ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحه ٦١ - ٥٥

# تولید شکل نوترکیب گلوتاردوکسین گیاه برنج در باکتری اشریشیاکلی

# Production of recombinant form of rice Glutaredoxin in *Escherichia coli*

احسان شیخ الاسلام اصفهانی[۱]، آذر شاه پیری[*۱]

۱- به‌ترتیب کارشناس ارشد، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

**Shaikholeslam Esfahani E[1], Shahpiri A[*1]**

1- Graduated MSc, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰۵/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

## چکیده

**گلوتاردوکسین‌ها (Grxها) پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین هستند که با داشتن یک گروه تیول-دی سولفید در جایگاه فعالشان در احیا برگشت‌پذیر پیوندهای دی سولفیدی نقش دارند. این پروتئین‌ها توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز توسط مولکول گلوتیون احیا می‌شوند. سپس این پروتئین خود در احیای باندهای دی سولفیدی پروتئین‌های دیگر دخالت دارد. ایزوفرم‌های مختلفی از Grx در گیاهان وجود دارد. در پژوهش حاضر توالی ژن کدکننده ایزوفرم OsGrx9 از گیاه برنج پلاسمید بیانی pET28a، همسانه‌سازی و سپس به سویه‌ی مناسبی از باکتری اشریشیا کلی به‌نام Rosetta (DE3) منتقل شد. با تحریک پروموتر T7 به‌وسیله‌ی IPTG، میزان مناسبی از پروتئین نوترکیب His-OsGrx9 در فاز محلول باکتری تولید شد و سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی شد. فعالیت احیایی این ایزوفرم نوترکیب تولید شده با استفاده از انسولین به‌عنوان سوبسترای الکترون گیرنده و حضور DTT یا GSH به‌عنوان عوامل احیاکننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که Grx9 در محیط این ویترو به‌خوبی فعال می‌باشد. به‌نظر می‌رسد فعالیت این پروتئین در حضور GSH کاملا وابسته به pH محیط می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی**
**اشریشیاکلی**
**برنج**
**بیان هترولوگ**
**گلوتاردوکسین**

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

## مقدمه

حفظ تعادل شرایط اکسیداسیون-احیا (ردوکس) در سلول برای انجام سوخت و سازهای مختلف سلولی و فعالیت مسیرهای انتقال پیام بسیار حیاتی است. در گیاهان مکانیسم‌های مختلف مولکولی در حفظ این تعادل نقش دارند. سیستم گلوتاردوکسین (GSH/Grx) به‌عنوان یکی از سیستم‌های وابسته به NADPH نقش مهمی در انتقال الکترون از NADPH به باندهای دی سولفیدی در بسیاری از پروتئین‌های سلولی دارد و بدین ترتیب با تنظیم تبادلات تیول-دی سولفید درحفظ تعادل ردوکس سلولی دخالت دارد. در این سیستم، احیای گلوتاردوکسین‌ها (Grx) توسط گلوتاتیون احیاشده (GSH) انجام می‌گیرد. مولکول GSH به‌وسیله‌ی آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) از گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) حاصل می‌شود. آنزیم GR که از فلاووپروتئین‌ها می‌باشد از NADPH به‌عنوان منبع اولیه‌ی الکترون برای احیای گلوتاتیون استفاده می‌کند (Holmgren 2000). این سیستم، اولین بار به‌عنوان یک مسیر جایگزین برای تشکیل دزوکسی‌ریبونوکلئیدها و بالطبع بیوسنتز مولکول DNA شناسایی شد (Holmgren 1976).

گلوتاردوکسین‌ها، اکسیدوردوکتازهایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین در محدوده‌ی ده تا پانزده کیلودالتون هستند که به‌طور عمده در دو شکل دی‌تیول (dtGrx) و منوتیول (mtGrx) به‌ترتیب با الگوی جایگاه فعال CxxC و CxxS در همه‌ی موجودات وجود دارند (Gelhaye et al. 2005). در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از Grx وجود دارد. به‌عنوان مثال در آرابیدوپسیس، ۳۱ و در برنج تا کنون ٤٨ ژن مختلف برای ایزوفرم‌های Grx شناسایی شده‌است (Garg et al. 2010).

نقش Grxها در تنظیم فعالیت کینازها، فسفاتازها، عوامل رونویسی، مسیرهای پیام‌رسانی، بیوسنتز، پیچش و تخریب مولکول‌های زیستی ضروری بدن (DNA، RNA و پروتئین‌ها)، متابولیسم و پاسخ به تنش‌ها که بیش از ۸۰ پروتئین هدف مختلف را شامل می‌شود، مشخص شده‌است (Rouhier et al. 2004). یکی از مهم‌ترین نقش‌های Grxها نقش آن‌ها در گلوتاتیون‌زدایی[1] پروتئین‌ها است (Holmgren 2000). با توجه به این که گروه تیول سیستئین‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها حساس به اکسیداسیون هستند، بنابراین تشکیل باندهای دی‌سولفیدی بین GSH و گروه تیول که تحت عنوان گلوتاتیونه کردن شناخته می‌شود، منجر به یک تغییر پس از ترجمه‌ای برگشت‌پذیر می‌شود که پروتئین را به حالت غیرفعال درمی‌آورد. این تغییر تنها توسط Grx می‌تواند مجدداً به حالت قبل بازگردد (Lemair 2004). گلوتاتیون در مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی از جمله پاسخ به عوامل بیماری‌زا، تنظیمات ردوکس و تغییر در غلظت $Ca^{2+}$ سیتوسلی و نیز پیام‌های سلولی مربوط به مقاومت اکتسابی سیستمی[2] نقش دارد (Meyer et al. 2005). علاوه بر پیام‌های درون‌سلولی، حضور Grxها در لوله‌های غربالی آوند آبکش، اشاره به نقش آن‌ها در پیام‌رسانی با مسیرهای بلند دارد (Garg et al., 2010). همچنین Grxها قادر به احیای طیف وسیعی از پروتئین‌ها از جمله پیرووات کیناز، فسفوفروکتوکیناز، ریبونوکلئوتید ردوکتاز، پروکسی‌ردوکسین‌های نوع دوم، گلوتاتیون-S-ترنسفراز، آنزیم GR و احیای دهیدروآسکوربات به آسکوربات هستند که نشان‌دهنده‌ی تنوع عملکرد این سیستم در سلول است (Lemaire et al. 2004) (Johansson et al. 2004) در این مقاله ژن کدکننده یکی از ایزوفرم‌های Grx از گیاه برنج (*Oryza sativa*) در باکتری *Escherichia coli* مورد همسانه‌سازی قرار گرفت و شکل نوترکیب این پروتئین به‌صورت شریک الحاقی با His.tag تولید و مورد خالص‌سازی قرار گرفت. تولید مقدار قابل توجه ار این پروتئین امکان بررسی مشخصات این پروتئین را برای ما فراهم ساخت.

## مواد و روش‌ها

توالی ژن کدکننده (NCBI accession number: AK065962) OsGrx9 از کتابخانه cDNA مرکز NIAS (http://www.dna.affrc.go.jp) که در پلاسمید pFLCI همسانه‌سازی شده بود تهیه شد. جهت تکثیر توالی ژن کدکننده، آغازگر اختصاصی رفت (Forward) با توالی 5′TAATAAGAATTCATGGCGCTCGCCAAGG3′ (زیر

[1] Deglutathionylation

[2] Systemic Acquired Resistance



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

جایگاه آنزیم برشی *Eco*RI خط کشیده شده‌است) و آغازگر اختصاصی برگشت (Reverse) با توالی 5′–TAATAAGAATTCATGGCGCTCGCCAAGG -3′ (زیر جایگاه آنزیم برشی *Hin*dIII خط کشیده شده‌است)، بر اساس ابتدا و انتهای توالی کدکننده ژن OsGrx9 طراحی شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱/۷۵ واحد آنزیم *Pfu* پلیمراز (فرمنتاز)، ۵۰ نانوگرم pFLCI–cDNA-OsGrx9 به‌عنوان الگو، پنج پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(۱۰X) و $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار انجام شد. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت کردن در دمای ۹٤°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ٦۲°C به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد و خالص‌سازی آن به‌وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (فرمنتاز) انجام شد. در مرحله بعد، محصول PCR خالص‌سازی شده از ژل، با آنزیم‌های *Hin*dIII (فرمنتاز) و *Eco*RI (فرمنتاز) مورد هضم قرار گرفت و سپس خالص‌سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. با هدف ایجاد جایگاه‌های مناسب جهت قرارگیری قطعه ژنی در حامل، پلاسمید pET28a به‌عنوان حامل بیانی با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Eco*RI برش داده شد و خالص‌سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. واکنش لیگاسیون بین پلاسمید خطی شده pET28a و قطعه ژن کدکننده OsGrx9 با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز) صورت گرفت. بعد از آن، محصول واکنش لیگاسیون با روش الکتروپوریشن به باکتری‌های مستعد DH5α انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت، واکنش Colony PCR از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) (Sambrook and Russell 2001) انجام شد. جهت بررسی صحت همسانه‌سازی قطعه ژن کدکننده OsGrx9 در حامل، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های تائید شده، با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت، جهت تائید صحت توالی نوکلئوتیدی استخراج پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-OsGrx9 توسط کیت استخراج پلاسمید (فرمنتاز) انجام گرفت و جهت توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شد.

پلاسمید نوترکیب pET28a-OsGrx و نیز پلاسمید pET28a فاقد قطعه ژنی موردنظر (شاهد) با روش الکتروپوریشن، به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفرم شدند. به‌دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET28a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE3) به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (Novagen 2005)، سلول‌های باکتری ترانسفرم شده در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) و بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که $OD_{600}$ به ۰/۷ رسید، IPTG[1] به‌عنوان ماده‌ی القاگر به غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط‌های کشت اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه‌برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری صورت گرفت (Mohammadi Nezhad et al. 2013). سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ g و در دمای ٤°C سانتریفوژ شدند. بعد از آن، محلول رویی ویال‌ها دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تریس–اسید کلریدریک ۱۰ میلی‌مولار ( pH 8) سوسپانسیون شد. به‌منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ g و دمای ٤°C صورت پذیرفت و فاز رویی آن جهت بررسی میزان بیان پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شد.

خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی انجام شد (Shahpiri et al. 2008). بدین منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستون‌های His-Trap HP (شرکت GE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافرA (ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم

[1] *Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside*



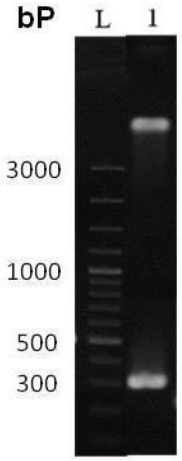
[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

۵۰۰ میلی‌مولار و ۳۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک، ۸ pH) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین‌های باند شده غیر اختصاصی میزان ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد شامل (ایمیدازول ٤۰۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار و ۳۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک، ۸ pH) و بافر A فیلتر شده سرد با نسبت ۱۰ درصد بافر B و ۹۰ درصد بافر A بر روی ستون بارگذاری شد و اجازه داده شد تا از ستون خارج شود. سپس جهت جداسازی پروتئین هدف ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط بافرA وB با شیب غلظتی ۱۵ تا ۷۰ درصد بافر B و به‌ترتیب از کمترین غلظت به میزان یک میلی‌لیتر از هرکدام روی ستون بارگذاری شد. خروجی ستون در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری نگهداری شد. کیفیت خلوص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین نوترکیب خالص با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر و استفاده از قانون بیر- لمبرت تعیین شد. ضریب خاموش مولی برای پروتئین His-OsGrx9 ۸۵٤۲ $M^{-1}$ $cm^{-1}$ در نظر گرفته شد.

فعالیت OsGrx9 با استفاده از میزان کدوریت ایجاد شده در اثر رسوب انسولین به عنوان سوبسترا با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Renard et al., 2011). بدین منظور واکنشی حاوی ۱۰۰ میلی مولار فسفات پتاسیم 7 pH ، ۰/۷۵ میلی‌گرم انسولین، ۲ میلی مولار EDTA و ۵ میکرومولار OsGrx تهیه شد. واکنش با اضافه شدن ۰/۳۳ میلی‌مولار DTT و یا یک میلی‌مولار GSH به‌عنوان عوامل احیاکننده شروع شد. جذب ٦۵۰ نانومتر به مدت ٦۰ دقیقه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

## نتایج

پس از قرارگیری و همسانه‌سازی ژن کدکننده OsGrx9 در پلاسمید pET28a و ترانسفورم آن به باکتری DH5α، توسط واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ژنی ۳۳۹ جفت‌بازی در کلنی‌های رشد یافته نشان داده شد. سپس کلنی های واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنزیمی به‌وسیله *Eco*RI و *Hind*III قرار گرفتند. جدا شدن قطعه به‌طول ۳۳۹ جفت‌باز از پلاسمید نوترکیبpET28a-OsGrx9 موفقیت همسانه‌سازی ژن کدکننده OsGrx9 در وکتور pET28a را تایید کرد (شکل۱). همچنین از طریق توالی‌یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده ازآغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد.



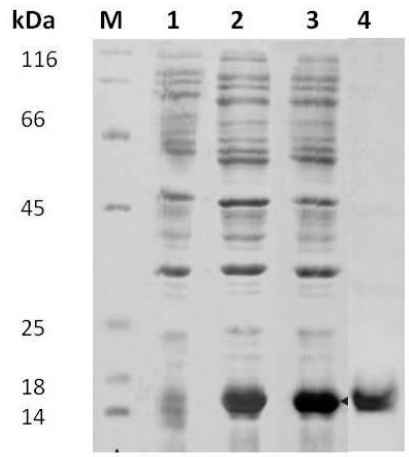

شکل ۱- الکتروفورز واکنش هضم دو طرفه آنزیمی pET28a-Grx با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI و جداسازی قطعه Grx9 به‌طول ۳۳۹ جفت‌باز که تاییدکننده همسانه‌سازی ژن در حامل pET28a می‌باشد. ستون ۱: DNA Ladder و ستون ۲: محصول هضم آنزیمی

پلاسمیدهای pET28a–OsGrx9 و pET28a به میزبان بیانی *E. coli* سویه‌ی Rosetta (DE3)، جهت تولید پروتئین نوترکیب انتقال داده شدند. توالی کدکننده این ایزوفرم در ناقل بیانی pET28a در الحاق با توالی کدکننده His-Tag (این ناحیه بر روی پلاسمید وجود دارد) باعث می‌شود پروتئین تولید شده به‌صورت His-OsGrx9 باشد. وزن مولکولی پروتئین His-OsGrx9 ۱۵/۵۹ کیلودالتون پیش‌بینی شد. وجود باند پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین‌های نوترکیب His-OsGrx9 را در مقایسه با سویه کنترل تایید کرد (شکل ۲). پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی و ستون‌های حاوی رزین نیکل $Ni^{+}$ خالص‌سازی شد. سپس به‌منظور ارزیابی کیفیت خالص‌سازی، پروتئین پس از خالص‌سازی بر روی SDS-PAGE بارگذاری شد. مشاهده شدن تک باند با وزن مولکولی مورد انتظار علاوه بر تایید بیان پروتئین His-OsGrx9 نشان‌دهنده کیفیت خالص‌سازی مناسب این



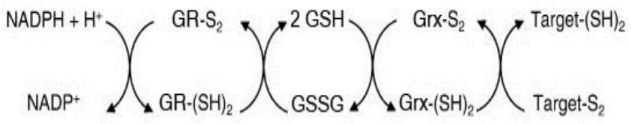
[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

پروتئین بود. میزان عملکرد پروتئین خالص His-OsGrx9 به ازای هر لیتر محیط کشت باکتری ۲۰ میلی‌گرم بود.

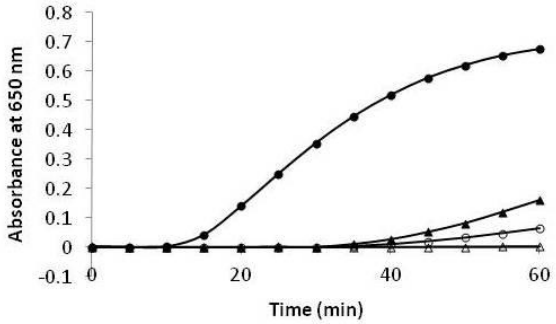



شکل ۲- بررسی ژل SDS-PAGE جهت تایید بیان پروتئین His-Grx9 با وزن مولکولی ۱۵/۵ کیلودالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3). M: مارکر پروتئینی؛ ستون ۱: محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در باکتری حاوی پلاسمید pET28a-Grx9 قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲ و ۳: محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در باکتری حاوی پلاسمید pET28a-Grx9 ۲ و ۳ ساعت پس از القا با IPTG؛ ستون ٤: پروتئین His-Grx9 پس از خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی

در سلول گیاهان، الکترون از NADPH به‌واسطه آنزیم GR به گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) انتقال می‌یابد. شکل اکسید شده GSSG به فرم احیا یعنی GSH تبدیل می‌شود. GSH خود باعث احیا شدن GRxها می‌شود و Grx احیا شده متعاقبا به‌عنوان یک عامل احیاکننده قادر به احیا کردن تعداد زیادی از پروتئین‌ها می‌باشد (شکل ۳). Holmgren et al. (1976) نشان دادند که در محیط این ویترو نیز در صورتی‌که Grx با DTT و یا در حضور GSH احیا شود می‌تواند باعث احیای باندهای دی سولفیدی در انسولین شود. انسولین پروتئینی دارای دو پلی پپتید α و β می‌باشد که به وسیله دو باند دی سولفیدی به هم اتصال دارند. احیای باندهای دی سولفیدی باعث جدا شدن دو رشته از هم و رسوب رشته β می‌شود. بنابراین در محیط این ویترو می‌توان با ایجاد واکنشی حاوی DTT ویا GSH به‌عنوان عامل اولیه احیا کننده، Grx و انسولین و اندازه‌گیری میزان رسوب سفید رنگ تولید شده از طریق اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ٦٥٠ نانومتر به بررسی فعالیت احیایی Grx پرداخت. در این پژوهش فعالیت احیایی OsGrx9 خالص به‌دست آمده در حضور احیا کننده DTT (واکنش ۱) و یا در حضور GSH (واکنش ۲) به‌عنوان عامل احیاکننده بررسی شد (شکل ٤). واکنش کنترل حاوی DTT و انسولین بدون حضور OsGrx، به‌عنوان واکنش کنترل برای واکنش ۱ در نظر گرفته شد. واکنش کنترل دیگری حاوی GSH و انسولین، بدون حضور OsGrx، به‌عنوان واکنش کنترل برای واکنش ۲ در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که OsGrx9 نوترکیب تولید شده فعال بود، به‌طوری که در مقایسه با نمونه‌ی کنترل، جذب در طول موج ٦٥٠ نانومتر در واکنش ۱ افزایش پیدا کرد. در واکنش ۱ با حضور DTT افزایش جذب بعد از ۱۰ دقیقه تاخیر شروع شد و سرعت افزایش ΔOD650/min ۰/۰۱۹٤ بود. در واکنش ۲ سرعت افزایش جذب با حضور یک میلی‌مولار GSH بسیار پایین بود و مقدار سرعت آن ΔOD650/min ۰/۰۰۷۲ بود. واکنش با حضور انسولین، OsGrx و GSH در pHهای ٦، ٦/٥، ۷، ۷/٥، ۸ و ۸/٥ صورت گرفت (شکل ٥).




شکل ۳- زنجیره‌ی انتقال الکترون در سیستم GSH/Grx

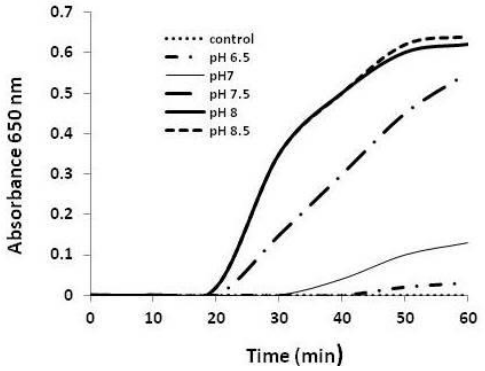



شکل٤- بررسی فعالیت احیایی Grx نوترکیب تولید شده (•) احیای انسولین در حضور Grx و DTT (▲) احیای اسولین در حضور Grx و GSH (o) واکنش کنترول حاوی انسولین و DTT (Δ) واکنش کنترول حاوی انسولین و GSH



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

نتیجه آزمایش نشان داد واکنش به شدت تحت تاثیر pH قرار می‌گیرد به‌طوری که سرعت احیای انسولین با افزایش pH از ٦/٥ به ٨ تغییر قابل توجهی داشت. افزایش pH از ٨ به ٨/٥ روی سرعت واکنش تاثیری نداشت.




شکل ٥- احیای انسولین در واکنش حاوی Grx و GSH در شرایط pH مختلف

## بحث

در سلول‌های زنده Grxها یکی از آنزیم‌های مهم در احیای باندهای دی سولفیدی پروتئین‌ها می‌باشند. این پرتئین‌های کوچک نقش مهمی در تنظیم فعالیت آنزیم‌های دیگر مانند پیروات کینازو فسفوفروکتوکیناز دارند (Axelsson al. 1983). همچنین گزارش‌هایی تاکنون در رابطه با نقش گلوتاردوکسین در احیای دهیدروآسکوربات ردوکتاز داده شده‌است. در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از گلوتاردوکسین وجود دارد (Garg et al. 2010). بر اساس جایگاه فعال Grxها به سه گروه CPYC، CGFS و انواع CC با توالی CCM(S/C) تقسیم می‌شوند. در این مطالعه ژن کدکننده ایزوفرم Grx9 مورد همسانه‌سازی قرار گرفت. ایزوفرم OsGrx9 یکی از ایزوفرم‌های Grx گیاه برنج است که در زیر گروه CPYC قرار می‌گیرد. توالی آمینواسیدی این ایزوفرم دارای شباهت بالایی به Grx در پستانداران و مخمر می‌باشد. همچنین دارای شباهت ٨٥ درصد با Grx در گندم (ACF40843)، جو (BAK01747) و ذرت (ACF86986) می‌باشد. باهمسانه‌سازی ژن OsGrx9 در پلاسمید بیانی pET28a و انتقال این حامل به سویه بیانی Rosetta (DE3) امکان تولید پروتئین OsGrx9 همراه با شریک الحاقی His.tag فراهم شد. این پروتئین به مقدار بالایی در فاز محلول باکتری تولید شد و لذا به‌نظر می‌رسد که سیستم بیانی *E. coli* سیستم مؤثر و مناسبی در تولید این پروتئین کوچک می‌باشد. خالص‌سازی این پروتئین با توجه به وجود ناحیه His.tag در انتهای آمینوی پروتئین امکان خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی را فراهم نمود. نقش OsGrx در احیای باندهای دی سولفیدی با استفاده از انسولین به‌عنوان سوبسترا و در حضور دو احیاکننده DTT و GSH مورد بررسی قرار گرفت. در pH 7، OsGrx در حضور DTT به‌طور مؤثری باعث احیا و رسوب انسولین شد در حالی‌که در این pH در حضور GSH فعالیت احیایی Grx مشاهده نشد. با این حال سرعت فعالیت احیایی Grx در حضور GSH با افزایش pH تا ٨ افزایش پیدا کرد. این موضوع نشان می‌دهد که فعالیت OsGrx در حضور احیاکننده طبیعی‌اش کاملا وابسته به pH محیط می‌باشد. این موضوع در مطالعات قبلی که با گلوتاردوکسین خالص شده از گیاه انجام شده بود نیز نشان داده شده‌است (Sha et al. 1997).

## منابع

Axelsson K, Manpervik B (1983). An essential role of cytosolic thioltransferase in protection of pyruvate kinase from rabbit liver against oxidative inactivation. FEBS letters 152: 114-118

Garg R, Jhanwar S, Tyagi AK, Jain M (2010). Genome-wide survey and expression analysis suggest diverse roles of glutaredoxin gene family members during development and response to various stimuli in rice. DNA Research. 17: 353-367.

Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot J (2005). The plant thioredoxin system. Cellular and Molecular Life Sciences 62: 24-35.

Holmgren A (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. Antioxidants and Redox Signaling 2: 811-820.

Holmgren A (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73: 2275-2279.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]

Johansson C, Lillig CH, Holmgren A (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. Journal of Biological Chemistry 279: 7537-7543.

Lemaire SD (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. Photosynthesis Research 79: 305-318

Meyer AJ, Hell R (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. Photosynthesis Research 86: 435-457

Renard M, Alkhalfioui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Montrichard F (2011). Identification and Characterization of Thioredoxin h Isoforms Differentially Expressed in Germinating Seeds of the Model Legume *Medicago truncatula.* Plant Physiology155: 1113-1126.

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. Cellular and Molecular Life Sciences 61: 1266-1277.

Sha S, Minakuchi K, Higaki N, Sato K, Ohtsuki K, Kurata A, Yoshikawa H, Kotaru M, Masumura T, Ichihara K, Tanaka K (1997). Purification and characterization of glutaredoxin (thioltransferase) from rice (*Oryza sativa L.*). Journal of Biochemistry 121: 842-848

Shahpiri A, Svensson B, Finnie C (2008). The NADPH-dependen thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase. Plant Physiology. 146: 789-799.

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.6.0 ]