



بر همکنش فرم نو ترکیب تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH (NTR) از گیاه برنج با تیوردوکسین (Trx) از دو منشا گیاهی و باکتریایی

هدیه اسلام پناه¹، آذر شاه پیری^{2*}، احسان شیخ الاسلام³

^{1,3} کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

² استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

تاریخ دریافت: 1391/05/31، تاریخ پذیرش: 1392/04/06

چکیده

حفظ تعادل شرایط اکسیداسیون- احیا (ردوکس) در سلول برای انجام متابولیسم‌های مختلف سلولی و فعالیت مسیرهای انتقال پیام بسیار حیاتی است. در موجودات زنده مکانیسم‌های مختلف مولکولی در حفظ این تعادل نقش دارند. سیستم تیوردوکسین وابسته به NADPH سیستمی متشکل از تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH، تیوردوکسین و NADPH می‌باشد که نقش مهمی در انتقال الکترون از NADPH به باندهای دی‌سولفیدی در بسیاری از پروتئین‌های سلولی دارد و بدین ترتیب با تنظیم تبادلات تیول-دی سولفید در حفظ تعادل ردوکس سلولی دخالت دارد. در تحقیق حاضر توالی ژن کدکننده‌ی یکی از ایزوفرم‌های NTR از گیاه برنج که قبلاً OsNTRB نامیده شده بود، در ناقل بیانی pET28a به همراه شریک الحاقی His₆-tag همسانه‌سازی و پلاسمید نو ترکیب به میزبان بیانی اشرشیا کلی (*E. coli*) سویه Rosetta (DE3) منتقل شد. مقدار قابل توجهی از فرم نو ترکیب این پروتئین پس از القا محیط کشت باکتری با IPTG تولید و با استفاده از کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شد. بیان هترولوگ و خالص‌سازی فرم نو ترکیب OsNTRB امکان بررسی برهمکنش این پروتئین را با دو تیوردوکسین موجود از دو منشا مختلف گیاه جو (HvTrxh1) و باکتری اشرشیاکلی (EcTrx) فراهم ساخت. نتایج نشان داد فرم نو ترکیب OsNTRB در محیط این ویترال فعال بوده و در حضور NADPH می‌تواند هر دو تیوردوکسین گیاهی و باکتریایی را احیا نماید. با این حال سرعت برهمکنش آن با تیوردوکسین HvTrxh1 بسیار بالاتر از EcTrx بوده و تفاوت قابل توجهی نشان داد.

واژه های کلیدی: برنج، تیوردوکسین ردوکتاز، تیوردوکسین، پروتئین نو ترکیب.

مقدمه

سیستم‌های دهنده الکترونی مختلفی احیا می‌شود. در پلاستیدها، احیای Trx ها (x, m, f, y) وابسته به نور و به واسطه آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) می‌باشد (Buchanan et al., 2002). در خارج از کلروپلاست، Trx های o و h همانند Trx در باکتری‌ها، قارچ‌ها و پستانداران به وسیله NADPH به واسطه آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH (NTR) احیا می‌شوند (Dai et al., 1996; Arner et al., 1999; Waksman et al., 1994). NTR ها آنزیم‌های متعلق به خانواده فلاووپروتئین اکسیدوردوکتازها هستند که شامل پروتئین‌هایی مانند لیپوآمید_دهیدروژناز، گلوکاتایون ردوکتاز و مرکوریک یون ردوکتاز می‌باشند (Mustachich & Powis, 2000). NTR ها پروتئین‌هایی دارای دو زیر واحد یکسان می‌باشند که به دو دسته با وزن مولکولی پایین و وزن مولکولی بالا تقسیم می‌شوند. NTR ها با وزن مولکولی بالا در موجوداتی مانند پستانداران، پرندگان و حشرات یافت می‌شوند که هر زیر واحد دارای وزن مولکولی حدودا 55 کیلودالتون می‌باشد (Arner et al., 1999). NTR ها در گیاهان شباهت بیشتری به NTR موجود در پروکاریوت‌ها و قارچ‌ها دارند و در گروه NTR با وزن مولکولی پایین قرار می‌گیرند. اعضای این خانواده، پروتئین‌هایی با دو زیر واحد یکسان حاوی 310-330 آمینو اسید و وزن مولکولی حدودا 35 کیلودالتون هستند که هر زیر واحد

تیوردوکسین (Trx) ها، پروتئین‌های کوچکی با وزن مولکولی 14-12 کیلودالتون هستند، که به واسطه وجود دو سیستمین در جایگاه فعال خود (WCG/PPC) در احیاء باندهای دی‌سولفیدی پروتئین‌های هدف شرکت‌کننده در فرآیندهای مختلف سلولی نقش مهمی را در سلول ایفا می‌کنند. به عنوان مثال با دادن الکترون به پراکسی‌ردوکسین‌ها به عنوان یکی از پروتئین‌های هدف نقش مهمی در حذف سمیت پراکسید هیدروژن در سلول دارند (Holmgren, 1985; Chae et al., 1999; Elias et al., 2000). در گیاهان بر خلاف پستانداران، باکتری‌ها و قارچ‌ها ایزوفرم‌های مختلفی از Trx وجود دارد که در قسمت‌های مختلف سلولی مانند کلروپلاست، میتوکندری، سیتوزول و هسته پراکنده‌اند (Gelhay et al., 2005; Meyer et al., 2005). ایزوفرم‌های مختلف Trx، بر اساس ساختمان اولیه و محل استقرار در شش زیر خانواده گروه‌بندی شده‌اند. Trx های x, m, f, y در کلروپلاست، Trx o در میتوکندری و Trx h در سیتوزول قرار دارند (Lemaire et al., 2001; Laloï et al., 2007). با این حال Trx های h در قسمت‌های دیگر سلولی مانند هسته، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری و Trx های f و m نیز در بافت‌های غیر فتوسنتتیک شناسایی شده‌اند (Gelhay et al., 2005). باندهای دی‌سولفیدی در جایگاه فعال Trx ها با

توالی آمینواسیدی OsNTRB واقع بر لوکوس Os02g48290 مرتبط با گیاه برنج، در پایگاه اطلاعاتی Rice genome annotation (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) مورد جستجو قرار گرفت. توالی پروتئینی دیگر NTRهای گیاهی با استفاده از نرم افزار BlastP در پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد. هم‌ریدیف‌سازی NTRهای گیاهی با استفاده از نرم افزار ClustalW2 انجام شد.

بیان هترولوگ NTR در باکتری *E. coli*

به منظور بیان پروتئین نوترکیب، ابتدا پلاسمید نوترکیب pJET-OsNTRB حاوی ژن کدکننده OsNTR (Eslampanah et al., 2012)، با استفاده از آنزیم های برشی *EcoRI* و *HindIII* هضم شد و قطعه OsNTR به کمک آنزیم T4DNA- Ligase در دمای 22 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت و 30 دقیقه، به دو انتهای پلاسمید بیانی pET28a که با استفاده از همین آنزیم های برشی خطی شده بود، متصل شد. محصول الحاق با استفاده از روش الکتروپوریشن در دستگاه Electroporator به سلولهای مستعد شده *DH5α* منتقل و بر روی محیط کشت جامد حاوی کانامایسین کشت شد. با استفاده از روش غربالگری سریع، کلونهای حاوی قطعه ژنی مورد نظر جداسازی و به منظور تایید حضور قطعه همسانه‌سازی شده، استخراج پلاسمید از کلونی‌های مورد نظر انجام و هضم آنزیمی با دو آنزیم برشی *EcoRI* و *HindIII*

دارای دو دومین، یکی متصل به NADPH و دیگری متصل به FADH و یک جایگاه فعال CXXC جهت احیا باندهای دی‌سولفیدی می‌باشد (Dai et al., 1996; Marcos et al., 2010). در سلول در هنگام برهمکنش NTR با Trx، الکترون‌ها از NADPH از طریق FADH به جایگاه فعال NTR منتقل و در نهایت با انتقال به باندهای دی‌سولفیدی موجود در جایگاه فعال Trx h باعث احیای آن می‌شوند.

یکی از سوالاتی که در مورد سیستم NTR/Trx مطرح می‌باشد این است که آیا آنزیم NTR به شکل یکسانی با Trx h های مختلف برهمکنش دارد و یا این برهمکنش تحت تاثیر ساختمان تیوردوکسین قرار می‌گیرد؟ جهت پاسخ به این سوال در این تحقیق ژن کدکننده یکی از ایزوفرم‌های NTR (OsNTRB) از گیاه برنج که قبلاً جداسازی و همسانه‌سازی شده بود (Eslampanah et al., 2012) به باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*)، منتقل و فرم نوترکیب این آنزیم تولید و خالص‌سازی شد. تولید فرم نوترکیب NTR از گیاه برنج امکان مقایسه برهمکنش این آنزیم را با فرم‌های نوترکیب Trx موجود با منشا گیاهی مانند Trx h از گیاه جو (*HvTrxh1*) و همچنین Trx از باکتری اشرشیاکلی (*EcTrx*) را در محیط این ویترو فراهم ساخت.

مواد و روش ها

آنالیز توالی

کلریدریک، $\text{pH} = 8$) به رسوب داخل لوله‌های اپندورف 50 میلی‌لیتری اضافه شد و رسوب به طور کامل حل گردید. دیواره‌ی باکتری‌ها با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (مدل UP50H، ساخت شرکت Hielscher) شکسته شد و در زمان‌های مختلف یک قطره از سوسپانسیون باکتری زیر میکروسکوپ بررسی شد تا تقریباً از شکست دیواره‌ی همه باکتری‌ها اطمینان حاصل گردد. لوله‌های اپندورف به مدت 15 دقیقه در 12000 دور در دقیقه (18514g) سانتریفوژ شدند. فاز بالا به یک لوله‌ی اپندورف 25 میلی‌لیتری تازه منتقل شد و به منظور انجام مراحل بعدی در دمای 20°C - نگهداری شدند.

خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی جذبی انجام شد. بدین منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستون‌های His-Trap HP (ساخت شرکت GE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافر A بارگذاری (ایمیدازول 10 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، $\text{pH} = 8$) به تعادل رسیده بودند، عبور داده شدند. جهت شستشوی پروتئین‌های باند شده غیر اختصاصی میزان 10 میلی‌لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد شامل (ایمیدازول 400 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، $\text{pH} = 8$) و بافر A فیلتر شده سرد با نسبت 10٪ بافر B و 90٪ بافر A بر روی ستون بارگذاری گردید و اجازه داده شد تا از ستون خارج گردد. سپس جهت جداسازی

صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها جهت توالی‌یابی فرستاده شدند و از آغازگرهای رفت و برگشت T7 برای توالی‌یابی آنها استفاده شد. پس از تایید توالی، پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) منتقل شدند. با توجه به وجود ژن مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین بر روی پلاسمید pET28a و همچنین مقاومت باکتری‌های Rosetta (DE3) به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، سویه‌های Rosetta (DE3) حاوی پلاسمیدهای نوترکیب بر روی محیط کشت حاوی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین و 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر کلرامفنیکل قادر به رشد بودند. به منظور تولید پروتئین از این سویه‌های نوترکیب، سلول‌های باکتری در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در محیط کشت LB حاوی این دو آنتی‌بیوتیک رشد داده شدند. وقتی A_{650} به 0/6 رسید، 100 میکرومولار IPTG به عنوان القا کننده به محیط کشت اضافه شد و کشت باکتریایی به مدت 4 ساعت دیگر ادامه یافت. سپس سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ رسوب داده شد و در دمای 20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی فاز محلول و خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی جذبی

جهت استخراج پروتئین‌های فاز محلول، به ازای رسوب 50 میلی‌لیتری از 250 میلی‌لیتر کشت القاء شده‌ی باکتری، 2500 میکرولیتر از بافر تریس (10 میلی‌مولار تریس-اسید

پروتئین هدف 10 میلی‌لیتر بافری حاوی 40٪ بافر B و 60٪ بافر A بر روی ستون بارگذاری گردید و هر میلی‌لیتر خروجی ستون در لوله‌های اپندورف 1/5 میلی‌لیتری لوله‌های اپندورف بر روی یخ در دمای 4°C نگهداری شدند. کیفیت خلوص پروتئین خارج شده در ویال‌ها با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت پروتئین نوترکیب His₆-ONTRB با استفاده از روش تعیین جذب در طول موج 280 نانومتر و قانون بیر-لمبرت تعیین شد.

0/1 EDTA، میلی مولار 0/2 (pH= 7/5)، میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوین سرم آلبومین (BSA)، 200 میکرومولار DTNB، 200 میکرومولار NADPH و غلظت 5 میکرومولار از هر کدام از پروتئین‌های نوترکیب (Shahpiri et al. 2008) HvTrxh1 و EcTrx (خریداری شده از شرکت سیگما) بود. واکنش‌ها با اضافه کردن 40 نانومولار OsNTRB آغاز شد و مقدار جذب نوری در طول موج 415 نانومتر به مدت 30 دقیقه با اسپکتروفوتومتر (Beckman DU 530) اندازه‌گیری و ثبت شد. لازم به ذکر است یک واکنش حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در واکنش بدون حضور تیوردوکسین به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد.

نتایج

آنالیز توالی آمینواسیدی OsNTRB

به منظور ردیابی پروتئین نوترکیب مورد نظر، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. بافر بارگذاری 5X (313 میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک (pH= 6/8)، 10 SDS، 50 درصد، گلیسرول 50 درصد، برومو فنول بلو 0/05 درصد) و 4 میکرولیتر دی‌تیوتریتول (DTT) 20X با هریک از نمونه‌ها مخلوط گردید و به مدت 10 دقیقه در 95°C جوشانده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه سانتیفریژ گردیدند و 14 میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها تزریق شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش کوماسی بلو R-250 صورت گرفت (Sambrook et al., 2001).

توالی آمینواسیدی OsNTRB از 331 مولکولی 34/67 کیلوالتون pI = 6/18 می‌باشد. OsNTRB با یکی از ایزوفرم‌های NTR از گیاه جو (HvNTR2) که به عنوان یک ایزوفرم میتوکندریایی / سیتوپلاسمی قبلاً مشخصه‌یابی شده است (Shahpiri et al., 2008)، دارای 91٪ شباهت در توالی آمینواسیدی است. در توالی OsNTRB همانند دیگر ایزوفرم‌های NTR از نوع میتوکندریایی / سیتوپلاسمی، موتیف‌های متصل شونده به FAD به صورت توالی GXGXA و TXXXXVFAAGD و موتیف

بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE

به منظور ردیابی پروتئین نوترکیب مورد نظر، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. بافر بارگذاری 5X (313 میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک (pH= 6/8)، 10 SDS، 50 درصد، گلیسرول 50 درصد، برومو فنول بلو 0/05 درصد) و 4 میکرولیتر دی‌تیوتریتول (DTT) 20X با هریک از نمونه‌ها مخلوط گردید و به مدت 10 دقیقه در 95°C جوشانده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه سانتیفریژ گردیدند و 14 میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها تزریق شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش کوماسی بلو R-250 صورت گرفت (Sambrook et al., 2001).

تعیین سرعت واکنش OsNTRB با Trx در حضور NADPH

مخلوط واکنش در حجم 300 میکرولیتر شامل 100 میلی مولار پتاسیم فسفات

پس از اتصال قطعه OsNTR به ناقل بیانی (شکل 2) و تایید توالی ژنی همسانه‌سازی شده، دستواره مورد نظر به میزبان بیانی Rosetta (DE3) که از سویه‌های باکتری اشیریشیا کلی است، منتقل گشت. پس از القای باکتری‌ها با IPTG، فاز محلول پروتئین از باکتری‌ها استخراج شد و آنالیز کل پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE صورت گرفت. قابل ذکر است که نمونه کنترل بدون تلقیح IPTG در کنار نمونه اصلی در نظر گرفته شد (شکل 3).

متصل شونده به NADPH با توالی GXGXXA مشاهده می‌شود. منطقه جایگاه فعال نیز حاوی دو سیستم با توالی CAVC می‌باشد (شکل 1).

بیان هترولوگ OsNTRB در باکتری *E. coli* و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب

توالی ژن کد کننده OsNTRB که از بافت ساقه گیاه برنج جداسازی و در پلاسمید pJET همسانه سازی شده بود (Eslampanah et al., 2012) و ناقل بیانی pET-28a(+) هریک تحت واکنش هضمی با دو آنزیم برشی *HindIII* و *EcoRI* هضم و خالص‌سازی شدند (شکل 2).

1

```

OsNTRB MEGSAGAPLRTRVCIIGSGPSAHTAAIYAARAELKPVLFEGWLANDIAAGGQLTTTTDVE 60
HvNTR2 MEGSAAAPLRTRVCIIGSGPAAHTAAIYAARAELKPVLFEGWMANDIAAGGQLTTTTDVE 60
*****

OsNTRB NFPGFPEGLGGLMDRCRAQSLRFGTIISETVTAVDFSARPFVAVSDSTTVLADAVVV120
HvNTR2 NFPGFPTGIMGIDLMDNCRAQSVRFGTNISETVTEVDFSARPFVAVSDSTTVLADTVVV120
*****

OsNTRB
ATGAVARRLHFAGSDAYWNRGISACAVCD2PIFRNKPIAVIGGGD3EESNFLT4KYGY180
HvNTR2 ATGAVARRLYFSGSDTYWNRGISACAVCDGAAPIFRNKPIAVIGGGDSAMEEGNFLT4KYGY180
*****

OsNTRB
SHVYIIHRRNTFRASKIMQARALSNPKIQVFDSEVVEAYGGEGGGPLAGVKVKNLVTGK240
HvNTR2
SQVYIIHRRNTFRASKIMQARALSNPKIQVVWDSEVVEAYGGAGGGPLAGVKVKNLVTGE240
*****

OsNTRB
ISDLQVSGLFFAIGHEPATKFLGGQLELDADGYVATKPGSTHTSV4KGVFAAGDVQDKKYR300
HvNTR2
VSDLQVSGLFFAIGHEPATKFLNGQLELHADGYVATKPGSTHTSVEGVFAAGDVQDKKYR300
*****

OsNTRB QAITAAGSGCMAALDAEHLQEVGAQEGKAD 331
HvNTR2 QAITAAGSGCMAALDAEHLQEVGAQVGKSD 331
*****

```

شکل 1- هم‌ردیف سازی توالی آمینو اسیدی دو NTR نوع سیتوزول/ میتوکندری از گیاه برنج (OsNTRB) و جو (HvNTR2). جعبه 1 و 4: موتیف اتصال FAD جعبه 3: موتیف اتصال NADP جعبه 2: موتیف مربوط به دو سیستمین در جایگاه فعال NTR.

Figure 1- Multiple alignment between cytoplasmic/mitochondrion type NTRs from rice (OsNTRB) and barley (HvNTR2). FAD-binding motifs (Box1 and Box4), NADP-binding motif (Box 3), and two Cys residues in the active site motif (Box 2).

نو ترکیب 21/544 میکرومولار تخمین زده شد و میزان پروتئین خالص His-OsNTRB به دست آمده به ازای هر لیتر محیط کشت باکتری 5 میلی گرم بود.

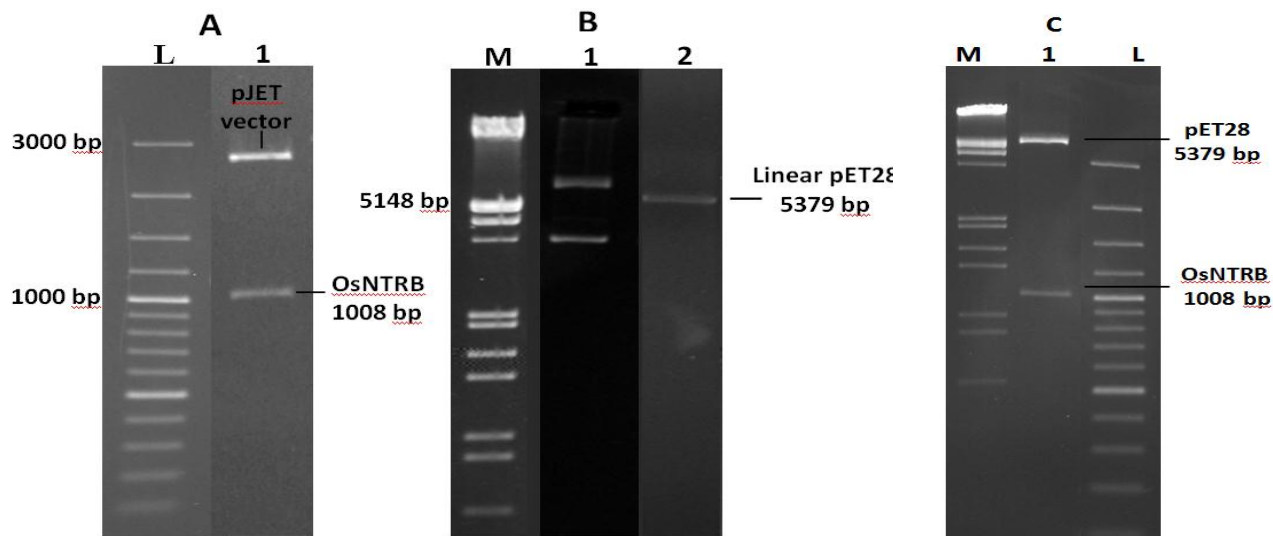
برهمکنش OsNTRB با دو تیوردوکسین گیاهی و باکتریای

در سلول گیاهان الکترون از NADPH به NTR و سپس از NTR به Trx h انتقال می یابد. Trx h احیا شده متعاقباً به عنوان یک عامل احیا کننده قادر به احیا کردن تعداد زیادی از پروتئین ها می باشد. هولمگرن در سال 1977 (Holmgren, 1977) نشان داد که در محیط این ویترو نیز در صورتی که آنزیم NTR با NADPH احیا گردد می تواند باعث احیای باند دی سولفیدی در جایگاه فعال Trx h گردد. با به کار بردن DTNB در واکنش به عنوان سوبسترای نهایی، Trx h احیا شده آن را احیا نموده و به TNB که یک ماده زرد رنگ است تبدیل می کند. این ماده زرد رنگ در طول موج 412 نانومتر بیشترین جذب را دارد. لذا با اندازه گیری میزان شدت رنگ زرد در طول موج 412 نانومتر و با ثبت میزان جذب در هر دقیقه، نمودار میزان جذب در زمان را می توان رسم نمود.

با توجه به وجود منطقه کدکننده پلی هیستیدین (His-tag) در بالا دست جایگاه کلون سازی در پلاسمید pET28a پروتئین نو ترکیب حاصل دارای دنباله پلی هیستیدین در انتهای آمینو می باشد. وزن مولکولی پیش بینی شده برای پروتئین های نو ترکیب His-OsNTRB 38/49 کیلو دالتون و نقطه ی ایزوالکتریک آن 6/9 می باشد. وجود باند پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین نو ترکیب His-OsNTRB در مقایسه با سویه کنترل را تایید کرد (شکل 3).

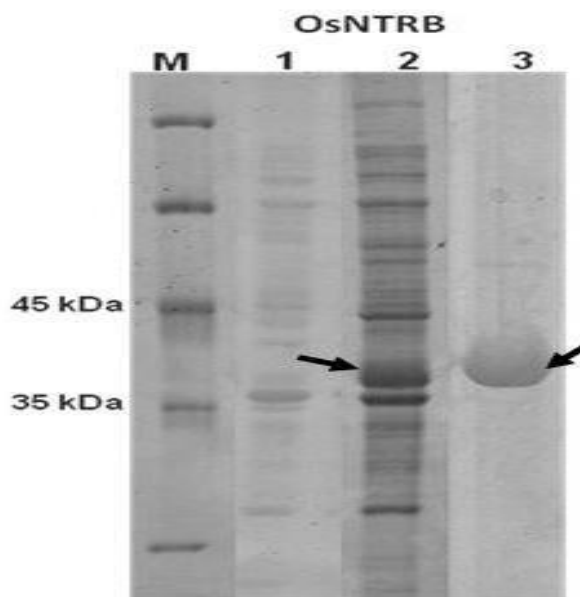
خالص سازی پروتئین های نو ترکیب از دیگر پروتئین های باکتری با استفاده از کروماتوگرافی جذبی بر روی ستون های حاوی رزین نیکل (Ni^{2+})، فراهم گشت و سپس به منظور ارزیابی کیفیت خالص سازی، پروتئین پس از خالص سازی بر روی SDS-PAGE بارگذاری شد (شکل 3). عدم وجود باندهای اضافی نشان دهنده کیفیت بالای خالص سازی است.

به منظور تعیین غلظت پروتئین نو ترکیب خالص شده، ابتدا میزان جذب نمونه پروتئینی در 280 نانومتر اندازه گیری شد و ضریب خاموشی مولی آن با استفاده از نرم افزار ProtParam در پایگاه اطلاعاتی Expasy محاسبه شد و نهایتاً در فرمول بیر-لمبرت قرار داده شد. غلظت پروتئین



شکل 2- آماده سازی قطعه OsNTRB و ناقل بیانی pET-28a به منظور همسانه سازی قطعه ORF در وکتور بیانی. A: L: DNA Ladder 100 bp ستون 1: قطعه ژن کد کننده OsNTRB به طول 1008bp جدا شده از پلاسمید pJET/ OsNTRB پس از برش با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* M B: نشانگر مولکولی III، ستون 1: پلاسمید pET-28a استخراج شده از باکتری DH5a ستون 2: پلاسمید بیانی pET-28a به طول 5379 bp هضم شده با دو آنزیم برشی *EcoRI* و *Hind III*: C: تایید همسانه سازی ژن در پلاسمید pET-28a با استفاده از هضم آنزیمی pET-OsNTRB با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI*: M نشانگر مولکولی III ستون 2: قطعه OsNTRB به طول 1008 bp جدا شده از پلاسمید pET-OsNTRB پس از برش با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* 100 bp DNA Ladder : L

Figure 2- Preparation fragment containing gene encoding OsNTRB and Linear vector pET-28a. A: DNA Ladder 100 bp plus (L), Double digestion of pJET- OsNTRB with restriction enzymes *Hind III* & *EcoRI* (Lane 1). B: Molecular Marker III (M), Extracted Plasmid pET28a (Lane 1), Digested pET-28a with two restriction enzymes *Hind III* and *EcoRI* (Lane 2). C: Confirmation if cloning of gene in pET28a by cutting of pET-OsNTRB with *EcoRI* and *HindIII*. Molecular Marker III (M), Double digestion of pET-OsNTRB with restriction enzymes *Hind III* & *EcoRI* (Lane 1), DNA Ladder 100 bp plus (L).



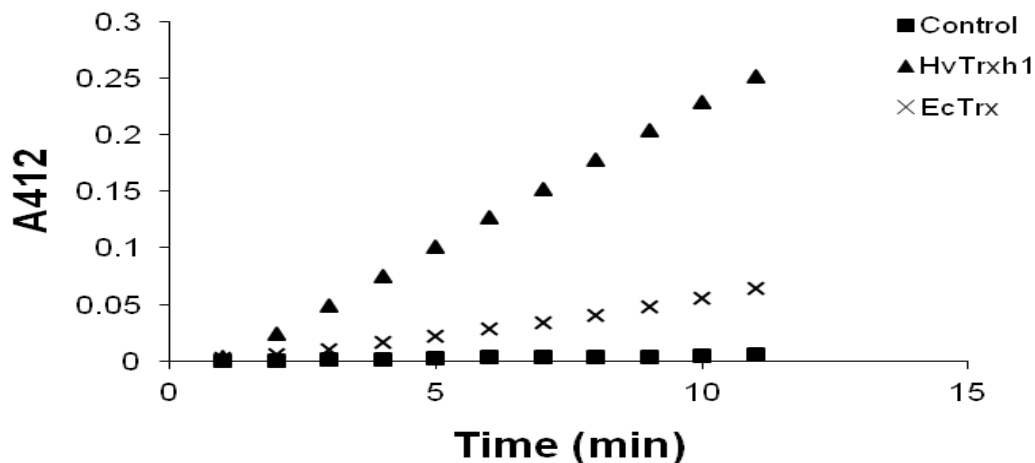
شکل 3- بررسی بیان و خالص سازی پروتئین نو ترکیب OsNTRB بر روی ژل SDS-PAGE. M: مارکر پروتئینی چاهک 1: پروتئین محلول استخراج شده بدون تلقیح IPTG چاهک 2: پروتئین محلول استخراج شده پس از 4 ساعت تلقیح IPTG چاهک 3: پروتئین نو ترکیب خالص شده His-OsNTRB
Figure 3- Analysis of expression and purification of recombinant OsNTRB by SDS-PAGE. Protein marker (M), Total soluble protein extracted from *E. coli* before addition of IPTG (lane1), Soluble extracted protein from *E. coli* 4 hours after addition of IPTG (lane 2), Purified His-OsNTRB (lane 3).

کنترل، جذب در طول موج 415 نانومتر در هر دو واکنش افزایش پیدا کرد. با این حال سرعت واکنش OsNTRB با دو تیوردوکسین مختلف کاملاً متفاوت بود. سرعت واکنش OsNTRB در واکنش با EcTrx و HvTrxh به ترتیب 0/006 و 0/025 $\Delta 412/\text{min}$ بود. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که سرعت بر همکنش NTR با تیوردوکسین گیاهی به کار برده شده در این تحقیق بسیار بالاتر از سرعت برهمکنش با تیوردوکسین باکتریایی است. برعکس در مطالعه‌ای که قبلاً صورت گرفته، نشان داده شده است که فرم نو ترکیب NTR باکتری *E. coli* با

با اندازه گیری شیب خط می‌توان به سرعت اولیه واکنش NTR در برهمکنش با Trx h پی‌برد. در این تحقیق نیز سرعت بر همکنش OsNTRB با دو Trx h ، با استفاده از DTNB به عنوان سوبسترای نهایی برای Trx و همچنین NADPH به عنوان عامل احیا کننده مقایسه شد (شکل 4).
 یک واکنش حاوی NADPH، OsNTRB و DTNB بدون حضور Trx، به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که آنزیم OsNTR تولید شده در این تحقیق فعال بوده و قادر به احیای تیوردوکسین در محیط این ویترو می‌باشد. به طوریکه در مقایسه با نمونه ی

NTR از هر موجود زنده با Trx از آن موجود ویا موجودات خویشاوند برهمکنش بهتری در مقایسه با موجودات ناخویشاوند دارد.

Trx از باکتری *E. coli* با سرعت بالایی برهمکنش دارد (Miranda-Vizuete et al., 1997). بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که



شکل 4- واکنش برهمکنش OsNTRB با تیوردوکسین های HvTrxh1 و EcTrx. نمونه کنترل واکنش حاوی NADPH, NTR و DTNB بدون حضور Trx است.

Figure 4- Enzyme assay OsNTRB with *E. coli* Trx and Barely Trx . Control shows the reaction containing NADPH, NTR and DTNB without addition of Trx.

کیتیک آنزیمی، مورد توجه محققان بسیاری قرار گرفته است. به طوریکه در مطالعه‌ای با جایگزینی یک سیستمین با سرین در جایگاه های فعال NTR و Trx از باکتری *E. coli* کمپلکسی از NTR-Trx با ایجاد یک باند دی سولفیدی دائمی بین آنها ساخته شد و با استفاده از کریستالوگرافی ساختمان سوم این کمپلکس به دست آمد (Wang et al., 1996; Lenon et al., 2000). دستیابی به ساختمان سوم تا حدودی آمینواسیدهای در گیر در برهمکنش را شناسایی

بحث

سیستم NTR/Trx به عنوان سیستم ردوکس، نقش مهمی را در مسیرهای مختلف متابولیتی در پروکاریوت ها و یوکاریوت‌ها ایفا می‌کند و در دامنه وسیعی از واکنش‌های حیاتی سلول نقش دارد. چگونگی برهمکنش NTR و Trx با استفاده از ایجاد موتاسیون و جایگزینی آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال این پروتئین ها در باکتری *E. coli* و ارزیابی برهمکنش این دو پروتئین با استفاده از روش‌های

تحقیق حاضر فرم نوترکیب NTR از گیاه برنج تولید و برهمکنش آن با دو Trx از گیاه جو و باکتری اشرشیا کلی که فقط 22٪ شباهت در توالی آمینواسیدی آنها وجود داشت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از تفاوت معنی دار بین سرعت برهمکنش NTR با دو نوع Trx بود. این نتیجه به خوبی نشان می‌دهد که NTR در برهمکنش با Trx، اختصاصی عمل می‌نماید و توالی Trx در برهمکنش این دو پروتئین تاثیر دارد. بر اساس ساختمان سوم به دست آمده از کمپلکس NTR-Trx از *E. coli* به نظر می‌رسد که آمینواسیدهای خاصی از این دو پروتئین درگیر در برهمکنش می‌باشند. با یافتن این آمینواسیدهای معادل در NTR و Trx های گیاهی، شاید بتوان پیش‌بینی نمود که یک NTR خاص گیاهی با کدام Trx برهمکنش بهتری دارد.

نمود. تا کنون مطالعات صورت گرفته در این زمینه در گیاهان کمتر بوده است. تولید فرم نوترکیب دو ایزوفرم مختلف NTR از گیاه جو با درصد شباهت بیش از 80٪ در توالی آمینواسیدی و همچنین دو ایزوفرم مختلف Trx h از همین گیاه با درصد شباهت 50٪ در توالی، امکان برهمکنش ایزوفرم‌های مختلف NTR را با ایزوفرم‌های مختلف تیوردوکسین فراهم ساخت. پارامترهای کینتیکی به دست آمده نشان داد که علی‌رغم شباهت اندک دو ایزوفرم Trx h، هر دو ایزوفرم NTR سرعت و تمایل یکسانی در برهمکنش با هر دو Trx h از گیاه جو دارند (Shahpiri et al., 2008). بر خلاف این تحقیق، در یونجه نتایج برهمکنش یکی از ایزوفرم‌های NTR با چندین ایزوفرم مختلف Trx h نشان داد که NTR در برهمکنش با ایزوفرم‌های مختلف سرعت متفاوتی دارد (Renard et al., 2011).

منابع

- Arner ESJ, Zhong L, Holmgren A (1999). Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 300: 226–239.
- Buchanan BB, Schürmann P, Ricardo A, Jacquot JP (2002). The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthesis Research* 73: 215–222.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods in Enzymology* 300: 219–226.
- Dai S, Saarinen M, Ramaswamy S, Meyer Y, Jacquot JP, Eklund H (1996). Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 264: 1044–1057.
- Elias SJ, Arne R, Holmgren A (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267: 6102–6109.
- Eslampanah H, Shahpiri A (2012). Molecular cloning and characterization of two isoforms of cytoplasmic/mitochondrial type NADPH-dependent thioredoxin reductase from rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Australian Journal of Crop Science* 6: 1045–1050
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005). The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 24–35.

- Holmgren A (1977). Bovine thioredoxin system. *Journal of Biological Chemistry* 252: 4600-460.
- Holmgren A (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* 54: 237-271.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14144-14149.
- Lennon BW, Williams CH Jr, Ludwig ML (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* 289: 1190-1194
- Marcos A, Oliveira KF, Discola A, Alves SV, Francisco edrano JM, Beatriz G, Luis N (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49: 3317-3326.
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F (2005). Thioredoxins in arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research* 86: 419-33.
- Miranda-Vizuet A, Damdimopoulos AE, Gustafsson J, Spyrou G (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30841-30847.
- Mustacich D, Powisi G (2000). Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal* 346: 1-8
- 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 Physiol* 155: 1113-1126
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory pp. A843-A854.
- 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.
- Waksman G, Krishna TSR, Williams CH, Kuriyan J (1994). Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *Journal of Molecular Biology* 236: 800-816.
- Wang PF, Veine DM, Ahn SH, Williams CH Jr (1996). A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization. *Biochemistry* 35: 4812-4819.

Interaction of recombinant form of NADPH-dependent thioredoxin reductase from rice with thioredoxin from two plant and bacterial sources

Eslampanah H.¹, Shahpiri A.*², Shaykholeslam Esfahani E.³

^{1,3} Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

² Assistant professor Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Abstract

Maintaining redox homeostasis in the cell is critical for different cellular metabolisms and signal transduction pathways. In plants different molecular mechanisms are involved in maintaining cellular redox homeostasis. NADP/thioredoxin system, consisting of NADPH, NADP-thioredoxin reductase (NTR) and thioredoxin plays important role as electron donor to disulfide bonds in many cellular proteins. In this study, the gene encoding one of NTR isoform from rice, namely OsNTRB was cloned in pET28a as fusion with His6-tag and transferred to Roseta (DE3), a strain of *Escherichia coli*. Considerable amount of His-OsNTRB was produced after induction of bacteria culture with IPTG and purified using affinity chromatography. Heterologous expression and purification of recombinant form of OsNTRB enabled us to study the interaction of this protein with thioredoxin from barley (HvTrxh1) and *E. coli* (Ec Trx). The results showed that recombinant form of OsNTRB is active and can reduce both HvTrxh1 and EcTrx *in vitro*. However the rates of reaction with these two Trx were significantly different.

Keywords: *Thioredoxin reductase, Thioredoxin, Rice, Recombinant Proteins.*

* Corresponding Author: Shahpiri A.

Tel: 093113913354

E-mail: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

