ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹
صفحه ۸۸-۷۹

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی یک ژن جدید رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی از گیاه علف مار ماهی

عباس عالم‌زاده[۱]*

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alemzadeh@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۸ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

یک ژن رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی از گیاه هالوفیت علف مار ماهی با نام علمی *Zostera marina* L. جدا گردید و با استفاده از برنامه‌های رایانه‌ای مورد بررسی و تجزیه قرار گرفت. جداسازی کامل این ژن با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس صورت گرفت. ژن مذکور حاوی ۱۱ اینترون است و حدود ۲/۷ کیلو جفت باز طول دارد که حاوی یک ناحیه رمز کننده ۱۶۱۷ جفت بازی است. یک پروتئین ۵۳۸ اسید آمینه‌ای توسط این ژن رمز می‌شود که احتمالا یک آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی است که در مکانیسم تحمل تنش شوری نقش دارد. با مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین رمز شونده توسط این ژن با سایر آنتی‌پورترهای گیاهی مشخص گردید که شباهت زیادی با آنتی‌پورترهای غلات دارد. در ناحیه بالا دست این ژن در موقعیت ۵۲ جفت باز بالا دست رمز شروع یک uORF شش اسیدآمینه‌ای وجود دارد که چنین ناحیه‌ای در سایر ژن‌های جدا شده از این گیاه نیز دیده شده است. با تجزیه و تحلیل رایانه‌ای توالی اسید آمینه‌ای پروتئین رمز شونده توسط ژن جدا شده مشخص گردید سه اسید آمینه ترئونین، تیروزین و سرین در موتیف‌های حفاظت شده در پروتئین مذکور و سایر پروتئین‌های همتای موجود در بانک‌های اطلاعاتی وجود دارند که با احتمالی بیش از ۹۰ درصد فسفریله می‌شوند و احتمالا نواحی فعال این پروتئین هستند.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌پورتر واکئولی،
جداسازی ژن،
پی‌سی‌آر معکوس،
بیوانفورماتیک

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

مقدمه

تنش شوری یکی از مشکلات عمده کشاورزی به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد. اثرات منفی ناشی از این تنش مانع رسیدن گیاهان به حداکثر پتانسیل عملکرد می‌گردد (۹). اثرات عمده ناشی از شوری در گیاهان به دلیل افزایش غلظت یون‌های سمی در گیاه و ایجاد عدم تعادل یونی همرا با تنش کم آبی در گیاه است (٤). سدیم یکی از یون‌هایی است که با افزایش غلظت آن در سیتوپلاسم گیاهان تحت تنش شوری موجب اختلال در فرآیندهای بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی گیاه می‌شود (۱۱). در حقیقت افزایش یون سدیم سبب اختلال در جذب و عمل یون پتاسیم و کاهش نسبت Na^+/K^+ می‌شود که این موضوع اکثر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸). بنابراین جهت تحمل تنش شوری ضروری است که گیاه بتواند غلظت یون سدیم را در سیتوپلاسم پایین نگه دارد.

در گیاهان، یون سدیم به واسطه فعالیت آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ از سیتوزول به بیرون رانده می‌شود. آنتی‌پورترهای واکئولی با فرستادن یون‌های سدیم به درون واکئول گیاه آن را از سیتوزول دور می‌کنند. تحت شرایط تنش شوری، بیان ژن رمز کننده آنتی‌پورترهای واکئولی افزایش می‌یابد که نشان از اهمیت این پروتئین در مکانیسم‌های تحمل تنش دارد (٦). با تحقیقات انجام شده در گیاهان مشخص گردیده است که آنتی‌پورترهای واکئولی توسط یک خانواده چند ژنی رمز می‌شوند برای مثال در ذرت و آرابیدوپسیس شش ایزوفرم برای این ژن وجود دارد (۱۵).

همانگونه که ذکر گردید گزارش‌های متعددی دال بر اهمیت آنتی‌پورترهای واکئولی در تحمل تنش شوری وجود دارد که در این میان ژن‌های رمز کننده این پروتئین در گیاهان هالوفیت جایگاه ویژه‌ای دارند (۹، ۱۳، ١٤). هالوفیت‌ها با پائین نگه داشتن غلظت یون‌های سمی از جمله سدیم در سیتوزول تحت شرایط تنش این امکان را برای خود فراهم می‌آورند که بتوانند تنش را به خوبی پشت سر بگذارند (۹). بنابراین ژن‌های رمز کننده آنتی‌پورترهای واکوئولی در گیاهان هالوفیت می‌توانند نامزدهای مناسبی برای اصلاح گیاهان زراعی مهم و حساس نسبت به تنش شوری باشند. با استفاده از این ژن‌ها از طریق مهندسی ژنتیک می‌توان گیاهان زراعی متحمل نسبت به تنش شوری ایجاد نمود. علاوه بر این می‌توان با بررسی و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها و توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های رمز شونده توسط آنها و مقایسه آنها با گیاهان معمولی به درک بیشتری نسبت به توانائی‌های این آنتی‌پورترها در مکانیسم‌های تحمل دست یافت.

گیاه علف مار ماهی (seagrass) با نام علمی *Zostera marina* L. یک گیاه تک لپه‌ای دریایی است که می‌تواند در شوری ۵-۳ درصد آب دریا به خوبی رشد نماید و چرخه رشد خود را کامل کند (۱۲). تا کنون مطالعات زیادی بر روی این گیاه صورت گرفته است اما درک ما از مکانیسم‌های تحمل موجود در آن بسیار ناچیز است. بر اساس بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که این گیاه جد مشترک با برنج دارد و به همین دلیل می‌تواند به عنوان یک منبع ژنی مناسب جهت اصلاح برنج برای شرایط تنش شوری مورد استفاده قرار گیرد (۲). در همین راستا طی تحقیقاتی سعی شده است تا ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های مهم در مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری در این گیاه شناسایی و جداسازی گردد.

در این مقاله نحوه جداسازی یک ایزوفرم جدید رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی از گیاه علف مار ماهی و نتایج حاصل از مقایسه توالی آن با سایر توالی‌های موجود در بانکهای اطلاعاتی گزارش گردیده و توالی اسیدآمینه‌های پروتئین رمز شونده توسط آن و رابطه فیلوژنتیکی آن با سایر آنتی‌پورترها جدا شده از سایر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاهان از منطقه یاسااورا در کشور ژاپن جمع‌آوری شدند و بلافاصله با آب شستشو داده شدند، سپس برگ‌های آن‌ها جدا شده، در ازت مایع منجمد و در دمای ۲۰ °C- نگهداری شدند.

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

DNA ژنومی به روش سقایی معروف و همکاران (۱۹۸٤) از برگ‌ها جدا گردید و با استفاده از فنل خالص شد. بر اساس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

نواحی حفاظت شده توالی آنتی‌پورترهای واکئولی در سایر گیاهان که در بانک ژن موجود می‌باشد و با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI یک جفت آغازگر دجنره به نام DNHX1F و DNHX1R طراحی گردید (جدول ۱). عمل تکثیر با استفاده از این آغازگرها (در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰μM از هر یک از dNTPها، ۰/۲ μM از هر کدام از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم دی‌ان‌آ پلیمراز و ۱ μM از DNA ژنومی) تحت چرخه حرارتی ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. ۳۵ بار این چرخه تکرار گردید و بعد از آن قطعات برای تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C قرار داده شدند.

قطعه تکثیر شده در مرحله قبل توالی‌یابی گردید و مشخص گردید که این قطعه مربوط به یک آنتی‌پورتر واکئولی می‌باشد. با استفاده از توالی این قطعه یک جفت آغازگر اختصاصی به نام IPZMDF1 و IPZMDR1 طراحی گردید (جدول ۱) و با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس نواحی ′۳ و ′۵ ژن تکثیر و توالی‌یابی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس

در ابتدا ۵ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده از برگ توسط آنزیم *Eco*RV هضم گردید و پس از تایید نتیجه هضم (شکل ۱)، محصول هضم توسط آنزیم لیگاز به هم دوخته شدند و یک میکرولیتر از آن به عنوان DNA الگو توسط آغازگرهای اختصاصی (در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰μM از هر یک از dNTPها، ۰/۲ μM از هر کدام از آغازگرها و ۰/۵ واحد آنزیم دی‌ان‌آ پلیمراز) تحت چرخه حرارتی ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۱۸۰ ثانیه تکثیر شد. ۳۵ بار این چرخه تکرار گردید و بعد از آن قطعات برای تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C قرار داده شدند. قطعات تکثیر شده توالی‌یابی گردید و برای بالا دست و پایین دست ناحیه رمزشونده ژن یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی گردید و با استفاده از آنها کل توالی ژن از درون ژنوم جداسازی گردید.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

نام آغازگر	توالی آغازگر
DNHX1F	5' – ATN TAY TTR CTN CCN CCN AT – 3'
DNHX1R	5' – RTC CAT NCC NAC RTA NAG RAA – 3'
IPZMDF1	5' – GTA AAT AGA AGC TGA CCC AGC – 3'
IPZMDR1	5' – ATA CTT TCG CAG CAC TAT CG – 3'
ZMATXF1	5' – CCA ACT GTT TCT GGG TAG ACT ACC G – 3'
ZMATXR1	5' –CAC TAG TGA TTC GCG GAT CCG – 3'

شکل۱- هضم DNA ژنومی برگ علف مار ماهی توسط آنزیم *Eco*RV.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

استخراج RNA و تهیه cDNA

با استفاده از روش لیتیم کلرید تغییر یافته (۱) RNA از برگ‌های گیاه مذکور جداسازی و با استفاده از فنل خالص گردید. با استفاده از کیت ReverTra Ace، از روی RNA استخراج شده cDNAs تهیه کردید. با استفاده آغازگرهای اختصاصی که برای ناحیه بالا دست و پایین دست ژن طراحی شده بود ناحیه رمز شونده ژن از cDNAs جداسازی و توالی‌یابی گردید. ناحیه رمز کننده ژن به درون ناقل مناسب الحاق و سپس به درون باکتری *Escherichia coli* سویه JM109 منتقل گردید.

نرم‌افزارهای رایانه‌ای مورد استفاده

با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI)، DNA Data Bank of Japan (DDBJ) و ExPASy و نرم‌افزارهای موجود در آنها، ClustalW، توالی شناسایی شده با سایر توالی‌ها مقایسه گردید و نواحی مختلف آن مورد تجزیه و تحلیل رایانه‌ای قرار گرفت.

نتایج و بحث

با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس ناحیه حفاظت شده توالی ژن‌های رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و DNA ژنومی گیاه علف مار ماهی طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک قطعه ۱۳۲۰ جفت بازی تکثیر گردید (شکل۲). با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی قطعه مذکور طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس یک قطعه حدود ٤٥٠٠ جفت بازی تکثیر گردید (شکل ۳). با توالی‌یابی این قطعه مشخص گردید که توالی آن مربوط به ژن مورد نظر می‌باشد. با مقایسه توالی قطعه تکثیر شده با سایر ژن‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی، رمز شروع و پایان آن مشخص گردید. با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه بالادست رمز شروع و پایین‌دست رمز پایان کل ژن از درون ژنوم جداسازی و توالی‌یابی گردید. با استفاده از همین آغازگرها ناحیه رمز شونده ژن از درون cDNAs جداسازی و توالی‌یابی گردید و مشخص شد که طول کامل ژن ٢٦٦٣ جفت باز است و حاوی یک ناحیه رمز شونده (coding sequence, CDS) ١٦١٧ جفت بازی می‌باشد که یک پروتئین ٥٣٨ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند (شکل ٤). ناحیه رمز شونده ژن به درون ناقل T-Easy الحاق و به درون باکتری کلی باسیل سویهJM109 منتقل گردید. با هضم آنزیمی، همسانه‌های مثبت حاوی DNA نوترکیب مشخص و انتخاب گردیدند. این همسانه‌ها حاوی ناحیه رمز شونده ژن بودند (شکل ٥).

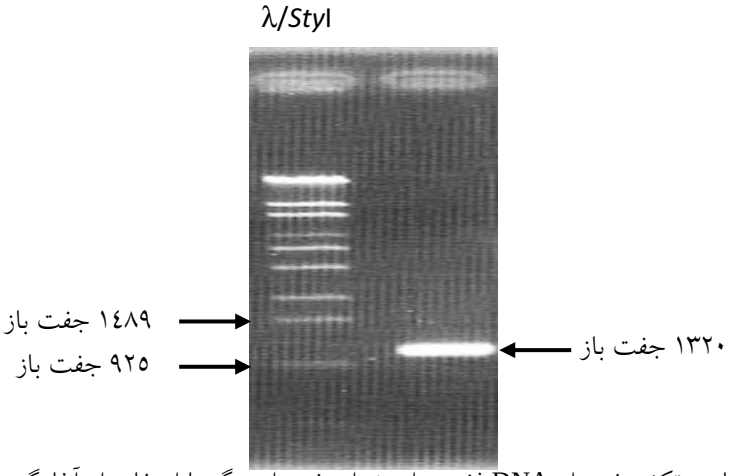
با مقایسه توالی ناحیه رمز کننده با توالی کامل ژن مشخص گردید که این ژن حاوی ١٢ اگزون و ١١ اینترون می‌باشد (شکل ٤). علاوه بر این، ٨٢ جفت باز بالا دست متیونین شروع کننده نیز توالی یابی گردید که در موقعیت ٥٢ جفت باز بالا دست رمز شروع حاوی یک upstream open reading frame (uORF) شش اسید آمینه‌ای (MPTVSG) می‌باشد (شکل ٤). نواحی uORF دیگری نیز در ناحیه بالا دست سایر ژن‌های این گیاه مشاهده شده است (٢، ٧). طی تحقیقات انجام شده پیشنهاد شده است که به احتمال زیاد این نواحی در تنظیم بیان ژن پائین دست خود نقش دارند (٣).

با توجه به اینکه فسفریله شدن سه اسیدآمینه ترئونین (T)، تیروزین (Y) و سرین (S) در پروتئین‌ها نقش مهمی در فعالیت پروتئین‌ها و برهمکنش آنها با پروتئین‌های تنظیمی ٣-٣-١٤ دارند (٥)، احتمال فسفریله شدن این سه اسیدآمینه در پروتئین رمز شونده توسط ژن مزبور و سایر پروتئین‌های همتای آن در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه NetPhos مشخص گردید. در توالی تمامی آنتی‌پورترهای واکئولی سه ناحیه بسیار حفاظت شده حاوی حداقل یکی از سه اسید آمینه مذکور که با احتمال بیش از ٩٠٪ فسفریله می‌شدند، مشاهده گردید (شکل ٦). یک اسید آمینه تیروزین در موقعیت ٢٨٦ تا ٢٩٢ از ابتدای اکثر آنتی‌پورترهای واکئولی گیاهی قرار دارد که با احتمال بیش از ٦٥ درصد فسفریله می‌گردد (شکل ٦ الف). دو اسید آمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ٢٩٨ تا ٣٠٢ از ابتدای اکثر آنتی‌پورترهای واکئولی گیاهی قرار دارند که با احتمال نزدیک ٩٥ درصد فسفریله می‌گردند (شکل ٦ ب). یک اسید آمینه سرین در موقعیت ١٣ تا ٢١ اسیدآمینه از انتهای اکثر آنتی‌پورترهای واکئولی گیاهی قرار

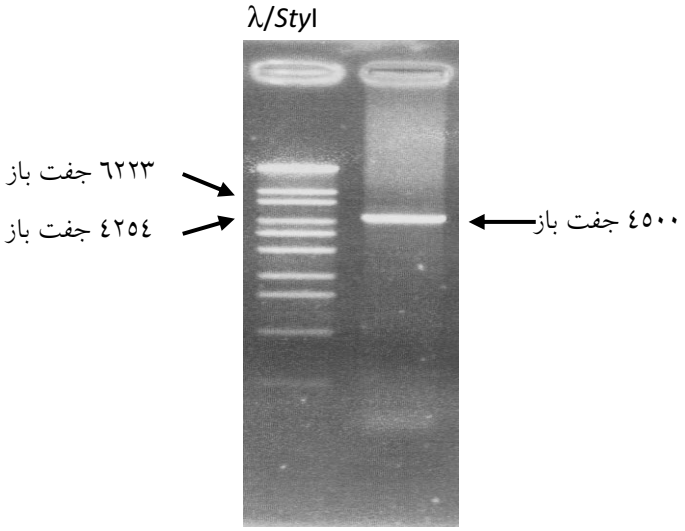
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

دارد که با احتمال حدود ۹۵ درصد فسفریله می‌گردد (شکل ٦ ج). به احتمال زیاد اسیدآمینه‌های فسفریله شده مذکور نقش بسزایی در برهمکنش این پروتئین با سایر پروتئین‌ها و متعاقب آن کنترل فعالیت پروتئین مورد نظر دارد. با استفاده از سایت kyte-doolittle entry form (http://gcat.davidson.edu/rakarnik/ kyte-doolittle.htm) مشخص گردید بر اساس شاخص کیت و دولیت تعداد دومین‌های درون غشایی پروتئین رمز شده توسط این ژن ۱۲ عدد می‌باشد (شکل ۷). با استفاده از برنامه ClustalW توالی اسیدآمینه‌ای آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان همردیف شدند و بر اساس آن با استفاده از برنامه phylodraw نمودار فیلوژنتیک رسم گردید (شکل ۸). بر اساس این نمودار مشخص گردید که اسیدآمینه رمز شده توسط ژن مذکور همراه با آنتی‌پورترهای گندم، برنج و جو در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل ۸). با توجه به تشابه آنتی‌پورتر رمز شونده توسط ژن مذکور از این گیاه با غلات و در نظر داشتن این موضوع که این گیاه یک گیاه هالوفیت است، می‌توان انتظار داشت که در آینده با انتقال ژن رمز کننده این پروتئین به غلات مهم به ویژه برنج این ژن به خوبی در این گیاهان بیان شده و سبب افزایش تحمل در آنها گردد و از این طریق قدم‌های مهمی در راه اصلاح گیاهان متحمل به شوری برداشته شود.



شکل۲. یک قطعه ۱۳۲۰ جفت بازی تکثیر شده از DNA ژنومی استخراج شده از برگ با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی سایر آنتی‌پورترهای گیاهی.

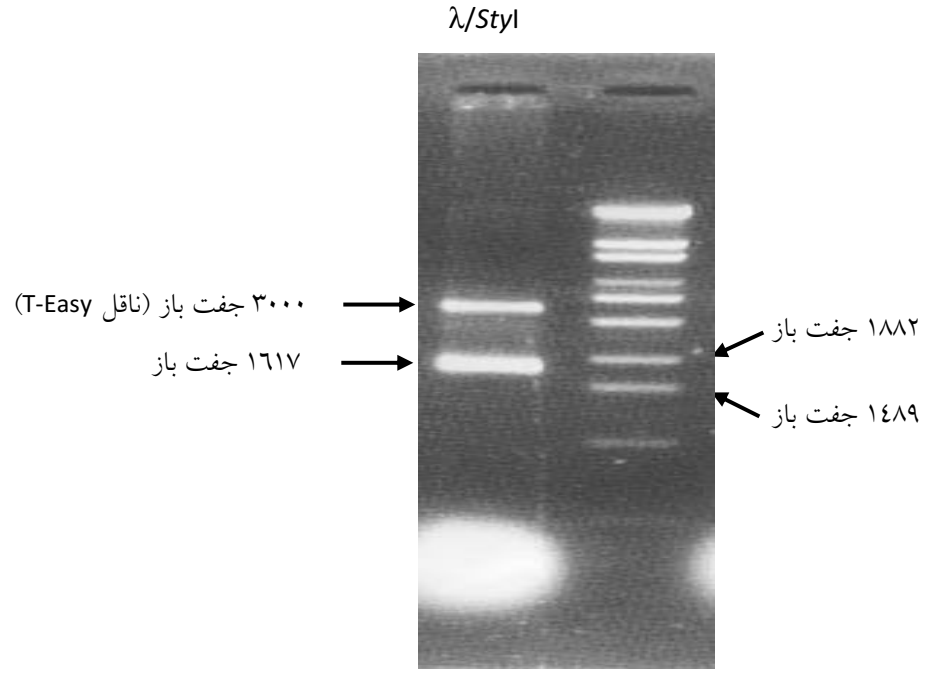


شکل۳- یک قطعه ٤٥۰۰ جفت بازی تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

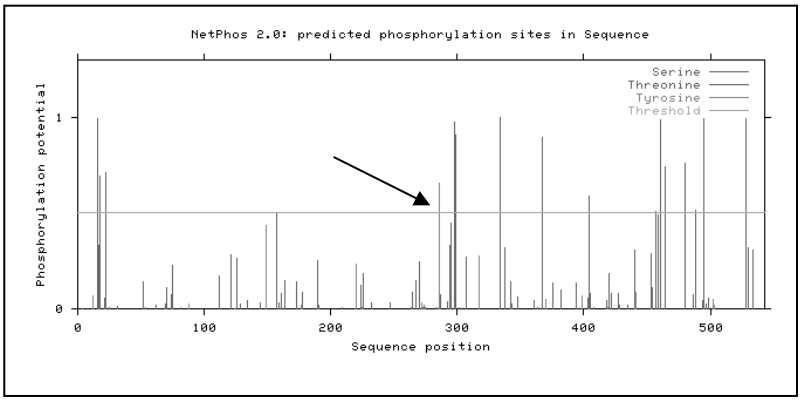
*AAGCCCACGATGCCAACTGTTTCTGGGTAGACTACCGTTTACATCCTAAATAATAAGGAAAAGGGATTAAARGAAAAGAAAA***ATGGGGATAAGTTTAGCAGCCGAG**
ATAGCCAAGTATGGAGTTTTGTCAACGTCCGATCATACTTCGGTCGCTTCGATCTGCTTGTTCGCCACGCTTCTCTGCGCGTGCATCGTCATCGGACATTTACTCG
AGGAGAACCGATGGGTGAACGAATCCATCACGGCCCTTCTCATTGTAAAAACAAACATCCCTAAGAATGATTTCAGTCAATTTTCCTCTCACATTTTTAATTTTTA
CCTGTCATTTTCATATATGATTGATTCCAG**GGACTTTTAACTGGTTTTATAATTCTGCTAACAACACAATGGAAGAGTTCACACATTTTGGTGTTCAGCGAGGATC**
TTTTCTTCATATATTTACTTCCTCCTATTATATTTAATGCTGGGTCAGCTTCTATTTACATTTTTTTTTCCTATTCAGGAAGAAAGAAAGAAAGAATCTGCTGCTT
GCTTACTTTTCTTCTTCTTCTCAG**GTTTCAAGTGAAAAAGAAACAATTTTTCCGAAATTTTATGACGATTATGCTATTCGGTGCAGTCGGCACATTGATATCCTTT**
TCTATTATTTCACTTGGTGCTATTACTTTGCTTGGTAAAATAAATATAGGGTTGACAGACATTGGGGATTATCTTGGTAAACTCAATTCCATCTCCATTGATCAGC
ATTGTAAAATTTAATCTCTATTTTTTCTGCTTGCTAATCATTAATCCTTTATTACCTTCTTTCATTGTTATAATTTGAAG**CCCTTGGAGCTATATTTTCAGCTACG**
GATTCTGTATGCACTTTGCAGGTTTGATTCATCAAATTCCTTGGAATATATTAAAGACAGACATGACTCATCACACCTTAATGACTAATGAAAGTAAATAATAG**GT**
TCTTAATCAAGACGAGACACCGTTACTCTACAGTTTAGTGTTTGGAGAAGGTGTCGTCAATGACGCGACATCGGTTGTGTTGTTTAATGCAATCCAACACTTTGAT
CTTGTCAACATTGATTTCACAATTATATTGCATTTTGCTGCTAACTTCTTATACTTATTCTTCACAAGCACGGTTCTTGGAGTTTGGAGTGAGATTCTCCATTCCC
TGATTCATAATTATTTGAATAAATCACAGATTGGGTTGTCTGCAATTATTATCTTATTCCAGACTGGACTTCTAAGT**GCCTTTGTAATCAAAAACTTATATTTCGG**
AAGGTTGCTGCTAAAACTTTTATTTTTTTCTCTTGATTGGTGATTTTGGAGTTTTCAACTTCATTTCTTCCAAATCTGTTTTGACATTCTACTCATCGTCAAGTT
TCGTTAATGATGCTCATGGCTTACCTCTCATACCTGCTAGCAGAGGTCAAATTAATTCTTCACAAACTTGAGATTAAATCAATAAATGAATCCATCAATTTAATCA
TTTATCTTATCTTATCTTATCTTATTGCAGCTGTTCTATCTGAGTGGTATATTGACAG**TGTTCTTCTGTGGGATAGTAATGTCGCATTACACATGGCATAATGTGA**
CGGAGAGTTCCCGAATAACAACCAAGTATTAATCAATCTTAATTAATCACACATTCCTCTGTAATCAATCCATCCATTCACTAATCTGGTCATATCAG**GCATACTT**
TCGCAGCACTATCGTTTATTGCCGAAATCTTCATCTTTCTCTATGTTGGAATGGATGCGTTGGATATCGAAAAGTGGAGATTTATCCGCGATAGGTATGGATTTAT
CAGCCAATGGCAATCTTTTTTATCCATTCTATTGAATTTCAAAAACTTAATTAACCAAACCAATATTATTATTTTTACCTAATTTATTGCAG**TCCTGGAAAATCAG**
TTGCCATAAGTTCTATCATACTTGGAACTGTTATGGTTGGGAGGGCAGCATTTGTGTTCCCGTTGTCATTTCTATCAAATTTATCAAAAAAATATGATCACGAGAA
GATTAGCTTCAATCAGCAAGTGTGTTTTTCTTCTTTGGGTATTTAGTGAATGTCAATTGATTGAATTACTTACTGTTAATCTCCCCACAG**ATCACCATATGGTGGG**
CTGGTCTTATGAGAGGTGCAGTTTCAATGGCACTTGCTTACAATCAGGTTAGTATTTTACAACACATGATCAAACATTTTCCCTAATATTTTGATATGTAATTGGA
AACAGTCATGTTGTTGTTGCAG**TTTACCACTTCTGGTCACACAGATATACATGAAAATGCGGTTATGATCACAAGCACCATAACGGTTGTGCTCTTCAGCACTGTG**
GTAAATATTTGTCTTGTCAACTGAATTGTTATGTTTATCGGATTGATTGAGAATGAACGAACGAACGGATGAATTGACGACAG**GTTTTTGGATTATTAACAAAACC**
TCTGATCAGTTATCTTGTACCACCTCAACAAGGGTTGAAGCATATGAGTAGTCTGTGTTCGGACTCAGTCAGTCCCAAGTCTTTTCTGGCGGCACTTCTAGGAAAT
AATGGGCATGAAGGTGAAGAAACCCACGGTGTTCCTCAACCGACAAGTTTGAGGATGCTTGTTACTTCTCCCACTCGTACTGTGCATTATTATTGGCGTAAGTTCG
ACGATGCAATCATGCGGCCAATGTTTGGTGGGAGAGGTTTTGTTCCGTTTGTTCCTGGTTCTCCCACAGAGGAGCCAAGTGTGCATCCATTTTAG

شکل٤. توالی ژن رمز کننده یک آنتی‌پورتر واکئولی از گیاه علف مار ماهی. نواحی رمز کننده زیرشان خط کشیده شده است. ناحیه بالا دست ژن دو خط زیرشان کشیده شده است. ناحیه uORF به رنگ خاکستری نشان داده شده است.

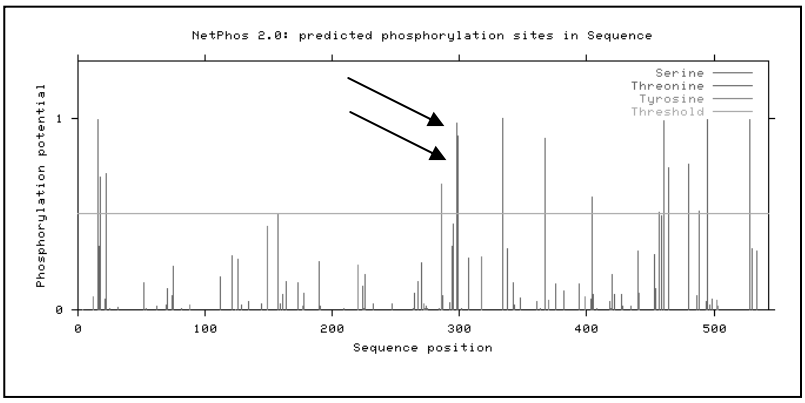


شکل۵- ناحیه رمز شونده ژن به طول ۱۶۱۷ جفت باز در ناقل T-Easy الحاق یافته و به درون باکتری کلی باسیل سویه JM109 منتقل شد. یک همسانه حاوی DNA نوترکیب (ژن + ناقل) انتخاب گردید.

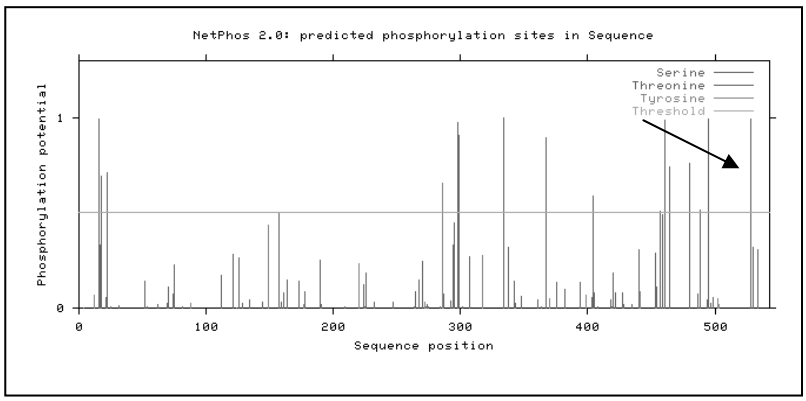
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]



الف) $V_{87}M_{100}S_{100}H_{100}\underline{\mathbf{Y}}_{\mathbf{87}}T_{100}W_{100}H_{100}N_{100}Y_{100}T_{100}$



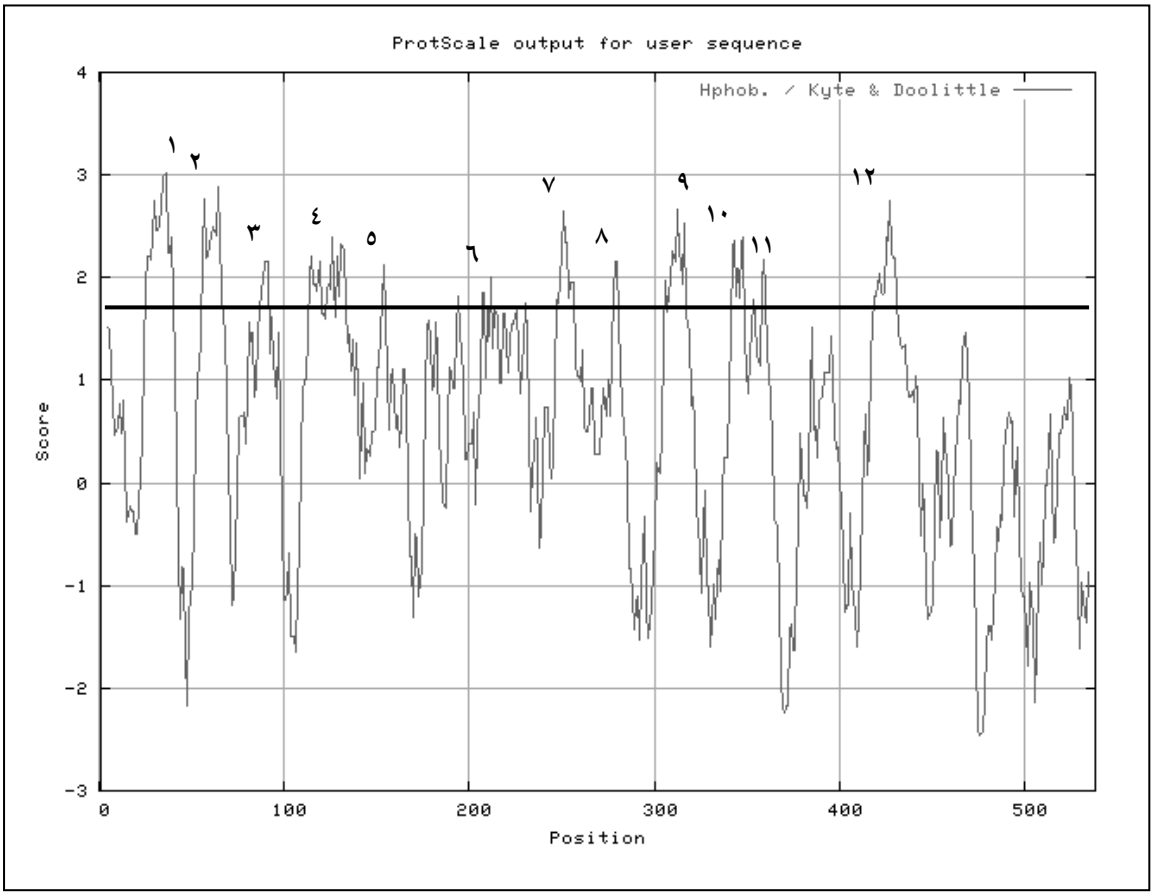
ب) $V_{100}T_{100}E_{100}S_{96}S_{100}R_{100}V_{65}\underline{\mathbf{T}}_{\mathbf{100}}\underline{\mathbf{T}}_{\mathbf{91}}K_{87}H_{96}A_{57}F_{96}A_{96}$



ج) $F_{83}G_{83}G_{83}R_{83}G_{100}F_{83}V_{78}P_{83}F_{91}V_{100}P_{96}G_{83}\underline{\mathbf{S}}_{\mathbf{100}}P_{100}$

شکل٦- توالی‌های حفاظت شده که به احتمال زیاد فسفریله شده و با سایر پروتئین‌های تنظیمی برهمکنش دارند. الف) یک اسید آمینه تیروزین در موقعیت ٢٨٦ تا ٢٩٢ از ابتدای پروتئین که با احتمال بیش از ٦٥ درصد فسفریله می‌گردد. ب) دو اسید آمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ٢٩٨ تا ٣٠٢ از ابتدای پروتئین که با احتمال نزدیک ٩٥ درصد فسفریله می‌گردند. ج) یک اسید آمینه سرین در موقعیت ١٣ تا ٢١ اسیدآمینه از انتهای پروتئین که با احتمال حدود ٩٥ درصد فسفریله می‌گردد.

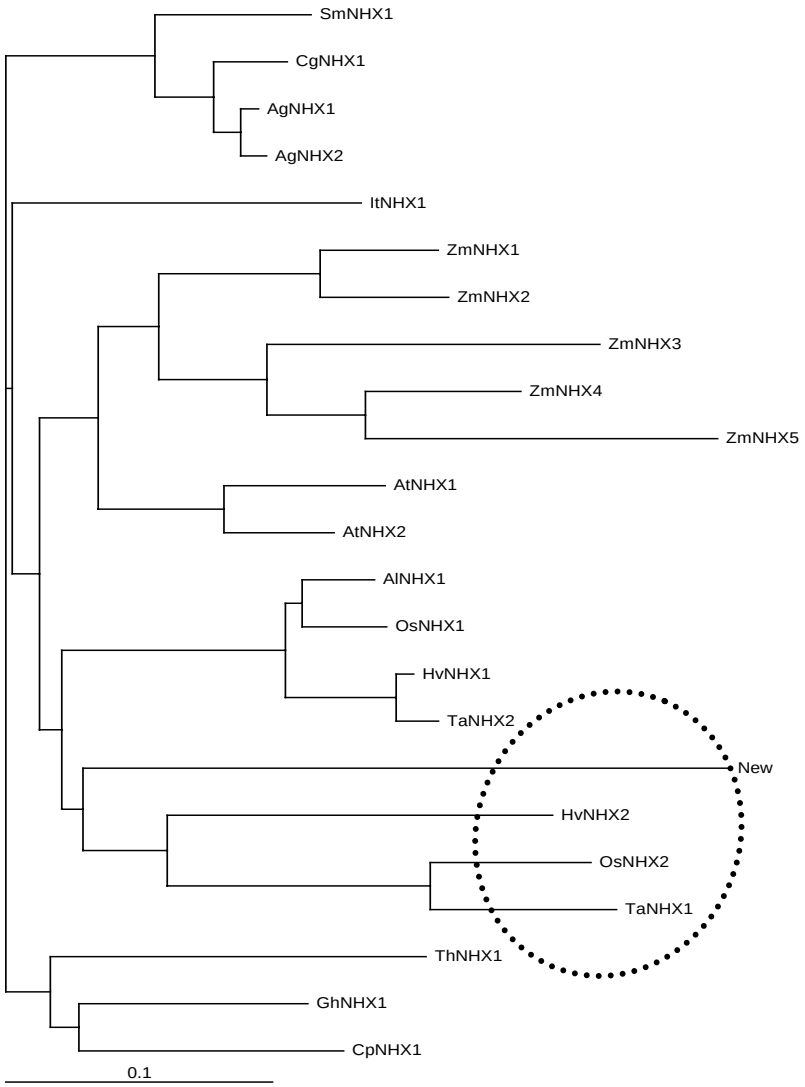
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]



شکل۷- نمودار هیدروپتی پروتئین آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی رمز شونده توسط ژن جدا شده از گیاه علف مار ماهی. ۱۲ ناحیه‌ای که احتمالا درون غشاء کشیده می‌شوند با شماره نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]



شکل۸. نمودار فیلوژنتیک حاصل از توالی آمینواسیدی ۲۸ آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی. AlNHX1 (*Aeluropus littoralis*)، 2 و AgNHX1 (*Atriplex gmelini*)، AtNHX1~6 (*Arabidopsis thaliana*)، CgNHX1 (*Chenopodium glaucum*)، CpNHX1 (*Citrus paradisi*)، GhNHX1 (*Gossypium hirustum*)، 2 و HvNHX1 (*Hordeum vulgar*)، ItNHX1 (*Ipomoea tricolor*)، 2 و OsNHX1 (*Oriza sativa*)، SlNHX1 (*Solanum lycopersicum*)، SmNHX1 (*Suaeda maritima*)، 2 و TaNHX1 (*Triticum aestivum*)، ThNHX1 (*Torenia hybrid*)، ZmNHX1~5 (*Zea mays*) و new (*Zostera marina*).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]

منابع

1- Alemzadeh A, Fujie M, Usami S and Yamda 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-421l.

2- Alemzadeh A, Fujie M, Usami S, Yoshizaki T, Oyama K, Kawabata T and Yamada T (2006) Cloning and characterization of a plasma membrane H^+-ATPase (*zha2*) from eelgrass (*Zostera marina* L.) In Mercer, C. (ed.) Proceedings of the 13th Australasian Plant Breeding Conference. AgResearch, Palmerston, New Zealand. pp. 589-565.

3- Arango M, Gevaudant F, Oufattole M andBoutry M (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. Planta, 216: 355-365.

4- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. Biochim Biophys Acta, 1465: 140-151.

5- 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.

6- 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.

7- Fukuhara T, Pak JY, Ohwaki Y, Tsujimura H and Nitta T (1996) Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H^+-ATPase in a seagrass. Plant Physiol, 110: 35-42.

8- Khan MA and Abdullah Z (2003) Salinity-sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oriza sativa*) under dense soil conditions. Environ Exp Bot, 49: 145-157.

9- Parida AK and Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotox Environ Safe, 60: 324-349.

10- 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.

11- Tester M and Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann Bot, 91: 503-527.

12- Ye, C.J., Zhao, K.F. (2003) Osmotically active compounds and their localization in the marine halophyte eelgrass. Biol. Plantarum. 46: 137-140.

13- 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.

14- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP and Blumwald V (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.

15- Zorb C, Nol A, Karl, S, Leib K, Yan F and Schubert S (2005) Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. J Plant Physiol. 162: 55-66.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.8.9]