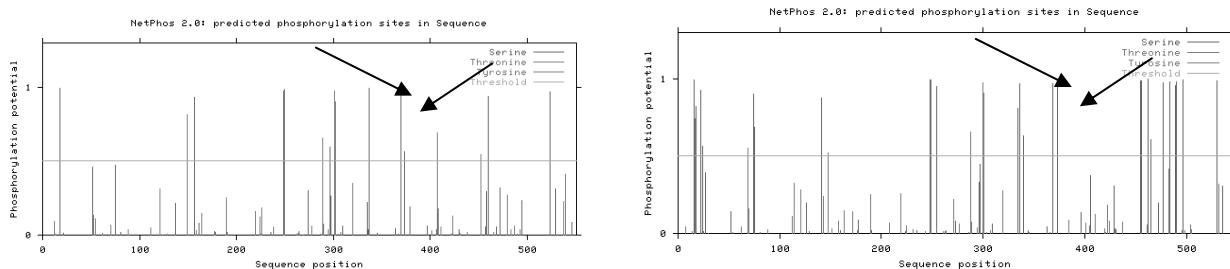
شکل ۴- توالی ناحیه رمز شونده دومین ایزوفرم رمز کننده آنتیپورتر واکولی از گیاه دریابی *Z. marina* که ۱۶۲۳ جفت باز می‌باشد.



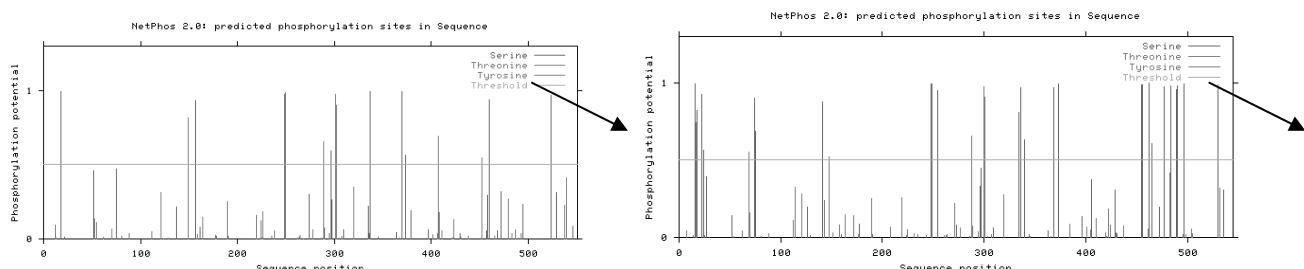
شکل ۵- نمودار فیلوجنتیک حاصل از توالی آمینواسیدی Na^+/H^+ آنتیپورتر واکولی *AgNHX1* (*Aeluropus littoralis*) *AlNHX1* (*Citrus paradisi*) *CpNHX1* (*Chenopodium glaucum*) *CgNHX1* (*Arabidopsis thaliana*) *AtNHX1~5* (*Atriplex gmelini*) (*Oriza sativa*) *OsNHX1* و *2* (*Ipomoea tricolor*) *ItNHX1* (*Hordeum vulgar*) *HvNHX1* (*Hordeum brevisubulatum*) *HbNHX1* (*PhNHX1*) (*Nierembergia caerulea*) *NcNHX1* (*Lycopersicon esculentum*) *LeNHX1* و *2* (*Lophopyrum elongatum*) *LoeNHX1* (*TaNHX1*) (*Suaeda maritima*) *SmNHX1* (*Rosa hybrida*) *RhnHX1* (*Poncirus trifoliate*) *PtNHX1* (*Petunia hybrida*) (*Zygophyllum xanthoxylum*) *ZxNHX1* و (*Z. marina*) *ZosterNew* و *Zoster 1* (*Zea mays*) *ZmNHX1~6* (*Triticum aestivum*)



الف) تیروزین موقعیت ۲۸۹ و ۲۸۸ به ترتیب در پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) و TaNHX1 (سمت چپ) در توالی حفاظت شده VMSHYTW_HNYT که به احتمال ۶۶ درصد فسفریله می‌شود.

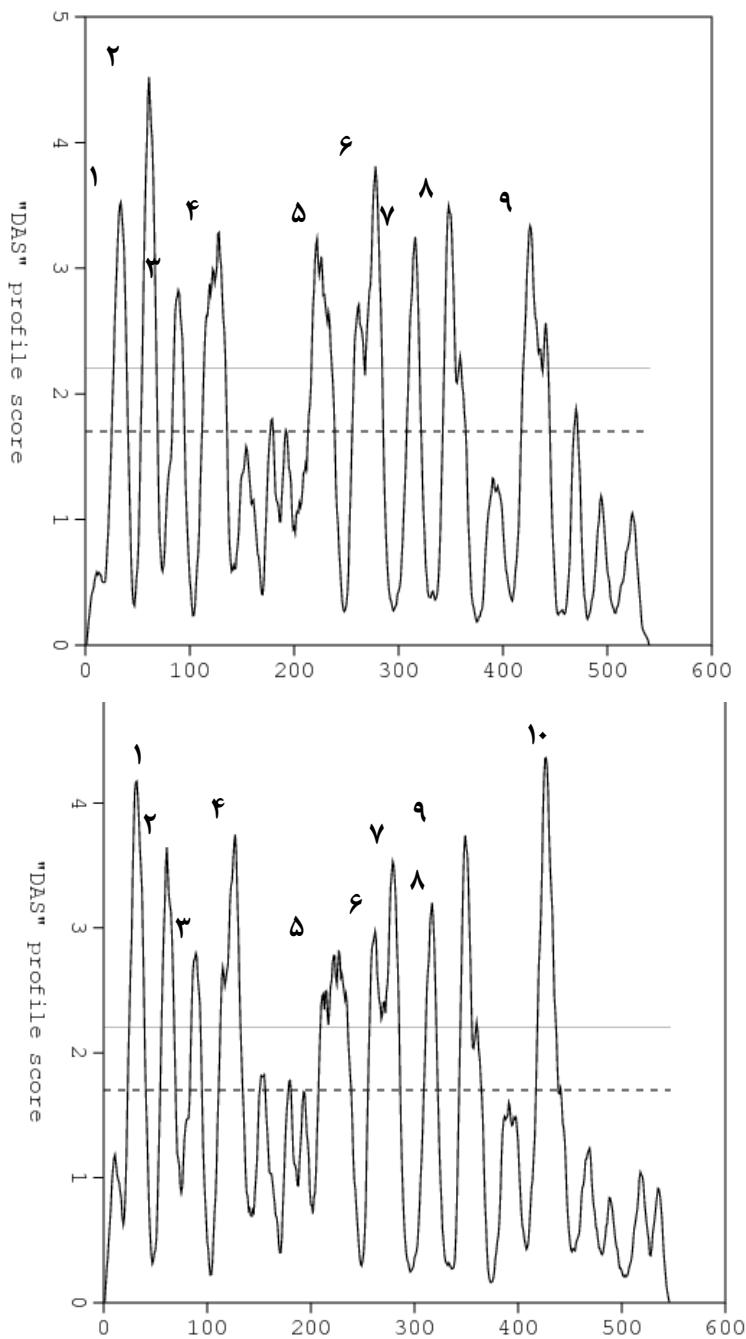


ب) دو ترئونین در پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) در موقعیت‌های ۳۰۰ و ۳۰۱ در موتیف VTESSRITTKHTFA و VTESSRVTTKHTFA که به احتمال بیش از ۹۰ درصد فسفریله می‌شوند.



ج) سرین در موقعیت‌های ۱۱ از انتهای کربوکسیلی در پروتئین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) در موتیف FGGRGFVPFVPGSP و در TaNHX1 (سمت چپ) در موقعیت ۲۲ از انتهای کربوکسیلی در موتیف FGGRGFVPFIPGGSP که به احتمال بیش از ۹۵ درصد فسفریله می‌شوند.

شکل ۶- آسید آمینه‌های تیروزین (الف)، ترئونین (ب) و سرین (ج) در توالی‌های حفاظت شده که به احتمال زیاد فسفریله شده و با سایر پروتئین‌های تنظیمی برهمکنش دارند.



شکل ۷- نمودار هیدروپتی آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکوئولی رمز شده توسط دومین ایزوفرم جدا شده از گیاه *Z. marina* (بالا) و *TaNHX* (پایین) نواحی که احتمالا درون غشاء کشیده می‌شوند با شماره نشان داده شده‌اند.

منابع

1. Alemzadeh A, Fujie M, Usami S and Yamada T (2005) Isolation of high-quality RNA from high-phenolic tissue of eelgrass (*Zostera marina* L.) by keeping temperature low. *Plant Mol Bio Rep*, 23: 421a-4211.
2. Bentem SF and Hirt H (2009) Protein tyrosine phosphorylation in plants: more abundant than expected? *Trends Plant Sci*, 14: 71-76.
3. Blumwald E, Aharon GS and Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 140-151.
4. Cruwel MLH, Rauw VL, Loewen M and Abrams SR (2001) Effects of sodium chloride on plant cells; a ^{31}P and ^{23}Na NMR system to study salt tolerance. *Plant Scie*, 160: 785-794.
5. Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH and Schubert (2004) Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem*, 279: 21749-21758.
6. Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P and Palmgren MG (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H^+ -ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr^{946} -Thr-Val and requires phosphorylation of Thr^{947} . *J Biol Chem*, 274: 36774-36780.
7. Fukuda A, Nakamura A and Tanaka Y (1999) Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 1446: 149-155.
8. Khan MA and Abdullah Z (2003) Salinity-sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oryza sativa*) under dense soil conditions. *Environ Exp Bot*, 49: 145-157.
9. Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, 157: 105-132.
10. Parida AK and Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safe*, 60: 324-349.
11. Plus M, Deslous-Paoli JM and Dagault F (2003) Seagrass (*Zostera marina* L.) bed recolonisation after anoxia-induced full mortality. *Aquat Bot*, 77: 121-134.
12. Rejili M, Vadel AM, Guetet A and Neffatti M (2007) Effect of NaCl on the growth and ionic balance K^+/H^+ of two populations of *Lotus corniculatus* (L.) (Papilionaceae). *S Afr J Bot*, 73: 623-631.
13. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 8014-8018.
14. Sattosanto JB, Saranga Y and Blumwald E (2007) Impact of AtNHX1, a vacular Na^+/H^+ antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biolog*, pp. 18.
15. Shi H and Zhu JK (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 50: 543-550.
16. Tester M and Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann Bot*, 91: 503-527.
17. Volkov V and Amtmann A (2006) The lungiella, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K^+/Na^+ homeostasis under salinity stress. *Plant J*, 48: 342-353.
18. Ye CJ and Zhao KF (2003) Osmotically active compounds and their localization in the marine halophyte eelgrass. *Biol. Plantarum*, 46: 137-140.
19. Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J*, 30: 529-539.
20. Zhang HX, Hodson JN, Williams JP and Blumwald E (2005) Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12832-12836.

