

مقایسه فعالیت احیایی سه ایزوفرم تیوردوکسین گیاه برنج (*Oryza sativa*) در واکنش با انسولین

زهرا پاپ زن¹، آذر شاه پیری^{2*}

¹ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

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

تاریخ دریافت: 1390/08/20، تاریخ پذیرش: 1391/02/18

چکیده

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی با وزن مولکولی 12-14 کیلودالتون هستند که با داشتن یک گروه تیول-دی سولفید در جایگاه فعالشان (WCG/PPC)، در احیاء برگشت‌پذیر پیوندهای دی‌سولفیدی نقش دارند. ایزوفرم‌های مختلفی از Trx در گیاهان وجود دارند. ایزوفرم‌های *m*، *f*، *x* و *y* در کلروپلاست، ایزوفرم *o* در میتوکندری و ایزوفرم *h* در سیتوزول یافت می‌شوند. Trx *h* دارای اهمیت اساسی در رشد و نمو گیاه است. در پژوهش حاضر، توالی ژن‌های کدکننده‌ی سه ایزوفرم Trx *h* از گیاه برنج، با نام‌های OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 جداسازی و همسانه‌سازی شدند. جهت تولید پروتئین نوترکیب، ژن‌ها در پلاسمید بیانی pET-15b، همسانه‌سازی و سپس به سویه‌ی مناسبی از باکتری اشریشیا کلی به نام Rosetta (DE3) منتقل شدند. با تحریک پروموتور T7 به وسیله‌ی IPTG، میزان مناسبی از پروتئین‌های نوترکیب تولید و با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شدند. فعالیت احیایی سه ایزوفرم نوترکیب تولید شده با استفاده از انسولین به عنوان سوبسترای الکترون‌گیرنده و DTT به عنوان عامل احیا کننده اولیه مورد مقایسه قرار گرفت. هر سه ایزوفرم نوترکیب تولید شده فعال و قادر به احیای انسولین بودند. با این حال سرعت احیای انسولین در واکنش‌ها کاملاً متفاوت بود که می‌تواند منعکس‌کننده تفاوت در فعالیت این ایزوفرم‌ها در گیاه و در نتیجه احتمال تفاوت در نقش آن‌ها نیز باشد.

کلمات کلیدی: برنج، تیوردوکسین، همسانه‌سازی، بیان هترولوگ پروتئین، انسولین، فعالیت احیایی.

سیتوپلاسم و میتوکندری، احیای باندهای دی سولفیدی Trx h، توسط NADPH و از طریق آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH (NTR) صورت می پذیرد (Bréhélin et al., 2004). در حالیکه Trx های کلروپلاستی توسط فردوکسین و از طریق آنزیم فردوکسین تیوردوکسین ردوکتاز احیا می شوند. فردوکسین خود توسط الکترون های حاصل از زنجیره انتقال الکترون در فتوسنتز احیا می شود (Hirasawa et al., 1999). Trx های احیا شده، خود به عنوان عوامل الکترون دهنده به طیف وسیعی از پروتئین ها که در متابولیسم های مختلف سلولی نقش دارند، عمل می کنند (Montrichard et al., 2009).

در گیاهان عالی، چندین ایزوفرم از Trx h وجود دارد. به عنوان مثال، در ژنوم گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تعداد هشت ژن کد کننده ی Trx h شناسایی شده است (Meyer et al., 2002, 2005). نقش Trx h در جوانه زنی بذر غلات به خوبی مستند شده است (Shahpiri et al., 2009). سیستم NTR/Trx با احیای پیوندهای دی سولفیدی پروتئین های ذخیره ای در هنگام جوانه زنی بذر مانند گلیادین و گلوتنین درگندم و هوردئین در جو، آن ها را به شکل محلول در آورده و بدین ترتیب این پروتئین ها را در معرض هضم آنزیمی به وسیله ی پروتئازها قرار می دهد (Kobrehel et al., 1992; Alkhalifioui et al., 2007; Lozano et al., 1996; Renard et al., 2011). غیر فعال کردن بازدارنده های آنزیمی تجزیه کننده نشاسته

تیوردوکسین ها، پروتئین های کوچکی (12-14 کیلو دالتون) هستند که در تمام پروکاریوت ها و یوکاریوت ها یافت می شوند. این پروتئین ها با داشتن یک گروه تیول - دی سولفید در جایگاه فعالشان به عنوان یکی از مهمترین آنزیم ها در تنظیم شرایط اکسیداسیون - احیای سلولی شناخته می شوند (Schürmann & Jacquot 2000). پیوند دی سولفیدی موجود بین دو سیستمین در یک پلی پپتید، بین دو پلی پپتید در یک پروتئین و یا بین دو سیستمین موجود بین دو پروتئین، نقش مهمی در پایداری ساختمان، پیچش پروتئین و فعالیت پروتئین ها دارد. Trx ها با احیای برگشت پذیر پیوندهای دی سولفیدی در بسیاری از مولکول های پروتئینی هدف، فعالیت آن ها را تنظیم می کنند. در گیاهان سیستم تیوردوکسین از اهمیت خاصی برخوردار است به طوریکه بر خلاف پستانداران، باکتری ها و قارچ ها، گیاهان دارای ایزوفرم های مختلفی از تیوردوکسین می باشند که بر اساس توالی آمینواسید و همچنین محل قرار گیری در سلول های گیاهی، طبقه بندی می شوند. Trx های f، m، x و y در کلروپلاست قرار دارند، Trx o در میتوکندری و Trx h در بخش های مختلف سلولی مانند سیتوسول، هسته، شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری یافت می شود (Gelhaye et al., 2004; Meyer et al., 2002, 2005).

تیوردوکسین ها در حالت اکسید، حاوی یک پل دی سولفیدی (S-S) در جایگاه فعال خود هستند که می تواند به گروه تیول (SH) احیا شود. در

(انجام شد. درخت فیلوژنتیک با نرم افزار MEGA4 و با استفاده از روش Neighbor-Joining (Nj) رسم شد. آغازگرها با استفاده از نرم افزار invitrogen perfect primer design طراحی شدند. وزن مولکولی و نقطه‌ی ایزوالکتریک با استفاده از نرم افزار-Expassy protparam (<http://web.expasy.org/protparam>) تعیین شد.

تهیه نمونه گیاهی

بذرهای بالغ برنج از لاین 2 منتخب از توده محلی لنجان که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان تهیه شده بودند، توسط آب شسته و به مدت 24 ساعت خیسانده شدند. بذرهای خیسانده شده با استفاده از روش آبکشت در دمای اتاق و به مدت سه هفته کشت داده شدند. اندام هوایی و ریشه‌های گیاهچه‌های یک هفته ای برداشت و در دمای 80- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جداسازی و همسانه سازی سه ژن کد کننده ی Trx h از برنج

محتوای RNA اندام هوایی گیاهچه‌های یک هفته ای برنج، با استفاده از کیت high pure RNA isolation (Roche)، استخراج و جهت حذف آلودگی DNA، نمونه‌ها توسط محلول DNase فاقد RNase، تیمار شدند. محتوای RNA (غلظت 0/1 میکروگرم) با استفاده از واکنش نسخه برداری معکوس (RT-PCR) و

مانند آنزیم ممانعت کننده آمیلاز و یا بازدارنده‌های تریپسین (Kobrehel et al., 1991) و همچنین فعال کردن پروتئازی مانند تیوکالسین از جمله دیگر نقش‌های این سیستم در بذر غلات هنگام جوانه زنی می باشند (Besse et al., 1996). در ژنوم برنج نیز به طور کلی 30 مکان ژنی کد کننده ی Trx وجود دارد که از بین آنها نه ژن کد کننده Trx h می باشند. در تحقیق حاضر، به منظور مقایسه خاصیت احیاکنندگی Trxها در برنج، سه ایزوفرم OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 جهت همسانه سازی انتخاب شدند. تولید پروتئین‌های نو ترکیب و خالص سازی آنها، امکان مقایسه ی خاصیت احیا کنندگی این سه ایزوفرم از Trx در برنج را در واکنش با انسولین برای نخستین بار در محیط این‌ویترو فراهم نمود.

مواد و روش‌ها

تجزیه و تحلیل توالی‌ها

توالی ژن کد کننده و همچنین توالی آمینو اسیدی ایزوفرم‌های Trx h برنج، از پایگاه داده ی ژنوم برنج (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) گرفته شد. همچنین توالی آمینو اسیدی Trx hها از سایر گیاهان در NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد جستجو قرار گرفت. همردیف سازی توالی‌ها با استفاده از نرم افزار ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)

NdeI در ابتدای آغازگرها در نظر گرفته شد. توالی آغازگرها در جدول 1 ذکر گردیده است. محصول RT-PCR مربوط به ژن OsTrx23، در پلاسمید pJET (Fermentas) مورد همسانه سازی قرار گرفت. محصولات RT-PCR، مربوط به ژن های OsTrx1 و OsTrx20، نیز در ناقل pUC57 (Genscript) در محل بین جایگاه های برشی *BamHI* و *NdeI* همسانه سازی شدند. همسانه سازی با استفاده از هضم آنزیمی و همچنین توالی یابی مورد تایید قرار گرفت.

توسط کیت AMV Reverse Transcriptase (Fermentas) و آغازگر Oligo dT (Fermentas) جهت تهیه ی cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از cDNA ی تولید شده، آنزیم pfu پلیمراز (Fermentas) و طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی (Ostrx1F، Ostrx1R، Ostrx20R، Ostrx20F، Ostrx23R، Ostrx23F) به ترتیب ژن های OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 با استفاده از PCR مورد تکثیر قرار گرفت. لازم به ذکر است که محل جایگاه برشی آنزیم های *BamHI* و جدول 1- توالی آغازگرهای مورد استفاده.

Table 1- The Sequences of Applied Primers.

آغازگر Primer	توالی نوکلئوتیدی Nucleotide sequence
Ostrx1F	5' <u>CATATGATGGGGTCCTGTGTGGGA</u> 3'
Ostrx1R	5' <u>GGATCCTCAGGCGCTGTCAGCAAG</u> 3'
Ostrx20F	3' <u>GACGACGGTGTCTCGTTGGGTA</u> 5' <u>CATATG</u>
Ostrx20R	5' <u>GGATCCTTATACATCATATAAC</u> 3'
Ostrx23F	5' <u>CATATGGCCGCCGAGGAGG</u> 3'
Ostrx23R	5' <u>GGATCCTTAGGCAGAAGCAGATGCAGC</u> 3'

وجود ژن مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بر روی پلاسمید pET15b و همچنین مقاومت باکتری های Rosetta (DE3) به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل سویه های Rosetta (DE3) حاوی پلاسمیدهای نوترکیب بر روی محیط کشت حاوی هر دو آنتی بیوتیک قادر به رشد بودند. بنابراین به منظور تولید پروتئین از این سویه های نوترکیب، سلول های باکتری در دمای 37 درجه سانتی گراد در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (100 میکرومولار) و

بیان هترولوگ و خالص سازی پروتئین های نوترکیب

به منظور بیان پروتئین های نوترکیب، ابتدا پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از همسانه سازی ژن ها، با استفاده از آنزیم های برشی *BamHI* و *NdeI* هضم و به ناقل بیانی pET15b که با استفاده از همین آنزیم های برشی، خطی شده بود، منتقل شدند. پس از تایید توالی، پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری اشرشیاکلی سویه Rosetta (DE3) منتقل شدند. با توجه به

ستون، شیب غلظتی از 10-50% بافر B تهیه و به میزان یک میلی لیتر از هر کدام از ستون عبور داده شد. خروجی‌های ستون در لوله‌های اپندورف 1/5 میلی لیتری جمع آوری شدند. کیفیت خلوص با استفاده از آنالیز هر خروجی بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین‌های نوترکیب و خالص His₆-OsTrx1، His₆-OsTrx20 و His₆-OsTrx23 با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب پروتئین در طول موج 280 نانومتر و استفاده از قانون بیر-لمبرت تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت احیایی ایزوفرم‌های نوترکیب در واکنش با انسولین به عنوان سوبسترا

مخلوط واکنش در حجم 1 میلی لیتر شامل پتاسیم فسفات 100 میلی مولار با pH برابر 6/5، EDTA با غلظت 0/2 میلی مولار، انسولین با غلظت 1 میلی‌گرم در میلی لیتر، DTT با غلظت 1 میلی مولار و غلظت‌های 5 میکرومولار از هر کدام از پروتئین‌های نوترکیب His₆-OsTrx1، His₆-OsTrx20 و His₆-OsTrx23 بود. واکنش‌ها با اضافه کردن DTT آغاز و در دمای آزمایشگاه انجام شد. مقدار جذب نوری در طول موج 650 نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Beckman DU 530) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است یک واکنش حاوی تمام ترکیبات ذکر

کلرامفینیکل (5 میکرومولار) رشد داده شدند. وقتی A650 به 0/6 رسید، 100 میکرومولار IPTG به عنوان القاکننده به نمونه‌ها اضافه شد و کشت باکتریایی به مدت 4 ساعت ادامه یافت. در نهایت، رسوب نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ جداسازی و رسوب‌ها در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج پروتئین‌های فاز محلول، بافر *Bugbuster* (Novagen) به رسوب سلولی اضافه شد. نمونه‌ها به خوبی مخلوط و به مدت 30 دقیقه با 120 دور در دقیقه حرکت، در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ (14000 دور در دقیقه و دمای 4 درجه سانتی‌گراد، به مدت 20 دقیقه) مایع رویی حاوی پروتئین کل محلول به لوله‌های جدید منتقل شد. خالص سازی با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی و با استفاده از ستون‌های His-Trap HP (GE Healthcare) انجام شد. برای این منظور، ابتدا ستون‌ها با استفاده از بافر بارگذاری A (ایمیدازول 10 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH=8) به تعادل رسید. سپس پروتئین کل استخراج شده از ستون عبور داده شد. جهت حذف پروتئین‌هایی که به صورت غیر اختصاصی به ستون اتصال دارند، ستون با محلولی حاوی 10% بافر B (ایمیدازول 400 میلی مولار، کلرید سدیم 500 میلی مولار و 30 میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH=8) و 90% بافر A شستشو داده شد. سپس جهت شستشوی پروتئین (پروتئین نوترکیب حاوی His-tag) از

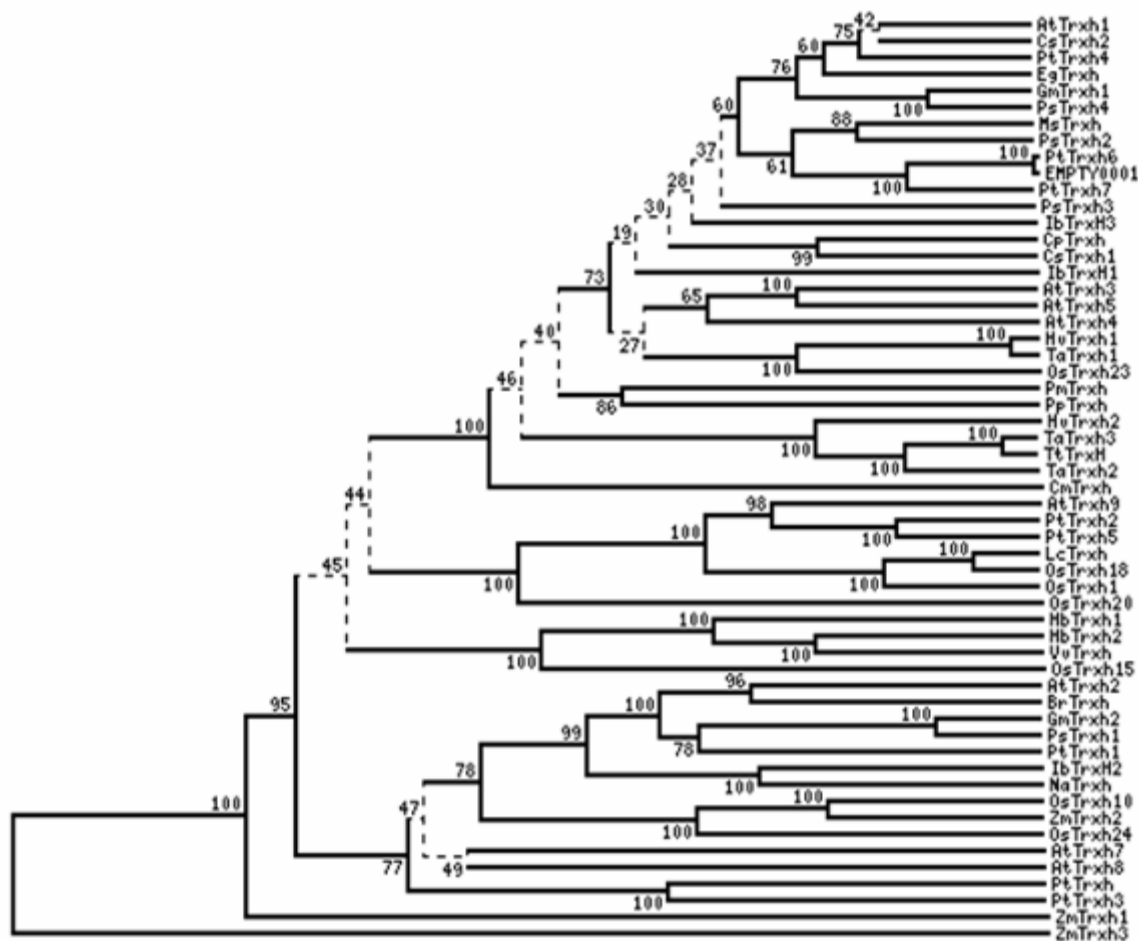
Lymus chinensis شباهت نشان داد. همچنین، ایزوفرم OsTrx20، به ترتیب به میزان 42 و 37 درصد، با ایزوفرم های OsTrx1 و OsTrx23 شباهت نشان داد. همردیف سازی بین توالی آمینواسیدی این سه ایزوفرم، تفاوت های قابل توجه ایزوفرم OsTrx20 با دو ایزوفرم دیگر را آشکار نمود. در حالیکه منطقه ی جایگاه فعال در ایزوفرم های OsTrx1 و OsTrx23 از موتیف WCG/PPC یعنی Trx فعال عمومی Trx یعنی WCG/PPC پیروی می کند، جایگاه فعال OsTrx20، به صورت WCTPC می باشد که در آن آمینو اسید گلايسين /پرولين، با ترئونین که یک آمینو اسید زنجیره ی قطبی می باشد جایگزین شده است (شکل 2). همچنین مقایسه ی توالی آمینو اسیدی بین سه ایزوفرم OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 نشان داد که ایزوفرم های OsTrx1 و OsTrx23، غیر از دو سیستمین (C) موجود در جایگاه فعال، دارای یک سیستمین اضافی در انتهای آمین می باشند. در حالیکه OsTrx20 دارای دو سیستمین اضافی در این انتهاست (شکل 2). حضور این سیستمین های اضافی در انتهای آمینوی Trx h موجود در صنوبر، جو و گندم نیز گزارش شده است (Maeda et al., 2003; Gelhaye et al., 2003; Cazalis et al., 2006). جایگزینی این سیستمین با اسید آمینه سرین در Trx h گندم نشان داده است که این اسید آمینه تأثیری بر فعالیت تیوردوکسین ندارد، اما حضور آن باعث دایمر شدن پروتئین می گردد (Cazalis et al., 2006).

شده در واکنش بدون حضور تیوردوکسین به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی، همسانه سازی و تجزیه و تحلیل توالی سه ژن کد کننده ی Trxh از گیاه برنج

توالی های cDNA به دست آمده در این پژوهش منطبق بر توالی های LOC_Os05g40190.1، LOC_Os01g07376.1 و LOC_Os07g08840.1 بود که قبلاً به ترتیب به عنوان OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 نامگذاری شده بودند (Nuruzzaman et al., 2008). توالی آمینو اسیدی پنج ایزوفرم OsTrx (شامل توالی سه ایزوفرم مورد مطالعه در این پژوهش) با توالی آمینو اسیدی Trx h از سایر گیاهان که از پایگاه اطلاعاتی NCBI شده بودند همردیف سازی شد و درخت فیلوژنتیک ترسیم گردید (شکل 1). نتایج این آنالیز نشان داد که توالی آمینواسیدی این سه ایزوفرم، شباهت بسیار زیادی به توالی Trx h از سایر گیاهان دارد، در حالیکه شباهت کمی بین این سه توالی مشاهده شد. تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک نشان داد که ایزوفرم OsTrx23 در حالیکه با ایزوفرم های OsTrx1 و OsTrx20 دارای 37 درصد شباهت در توالی است، اما با ایزوفرم Trx h از گیاه گندم (AAL67139) و ایزوفرم Trxh از گیاه جو (AAP72290)، به ترتیب دارای 76 و 74 درصد شباهت در توالی است. توالی آمینواسیدی ایزوفرم OsTrx1 به میزان 82 درصد با Trx h از گیاه



شکل 1- درخت فیلوژنتیک ایزوفرم‌های Trxh در گیاهان مختلف.

Figure 1- Phylogenetic Tree of Multiple Alignment between Trx h Isoforms of various plants.

At: *Arabidopsis thaliana*- AtTrxh1 (At3g51030)- AtTrxh2 (At5g39950)- AtTrxh3 (At5g42980)- AtTrxh4 (At1g19730)- AtTrxh5 (At1g45145)- AtTrxh7 (At1g59730)-AtTrxh8 (At1g69880)-AtTrxh9 (At3g08710); **Br:** *Brassica rapa*- BrTrxh (AAN76509); **Cp:** *Citrus x paradise*- CpTrxh (AAP33009); **Cs:** *Citrus shirauhi* -CsTrxh1 (AAP33009)- CsTrxh2 (ABL67652); **Cm:** *Cucurbita maxima*- CmTrxh (BAC21264); **Eg:** *Eucalyptus grandis*- Eg Trxh (ABB53600); **Gm:** *Glycine max*- GmTrxh1 (ABV71991)-GmTrxh2 (ABV71992); **Hb:** *Hevea brasiliensis*- HbTrxh1 (ACI00350)- HbTrxh2 (AAD33596); **Hv:** *Hordeum vulgare*-HvTrxh1 (AAP72290)-HvTrxh2 (AAP72291); **Ib:** *Ipomoea batatas*- IbTrxh1 (AAQ23134)-IbTrxh2 (AAQ23133)- IbTrxh3 (AAQ23135); **Lc:** *Leymus chinensis*- LcTrxh (AAO16555); **Ms:** *Medicago sativa*- MsTrxh (AAZ32865), **Na:** *Nicotiana alata*- NaTrxh (AAY42864), **Os:** *Oryza sativa*- OsTrx1 (LOC_Os01g07376.1)- OsTrx10 (LOC_Os03g58630.1)- OsTrx15 (LOC_Os04g53740.1)- OsTrx18 (LOC_Os05g07690.2)- OsTrx20 (LOC_Os05g40190.1)- OsTrxh23 (LOC_Os07g08840.1)- OsTrxh24 (LOC_Os07g09310.1) , **Pm:** *Picea mariana*-PmTrxh (AAC32111), **Pp:** *Prunus persica*- PpTrxh (AAL26915), **Ps:** *Pisum sativum*-PsTrxh1 (AAO12855)- PsTrxh2 (AAO12854)- PsTrxh3 (CAC42084)- Pstrxh4 (CAC36986), **Pt:** *Populus trichocarpa*- PtTrxh (CAC36986)- PtTrxh1 (EEF04165)- PtTrxh2 (XP_002323681)- PtTrxh3 (XP_002312703)- PtTrxh4 (XP_002310830)- PtTrxh5 (XP_002309192) **Ta:** *Triticum aestivum*- TaTrxh1 (AAL67139)- TaTrxh2 (AAF88067)- TatTxx3 (AAL24517), **Tt:** *Triticum turgidum*, **Vv:** *Vitis vinifera*, **Zm:** *Zea mays*.

نوترکیب His-OsTrx1، His-OsTrx20 و His-OsTrx23 به ترتیب 16/86، 17/54 و 15/31 کیلودالتون و نقطه ی ایزوالکتریک آن ها 5/59، 5/01 و 6/29 می باشد. وجود باندهای پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین های نوترکیب His-OsTrx1، His-OsTrx20 و His-OsTrx23 در مقایسه با سویه کنترل را تایید کرد (شکل 3). پروتئین های نوترکیب تولید شده، با استفاده از کروماتوگرافی جذبی و ستون های حاوی رزین نیکل (Ni^{2+})، خالص شدند (شکل 3). میزان عملکرد پروتئین خالص His-OsTrx1، His-OsTrx20 و His-OsTrx23 به ازای هر لیتر محیط کشت باکتری به ترتیب ترتیب 23، 13 و 25 میلی گرم بود.

بیان هترولوگ و خالص سازی پروتئین های نوترکیب OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23:

جهت تولید پروتئین های نوترکیب توالی های سه ژن کد کننده ی Trx h، پس از انتقال به ناقل بیانی pET15b به میزبان بیانی Rosetta (DE3) که از سویه های باکتری اشیریشیا کلی است، منتقل شدند. پس از القای باکتری ها با IPTG، فاز محلول پروتئین از باکتری ها استخراج شد و آنالیز کل پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE صورت گرفت. با توجه به وجود منطقه کد کننده پلی هیستیدین (His-tag) در بالا دست جایگاه کلون سازی در پلاسمید pET15b پروتئین های نوترکیب حاصل دارای دنباله پلی هیستیدین در انتهای آمینو می باشند. وزن مولکولی پیش بینی شده برای پروتئین های

```

*
OsTrx1  MGSCVGGKERSDEEDKIDFKGGNVHVI SNKENWDHKIAEANKDGKIVIANFSAAWCGPCR 60
OsTrx20  MG-CCGSSTVDAEEHLDYSGGNVTLVTDQKNWDNTMEEVAEHGKTVVLKFSAIWCTPCR 59
**
OsTrx23  -----MAAEE-----GVVIACHNKDEFDAQMTKAKEAGKVVIIDFTASWCGPCR 45
*

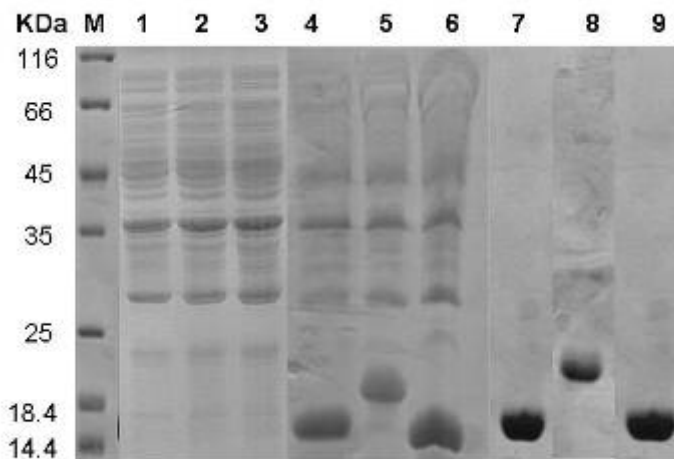
OsTrx1  IAPVYAEMSOTYPQFMFLTIDVDELMDFFSSWDIRATPTFFFLKNGEQVDKLVGANKPEL120
OsTrx20  AAPLFAELSLKYPDIVFVSDVDPELVTQYDVRATPTFLFMKNNEEI DKLVGGNHEDL119
OsTrx23  IAPVFAEYAKKFPGAVFLKVDVDELKEVAEKYNVEAMPTFLFIKDGAEADKVVGARKDDL105

OsTrx1  EKKVAALADSA----- 131
OsTrx20  QEKFEQLNRPKLYDDV- 135
OsTrx23  QNTIVKHVGATAASASA 122

```

شکل 2- همردیف سازی بین توالی های OsTrxh1، OsTrxh20 و OsTrxh23 از گیاه برنج با استفاده از نرم افزار ClustalW. سیستین ها در انتهای آمینو با علامت ستاره نشان داده شده اند و منطقه جایگاه فعال با رنگ خاکستری نشان داده شده است.

Figure 2- Multiple alignment between OsTrx1, OsTrx20 and OsTrx23 using the ClustalW software. The active site is shown with gray box and N-terminal Cysteins are marked with asterisk.



شکل 3- آنالیز SDS-PAGE بیان و خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب ایزوفرم‌های Trxh از گیاه برنج در باکتری اشرشیاکلی محتوای کل پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET15b-OsTrx1 (ستون‌های 1 و 4)، pET15b-OsTrx20 (ستون‌های 2 و 5) و pET15b-OsTrx23 (ستون‌های 3 و 6). قبل از اضافه کردن IPTG (ستون‌های 1، 2 و 3) و 4 ساعت پس از اضافه کردن IPTG (ستون‌های 4، 5 و 6). پروتئین‌های خالص سازی شده His-OsTrx1، His-OsTrx20 و His-OsTrx23 (ستون‌های 7، 8 و 9).

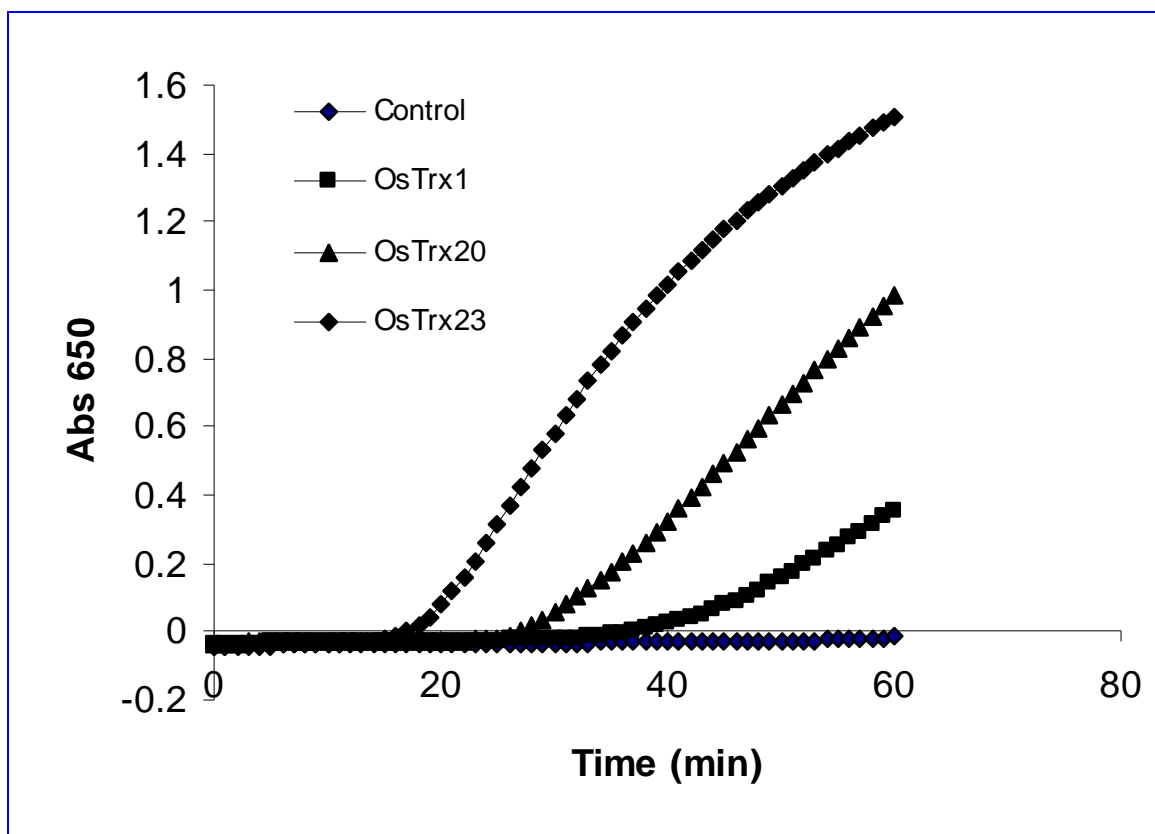
Figure 3- SDS-PAGE analysis for verification of expression and purification rice Trx h isoforms in *E. coli*. Total soluble protein extracted from *E. coli* harboring pET15b-OsTrx1 (lanes 1,4), pET15b-OsTrx20 (lanes 2,6) and pET15b-OsTrx23 (lanes 3,6). Before addition IPTG (lanes 1,2 and 3) and 4 hours after addition of IPTG (lanes 4,5 and 6). Purified His-OsTrx1, OsTrx20 and OsTrx23 (7, 8 and 9).

اندازه گیری فعالیت تیوردوکسین‌ها با استفاده از انسولین (Holmgren 1979). انسولین پروتئینی دارای دو پلی پپتید α و β می باشد که به وسیله دو باند دی سولفیدی به هم اتصال دارند. احیای باندهای دی سولفیدی باعث جدا شدن دو رشته از هم و رسوب رشته β می گردد. بنابر این در محیط این ویترو می توان با ایجاد واکنشی حاوی DTT، Trx h و انسولین و اندازه گیری میزان رسوب سفید رنگ تولید شده از طریق اندازه گیری میران جذب در طول موج 650 نانومتر به بررسی فعالیت احیایی انسولین پرداخت. در این پژوهش

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 پروتئین‌ها می باشد. هولمگرن و همکاران در سال 1979 نشان دادند که در محیط این ویترو نیز در صورتی که Trx h با DTT احیا گردد می تواند باعث احیای باندهای دی سولفیدی در انسولین گردد

رسوب دهی بین سه ایزوفرم متفاوت بود. در واکنش حاوی ایزوفرم OsTrx23، رسوب دهی پانزده دقیقه پس از اضافه کردن پروتئین آغاز شد، در حالیکه این مدت زمان برای ایزوفرم‌های OsTrx20 و OsTrx1 به ترتیب 27 و 37 دقیقه پس از اضافه کردن پروتئین بود. در بین سه ایزوفرم مورد مطالعه OsTrx23 با سرعتی معادل $0/05 \Delta A_{650}/\text{min}$ دارای بیشترین فعالیت در مقایسه با OsTrx1 ($A_{650}/\text{min}0/016$) و OsTrx20 ($A_{650}/\text{min}0/03$) بود.

نیز فعالیت احیایی سه ایزوفرم Trx h خالص به دست آمده، با استفاده از انسولین به عنوان سوسترا برای Trx و همچنین DTT به عنوان عامل احیا کننده مقایسه شد (شکل 4). یک واکنش حاوی DTT و انسولین، بدون حضور Trx، به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که هر سه ایزوفرم نوترکیب تولید شده فعال بودند، به طوریکه در مقایسه با نمونه ی کنترل، جذب در طول موج 650 نانومتر در هر سه واکنش افزایش پیدا کرد. با این حال سرعت



شکل 4- احیای انسولین توسط سه ایزوفرم His-OsTrx1، His-OsTrx20 و His-OsTrx23 تولید شده در طی زمان. نمونه ی کنترل شامل واکنش فاقد Trx h می باشد.

Figure 4- Time course of insulin reduction by purified recombinant His-OsTrx1, OsTrx20 and OsTrx23. Control shows the reaction containing insulin and DTT without addition Trx h.

بحث

یک از ژن‌های کد کننده ایزوفرم‌های مختلف AtTrxh از آرابیدوپسیس به سویه‌ای از مخمر که دارای ژن‌های جهش یافته Trx h بود به شکل مختلفی خصوصیات فنوتیپی از دست رفته به مخمر جهش یافته را باز گردانید. به عنوان مثال در حالیکه AtTrx3 و AtTrx4 باعث ایجاد تحمل مخمر جهش یافته به پر اکسید هیدروژن گردیدند، بیان دیگر ایزوفرم‌ها این خصوصیت را ایجاد نکرد (Mouaheb *et al.*, 1998). این نتایج نیز تفاوت در نقش ایزوفرم‌های مختلف را نشان می‌دهد. تفاوت در فعالیت احیا کنندگی فرم نوترکیب ایزوفرم‌های مختلف Trx h منشا گرفته از یک گیاه، دلیل دیگری بر تفاوت در نقش ایزوفرم‌های مختلف گیاهی است. به طوری که اشکال نوترکیب دو ایزوفرم HvTrxh1 و HvTrxh2 که هر دو در بذر جو بافت می‌شوند، فعالیت احیا کنندگی تقریباً متفاوتی در واکنش با انسولین نشان دادند (Maeda *et al.*, 2003). در پژوهش حاضر، سه ایزوفرم مختلف Trx h از گیاه برنج به نام‌های OsTrx1، OsTrx20 و OsTrx23 که دارای کمتر از 50 درصد شباهت در توالی هستند، به صورت هترولوگ در باکتری اشریشیا کلی تولید شدند. با تولید این ایزوفرم‌ها به صورت خالص امکان مقایسه فعالیت آن‌ها در واکنش با انسولین برای اولین بار در محیط این‌ویترو فراهم شد. در حضور ایزوفرم OsTrx23، انسولین با سرعت بیشتری نسبت به OsTrx20 و OsTrx1 احیا شد. همچنین سرعت احیا در حضور OsTrx20 بیش از

سیستم NADPH/Trx، که شامل NADPH، NTR و Trx‌های سیتوپلاسمی یا میتوکندریایی (Trx o و Trx h) می‌باشد، در گیاهان به عنوان یکی از مهمترین سیستم‌ها در تنظیم اکسیداسیون- احیای سلولی شناخته شده است. وجود طیف وسیعی از پروتئین‌های هدف برای این سیستم و نقش کلیدی آن‌ها در بسیاری از متابولیسم‌های سلولی به خوبی اهمیت این سیستم را نشان می‌دهد (Shahpiri *et al.*, 2009; Buchanan & Balmer, 2005). با این حال حضور ایزوفرم‌های Trx h در گیاهان، این سیستم را در مقایسه با دیگر موجودات بسیار پیچیده ساخته است. با اینکه پژوهش‌های زیادی بر روی سیستم NTR/Trx h در گیاهان صورت گرفته است، اما هنوز پاسخ واضحی برای این سوال که آیا ایزوفرم‌های مختلف Trx h دارای نقش متفاوتی در گیاهان می‌باشند یا خیر، وجود ندارد. بررسی بیان ژن کد کننده ایزوفرم‌های مختلف Trx h در اندام‌ها و یا بافت‌های مختلف گیاهی نشان داده است که ایزوفرم‌های مختلف دارای توزیع متفاوتی در اندام‌های گیاهی مختلف می‌باشند. به عنوان مثال HvTrxh1 از گیاه جو در هر دو بافت لایه آلرون و جنین بذر جو مشاهده شد، در حالیکه HvTrxh2 فقط در جنین بذر مشاهده شد (Shahpiri *et al.*, 2008, 2009). این نتایج خود می‌تواند باز گوکننده تفاوت در نقش ایزوفرم‌های مختلف باشد. از طرفی انتقال هر

OsTrx1 بود. این تفاوت در سرعت انتقال الکترون از هر ایزوفرم Trx h به پروتئین هدف، می تواند نشان دهنده‌ی احتمال تفاوت در نقش این ایزوفرم ها در گیاه برنج باشد.

منابع

- Alkhalfioui F, Renard M, William HV, Wong J, Charlene KT, William JH, Buchanan BB, Montrichard F (2007). Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology* 144: 1559–1579.
- Besse I, Wong JH, Kobrehel K, Buchanan BB (1996). Thiocalsin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3169-3175.
- Bréhélin C, Laloi C, Setterdahl AT, Knaff DB, Meyer Y (2004). Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* 79: 295-304.
- Buchanan BB, Balmer Y (2005). Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* 56: 187-220.
- Cazalis R, Pulido P, Aussenac T, Pérez-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.
- Gelhaye E, Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Girardet JM, Sautie`re PE, Sayzet M, Martin F, Jacquot JP (2003). Identification and characterization of a third thioredoxin h in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 629–635.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2004). The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 265-271.
- Hirasawa M, Schürmann P, Jacquot JP, Manieri W, Jacquot P, Keryer E, Hartman FC, Knaff DB (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry* 38: 5200-5205.
- Holmgren A (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide *The Journal of Biological Chemistry* 254: 9627-9632.
- Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M (1995). Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463.
- Kobrehel K, Yee BC, Buchanan BB (1991). Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of alpha-amylase and trypsin inhibitor proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 16135-16140.
- Kobrehel K, Wong JH, Balogh A, Kiss F, Yee BC, Buchanan BB (1992). Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiology* 99: 919-924.
- Lozano RM, Wong JH, Yee BC, Peters A, Kobrehel K, Buchanan BB (1996). New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta* 200: 100-106.
- Maeda K, Finnie C, Østergaard 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.
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP (2002). Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in Enzymology* 347: 394-402.
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F (2005). Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Research* 86: 419-433.

- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009). Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of proteomics* 72: 452-474.
- Mouaheb N, Thomas D, Verdoucq L, Monfort P, Meyer Y (1998). *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3312-3317.
- Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang Ch, Wang L, Xie L, Xiong L, Zhang Q, Lian X (2008). Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. *Molecular Genetics & Genomics* 280: 139-151.
- Renard M, Alkhalfioui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Montrichard F (2011). Identification and characterization of thioredoxin h isoforms differentially expressed in germinating seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 155: 1113-1126.
- Schürmann P, Jacquot JP (2000). Plant thioredoxin system revisited. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 371-400.
- Shahpiri A, Svensson B, Finnie Ch (2009). From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barley seeds. *Molecular Plant* 1-12.
- Shahpiri A, Svensson B, Finnie Ch (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.
- Xie G, Kato H, Sasaki K, Ryozi I (2009). A cold-induced thioredoxin h of rice, OsTrx23, negatively regulates kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 in vitro. *FEBS letter* 583: 2734-2738.

Comparison of Reduction Activity of three Rice (*Oryza sativa*) Thioredoxin Isoforms in Reaction with Insulin

Papzan Z.¹, Shahpiri A.*²

¹ MSc, Department of Agricultural 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

Thioredoxins (Trxs) are ubiquitous, low-molecular-mass proteins with two cysteins in their active site WC(G/P)PC which are involved in reversible reduction of disulfide bonds. Plants contain several forms of Trxs. Thioredoxin f, m, x and y are found in the chloroplast, Trxo is localized in mitochondria and Trxh is typically cytosolic. Trxh isoforms play important roles in plants development. In this study, we describe isolation and cloning of three cDNAs encoding different Trx h isoforms, stated OsTrx1, OsTrx20 and OsTrx23. Three Trx h were heterologously expressed in Rosetta (DE3) - a strain of *Escherichia coli*. After inducing T7 promoter with IPTG, proper amount of recombinant proteins were produced. The recombinant proteins were purified by affinity chromatography. The recombinant Trxh isoforms were analyzed for their ability to reduce Insulin – an electron receptor substrate for Trxs- and DTT, as a primary reducing agent. All three isoforms were active, but the rate of reduction varied among different reactions. The existence of observed variations can reveal different functions for thioredoxins in plant system.

Key words: Rice, Thioredoxin, Cloning, Heterologous protein expression, Insulin, Reduction activity.

* Corresponding Author: Shahpiri A.

Tel: 0311-3913354

Email: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir