

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی یک ژن جدید رمز کننده

آنتی پورتر Na^+/H^+ واکئولی از گیاه علف مار ماهی

عباس عالمزاده*

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 آنتی پورتر 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 احتمالاً یک آنتی پورتر Na^+/H^+ واکئولی است که در مکانیسم تحمل تنش شوری نقش دارد. با مقایسه توالی اسید آمینه‌ای پروتئین رمز شونده توسط این ژن با سایر آنتی پورترهای گیاهی مشخص گردید که شباهت زیادی با آنتی پورترهای غلات دارد. در ناحیه بالا دست این ژن در موقعیت ۵۲ جفت باز بالا دست رمز شروع یک uORF شش اسید آمینه‌ای 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 احتمالاً نواحی فعال این پروتئین هستند.

واژه‌های کلیدی

آنتی پورتر واکئولی،
جداسازی ژن،
پی‌سی‌آر معکوس،
بیوانفورماتیک

مقدمه

می توان گیاهان زراعی متحمل نسبت به تنش شوری ایجاد نمود. علاوه بر این می توان با بررسی و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی این ژن ها و توالی اسید آمینه ای پروتئین های رمز شونده توسط آنها و مقایسه آنها با گیاهان معمولی به درک بیشتری نسبت به توانائی های این آنتی پورترها در مکانیسم های تحمل دست یافت.

گیاه علف مار ماهی (seagrass) با نام علمی *Zostera marina* L. یک گیاه تک لپه ای دریایی است که می تواند در شوری ۳-۵ 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 مکانیسم های تحمل موجود در آن بسیار ناچیز است. بر اساس بررسی های انجام شده مشخص شده است که این گیاه جد مشترک با برنج دارد و به همین دلیل می تواند 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 ژن های رمز کننده پروتئین های مهم در مکانیسم های تحمل به تنش شوری در این گیاه شناسایی و جداسازی گردد.

در این مقاله نحوه جداسازی یک ایزوفرم جدید رمز کننده آنتی پورتر Na^+/H^+ واکتولی از گیاه علف مار ماهی و نتایج حاصل از مقایسه توالی آن با سایر توالی های موجود در بانکهای اطلاعاتی گزارش گردیده و توالی اسید آمینه های پروتئین رمز شونده توسط آن و رابطه فیلوژنتیکی آن با سایر آنتی پورترها جدا شده از سایر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

گیاهان از منطقه یاساورا در کشور ژاپن جمع آوری شدند و بلافاصله با آب شستشو داده شدند، سپس برگ های آنها جدا شده، در ازت مایع منجمد و در دمای $20^{\circ}C$ - نگهداری شدند.

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره ای پلیمرز

DNA ژنومی به روش سقایی معروف و همکاران (۱۹۸۴) از برگ ها جدا گردید و با استفاده از فنل خالص شد. بر اساس

تنش شوری یکی از مشکلات عمده کشاورزی به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک می باشد. اثرات منفی ناشی از این تنش مانع رسیدن گیاهان به حداکثر پتانسیل عملکرد می گردد (۹). اثرات عمده ناشی از شوری در گیاهان به دلیل افزایش غلظت یون های سمی در گیاه و ایجاد عدم تعادل یونی همرا با تنش کم آبی در گیاه است (۴). سدیم یکی از یون هایی است که با افزایش غلظت آن در سیتوپلاسم گیاهان تحت تنش شوری موجب اختلال در فرآیندهای بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی گیاه می شود (۱۱). در حقیقت افزایش یون سدیم سبب اختلال در جذب و عمل یون پتاسیم و کاهش نسبت Na^+/K^+ می شود که این موضوع اکثر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را تحت تاثیر قرار می دهد (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 آنتی پورترهای Na^+/H^+ از سیتوزول به بیرون رانده می شود. آنتی پورترهای واکتولی با فرستادن یون های سدیم به درون واکتول گیاه آن را از سیتوزول دور می کنند. تحت شرایط تنش شوری، بیان ژن رمز کننده آنتی پورترهای واکتولی افزایش می یابد که نشان از اهمیت این پروتئین در مکانیسم های تحمل تنش دارد (۶). با تحقیقات انجام شده در گیاهان مشخص گردیده است که آنتی پورترهای واکتولی توسط یک خانواده چند ژنی رمز می شوند برای مثال در ذرت و آرابیدوپسیس شش ایزوفرم برای این ژن وجود دارد (۱۵).

همانگونه که ذکر گردید گزارش های متعددی دال بر اهمیت آنتی پورترهای واکتولی در تحمل تنش شوری وجود دارد که در این میان ژن های رمز کننده این پروتئین در گیاهان هالوفیت جایگاه ویژه ای دارند (۹، ۱۳، ۱۴). هالوفیت ها با پائین نگه داشتن غلظت یون های سمی از جمله سدیم در سیتوزول تحت شرایط تنش این امکان را برای خود فراهم می آورند که بتوانند تنش را به خوبی پشت سر بگذارند (۹). بنابراین ژن های رمز کننده آنتی پورترهای واکتولی در گیاهان هالوفیت می توانند نامزدهای مناسبی برای اصلاح گیاهان زراعی مهم و حساس نسبت به تنش شوری باشند. با استفاده از این ژن ها از طریق مهندسی ژنتیک

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس

در ابتدا ۵ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده از برگ توسط آنزیم *EcoRV* 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، ۲۰۰ μM از هر یک از dNTPها، ۰/۲ μM از هر کدام از آغازگرها، ۰/۵ چرخه حرارتی $95^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $62^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^{\circ}C$ 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 $72^{\circ}C$ 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.

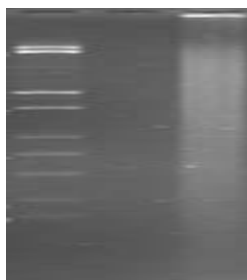
نواحی حفاظت شده توالی آنتی پورترهای واکتولی در سایر گیاهان که در بانک ژن موجود می‌باشد و با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI یک جفت آغازگر دجنره به نام DNHX1R و DNHX1F طراحی گردید (جدول ۱). عمل تکثیر با استفاده از این آغازگرها (در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰ μM 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 $95^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $62^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^{\circ}C$ 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 $72^{\circ}C$ قرار داده شدند.

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

λ/Styl DNA هضم شده

شکل ۱- هضم DNA ژنومی برگ علف مار ماهی توسط آنزیم *EcoRV*.

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 گردید. با استفاده از 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.

نرم افزارهای 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 آنتی پورتر Na^+/H^+ واکتولی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و DNA ژنومی گیاه علف مار ماهی طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک قطعه ۱۳۲۰ جفت بازی تکثیر گردید (شکل ۲). با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی قطعه مذکور طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس یک قطعه حدود ۴۵۰۰ 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 پایین دست 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 ۲۶۶۳ جفت باز است و حاوی

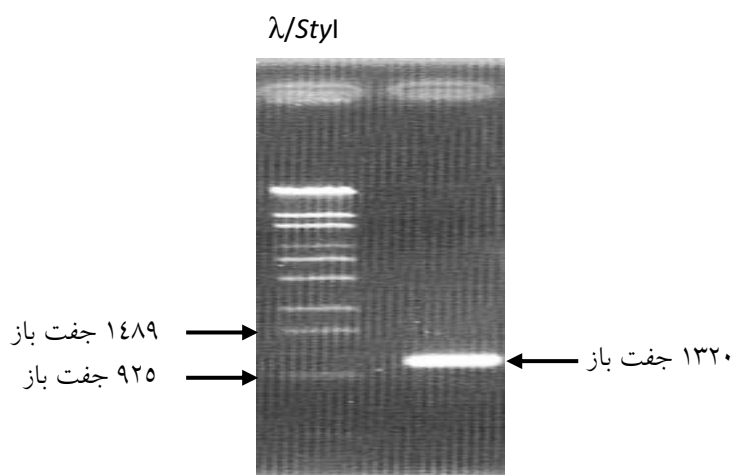
یک ناحیه رمز شونده (coding sequence, CDS) ۱۶۱۷ جفت بازی می‌باشد که یک پروتئین ۵۳۸ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند (شکل ۴). ناحیه رمز شونده ژن به درون ناقل T-Easy الحاق و به درون باکتری کلی باسیل سویه JM109 منتقل گردید. با هضم آنزیمی، همسانه‌های مثبت حاوی DNA نوترکیب مشخص و انتخاب گردیدند. این همسانه‌ها حاوی ناحیه رمز شونده ژن بودند (شکل ۵).

با مقایسه توالی ناحیه رمز کننده با توالی کامل ژن مشخص گردید که این ژن حاوی ۱۲ آگرون و ۱۱ اینترون می‌باشد (شکل ۴). علاوه بر این، ۸۲ جفت باز بالا دست متیونین شروع کننده نیز توالی یابی گردید که در موقعیت ۵۲ جفت باز بالا دست رمز شروع حاوی یک upstream open reading frame (uORF) شش اسید آمینه‌ای (MPTVSG) می‌باشد (شکل ۴). نواحی uORF دیگری نیز در ناحیه بالا دست سایر ژن‌های این گیاه مشاهده شده است (۲، ۷). طی تحقیقات انجام شده پیشنهاد شده است که به احتمال زیاد این نواحی در تنظیم بیان ژن پائین دست خود نقش دارند (۳).

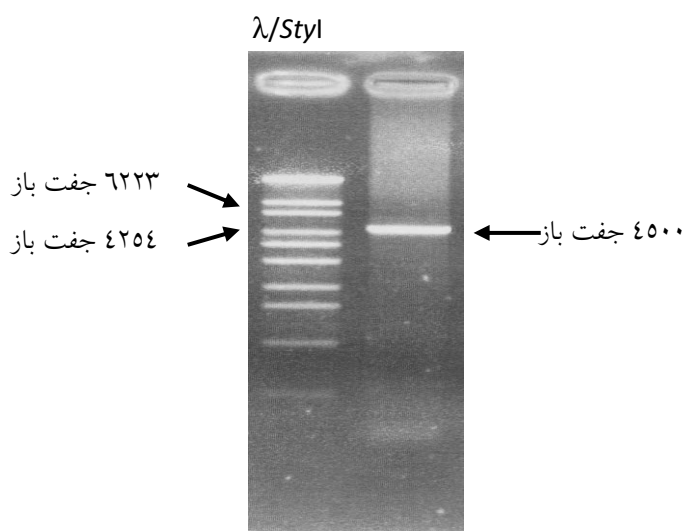
با توجه به اینکه فسفریله شدن سه اسید آمینه ترئونین (T)، تیروزین (Y) و سرین (S) در پروتئین‌ها نقش مهمی در فعالیت پروتئین‌ها و برهمکنش آنها با پروتئین‌های تنظیمی ۳-۳-۱۴ دارند (۵)، احتمال فسفریله شدن این سه اسید آمینه در پروتئین رمز شونده توسط ژن مزبور و سایر پروتئین‌های هم‌تای آن در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه NetPhos مشخص گردید. در توالی تمامی آنتی پورترهای واکتولی سه ناحیه بسیار حفاظت شده حاوی حداقل یکی از سه اسید آمینه مذکور که با احتمال بیش از ۹۰٪ فسفریله می‌شدند، مشاهده گردید (شکل ۶). یک اسید آمینه تیروزین در موقعیت ۲۸۶ تا ۲۹۲ از ابتدای اکثر آنتی پورترهای واکتولی گیاهی قرار دارد که با احتمال بیش از ۶۵ درصد فسفریله می‌گردد (شکل ۶ الف). دو اسید آمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ۲۹۸ تا ۳۰۲ از ابتدای اکثر آنتی پورترهای واکتولی گیاهی قرار دارند که با احتمال نزدیک ۹۵ درصد فسفریله می‌گردند (شکل ۶ ب). یک اسید آمینه سرین در موقعیت ۱۳ تا ۲۱ اسید آمینه از انتهای اکثر آنتی پورترهای واکتولی گیاهی قرار

نمودار فیلوژنتیک رسم گردید (شکل ۸). بر اساس این نمودار مشخص گردید که اسیدآمینو رمز شده توسط ژن مذکور همراه با آنتی پورترهای گندم، برنج و جو در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل ۸). با توجه به تشابه آنتی پورتر 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.

دارد که با احتمال حدود ۹۵ درصد فسفریله می‌گردد (شکل ۶ ج). به احتمال زیاد اسیدآمینوهای 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 اسیدآمینوهای آنتی پورترهای Na^+/H^+ واکنولی در گیاهان همردیف شدند و بر اساس آن با استفاده از برنامه phylo draw



شکل ۲. یک قطعه ۱۳۲۰ جفت بازی تکثیر شده از DNA ژنومی استخراج شده از برگ با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی سایر آنتی پورترهای گیاهی.

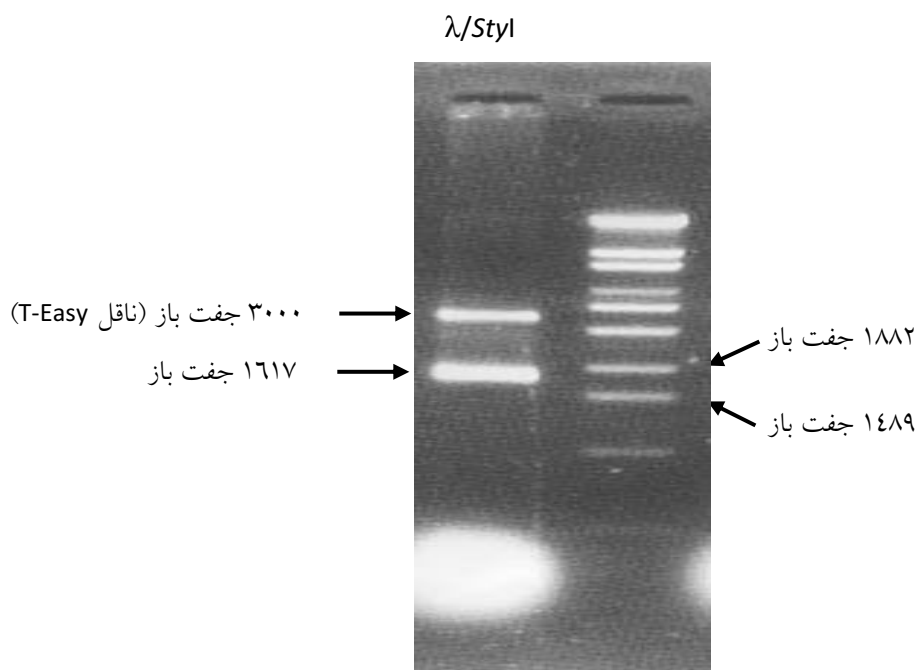


شکل ۳- یک قطعه ۴۵۰۰ جفت بازی تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس معکوس.

AAGCCACGATGCCAACTGTTTCTGGGTAGACTACCGTTTACATCCTAAATAATAAGGAAAAGGGATTAAARGAAAAGAAAATGGGGATAAGTTTAGCAGCCGAG
ATAGCCAAGTATGGAGTTTGTCAACGTCGATCATACTCGGTCGCTTCGATCTGCTTGTTCGCCACGCTTCTCTGCGCGTGCATCGTCATCGGACATTTACTCG
AGGAGAACCAGATGGGTGAACGAAATCCATCACGGCCCTTCTCATTGTAAAAACAACATCCCTAAGAATGATTTAGTCAATTTTCTCTCACATTTTAAATTTTA
CCTGTCATTTTCATATATGATTGATTCAGGGACTTTTAACTGGTTTTATAAATCTGCTAACACAACAATGGAAGAGTTTACACATTTTGGTGTTCAGCGAGGATC
TTTTCTTCATATATTTACTTCTCTTATTTAATGCTGGTTCAGCTTCTATTTTACATTTTTTTTCTATTAGGAAGAAAAGAAAAGAAATCTGCTGCTT
GCTTACTTTTCTTCTTCTCTCAGGTTTTCAAGTGAAAAAGAAACAATTTTCCGAAATTTTATGACGATTATGCTATTTCGGTGCAGTCGGCACATTGATATCCTTT
TCTATTATTTCACTTGGTGTATTACTTTGCTTGGTAAAAATAAATATAGGGTTGACAGACATTGGGGATTATCTTGTAAACTCAATTCATCTCCATTGATCAGC
ATTGTAATAATTAATCTCTATTTTCTGCTTGCATTAATTAATCCTTTATTACCTTCTTTCATTTGTTATAAATTTGAAGCCCTTGGAGCTATATTTTTCAGCTACG
GATTCCTGTATGCACTTTGACAGTTTGGATTTCATCAAAATTCCTTGGAAATATATAAGACAGACATGACTCATCACACCTTAATGACTAATGAAAGTAAATAATAGGT
TCTTAATCAAGACGAGACACCGTTACTCTACAGTTTAGTGTGGAGAAGGTGCTGCAATGACCGCAGCATCGGTTGTGTTGTTTAAATGCAATCCAACACTTTGAT
CTTGTCAACATTGATTTCAAAATATATTGCATTTTGTCTAACTTCTTATACTTATTCTTCAAGCACGGTCTTGGAGTTTGGAGTGTGAGATTCTCCATTCCC
TGATTCATAAATTAATTTGAATAAAATCACAGATTGGGTTGTCTGCAATTAATCTTATTCCAGACTGGACTCTAAGTGCCTTTGTAATCAAAAACCTATATTTTCGG
AAGTTGCTGCTAAACTTTTATTTTTTCTCTGATTGGTGATTTTGGAGTTTCAACTTCATTCTTCCAAATCTGTTTGGACATTCTACTCATCGTCAAGTT
TCGTTAATGATGCTCATGGCTTACCTCTCATACCTGCTAGCAGAGGTCAAATTAATCTTCAAACTTGAGATTAATCAATAAATGAATCCATCAATTTAATCA
TTTATCTTATCTTATCTTATCTTATGTCAGCTGTCTATCTGAGTGGTATATTGACAGTGTCTTCTGTTGGGATAGTAATGTCGCATTACACATGGCATAATGTGA
CGGAGAGTTCCCGAATAACAACCAAGTATTAATCAATCTTAATTAATCACACATTCCTCTGTAATCAATCCATCCATTCACTAATCTGGTCAATACAGGCATACTT
TCGCAGCACTATCGTTTATGCGGAAATCTTCACTTCTCTATGTTGGAATGGATGCGTTGGATATCGAAAAGTGGAGATTTATCCCGGATAGGTATGGATTTAT
CAGCCAATGGCAATCTTTTTTATCCATTCATTGAAATTTCAAAAACCTTAATTAACCAACCAATATTATTATTTTACCTAATTTTATGCACTCCTGGAAAATCAG
TTGCCATAAGTTCTATCACTTGGAACTGTTATGGTTGGGAGGCGAGCATTTGTGTTCCCGTTGTCATTCTATCAAATTTATCAAAAAATATGATCACGAGAA
GATTAGCTTCAATCAGCAAAGTGTGTTTTTCTTCTTGGGTAATTTAGTGAATGTCAATGATTGAATTAATCTACTGTTAATCTCCACAGATCACCATATGGTGGG
CTGGTCTTATGAGAGGTGCAGTTTCAATGGCACTGCTTACAATCAGGTTAGTATTTTACAACACATGATCAAAACATTTTCCCTAATATTTGATATGTAATGGA
AACAGTCAATGTTGTTGTTGAGTTTACCACCTTCTGGTCCACAGATATACATGAAAATGCGGTTATGATCAACAGCACCAACCGTTGTGCTCTTACGACTGTG
GTAATAATTTGCTTGTCAACTGAATTTGTTATGTTTATCGGATTGATTGAGAATGAACGAAACGAAACGGATGAATGACGACAGGTTTTTGGATTATTAACAAAACC
TCTGATCAGTTATCTTGTACCACCTCAACAAGGTTGAAGCATATGAGTAGTCTGTGTTCCGACTCAGTCAGTCCCAAGTCTTTTTCTGGCCGCACTTCTAGGAAAT
AATGGGCATGAAGTGAAGAAACCACGTTGTTCTCAACCGACAAGTTTGGAGTGTGTTACTTCTCCACTCGTACTGTGCATTATTTATGGCGTAAGTTCCG
ACGATGCAATCATCGGCCAAATGTTTGGTGGGAGAGGTTTTGTTCCGTTTGTCTCCACAGAGGAGCCAAAGTGTGCATCCATTTTAG

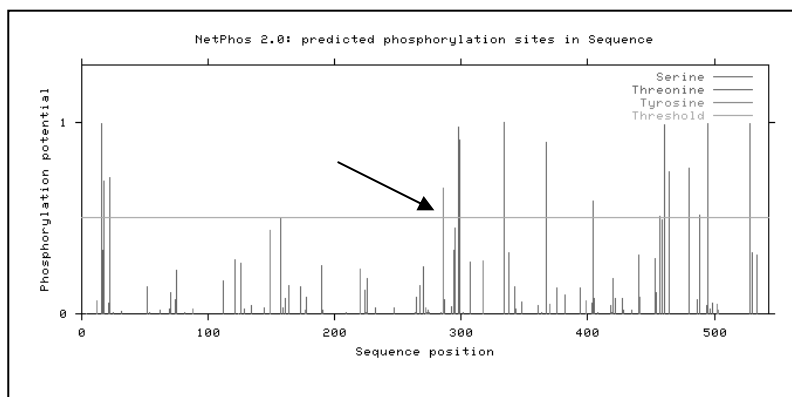
شکل ۴. توالی ژن رمز کننده یک آنتی پورتر واکتولی از گیاه علف مار ماهی. نواحی رمز کننده زیرشان خط کشیده شده است. ناحیه بالا دست

ژن دو خط زیرشان کشیده شده است. ناحیه uORF به رنگ خاکستری نشان داده شده است.

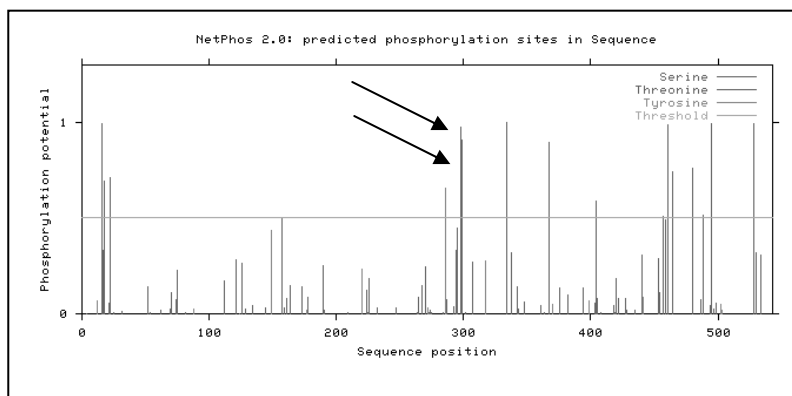


شکل ۵- ناحیه رمز شونده ژن به طول ۱۶۱۷ جفت باز در ناقل T-Easy الحاق یافته و به درون باکتری کلی باسیل سویه JM109 منتقل شد.

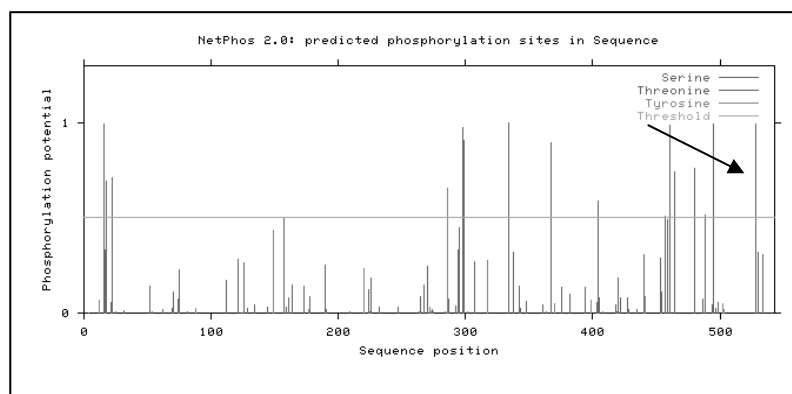
یک همسانه حاوی DNA نوترکیب (ژن + ناقل) انتخاب گردید.



الف) $\text{V}_{87}\text{M}_{100}\text{S}_{100}\text{H}_{100}\text{Y}_{87}\text{T}_{100}\text{W}_{100}\text{H}_{100}\text{N}_{100}\text{Y}_{100}\text{T}_{100}$

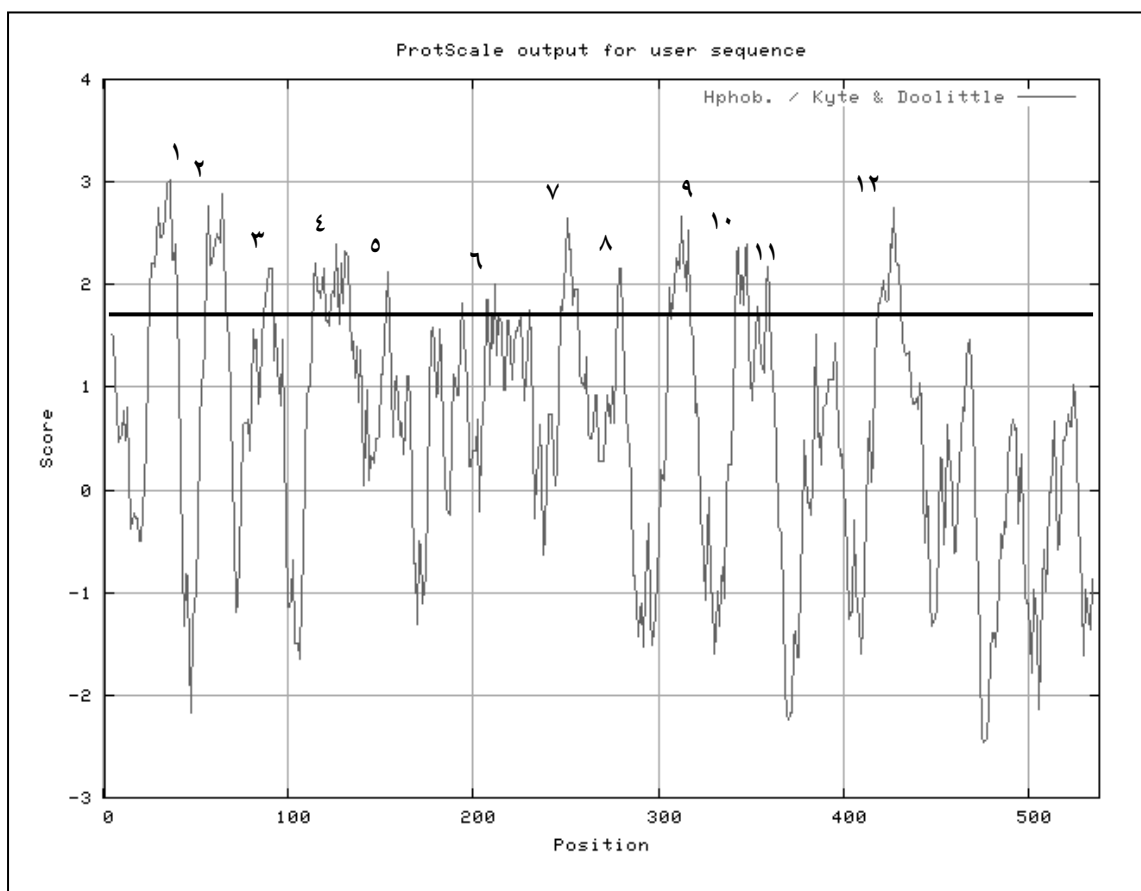


ب) $\text{V}_{100}\text{T}_{100}\text{E}_{100}\text{S}_{96}\text{S}_{100}\text{R}_{100}\text{V}_{65}\text{T}_{100}\text{T}_{91}\text{K}_{87}\text{H}_{96}\text{A}_{57}\text{F}_{96}\text{A}_{96}$

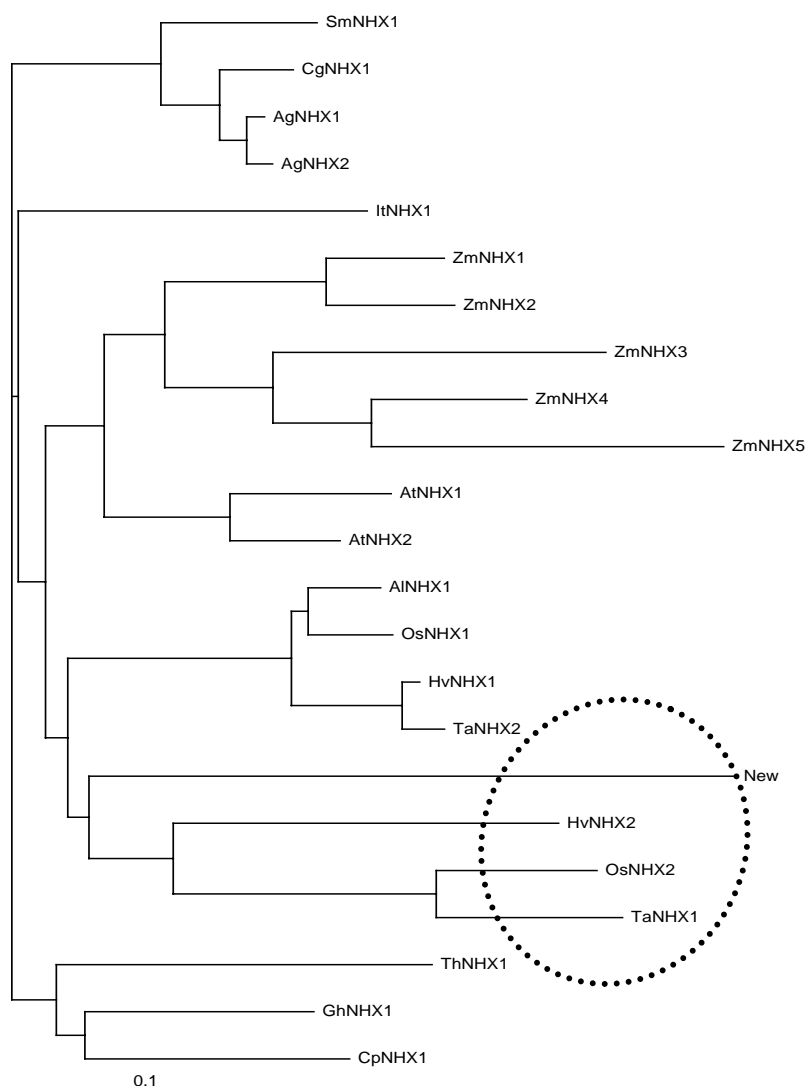


ج) $\text{F}_{83}\text{G}_{83}\text{G}_{83}\text{R}_{83}\text{G}_{100}\text{F}_{83}\text{V}_{78}\text{P}_{83}\text{F}_{91}\text{V}_{100}\text{P}_{96}\text{G}_{83}\text{S}_{100}\text{P}_{100}$

شکل ۶- توالی‌های حفاظت شده که به احتمال زیاد فسفریله شده و با سایر پروتئین‌های تنظیمی برهمکنش دارند. الف) یک اسید آمینه تیروزین در موقعیت ۲۸۶ تا ۲۹۲ از ابتدای پروتئین که با احتمال بیش از ۶۵ درصد فسفریله می‌گردد. ب) دو اسید آمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ۲۹۸ تا ۳۰۲ از ابتدای پروتئین که با احتمال نزدیک ۹۵ درصد فسفریله می‌گردند. ج) یک اسید آمینه سرین در موقعیت ۱۳ تا ۲۱ اسید آمینه از انتهای پروتئین که با احتمال حدود ۹۵ درصد فسفریله می‌گردد.



شکل ۷- نمودار هیدروپتی پروتئین آنتی پورتر Na^+/H^+ و اکثولی رمز شونده توسط ژن جدا شده از گیاه علف مار ماهی. ۱۲ ناحیه‌ای که احتمالاً درون غشاء کشیده می‌شوند با شماره نشان داده شده‌اند.



شکل ۸. نمودار فیلوژنتیک حاصل از توالی آمینواسیدی ۲۸ آنٹی پورتر Na^+/H^+ و اکتولی. AINHX1 (*Aeluropus littoralis*)، ۲ و AgNHX1، (*Citrus paradisi*) CpNHX1، (*Chenopodium glaucum*) CgNHX1، (*Arabidopsis thaliana*) AtNHX1~6، (*Atriplex gmelini*)، ۲ و (*Gossypium hirsutum*) GhNHX1، (*Hordeum vulgare*) HvNHX1، ۲ و (*Ipomoea tricolor*) ItNHX1، (*Suaeda maritima*) SmNHX1، (*Solanum lycopersicum*) SINHX1، (*Torenia*) ThNHX1، (*Triticum aestivum*) TaNHX1 و ۲، (*Zostera marina*) new و (*Zea mays*) ZmNHX1~5، (hybrid)

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-4211.
- 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 and Boutry 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 Tyr⁹⁴⁶-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr⁹⁴⁷. *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 (*Oryza 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-Marouf 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.