

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^۱، آذر شاه پیری^{۱*}

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

Shaikhholeslam Esfahani E¹, 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: ۹۶/۰۵/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

گلو تاردوکسین ها (Grx) پروتئین هایی 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 پروتئین ها توسط آنزیم گلو تاتیون ردوکتاز توسط مولکول گلو تیون احیا می شوند. سپس این پروتئین خود در احیای باندهای دی سولفیدی پروتئین های دیگر دخالت دارد. ایزوفرم های مختلفی از Grx در گیاهان وجود دارد. در پژوهش حاضر توالی ژن کد کننده ایزوفرم OsGrx9 از گیاه برنج پلاسמיד بیانی pET28a، همسانه سازی و سپس به سویی مناسبی از باکتری اشریشیا کلی به نام Rosetta (DE3) منتقل شد. با تحریک پروموتور T7 به وسیله IPTG، میزان مناسبی از پروتئین نو ترکیب His-OsGrx9 در فاز محلول باکتری تولید شد و سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی خالص سازی 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 احیا کننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که Grx9 در محیط این ویترو به خوبی فعال می باشد. به نظر می رسد فعالیت این پروتئین در حضور GSH کاملاً وابسته به pH محیط می باشد.

واژه های کلیدی

اشریشیا کلی

برنج

بیان هترولوگ

گلو تاردوکسین

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) به عنوان 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 در حفظ تعادل ردوکس سلولی دخالت دارد. در این سیستم، احیای گلو تاردوکسین‌ها (Grx) توسط گلو تاتیون احیاشده (GSH) انجام می‌گیرد. مولکول GSH به وسیله آنزیم گلو تاتیون ردوکتاز (GR) از گلو تاتیون اکسید شده (GSSG) حاصل می‌شود. آنزیم GR که از فلاوو پروتئین‌ها می‌باشد از NADPH به عنوان منبع اولیه الکترون برای احیای گلو تاتیون استفاده می‌کند (Holmgren 2000). این سیستم، اولین بار به عنوان یک مسیر جایگزین برای تشکیل دزوکسی ریبونوکلیدها و بالطبع بیوستنز مولکول DNA شناسایی شد (Holmgren 1976).

گلو تاردوکسین‌ها، اکسیدوردوکتازهایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین در محدوده‌ی ده تا پانزده کیلو دالتون هستند که به طور عمده در دو شکل دی تیول (dtGrx) و منو تیول (mtGrx) به ترتیب با الگوی جایگاه فعال CxxC و CxxS در همه‌ی موجودات وجود دارند (Gelhay et al. 2005). در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی از Grx وجود دارد. به عنوان مثال در آرابیدوپسیس، ۳۱ و در برنج تا کنون ۴۸ ژن مختلف برای ایزوفرم‌های Grx شناسایی شده است (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 شده است (Rouhier et al. 2004). یکی از مهم‌ترین نقش‌های Grx‌ها نقش آن‌ها در گلو تاتیون زدایی^۱ پروتئین‌ها است (Holmgren 2000). با توجه به این که گروه

¹ Deglutathionylation

تیول سیستم‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها حساس به اکسیداسیون هستند، بنابراین تشکیل باندهای دی سولفیدی بین GSH و گروه تیول که تحت عنوان گلو تاتیون شناخته می‌شود، منجر به یک تغییر پس از ترجمه‌ای برگشت پذیر 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+} سیטوسولی و نیز پیام‌های سلولی مربوط به مقاومت اکتسابی سیستمی^۲ نقش دارد (Meyer et al. 2005). علاوه بر پیام‌های درون سلولی، 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، ریبونوکلوئوتید ردوکتاز، پروکسی ردوکسین‌های 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 همسانه سازی قرار گرفت و شکل نو ترکیب این پروتئین به صورت شریک الحاقی با His.tag تولید و مورد خالص سازی 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 همسانه سازی شده بود تهیه شد. جهت تکثیر توالی ژن کدکننده، آغازگر اختصاصی رفت (Forward) با توالی 5'TAATAAGAATTCATGGCGCTCGCCAAGG3' (زیر

² Systemic Acquired Resistance

جایگاه آنزیم برشی *EcoRI* خط کشیده شده است) و آغازگر اختصاصی برگشت (Reverse) با توالی 5'-TAATAAGAATTCATGGCGCTCGCCAAGG-3' (زیر جایگاه آنزیم برشی *HindIII* خط کشیده شده است)، 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 میلی مولار dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR و $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار انجام شد. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت کردن در دمای $94^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای $62^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای $72^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی ابتدایی در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه و در پایان مرحله تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد و خالص سازی آن به وسیله Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (فرمتاز) انجام شد. در مرحله بعد، محصول PCR خالص سازی شده از ژل، با آنزیم های *HindIII* (فرمتاز) و *EcoRI* (فرمتاز) مورد هضم قرار گرفت و سپس خالص سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. با هدف ایجاد جایگاه های مناسب جهت قرارگیری قطعه ژنی در حامل، پلاسمید pET28a به عنوان حامل بیانی با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* برش داده شد و خالص سازی 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 باکتری های مستعد DH5 α انتقال داده شد. جهت انتخاب باکتری های تراریخت، واکنش Colony PCR از کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی LB (Luria Bertani) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) (Sambrook and Russell 2001) انجام شد. جهت بررسی صحت همسانه سازی قطعه ژن کدکننده *OsGrx9*

در حامل، پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های 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 توالی یابی به شرکت Bioneer ارسال شد.

پلاسمید نو ترکیب pET28a-*OsGrx9* و نیز پلاسمید pET28a فاقد قطعه ژنی مورد نظر (شاهد) با روش الکتروپوریشن، به سلول های مستعد باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفرم شدند. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET28a و نیز مقاومت باکتری Rosetta (DE3) به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (Novagen 2005)، سلول های باکتری ترانسفرم شده در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی گرم بر لیتر) و بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه و در دمای $37^{\circ}C$ کشت داده شدند. هنگامی که OD₆₀₀ به ۰/۷ رسید، IPTG^۱ به عنوان ماده ای القاگر به غلظت نهایی ۰/۱ میلی مولار به محیط های کشت اضافه شد. در فواصل زمانی مختلف نمونه برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری صورت گرفت (Mohammadi Nezhad et al. 2013). سپس ویال ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ g و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ شدند. بعد از آن، محلول رویی ویال ها دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تریس-اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار (pH 8) سوسپانسیون شد. به منظور استخراج پروتئین های محلول، دیواره سلول های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتریفوژ نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ g و دمای $4^{\circ}C$ صورت پذیرفت و فاز رویی آن جهت بررسی میزان بیان پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شد.

خالص سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی انجام شد (Shahpiri et al. 2008). بدین منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستون های His-Trap HP (شرکت GE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافر A (ایمیدازول ۱۰ میلی مولار، کلرید سدیم

¹ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside

به طول ۳۳۹ جفت باز از پلاسمید نو ترکیب 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 میزبان بیانی *E. coli* سویه Rosetta (DE3)، جهت تولید پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب His-OsGrx9 را در مقایسه با سویه کنترل تایید کرد (شکل ۲). پروتئین نو ترکیب 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

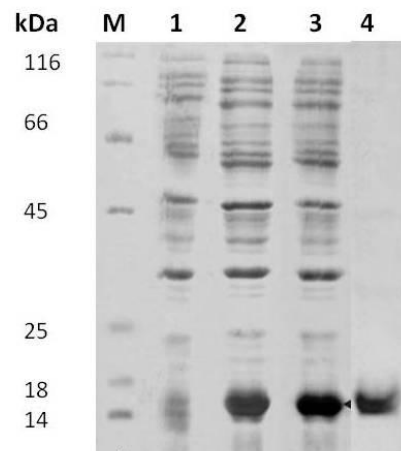
۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH ۸) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین های باند شده غیر اختصاصی میزان ۱۰ میلی لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد شامل (ایمیدازول ۴۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH ۸) و بافر A فیلتر 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 نو ترکیب 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 pH 7 ، 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 DH5α، 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

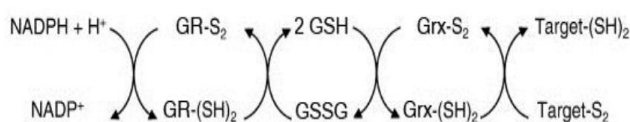
پروتئین بود. میزان عملکرد پروتئین خالص His-OsGrx9 به ازای هر لیتر محیط کشت باکتری ۲۰ میلی گرم بود.



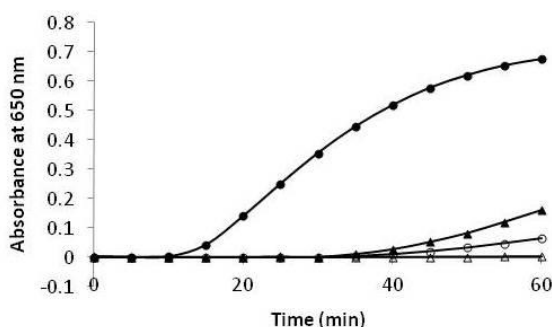
شکل ۲- بررسی ژل SDS-PAGE جهت تایید بیان پروتئین His-Grx9 با وزن مولکولی ۱۵/۵ کیلو دالتون تولید شده در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3). M: مارکر پروتئینی؛ ستون ۱: محتوای پروتئین های محلول استخراج شده در باکتری حاوی پلاسمید pET28a-Grx9 قبل از القا با IPTG؛ ستون ۲ و ۳: محتوای پروتئین های محلول استخراج 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 GRx ها می شود و Grx احیا شده متعاقباً به عنوان یک عامل احیا کننده قادر به احیا کردن تعداد زیادی از پروتئین ها 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 α و β 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 β 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

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 نو ترکیب تولید شده فعال بود، به طوری که در مقایسه با نمونه ی 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 ۸/۵ صورت گرفت (شکل ۵).



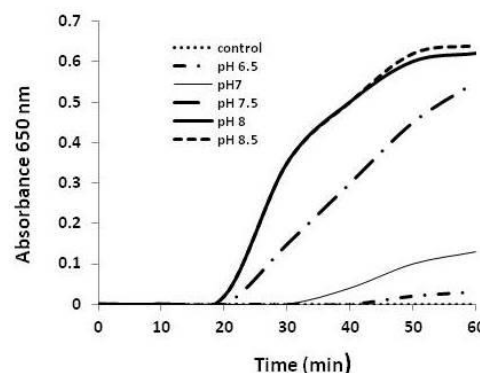
شکل ۳- زنجیره ی انتقال الکترون در سیستم GSH/Grx



شکل ۴- بررسی فعالیت احیایی Grx نو ترکیب 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

ژن کدکننده ایزوفریم Grx9 مورد همسانه سازی قرار گرفت. ایزوفریم OsGrx9 یکی از ایزوفریم های Grx گیاه برنج است که در زیر گروه CPYC قرار می گیرد. توالی آمینواسیدی این ایزوفریم دارای شباهت بالایی به Grx در پستانداران و مخمر می باشد. همچنین دارای شباهت ۸۵ درصد با Grx در گندم (ACF40843)، جو (BAK01747) و ذرت (ACF86986) می باشد. باهمسانه سازی 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 می رسد که سیستم بیانی *E. coli* سیستم مؤثر و مناسبی در تولید این پروتئین کوچک می باشد. خالص سازی این پروتئین با توجه به وجود ناحیه His.tag در انتهای آمینوی پروتئین امکان خالص سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی را فراهم نمود. نقش OsGrx در احیای باندهای دی سولفیدی با استفاده از انسولین به عنوان سوبسترا و در حضور دو احیاکننده DTT و GSH مورد بررسی قرار گرفت. در pH 7، OsGrx در حضور DTT به طور 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 می دهد که فعالیت OsGrx در حضور احیاکننده طبیعی اش کاملاً وابسته به pH محیط می باشد. این موضوع در مطالعات قبلی که با گلوتارلدوکسین خالص شده از گیاه انجام شده بود نیز نشان داده شده است (Sha et al. 1997).

نتیجه آزمایش نشان داد واکنش به شدت تحت تاثیر pH قرار می گیرد 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 سلول های زنده Grx ها یکی از آنزیم های مهم در احیای باندهای دی سولفیدی پروتئین ها می باشند. این پرتئین های کوچک نقش مهمی در تنظیم فعالیت آنزیم های دیگر مانند پیرووات کینازو فسفوفروکتوکیناز دارند (Axelsson al. 1983). همچنین گزارش هایی تاکنون در رابطه با نقش گلوتارلدوکسین در احیای دهیدروآسکوربات ردوکتاز داده شده است. در گیاهان ایزوفریم های مختلفی از گلوتارلدوکسین وجود دارد (Garg et al. 2010). بر اساس جایگاه فعال Grx ها به سه گروه CPYC، CGFS و انواع CC با توالی CCM(S/C) تقسیم می شوند. 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, Alkhalifioui 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.