

همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری یک

ژن تیوردوکسین نوع *h*, متعلق به زیرگروه I از بافت حبه انگور

(*Vitis vinifera* L.)

رضا حیدری جاپلقی^۱، رحیم حداد^{۲*}، قاسمعلی گروسی^۳، سعید نواب پور^۴

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۴- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی‌سولفید ردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت شده و در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند. در مقایسه با سایر موجودات زنده، گیاهان دارای ۶ نوع تیوردوکسین مختلف^{۱, ۲, ۳} و یعنی باشند که تنها تیوردوکسین نوع *h* با اشکال متعدد، بطور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته و در فرآیندهای مختلفی از جمله محافظت سلولی در برابر تنفس اکسیداتیو ایفای نقش نماید. همسانه‌سازی ژن تیوردوکسین نوع *h* از بافت حبه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) انجام شده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و فیلوجنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی چارچوب باز خوانی این ژن، تحت عنوان *h4*, به طول ۳۴۵ bp بوده و یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را دمز نموده و دارای جایگاه فعال معمول WCGPC می‌باشد. وزن مولکولی تخمین زده شده و نقطه آبیوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۱۲/۷۶ کیلو Dalton و ۵/۲۲ بوده و پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی آن با استفاده از ساختار کربستالی ژن *AtTrx h1* از آراییدوپسیس نشان داد که این پروتئین با سایر تیوردوکسین‌های بررسی شده مطابقت داشته و با داشتن ۵ صفحه β و ۴ مارپیچ α , ساختار سه‌بعدی از نوع Thioredoxin Fold را نشان می‌دهد. توالی پروتئینی بدست آمده شباهت زیادی را با تیوردوکسین‌های نوع *h* سایر گیاهان، از قبیل صنوبر (درصد مشابه با تیوردوکسین *Pth3*) و رقم Shiranuhi از جنس مرکبات (درصد مشابه با تیوردوکسین *Csh* نشان داده و بررسی‌های فیلوجنتیکی با استفاده از ژن‌های تیوردوکسین از گیاهان دیگر نشان داد که ژن *VvTrx h4*, تیوردوکسین نوع *h* بوده و متعلق به زیرکلاس IA از زیرگروه I می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

انگور،

تیوردوکسین نوع *h*،

جداسازی،

ساختار سه‌بعدی،

همسانه‌سازی

مقدمه

که جایگاه فعال‌شان به صورت CxxS است، با سایر گروه‌های تیوردوکسین در داشتن جایگاه فعال WC[G/P]PC مشابه می‌باشند. جایگاه فعال WCGPC در اکثر تیوردوکسین‌های نوع h¹ تیوردوکسین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی معمول است، در حالی که جایگاه فعال WCPPC فقط در تعدادی از همشکل‌های زیر گروه I وجود دارد (۱۶). تیوردوکسین‌های نوع h² به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی شده و نقش مهمی را در محافظت سلولی در برابر تنفس اکسیداتیو و به دنبال آن تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌نمایند (۱۶). اعضای زیرگروه‌های I و II به وسیله NTR احیاء شده در حالی که احیاء تیوردوکسین‌های h³ زیرگروه III توسط سیستم گلوتاتیون/گلوتاردوکسین⁴ انجام می‌شود (۱۵، ۱۶ و ۲۰).

Gautier و همکاران (۱۴) دو ژن تیوردوکسین نوع h را از کتابخانه cDNA بذور نارس گندم (*Triticum aestivum*) کپتاکسین و همسانه‌سازی نموده و ویژگی‌های کاتالیتیکی جداسازی و همسانه‌سازی پروتئین‌های ایجاد شده آنها را مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده نمودند که پروتئین‌های تیوردوکسین قادر به احیاء پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گندم می‌باشند. Gelhaye و همکاران (۱۵) سه توالی رمز کننده تیوردوکسین نوع h را از کتابخانه EST (Populus trichocarpa) بافت‌های برگ/ریشه گیاه صنوبر جداسازی و همسانه‌سازی نمودند. این محقق در گزارشی دیگر اعلام نمود که این همشکل‌ها حاوی توالی جایگاه فعال متفاوت بوده و به زیرگروه‌های مختلفی تعلق دارند. Laloï و همکاران (۳۳) نشان دادند که ژن TRXh5 در گیاه آراییدوپسیس در اثر آسیب بافت، پیری، آلدگی با عامل بیماریزای قارچی و شرایط تنفس اکسنده به میزان زیادی در بافت‌های مختلف القا می‌شود. Peterson و همکاران (۴۷) ساختار سه‌بعدی یک پروتئین تیوردوکسین نوع h⁵ تحت عنوان AtTrx1 از گیاه آراییدوپسیس را در وضعیت اکسید شده و به روش NMR⁶ تعیین نمودند. بررسی آنها نشان داد که این پروتئین دارای ساختار سه‌بعدی مختص تیوردوکسین‌ها⁷ بوده به طوری که حاوی پنج صفحه β و

تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی‌سولفید ردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت شده و در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند (۱۶ و ۳۷). این پروتئین‌ها با داشتن یک گروه دی‌سولفیدی فعال، نقش تنظیم کننده‌ای را در بسیاری از فرآیندهای سلولی شامل: متابولیسم، تنفس نوری، ترجمه، بیوستر ویتامین‌ها (۲۰ و ۴۲)، فتوستز (۳)، نسخه‌برداری (۵ و ۲۴)، ستر DNA (۳ و ۵۶)، محافظت سلولی در برابر تنفس اکسنده (۴۳ و ۵۳)، جوانه‌زنی بذور غلات (۲)، خودناسازگاری (۵، ۱۶ و ۲۱) و کاهش حساسیت و سمیت پروتئین‌های حساسیتزا و سمی (۲۹) ایفا می‌نمایند. توالی جایگاه فعال تیوردوکسین‌ها در وضعیت اکسید شده یک پیوند دی‌سولفیدی را تشکیل می‌دهد، اما در حالت احیاء شده، گروه دی‌تیول تیوردوکسین‌ها می‌تواند فعالیت بسیاری از پروتئین‌های هدف را از طریق احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی‌شان تحت شعاع قرار دهد (۳۳ و ۳۷). در حالی که اغلب موجودات زنده دارای تعداد اندکی از ژن‌های تیوردوکسین می‌باشند، انواع مختلفی از ژن‌های تیوردوکسین در گیاهان مختلف یافت شده است. برای مثال، حداقل ۴۸ ژن تیوردوکسین در ژنوم گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شناسایی شده است (۴۲).

گیاهان عالی دارای دو سیستم تیوردوکسین، شامل سیستم وابسته به فردوكسین و سیستم وابسته به NADPH می‌باشند. سیستم وابسته به فردوكسین، درون کلروپلاست‌ها قرار داشته و شامل تیوردوکسین‌های f⁸ و m⁹ و u¹⁰ می‌باشد. این تیوردوکسین‌ها در هسته کد شده و به وسیله آنزیم فردوكسین- تیوردوکسین ردوکتاز¹ (FTR) احیاء شده و یک انتهای آمینو با طول زیاد دارند که احتمالاً یک پیتید راهنمای^{۱۱} برای ورود به درون کلروپلاست‌ها می‌باشد (۹، ۱۶ و ۴۵). سیستم وابسته به NADPH شامل تیوردوکسین‌های o (میتوکندریایی) و h (سیتوزولی) بوده که تیوردوکسین‌های NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز^۲ (NTR) احیاء می‌شوند (۱۶، ۲۰ و ۵۱). تیوردوکسین‌های نوع h^{۱۲} بجز همشکل‌هایی

¹ Ferredoxin thioredoxin reductase² Signal peptide³ NADPH thioredoxin reductase⁴ Glutathione/glutaredoxin system⁵ Nuclear magnetic resonance⁶ Thioredoxin fold

آزمایشگاه انتقال داده شده و تا زمان آزمایش در دمای -80°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از روش CTAB بهینه شده روش Reid و همکاران (۴۹) در مقیاس کوچک استفاده شد. بافت مورد نظر با استفاده از هاون و ازت مایع به صورت پودر درآمده و به میزان 0.1 g به یک تیوب 2 mL لیتری حاوی یک میلی لیتر بافر $25\text{ mM EDTA pH }8$ ، $300\text{ mM Tris-HCl pH }8$ استخراج (۲۵) دو مولار، PVP دو درصد، CTAB دو درصد و بتا- ناکلریکاتنول^۸ دو درصد) اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت 30 min در حمام آب گرم (Techne-FTE10AE، انگلستان) با دمای 65°C درجه سانتی گراد قرار داده شده و هر 5 min دقیقه به آرامی ورتكس (Techne-FVORTECE، انگلستان) گردیدند. سپس پروتئین‌ها دو مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوامیل الکل $7/v:1$ (۲۴:۱) حذف گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردیده و 0.1 mL حجم سدیم استات M $3/6$ و 0.1 mL حجم ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت 30 min دقیقه در دمای -80°C درجه سانتی گراد نگهداری گردید. اسیدهای نوکلئیک به وسیله سانتریفیوژ (Hettich-D78532) آلمان) با سرعت 14000 rpm به مدت 30 min درجه در دمای 4°C درجه سانتی گراد رسوب داده شده و در آب DEPC شده حل گردید. در مرحله بعد 0.3 mL حجم لیتیوم کلراید 8 mol/L به نمونه‌ها اضافه گردیده و تیوب‌ها به مدت یک طول شب $8-12\text{ hours}$ در دمای 4°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت 14000 rpm به مدت 30 min دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی گراد رسوب و با استفاده از الکل اتانول 70 mL درصد شسته شده و در مقدار مناسب آب DEPC شده حل گردید. در نهایت، کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Labomed-UVD3200، انگلستان) در طول موج‌های 260 ، 280 و 230 nm نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز $1/2\text{ mm}$ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

⁸ β -mercaptopethanol

چهار مارپیچ α می‌باشد. Cazalis و همکاران (۱۱) همسانه‌سازی و بیان متفاوت سه همشکل ژن تیوردوکسین h را تحت تیمار با تنش‌های شوری (NaCl) و اکسیده (H_2O_2) در بذور گندم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده الگوی متفاوت بیان سه آیزوفرم در بذور تیمار شده بود. Park و همکاران (۴۶) یک تیوردوکسین نوع h را از عصاره‌های سیتوزولی گیاه آراییدوپسیس که تحت تیمار گرمایی بودند، جداسازی و همسانه‌سازی نموده و آن را *AtTrx-h3* نامیدند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که پروتئین رمز شده توسط این ژن موجب افزایش تحمل گرمایی در گیاه آراییدوپسیس می‌شود.

از آنجاییکه ژن‌های تیوردوکسین در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند، لذا پیش‌بینی می‌شد که در انگور نیز باید بیان شوند. پس از جداسازی و شناسایی ژن $Vvh10$ (با شماره دستیابی NCBI GenBank HM622264) از بافت حبه انگور یاقوتی (۱)، در این مطالعه، همسانه‌سازی و توصیف یک توالی کامل cDNA c دیگر که رمز کننده تیوردوکسین نوع h از بافت حبه انگور عسکری، تحت عنوان *VvhTrx h4*، می‌باشد، توضیح داده می‌شود. سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختارهای دو بعدی و سه بعدی توالی پروتئینی بدست آمده با استفاده از برنامه‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و با استفاده از بررسی‌های همولوژی و فیلوژنیکی با تیوردوکسین‌های سایر گیاهان نشان می‌دهیم که ژن همسانه شده، تیوردوکسین نوع h بوده و به زیرکلاس IA از زیرگروه I تعلق دارد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت حبه در مرحله تغییر رنگ حبه^۷ از انگور عسکری از تاکستان انگور در مرکز تحقیقات انگور، وابسته به مرکز تحقیقات وزارت جهاد کشاورزی، واقع در شهر تاکستان (استان قزوین)، جمع‌آوری و پس از توزیع، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بالافاصله درون ازت مایع قرار داده شد. نمونه‌ها سریعاً به

⁷ Véraison

مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرتستگی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی و توالی‌بایی DNA

پس از خالص‌سازی محصول RT-PCR با اندازه مورد نظر از GF-1 PCR روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (Clean Up Kit-Vivantis)، ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی (Fermentas) pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی *BamHI* گرفته شد. هضم گردیده و مجدداً بوسیله کیت استخراج اسید نوکلئیک از لوله‌هایی که واکنش هضم درون آنها انجام شده، خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال پلاسمید به DNA ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم T4 لیگاز DNA (Fermentas) انجام گرفته (۵۲). در مرحله بعد باکتری‌ها روی محیط کشت جامد SOB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین، X-gal و IPTG به منظور انجام آزمون سفید-آبی کشت داده شده و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. در نهایت، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS انجام گرفته (۶) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که جهت قرارگیری ژن همسانه‌سازی شده روی ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* (Fermentas) انجام گرفت. توالی‌بایی DNA پلاسمید نوترکیب پس از PCR با استفاده از آغازگرهای راهانداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت Seqlab⁹ آلمان، انجام شد.

⁹ Sequence laboratories gottingen

ستز رشته اول cDNA و واکنش RT-PCR به منظور ستز رشته اول cDNA ۵ μg از محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم I (Fermentas)، به عنوان RNA الگو، به همراه آغازگرهای Oligo dT (18 mer) (Qiagen) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تیمار شدند. سپس مخلوط RevertAidTM M- واکنش به همراه آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Fermentas) MuiV ساعت تیمار شده و پس از آن، عمل غیر فعال سازی آنزیم نسخه-بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. بدین ترتیب رشته اول مولکول cDNA ساخته شده و از این مولکول RNA-DNA به عنوان الگو در واکنش استفاده گردید. واکنش RT-PCR به منظور تکثیر ژن VvTrx h4 با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده بر اساس توالی تظاهر یافته برچسب‌دار (EST: CB348011) شناسایی شده با برنامه Goes da BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و همکاران، منتشر نشده). آغازگرهای اختصاصی با توالی-5'-TACGGATCCATGGCGGAAGAGGGACAA-3' (Agazgk رفت، مطابق با توالی اسید‌آمینه‌ای MAEEGQ) و 5'-ATCGGATCCTCAAGCAGTTGCATGCTTCTC-3' (آغازگر برگشت، مطابق با توالی اسید‌آمینه‌ای TEKHATA) که شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *BamHI* در انتهای ۵' بودند (Goes da Silva و همکاران، منتشر نشده)، که توسط شرکت Metabion آلمان ستز شدند. مخلوط mM Tris-HCl (pH ۸/۸) ۵۰ μl حاوی ۱۰ mM KCl، ۱۰ mM (NH₄)₂SO₄، ۲ mM MgSO₄، ۰/۱% Triton، ۰/۱% BSA، ۰/۱% dNTP، ۰/۱ mg/ml DNA الگو و ۰/۱% TE-100 درصد، ۰/۱ mg/ml *Pfu* DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT-PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،

شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای همردیف-سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). همچنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های آراییدوپسیس، صنوبر و تیوردوکسین‌های نوع *h* گیاهان مختلف به منظور تعیین نوع، زیرگروه و زیرکلاس ژن همسانه‌سازی شده (http://ClustalW.genome.ad.jp) ClustalW نرم‌افزار (http://www.expasy.ch/tools/ExPASY) بوسیله نرم‌افزار ClustalW انجام شد. توالی‌های پروتئینی از گیاهان مختلف که برای تهیه همردیف‌سازی چندگانه و ساخت درخت‌های فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دستیابی و منبع در جدول (۲) ذکر شده‌اند.

بررسی توالی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه‌های PSORT، ProtParam، TMHMM و PSIPred ساختارهای دوم و سوم پروتئین به وسیله برنامه‌های Swiss PDB-viewer و Swiss-MODEL (لینک‌هایی در تارنمای ExPASY (http://www.expasy.ch/tools/ExPASY) تعیین گردیدند. توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین

جدول ۱- میزان یکسانی و شباهت توالی پروتئینی *VvTrx h4* با همشکل‌های انگور و سایر توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در تهیه همردیف‌سازی چندگانه از گیاهان مختلف در سطح پروتئین و DNA.

ردیف	نام گیاه	جنس و گونه	نام	اختصاصی	پروتئین	DNA	شماره دستیابی
			زن	یکسانی	درصد تشابه	درصد درصد	
۱	انگور	<i>Vitis vinifera</i>	Vvh1		۹۸	۸۰	HM370524
			Vvh2		۹۸	۹۹	HM370525
			Vvh3		۹۶	۹۹	HM370526
			Vvh5		۵۱	۷۱	CF513794
			Vvh6		۴۵	۷۳	CB004453
			Vvh10		۷۶	۸۱	HM622264
			VvCxxS1		۴۲	۶۱	EU280164
			VvCxxS2		۴۳	۶۱	HM370528
۲	انسان	<i>Homo sapiens</i>	H.sapiens		۵۰	۷۰	J04026
			Osh1		۵۵	۷۲	D26547
			Nth1		۷۱	۸۵	X58527
			Nth2		۶۸	۸۳	Z11803
			Nbh1		۷۲	۸۵	GQ354821
			Gm1		۷۷	۸۶	EU144127
			Pth3		۷۲	۸۹	BU822062
			Rch1		۷۲	۸۵	XM_002534085
			Rch2		۷۰	۸۵	XM_002510410
			Pph		۷۳	۸۴	AF323593
			Msh		۷۲	۸۵	DQ122787
			Csh		۷۳	۸۶	EF122401
	Shiranuhi از جنس مرکبات	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>					

جدول ۲- توالی‌های پروتئینی مورد استفاده برای ساخت درخت‌های فیلوژنتیکی. توالی‌های پروتئینی از گیاهان مختلف به همراه شماره دستیابی و منبع از پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank بدست آمدند.

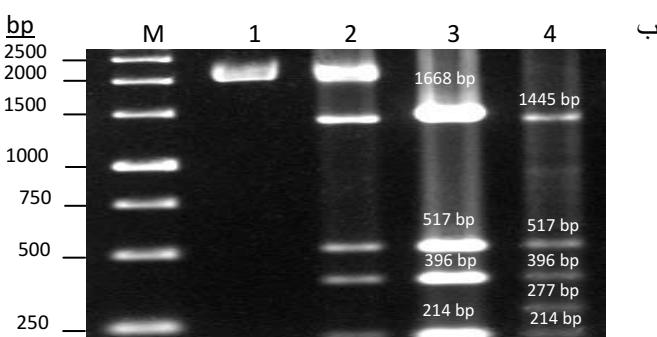
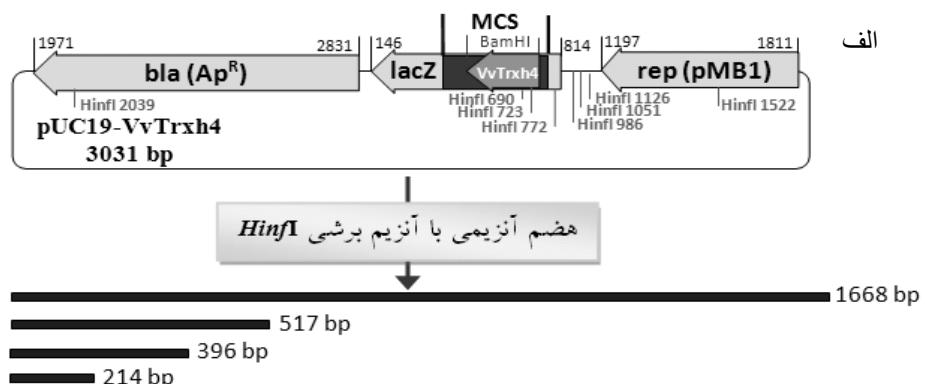
ردیف	نام گیاه	جنس و گونه	نوع تیوردوکسین	نام اختصاصی ژن	شماره دستیابی
۱	آرابیدوپسیس	<i>Arabidopsis thaliana</i>	hI	Z14084	Ath1
				Z35474	Ath3
				Z35473	Ath4
				Z35476	Ath5
			hII	Z35475	Ath2
				BT003140	Ath7
				BT003670	Ath8
			hIII	BT011728	Ath9
				AF144390	AtCxxS1
				BT003671	AtCxxS2
				NM_115500	AtCxxC2
			o	BT025773	Ato1
			f	AF396650	Ato2
			m	AY096721	Atf1
			x	AY059086	Atf2
			y	O48737	Atm1
				AY079362	Atm2
				BT025735	Atm3
				AK227059	Atm4
				BT000355	Atx
				BT010965	Aty1
				BT014871	Aty2
۲	بادام زمینی	<i>Arachnis hypogaea</i>	hI	CD038084	Ahh
۳	برنج	<i>Oryza sativa</i>	hI	Q9FRT3	Osh2
۴	سویا	<i>Glycine max</i>	hI	BI699372	Gmh2
۵	سیب زمینی	<i>Solanum tuberosum</i>	hI	BM111010	Sth
۶	سیب زمینی شیرین	<i>Ipomoea batatas</i>	hI	AY344230	Ibh1
۷	جو	<i>Hordeum vulgare</i>	hI	AY245454	Hvh1
۸	حال واش	<i>Mentha piperita</i>	hI	AY245455	Hvh2
				AW255457	Mph
				AF483625	Pth1
				BU822062	Pth3
				AF483266	Pth2
				BU869308	Pth5
				BU835000	Pth4
			hIII	CA823821	PtCxxS1
				BU874060	PtCxxS3
۹	صنوبر	<i>Populus trichocarpa</i>		XM_002326599	Pto
				XM_002325871	Ptf
				XM_002337401	Ptm
				XM_002310030	Ptx
				XM_002306666	Pty1
				XM_002302134	Pty2
۱۰	کلزا	<i>Brassica napus</i>	hI	U59379	Bnh1
				U59380	Bnh2
۱۱	گریپ فروت	<i>Citrus paradisi</i>	hI	AY271308	Cph
				AY072771	Tah1
۱۲	گندم	<i>Triticum aestivum</i>	hI	AF286593	Tah2
				AF420472	Tah3
۱۳	فلفل قرمز	<i>Capsicum annuum</i>	hI	AY496104	Cah
۱۴	نخود فرنگی	<i>Pisum sativum</i>	hI	AY170650	Psh1
				AJ310990	Psh2
۱۵		<i>Hevea brasiliensis</i>	hI	CB377001	Hbh
۱۶		<i>Ipomoea nil</i>	hI	BJ561302	Inh

pUC19 همسانه‌سازی شده و نتایج توالی‌یابی DNA نشان داد که موقعیت قرارگیری آن روی جایگاه چندگانه همسانه‌سازی^{۱۰} ناقل در جهت معمولی می‌باشد که با نتایج بدست آمده توسط هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* مطابقت داشت (شکل ۱).

¹⁰ Multiple cloning site

نتایج و بحث

جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی اسید‌آمینه‌ای و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین بدست آمده از RT-PCR از cDNA رمز کننده VvTrx h4 با استفاده از تکنیک RT-PCR از بافت حبه انگور عسکری، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی



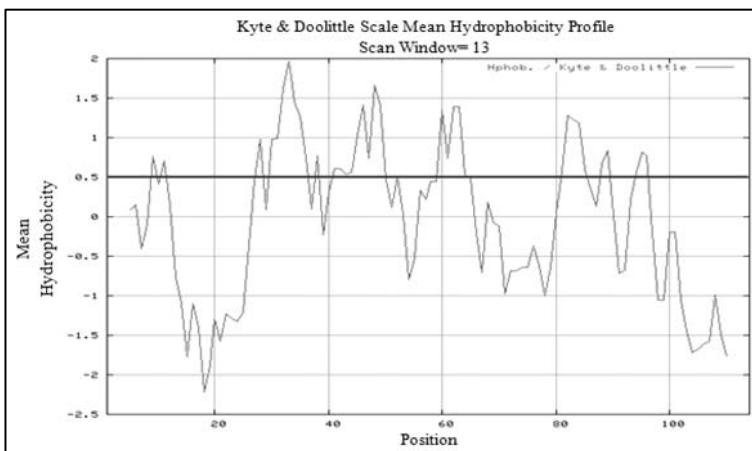
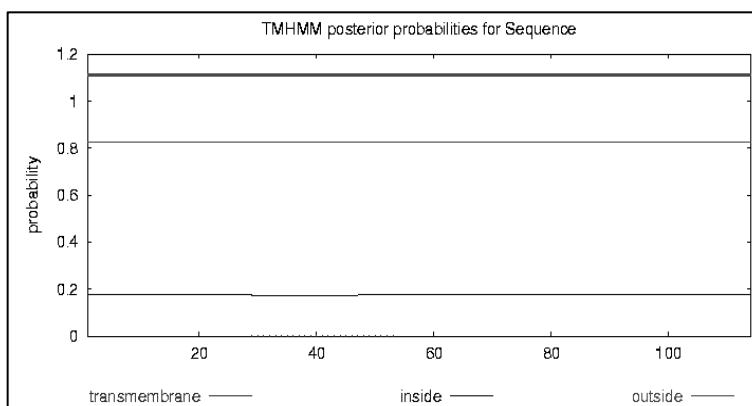
شکل ۱ - ساختار ناقل نوترکیب *pUC19-VvTrx h4* و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد به منظور تعیین جهت ژن همسانه‌سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI*. الف) ناقل نوترکیب حاوی ژن *VvTrx h4* در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی (MCS) می‌باشد. همچنین توالی مسئول رونوشتبرداری ناقل نوترکیب (pMB1)، ژن‌های *lacZ* و مقاومت به آمپیسیلین (*Ap^R*) و جایگاه چندگانه برای همسانه‌سازی روی ناقل نوترکیب نشان داده شده‌اند. ب) نتیجه هضم آنزیمی نشان می‌دهد که همسانه‌سازی در جهت معمولی منجر به تولید ۴ باند شده و در جهت عکس ۵ باند تولید می‌کند. M) نشانگر مولکولی ۱ Kb، ۱) پلاسمید غیرنوترکیب هضم نشده، ۲) پلاسمید غیرنوترکیب هضم شده با *HinfI* (۳) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت معمولی، ۴) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در جهت عکس.

الف

```

1 ATGGCGGAAGAGGGACAAGTTGTCGGTGCCACAGTGTGGAATCGTGAAGGAGCAATTCCAGCATGGA
1 M A E E G Q V V G C H S V E S W K E Q F Q H G
70 ATAGAGTCCAAGAAACTGGTGGTGGATATCACTGCTTCAATGGTGTGGGCCATGTCGTGCATTAGC
24 I E S K K L V V V D I T A S W C G P C R V I S
139 CCATTCTGGCAGAGCTTGCAGAAGATGCCTAATGTCGTATTCTCAAGGTGGATGTGGATGAATTG
47 P F L A E L A K K M P N V V F L K V D V D E L
208 GAGACTGTTGCTAAGGAGTGGGAAGTGGAGGCCATGCCAACCTTCTGTTCTGAAAGAAGGAAACGTA
70 E T V A K E W E V E A M P T F L F L K E G N V
277 GTGGACAAGGTTGTGGGTGCAAAAAGAGAAGAAACTGGTGCAGAAGACAGAGAAGCATGCAACTGCTTGA
93 V D K V V G A K R E E L V Q K T E K H A T A *

```



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و شاخص‌های ساختاری در VvTrx h4. الف) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی. اسیدهای آمینه آبی رنگ نشان دهنده موتیف‌های ساختاری در گیر در انتقال سلول به سلول، اسیدهای آمینه قرمز رنگ نشان دهنده توالی جایگاه فعال و اسیدآمینه نارنجی رنگ شامل اسیدآمینه تریپتوфан ویژه می‌باشند. همچنین کدون‌های آغاز و پایان چارچوب باز خواندنی به ترتیب با رنگ‌های سبز و قهوه‌ای نشان داده شده‌اند. ب) بررسی بخش‌های درون سلولی و برون سلولی پروتئین VvTrx h4 با استفاده از شاخص TMHMM. پروتئین VvTrx h4 با داشتن بخش‌های غشائی و خارج سلولی، می‌تواند انتقال پلاسمودسمازی داشته باشد. ج) بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین VvTrx h4. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط قرمز رنگ قرار دارند.

پروتئین)، محاسبه شده بوسیله برنامه ProtParam به ترتیب ۹۱/۳۲ و حدوداً ۳۰ ساعت محاسبه گردید که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین VvTrx h4 و بطور کلی تیوردوکسین‌ها در برابر حرارت می‌باشد (۳۱، ۳۲). شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle (۳۲)، نشان داد که پروتئین VvTrx h4، به دلیل خاصیت احیاء‌کنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز بوده (شکل ۲) (۳۲) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۱۹ اسیدآمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۱۴ می‌باشد. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با برنامه PSORT نشان داد که برخلاف تعدادی از تیوردوکسین‌های نوع *h* که محل فعالیتشان درون میتوکندری، هسته و شبکه آندوپلاسمی است (۳۰، ۴۰، ۴۳، ۵۳ و ۵۴)، پروتئین VvTrx h4 از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن درون سیتوزول قرار دارد.

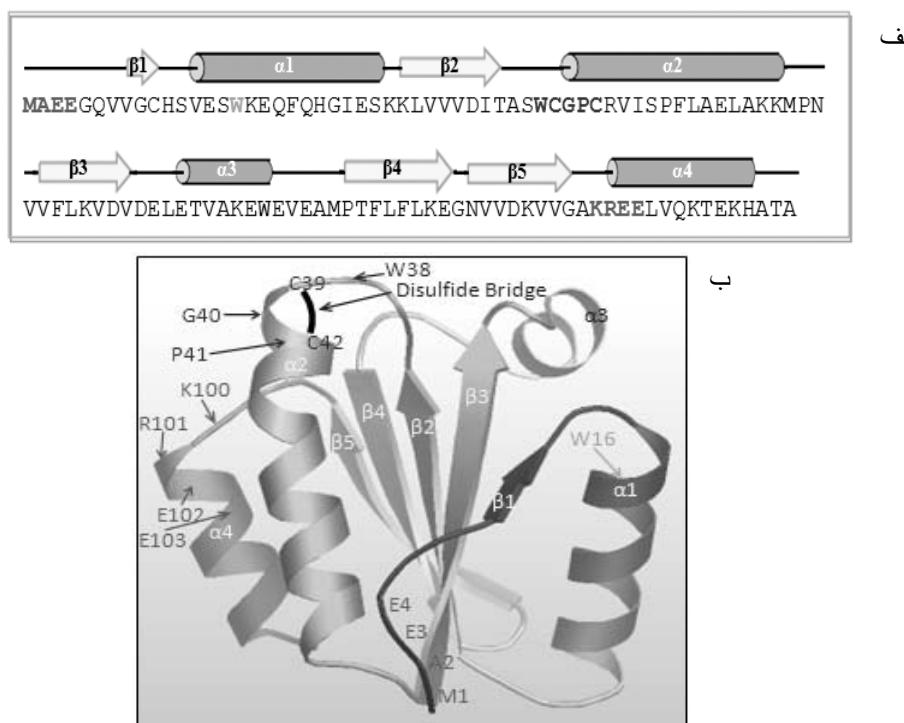
بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین VvTrx h4 بررسی ساختار دوم پروتئین VvTrx h4 با استفاده از برنامه PSIpred نشان داد که این پروتئین مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها، حاوی ۵ رشته β و ۴ مارپیچ α بوده که به ترتیب $\beta_1, \beta_2, \alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \beta_3, \beta_4$ در ساختار دو بعدی پروتئین قرار می‌گیرند (شکل ۳ الف). به هر حال، این نوع آرایش با آنچه که در Vvh10 (با ۶ رشته β و ۴ مارپیچ α) مشاهده گردید (۱)، اندکی تفاوت دارد. در پروتئین VvTrx h4، جایگاه فعال WCGPC مابین انتهای کربوکسیل صفحه ۲ و انتهای آمینی مارپیچ α_2 قرار گرفته و اسیدآمینه ویژه تریپتوфан (Trp16)، چهارمین اسیدآمینه MAEE مارپیچ α_1 را تشکیل می‌دهد. همچنین موتفی ساختاری درون هیچ یک از صفحات β و مارپیچ‌های α قرار نگرفته و تنها یک ساختار مارپیچ پیچیده را در انتهای آمینو توالی پروتئینی تشکیل داده در حالی که موتفی ساختاری KREE به گونه‌ای در بین صفحه β_5 و مارپیچ α_4 قرار گرفته که اسیدهای آمینه Arg101-Glu102-Glu103 انتهای آمینی مارپیچ α_4 را تشکیل می‌دهند (شکل ۳ الف). نحوه و مکان قرارگیری جایگاه فعال و

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب باز خوانی cDNA رمز کننده *h4*, VvTrx، ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HM370527، به طول ۳۴۵ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TGA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۱۴ اسیدآمینه (با ۹۹ درصد یکسانی و ۹۷ درصد شباهت نسبت به توالی اولیه) را رمز می-نماید (شکل ۲ الف). برخلاف توالی پلی‌پپتیدی Vvh10 که دارای جایگاه فعال غیرمعمول RCGLC می‌باشد (۱)، توالی پروتئینی VvTrx h4 دارای یک جایگاه فعال معمول WCGPC بوده و در موقعیت ۱۶ خود یک اسیدآمینه تریپتوファン دارد که یکی از مشخصه‌های ویژه تیوردوکسین‌های نوع *h* بوده و در طی تکامل حفظ شده است (۲۰) (شکل ۲ الف). همچنین مشابه با توالی پلی‌پپتیدی Vvh10 (۱)، در هر دو انتهای آمینو و کربوکسیل توالی پروتئینی VvTrx h4، به ترتیب موتفی‌های ساختاری MAEE و KREE مشاهده می‌شود (شکل ۲ الف) که برای انتقال پروتئین در لوله‌های بافت آبکش از طریق پلاسمودسماata ضروری بوده (۲۶) و تنها در تیوردوکسین‌های گیاهان عالی یافت شده و در تیوردوکسین‌های باکتری‌ها، پستانداران و جلبک‌ها دیده نشده‌اند (۴۷). به هر حال بررسی‌ها با برنامه TMHMM نشان داد که پروتئین VvTrx h4 با داشتن بخش‌های غشائی و خارج سلولی می‌تواند با احتمال زیادی انتقال پلاسمودسماای داشته باشد (شکل ۲ ب)، البته این فعالیت منحصر به فرد نیاز به بررسی‌های دقیق-تری دارد. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی VvTrx h4 با فرمول مولکولی $C_{573}H_{911}N_{147}O_{169}S_6$ برابر ۱۲/۷۶ کیلو Dalton و ۵/۲۲ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۲/۵۶ می‌باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود (۱۳). همچنین شاخص Aliphatic (به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه عمر این پروتئین در محیط درون شیشه (با توجه به وجود یک اسیدآمینه حفظ شده متیونین در انتهای آمینی)

ساختار سه بعدی پروتئین *VvTrx h4* بوسیله برنامه‌های Swiss- MODEL و Swiss PDB-viewer و با استفاده از ساختار کریستالی ژن *Ath1* از آراییدوپسیس (با شماره دستیابی 1xfIA در پایگاه PDB¹¹) به عنوان یک الگو، مورد پیش‌بینی قرار گرفت و *VvTrx h4* مشاهده شد که ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده پروتئین *VvTrx h4* مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها بوده (۲۸ و ۵۵) بطوری که صفحات α_1 , β_2 , β_3 و β_5 به صورت موازی و صفحه β_4 به صورت غیرموازی، طوری کنار هم قرار می‌گیرند که یک صفحه چین‌دار مرکزی را تشکیل داده و توسط مارپیچ‌های α احاطه می‌شوند (شکل ۳ ب). جایگاه فعال، اسیدآمینه تریپتوфан ویژه و سایر موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول به صورت مشخص در شکل ۳ (الف و ب) نشان داده شده‌اند.

¹¹ Protein Data Bank

موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در ساختار دو بعدی پروتئین *VvTrx h4* با سایر تیوردوکسین‌هایی که قبل از گزارش شده‌اند، مشابه می‌باشد (۴۷، ۲۸ و ۴۶/۴۹). پروتئین *VvTrx h4* حاوی ۵۳ مارپیچ α (۰/۴۶/۴۹)، ۱۰ دور β و ۲۲ رشته β (۰/۱۹/۳۰) و ۲۹ مارپیچ اتفاقی (۰/۲۵/۴۴) می‌باشد که با پروتئین *Vvh10* از انگور با ۵۶ مارپیچ α ، ۱۳ دور β و ۲۳ رشته β مارپیچ اتفاقی (۱) به میزان زیادی مشابه می‌باشد. همچنین ساختار دوم پروتئین *Nth2* از تنباکو، *Pth3* از صنوبر و *Osh1* از برج نشان داد. پروتئین *Nth2* حاوی ۵۷ مارپیچ α , ۱۲ دور β , ۲۴ رشته β و ۲۵ مارپیچ اتفاقی (۸)، پروتئین *Pth3* دارای ۵۹ مارپیچ α , ۸ دور β , ۲۵ رشته β و ۳۰ مارپیچ اتفاقی (۱۷) و پروتئین *Osh1* نیز حاوی ۶۶ مارپیچ α , ۱۱ دور β متصل شده توسط ۲۲ رشته β و ۲۳ مارپیچ اتفاقی می‌باشند (۲۷).



شکل ۳- ساختارهای دو بعدی و سه بعدی پروتئین *VvTrx h4*. الف) ساختار دو بعدی با استفاده از برنامه PSIPred. اسیدهای آمینه جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینه تریپتوfan ویژه به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. ب) ساختار سه بعدی با استفاده از برنامه‌های SWISS-MODEL و Swiss PDB-viewer. مارپیچ‌های α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده به طور مشخص در ساختار سه بعدی قابل مشاهده می‌باشند. همچنین اسیدهای آمینه جایگاه فعال، اسیدهای موجود در موتیف-

های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآmine تریپتوфан ویژه با فلاش و به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. نحوه تشکیل پیوند دی‌سولفیدی بین دو اسیدآmine سیستئین جایگاه فعال پروتئین نیز در شکل ۳ ب قابل مشاهده می‌باشد.

VvTrx h4	MAEEGQVVGCHSVESWKEQFQHGIIESKKLVVVDITASWCGPCRVISEFLAELA	53
Vvh3	-----MAEEGQVLGCHSVESWKEQFQHGIIESKKLVVVDFTASWCGPCRVISEFLAELA	53
Vvh2	-----MAEEGQVLGCHSVESWKEQFQHGIIESKKLVVVDFTASWCGPCRVISEFLAELA	53
Vvh10	-----MAEEGQVLGCHSVESWKEQFQHGIIESKKLVVVDFTASWCGPCRVISEFLAELA	53
Vvh1	-----MAEEGQVVGVGHVTVEAWNDHIQCNESNLKLVVDFDTASWCGPCRVISEFLAELA	53
Nth2	-----MAEEGQVIGVHTVDAWNEHILQKGIDDKKLIVVDFDTASWCGPCFKIASFYAELA	53
Csh	-----MAAEEGQVIGCHTVEAWNBCLQKSNETKQLVVVDFDTASWCGPCRVIAPFLAELA	55
Rch1	-----MAAEEGQVIGCHTVEAWNBCLQKGNDTKGLIVVDFDTASWCGPCRVIAPFLAELA	54
Pth3	-----MAAFQGVIGCHTVEAWNBCLQORGNESKKLVVVDFTASWCGPCRVIAPFLAELA	54
Gmh1	-----MAGSSEEGQVISCHTVEEWNDCLQKGNESKKLVVVDFTASWCGPCRVIAPFLAELA	56
Rch2	-----MAEEGQVIACTVEAWTPELEKQGETKKLIVVDFDTASWCGPCRVIAPFLAELA	53
Msh	-----MAAEEGQVIGVHTVEAWKEHEIHKGNENKSLIVVDFDTASWCGPCRVIAPFLAELA	54
Pph	-----MAEENQVIGCHTTQAWEBOLHKGNENKSLIVVDFDTASWCGPCRVIAPFLAELA	53
Nth1	MAANDATSSEEGQVFCHKVVEWNBYFKKGVEETKLLVVVDFDTASWCGPCRVIAPFLADIA	60
Nbh1	-----SSEEGQVFCHKVVEWNEHFQKGVEETKLLVVVDFDTASWCGPCRVIAPFLADIA	53
Osh1	-----MAAEEGUVIAHNKDFDAAQTKAKEAGKVVIIIDFTASWCGPCRVIAPFLADIA	54
H.sapiens	-----MVKQIESKTAFOAIDAAQD--KLVVVDFSAIWCGPCOKMIKEFFHSL	46

VvTrx h4	KKMPNVVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFLFLKEGNVVDKVVGAKREELVCKTEKHAT	113
Vvh3	KKMPNVVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFLFLKEGNVVDKVVGAKREELVCKTEKHAT	113
Vvh2	KKMPNVIFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFLFLKEGNVVDKVVGAKREELVCKTEKHAT	113
Vvh10	KSMPNVVFLKVDVDELETVAKEWEVEAMPTFLFLKIRNVVDKVVGAKREELVCKTEKHAT	113
Vvh1	KRIPTVTFLKVDVDELSVATDWAIVEAMPTFMFLKQGKIVDKVVGAKKDSLQQTIAKHM	113
Nth2	KKMPTVTFLKVDVDELSVATDWAIVEAMPTFMFLKEGKIVDKVVGAKKDELQQTIAKHS	113
Csh	KRLPNVTFLKVDVDELSVATDWAIVEAMPTFMFLKEGKIVDKVVGAKKDELQQTIAKHLA	115
Rch1	KKLPNVTFLKVDVDELTVAHEWAVESAMPTFMFLKEGKIMDKVVGAKKDELQQTIAKHM	114
Pth3	RKLPDVIFLKVDVDELTVAQDWAVEAMPTFMFLKEGKIVDKVVGARKDELQOQTIARHHA	114
Gmh1	KRFTSVIFLKVDVDELSVSDWATEAMPTFVFKVEGTLLIDKVVGAKKDELQQTQKHVA	116
Rch2	KKMPNVTFLKVDVDELSVAEDWAIVEAMPTFMFLKEGKIVHKVVGANKEELQMTIAFYAT	113
Msh	KRLPNVTFLKVDVDELTVAEEWAVAMPTFLFLKEGKIVDKVVGAQKECILQQAATKHAT	114
Pph	KKTPEVTFLKVDVDELRVSEEWGVEAMPTFLFLKEGKIVDKVVGAKKDELQIKWAKHVA	113
Nth1	KKMPHVIFLKVDVDELTVAEEWSVEAMPTFVFIKDGKEVDRVVGAKKEELQQTIVRHAA	120
Nbh1	KKMPHVIFLKVDVDELTVAEEWSVEAMPTFVFLKDGEVDRVVGAKKEELQQTIVRHAA	113
Osh1	KKFPGAVFLKVDVDELEKVAEKYNEAMPTFLFLKDGAEADKVVGARKDDLONTIVRHVG	114
H.sapiens	EKYSNVIIFEVDDCQDVASECEVKOMPTEQFFKKQGEFSGANKERIEATINELV	105

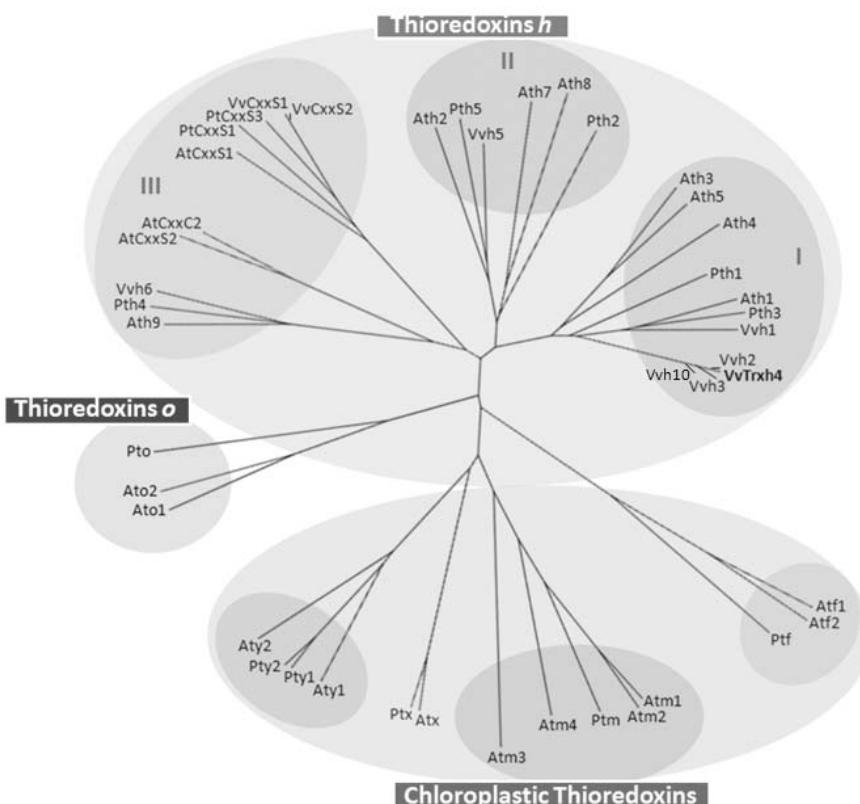
شکل ۴- هم‌دیف‌سازی چندگانه ژن *VvTrx h4* با آیزوفرم‌های نوع *h* انگور، سایر گیاهان و ژن تیوردوکسین انسانی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW. جایگاه فعال، موتفی‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآmine تریپتوfan ویژه به ترتیب با کادرهای قرمز، آبی و نارنجی رنگ نشان داده شده‌اند. نواحی تیره و نیمه روشن به ترتیب نشان دهنده اسیدهای آmine کاملاً محافظت شده و نیمه محافظت شده می‌باشد. همچنین علامت \times نشان دهنده اسیدهای آmine کاملاً یکسان و علامت \circ نمایان گر اسیدهای آmine مشابه می‌باشد. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۱ آمده است.

یکسانی ژن *VvTrx h4* با ژن تیوردوکسین انسانی به ترتیب برابر ۵۰ درصد مشاهده شد. در مقایسه با تیوردوکسین‌های نوع *h* ۷۰ درصد مشاهده شد. در مقایسه با تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور، ژن *VvTrx h4* بیشترین تشابه را با همشکلهای زیرگروه I (hI)، از ۸۰ تا ۹۹ درصد و کمترین تشابه را با همشکلهای زیرگروه III (hIII) به میزان ۶۰ تا ۷۲ درصد دارد. از بین همشکلهای hI بیشترین تشابه را با همشکل *Vvh2* به میزان ۹۹ درصد (درصد یکسانی) و کمترین تشابه را با همشکل *Vvh1* به میزان ۸۰ درصد (درصد یکسانی) دارد. بعلاوه ژن *VvTrx h4* با همشکل *Vvh10* از زیرگروه I (۱)، به ترتیب دارای ۸۱ درصد شباht و ۷۶ درصد یکسانی می‌باشد (جدول ۱).

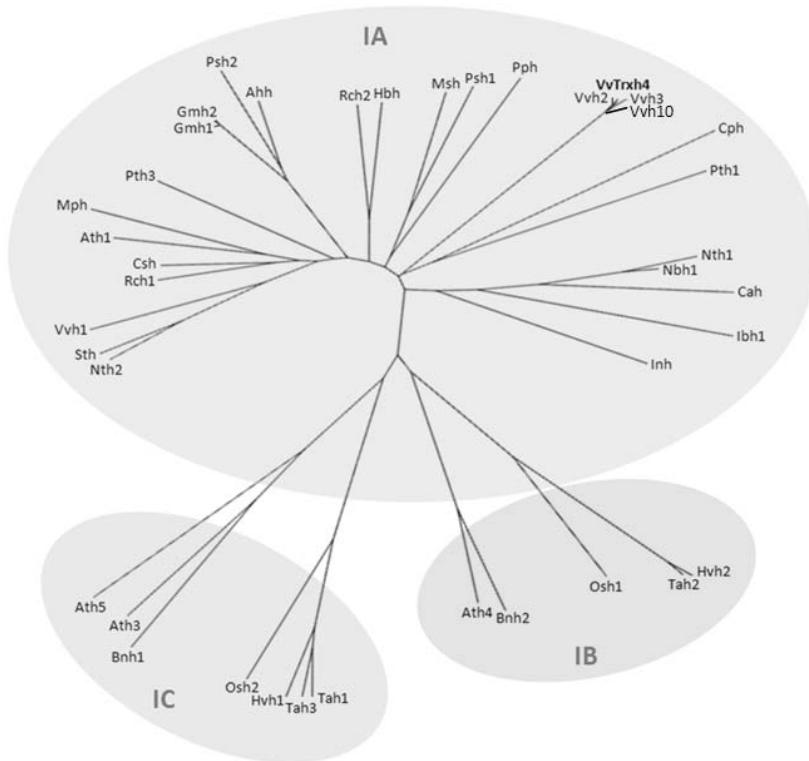
بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی ژن پروتئین ژن *VvTrx h4* با سایر تیوردوکسین‌ها توالی پروتئینی بدست آمده *VvTrx h4* با سایر تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاهان دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین تشابه را با ژن‌های *Pth3* از گیاه صنوبر (*Populus trichocarpa*)، *Citrus* از یک رقم مربوط به جنس مرکبات (*Nicotiana benthamiana*), *Nbh1* از گیاه تنباکو (*Ricinus communis*) و *Rch1* از گیاه کرچک (*Ricinus communis*) به ترتیب به میزان ۷۲٪ (٪ ۷۲٪ یکسانی)، ۷۳٪ (٪ ۷۳٪ یکسانی)، ۸۵٪ (٪ ۸۵٪ یکسانی) و ۷۶٪ (٪ ۷۶٪ یکسانی) دارد (شکل ۴). همچنین میزان شباهت و

بررسی‌ها نشان داده‌اند که این زیرگروه با داشتن موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، در تنظیم رده‌کس ترکیبات بافت آوندی دخالت دارند (۲۶ و ۱۶). تیوردوکسین‌های *Ath8* شامل همشکل‌های *Vvh5* انگور، *Ath2*, *Ath7* و *Ath8* *hII* آرابیدوپسیس و *Pth2* و *Pth5* صنوبیر بوده و از نظر تکاملی، قربت نزدیکی با تیوردوکسین‌های *hI* دارند (شکل ۵). سومین زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* شامل تیوردوکسین‌هایی با جایگاه فعال معمول WCGPC (*Vvh6*) آرابیدوپسیس *Ath9* و *Vvh4* صنوبیر و تیوردوکسین‌های ناهنجار *CxxS1* (*CxxS*) و *AtCxxS1* و *AtCxxS2* آرابیدوپسیس و *PtCxxS1* و *PtCxxS3* آنچه باشد که ویژگی اصلی آنها واکنش با سیستم گلوتاردوکسین/گلوتاکیون می‌باشد (۱۵).

به منظور تعیین نوع و زیرگروه ژن همسانه‌سازی شده *VvTrx h4* بررسی فیلوزنیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبیر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور به روش Unrooted-Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد و مشاهده گردید که تیوردوکسین‌ها به سه گروه اصلی شامل تیوردوکسین‌های کلروپلاستی (*x* و *y*، *o* و *h*) تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۵). تیوردوکسین‌های نوع *h* نیز به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم شده که این گروه‌بندی بر اساس توالی اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی آن‌ها می‌باشد (۱۵ و ۱۶). تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I (*hI*)، شامل همشکل‌های *Ath3*, *Ath1*, *Pth3*, *Vvh1*, *Vvh2*, *Vvh3*, *Vvh10* و *Vvh4*, *Ath3*, *Ath1*, *Pth3*, *Vvh1*, *Vvh2*, *Vvh3*, *Vvh10* و *Vvh4* آرابیدوپسیس و *Pth3* صنوبیر بوده و *Ath4* می‌باشد.



شکل ۵- درخت فیلوزنیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن نوع و زیرگروه ژن *VvTrx h4* با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های گیاهان آرابیدوپسیس، صنوبیر و تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن زیرکلاس ژن *VvTrx h4* با استفاده از تیوردوکسین‌های *hI* انگور و سایر تیوردوکسین‌های *hI*. شماره دستیابی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.

بررسی فیلوژنتیکی تیوردوکسین‌های *hI* از گیاهان مختلف نشان داد که این زیرگروه می‌تواند به سه زیرکلاس مختلف IA، IB و IC تقسیم‌بندی شود (شکل ۶). زیرکلاس IA حاوی ژن *VvTrx h4* به همراه همشکل‌های *Vvh1*, *Vvh2*, *Vvh3* و *Vvh10* انگور و سایر ژن‌ها از گیاهان دولپه‌ای بوده در حالی که زیرکلاس‌های IC و IB، که قرابت بیشتری از نظر تکاملی با یکدیگر دارند، علاوه بر تیوردوکسین‌هایی از آراییدوپسیس و کلزا، شامل تیوردوکسین‌هایی از غلات نیز می‌باشند. تقسیم‌بندی بیشتر تیوردوکسین‌های *hI* بر اساس نوع اسید‌آمینه موجود در موقعیت ۱۰۱ پیشنهاد شده است، بطوری که زیرکلاس‌های IA و IB دارای یک اسید‌آمینه آب‌دوست یا باردار در این موقعیت بوده اما زیرکلاس IC حاوی یک اسید‌آمینه آب‌گریز هستند (۲۰ و ۳۷). به هر حال بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از انواع تیوردوکسین‌ها از گیاهان مختلف نشان می‌دهند که ژن همسانه‌سازی شده

از نوع *h* بوده و به زیرگروه I تعلق داشته و به دلیل وجود یک اسید‌آمینه باردار لیزین در موقعیت ۱۰۰، متعلق به زیرکلاس IA می‌باشد (شکل‌های ۵ و ۶). با توجه به تنوع و دخالت تیوردوکسین‌ها در فرآیندهای متعدد سلولی گیاهان عالی، جداسازی، شناسایی، بررسی فعالیت کاتالیتیکی و بیان آن‌ها در سطوح RNA و پروتئین در بافت‌های مختلف، تحت تنش‌های زنده و یا غیرزنده توصیه شده تا بتوان دیدگاه مناسبی از این پروتئین‌های کوچک، فراوان و مقاوم در برابر حرارت بدست آورده و تحمل به تنش‌های محیطی گیاهان را بهبود بخشد.

سپاسگزاری
نویسنگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مدیریت محترم سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان

13. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571–607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.
14. Gautier MF, Lullien-Pellerin V, De Lamotte-Guery F, Guirao A and Joudrier P (1998) Characterization of wheat thioredoxin *h* cDNA and production of an active *Triticum aestivum* protein in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem., 252:314–2324.
15. Gelhaye E, Rouhier N and Jacquot JP (2003b) Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction. FEBS Lett., 555:443–448.
16. Gelhaye E, Rouhier N and Jacquot JP (2004a) The thioredoxin *h* system of higher plants. Plant Physiol. Biochem., 42:265–271.
17. Gelhaye E, Rouhier N, Gardikas AV, Girardet JM, Sautière PE, Sayzet M, Martin F and Jacquot JP (2003a) Identification and characterization of a third thioredoxin *h* in poplar. Plant Physiol. Biochem., 41:629–635.
18. Gelhaye E, Rouhier N, Gerard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y and Jacquot JP (2004b) A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. Plant Biol., 101(40):14545–14550.
19. Gelhaye E, Rouhier N, Laurent P, Sautiere PE, Martin F and Jacquot JP (2002) Isolation and characterization of an extended thioredoxin *h* from poplar. Physiol. Plantarum, 114:165–171.
20. Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N and Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 62:24–35.
21. Haffani YZ, Gaude T, Cock JM and Goring DR (2004) Antisense suppression of thioredoxin *h* mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. Plant Mol. Biol., 55:619–630.
22. Hall M, Cabana AM, Akerlund H, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M and Kieselbach T (2010) Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. Proteomics, 10(5):987–1001.
23. Hasdai M, Elmaci C, Goldschmidt EE, Drobys S and Porat R (2004) Isolation of a thioredoxin *h* cDNA from grapefruit peel tissue that is induced upon infection by *Penicillium digitatum* and elicitation of pathogen resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol., 65(6):277–283.
24. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K and Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. J. Biol. Chem., 274(39):27891–27897.
25. Huang DJ, Chen HJ, Hou WC and Lin YH (2004) Isolation and characterization of thioredoxin *h* cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage roots. Plant Sci., 166(2):515–523.

قزوین و مدیریت مرکز تحقیقات انگور تاکستان که ما را در امر نمونه‌برداری یاری نمودند ابزار می‌دارد.

منابع

1. موسوی ش، حداد ر، گروسی قع، و حسینی ر (۱۳۸۹) همسانه سازی و بررسی ساختار ژن تیوردوکسین *h* از بافت حبه انگور یاقوتی (*Vitis vinifera* L. cv. Yaquti)، مجله فن‌آوری زیستی در کشاورزی، ۹، ش ۱: ۲۶–۱۷.
2. Alkhaifioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB and Montrichard F (2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol., 144:1559–1579.
3. Arner ESJ and Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem., 267:6102–6109.
4. Baumann U and Juttner J (2002) Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 59:1042–1057.
5. Besse I and Buchanan BB (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. Bot. Bull. Acad. Sin., 38:1–11.
6. Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Aci. Res., 7:1513–1525.
7. Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ and Goring DR (1996) Two members of the thioredoxin-*h* family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. Plant Cell, 8(9):1641–1650.
8. Brugidou C, Marty I, Chartier Y and Meyer Y (1993) The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. Mol. Gen. Genet., 238(1-2):285–293.
9. Buchanan BB, Schürmann P, Wolosiuk RA and Jacquot JP (2002) The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. Photosyn. Res., 73:215–222.
10. Callahan AM, Morgens PH and Cohen RA (1993) Isolation and initial characterization of cDNAs for mRNAs regulated during peach fruit development. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 118:531–537.
11. Cazalais R, Pulido P, Aussénac T, Perez-Ruiz JM and Cejudo FJ (2006) Cloning and characterization of three thioredoxin *h* isoforms from wheat showing differential expression in seeds. J. Exp. Bot., 57:2165–2172.
12. Cohen SN, Chang ACY and Hsu L (1972) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 69:2110–2114.

27. Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H and Chino M (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, 195(3):456–463.
28. Jacquot JP, Lancelin JM and Meyer Y (1997) Thioredoxin: structure and function in plant cells. *New Phytol.*, 136:543–570.
29. Joudrier P, Gautier MF, de Lamotte F and Kobrehel K (2005) The thioredoxin *h* system: potential applications. *Biotech. Adv.*, 23:81–85.
30. Juttner J, Olde D, Langridge P and Baumann U (2000) Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *Eur. J. Biochem.*, 267:7109–7117.
31. Kim YJ, Shim JS, Krishna PR, Kim SY, In JG, Kim MK, Kim DC (2008) Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng*. C. A. Meyer. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 26:335–349.
32. Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157:105–32.
33. Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y and Reichheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.*, 134:1006–1016.
34. Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienberger JM, Bonnard G and Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:14144–14149.
35. Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D and Croteau R (2000) Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(6):2934–2939.
36. Lucas S, Hammon N, Glavina del Rio T, Detter J, Dalin E, Tice H, Pitluck S, Tuskan G, Chapman J, Putnam NH, Salamov AA, Terry A, Grigoriev IV and Rokhsar D (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Sci.*, 313(5793):1596–1604.
37. Maeda K, Finnie C, Ostergaard O and Svensson B (2003) Identification, cloning and characterization of two thioredoxin *h* isoforms, *HvTrxh1* and *HvTrxh2*, from the barley seed proteome. *Eur. J. Biochem.*, 270:2633–2643.
38. Maeda K, Hagglund P, Finnie C, Svensson B and Henriksen A (2008) Crystal structures of barley thioredoxin *h* isoforms *HvTrxh1* and *HvTrxh2* reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. *Prot. Sci.*, 17:1015–1024.
39. Martin JL (1995) Thioredoxin- a fold for all reasons: the thioredoxin fold is a characteristic protein structural motif that has been found in five distinct classes of proteins that have the common property of interacting with cysteine-containing substrates. *Curr. Biol.*, 3:245–250.
40. Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemieux PG and Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin
26. Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M and Lucas WJ (1998) Rice phloem thioredoxin *h* has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta*, 205:12–22. required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *PNAS*, 107(8):3900–3905.
41. Mestres-Ortega D and Meyer Y (1999) The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene*, 240 (2):307–316.
42. Meyer Y, Reichheld JP and Vignols F (2005) Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosyn. Res.*, 86:419–433.
43. Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F and Reichheld JP (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Act.*, 1783:589–600.
44. Montrichard F, Renard M, Alkhalfioui F, Duval FD and Macherel D (2003) Identification and differential expression of two thioredoxin *h* isoforms in germinating seeds from pea. *Plant Physiol.*, 132(3):1707–1715.
45. Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimar BG and Netto LES (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochem.*, 49(15):3317–3326.
46. Park SK, Jung YJ, Lee JR, Lee YM, Jang HH, Lee SS, Park JH, Kim SY, Moon JC, Lee SY, Chae HB, Shin MR, Jung JH, Kim MG, Kim WY, Yun DJ, Lee KO and Lee SY (2009) Heat-shock and redox-dependent functional switching of an *h*-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiol.*, 150:552–561.
47. Peterson FC, Lytle BL, Sampath S, Vinarov D, Tyler E, Shaham M, Markley JL and Volkman BF (2005) Solution structure of thioredoxin *h1* from *Arabidopsis thaliana*. *Prot. Struc. Rep.*, 14:2195–2200.
48. Piaz FD, Braca A, Belisario MA and De Tommasi N (2010) Thioredoxin system modulation by plant and fungal secondary metabolites. *Curr. Med. Chem.*, 17(5):479–494.
49. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F and Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.*, 6:27–37.
50. Rivera-Madrid R, Mestres D, Marinho P, Jacquot JP, Decottignies P, Miginiac-Maslow M and Meyer Y (1995) Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:5620–5624.
51. Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot JP (2002) Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973:520–528.
52. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual'. 3nd ed. Vol:1-3. Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

53. Serrato AJ and Cejudo FJ (2003) Type-*h* thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 217:392–399.
54. Serrato AJ, Crespo JL, Florencio FJ and Cejudo FJ (2001) Characterization of two thioredoxins *h* with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol. Biol.*, 46:361–371.
55. Shahpiri A, Svensson B and Finnie C (2009) From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barely seeds. *Mol. Plant*, 1–12.
56. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP and Kehrer JP (2004) Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol. Sci.*, 78: 3–14.
57. Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Gruber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J and Fradeliz D (1988) Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, 263(30):15506-15512.