

همسانه‌سازی مولکولی ترادف رمزکننده ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی در گراسشورزی *Aeluropus littoralis*

احسان شکری\*، نجمه نصیری و قربانعلی نعمت‌زاده

ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۶

## چکیده

پمپ پروتونی  $H^+$ -ATPase یکی از پروتئینهای مهم موجود در غشای پلاسمایی گیاهان می‌باشد که نقش مهمی در فیزیولوژی مولکولی پاسخ به تنش ایفاء می‌کند. گراس *Aeluropus littoralis* به واسطه مقاومت به برخی از استرس‌های محیطی مثل تنش شوری و عناصر سنگین مدل خوبی برای مطالعه ساختار و عملکرد این پمپ می‌باشد. در این مطالعه به عنوان نقطه آغاز، ترادف کامل ناحیه کدکننده این ژن در هالوفیت *Aeluropus littoralis* شناسایی و همسانه‌سازی شد. اطلاعات اولیه به دست آمده نشان می‌دهد ترادف نوکلئوتیدی پمپ پروتونی  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی یک ناحیه ORF کامل به طول ۲۸۵۶ bp می‌باشد که همولوژی معنی‌داری با گونه‌های *Zea mays* و *Oryza sativa*، *Sorghum bicolor* دارد. همچنین ترادف آمینواسیدی این ژن، پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰۴۵۶۷ دالتون متشکل از ۹۵۱ اسیدآمینو را رمز می‌کند که از نظر نوع و ساختار دامین، بیشترین تطابق را با پروتئینهای  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گیاهی و فارچی نوع سوم (type III) از خانواده بزرگ پمپهای ATPase p-type دارد. هم‌ردیفی مقایسه‌ای ترادف آمینواسیدی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گیاه *Aeluropus littoralis* (*Alha*) برخی گونه‌ها نشان می‌دهد که جایگزینیهای نوکلئوتیدی نقاط حساس و عملکردی پروتئین را هدف قرار نداده و این مناطق در توالی مورد بررسی، حفاظت‌شده باقی مانده‌اند. در نهایت این ترادف با شماره دسترسی GI:346230720 در پایگاه داده NCBI ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی:  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی، *Aeluropus littoralis*، *Alha*، فیزیولوژی مولکولی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۰۵۳۳۲۱۹۳، پست الکترونیکی: shokri62@gmail.com

## مقدمه

سازگاری در مواجهه با تنش‌های زنده و غیرزنده همچون سرما، گرما، خشکی، شوری و غیره ایفاء می‌کند. یکی از پروتئینهای تراغشایی مهم موجود در غشای پلاسمایی گیاهان  $H^+$ -ATPase می‌باشد.  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی نقش مهمی در ایجاد و کنترل انتقالات از عرض غشاء ایفاء می‌کند. این آنزیم با استفاده از انرژی هیدرولیز ATP یون  $H^+$  را فعالانه به فضای آپوپلاستی هدایت می‌کند. عمل پمپ‌کردن پروتون به خارج، باعث ایجاد شیب الکتروشیمیایی در عرض غشاء گردیده و این اختلاف

غشای پلاسمایی که محیط سیتوپلاسم و هسته را در بردارد یک غشاء دولایه‌ای سیال است که از لحاظ بیولوژیکی بسیار فعال می‌باشد. پروتئینهای موجود در این غشاء که در سطح یا عمق آن مستقر هستند می‌توانند نقش‌های مختلف آنزیمی، ناقلی، ساختمانی و غیره داشته باشند. از مهم‌ترین اعمال بیولوژیکی غشای پلاسمایی خاصیت نفوذپذیری انتخابی نسبت به یونها، مولکولهای آلی و کنترل تردد ترکیبات به داخل و خارج سلول است. همچنین این غشاء نقش مهمی در پاسخ به محرکهای بیرونی و ایجاد

ATP دارند در حالی که در وضعیت  $E_2$  تمایل کمی برای این لیگاندها وجود دارد. وضعیتهای  $E_1$  و  $E_2$  در طول انتقال به صورت متناوب عمل می‌کنند (۳). دامینهای سیتوپلاسمی A، N و P مسئول هیدرولیز ATP هستند. تغییرات فضایی در این دامینها هنگام فرآیند کاتالیز منجر به تحرکات همزمان در بخشهای فرورفته در غشاء گردیده و انتقال پروتون را هدایت می‌کند. واحد انتقال‌دهنده پروتون یک سیستم گیرنده / دهنده پروتون را در مرکز ناحیه تراغشایی تشکیل می‌دهد که شامل آمینواسیدهای آسپارتیک اسید (Asp684)، آسپارژین اسید (Asn106)، آرژنین (Arg655) و یک حفره مرکزی بزرگ که احتمالاً با آب پر می‌شود، می‌باشد (۳). آسپارتیک اسید در تماس نزدیک با آسپارژین اسید می‌باشد. در وضعیت  $E_1$  پروتونه شدن آسپارتیک اسید (Asp684) باعث می‌شود بین این دو اسید آمینه پیوند هیدروژنی تشکیل شود. در حالی که فسفوریلاسیون باعث ایجاد وضعیت  $E_2$  و آزاد شدن پروتون از آسپارتیک اسید (Asp684) می‌گردد. پیشنهاد شده است آسپارتیک اسید نقش مهمی در رهاسازی و پمپ‌کردن پروتون در پتانسیلهای غشایی بالا دارد. بار مثبت آرژنین (Arg655) در نزدیکی آسپارتیک اسید (Asp684) باعث آزادسازی پروتون از آسپارتیک اسید (Asp684) می‌شود و مانع پروتونه شدن مجدد آسپارتیک اسید (Asp684) می‌گردد (۳). به نظر می‌رسد به ازاء هر واحد ATP، یک واحد پروتون انتقال یابد (۱۱). پمپ  $H^+$ -ATPase غشایی توسط یون پتاسیم ( $K^+$ ) تحریک می‌شود (۱۱). یون پتاسیم به دامین فسفوریلاسیون P در سیتوپلاسم متصل می‌شود و باعث دفسفوریلاسیون وضعیت فسفوریله شده  $E_1$  می‌گردد (۱۳). همچنین پمپ  $H^+$ -ATPase غشایی پلاسمایی گیاهان برای فعالیت خود نیاز مبرم به  $Mg^{2+}$  داشته و تنها قادر است که از انرژی هیدرولیز ATP استفاده نماید. امروزه تحقیقات به روشنی اهمیت پمپ  $H^+$ -ATPase غشایی پلاسمایی گیاهان را به واسطه تنوع فراوان اعمال حیاتی و نقش ضروری آن در سازگاری با تغییرات

غلظت یون زمینه لازم را برای فعالیت سایر ناقلین غشایی فراهم می‌آورد. عمل هم‌انتقالی (Symport) و انتقال تبادلی (Transport) ناقلین غشاء باعث جذب مواد ضروری، دفع یون، آلاینده‌ها و ترکیبات سمی از سلول می‌شود (۷). بنابراین پمپ  $H^+$ -ATPase غشایی پلاسمایی طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیک و اساسی گیاه همچون جذب، دفع، بارگیری آوندها، باز و بسته شدن روزنه‌ها، رشدونمو و طول شدن سلولها و غیره را از طریق ایجاد فشار پروتون و تنظیم pH سلول تحت تأثیر قرار می‌دهد. از لحاظ ساختاری  $H^+$ -ATPase یک پمپ بیولوژیک محسوب می‌شود که تنها از یک زنجیره پلی‌پپتیدی عملکردی با جرم مولکولی ۱۰۰ kDa تشکیل شده است. این پروتئین می‌تواند از طریق الیگومریزاسیون (Oligomerize) کمپلکسهای هگزامری و دایمری ایجاد کند (۸). پایانه‌های کربوکسیلی (C) و آمینی (N) این پروتئین در فضای سیتوپلاسم رها شده است (۵). در ساختار  $H^+$ -ATPase پلاسمایی ۵ دامین به نامهای M، A، N، P و R وجود دارد. دامین A (فعال‌کننده - Actuator) شامل انتهای آمینی (N) و یک لوپ کوچک می‌باشد. دامین M (دامین غشایی) یک دامین تراغشایی با ۱۰ ناحیه هلیکس به نامهای  $M_1$  تا  $M_{10}$  می‌باشد. دامین P (جایگاه فسفوریلاسیون) در لوپ بزرگ قرار دارد و دامین N (Nucleotide binding) در بین دو ناحیه توالی تشکیل‌دهنده دامین P قرار گرفته است. دامین R (تنظیم‌کننده) نیز پایانه کربوکسیلی پروتئین را شامل می‌شود که نقش خودبازداری (Autoinhibitory) دارد (۵ و ۱۱). فعالیت  $H^+$ -ATPase غشایی پلاسمایی گیاهان با مداخله این بخش پایین نگه داشته می‌شود. به نظر می‌رسد خاصیت بازدارندگی این دامین مربوط به واکنش (تداخل) نواحی R I و R II با دامینهای سیتوپلاسمی باشد (۶ و ۱۲). سیکل کاتالیک  $H^+$ -ATPase غشایی با دو وضعیت فضایی  $E_1$  و  $E_2$  تعریف می‌شود. بر این اساس در وضعیت  $E_1$  جایگاههای اتصال ناحیه تراغشایی کشش بالایی برای پروتون و مولکول

**طراحی آغازگرها:** طراحی آغازگرهای دجنره با استفاده از نرم افزار OLIGO 5 و با استفاده از اطلاعات به دست آمده از هم‌ردیفی چندگانه برای ژن موردنظر در گونه‌های *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* و سایر گونه‌ها انجام گردید. توالی الیگونوکلوئوتیدهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت زیر می‌باشد:

**Forward :**

5-ATGGG(T,C)(A,G)GGCTCG(A,G)GATC-3

**Reverse :** 5-TCACACGGTGTAGTTCTGGTTG-3

**استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن Alha :**

استخراج RNA به روش ترايزول با اندکی تغییرات انجام شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگ تاز به ازت مایع سائیده شد و پودر به دست آمده در ۱ میلی‌لیتر ماده تجاری ترايزول همگن گردید. سپس با افزودن کلروفورم فاز آبی که حاوی RNA کل می‌باشد از فاز آلی جداسازی و با استفاده از اتانول رسوب داده شد. ارزیابی غلظت و کیفیت RNA به دست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز انجام شد. سپس جهت ساخت cDNA، واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آنزیم M-Mulv Reverse transcriptas (شرکت *Fermentas*) و آغازگر برگشت انجام گردید. cDNA سنتز شده، به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت و آنزیم *Pfu polymerase* (تاکارای ژاپن) استفاده شد. شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۹ درجه و بسط ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و نهایتاً بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. نوار ۳۰۰۰bp به دست آمده با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت *Roche*، جداسازی و در وکتور pTZ57R/T طبق

محیط به اثبات رسانیده است (۱۰). تا کنون نقش این پمپ در بارگذاری سوکروز و انتقال سایر ترکیبات آلی در آوندهای آبکش، جذب عناصر معدنی در ریشه‌ها، رشد ریشه‌های مویی و لوله‌گرده، باز و بسته شدن روزنه‌ها، حفظ فشار تورگر، تنظیم حرکات و جهت‌یابی در گیاه، انرژی‌دهی ترانسپورترها و تنظیم PH سیتوپلاسم و بسیاری از اعمال فیزیولوژیک دیگر (۴، ۹ و ۱۴) برای این پمپ گزارش شده است. در این مطالعه گیاه *Aeluropus littoralis* به عنوان یکی از هالوفیت‌های بومی ایران که در اراضی شور نواحی خشک و نیمه خشک کشور متکامل شده است به عنوان منبع ژن، به منظور جداسازی ترادف کدکننده ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که انتظار می‌رود بخشی از مقاومت گیاه *Aeluropus littoralis* به عنوان یک گیاه شورزی در مواجهه با برخی تنش‌های محیطی مثل شوری و عناصر سنگین مربوط به چگونگی ساختار و عملکرد پمپ  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی آن باشد، اطلاعات به دست آمده در این تحقیق می‌تواند در آتیه مطالعات فیزیولوژی تنش و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم سودمند واقع شود.

## مواد و روشها

**تهیه مواد گیاهی:** به منظور تهیه مواد اولیه گیاهی مورد نیاز در این تحقیق، بذرهای گیاه *A. littoralis*، پس از انجام بررسی‌های گیاه‌شناسی و تأیید گونه، از رویشگاه‌های طبیعی آن در مناطق شمالی کشور (استان مازندران) جمع‌آوری و به گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، منتقل گردید. پس از انجام ضدعفونی سطحی بذرها در ماسه شسته کشت گردیدند. یک ماه پس از کشت به منظور افزایش سطح ترانسکریپتوم پاسخ‌دهنده به شوری در گیاه و سهولت جداسازی، تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم به مدت ۱۴ روز اعمال شد و سپس برگ‌های گیاه جهت استخراج RNA برداشت گردید.

آنالیز توالی نوکلئوتیدی آشکار شده نشان داد، ترادف به دست آمده یک ناحیه ORF کامل به طول ۲۸۵۶ bp می‌باشد که با کدون خاتمه TGA به پایان می‌رسد. همچنین مشخص گردید این ترادف، پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰۴۵۶۷ دالتون متشکل از ۹۵۱ اسیدآمینه را رمز می‌کند. به منظور دستیابی به اطلاعات بیشتر در خصوص قطعه تکثیر شده آزمون میزان درجه همسانی در Gene Bank با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی انجام گردید. نتایج آنالیز هم‌ردیفی با استفاده از برنامه BLAST نشان داد که ژن مورد بررسی همولوژی بالا و معنی‌داری در سطح DNA و اسیدآمینه با ژنهای p-type ATPase در گونه‌های مختلف گیاهی، قارچها و جلبکها دارد. بر این اساس در سطح پروتئینی ۹۲ تا ۹۵ درصد تشابه با گونه‌های *Brachypodium*، *Oryza sativa*، *Sorghum bicolor* و *Zea mays distachyon* به دست آمد (جدول ۱). همچنین در سطح نوکلئوتیدی ۹۰ درصد همسانی با گونه‌های *Oryza sativa*، *Sorghum bicolor* و *Zea mays* مشاهده گردید (جدول ۲).

به منظور شناسایی دقیق‌تر و انتساب ترادف مورد بررسی به زیر خانواده (subfamily) صحیحی از پروتئینها، توالی پپتیدی برای کشف وجود دامینهای احتمالی با استفاده از امکانات سرور جستجوی CDD در سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفت. بر این اساس دامینهای cation-ATPase-N، ATPase-III-A-H، ATPase-HHE1-E2-ATPase و HAD: halocid dehalogenase در ترادف مورد بررسی شناسایی شد و جایگاه نسبی آن با برخی از ترادفهای گونه‌های گیاهی و قارچی مقایسه گردید (شکل ۱). نتایج به دست آمده از هم‌ردیفی مقایسه‌ای دامینهای حفاظت شده نشان داد توالی مورد بررسی از نظر نوع و ساختار دامین، بیشترین تطابق را با پروتئینهای H<sup>+</sup>-ATPase غشای پلاسمایی گیاهی و قارچی نوع سوم (type III) از خانواده بزرگ پمپهای p-type ATPase دارد. با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینواسیدی مشخص شد که در پلی‌پپتید

دستورالعمل کیت InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) در باکتری *E. coli* کلون شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از باکتری بر روی محیط گزینش حاوی IPTG، X-gal و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ کشت گردید. پس از ظهور کلون‌ها، استخراج پلاسمید با استفاده از روش مینی‌پرپ از کلون‌های سفید انجام شد. در این روش با استفاده از بافر (گلوکز، EDTA و Tris-Hcl با PH=8) دیواره سلولی باکتری به صورت قلبایی لیز می‌شود. سپس محلول دناتوره‌کننده (حاوی NaOH و SDS) اضافه می‌گردد و در نهایت با استفاده محلول فنل/کلروفورم/ ایزوآمیل الکل، فاز آبی حاوی پلاسمید جداسازی و با استفاده از اتانول رسوب داده شد. تعیین توالی به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید.

**آنالیزهای بیوانفورماتیکی:** درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour joining و توسط نرم‌افزار MEGA 4 و آنالیز ساختار ثانویه و پیش بینی مناطق تراغشایی به روش Kyte and Doolittle و به صورت آنالیز توسط برنامه Genetyx-Mac سرور [www.expasy.org](http://www.expasy.org) صورت پذیرفت. بازبینی قطعه توالی‌یابی شده با نرم افزار Chromas و شناسایی ORF، هم‌ردیفیهای چندگانه و آنالیز توالی DNA و پروتئین با استفاده از نرم‌افزار DNASISMAX و BioEdit انجام شد. همچنین به منظور تعیین جایگاههای آمینواسیدی مهم (شکل ۳) از نرم افزار TMRPres2D و توالی پپتیدی ژن AHA2 و مقاله Palmgren (۲۰۱۱) (۱۱) استفاده شد. تعیین دامینها و آزمون درجه همسانی به وسیله پایگاه ژن NCBI و برنامه BLAST انجام گردید.

## نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای دجنره و نمونه cDNA برگ به عنوان الگو منجر به تکثیر قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۳۰۰۰ جفت باز گردید. قطعه DNA به دست آمده پس از بازیابی از روی ژل تعیین ترادف شد.

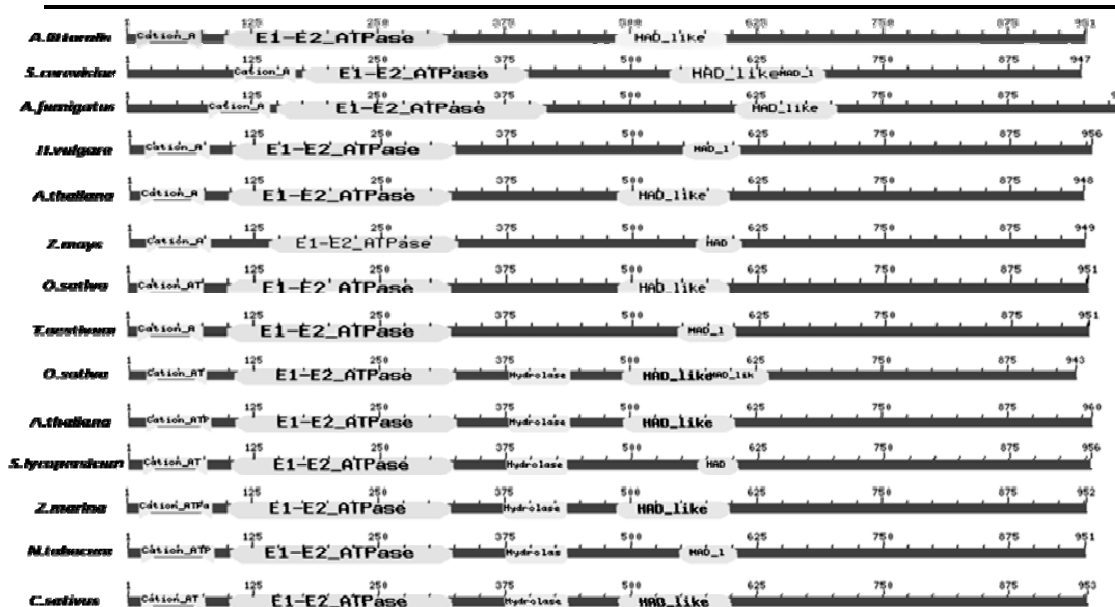
مورد بررسی، ۱۰ منطقه تراغشایی (دامین M<sub>1</sub> تا M<sub>10</sub>) ناحیه تراغشایی را در توالی مورد بررسی تأیید می‌کند و وجود دارد. پیش‌بینی الگوی هیدروفوبیسیته نیز وجود ۱۰ (شکل ۲).

جدول ۱- نتیجه بلاست توالی پروتئینی ژن H<sup>+</sup>-ATPase غشای پلاسمایی با سایر گونه‌ها

نام گونه	نام ژن	میزان پوشش	ارزش E	درصد همسانی
<i>Sorghum bicolor</i>	hypotical protein similar to ha 1	۱۰۰٪	۰	۹۵٪
<i>Oryza sativa</i>	ha	۱۰۰٪	۰	۹۴٪
<i>Brachypodium distachyon</i>	ha 1	۱۰۰٪	۰	۹۳٪
<i>Zea mays</i>	ha 2	۱۰۰٪	۰	۹۳٪
<i>Triticum aestivum</i>	ha 1	۱۰۰٪	۰	۹۲٪
<i>Glycine max</i>	ha 4	۱۰۰٪	۰	۸۹٪
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ha 2	۹۸٪	۰	۸۶٪

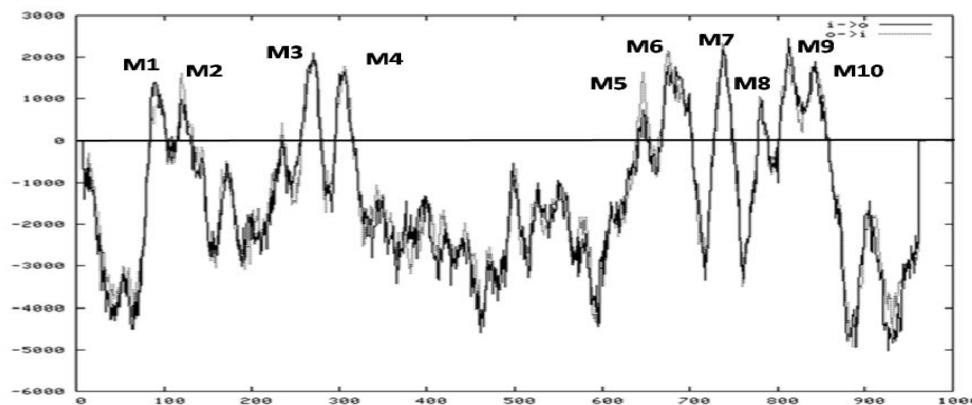
جدول ۲- نتیجه بلاست توالی نوکلئوتیدی ژن H<sup>+</sup>-ATPase غشای پلاسمایی با سایر گونه‌ها

نام گونه	نام ژن	میزان پوشش	ارزش E	درصد همسانی
<i>Sorghum bicolor</i>	hypotical protein similar to ha 1	۱۰۰٪	۰	۹۰٪
<i>Oryza sativa</i>	ha1	۱۰۰٪	۰	۸۹٪
<i>Zea mays</i>	ha2	۱۰۰٪	۰	۸۸٪
<i>Triticum aestivum</i>	ha1	۱۰۰٪	۰	۸۷٪
<i>Brachypodium distachyon</i>	ha1	۱۰۰٪	۰	۸۷٪
<i>Hordeum vulgare</i>	ha1	۹۹٪	۰	۸۶٪
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ha2	۹۹٪	۰	۷۸٪
<i>Zostera marina</i>	ha1	۹۹٪	۰	۷۶٪

شکل ۱- هم‌ردیفی مقایسه‌ای دامین‌های حفاظت‌شده ژن H<sup>+</sup>-ATPase غشای پلاسمایی *Aeluropus littoralis* با سایر ژنهای خانواده H<sup>+</sup>-ATPase غشای

پلاسمایی در گونه‌های مختلف گیاهی و قارچی. بر این اساس توالی مورد بررسی از نظر نوع و ساختار دامین، بیشترین تطابق را با پروتئینهای H<sup>+</sup>-

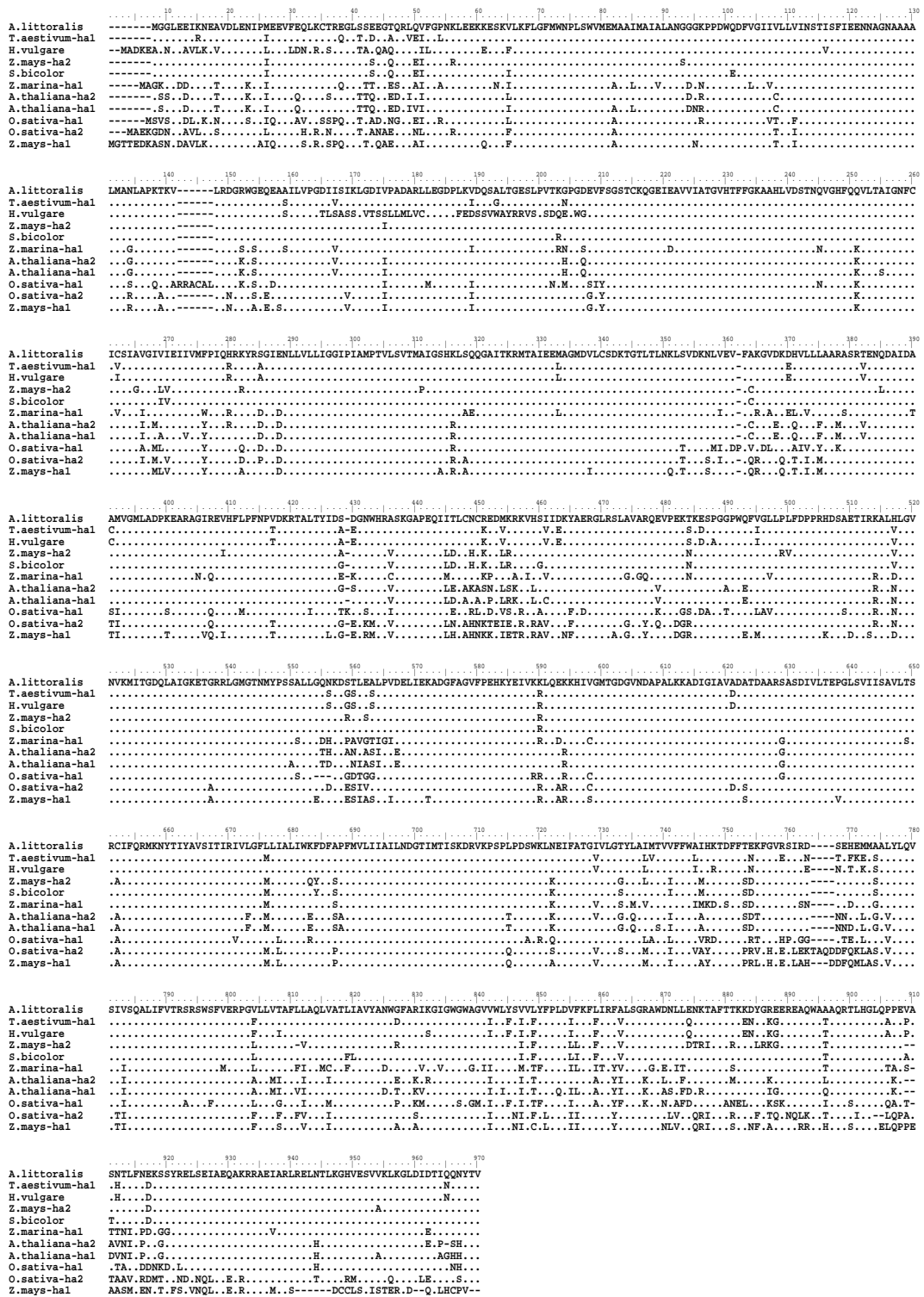
ATPase غشای پلاسمایی گیاهی و قارچی نوع سوم (type III) دارد.



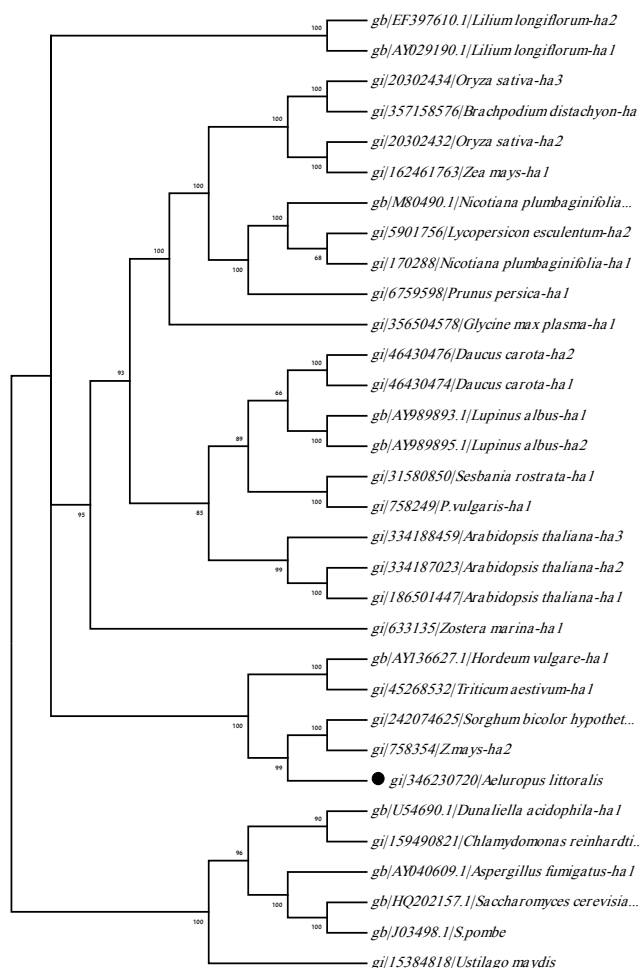
شکل ۲- نمودار هیدروفوبوسیتی توالی آمینواسیدی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی در گیاه *Aeluropus littoralis* به روش (Kyte & Doolittle) با استفاده از برنامه Genetyx-Mac. محل قرارگیری مناطق ترانس ممبران (۱ تا ۱۰) در شکل نمایش داده شده است.



شکل ۳- ترادف اسیدهای آمینه در پروتئین  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی *Aeluropus littoralis*. برای تعیین جایگاههای آمینواسیدی مهم از نرم افزار TMRPres2D و توالی پپتیدی ژن AHA2 و مقاله Palmgren (۲۰۱۱) استفاده شد. مناطق تراغشایی M1 تا M10 در مستطیلهای افقی کادربندی شده است. محل دقیق اسیدهای آمینه آرژنین (۱۱۳)، آسپارژین (۶۷۰) و آسپارتیک (۶۹۹)، به ترتیب در مناطق تراغشایی M<sub>1</sub>، M<sub>5</sub> و M<sub>6</sub> و اسید آمینه ترئونین (۹۵۰) در کادرهای عمودی مشخص شده است. اسیدهای آمینه لیزین (۴۳۸) محل اتصال مولکول ATP داخل کروش و آسپارتیک (۶۰۳) و (۶۰۷) به عنوان جایگاه اتصال یون منیزیم در کادرهای دایره ای شکل نمایش داده شده است. ۲۶ اسید آمینه مهم دامین تنظیمی R (RI & RII) با خط زیر نشان داده شده است. اسیدهای آمینه تشکیل دهنده دامین N که دو بخش دامین P را به هم مربوط می‌سازد، در مرکز پپتید با رنگ مات مشخص گردیده است.



شکل ۴- هم‌ردیفی مقایسه‌ای توالی آمینواسیدی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گیاه *A. littoralis* با استفاده از الگوریتم Clustal w توسط نرم افزار BioEdit. توالی آمینو اسیدی گونه های مورد مقایسه شامل: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Zostaria marina*, *Arabidopsis thaliana ha1 & ha 2*, *Oryza sativa ha1 & ha 2*



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئینی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی هالوفیت *A. littoralis* با گونه‌های مختلف گیاهی، قارچی و جلبک با استفاده از نرم افزار MEGA4 به روش Neighbour joining. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰۰ نظر گرفته شد.

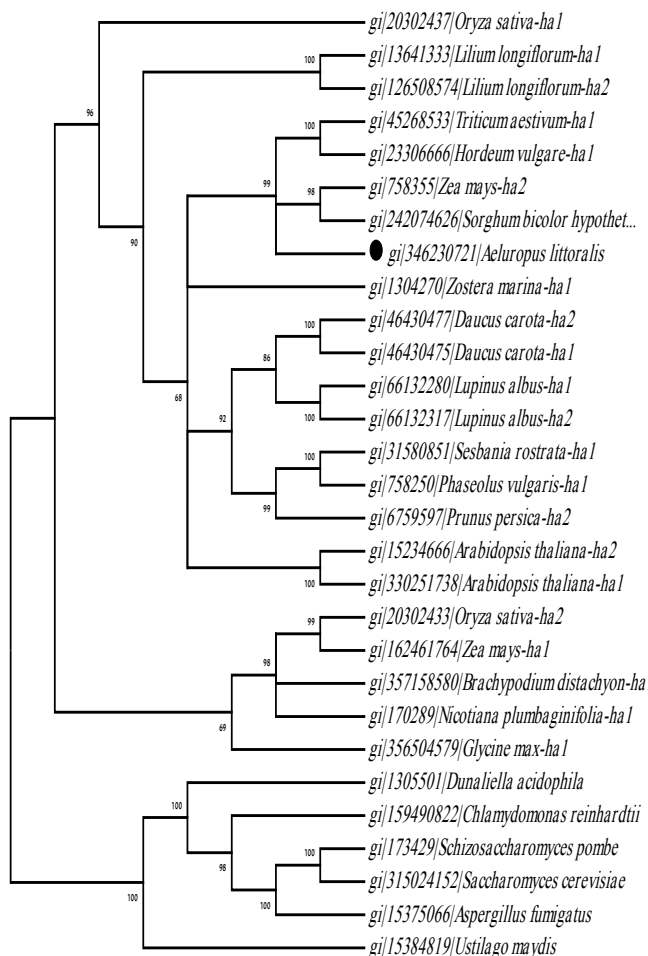
اسیدآمینو شناسایی گردید. همچنین جایگاه دو ناحیه R1 و R2 که اثر تنظیمی بر فعالیت آنزیم دارند در داخل دامین R تعیین گردید (شکل ۳).

علاوه بر این محل دقیق اسیدهای آمینه آسپارتیک (۶۹۹)، آسپارژین (۶۷۰) و آرژنین (۱۱۳) که واحد انتقال‌دهنده  $H^+$  را به صورت یک سیستم گیرنده/دهنده پروتون در مرکز دامین تراغشایی (M) تشکیل می‌دهند، به ترتیب در مناطق تراغشایی  $M_1$  و  $M_5$ ،  $M_6$  مشخص گردید. همچنین در این بررسی، وجود اسیدهای آمینه ترئونین (۹۵۰) که فاکتور رونویسی ۳-۳-۱۴ با فسفریلاسیون آن باعث فعال شدن پمپ می‌شود و اسیدهای آمینه لیزین (۴۳۸) محل

پس از پیش‌بینی مناطق تراغشایی در ادامه محل دامین سیتوپلاسمی A به طول ۱۶۱ آمینواسید به صورت دو قسمت مجزا قبل از اولین منطقه تراغشایی  $M_1$  و در فاصله نواحی تراغشایی  $M_2$  و  $M_3$  شناسایی شد. بخشی از دامین A که در فاصله نواحی تراغشایی  $M_2$  و  $M_3$  واقع می‌شود در داخل سیتوپلاسم تشکیل لوپ می‌دهد. دامین‌های P و N نیز در فاصله مناطق تراغشایی  $M_4$  و  $M_5$  قرار گرفته‌اند. بر این اساس دامین p به صورت دو قسمتی و به طول کلی ۱۶۵ آمینو اسید، در مرکز تراغشایی و دامین N به طول ۱۴۹ اسیدآمینو، مابین دو بخش دامین p واقع شده است و دو قسمت آن را به هم مربوط می‌سازد. در نهایت دامین R پس از آخرین ناحیه تراغشایی  $M_{10}$  به طول تقریبی ۱۱۷



اتصال مولکول ATP و اسپارتیک (۶۰۳) و (۶۰۷) به تأیید شد (شکل ۳).  
عنوان جایگاه اتصال یون منیزیم همگی در ترادف *Alha*



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی هالوفیت *A. littoralis* با گونه‌های گیاهی، قارچی و جلبکی مختلف با استفاده از نرم افزار MEGA4 به روش Neighbour joining. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.

اسیدآمینو جایگزین اسم رمز دیگر آن شده است. با این وجود نتایج نشان می‌دهد که در مجموعه ترادفهای مورد بررسی، جایگزینیهای نوکلئوتیدی که در نواحی واقع در نزدیکی پایانه آمینی و کربوکسیلی و همچنین یک منطقه واقع در فاصله اسیدآمینوهای شماره ۴۴۰ تا ۴۶۰ واقع می‌شوند عمدتاً باعث تغییر نوع اسیدآمینو می‌شوند و مناطق یادشده از حفاظت شونگی کمتری نسبت به سایر نقاط برخوردار هستند. همردیفی ترادف آمینواسیدی ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گیاه *Aeluropus littoralis*

به منظور آشکارسازی تفاوتها در سطح DNA و اسیدآمینو، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن مورد بررسی با سایر توالیهای مربوطه در گونه‌های سورگوم، ذرت، برنج، گندم، جو، آرابیدوپسیس و زوستاریا همردیف شد. نتیجه این بررسی نشان داد که اگر چه تفاوتها در سطح نوکلئوتیدی بالاست (نتایج نشان داده نشده است) اما از لحاظ تغییرات اسیدآمینو بسیاری از این تفاوتها بی‌معنی است، بدین مفهوم که در اکثر نقاط محل اختلاف، تغییر نوکلئوتید منجر به تغییر اسیدآمینو نگردیده است و تنها یک اسم رمز

توالی نوکلئوتیدی نیز ژن مورد بررسی اگرچه قرابت نزدیکی با ژنهای همتای خود در گونه‌های  $C_4$ ، ذرت و سورگوم دارد ولی از نظر جد ژنی با آنها اشتراک ندارد (شکل ۶).

### بحث و نتیجه گیری

اثرات زیان آور غلظتهای بالای نمک به صورت کاهش رشد یا مرگ گیاهان نمایان می‌شود که در میان گونه‌های مختلف گیاهی متغیر می‌باشد. تنش شوری فرآیندهای عمده‌ای از قبیل رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین و متابولیسم چربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲) با توجه به اینکه تنشهای خشکی، شوری خاک، برخی آلودگیهای زیست محیطی و بیماریهای گیاهی موجب کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی می‌شوند، ارائه راهکارهای لازم برای مقابله با این عوامل تنش‌زا امری ضروری می‌باشد (۱). در این مطالعه با استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک، توالی کامل ناحیه کدکننده ژن  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی در گونه *Aeluropus littoralis* شناسایی، جداسازی و کلون گردید. درجه همسانی بسیار بالای توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن با سایر ژنهای  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گزارش شده در GeneBank، آنالیز درخت فیلوژنتیک، کشف تمامی دامینها و موتیفهای حفاظت شده در توالی پروتئینی و عدم جایگزینیهای اسیدآمینه‌ای با معنی در نواحی حفاظت شده، به انضمام اطلاعات پایه‌ای که از پیش‌بینی ساختارهای ثانویه و عملکرد استنباط می‌شود، نشان می‌دهد که به احتمال زیاد ترادف شناسایی شده یک ترادف عملکردی کامل با محصول پروتئینی شناخته شده می‌باشد. با این وجود بدیهی است که تعیین بیشتر خصوصیات این ژن مستلزم بیان آن در سیستم یوکاریوتی مناسب و بررسی کارکرد آن در سطوح بیوشیمیایی و آنزیمی می‌باشد. در مجموع با آشکار شدن ترادف نوکلئوتیدی و پروتئینی پمپ مهم  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی در گراس شورزی و تک لپه

(Alha) نشان می‌دهد که در محل اسیدهای آمینه شماره ۲۶، ۴۶، ۵۱، ۵۱۷، ۷۵۴، ۸۰۴، ۸۴۷، ۸۴۹ و ۸۹۶ اسید آمینه‌های جایگزین شده متفاوت با سایر گونه‌های مورد بررسی در این هم ردیفی می‌باشد (شکل ۴)، با این وجود به دلیل اینکه تغییرات ایجاد شده جایگاههای حساس و عملکردی پروتئین را هدف قرار نداده و همچنین تمام اسیدآمینه‌های جایگزین شده از یک گروه بیوشیمیایی و یا از گروههای بیوشیمیایی نزدیک همنند، اختلافات مشاهده شده چندان نمی‌تواند مهم و عامل تغییرات اساسی در ساختار یا عملکرد پمپ *Alha* تلقی شوند. همچنین نتیجه همردیفی نشان داد هیچ گونه تغییری، در ۲۶ اسید آمینه مهم (شکل ۳) دامین تنظیمی R که تا کنون از طریق جهش-زایی نقطه‌ای در گیاه مدل آرابیدوپسیس (۱۴) مشخص شده، تغییرات در آنها باعث افزایش فعالیت پمپ پلاسمایی می‌شود، رخ نداده و این مناطق در توالی مورد بررسی، بدون تغییر و حفاظت شده باقی مانده‌اند (شکل ۴). بنابراین با توجه به طبیعت بسیار حفاظت شده پمپ  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی به نظر می‌رسد اختلافات مشاهده شده در میزان فعالیت این پمپ و ایزوفرمهای آن در گونه‌های مختلف مربوط به المانتهای تنظیمی و نواحی بالادست این ژن و یا تغییرات پس از ترجمه باشد.

در نهایت به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، آنالیز کلاستر توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با برخی از گونه‌های گیاهی، فارچی و جلبکها انجام شد. بر این اساس مشخص شد از لحاظ ترادف پپتیدی، پروتئین *Alha* همراه با  $H^+$ -ATPase غشای پلاسمایی گونه‌های گندم ( $ha1$ )، جو ( $ha1$ )، ذرت ( $ha2$ ) و سورگوم از جد ژنی مشترکی منتج شده است و لذا این گونه‌ها با هم تشکیل یک *clade* را می‌دهند. در این *clade* گونه‌های گندم-جو، و همچنین ذرت-سورگوم مونوفیلیتیک هستند در حالی که گونه *Aeluropus* در هیچ یک از این گروههای مونوفیلیتیک قرار نمی‌گیرد و مستقیماً از جد اولیه *clade* به وجود آمده است (شکل ۵). از لحاظ

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و پشتیبانی مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مساعدت بخشهای مختلف، به ویژه ریاست محترم پژوهشکده قدردانی نمایند.

*Aeluropus littoralis* امکان درک بهتر مکانسیم عمل و توپولوژی پمپهای پروتونی پلاسمایی با منشاء هالوفیتی و همچنین مطالعه روند تکامل مولکولی این پمپها فراهم شده است. در نهایت با توجه به نقش گسترده‌ای که پمپهای پروتونی غشای پلاسمایی در بهبود و تنظیم ابعاد مختلف فیزیولوژی مولکولی گیاه و پاسخ به شرایط محیطی دارند، از مجموع این اطلاعات می‌توان برای ایجاد نسلی از گیاهان پیشرفته با قابلیت‌های ویژه در پاسخ به طیفی از تنش‌های زنده و غیر زنده، سود جست.

## منابع

۱. خسروی، ه.، یخچالی، ب.، علیخانی، ح.، ۱۳۸۸. تعیین پتانسیل تعدادی از ریزوبیوم‌های بومی به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه و نقش آنها در کاهش اتیلن تنشی. مجله زیست‌شناسی ایران، ج ۲۲، ش ۴. صفحه ۶۷۰-۶۶۱.
۲. نوح‌پیشه، ز.، منوچهری‌کلانتری، خ. ۱۳۹۰. اثرات کاربرد اسپرمیدین و تنش شوری در گیاه لفل. مجله زیست‌شناسی ایران، ج ۲۴، ش ۶. صفحه ۸۵۷-۸۴۸.
3. Buch-Pedersen, M., Pedersen, P., Veierskov, B., Nissen, P. and Palmgren, M. 2009. Protons how they are transported by proton pumps. *European Journal of Physiology* 457: 573-579.
4. Buch-Pedersen, M., Rudashevskaya, E., Berner, T., Venema, K. and Palmgren, M. 2006. Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 38285-38292.
5. DUBY, G. and Boutry, M. 2009. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 457: 645-655.
6. Jang, Y., Qin, Y., Xie, C., Zhao, F., Zhao, J., Liu, D., Chen, S., Fuglsang, A., Palmgren, M., Schumaker, K., Deng, X. and Guo, Y. 2010. The Arabidopsis chaperone J3 regulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase through interaction with the PKS5 kinase. *The Plant Cell* 22: 1313-1332.
7. Kabała, K., Janicka-Russak, M., Burzyński, M. and Kłobus, G. 2008. Comparison of heavy metal effect on the proton pumps of plasma membrane and tonoplast in cucumber root cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 278-288.
8. Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J. and Boutry, M. 2005. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins convert a dimer into a hexamer. *PNAS* 102: 11675-11680.
9. Kolbert, Z., Bartha, B. and Erdei, L. 2008. Osmotic stress- and indolile-3-butyric acid induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* 133: 406-416.
10. López-Pérez, L., Martínez Ballesta, M., Maurel, C. and Carvajal, M. 2009. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* 70: 492-500.
11. Palmgren, M. 2001. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase : powerhouse for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 52: 817-845.
12. Speth, C., Jaspert, N., Marcon, C. and Oecking, C. 2010. Regulation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by its C-terminal domain : what we know for sure?. *European Journal of Cell Biology* 89: 145-151.
13. Takemiya, A. and Schimazaki, K. 2010. Phosphatidic acid inhibits blue light induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatases1. *Plant Physiology* 153: 1555-1562.
14. Zandonadi, D., Santos, M., Dobbss, L., Olivares, F., Canellas, L. L., Binzel, M., Okorokova Façanha, A. and Façanha, A. 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Planta* 231: 1025-1036.

## Molecular Cloning of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Coding Sequence from *Aeluropus littoralis* Halophyte Grass

Shokri E., Nasiri N. and Nematzadeh G.H.

Plant Breeding Dept., Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

### Abstract

H<sup>+</sup>-ATPase proton pump is one of the major proteins found in plasma membrane of plants which plays an important role in molecular physiology of stress response. *Aeluropus littoralis* grass due to resistance to some environmental stresses like salinity and heavy metals is a good model for studying the structure and function of the plasma H<sup>+</sup>-ATPase pump. In this study as a starting point, the complete coding sequence of the gene were identified and cloned from *Aeluropus littoralis* halophyte. Preliminary data showed that nucleotide sequence of *A. littoralis* plasma membrane proton pump contains a 2856 bp full-length ORF region that shared a significant homology with *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* and *Zea mays*. Also the predicted peptide of this gene consists of 165 amino acid residues with a molecular weight of 104567 Da which is in terms of domains type and structure, consistent with most plant and fungal plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase protein type III (type III) from a large family pump ATPase p-type. Comparative alignment of amino acid sequence of *A. littoralis* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase with some species indicated that nucleotide substitutions did not targeted critical and functional positions of protein and these regions remained conserved. At last the sequence was submitted to GenBank with accession number of GI: 346230720.

**Key words:** plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, *Alha*, *Aeluropus littoralis*, molecular physiology