

## تولید شکل نو ترکیب گلو تاردوکسین گیاه برنج در باکتری اشریشیا کلی

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

احسان شیخ الاسلام اصفهانی<sup>۱</sup>، آذر شاه پیری<sup>\*۱</sup>

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

Shaikholeslam Esfahani E<sup>1</sup>, Shahpiri A<sup>\*1</sup>

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: ۹۶/۰۵/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

#### چکیده

گلو تاردوکسین‌ها (Grxها) پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین هستند که با داشتن یک گروه تیول-دی سولفید در جایگاه فعالشان در احیا برگشت پذیر پیوندهای دی سولفیدی نقش دارند. این پروتئین‌ها توسط آنزیم گلو تاتیون ردوکتاز توسط مولکول گلو تیون 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 به نام Rosetta (DE3) منتقل شد. با تحریک پروموتور T7 به وسیله‌ی IPTG، میزان مناسبی از پروتئین نو ترکیب His-OsGrx9 در فاز محلول باکتری تولید شد و سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی شد. فعالیت احیایی این ایزوفرم نو ترکیب تولید شده با استفاده از آنسولین به عنوان سوبسترای الکترون گیرنده و حضور DTT یا GSH به عنوان عوامل احیاکننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که Grx9 در محیط این ویترو به خوبی فعال می‌باشد. به نظر می‌رسد فعالیت این پروتئین در حضور GSH کاملاً وابسته به pH محیط می‌باشد.

#### واژه‌های کلیدی

اشریشیا کلی

برنج

بیان هترولوگ

گلو تاردوکسین

تیول سیستمین‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها حساس به اکسیداسیون هستند، بنابراین تشکیل باندهای دی‌سولفیدی بین GSH و گروه تیول که تحت عنوان گلو تاتیونه 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). گلو تاتیون در مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی از جمله پاسخ به عوامل بیماری‌زا، تنظیمات ردوکس و تغییر در غلظت  $Ca^{2+}$  سیتوسولی و نیز پیام‌های سلولی مربوط به مقاومت اکتسابی سیستمی<sup>۲</sup> 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، ریبونوکلو تید ردوکناز، پروکسی‌ردوکسین‌های نوع دوم، گلو تاتیون-S-ترنس‌فراز، آنزیم GR و احیای دهیدروآسکوربات به آسکوربات هستند که نشان‌دهنده 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 نو ترکیب این پروتئین به صورت شریک الحاقی با His.tag تولید و مورد خالص‌سازی قرار گرفت. تولید مقدار قابل توجه از 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

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 گلو تاردوکسین (GSH/Grx) به‌عنوان یکی از سیستم‌های وابسته به NADPH نقش مهمی در انتقال الکترون از NADPH به باندهای دی‌سولفیدی در بسیاری از پروتئین‌های سلولی دارد و بدین ترتیب با تنظیم تبادلات تیول-دی‌سولفید در حفظ تعادل ردوکس سلولی دخالت دارد. در این سیستم، احیای گلو تاردوکسین‌ها (Grx) توسط گلو تاتیون احیاشده (GSH) انجام می‌گیرد. مولکول GSH به‌وسیله آنزیم گلو تاتیون ردوکناز (GR) از گلو تاتیون اکسید شده (GSSG) حاصل می‌شود. آنزیم GR که از فلاووپروتئین‌ها می‌باشد از NADPH به‌عنوان منبع اولیه الکترون برای احیای گلو تاتیون استفاده می‌کند (Holmgren 2000). این سیستم، اولین بار به‌عنوان یک مسیر جایگزین برای تشکیل دزوکسی‌ریبونوکلو تیدها و بالطبع بیوستنز مولکول DNA شناسایی شد (Holmgren 1976).

گلو تاردوکسین‌ها، اکسیدوردوکنازهایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین در محدوده‌ی ده تا پانزده کیلو دالتون هستند که به‌طور عمده در دو شکل دی‌تیول (dtGrx) و منو تیول (mtGrx) به‌ترتیب با الگوی جایگاه فعال CxxC و CxxS در همه‌ی موجودات وجود دارند (Gelhay et al. 2005). در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از Grx وجود دارد. به‌عنوان مثال در آرابیدوپسیس، ۳۱ و در برنج تا کنون ۴۸ ژن مختلف برای ایزوفرم‌های Grx شناسایی شده‌است (Garg et al. 2010).

نقش Grxها در تنظیم فعالیت کینازها، فسفاتازها، عوامل رونویسی، مسیرهای پیام‌رسانی، بیوستنز، 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 گلو تاتیون‌زدایی<sup>۱</sup> پروتئین‌ها است (Holmgren 2000). با توجه به این که گروه

<sup>2</sup> Systemic Acquired Resistance

<sup>1</sup> Deglutathionylation

در حامل، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های تأیید شده، با دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* برش داده شدند و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت، جهت تأیید صحت توالی نوکلئوتیدی استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب pET28a-OsGrx9 توسط کیت استخراج پلاسمید (فرمتاز) انجام گرفت و جهت توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شد.

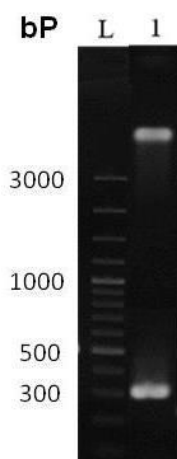
پلاسمید نو ترکیب pET28a-OsGrx9 و نیز پلاسمید pET28a فاقد قطعه ژنی مورد نظر (شاهد) با روش الکتروپوریشن، به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفرم شدند. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET28a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE3) به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (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<sub>600</sub> به ۰/۷ رسید، IPTG<sup>۱</sup> به عنوان 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 ۴°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. به منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتریفوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ g و دمای ۴°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 بافر A (ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم

جایگاه آنزیم برشی *EcoRI* خط کشیده شده‌است) و آغازگر اختصاصی برگشت (Reverse) با توالی 3'-TAATAAGAATTCATGGCGCTCGCCAAGG-5' (زیر جایگاه آنزیم برشی *HindIII* 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* پلیمرز (فرمتاز)، ۵۰ نانوگرم pFLCI-cDNA-OsGrx9 به عنوان الگو، پنج پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X) و MgSO<sub>4</sub> 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 ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۲°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 به وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (فرمتاز) انجام شد. در مرحله بعد، محصول PCR خالص‌سازی شده از ژل، با آنزیم‌های *HindIII* (فرمتاز) و *EcoRI* (فرمتاز) 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 به عنوان حامل بیانی با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* 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 (فرمتاز) 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

<sup>1</sup> Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside

به طول ۳۳۹ جفت باز از پلاسمید نوترکیب pET28a-OsGrx9 موفقیت همسانه سازی ژن کدکننده OsGrx9 در وکتور pET28a را تایید کرد (شکل ۱). همچنین از طریق توالی یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده از آغازگرهای T7 Promoter/Terminator تایید شد.



شکل ۱- الکتروفورز واکنش هضم دو طرفه آنزیمی pET28a-Grx آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* و جداسازی قطعه Grx9 به طول ۳۳۹ جفت باز که تاییدکننده همسانه سازی ژن در حامل pET28a می باشد. ستون ۱: DNA Ladder و ستون ۲: محصول هضم آنزیمی

پلاسمیدهای pET28a-OsGrx9 و pET28a به میزان بیانی *E. coli* سویه *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 می شود پروتئین تولید شده به صورت His-OsGrx9 باشد. وزن مولکولی پروتئین His-OsGrx9 ۱۵/۵۹ کیلودالتون پیش بینی شد. وجود باند پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین های نوترکیب His-OsGrx9 را در مقایسه با سویه کنترل تایید کرد (شکل ۲). پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی و ستون های حاوی رزین نیکل  $Ni^{+2}$  خالص سازی شد. سپس به منظور ارزیابی کیفیت خالص سازی، پروتئین پس از خالص سازی بر روی SDS-PAGE بارگذاری شد. مشاهده شدن تک باند با وزن مولکولی مورد انتظار علاوه بر تایید بیان پروتئین His-OsGrx9 نشان دهنده کیفیت خالص سازی مناسب این

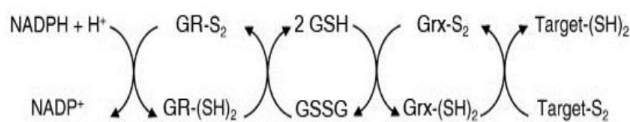
۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، ۸ pH) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین های باند شده غیر اختصاصی میزان ۱۰ میلی لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد شامل (ایمیدازول ۴۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، ۸ pH) و بافر A فیلتر 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 میلی لیتر مخلوط بافر A و B با شیب غلظتی ۱۵ تا ۷۰ درصد بافر B و به ترتیب از کمترین غلظت به میزان یک میلی لیتر از هر کدام روی ستون بارگذاری شد. خروجی ستون در ویال های ۱/۵ میلی لیتری نگهداری شد. کیفیت خلوص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین نوترکیب خالص با استفاده از اندازه گیری میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر و استفاده از قانون بیر-لمبرت تعیین شد. ضریب خاموش مولی برای پروتئین His-OsGrx9  $8542 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  در نظر گرفته شد.

فعالیت OsGrx9 با استفاده از میزان کدورت ایجاد شده در اثر رسوب انسولین به عنوان سوبسترا با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (Renard et al., 2011). بدین منظور واکنشی حاوی ۱۰۰ میلی مولار فسفات پتاسیم ۷ pH، ۰/۷۵ میلی گرم انسولین، ۲ میلی مولار EDTA و ۵ میکرومولار OsGrx9 تهیه شد. واکنش با اضافه شدن ۰/۳۳ میلی مولار DTT و یا یک میلی مولار GSH به عنوان عوامل احیاکننده شروع شد. جذب ۶۵۰ نانومتر به مدت ۶۰ دقیقه مورد اندازه گیری قرار گرفت.

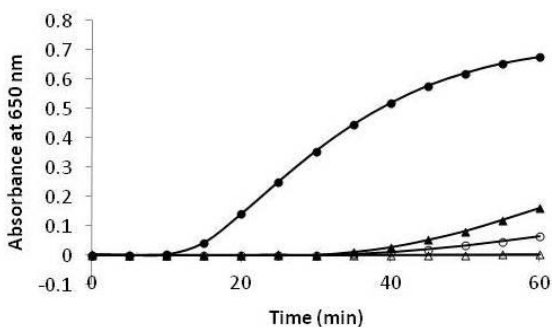
## نتایج

پس از قرارگیری و همسانه سازی ژن کدکننده OsGrx9 در پلاسمید pET28a و ترانسفورم آن به باکتری DH5 $\alpha$ ، توسط واکنش Colony PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ژنی ۳۳۹ جفت بازی در کلنی های رشد یافته نشان داده شد. سپس کلنی های واجد ژن، مورد واکنش هضم دو طرفه آنزیمی به وسیله *EcoRI* و *HindIII* قرار گرفتند. جدا شدن قطعه

بررسی فعالیت احیایی Grx پرداخت. در این پژوهش فعالیت احیایی OsGrx9 خالص به دست آمده در حضور احیا کننده DTT (واکنش ۱) و یا در حضور GSH (واکنش ۲) به عنوان عامل احیا کننده بررسی شد (شکل ۴). واکنش کنترل حاوی DTT و انسولین بدون حضور OsGrx، به عنوان واکنش کنترل برای واکنش ۱ در نظر گرفته شد. واکنش کنترل دیگری حاوی GSH و انسولین، بدون حضور OsGrx، به عنوان واکنش کنترل برای واکنش ۲ در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که OsGrx9 نوترکیب تولید شده فعال بود، به طوری که در مقایسه با نمونه‌ی کنترل، جذب در طول موج ۶۵۰ 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 ۰/۰۱۹۴  $\Delta OD_{650}/min$  بود. در واکنش ۲ سرعت افزایش جذب با حضور یک میلی مولار GSH بسیار پایین بود و مقدار سرعت آن ۰/۰۰۷۲  $\Delta OD_{650}/min$  بود. واکنش با حضور انسولین، OsGrx و GSH در pH های ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸، ۸/۵ صورت گرفت (شکل ۵).

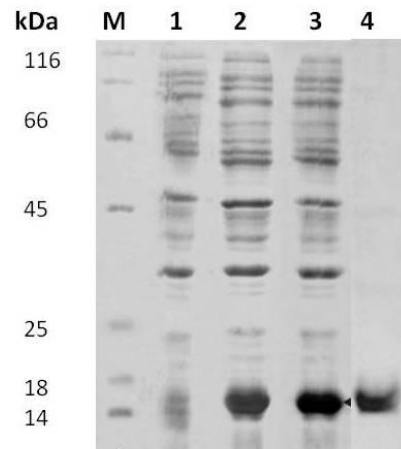


شکل ۳- زنجیره‌ی انتقال الکترون در سیستم GSH/Grx



شکل ۴- بررسی فعالیت احیایی Grx نوترکیب تولید شده (●) احیای انسولین در حضور Grx و DTT (▲) احیای انسولین در حضور Grx و GSH (○) واکنش کنترل حاوی انسولین و DTT (Δ) واکنش کنترل حاوی انسولین و GSH

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

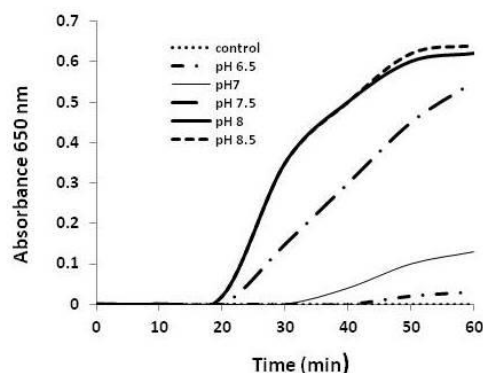


شکل ۲- بررسی ژل SDS-PAGE جهت تایید بیان پروتئین His-Grx9 با وزن مولکولی ۱۵/۵ کیلو دالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3). M: مارکر پروتئینی؛ ستون ۱: محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در باکتری حاوی پلاسمید pET28a-Grx9 قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲ و ۳: محتوای پروتئین‌های محلول استخراج شده در باکتری حاوی پلاسمید pET28a-Grx9 ۲ و ۳ ساعت پس از القا با IPTG؛ ستون ۴: پروتئین His-Grx9 پس از خالص سازی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی

در سلول گیاهان، الکترون از NADPH به واسطه آنزیم GR به گلو تاتیون اکسید شده (GSSG) انتقال می یابد. شکل اکسید شده GSSG به فرم احیا یعنی GSH تبدیل می شود. GSH خود باعث احیا شدن GRها می شود و Grx احیا شده متعاقباً به عنوان یک عامل احیا کننده قادر به احیا کردن تعداد زیادی از پروتئین‌ها می باشد (شکل ۳). (Holmgren et al. (1976) نشان دادند که در محیط این ویترو نیز در صورتی که Grx با DTT و یا در حضور GSH احیا شود می تواند باعث احیای باندهای دی سولفیدی در انسولین شود. انسولین پروتئینی دارای دو پلی پپتید  $\alpha$  و  $\beta$  می باشد 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  $\beta$  می شود. بنابراین در محیط این ویترو می توان با ایجاد واکنشی حاوی DTT و یا GSH به عنوان عامل اولیه احیا کننده، Grx و انسولین و اندازه گیری میزان رسوب سفید رنگ تولید شده از طریق اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر به

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 ۸۵ 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 به نظر 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 حالی که 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 ۸ افزایش پیدا کرد. این موضوع نشان می‌دهد که فعالیت OsGrx در حضور احیاکننده طبیعی‌اش کاملاً وابسته به pH محیط می‌باشد. این موضوع در مطالعات قبلی که با گلو تاردوکسین خالص شده از گیاه انجام شده بود نیز نشان داده شده‌است (Sha et al. 1997).

نتیجه آزمایش نشان داد واکنش به شدت تحت تاثیر pH قرار می‌گیرد به طوری که سرعت احیای انسولین با افزایش pH از ۶/۵ به ۸ تغییر قابل توجهی داشت. افزایش pH از ۸ به ۸/۵ روی سرعت واکنش تاثیری نداشت.



شکل ۵- 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 پروتئین‌های کوچک نقش مهمی در تنظیم فعالیت آنزیم‌های دیگر مانند پیرووات کیناز و فسفوفروکتوکیناز دارند (Axelsson al. 1983). همچنین گزارش‌هایی تاکنون در رابطه با نقش گلو تاردوکسین در احیای دهیدروآسکوربات ردوکتاز داده شده‌است. در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از گلو تاردوکسین 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

## 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.

Gelhay 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.

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 Physiology* 155: 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-dependent 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.