شناسایی، همسانه سازی و تحلیل ساختار ژن تیوردوکسین *h* (*VvTrxh10*) جدا شده از بافت حبه انگور (*Vitis vinifera* L.) رقم یاقوتی

Identification and Cloning of a Thioredoxin *h* (*VvTrxh10*) Gene Isolated from Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Yaquti Berry Tissue

سید شرف‌الدین موسوی[۱]، رحیم حداد*[۲]، قاسمعلی گروسی[۲] و رامین حسینی[۲]

چکیده

جهت بررسی ساختار ژن تیوردوکسین، RNA کل از بافت حبه انگور (*Vitis vinifera* L.) رقم یاقوتی استخراج و با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR)، کتابخانه cDNA تهیه گردید. سپس ژن تیوردوکسین *h* تحت عنوان *VvTrxh10* سنتز، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه سازی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که قطعه همسانه سازی شده از ژن تیوردوکسین *h* حاوی یک چارچوب قرائت آزاد منفرد به طول ۳۴۵ bp بوده و پروتئینی با ۱۱۴ اسید آمینه را کد می‌کند. بررسی ترجمه پروتئینی توالی رمز کننده نشان داد که این ژن حاوی جایگاه فعال غیر معمول RCGLC، اسید آمینه تریپتوفان ویژه W و یک موتیف ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در انتهای آمینوی (MAEE) خود می‌باشد. بررسی فیلوژنتیکی و نیز همردیف سازی چندگانه نشان داد که این آیزوفرم متعلق به زیرگروه I از تیوردوکسین‌های *h* است. علاوه بر آن، توالی پروتئینی پیش‌بینی شده، شباهت زیاد آن را با ژن تیوردوکسین *h* سایر گیاهان در بانک ژن NCBI نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انگور، تیوردوکسین، همسانه سازی، بررسی توالی، رقم یاقوتی

---

۱ و ۲. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

*: نویسنده مسئول

مقدمه

تیوردوکسین‌ها پروتئین‌هایی فراگیر و از لحاظ وزنی کوچک (معمولا شامل ۱۰۰ تا ۱۲۰ آمینو اسید) بوده و دارای پل دی‌سولفیدی واکنش‌پذیر و به‌شدت انفعالی هستند که همه آن‌ها دارای توالی‌های حفاظت شده WC[G/P]PC در ساختار خود می‌باشند (Buchanan, 1991Y., Cha *et al*.1995 and Hagglund, *et al*.2008). تیوردوکسین‌ها دارای نقش‌های مهم از جمله کنترل عوامل نسخه برداری، اکسایش و کاهش تیول، انتقال الکترون به ریبونوکلئوتید ردوکتاز و حتی دفاع در برابر شرایط اکسیداتیو و مرگ سلولی هستند و هم‌چنین بر عوامل رشد سلولی تاثیر دارند (چیو و همکاران، ۲۰۰۸؛ چیبانی و همکاران، ۲۰۰۹). در پستانداران فرآیند اکسایش و کاهش تیوردوکسین‌ها تنها با پیوند دی سولفید صورت نمی‌پذیرد، بلکه گاهی ممکن است پیش ماده‌های دیگری نظیر سولفید، لیپید هیدروپروکسید و آب اکسیژنه نیز در این فرآیند دخالت نمایند (ساندالوا و همکاران، ۲۰۰۱). این مولکول‌ها در سلول‌های باکتریایی و جانوری، در واکنش-های متعددی که نیاز به احیای پیوند دی‌سولفید در پروتئین‌ها و یا آنزیم‌های هدف دارند، از جمله در واکنش‌های تیول دی سولفید، به‌وسیله باقیمانده سیستئینی جایگاه فعال خود، شرکت کرده که این امر به آن‌ها اجازه احیای پیوند دی سولفید در پروتئین‌های هدف را می‌دهد (زونگ و هولمگرن، ۲۰۰۰؛ هاشمی و همکاران، ۲۰۰۶؛ گلاند و همکاران، ۲۰۰۸؛ هارا و همکاران، ۲۰۰۶). در گیاهان نیز تیوردوکسین‌ها دارای نقش‌های بسیار ویژه و منحصر به فردی می‌باشند. بهترین مثال در این زمینه، سیستم تنظیمی اکسایش-کاهش توسط آنزیم‌های کلروپلاستی است. تیوردوکسین‌ها هم‌چنین پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر را طی فرآیند جوانه زنی تحریک می‌نمایند (چو و همکاران، ۱۹۹۹؛ شنگ و همکاران، b و a ۲۰۰۷). تیوردوکسین‌ها، خانواده‌های چند ژنی بزرگی را با موقعیت‌های درون سلولی مختلف، در گیاهان تشکیل می-دهند. سلول‌های گیاهی فتوسنتزی دارای دو سیستم کاهشی متفاوت و منحصر به‌فرد هستند که یکی از آن‌ها غیر کلروپلاستی بوده و وابسته به NADPH (به‌عنوان دهنده الکترون) است و دیگری کلروپلاستی بوده و وابسته به فردوکسین احیا شده توسط نور می‌باشد (بالمر و همکاران، ۲۰۰۶). تیوردوکسین‌های نوع *h* به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند که وجه تشابه آن‌ها با سایر گروه-های تیوردوکسین به استثناء آیزوفرم‌هایی که جایگاه فعال-شان به‌صورت CXXS است، در داشتن جایگاه فعال WC[G/P]PC می‌باشد. در این بین معمول‌ترین جایگاه فعال، جایگاه WCGPC بوده که در هر ۳ زیرگروه تیوردوکسین‌های نوع *h* و هم‌چنین تیوردوکسین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی فراوان‌ترین حالت را به‌خود اختصاص داده است، در حالی‌که جایگاه فعال WCPPC فقط در تعدادی از آیزوفرم‌ها و آن‌هم زیر گروه I وجود دارد. تمام تیوردوکسین-های نوع *h* که تاکنون شناخته شده‌اند، حداقل یک ویژگی متمایز برای شناسایی دارند و آن هم وجود یک اسید آمینه تریپتوفان (Trp) است که در توالی پروتئینی به‌صورت W نشان داده می‌شود. این اسید آمینه ضریب انهدام تصاعدی معادل ۲۹۰mm را به تیوردوکسین‌ها می‌دهد (مائیدا و همکاران، ۲۰۰۸؛ سراتو و همکاران، ۲۰۰۸).

گیاهان عالی و بریوفیت‌ها نسبت به جلبک‌ها، سیانوباکتری‌ها و موجودات غیر فتوسنتزی، هم شکلی‌های بیشتری از تیوردوکسین‌ها را دارا می‌باشند (چیبانی و همکاران، ۲۰۰۹). سلول‌های بذر غلات با بیان بالای ژن تیوردوکسین در طول جوانه‌زنی و بلوغ به‌مکانیزم‌هایی برای حفاظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو مجهز می‌شوند (پالیدو و همکاران، ۲۰۰۹). تیوردوکسین *h* در گندم ، جو و لگوم‌هایی چون *Medicago truncatula*، به‌عنوان پروتئین تنظیمی مرکزی در بذرها، عمل می‌نماید (لی و همکاران، ۲۰۰۹). این پروتئین به‌وسیله احیای گروه دی‌سولفید در پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، آنزیم‌ها و بازدارنده‌های آنزیمی فعالیت نموده و بدین‌وسیله سبب تسهیل در امر جوانه زنی می‌گردد. در گیاه آرابیدوپسیس، جایگاه ارتباط تیوردوکسین با چرخه کنترلی ردوکس در بخش لومن کلروپلاست نشان داد که واکنش‌هایی که توسط چرخه ردوکس در لومن کلروپلاست کنترل می شوند، نقشی اساسی در عملکرد فتوسیستم II و تنظیم شدت نور ایفا می‌نمایند (هال و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌چنین نتایج همسانه سازی ژن‌های تیوردوکسین و تیوردوکسین ردوکتاز مربوط به باکتری *Anabena ferrooxidans* و بیان آن‌ها در باکتری *Escherichia coli* نشان داد که اسید آمینه‌های سیستئین شماره ۳۳ و ۳۶ از ژن تیوردوکسین و اسید آمینه-های سیستئین شماره ۱۴۲ و ۱۴۵ از ژن تیوردوکسین ردوکتاز بقایای جایگاه فعال را تشکیل می دهند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

در این مطالعه، جداسازی و همسانه‌سازی توالی کامل cDNA کدکننده تیوردوکسین نوع *h*، با شماره دستیابی HM622264 در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank تحت عنوان *VvTrxh10*، از بافت حبه انگور رقم یاقوتی

توضیح داده می‌شود که ثبت گردیده است. سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختار دوبعدی توالی پروتئینی به‌دست آمده با استفاده از برنامه‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و با استفاده از بررسی‌های همولوژی و فیلوژنتیکی با تیوردوکسین‌های سایر گیاهان نشان می‌دهیم که ژن همسانه شده، تیوردوکسین نوع *h* بوده و به زیرگروه I تعلق دارد.

مواد و روش‌ها

حبه‌های انگور مورد بررسی در این پژوهش از مرکز تحقیقات انگور سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، واقع در شهر تاکستان تهیه گردید. ابتدا میوه‌ها از ناحیه اتصالشان به دمبرگ از خوشه جدا و سپس به میزان یک گرم حبه در داخل بسته‌های آلومینیومی قرار داده شدند. به‌منظور جلوگیری از اضمحلال احتمالی اسیدهای نوکلئیک موجود در بافت، نمونه‌ها بلافاصله در درون ازت مایع تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان مصرف در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

استخراج RNA کل به روش رید و همکاران (۲۰۰۶) و با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا بافر استخراج (300 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 2% PVP, 2% CTAB, 2 M NaCl, 2% β-mercaptoethanol) در یک لوله آزمایش ۱۵ ml آماده گردید. ۰/۱ گرم بافت حبه توسط ازت مایع در هاون به صورت پودر درآمده و به میزان متعارف به یک لوله آزمایش ۲ ml حاوی ۱ ml بافر استخراج اضافه گردید و به شدت تکان داده شد. لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تمامی مراحل بعدی عملیات استخراج RNA، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پروتئین‌ها دو مرتبه با یک حجم برابر از ترکیب کلروفرم: ایزو آمیل الکل (۲۴:۱ v/v) شستشو و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۴۰۰۰سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به یک لوله آزمایش جدید منتقل گردیده و سپس۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول، به‌منظور رسوب اسیدهای نوکلئیک به آن افزوده شد و چندین بار به آرامی سر و ته گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- و یا ۱۲-۸ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول مذکور به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصله در µl ۲۰۰ آب DEPC شده حل شد. مجدداً پروتئین‌ها یک مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱ v/v) شستشو و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید ۸ مولار به نمونه‌ها اضافه گردید و لوله‌ها به مدت یک طول شب (۱۲-۸ ساعت) در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب RNA کل با استفاده از الکل اتانول ۷۰ درصد و به - کمک سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شسته شد. کمیت و کیفیت RNA کل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲٪ تعیین گردید.

برای سنتز رشته اول cDNA، واکنش نسخه‌برداری معکوس انجام گرفت. برای این آزمایش از ۵-۰/۱ میکروگرم RNA کل به همراه یک میکروگرم آغازگر Oligo- (18mer) dT (Fermentas) و آنزیم نسخه‌بردار معکوس RevertAid^{TM} M-MuiV (Fermentas)، در حضور دزوکسی-ریبونوکلئوتیدهای تری فسفات (dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد و پس از آن، عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه-بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. بدین ترتیب رشته اول مولکول cDNA ساخته شده و از آن به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید.

به‌منظور طراحی آغازگرهای تصادفی و واکنش PCR از توالی DNA ژنومی ژن تیوردوکسین *h* انگور رقم پینوت نویر (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) با نام *VvTRXh* و شماره دست‌یابی AM430243 در بانک ژن NCBI استفاده گردید (ولاسکو و همکاران، ۲۰۰۶). در طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن *VvTRXh* و هم‌چنین محاسبه دمای ذوب آن‌ها از نرم‌افزار الیگو (نسخه ۶) استفاده شد. این آغازگرها براساس ابتدا و انتهای توالی ژن *VvTRXh*، به گونه‌ای طراحی شدند که محصول PCR حاصل از آن‌ها تمامی ناحیه رمز کننده این ژن را در برگیرد. برای انتخاب آنزیم برشی به‌منظور تسهیل در فرآیندهای همسانه‌سازی از نرم افزار آن لاین Restriction mapper. V3 استفاده گردید. پس از تبیین جایگاه برشی *Kpn*I و به‌منظور افزایش بازده برش آنزیمی، ۳ نوکلئوتید به انتهای '۵ آغازگرها اضافه شد. به‌منظور افزایش بیان ژن، ۳ نوکلئوتید با توالی ACC که بخشی از توالی مورد توافق کزاک به شمار می‌رود، بین توالی برشی و توالی اتصال آغازگر با ژن

مورد نظر اضافه شد. در نتیجه با توجه به ابتدا و انتهای ژن *VvTRXh* و توالی‌های مذکور، آغازگرهای اختصاصی با توالی‌های 5'-ATA**GGTACC**ACCATGGCGGAAG-3' (آغازگر رفت، مطابق با توالی اسید آمینه‌ای MAE) و 5'-TGTT**GGTACC**TCAAGCAGTTGCA-3' (آغازگر برگشت، مطابق با توالی اسید آمینه‌ای HATA) و با سفارش شرکت ژن فن آوران از شرکت دانمارکی کوپنهاژن (Copenhagen-Denmark) تهیه گردید. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اختصاصی در ۳۵ چرخه دمایی شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه بود. هم‌چنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت، قطعه تکثیر شده، از روی ژل و با استفاده از کیت استخراج DNA، محصول شرکت فرمنتاز با شماره کاتالوگ K0513، خالص سازی شد.

واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 انجام گرفت (هیمن و همکاران، ۲۰۱۰). پس از تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α، جهت انتقال پلاسمید حاوی ژن از روش شوک حرارتی استفاده شد (کوهن و همکاران، ۱۹۷۲). استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی و SDS انجام گرفت (بیرن بویم و دولای، ۱۹۷۹) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی DNA پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت Seqlab (Sequence Laboratories Gottingen-Germany) انجام شد. توالی اسید آمینه‌ای به‌دست آمده به‌منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مورد جستجو قرار گرفت (جدول ۱). هم‌ردیف‌سازی چندگانه و درخت‌های فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW (http://ClustalW.genome.ad.jp) تهیه شدند. هم‌چنین ساختار ثانویه پروتئین به‌وسیله برنامه PSIpred و سایر ویژگی‌های ساختاری پروتئین با استفاده از برنامه‌های ProtParam، PSORT و ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/) تعیین گردید.

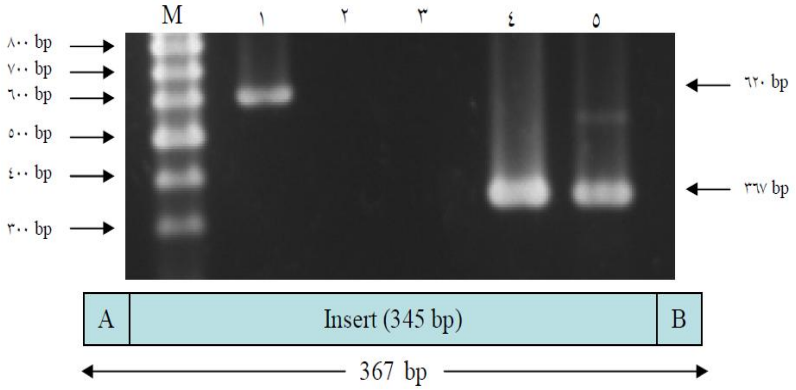
نتایج و بحث

جداسازی و همسانه‌سازی cDNA رمز کننده ژن تیوردوکسین *h*

cDNA رمز کننده ژن تیوردوکسین *h* (*VvTrxh10*) با استفاده از تکنیک RT-PCR از بافت حبه انگور، رقم یاقوتی، تهیه و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه‌سازی شد. بررسی‌ها با استفاده از تکنیک‌های PCR و هضم آنزیمی، دو کلونی نوترکیب را شناسایی کردند (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج توالی‌یابی DNA و بررسی با نرم افزار ClustalW نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده، از بالا خانواده تیوردوکسین‌های نوع *h* بوده و موقعیت قرارگیری آن روی جایگاه MCS ناقل پلاسمیدی در جهت معمولی می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده توسط هضم آنزیمی مطابقت دارد (شکل ۲).

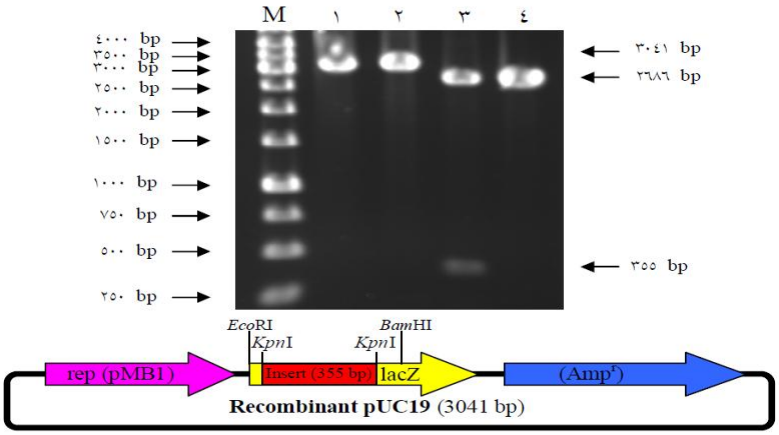
cDNA رمز کننده ژن تیوردوکسین (*VvTrxh10*) حاوی یک چارچوب قرائت آزاد منفرد به‌طول ۳۴۵ bp بود که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TGA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۱۴ اسیدآمینه را رمز می‌کرد که بیشترین اسید آمینه موجود در این پروتئین، اسید آمینه والین شناخته شد که ۱۴٪ از کل پروتئین را به‌خود اختصاص داد (شکل ۳ الف). با استفاده از برنامه SOPMA مشخص گردید که از این ۱۱۴ اسید آمینه، ۵۵ اسید آمینه (۴۸/۲۵٪) متعلق به مارپیچ آلفا، ۳۱ اسید آمینه (۲۷/۱۹٪) متعلق به مارپیچ بتا می‌باشد. فرمول مولکولی آن $C_{573}H_{917}N_{155}O_{163}S_9$ و وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۱۲/۸۷۴ کیلو دالتون و ۵/۴۰ بود و شاخص Aliphatic آن، به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت، ۹۸/۲۵ محاسبه گردید که نشان دهنده مقاوم بودن تیوردوکسین‌ها در برابر دما می‌باشد. شاخص Hydropathy محاسبه شده به روش کیت و دولیتل (۱۹۸۲)، نشان داد که پروتئین VvTrxh10، به‌دلیل خاصیت احیاءکنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز بوده (شکل ۳ ب) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۱۷ اسید آمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی‌که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۱۴ می‌باشد. هم‌چنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با برنامه‌های PSORT و WOLFPSORT نشان‌داد که برخلاف تعدادی از تیوردوکسین‌های نوع *h* که محل فعالیت‌شان درون میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی است (استین و همکاران، ۱۹۹۵؛ جلهای و همکاران، ۲۰۰۴؛ شاهپیری و همکاران، ۲۰۰۸؛ لپیستو و همکاران، ۲۰۰۹؛ هال و همکاران، ۲۰۱۰). پروتئین

VvTrxh10 از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن درون سیتوسول قرار دارد.



شکل ۱: آزمون سریع کلونی های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. M) نشانگر مولکولی bp ۱۰۰، ۱) کنترل مثبت bp ۶۲۰ (DNA و آغازگرهای مربوط به شرکت fermentase)، ۲) کنترل منفی فاقد عصاره سلولی، ۳) عصاره سلولی باکتری *E. coli* غیر نوترکیب، ۴ و ۵) کلونی‌های نوترکیب. برای هر نمونه، µl ۵ از محصول PCR درون هر چاهک بارگذاری شده است. A) جایگاه برشی آنزیم *Kpn*I (۶ bp) بانضمام توالی‌های اضافی دلخواه (۳ bp) و کزاک (۳ bp) بانضمام ۱۰ نوکلئوتید از آغازگر رفت که مجموعا ۲۲ نوکلئوتید را شامل می شود. B) جایگاه برشی آنزیم *Kpn*I (۶ bp) به همراه توالی اضافی دلخواه (۴ bp) بانضمام ۱۳ نوکلئوتید از آغازگر برگشت را در بر می‌گیرند که مجموعا ۲۳ نوکلئوتید را شامل می شود.

Figure 1: Analysis of recombinant clones by PCR and 1.2% agarose gel electrophoresis. M) 100 bp DNA ladder; lane 1) positive control (620 bp); lane 2) negative control, lake of primers; lane 3) negative control, lake of template; lanes 4 and 5) recombinant clones carrying ORF fragment of the *VvTrxh10* gene. For each sample, 5 µl from PCR product has been loaded into each well. A) 22 nucleotides including: *Kpn*I restriction site (6 bp), an addition of three nucleotides following Kozak sequence (3 bp) and forward primer (10 bp). B) 23 nucleotides including: *Kpn*I restriction site (6 bp), an addition of four nucleotides and reverse primer (13 bp).



شکل ۲: تایید کلونی‌های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. M) نشانگر مولکولی Kb ۱، ۱)پلاسمید نوترکیب هضم شده با آنزیم *Bam*HI ۲) پلاسمید نوترکیب هضم شده با آنزیم *Eco*RI، ۳) پلاسمیدهای نوترکیب هضم شده با آنزیم *Kpn*I، ۴) پلاسمید غیر نوترکیب هضم شده با آنزیم *Kpn*I.

Figure 2: Analysis of recombinant clones by enzymatic digestion and 1.2% agarose gel electrophoresis. M) 1 kb DNA ladder; 1) Recombinant plasmid digested by *Bam*HI; 2) Recombinant plasmid digested by *Eco*RI; 3) Recombinant plasmid digested by *Kpn*I; 4) Non-recombinant plasmid digested by *Kpn*I.

جدول ۱: مشخصات توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI مورد استفاده در بررسی‌های همردیف‌سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی

Table 1. The protein sequences characteristics on NCBI used for preparation of multiple alignment and construction of phylogenetic tree.

ردیف	نام عمومی گیاه	نام علمی	نام ژن	شماره دستیابی
1	Arabidopsis (آرابیدوپسیس)	*Arabidopsis thaliana*	*AtTrxh1*	Z35473
2	Grape (انگور)	*Vitis vinifera*	*VvTrxh1*	XM002280537
3	Grape (انگور)	*Vitis vinifera*	*VvTrxh2*	XM002274169
4	Grape (انگور)	*Vitis vinifera*	*VvTrxh3*	FN594959
5	Corn (ذرت)	*Zea mays*	*ZmTrxh1*	EU959205
6	Corn (ذرت)	*Zea mays*	*ZmTrxh2*	EU952330
7	Corn (ذرت)	*Zea mays*	*ZmTrxh3*	NM001112318
8	Rice (برنج)	*Oryza sativa*	*OsTrxh1*	AB053294
9	Wheat (گندم)	*Triticum aestivum*	*TaTrxh1*	AB053294
10	Wheat (گندم)	*Triticum aestivum*	*TaTrxh2*	AF420472
11	Soybean (سویا)	*Glycine max*	*GmTrxh1*	EU144127
12	Soybean (سویا)	*Glycine max*	*GmTrxh2*	BT090149
13	Rape (کلزا)	*Brassica napus*	*BnTrxh*	GI11135265
14	Tobacco (تنباکو)	*Nicotiana benthamiana*	*NbTrxh*	GQ354821
15	Sorghum (ذرت خوشه‌ای)	*Sorghum bicolor*	*SbTrxh1*	XM002461523
16	Sorghum (ذرت خوشه‌ای)	*Sorghum bicolor*	*SbTrxh2*	XM002463225
17	Pea (نخود فرنگی)	*Pisum sativum*	*PsTrxh1*	AY170650
18	Pea (نخود فرنگی)	*Pisum sativum*	*PsTrxh2*	XM002310794
19	Alfalfa (یونجه)	*Medicago truncatula*	*MtTrxh*	DQ121442
20	Poplar (صنوبر)	*Populus* trichocarpa	*PtTrxh1*	XM002307651
21	Poplar (صنوبر)	*Populus* trichocarpa	*PtTrxh2*	XM002310794
22	Castor oil (کرچک)	*Ricinus comunis*	*RcTrxh*	XM002534085
23	Sweet potato (سیب زمینی شیرین)	*Ipomoea batatas*	*IbTrxh*	AY344229
24	Red pepper (فلفل قرمز)	*Capsicum annuum*	*CaTrxh*	AY496104
25	Aleppe oak (صنوبر سیتکا)	*Picea sitchensis*	*PisTrxh*	EF083689
26	Red gum(اکالیپتوس)	*Eucalyptus grandis*	*EgTrxh*	DQ227992
27	Rye grass (چچم)	*Lolium perenne*	*LpTrxh*	AF159387
28	Salvia (سالویا)	*Salvia miltiorrhiza*	*SmTrxh*	FJ217699
29	Iron wood (سیب مانگرو)	*Sonneratia alba*	*SaTrxh1*	GQ121962
30	Iron wood (سیب مانگرو)	*Sonneratia alba*	*SaTrxh2*	GQ121963
31	Fagopyrum (راش گندم)	*Fagopyrum esculentum*	*FeTrxh*	GI11135312
32	Orange (پرتقال)	*Citrus sinensis*	*CiTrxh1*	GQ853549
33	Potato (سیب زمینی)	*Solanum berthaulti*	*SoTrxh*	DQ 413184
34	jatropha (جوزالقی)	*Jatropha curcas*	*JcTrxh*	FJ489602

همان‌طور که در ادامه بیان خواهد شد، توالی پروتئینی ژن *VvTrxh10* نشان‌داد که این پروتئین با تیوردوکسین‌های نوع *h* سایر گیاهان شباهت زیادی دارد اما دارای یک جایگاه فعال غیر معمول RCGLC (Arg-Cys_N-Gly-Leu-Cys_C) بوده که در هیچ‌کدام از ۳ زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* مشاهده نمی‌شود. این امر می تواند بیان‌گر ایزوفرم کاملاً جدید و منحصر به فردی از خانواده تیوردوکسین‌های نوع *h* باشد. علاوه بر تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I انگور، در توالی پروتئینی این ژن، موتیف ساختاری MAEE در ابتدای زنجیره مشاهده شد که فقط در تیوردوکسین‌های گیاهان عالی یافت می‌شود و در تیوردوکسین‌های باکتری‌ها، پستانداران و جلبک‌ها مشاهده نشده است (دروکس و همکاران ۱۹۸۷؛ دکوتینس و همکاران، ۱۹۹۰؛ کوهن و همکاران، ۱۹۹۳). وجود موتیف ساختاری مذکور، در انتقال سلول به سلول این پروتئین در بافت‌های مختلف گیاهی ضروری می‌باشد (پالیدو و همکاران، ۲۰۰۹). هم‌چنین تمام تیوردوکسین‌های نوع *h* که تاکنون شناسایی شده‌اند، دارای یک اسید آمینه تریپتوفان ویژه (W) می‌باشند که یک ضریب خاموشی تصاعدی را در حدود ۲۹۰nm به تیوردوکسین‌ها می‌دهد (چیو و همکاران، ۲۰۰۸). این اسید آمینه به‌طور معمول در موقعیت ۱۶ توالی پروتئین-های سایر آیزوفرم‌های تیوردوکسین *h* در گیاهانی چون انگور، ذرت، برنج، گندم وآرابیدوپسیس و پروتئین VvTrxh10 حاصل از ژن همسانه سازی شده مشاهده

گردیده است (فورستر، ۲۰۰۷؛ سراتو و همکاران، ۲۰۰۸). به نظر می‌رسد توالیMAEE مشاهده شده در ابتدای زنجیره پروتئینی VvTrxh10 و سایر تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I انگور، به‌جز آیزوفرم *VvTrxh1*، در انتقال پلاسمودسمایی نقش داشته باشد (جلهای و همکاران، ۲۰۰۴) که این فعالیت منحصر به فرد نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد.

بررسی ساختار دوم پروتئین VvTrxh10 با استفاده از برنامه PSIpred نشان داد که این پروتئین حاوی ۶ صفحه β و ۴ مارپیچ α می‌باشند که به‌ترتیب β_1، α_1، β_2، α_2، β_3، α_3، β_4، β_5، β_6 و α_4 در ساختار دو بعدی پروتئین قرار می‌گیرند (شکل ۴). در بین صفحات β، بلندترین صفحه مربوط به صفحات β_2 وβ_3 و β_6 با ۷ اسید آمینه و کوتاه‌ترین صفحه مربوط به صفحه β_4 با ۳ اسید آمینه می‌باشد. هم‌چنین در بین مارپیچ‌های α، بلندترین و کوتاه‌ترین مارپیچ به‌ترتیب مربوط به α_2 با ۱۶ اسید آمینه و α_3 با ۷ اسید آمینه می‌باشد. جایگاه فعال RCGLC به‌علت دارا بودن دو سیستئین (C) در توالی خود، سبب تشکیل باند دی سولفیدی در پروتئین تیوردوکسین شده و عامل اصلی احیای دیگر پروتئین‌های سطح سلولی در چرخه ردوکس می‌گردد. ما بین انتهای کربوکسیل صفحه β_2 و انتهای آمینوی مارپیچ α_2 به شکلی قرار گرفته است که اسیدهای آمینه Gly_{40}، Leu_{41} و Cys_{42} در انتهای آمینوی مارپیچ α_2 واقع شده‌اند. اسید آمینه ویژه Trp_{16}، چهارمین اسید آمینه مارپیچ α_1 را تشکیل داده و موتیف ساختاری MAEE انتهای آمینوی پروتئین نیز که عامل اصلی انتقال پلاسمودسمایی تیوردوکسین‌ها می‌باشد (شاه‌پیری و همکاران، ۲۰۰۹)، درون هیچ یک از صفحات β و مارپیچ‌های α قرار نگرفته و تنها یک ساختار Coil را تشکیل می‌دهد، اما موتیف ساختاری KREE که مانند موتیف ساختاری MAEE در انتقال پلاسمودسمایی نقش دارد (شاه‌پیری و همکاران، ۲۰۰۹)، به گونه‌ای در بین صفحه β_6 و مارپیچ α_4 قرار گرفته که اسیدهای آمینه Arg_{101}-Glu_{102}-Glu_{103} انتهای آمینوی مارپیچ α_4 را تشکیل می‌دهند که با سایر نتایج به‌دست آمده مطابقت دارد (کازالیس و همکاران، ۲۰۰۶؛ جاتنر و همکاران، ۲۰۰۸؛ شاه‌پیری و همکاران، ۲۰۰۸؛ هیمن و همکاران، ۲۰۱۰).

همردیف‌سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی

بررسی همردیفی با نرم‌افزار stalwClu نشان داد که ژن همسانه‌سازی شده *VvTRXh۱۰* با ژن‌های تیوردوکسین *h* سایر گیاهان شباهت نسبتا زیادی دارد، به‌طوری که ژن *VvTRXh۱۰* بیشترین تشابه را با گیاهان *alba Sonneratia* (۸۰٪)، *mays Zea* (۷۷٪)، *trichocarpa Populus* (۷۲٪)، *sitchensis Picea* (۶۹٪)، *colorbi Sorghum* (۶۸٪)، *max Glycine* (۶۸٪) و*batatas Ipomoea* (۶۸٪) و کمترین تشابه را با گیاه *communis Ricinus* (۵۴٪) نشان داد (شکل ۵). تاکنون چندین آیزوفرم از ژن تیوردوکسین *h* در گیاه انگور شناسایی شده‌اند که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تیوردوکسین‌های *h* به سه زیر گروه مختلف I، II و III تقسیم بندی می‌شوند که از نظر جایگاه فعال، انتهای زنجیره اسید آمینه، ساختار اولیه پروتئینی، موقعیت زیرسلولی و احتمالاً نوع کارکرد با هم متفاوتند (جلهای و همکاران، ۲۰۰۴؛ جوارز و همکاران، ۲۰۰۶). به‌منظور تعیین زیرگروه ژن همسانه‌سازی شده (*VvTrxh10*)، بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از تیوردوکسین های *h* گیاهان مختلف انجام شد (شکل ۶). ژن همسانه سازی شده (*VvTrxh10*) به‌همراه ایزوفرم‌های *VvTrxh1*، *VvTrxh2* و *VvTrxh3* از گیاه انگور، *GmTrxh1* و *GmTrxh2* از گیاه سویا، *PtTrxh1* و *PtTrxh2* از گیاه صنوبر،*CiTrxh1* و *CiTrxh2* از پرتقال، *SaTrxh1* و *SaTrxh2* از سیب مانگرو و *PsTrxh1* و *PsTrxh2* از گیاه نخود، *SbTrxh1* و *SbTrxh2* از گیاه سورگوم و ژن‌های *AtTrxh1*، *BnTrxh*، *MtTrxh*، *EgTrxh*، *RcTrxh*، *NbTrxh*، *SmTrxh*، *CaTrxh*، *IbTrxh* که به‌ترتیب متعلق به گیاهان آرابیدوپسیس، کلزا، یونجه، اوکالیپتوس، کرچک روغنی، توتون، سالویا، فلفل قرمز و سیب‌زمینی شیرین هستند، در زیرگروه اول (I) از تیوردوکسین‌ها دسته‌بندی می‌شوند. اما ایزوفرم‌های *ZmTrxh1*، *ZmTrxh2* و *ZmTrxh3* از گیاه ذرت، *TaTrxh1* و *TaTrxh2* از گیاه گندم، *OsTrxh1* از گیاه برنج و *SoTrxh* از گیاه سیب‌زمینی متعلق به زیر گروه دوم (II) می‌باشند. هم‌چنین دو ایزوفرم *LpTrxh* و *PisTrxh* به‌ترتیب از گیاهان چچم و صنوبر سیتکا در زیرگروه سوم (III) از تیوردوکسین‌ها جای می‌گیرند.

نتایج توالی‌یابی DNA و بررسی‌ها با نرم افزار Blastn و ClustalW صحت قطعه همسانه سازی شده را تایید نمود. بررسی فیلوژنتیکی به‌روش دندروگرام نشان‌داد که ژن همسانه سازی شده *VvTRXh10* به زیرگروه I تعلق داشته و همان‌طور که بررسی‌های ترتیب توالی نیز نشان داد، بیشترین شباهت را با آیزوفرم‌ها *VvTRXh1*، *VvTRXh2* و *VvTRXh3* انگور نشان می‌دهند. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که ژن شناسایی شده، آیزوفرم جدیدی از ژن تیوردوکسین *h* گیاه انگور بوده که با توجه به داده‌های پایگاه اطلاعاتی

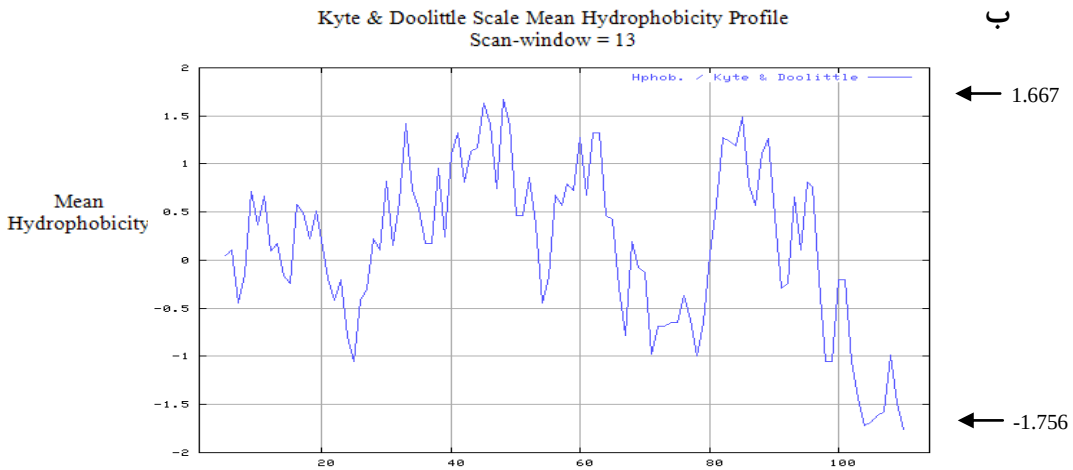
www.swissprot.com و نرم‌افزار WOLFPSORT موجود در این پایگاه، محل فعالیت آن احتمالاً در داخل سیتوسول می‌باشد و در تنظیم ردوکس سلولی نقش خود را ایفا می‌کند.

ژن تیورودوکسین *h* همسانه‌سازی شده در ناقل پلاسمیدی pUC19 در تحقیقات ملکولی آتی، با انتقال آن به گیاهان مدل و مطالعه اثرات آن مورد استفاده قرار خواهدگرفت.

الف

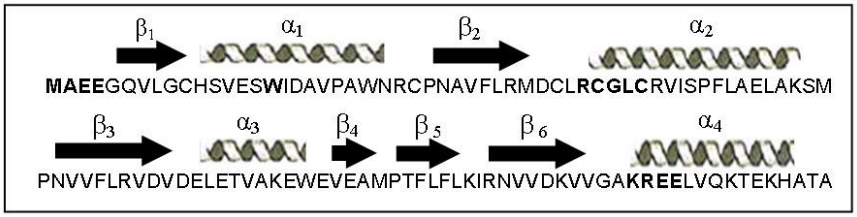
```
atggcggaagagggacaagttctcggttgccacagtgtggaatcgtggattgatgcagttccagcatggaatagatgtcct
 M  A  E  E  G  Q  V  L  G  C  H  S  V  E  S  W  I  D  A  V  P  A  W  N  R  C  P
aatgctgtatttctcaggatggactgcttgaggtgtggactgtgtcgtgtcattagcccatttctggcagagcttgccaag
 N  A  V  F  L  R  M  D  C  L  R  C  G  L  C  R  V  I  S  P  F  L  A  E  L  A  K
agtatgcctaatgtcgtatttctcagggtggatgtggatgaattggagactgttgctaaggagtgggaagtggaggccatg
 S  M  P  N  V  V  F  L  R  V  D  V  D  E  L  E  T  V  A  K  E  W  E  V  E  A  M
ccaacctttctgttcctgaaaataagaaacgtagtggacaaggttgtgggtgcaaaaagagaagaactggtgcagaagaca
 P  T  F  L  F  L  K  I  R  N  V  V  D  K  V  V  G  A  K  R  E  E  L  V  Q  K  T
```

ب



شکل ۳: بررسی توالی ژن *VvTrxh10*. الف) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی. توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی مشخص شده با کادر، نشان دهنده موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی مشخص شده بصورت پررنگ، نشان دهنده جایگاه فعال و اسیدآمینه مشخص شده با علامت مثلث، تریپتوفان ویژه می‌باشند. ب) بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین VvTrxh10. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط توپر قرار دارند.

Figure 3: cDNA and deduced amino acid sequences, and Hydropathic index of *VvTrxh10*. A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of *VvTrxh10*. The potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer (MAEE and KREE) and putative active site sequence (RCGLC) are indicated in italic and bold, respectively. The characteristic tryptophan (W16) is also distinguished by triangle. B) Hydropathic index analysis of VvTrxh10 deduced amino acid sequence. Hydrophobic domains are indicated by positive numbers; hydrophobic domains are above the line, and hydrophilic domains are below.



شکل ۴: ساختار دوبعدی پروتئین *VvTrxh10* با استفاده از برنامه PSIpred. جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسید آمینه تریپتوفان ویژه بصورت پررنگ نشان داده شده‌اند.

Figure 4: Predicted secondary structure of *VvTrxh10* using the PSIpred program. The potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer and the characteristic tryptophan are indicated in bold.

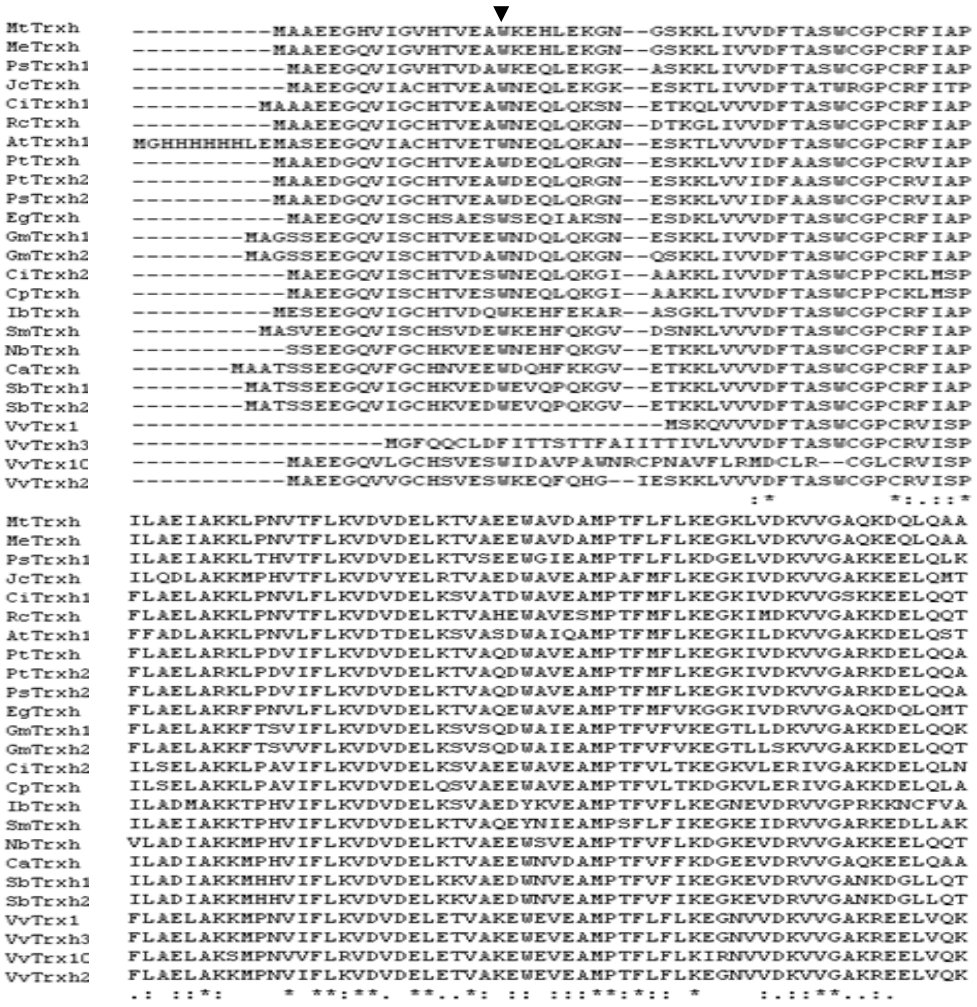
تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت مرکز تحقیقات انگور، واقع در شهر تاکستان در امر تهیه مواد گیاهی مورد نیاز کمال تشکر و سپاس را داریم. هم‌چنین از آقای مهندس رضا حیدری که در بخش نرم افزاری تدوین مقاله مساعدت لازم را مبذول داشتند، سپاسگزاری می‌گردد.

جدول ۲: آیزوفرم‌های ژن تیوردوکسین *h* و مشخصات کلی آن‌ها در گیاه انگور

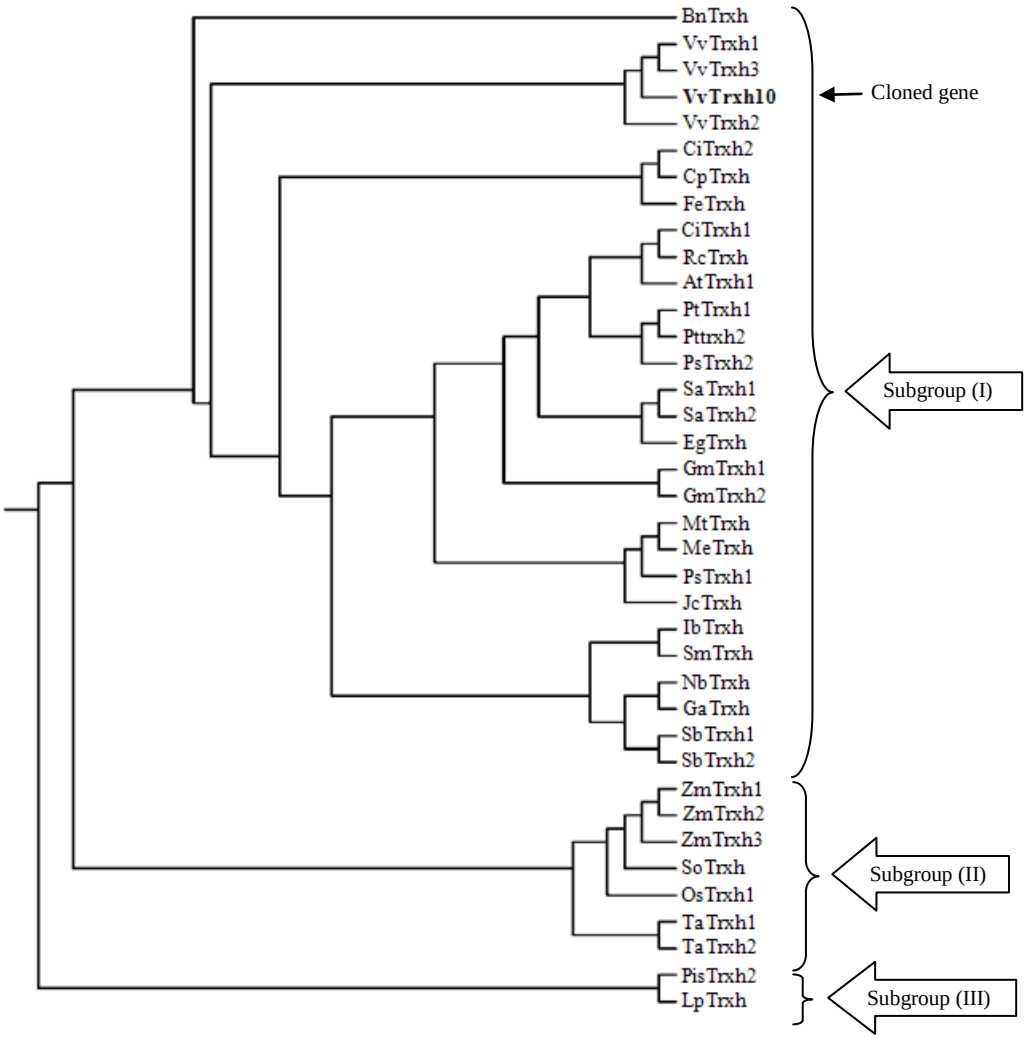
Table 2. The characteristics of different isoforms of Trx *h* gene in grape.

نام ژن	شماره دستیابی	بافت مورد استفاده	رقم مورد استفاده	زیر گروه	منبع
VvTrxh1	CF216136	Stem	Cabernet Sauvignon	(I)	Da Silva (2005)
VvTrxh2	CB348011	Berry	Cabernet Sauvignon	(I)	Da Silva (2005)
VvTrxh3	CF513794	Bud	Cabernet Sauvignon	(II)	Da Silva (2005)
VvTrxh4	CF473629	Leaf	Chardonnay	(II)	Gelhaye *et al.* (2004)
VvTrxh5	CB004453	Leaf	Chardonnay	(III)	Cramer and Cushman (2002)
VvCXXS	CF204852	Leaf	Chardonnay	(III)	Gelhaye *et al.* (2004)
VvTrxh	AM430243	Berry	Pinot Noir	(I)	Velasco *et al.* (2006)



شکل ۵: همردیف‌سازی چندگانه پروتئینی ژن *VvTrxh10* همسانه سازی شده با سایر ایزوفرم‌های انگور و گیاهان دیگر از زیرگروه I با استفاده از نرم افزار Clustalw. جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول با کادر و اسیدآمینه تریپتوفان ویژه با علامت مثلث نشان داده شده‌اند. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی در جدول ۱ آورده شده است.

Figure 5. Multiple sequence alignment of cloned *VvTrxh10* gene with other grape isoforms and selected Trxs *h*I from different sources using ClustalW. The potential structural motifs involved in cell-to-cell transfer were shown by box and the characteristic tryptophan is also distinguished by triangle. Accession numbers are given in Table 1.



شکل ۶: درخت فیلوژنتیکی رسم شده ژن همسانه سازی شده (*VvTrxh10*) با سایر آیزوفرم‌های گیاهان به منظور تعیین زیرگروه ژن همسانه سازی شده با استفاده از نرم افزار Clustalw. خلاصه مشخصات و شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی در جدول ۱ آورده شده است.

Figure 6: Phylogenetic analysis of cloned *VvTrxh10* gene with other grape isoforms and Trxs *h* from different plants to determine subgroup of cloned *VvTrxh10* gene using ClustalW. Accession numbers are given in Table 1.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵۵-۵۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

Identification, Cloning and Characterization of a Thioredoxin *h* (*VvTrxh10*) Gene Isolated from Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Yaquti Berry Tissue

Mussavi[1], S, S., Haddad[2*],R., Garousi[2], Gh. and Hosseini[2], R.

Abstract

Total RNA was extracted from grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Yaquti berry tissue to characterize a thioredoxin *h* gene (*VvTrxh10*). A cDNA library was synthesized using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then, the *VvTrxh10* gene was amplified, isolated and cloned in a pUC19 vector plasmid. Nucleotide sequence analysis revealed that the cloned cDNA expressed thioredoxin and contained a single open reading frame of 345 bp encoding a protein of 114 amino acid residues. Predicted protein sequence analysis showed that this gene contains a nongeneral catalic site RCGLC, characteristic tryptophan (W) and potential structural motif involving cell-to-cell taransfer (MAEE) in N-terminal. Phylogenetic and alignment studies revealed that such isoform belongs to the subgroup I from *h* thioredoxins group. Moreovere, relevant predicted protein exhibited a high similarity with the other plant thioredoxins *h* gene in the NCBI gene bank.

Keywords: Grapevine, Thioredoxin *h*, Cloning, Sequence analysis, Yaquti cultivar

References

Balmer, Y., Vensel, W. H., Cai, N., Manieri, W., Schurmann, P. and Hurkman, W. J. 2006. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. The National Academy of Sciences of the USA 8: 2988-2993.

Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Research 7: 1513-1525.

Buchanan, B. B. 1991. Regulation of the CO_2 assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Archives of Biochemistry and Biophysics 288: 1-9.

Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Perez-Ruiz, J. M. and Cejudo, F. J. 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin *h* isoforms from wheat showing differential expression in seeds. Journal of Experimental Botany 57: 2165-2172.

Cha, M. K., Kim, H. K. and Kim, I. H. 1995. Thioredoxin-linked 'thiol peroxidase' from periplasmic space of *Escherichia coli.* Journal of Biological Chemistry 270: 28635-28641.

Chew, E., Lu, J., Bradshaw, T. D. and Holmgren. A. 2008. Thioredoxin redoctase inhibition by antitumor quinols: a quinol pharmacophore effect correlating to antiproliferative activity. Medical Nobel Institute for Biochemistry 6: 2072-2083.

Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J., Gelhaye. E. and Rouhier, N. 2009. Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. Molecular Plant 2: 308-322.

Cho, M. J., Wong, J. H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P. G. and Buchanan, B. 1999. Overexpression of thioredoxin *h* leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. PNAS 96: 14641-14646.

Cohen, G., Yanko, M., Mislovati, M., Argaman, A., Schreiber, R., Av-Gay, Y. and Aharonowitz, Y. 1993. Thioredoxin-thioredoxm reductase system of *Streptomvces clavuligerus:* sequences, expression, and organization of the genes. Journal of Bacteriology 175: 5159-5167.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc, Natl. Acad. Sci. 69: 2110-2114.

Cramer, G. R. and Cushman, J. C. 2002. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. Genome Research. 12: 231-240.

Da Silva, F. G. 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. Journal of biological chemistry 10: 510-521.

Decottignies, P., Schmitter, J. M., Jacquot, J. P., Dutka, S., Picaud, A. and Gadal, P. 1990. Purification, characterization and complete amino acid sequence of a thioredoxin from a green alga *Chlamydomonas reinhardtii.* Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 112-121.

Droux, M., Jacquot, J. P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J. C., Crawford, N. A., Yee, B. C. and Buchanan, B. B. 1987. Ferredoxin-thioredoxin reductase: an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis. Ptirification and properties of the enzyme from cyanobacterial species. Archives of Biochemistry and Biophysics 252: 426-439.

1. Graduate in MSc of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, IR of Iran.

2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, IR of Iran, P. O. Box: 34149-288 Tel: 0281- 8371165, Fax: 3780073.

*: Corresponding author

Foerster, H. T. 2007. *Arabidopsis thaliana* col Pathway: thioredoxin pathway. Molecular Biology 4: 1357-1363.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y. and Jacquot, J. 2004. A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. PNAS 101: 14545-14550.

Hagglund, P. H., Bunkenborg, J., Maeda, K. and Svensson, B. 2008. Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags. Proteome Research. 12: 5270-5276.

Hall, M., Mata-Cabana, A., Akerlund, H. E. and Florencio, F. J. 2010. Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. Proteomics 10: 572-583.

Hashemy, S. I., Ungerstedt, J. S., Zahedi, A. F. and Holmgren, A. 2006. Thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. Journal of biological chemistry 281: 10691-10697.

Heyman, J. A., Cornthwaite, J. and Foncerrada, L. 2010. Frames using topoisomerase imediated ligation genome-scale cloning and expression of individual open reading. Genome Research 9: 383-392.

Juarez, D. J., McClure, B., Vazquez, S. S., Guevara, G. A., Leon, M. P., Marquez, G. J. and Cruz, G. F. 2006. A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase *in vitro*. Biology Chemistry 6: 3418-3424.

Juttner, J., Olde, D., Langridge, P. and Baumann, U. 2008. Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. European Journal of Biochemistry 267: 7109-7117.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982 A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal Molecular Biology 157: 105–132.

Lepisto, A., Kangasjarvi, S., Luomala, E. M., Brader, G., Sipari, N., Keranen, M., Keinanen, M. and Rintamaki, E. 2009. Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. Plant Physiology 149: 1261-1276.

Li, Y. C., Ren, J. P., Cho, M. J., Zhou, S. M., Kim, Y. B., Guo, H. X., Wong, J. H., Niu, H. B., Kim, H. K., Morigasaki, S., Lemaux, P. G., Frick, O. L., Yin, J. and Buchanan, B. B. 2009. The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds. Molecular Plant 3: 430-441.

Maeda, K., Hagglund, P., Finnie, C., Svensson, B. and Henriksen, A. 2008. Crystal thioredoxin *h* isoforms HvTrxh1 and HvTrxh2 reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. Protein Science. 6: 1015-1024.

Pulido, P., Cazalis, R. and Cejudo, F. J. 2009. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. Plant Journal 1: 132-145.

Reid, K. E., Niclas, O., James, S., Fred, P. and Steven, T. L. 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: 27-35.

Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. and Schneider, A. 2001. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. PNAS 98: 9533-9538.

Serrato, A. J., Guilleminot, J., Meyer, Y. and Vignols, F. 2008. *AtCXXS*: atypical members of the *Arabidopsis thaliana* thioredoxin *h* family with a remarkably high disulfide isomerase activity. Physiology Plant 3: 611-622.

Shahpiri, A., Svensson, B. and 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.

Shahpiri, A., Svensson, B. and Finnie, C. 2009. From proteomics to strutural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barely seeds. Molecular Plant 1-12.

Sheng, Z. W., Fen, L. Y., Wu, Z. S. and Bao, X. X. 2007a. Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. National Engineering Research Center for Wheat 1: 18-24.

Sheng, Z. W., Fen, L. Y., Wu, Z. S. and Bao, X. X. 2007b. Effects of antisense-thioredoxin *s* gene on expression of endogenous thioredoxin *h* gene in transgenic wheat seed. National Engineering Research Center for Wheat 4: 325-332.

Stein, M., Jacquot, J. P., Jeannette, E., Decottignies, P., Hodges, M., Lancelin, J. M., Mittard, V. Schmitter, J. M. and Miginiac, M. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxins: structure of the genes coding for the chloroplastic *m* and cytosolic *h* isoforms; expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. Plant Molecular Biology 28: 487-503.

Velasco, R., Dematte, L. and Toppo, S. 2006. Coping with an heterozygous genome: the Pinot Noir whole genome sequencing. Molecular Plant 10: 619-628.

Wang, X. L., Wayne, B. L., Yuan, Y. X., Wang, Y., Wei, Y., Theodore, A. C., Lopez, B. L., Liu, H. and Liang, M. 2010. Methylglyoxal increases cardiomyocyte ischemia/reperfusion injury via glycative inhibition of thioredoxin activity. Physiology Endocrinology Metabolism 10: 473-481.

Zhong, L. and Holmgren, A. 2000. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine. Journal of Biological Chemistry 275: 18121-18128.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 17-26= ۱۷-۲۶).