

بررسی و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار مولکولی و روند تکامل ژنتیکی دو آیزوفرم
تیوردوکسین نوع *h* از گیاه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari)

رضا حیدری جاپلقی¹، رحیم حداد^{2*}، قاسمعلی گروسی²

¹ کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین

² عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین

چکیده

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک و مقاوم در برابر حرارت هستند که در واکنش‌های تبدیلی دی‌تیول/دی‌سولفید شرکت می‌کنند. در مقایسه با سایر موجودات زنده، گیاهان حاوی شش نوع تیوردوکسین مختلف شامل *o*، *m*، *h*، *f*، *x* و *y* می‌باشند که تیوردوکسین نوع *h* با داشتن اشکال چندگانه، در فرآیندهای مختلفی همچون محافظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو و تنش‌های زنده و غیرزنده دخالت دارد. دو ژن تیوردوکسین نوع *h* تحت عناوین *VvTrxh4* و *VvCxxS2*، از بافت حبه گیاه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه‌سازی شده و خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار مولکولی و روند تکامل ژنتیکی آن‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب خواندنی ژن‌های همسانه‌سازی شده *VvTrxh4* و *VvCxxS2* به ترتیب 345 bp و 381 bp طول داشته و پروتئین‌هایی با 114 و 126 اسید آمینه را کد می‌کنند. بررسی توالی پروتئینی نشان داد که ژن *VvTrxh4* دارای جایگاه فعال معمول WCGPC بوده، در حالی که جایگاه فعال ژن *VvCxxS2* به صورت غیرمعمول و به شکل WCIPS می‌باشد. وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین *VvTrxh4* به ترتیب برابر 12/76 کیلودالتون و 5/22 و پروتئین *VvCxxS2* به ترتیب برابر 14/25 کیلودالتون و 4/68 می‌باشد. بررسی‌های ساختاری نشان داد که پروتئین‌های بدست آمده از نظر ساختار سه‌بعدی مشابه می‌باشند. در حالی که بررسی‌های فیلوژنتیکی ژن‌های همسانه‌سازی شده با تیوردوکسین‌های سایر گیاهان نشان داد که این ژن‌ها متعلق به زیرگروه‌های متفاوت می‌باشند. در این تحقیق ژن *VvTrxh4* متعلق به کلاس A از زیرگروه I بوده، اما ژن *VvCxxS2* به کلاس B از زیرگروه III تیوردوکسین‌های نوع *h* تعلق دارد.

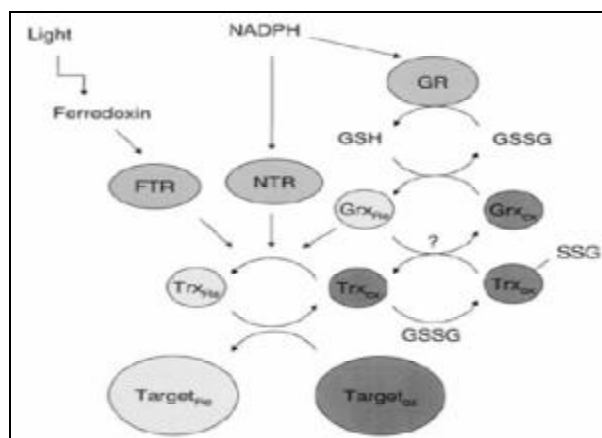
واژه‌های کلیدی: انگور، خصوصیات بیوشیمیایی، تکامل ژنتیکی، تیوردوکسین، همسانه‌سازی.

(Gelhaye et al., 2005). احیاء تیوردوکسین‌های زیرگروه I و II وابسته به مولکول NADPH و با دخالت آنزیم NTR انجام می‌شود (Gelhaye et al., 2004)، اما تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه III، که اولین بار در درخت صنوبر (*Populus* spp.) گزارش شدند (Gelhaye et al., 2003)، از طریق سیستم گلوکاتایون/گلوکاتاردوکسین احیاء می‌شوند. مطالعات پروتئومیکس نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های نوع *h* در فرآیندهای متعدد سلولی دخالت دارند. تعدادی از اعمال آنها عبارتند از: تحریک جوانه‌زنی بذر و رشد و نمو گیاهک (Cazalis et al., 2006)، محافظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو (Dos Santos and Rey, 2006; Meyer et al., 2008)، غیرفعال‌سازی پروتئین‌های سمی (Joudrier et al., 2005) و محافظت در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده (Laloi et al., 2004; Reichheld et al., 2002; Park et al., 2009). تا کنون ژن‌های زیادی از این خانواده مطالعه و گزارش شده است. به عنوان مثال، بیان ویژه هشت ژن تیوردوکسین نوع *h* در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که سطوح بیان این آیزوفرم‌ها در بافت‌های مختلف گیاه متفاوت بوده و در واکنش به عامل بیماریزای قارچی یکسان بیان نمی‌شوند (Reichheld et al., 2002). در مطالعه‌ای دیگر بیان شد که ژن *TRXh5* در گیاه آرابیدوپسیس در اثر زخم‌شدگی، پیری، آلودگی با عامل بیماریزای

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک و مقاوم در برابر حرارت هستند که به فراوانی در تمامی موجودات زنده از تک‌سلولی‌ها تا پرسلولی‌های عالی یافت شده (Gelhaye et al., 2004) و به همراه دامنه وسیعی از پیش‌ماده‌ها، در واکنش‌های تبدیلی دی‌تیول/دی‌سولفید شرکت می‌کنند (Joudrier et al., 2005). در بین موجودات زنده، پستانداران و تک‌سلولی‌ها دارای یک یا چند ژن کدکننده تیوردوکسین می‌باشند، در حالی که پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم نشان می‌دهند که گیاهان دارای انواع مختلفی از ژن‌های کدکننده تیوردوکسین‌ها می‌باشند (Gelhaye et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Meyer et al., 2004; al., 2010). در گیاهان عالی، بر اساس تجزیه و تحلیل ساختار اولیه پروتئینی و موقعیت درون سلولی، تیوردوکسین‌ها به شش نوع اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند که عبارتند از: تیوردوکسین‌های *x, o, m, h, f* و *y*. تیوردوکسین‌های *x, m, f* و *y* درون کلروپلاست‌ها قرار داشته (Hall et al., 2010) و تیوردوکسین *o* متعلق به میتوکندری‌ها می‌باشد (Laloi et al., 2001). شکل 1 مسیرهای مختلف احیاء تیوردوکسین‌ها را در اندامک‌های کلروپلاست، میتوکندری و نیز سیتوزول نشان می‌دهد. تیوردوکسین‌های نوع *h* درون سیتوزول، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و حتی هسته سلول قرار داشته و به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند

یک تیوردوکسین نوع *h* به نام *AtTrx-h3* از عصاره‌های سیتوزولی گیاه آرابیدوپسیس تحت تیمار گرمایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده و پس از تجزیه و تحلیل‌های مربوطه مشخص شد که پروتئین کد شده توسط این ژن، عمدتاً از طریق فعالیت چپرونی موجب افزایش تحمل گرمایی در گیاه آرابیدوپسیس می‌شود (Park et al., 2009).

قارچی و شرایط تنش اکسیداتیو به میزان زیادی در بافت‌های مختلف القا می‌شود (Laloi et al., 2004). همسانه‌سازی و بیان متفاوت سه آیزوفرم ژن تیوردوکسین نوع *h* تحت تیمار با تنش‌های شوری (NaCl) و عامل اکسیداتیو (H_2O_2) در بذور گندم (*Triticum aestivum*) نشان داد که الگوی بیان سه آیزوفرم در بذور تیمار شده متفاوت است (Cazalis et al., 2006). همچنین،



شکل 1- مسیرهای مختلف احیاء تیوردوکسین‌ها. احیاء تیوردوکسین‌های کلروپلاستی توسط آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) انجام می‌گیرد، در حالی که در میتوکندری و سیتوزول، تیوردوکسین‌ها توسط آنزیم NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) احیاء می‌شوند. تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه III می‌توانند از طریق سیستم گلوکاتایون/گلوکاتاردوکسین (GSH/Grx) نیز احیاء شوند (Gelhay et al., 2005). GR: گلوکاتایون ردوکتاز، GSH: گلوکاتایون در وضعیت احیاء، GSSG: گلوکاتایون اکسید شده، Grx: گلوکاتاردوکسین.

Figure 1- Different pathways of Trxs reduction. The chloroplastic pathway involves ferredoxin-thioredoxin reductase (FTR). In mitochondria and cytoplasm, thioredoxins could be reduced by NADP thioredoxin reductase (NTR). The *h*-type Trxs from subgroup III could also be reduced via the glutathione/glutaredoxin (GSH/Grx) system (Gelhay et al., 2005). GR: glutathione reductase, GSH: reduced form of glutathione, GSSG: oxidized form of glutathione, Grx: glutaredoxin.

گیاهان، شناسایی، همسانه‌سازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و ساختاری آنها

با توجه به تنوع و دخالت تیوردوکسین- های نوع *h* در فرآیندهای متعدد سلولی در

به یک تیوب 2 ml حاوی 1 ml بافر استخراج (300mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 2% PVP, 2% CTAB, 2M NaCl, 2% β -mercaptoethanol) اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شده و هر 5 دقیقه به آرامی ورتکس (Techne-FVORTECE، انگلستان) گردیدند. سپس پروتئین‌ها دو مرتبه و با یک حجم برابر از کلروفورم: ایزوآمیل الکل (24:1 v/v) جداسازی گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل شده و 0/1 حجم سدیم استات 3 M و 0/6 حجم ایزوپروپانول به آن افزوده و سپس به مدت 30 دقیقه در دمای -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. رسوب اسید نوکلئیک به وسیله سانتریفیوژ (Hettich-D78532، آلمان) با سرعت 14000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری و در آب DEPC حل گردید. سپس 0/3 حجم لیتیم کلراید 8 M به نمونه‌ها اضافه گردیده و تیوب‌ها به 6-8 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت 14000 rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد رسوب و با استفاده از الکل اتانول 70% شستشو و در $200 \mu\text{l}$ آب DEPC شده حل گردید. کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UVD3200، انگلستان) در طول موج‌های 230، 260 و 280 نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز 1/2% مورد بررسی قرار گرفت.

ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه جداسازی و همسانه‌سازی توالی‌های کامل cDNA کدکننده دو آیزوفرم تیوردوکسین نوع h از بافت حبه انگور عسکری در شرایط طبیعی انجام شده، سپس خصوصیات بیوشیمیایی و ساختاری پیش‌بینی شده آن‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرد. همچنین نشان داده می‌شود که این آیزوفرم‌ها به زیرگروه‌های متفاوتی از تیوردوکسین‌های نوع h تعلق دارند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جداسازی RNA کل

بافت حبه در مرحله ترش- شیرین (Veraison) از گیاه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. cv. Askari)، از مزارع انگور در ایستگاه تحقیقات انگور، وابسته به سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، واقع در شهر تاکستان (استان قزوین) جمع‌آوری و در همان محل، پس از جداسازی هسته‌ها و توزین به مقدار 1 گرم، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در دمای -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج RNA کل از یک روش بهینه شده در مقیاس کوچک که تغییر یافته روش Reid و همکاران (2006) می‌باشد، استفاده شد. بافت مورد نظر با استفاده از هاون چینی و ازت مایع به صورت پودر درآمده و به میزان 0/1 گرم

سنتز رشته اول cDNA

رشته اول cDNA با استفاده از 5 µg محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم RNase-free DNase I (Fermentas)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MuLV RevertAid™ (Fermentas) و آغازگرهای Oligo (dT)₁₈ (Qiagen) سنتز گردید. ترکیب هر واکنش نسخه‌برداری شامل mM Tris-HCl (pH 8/3)، mM MgCl₂ 4، mM KCl 50، mM dithiothreitol 10، ng Olig (dT)₁₈ primer 10، mM dNTP 50 و سر انجام 200 units RevertAid™ M-MuLV RT بود. واکنش نسخه‌برداری در دمای 42 درجه سانتی-گراد به مدت یک ساعت انجام و عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه صورت گرفت. بدین ترتیب از رشته اول مولکول cDNA به عنوان الگو در واکنش RT-PCR استفاده گردید.

طراحی آغازگرها و واکنش RT-PCR

تکثیر ژن‌های *VvCxxS2* و *VvTrxh4* با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده بر اساس توالی بیانی برچسب دار (EST: CB348011 برای ژن *VvTrxh4* و EST: EE089310 برای ژن *VvCxxS2*) شناسایی شده با برنامه BLAST انجام شد. آغازگرهای

اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Bam*HI در انتهای 5' بودند که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. مخلوط واکنش در حجم نهایی 50 µl حاوی mM Tris-HCl (pH 8/8) 20، mM MgSO₄ 10، mM KCl 10، (NH₄)₂SO₄ 10، 2 mg/ml BSA، %0/1 Triton X-100، 500 µM از هر dNTP، 50 pM از هر آغازگر (رفت و برگشت)، 100 ng DNA الگو و 1/25 واحد از آنزیم *Pfu* DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT-PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در 35 چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال در دمای 58 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده شامل آغازگر رفت *VTrxh4F* با توالی 5'-TACGGATCCATGGCGGAAGAGGGA-3' و آغازگر برگشت *VTrxh4R* با توالی 5'-ATCGGATCCTCAAGCAGTTGCATG-3' برای تکثیر ژن *VvTrxh4* و آغازگر

نوکلئوتیدی قطعات DNA با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتريوفاز T7 در دو جهت رفت و برگشت و با روش توالی‌یابی Dideoxynucleotide توسط شرکت SeqLab (Sequence Laboratories Gottingen) آلمان انجام شد. لازم به ذکر است که جهت قرارگیری ژن همسانه‌سازی شده در ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Hinfi* (Fermentas) نیز تعیین گردید.

بررسی توالی

خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین‌های بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam، ProtScale، TMHMM و PSORT (http://www.expasy.ch/tools/) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ساختار دوم پروتئین‌ها به وسیله برنامه PSIPred (bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) و ساختار سوم آن‌ها با استفاده از برنامه‌های SWISS-MODEL و Swiss PDB-viewer (http://www.expasy.ch/tools/) تعیین گردید. درخت فیلوژنتیکی نیز با استفاده از تیوردوکسین-های نوع *h* گیاهان آرابیدوپسیس، درخت صنوبر، انگور، گندم، جو، برنج، سویا و کلزا و به کمک نرم‌افزار ClustalW (http://ClustalW.genome.ad.jp) ساخته شد. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI که برای ساخت درخت فیلوژنتیکی مورد

رفت VCxxS2F با توالی 5'-TACGGATCCATGGAAAATCAGGAG CCG-3 و آغازگر برگشت VCxxS2R با توالی 5'-ATCGGATCCCTAGGCTACATACAC GCGAAA-3' برای تکثیر ژن *VvCxxS2* بود.

همسانه سازی و توالی‌یابی DNA

محصولات RT-PCR روی ژل آگارز 0/8% الکتروفورز گردیده، سپس قطعات تکثیر شده با اندازه‌های مورد نظر 345 bp و 381 bp از روی ژل بریده شده و با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک GF-1 PCR Clean Up Kit (Vivantis) خالص‌سازی شدند. قطعات خالص‌سازی شده و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی *BamHI* (Fermentas) هضم گردیده و واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) انجام گرفت. محصول واکنش اتصال به طور مستقیم و با استفاده از روش شوک حرارتی برای تراریزش سلول‌های مستعد باکتری اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5 α مورد استفاده قرار گرفت. پس از غربال‌گری روی محیط کشت جامد SOB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG، پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS استخراج گردیده (Sambrook and Russell, 2001) و با استفاده از کیت GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) خالص‌سازی و تغلیظ شدند. توالی

(CA799351) Gm5 (BM188930)،
GmCxxS2 (ACU19593) GmCxxS1
Bn1 (Brassica napus): (ACU14856)؛ کلزا
(U59379) Bn2، (U59380).

نتایج و بحث

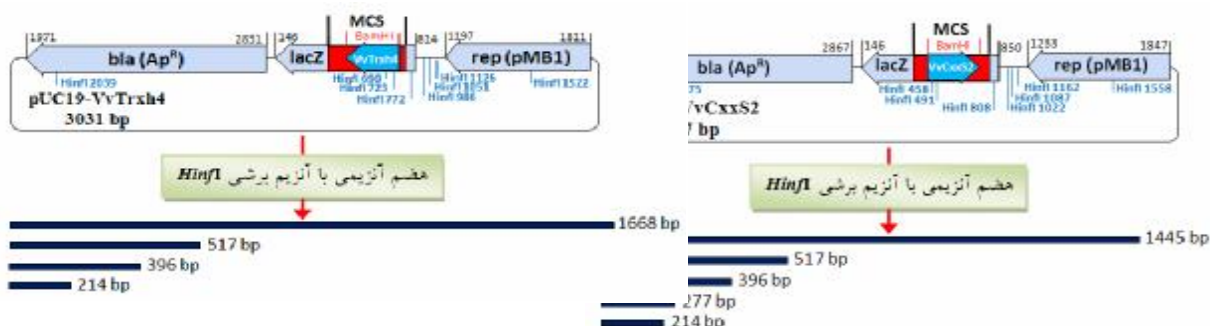
بررسی توالی و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی

پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2

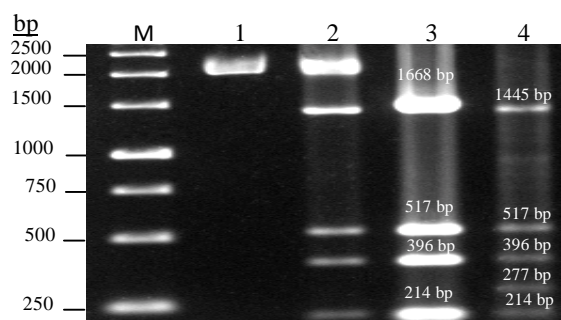
جداسازی و همسانه‌سازی قطعات cDNA
کدکننده تیوردوکسین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2
(ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی
GenBank. به ترتیب با شماره‌های دستیابی
HM370527 و HM370528) با استفاده از
روش RT-PCR انجام شد. نتایج هضم آنزیمی
با آنزیم برشی *HinfI* نشان داد که ژن *VvTrxh4*
در جهت معمولی و ژن *VvCxxS2* در جهت
عکس روی ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه-
سازی شده‌اند که با نتایج توالی‌یابی مطابقت دارد
(شکل 2). بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که
چارچوب خواندنی ژن‌های همسانه‌سازی شده
VvTrxh4 و *VvCxxS2* به ترتیب 345 bp و 381
طول داشته و هر دو ژن با کدون ATG آغاز
می‌شوند، اما به ترتیب با کدون‌های TGA و
TAG خاتمه می‌یابند (شکل 3).

استفاده قرار گرفتند، عبارتند از: آرابیدوپسیس
(*Arabidopsis thaliana*): At1 (At3g51030)،
At2 (At5g39950) At3 (At5g42980) At4،
At5 (At1g19730) At6 (At1g45145) At7،
At8 (At1g59730) At9 (At1g69880)،
AtCxxS1 (At3g08710) (At1g11530)،
AtCxxS2 (At2g40790) AtCxxC2،
(At3g56420)؛ درخت صنوبر (*Populus*)
trichocarpa): Pt1 (AF483625) Pt2،
Pt3 (AF483266) Pt4 (BU822062)،
Pt5 (BU835000) PtCxxS1 (BU869308)،
PtCxxS3 (CA823821) (BU874060)؛ انگور
(*Vitis vinifera*): Vv1 (HM370524) Vv2،
Vv3 (HM370525) Vv4 (HM370526)،
Vv5 (CF513794) Vv6 (CB004453) VvCxxS1،
(EU280164)؛ گندم (*Triticum aestivum*):
Ta1 (CD886902) Ta2 (CD892602) Ta3،
Ta4 (BJ210524) Ta5 (CD894811)،
Hv1 (AF438359)؛ جو (*Hordeum vulgare*):
Hv2 (AY245454) Hv3 (AY245455)،
Hv4 (BI960260) (AF435815)؛ برنج
(*Oryza sativa*): Os1 (Q42443) Os2،
Os3 (Q9FRT3) Os4 (AF435817) OsCxxS،
(NP_001053968)؛ سویا (*Glycine max*):
Gm1 (AI461219) Gm2 (BI699372) Gm4،

(A) الف



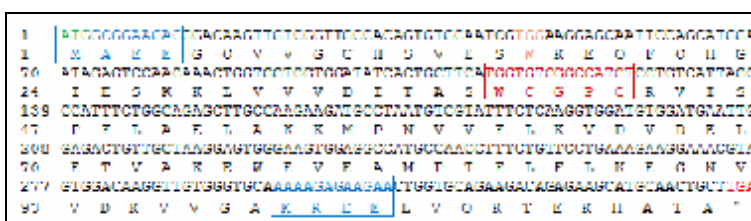
(B) ب



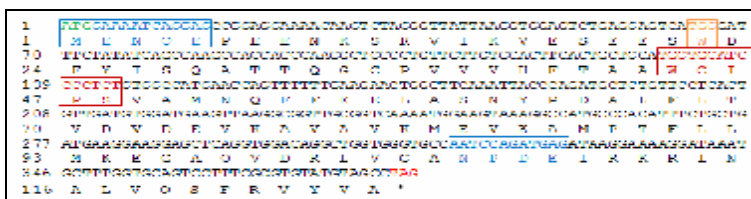
شکل 2- ساختار ناقل‌های نو ترکیب pUC19-VvCxxS2 و pUC19-VvTrxh4 و الکتروفورز ژل آگارز 1/5 درصد به منظور تعیین جهت ژن‌های همسانه‌سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI* (الف) ناقل‌های نو ترکیب pUC19-VvCxxS2 و pUC19-VvTrxh4 به ترتیب حاوی ژن *VvTrxh4* در جهت معمولی و ژن *VvCxxS2* در جهت عکس روی جایگاه همسانه‌سازی چندگانه (MCS) می‌باشند. توالی مسئول رونوشت‌برداری ناقل نو ترکیب (pMB1)، ژن‌های *lacZ* و مقاومت به آمپی‌سیلین (Ap^R) و جایگاه همسانه‌سازی چندگانه روی ناقل‌های نو ترکیب نشان داده شده‌اند. (ب) نتیجه هضم آنزیمی نشان می‌دهد که همسانه‌سازی در جهت معمولی منجر به تولید 4 باند شده و در جهت عکس 5 باند تولید می‌کند. (M نشانگر مولکولی 1 Kb، 1) پلاسمید غیرنو ترکیب هضم نشده، (2) پلاسمید غیرنو ترکیب هضم شده با آنزیم *HinfI*، (3) پلاسمید نو ترکیب هضم شده با آنزیم *HinfI* حاوی ژن *VvTrxh4* در جهت معمولی، (4) پلاسمید نو ترکیب هضم شده با آنزیم *HinfI* حاوی ژن *VvCxxS2* در جهت عکس.

Figure 2- The structure of recombinant vectors of pUC19-VvTrxh4 and pUC19-VvCxxS2 and 1.5% agarose gel electrophoresis to determine the direction of cloned genes using enzymic digestion with *HinfI*. (A) The recombinant vectors of pUC19-VvTrxh4 and pUC19-VvCxxS2 contain the *VvTrxh4* gene in correct direction and *VvCxxS2* gene in reverse direction on Multiple Cloning Site (MCS), respectively. The

pMB1 sequence, *lacZ* gene, Ap^R gene, and MCS have been revealed on recombinant vectors. (B) The enzymic digestion displays that cloning in correct and reverse directions products 4 and 5 bonds, respectively. M) 1 Kb DNA ladder, 1) The non-digested pure plasmid, 2) The pure plasmid digested with *HinfI*, 3) The recombinant plasmid containing the *VvTrxh4* gene in correct direction and digested with *HinfI*, 4) The recombinant plasmid containing the *VvCxxS2* gene in reverse direction and digested with *HinfI*.



(A) الف



(B) ب

شکل 3- توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی الف) ژن *VvTrxh4* و ب) ژن *VvCxxS2*. کادرهای آبی رنگ نشان دهنده موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، کادرهای قرمز تیره رنگ نشان دهنده جایگاه فعال و کادر نارنجی رنگ شامل اسید آمینه تریپتوفان ویژه می‌باشند. همچنین کدون‌های آغاز و پایان چارچوب باز خواندنی ژن‌ها، به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز روشن نشان داده شده‌اند.

Figure 3- The nucleotide and protein sequences of (A) *VvTrxh4* and (B) *VvCxxS2* genes. The potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer (blue boxes), the active site (red boxes), and the characteristic tryptophan residue (orange box) are distinguished. The initiation and termination codons of ORFs have been also indicated in green and red, respectively.

برابر 12/76 کیلودالتون و 5/22 بوده، در حالی که پروتئین *VvCxxS2* با 126 اسیدآمینه دارای وزن مولکولی محاسبه شده 14/25 کیلودالتون و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده 4/68 می‌باشد. به طور کلی تیوردوکسین‌ها پروتئین‌هایی پایدار،

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین‌های بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین *VvTrxh4* با 114 اسیدآمینه، به ترتیب

1/294 تعیین گردید، در حالی که این مقادیر برای پروتئین VvCxxS2 به ترتیب معادل 1/095 و 1/086 می‌باشد. این اختلاف به دلیل تفاوت در توالی جایگاه فعال پروتئین VvTrxh4 نحوی که در جایگاه فعال پروتئین دو اسیدآمینو سیستئین قرار دارد، اما در جایگاه فعال پروتئین VvCxxS2 تنها یک اسیدآمینو سیستئین وجود دارد (Gasteiger et al., 2005). پیش‌بینی موقعیت زیرسولوی این پروتئین‌ها با برنامه PSORT نشان داد که برخلاف تعدادی از تیوردوکسین‌های نوع *h* که محل فعالیت‌شان درون میتوکندری، هسته و شبکه آندوپلاسمی است (Gelhaye et al., 2004)، پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2 از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن‌ها درون سیتوزول می‌باشد.

مقایسه توالی اسیدآمینوای و موتیف‌های ساختاری پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2

پروتئین VvTrxh4 دارای یک جایگاه فعال معمول WCGPC (-Trp-Cys₃₉-Gly-Pro-) (Cys₄₂) با دو اسیدآمینو سیستئین می‌باشد که این توالی حفظ شده در هر سه زیرگروه I، II و III از تیوردوکسین‌های نوع *h* مشاهده می‌شود، به طوری که در گیاه انگور، آیزوفرماهای VvI، Vv2 و Vv3 از زیرگروه I، آیزوفرما Vv5 از زیرگروه II و آیزوفرما Vv6 از زیرگروه III دارای جایگاه فعال WCGPC می‌باشند.

با نیمه عمر بالا و مقاوم در برابر حرارت می‌باشند (Gelhaye et al., 2005). شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیان‌گر میزان پایداری آن‌ها در لوله آزمایش می‌باشد به طوری که پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از 40 جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند (Gasteiger et al., 2005). شاخص ناپایداری پروتئین VvTrxh4 در حدود 32/56 محاسبه گردید، اما این شاخص برای پروتئین VvCxxS2 معادل 39/55 تعیین گردید که حاکی از پایداری نسبی پروتئین VvTrxh4 نسبت به پروتئین VvCxxS2 می‌باشد. با توجه به وجود یک اسیدآمینو حفظ شده متیونین (Met) در انتهای آمینوی پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2، نیمه عمر آن‌ها در محیط درون شیشه (*in vitro*) در حدود 30 ساعت محاسبه گردید (Gasteiger et al., 2005). همچنین شاخص آلیفاتیک (Aliphatic) که به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت می‌باشد (Kim et al., 2008)، برای پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2 به ترتیب معادل 91/32 و 86/59 محاسبه گردید که نشان دهنده مقاوم بودن این پروتئین‌ها و به طور کلی تیوردوکسین‌ها در برابر حرارت می‌باشد (Gelhaye et al., 2004, 2005). ضریب خاموشی پروتئین VvTrxh4 در طول موج 280 nm در محیط آب، در حالت اکسید شده در حدود 1/303 و در حالت احیاء شده برابر

شوند. این گروه از تیوردوکسین‌ها توسط سیستم گلووتاردوکسین/گلووتاتیون احیاء می‌شوند (Gelhaye *et al.*, 2003). تمام تیوردوکسین‌های نوع *h* که تاکنون شناسایی شده‌اند، دارای یک اسیدآمینه تریپتوفان ویژه می‌باشند که یک حداکثر جذب نور UV در طول موج 290 nm را به تیوردوکسین‌ها می‌دهد (Gelhaye *et al.*, 2004). این اسیدآمینه تریپتوفان ویژه، در پروتئین‌های *VvTrxh4* و *VvCxxS2* به ترتیب در موقعیت‌های 16 و 22 مشاهده می‌شود. بررسی‌ها با برنامه TMHMM نشان داد که هر دو پروتئین جزء پروتئین‌های خارج سلولی بوده و می‌توانند انتقال پلاسمودسمایی داشته باشند که برای این انتقال به موتیف‌هایی در انتهای آمینو و انتهای کربوکسیل نیازمند می‌باشند (Meng *et al.*, Ishiwatari *et al.*, 1998). در انتهای آمینوی پروتئین *VvTrxh4* و سایر تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I انگور، یک موتیف MAEE و در انتهای کربوکسیل آن و آیزوفرماهای *Vvh2* و *Vvh3*، نیز یک موتیف KREE مشاهده می‌شود. در حالی که موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در پروتئین *VvCxxS2* نسبت به آنچه که در پروتئین *VvTrxh4* مشاهده شد، متفاوت می‌باشد، به طوری که در انتهای آمینوی آن یک موتیف MENQE و در انتهای کربوکسیل، موتیف NPDE مشاهده می‌گردد.

برخلاف پروتئین *VvTrxh4*، پروتئین *VvCxxS2* دارای یک جایگاه فعال غیرمعمول *WCxxS* (Trp-Cys₄₅-Ile-Pro-Ser) می‌باشد که تنها در تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه III مشاهده می‌شود. پروتئین *VvTrxh4* و به طور کلی تیوردوکسین‌ها با جایگاه فعال WCGPC به علت داشتن دو اسیدآمینه Cys در جایگاه فعال خود، در حالت اکسید شده یک پیوند دی-سولفیدی تشکیل می‌دهند که در آرایش فضایی به شکل بیرون‌زدگی از سطح پروتئین خارج شده و در معرض حمله نوکلئوفیلی آنزیم NTR قرار گرفته و احیاء می‌شود (Spyrou *et al.*, 1997؛ Joudrier *et al.*, 2005). در حالت احیاء شده، هر دو اسیدآمینه Cys در فعالیت‌های کاتالیتیکی تیوردوکسین‌ها دخالت نموده و موجب احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی در پروتئین‌های هدف می‌شود. به هر حال وجود پیوند دی‌سولفیدی در تیوردوکسین‌های واقعی WCGPC موجب می‌شود که ضریب خاموشی آن‌ها در حدود -290 mv شده و توسط آنزیم NTR احیاء شوند (Gelhaye *et al.*, 2005). در مقابل، پروتئین *VvCxxS2* مشابه با تیوردوکسین‌های ناهنجار *CxxS* به دلیل فقدان دومین اسیدآمینه Cys در جایگاه فعال و عدم تشکیل پیوند دی‌سولفید، دارای ضریب خاموشی در حدود -200 mv بوده و در نتیجه همانند تیوردوکسین‌های واقعی WCGPC عمل نکرده و نمی‌توانند توسط آنزیم NTR احیاء

در هر دو پروتئین می‌باشد. همان طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، توالی جایگاه فعال در هر دو پروتئین مابین انتهای کربوکسیل صفحه $\beta 2$ و انتهای آمینوی مارپیچ $\alpha 2$ قرار گرفته، اسیدآمینه تریپتوفان ویژه چهارمین اسیدآمینه مارپیچ $\alpha 1$ را تشکیل داده و موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، شامل موتیف انتهای آمینو و انتهای کربوکسیل، به ترتیب درون اولین ساختار مارپیچ پیچیده و بین صفحه $\beta 5$ و مارپیچ $\alpha 4$ قرار گرفته‌اند. بررسی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های $VvTrxh4$ و $VvCxxS2$ بوسیله برنامه‌های Swiss-MODEL و Swiss PDB-viewer، به ترتیب با استفاده از ساختار کریستالی آیزوفرم‌های AtI از آرآبیدوپسیس (با شماره دستیابی 1xfIA در پایگاه PDB) و HvI از جو (با شماره دستیابی 2vlvB در پایگاه PDB) به عنوان یک نمونه نشان داد که صفحات $\beta 1$ ، $\beta 2$ ، $\beta 3$ و $\beta 5$ به صورت هم‌جهت و صفحه $\beta 4$ به صورت غیر هم‌جهت، طوری کنار هم قرار می‌گیرند که یک صفحه چین‌دار مرکزی را تشکیل داده و توسط مارپیچ‌های α احاطه می‌شوند (شکل 4). این نوع سازمان‌دهی به عنوان پیچ و تاب‌خوردگی مختص تیوردوکسین‌ها (Thioredoxin Fold) شناخته شده و برای فعالیت جایگاه فعال بسیار ضروری است (Jacquot *et al.*, 1997).

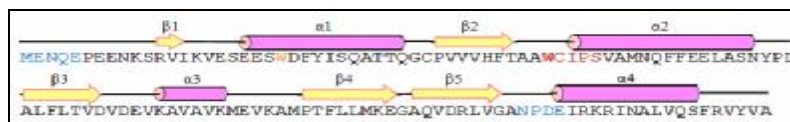
بررسی ساختار دوم و مدلسازی مولکولی

پروتئین‌های $VvCxxS2$ و $VvTrxh4$

بررسی ساختار دوم پروتئین‌های $VvCxxS2$ و $VvTrxh4$ با استفاده از برنامه PSIpred (شکل 4) نشان داد که این پروتئین‌ها و به طور کلی تیوردوکسین‌ها، حاوی 5 صفحه β و 4 مارپیچ α می‌باشند که به ترتیب $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\alpha 3\beta 4\beta 5\alpha 4$ در ساختار دویعدی پروتئین قرار می‌گیرند (Peterson *et al.*, 2005). پروتئین $VvTrxh4$ شامل 53/51% اسیدآمینه آب‌دوست و 46/49% اسیدآمینه آب-گریز می‌باشد. به طور مشابه، 50/79% و 49/21% پروتئین $VvCxxS2$ را، به ترتیب اسیدهای آمینه آب‌دوست و آب‌گریز تشکیل می‌دهد. توزیع اسیدهای آمینه در بین مارپیچ-های α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده در هر دو پروتئین تقریباً مشابه می‌باشد. پروتئین $VvTrxh4$ حاوی 42/11% مارپیچ α ، 29/82% صفحه β و 28/07% مارپیچ پیچیده بوده و پروتئین $VvCxxS2$ نیز از 38/10% مارپیچ α ، 26/19% صفحه β و 35/71% مارپیچ پیچیده تشکیل شده است. در بین صفحات β ، بلندترین صفحه مربوط به صفحات $\beta 4$ و $\beta 5$ با 8 اسیدآمینه و کوتاه‌ترین صفحه مربوط به صفحه $\beta 1$ با 3 اسیدآمینه و در بین مارپیچ‌های α ، بلندترین و کوتاه‌ترین مارپیچ به ترتیب مربوط به $\alpha 2$ با 16 اسیدآمینه و $\alpha 3$ با 6 و 7 اسیدآمینه



(A) الف



(B) ب

شکل 4- ساختار دوبعدی پروتئین‌های الف) VvTrxh4 و ب) VvCxxS2 با استفاده از برنامه PSIPred. جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینو تریپتوفان ویژه به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند.

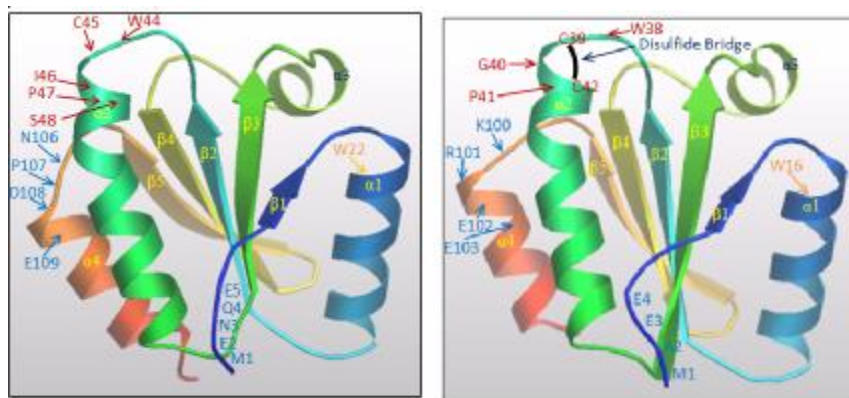
Figure 4- The secondary structure of (A) VvTrxh4 and (B) VvCxxS2 proteins using PSIPred program. The active site, the potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer, and the characteristic tryptophan residue have been indicated in red, blue, and orange, respectively.

مارپیچ‌های α بیشترین تماس را با محیط آبی داشته، در حالی که صفحات β تا حد امکان از محیط آبی فاصله گرفته‌اند. این طرز قرارگیری در فضای سه‌بعدی به ماهیت اسیدآمینوهای تشکیل دهنده مارپیچ‌ها و صفحات مربوط می‌شود، به نحوی که صفحات β بیشتر از اسیدهای آمینو آب‌گریز و مارپیچ‌های α از اسیدهای آمینو آب‌دوست تشکیل شده‌اند. در پروتئین VvTrxh4 صفحات β شامل 58/82% اسیدآمینو آب‌گریز و مارپیچ‌های α حاوی 62/50% اسیدآمینو آب‌دوست می‌باشند و به طور مشابه، در پروتئین VvCxxS2، صفحات β شامل 63/64% اسیدآمینو آب‌گریز و مارپیچ‌های α حاوی 54/17% اسیدآمینو آب‌دوست هستند. جایگاه فعال، اسیدآمینو تریپتوفان ویژه و سایر

نحوه آرایش مارپیچ‌های α در اطراف صفحات مرکزی β به گونه‌ای می‌باشد که مارپیچ‌های $\alpha 1$ و $\alpha 3$ در یک طرف و مارپیچ‌های $\alpha 2$ و $\alpha 4$ نیز در طرف دیگر صفحات β قرار دارند. مارپیچ‌های $\alpha 1$ ، $\alpha 2$ و $\alpha 4$ در وضعیت موازی با یکدیگر و صفحات β قرار داشته در حالی که مارپیچ $\alpha 3$ به صورت عمود بر مارپیچ‌های α و صفحات β واقع شده است. اسیدهای آمینو جایگاه فعال به شکل بیرون‌زدگی در انتهای کربوکسیل صفحه $\beta 2$ و آغاز مارپیچ $\alpha 2$ قرار گرفته‌اند به طوری که اسیدآمینو Cys₃₉ نسبت به اسیدآمینو Cys₄₂ در واکنش دی-تیول/دی‌سولفید، بیشتر در معرض حمله نوکلئوفیلی قرار دارد (Spyrou *et al.*, 1997). همان طور که در شکل 5 مشاهده می‌شود،

اند. نتایج بدست آمده با سایر نتایج حاصله مشابه می‌باشد (Peterson *et al.*, 2005)؛ (Maeda *et al.*, 2003).

موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در پروتئین‌های VvTrxh4 و VvCxxS2 به صورت مشخص در شکل 5 نشان داده شده-



ب (B)

الف (A)

شکل 5- ساختار سه بعدی پروتئین‌های الف) VvTrxh4 و ب) VvCxxS2 با استفاده از برنامه‌های SWISS-MODEL و Swiss PDB-viewer. مارپیچ‌های α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده به طور مشخص در ساختارهای سه‌بعدی قابل مشاهده می‌باشند. همچنین اسیدهای آمینه جایگاه فعال، اسیدهای آمینه موجود در موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسید آمینه تریپتوفان ویژه به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. نحوه تشکیل پیوند دی-سولفیدی بین دو اسید آمینه سیستمین جایگاه فعال پروتئین VvTrxh4 نیز در شکل 5- الف قابل مشاهده می‌باشد.

Figure 5- The 3D structure of (A) VvTrxh4 and (B) VvCxxS2 proteins using SWISS-MODEL and Swiss PDB-viewer programs. The α -helices, β -sheets, and coiled coil regions are distinguished in the 3D structures. The residues in the active site sequence, the potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer, and the characteristic tryptophan residue have been also indicated in red, blue, and orange respectively.

Unrooted-Neighbor Joining با استفاده از نرم افزار ClustalW نشان داد که تیوردوکسین‌ها به سه زیرگروه بزرگ I، II و III تقسیم‌بندی شده، به طوری که آیزوفرم VvTrxh4 به زیرگروه I و آیزوفرم VvCxxS2 به زیرگروه III تعلق دارند

بررسی فیلوژنتیکی آیزوفرم‌ها

بررسی فیلوژنتیکی آیزوفرم‌های VvTrxh4 و VvCxxS2 با تیوردوکسین‌های نوع h گیاهان آراییدوپسیس، درخت صنوبر، انگور، گندم، جو، برنج، سویا و کلزا به روش

باشد (Gelhay et al., 2005). نکته جالب در مورد آیزوفرم‌های *VvTrxh4* و *VvCxxS2* این است که با اینکه این آیزوفرم‌ها به زیرگروه‌های متفاوتی تعلق دارند، اما اسیدآمین‌ها موجود در موقعیت 100 توالی پروتئینی آن‌ها (مشابه با موقعیت 101 کلاس‌های IB و IC)، مشابه با تیوردوکسین‌های کلاس IB بوده و به ترتیب یک اسیدآمین‌ها باردار (K) و یک اسیدآمین‌ها آب‌دوست (N) می‌باشد. تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه II (*hII*) با جایگاه فعال WCGPC، دارای یک انتهای آمینو با طول زیاد بوده (Gelhay et al., 2004) و شامل آیزوفرم *Vv5* انگور و تیوردوکسین‌های *At2*، *At7* و *At8* آرابیدوپسیس می‌باشد. سومین زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* (*hIII*) به دو کلاس IIIA و IIIB تقسیم‌بندی می‌شوند (Gelhay et al., 2005): کلاس IIIA شامل تیوردوکسین‌هایی با جایگاه فعال معمول WCGPC، از قبیل آیزوفرم *Vv6* انگور بوده و دارای یک انتهای آمینو با طول زیاد می‌باشد که در موقعیت چهارم خود، یک اسیدآمین‌ها Cys دارند. آزمایش‌های جهش‌زایی نشان می‌دهد که این اسیدآمین‌ها به همراه دو اسیدآمین‌ها Cys موجود در جایگاه فعال، در واکنش کاتالیتیکی با گلوئوتاردوکسین‌ها (Grxs) دخالت دارند. کلاس IIIB نیز از تیوردوکسین‌های ناهنجار CxxS تشکیل شده و از جمله این تیوردوکسین‌ها می‌توان به آیزوفرم‌های *VvCxxS1* و *VvCxxS2* انگور اشاره نمود (شکل 6). بررسی فیلوژنتیکی

(شکل 6). Gelhay et al. (2005) با بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان دادند که تیوردوکسین‌های نوع *h* بر اساس توالی اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی به سه زیرگروه مختلف و هر زیرگروه به چند کلاس متفاوت تقسیم‌بندی می‌شوند. تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I (*hI*) با جایگاه فعال WC[G/P]PC، سیتوزولی بوده و بدلیل داشتن موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، در تنظیم ردوکس ترکیبات بافت آوندی دخالت داشته، و قبل از انتقال از طریق پلاسمودسماتا به درون عناصر آوند آبکش، در سلول‌های جانبی بافت آوند آبکشی سنتز می‌شوند (Gelhay et al., 2004, 2005). تیوردوکسین‌های *hI* به سه کلاس IA، IB و IC تقسیم‌بندی می‌شوند که آیزوفرم *VvTrxh4* به همراه آیزوفرم‌های *Vv1*، *Vv2* و *Vv3* انگور به کلاس IA تعلق دارند. کلاس‌های IB و IC علاوه بر تیوردوکسین‌هایی از گیاهان آرابیدوپسیس و کلزا، شامل تیوردوکسین‌هایی از غلات نیز می‌باشند. تیوردوکسین‌های موجود در کلاس IB، در موقعیت 101 توالی پروتئینی خود، دارای یک اسیدآمین‌ها آب‌دوست یا باردار (R، K یا N) می‌باشند، در حالی که اسیدآمین‌ها موجود در موقعیت مشابه توالی پروتئینی تیوردوکسین‌های کلاس IC، یک اسیدآمین‌ها آب‌گریز (A، I یا M) است. این اسیدآمین‌ها به عنوان اولین اسیدآمین‌ها موتیف ساختاری RKDD بوده که برای انتقال پروتئین از طریق پلاسمودسماتا بسیار حیاتی می‌-

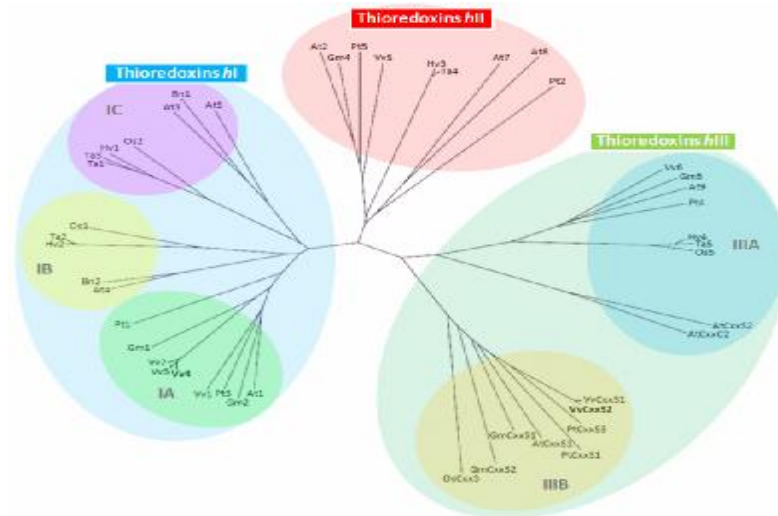
های کوچک، فراوان و مقاوم در برابر حرارت بدست آورده و گیاهانی متحمل به تنش‌های محیطی تولید نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مدیریت محترم سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، جناب آقای دکتر نوری و مدیریت محترم مرکز تحقیقات انگور تاکستان، جناب آقایان دکتر نجاتیان، مهندس رسولی و مهندس فدائی که ما را در امر نمونه برداری یاری نمودند، ابراز می‌دارند.

در مورد تقسیم‌بندی تیوردوکسین‌های نوع *h* گیاهان آرابیدوپسیس، درخت صنوبر، انگور، گندم، جو، برنج، سویا و کلزا، مشابه با نتایج موجود می‌باشد (Gelhaye *et al.*, 2004, 2005).

با توجه به تنوع، گستردگی و دخالت تیوردوکسین‌ها در فرآیندهای متعدد سلولی در گیاهان، شناسایی، جداسازی، همسانه‌سازی، بررسی فعالیت کاتالیتیکی، بررسی بیان آیزوفرم‌های مختلف تیوردوکسین در سطح RNA و پروتئین در بافت‌های مختلف گیاهان زراعی و باغی و انتقال به گیاهان مدل و بررسی فعالیت آن‌ها تحت تنش‌های زنده و غیرزنده توصیه می‌شود تا بتوان اطلاعات بیشتری از این پروتئین‌ها



شکل 6- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن زیرگروه و کلاس ژن‌های *VvTrxh4* و *VvCxxS2* با استفاده از تیوردوکسین‌های نوع *h* گیاهان آرابیدوپسیس، انگور، صنوبر، گندم، برنج، جو، سویا و کلزا. شماره دستیابی ژن‌ها در بخش مواد و روش‌ها آورده شده است.

Figure 6- The phylogenetic tree constructed using ClustalW software to demonstrate the subgroup and subclass of the *VvTrxh4* and *VvCxxS2* genes with *h*-type Trxs from *Arabidopsis*, grape, poplar, wheat, rice, barely, soybean, and casteroil plants. Accession numbers are given in materials and methods.

منابع

- Cazalis R, Pulido P, Aussenac T, Perez Ruiz JM, Cejudo FJ (2006). Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. *Journal of Experimental Botany*. 57:2165-2172.
- Dos Santos CV, Rey P (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *TRENDS in Plant Science*. 11:329-334.
- 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.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2003). Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters*. 555:443-448.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2004). The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:265-271.
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005). The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62:24-35.
- Hall M, Cabana AM, Akerlund H, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M, Kieselbach T (2010). Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics*. 10(5):987-1001.
- Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ (1998). Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta*. 205:12-22.
- Jacquot JP, Lancelin JM, Meyer Y (1997). Thioredoxin: structure and function in plant cells. *New Phytology*. 136:543-570.
- Joudrier P, Gautier MF, de Lamotte F, Kobrehel K (2005). The thioredoxin h system: potential applications. *Biotechnology Advances*. 23:81-85.
- 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 Molecular Biology Reports*. 26:335-349.
- Laloi C, Mestres Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP (2004). The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*. 134:1006-1016.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *PNAS*. 98:14144-14149.
- Maeda K, Finnie C, Ostergaard O, Svensson B (2003). Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry*. 270:2633-2643.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *PNAS*. 107(8):3900-3905.
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research*. 86:419-433.
- Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riendet C, Vignols F, Reichheld JP (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1783:589-600.

- Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimar BG, Netto LES (2010). Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*. 49(15):3317–3326.
- 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, 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 Physiology*. 150:552–561.
- Peterson FC, Lytle BL, Sampath S, Vinarov D, Tyler E, Shahan M, Markley JL, Volkman BF (2005). Solution structure of thioredoxin h1 from Arabidopsis thaliana. *Protein Structure Report*. 14:2195–2200.
- Reichheld JP, Mestres Ortega D, Laloi C, Meyer Y (2002). The multigenic family of thioredoxin h in Arabidopsis thaliana: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:685–690.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, 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 Biology*. 6:27–37.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol:1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Spyrou G, Enmark E, Miranda Vizueté A, Gustafsson JA (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:2936–2941.

Analysis and Comparison of Biochemical and Molecular Structural Characteristics and Phylogenetic Trend of Two *h*-Type Thioredoxin Isoforms from Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Askari)

Heidari Japelaghi R.¹, Haddad R.^{*2}, Garousi G.A.²

¹ M.Sc. of Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

² Academic member of Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Abstract

Thioredoxins (Trxs) are small heat-stable proteins that participate in dithiol-disulfide exchange reactions. In contrast to other organisms, plants contain six different Trx types: *f*, *m*, *x*, *y*, *o* and *h*. The *h*-type Trx consists of multiple forms that involved in different processes such as cellular protection against oxidative, biotic and abiotic stresses. Two thioredoxin *h*-type genes, called *VvTrxh4* and *VvCxxS2*, were isolated of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Askari) berry tissue and were cloned into pUC19 plasmid vector. Reverse transcription was carried out using Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), to analyze biochemical, structural and phylogenetic characteristics. Nucleotide sequence analysis revealed that the open reading frame of *VvTrxh4* and *VvCxxS2* genes are 345 bp and 381 bp long, respectively and encode for proteins of 114 and 126 amino acid residues, respectively. Protein sequence analysis showed that *VvTrxh4* gene contains a typical catalytic site WCGPC, whereas *VvCxxS2* gene harbors the non-typical active site WCIPS. The calculated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptides for both *VvTrxh4* and *VvCxxS2* were 12.76 kDa and 5.22, and also 14.25 kDa and 4.68, respectively. Structural analysis showed that deduced proteins contain a identical 3D structure, whereas phylogenetic study of cloned genes with thioredoxin from other plants revealed that these genes are belonging to different subgroups. In the present research project, *VvTrxh4* gene belongs to class IA, while *VvCxxS2* gene belongs to class IIIB from *h*-type thioredoxins.

Key words: Biochemical characteristics, Cloning, Grape, Phylogenetic, Thioredoxin.

* Corresponding author: R. Haddad

Tel: 02818371165

E-mail: raheemhaddad@yahoo.co.uk