

The Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) NtPIP2; 1 Aquaporin in *Xenopus* Oocytes and Study of its sensitivity to Mercury

Mahdieh Najafabadi M, PhD^{1*}, Mostajeran A, PhD², Katsuhara M, PhD³

1- Biology Department, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8 - 7349, Iran

2- Biology Department, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Japan

* Email Corresponding author: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

Received: 22 Jan. 2011

Accepted: 6 Apr. 2011

Abstract

Aim: Movement of water across cellular membranes is facilitated by the presence of water channels named aquaporins (AQPs). Mercurial compounds are potent blockers of plant and animal aquaporins. However some aquaporin isoforms such as NtAQP1 in tobacco are mercury-insensitive. The aim of this research was to determine the sensitivity of tobacco NtPIP2;1 to mercury.

Materials and methods: In this experimental study, after invitro transcription of NtPIP2;1 and cRNA synthesis, cRNA was injected to *Xenopus* oocytes by microinjection. Two days after incubation, oocytes were subjected to 1 mM mercury chloride for 10 min. Then, oocyte volume swelling assay in hypotonic medium was conducted and the membrane osmotic water permeability coefficient (Pf) was determined.

Results: Pf for control and mercury chloride-treated oocytes expressing NtPIP2;1 was respectively calculated 0.99×10^{-2} and 0.98×10^{-2} cm s⁻¹, which was not significant ($P > 0.05$). Comparing the amino acid sequence of NtPIP2;1 with NtAQP1, a mercury-insensitive aquaporin, revealed the similar to NtAQP1 replacement of cys with Thr in 233 position near the aquaporin pore in NtPIP2;1.

Conclusion: NtPIP2;1 encodes a mercury-insensitive aquaporin in tobacco which could be due to cysteine replacement with threonin near the aquaporin pore.

Keywords: Aquaporin, Tobacco, Mercury, Oocyte, *Xenopus*

بیان آکوپورین NtPIP2;1 توتون در اووسیت‌های زنبوبوس و مطالعه حساسیت آن نسبت به جیوه

مجید مهدیه نجف آبادی.^۱ PhD.*، اکبر مستاجران.^۲ PhD، ماکی کاتسوها.^۳ PhD

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۳- دانشگاه اوکایاما ژاپن، کوراشیکی، موسسه تحقیقاتی منابع زیستی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲

چکیده

هدف: حرکت آب از عرض غشاء‌های سلولی در اثر حضور کانال‌های آبی به نام آکوپورین‌ها (AQPs) تسهیل می‌شود. ترکیبات جیوه یکی از بازدارنده‌های قوی آکوپورین‌های گیاهی و جانوری می‌باشند. به هر حال چندین فرم مشابه از آکوپورین‌ها مانند NtAQP1 در گیاه توتون توسط جیوه ممانعت نمی‌شوند. هدف از این تحقیق بررسی حساسیت آکوپورین NtPIP2;1 جداسازی شده از توتون نسبت به جیوه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی پس از سنتز crRNA مربوط به NtPIP2;1، تزریق آن به داخل اووسیت‌های زنبوبوس توسط میکرواینجکشن صورت گرفت. پس از دو روز انکوبه کردن اووسیت‌ها، آنها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض ۱ میلی‌مولار کلرور جیوه قرار گرفته، سپس آزمون انبساط حجم اووسیت در محیط هیپوتونیک انجام و ضریب نفوذپذیری غشاء (P_f) اووسیت تعیین شد. **نتایج:** P_f محاسبه شده برای اووسیت‌های گروه کنترل و تیمار شده با کلرور جیوه که هر دو آکوپورین NtPIP2;1 را بیان می‌کنند به ترتیب برابر با 0.99×10^{-2} و 0.98×10^{-2} سانتیمتر بر ثانیه بود که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ($p > 0.05$). مقایسه توالی اسید آمینه آکوپورین NtPIP2;1 با NtAQP1 (غیرحساس به جیوه) نشان داد که NtPIP2;1 همانند NtAQP1 در نزدیک منفذ آبی دارای اسید آمینه ترئونین به جای سیستئین می‌باشد.

نتیجه‌گیری: NtPIP2;1 یک آکوپورین غیر حساس به جیوه را در گیاه توتون کدگذاری می‌کند و این به دلیل جایگزینی اسیدآمینه سیستئین در نزدیک منفذ آبی با ترئونین می‌باشد.

واژگان کلیدی: آکوپورین، توتون، جیوه، اووسیت، زنبوبوس

مقدمه

قبلاً تصور بر این بود که آب قادر است به سادگی توسط انتشار از خلال دو لایه چربی غشاء سلولی حرکت کند. اما امروزه مشخص شده که دو لایه چربی غشاء، نفوذپذیری محدودی نسبت به آب داشته و مجموعه‌ای از پروتئین‌ها برای انتقال آب در عرض غشاء وجود دارند. پروتئین‌های ناقل آب ابتدا در سلول‌های عدسی چشم گاو شناسایی، سپس در سال ۱۹۹۱ پرستون و آگری (۱) یک پروتئین مشابه در گلوبول‌های قرمز خون انسان شناسایی و نام CHIP28 بر آن گذاشتند. مطالعات بعدی پروتئین‌های مشابهی را در دیگر موجودات نشان داد که به آکوپورین‌ها (AQPs) ویا کانال‌های آبی معروف شدند (۲ و ۳). پروتئین عدسی چشم گاو در حال حاضر به AQP0 و پروتئین گلبول قرمز به آکوپورین AQP1 تغییر نام دادند (۴). کشف پروتئین تونوپلاستی (TIP) توسط مورل و همکارانش (۵) در سال ۱۹۹۳ در تونوپلاست گیاه توتون نشان داد که آکوپورین‌ها علاوه بر جانوران، در اغلب غشاء‌های سلول‌های گیاهی نیز پراکنده‌اند. این پروتئین‌ها مرکب از شش دامین طی کننده‌ی عرض غشاء بوده که توسط ۵ لوپ به یکدیگر متصل شده‌اند و N و C ترمینال آنها در داخل سیتوسل قرار دارد (۶ و ۷).

آکوپورین‌های گیاهی تنوع ایزوفرمی قابل توجهی را نشان می‌دهند. تعیین توالی ژنوم، تعداد دقیق ژن‌های آکوپورین را تا مرز ۳۵ عدد در گیاه آرابیدوپسیس (۶ و ۷) و ۳۳ عدد در گیاه ذرت (۲ و ۳) تعیین نموده است. بر پایه‌ی همولوژی توالی، آکوپورین‌های گیاهی به ۴ زیر گروه که تا حدودی مطابق با مکان آنها در سلول است تقسیم می‌شوند (۳، ۴، ۷ و ۸). پروتئین‌های نوع تونوپلاستی (TIPs) و نوع غشاء پلاسمایی (PIPs) آکوپورین‌هایی هستند که به ترتیب در غشاء‌های واکوئلی و پلاسمایی به وفور بیان می‌شوند. سومین زیر گروه شامل پروتئین‌های غشایی شبه نودولین ۲۶ (NIPs) هستند. به عبارتی این زیر گروه همولوگ‌های نزدیک به GmNod26 (آکوپورین فراوان در غشاء پری باکترئید گرک‌های تثبیت کننده‌ی ازت در ریشه‌های سویا) می‌باشند. NIPs در غیر لگوم‌ها نیز وجود داشته و در این گیاهان در غشاء‌های پلاسمایی و درون سلولی قرار گرفته‌اند (۷). زیر گروه آخر پروتئین‌های بازی کوچک (SIPs) بوده که غالباً در شبکه‌ی آندوپلاسمی قرار دارند (۷ و ۸).

آکوپورین‌های غشاء پلاسمایی یا PIPs خود به دو گروه فیلوژنتیکی PIP1 و PIP2 تقسیم می‌شوند. اعضای این دو گروه

نه تنها از نظر طول N و C ترمینال خود متفاوت هستند بلکه فعالیت کانال آب متفاوتی را هنگام بیان در اووسیت‌های زنوپوس نشان می‌دهند (۴). PIP1s عموماً در این میزبان هترولوگ خاموش می‌باشند، درحالی‌که PIP2s فعالیت کانال آب بالایی را نشان می‌دهند.

ترکیبات گیوه از بازدارنده‌های قوی آکوپورین‌ها می‌باشند و امروزه جهت مطالعه نقش آکوپورین‌ها در هدایت آبی گیاهان از این ترکیبات استفاده می‌شود (۵). مشخص شده است که ترکیبات گیوه با گروه سولفیدریل سیستئین در نزدیک منفذ کانال آبی آکوپورین واکنش داده و سبب توقف فعالیت انتقال آب می‌شود (۹ و ۱۰). به هر حال چندین ایزوفرم از آکوپورین‌ها نسبت به گیوه غیر حساس‌اند. برای مثال RD28 در گیاه آرابیدوپسیس (۹) و NtAQP1 در گیاه توتون (۱۰) از این جمله‌اند. در جانوران نیز آکوپورین AQP4 توسط گیوه ممانعت نمی‌شود (۴).

شناسایی آکوپورین‌های غیر حساس به گیوه و تفکیک آن از انواع حساس می‌تواند تصویر روشن‌تری از نقش هر یک از ایزوفرم‌های آکوپورینی در روابط آبی گیاهان تحت شرایط محیطی مختلف در هنگام مطالعه آنها با استفاده از ترکیبات گیوه ارائه دهد. همچنین بررسی دلیل عدم حساسیت برخی آکوپورین‌ها نسبت به گیوه در سطح مولکولی می‌تواند در طراحی آکوپورین‌های مقاوم به گیوه برای جذب آب در گیاهان در محیط‌های آلوده به این عنصر مفید باشد. لذا هدف از این تحقیق بررسی حساسیت آکوپورین NtPIP2;1 کلون شده از گیاه توتون نسبت به گیوه و آنالیز مولکولی آن از طریق مقایسه توالی آمینواسیدی این آکوپورین با NtAQP1 غیر حساس به گیوه در این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن NtPIP2;1 در وکتور بیانی زنوپوس: ناحیه کدکننده کلون cDNA (Complementary DNA) NtPIP2;1 که قبلاً توسط مولفین جداسازی شده بود (۱۱) توسط مجموعه پرایمر اختصاصی ذیل تکثیر شد.

Forward; 5'-
GCTCTAGAATGTCAAAGGACGTGATTG-3'
Reverse; 5'-
GCAAGCTTTTAGTTGGTTGGTTACTG-3'

این مجموعه پرایمر محل‌های برشی مربوط به آنزیم‌های با اثر محدود XbaI و HindIII را به ترتیب به انتهای 5' و 3' قطعات تکثیر شده آکوپورین NtPIP2;1 اضافه می‌کند.

ریز تزریقی *crRNA* به اووسیت‌های زنوپوس: لوب‌های تخمدانی به طریق جراحی از قورباغه ماده *Xenopus laevis* بیهوش شده با استفاده از ۳-آمینوبنزوئیک اسید اتیل استر متان سولفونات ۰/۱ درصد (Sigma, Aldrich) جداسازی شدند و در محلول اصلاح شده بارت (MBS, Modified Barth Solution): ۸۸ میلی مولار کلرور سدیم، ۱ میلی مولار کلرور پتاسیم، ۲/۴ میلی مولار بیکربنات سدیم، ۱۵ میلی مولار تریس، ۰/۳۳ میلی مولار نیترات کلسیم، ۰/۴۱ میلی مولار کلرور کلسیم، ۰/۸۲ میلی مولار سولفات منیزیم، ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سدیم پنی سیلین و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سولفات استرپتومایسین) قرار گرفتند. لوب‌های تخمدانی به قطعات کوچکی بریده شدند و در محلول MBS حاوی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر کلاژناز B (Boehringer, Germany) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر انکوبه شدند. در پایان کلاژناز با شستشوی اووسیت‌ها (۵ مرتبه) در محلول MBS حذف شدند. اووسیت‌های مرحله V و VI جمع‌آوری و در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد در محیط MBS حاوی آنتی‌بیوتیک به مدت ۱ روز انکوبه شدند. روز بعد اووسیت‌ها برای آزمایشات تزریق *crRNA* مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴). تزریق *crRNA* به اووسیت‌های زنوپوس توسط دستگاه NanojectII (Drummond Scientific Co.,) Auto/Oocytes Injector (Broomall, PA, USA) انجام گرفت. حجم مورد نیاز برای تزریق روی ۵۰ نانولیتتر تنظیم و به آرامی ۵۰ نانولیتتر نمونه *crRNA* و یا آب (کنترل منفی، NC, negative control) به هر اووسیت از محل قطب روشن اووسیت تزریق شد. اووسیت‌های تزریق شده در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت ۱ الی ۲ روز قبل از سنجش انبساط و تعیین ضریب نفوذپذیری غشاء (P_f) انکوبه شدند (۱۴).

سنجش انبساط حجم اووسیت‌ها و محاسبه P_f : ضریب نفوذ پذیری آبی (P_f) غشاء اووسیت‌ها طبق روش پرستون و همکاران (۱۵) ۱ تا ۲ روز بعد از تزریق تعیین گردید. اووسیت‌ها از محیط MBS ایزوتونیک به محیط MBS با رقت ۱ به ۵ (محیط هیپوتونیک) در زیر میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین دیجیتال سیاه و سفید (Cool SNAP, Roper Scientific, Tucson, USA) منتقل شدند. تصاویر دیجیتال از اووسیت‌های در حال انبساط در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه با استفاده از نرم افزار (Universal Imaging, Westchester,)

پس از انجام الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر و انجام مراحل کلون سازی با استفاده از وکتور TOPO (Invitrogen) و تعیین توالی کلون‌های مثبت توسط روش سنگر (۱۲)، کلون‌های فاقد خطا (جهش) شناسایی و سپس ناحیه کدکننده مربوط به این آکوپورین در داخل وکتور بیانی pGEMHE (۹) که برای بیان پروتئین در داخل اووسیت‌های زنوپوس طراحی شده است درج گردید (۱۱).

برای قرار دادن *NtPIP2;1* در جهت گیری صحیح در داخل وکتور pGEMHE از آنزیم‌های با اثر محدود فوق طبق روش سمبروک (۱۳) استفاده شد. واکنش اتصال با استفاده از کیت High Ligation (TOYOBO, Tokyo, Japan) در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد در طول شب با استفاده از نسبت مولی ۲ به ۱ انجام گرفت (۱۳). سپس ۲ میکرولیتر از پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از واکنش اتصال به باکتری *E. coli* (سوش JIM109) منتقل شد. پس از انتخاب کلنی‌های مثبت توسط colony PCR (۱۳) پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت Plasmid MiniPrep (شرکت کیژن) از باکتری استخراج گردید.

سنتز *crRNA* (Complementary RNA) در *in vitro*: سنتز *crRNA* توسط رونویسی در آزمایشگاه (*in vitro*)، ابتدا پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم *NheI* خطی شد. سپس واکنش با افزودن ۱/۱۰ حجم کل از استات سدیم ۳ نرمال و ۲ حجم از اتانول مطلق متوقف گردید. محتویات لوله به خوبی با یکدیگر مخلوط شده و حداقل ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد سرد گردید. پس از رسوب دادن پلاسمید خطی شده توسط سانتریفیوژ، شستشو و خشک کردن رسوب، نمونه در بافر TE (pH=8, Tris-ETDA) در غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر حل شد (۱۴). برای واکنش رونویسی در شرایط *in vitro* از کیت mMACHINET7 (شرکت mMESSAG USA, Ambion) استفاده شده و واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای بازیافت *crRNA* از مخلوط واکنش فوق از روش رسوب دهی با کلرید لیتیوم (۵/۷ مولار کلرید لیتیوم، ۵۰ میلی مولار EDTA) استفاده شد. پس از شستشوی رسوب با اتانول ۷۰ درصد و انجام سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، *crRNA* در ۱۰ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز معلق گردیده و غلظت آن بر روی ۱ میکروگرم در میکرولیتر تنظیم و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در حجم‌های کم نگهداری شد (۱۳).

طراحی شده در ابتدا و انتهای این ناحیه که به ترتیب جایگاه اثر آنزیم‌های XbaI و HindIII را به قطعات حاصل از تکثیر اضافه می‌کنند تکثیر شد (شکل ۱). چنانکه در شکل ۱ مشاهده می‌شود قطعه تکثیر شده دارای ۸۶۰ جفت باز می‌باشد. قطعه تکثیر شده با جهت‌گیری صحیح در وکتور بیانی pGEMHE قرار گرفت. این وکتور حامل پروموتور آنزیم‌های RNA پلیمریز فزهای T7 و SP6 می‌باشد که برای انجام رونویسی در شرایط آزمایشگاهی لازم است (۹). همچنین وکتور مذکور دارای نواحی غیر قابل ترجمه (UTR, Untranslational Region) ژن بتاگلوبین قورباغه است که ترجمه cRNA را در داخل اووسیت امکان پذیر می‌سازد (۹). به منظور بررسی حساسیت فعالیت آکوپورین NtPIP2;1 نسبت به جیوه، تاثیر آن بر سرعت تغییر حجم نسبی و نفوذپذیری آبی غشاء اووسیت‌هایی که NtPIP2;1 را بیان می‌کنند، بلافاصله پس از انتقال آنها به محیط هیپوتونیک مطالعه شد. نتایج نشان داد که بیان NtPIP2;1 در اووسیت‌ها سبب افزایش سریع در انبساط حجم آنها در محیط هیپوتونیک می‌شود به طوری که حتی پس از گذشت مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اغلب اووسیت‌ها به دلیل ورود بیش از حد آب به داخل آنها پاره شده، در حالیکه در اووسیت‌های کنترل منفی (NC, Negative Control، تزریق شده با آب) روند افزایش حجم نسبی بسیار کند بود (شکل ۳). از طرفی مشاهده شد که تیمار اووسیت‌های بیان کننده NtPIP2;1 با جیوه تاثیری بر سرعت تغییر حجم نسبی آنها نداشت (شکل ۳). محاسبه ضریب نفوذپذیری آبی غشاء (P_f) اووسیت نشان داد که بیان NtPIP2;1 در اووسیت موجب افزایش معنی‌داری (T-test, $P < 0.05$) در میزان P_f غشاء اووسیت نسبت به آب از ۰/۱۲ سانتیمتر بر ثانیه در کنترل منفی (NC، اووسیت های تزریق شده با آب) به بیش از ۰/۹۹ سانتیمتر بر ثانیه شد (شکل ۴). در مقابل افزودن جیوه به اووسیت‌هایی که آکوپورین NtPIP2;1 را بیان می‌کنند کاهش معنی‌داری را در میزان P_f غشاء اووسیت موجب نشد (شکل ۴). مقایسه توالی اسید آمینه آکوپورین NtPIP2;1 با NtAQP1 که یک آکوپورین شناخته شده غیر حساس به جیوه است نشان داد که NtPIP2;1 دارای اسید آمینه ترئونین در محلی مشابه با NtAQP1 می‌باشد (شکل ۵، در محل فلش) که به نظر می‌رسد این عامل منجر به عدم حساسیت آکوپورین NtPIP2;1 نسبت به جیوه می‌شود. آکوپورین دیگری از گیاه توتون به نام NtPIP1 نیز در همین موقعیت دارای اسید آمینه ترئونین است (شکل ۵). لازم به ذکر است که

MetaView (PA, USA) تهیه شدند و مساحت سطحی اووسیت‌ها با استفاده از نرم افزار WinRoof ver3.51 (MITANI Corporation, Fukui, Japan) آنالیز گردیده و سپس P_f با استفاده از معادله زیر از محدوده خطی نمودار تغییر حجم نسبی اووسیت در برابر زمان محاسبه شد:

$$P_f = V_o \frac{d(V/V_o)/dt}{SV_w(Osm_{in} - Osm_{out})}$$

در این رابطه V_o حجم اولیه اووسیت (9×10^{-4} سانتی‌مترمکعب) و S مساحت سطحی اولیه اووسیت (۰/۰۴۵ سانتی‌مترمربع) و V_w حجم مولی آب (۱۸ سانتیمتر مکعب بر مول)، dt مدت زمان، Osm_{in} اسمولاریته داخل اووسیت (۲۰۰ میلی اسمول) و Osm_{out} اسمولاریته محیط هیپوتونیک (۴۰ میلی اسمول) می‌باشد.

تیمار اووسیت‌ها با کلرور جیوه: به منظور بررسی حساسیت آکوپورین NtPIP2;1 توتون نسبت به جیوه، اووسیت‌های تزریق شده با cRNA آکوپورین NtPIP2;1 و همچنین اووسیت‌های کنترل منفی به مدت ۱۰ دقیقه در معرض ۱ میلی‌مولار کلرور جیوه در محیط MBS قرار داده شدند. سپس انبساط حجم آنها طی زمان در مقایسه با اووسیت‌های شاهد (بدون تیمار با جیوه) مورد بررسی قرار گرفت.

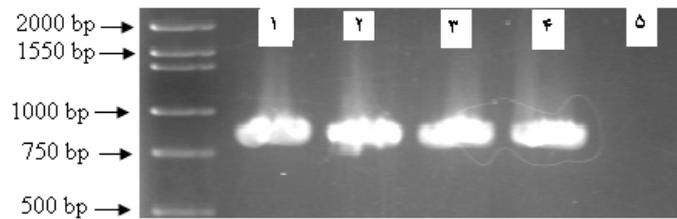
هم ردیفی (Alignment) توالی آمینواسید NtPIP2;1 با NtAQP1: به منظور مقایسه توالی آمینواسیدی آکوپورین NtPIP2;1 با آکوپورین غیر حساس به جیوه NtAQP1 از نرم افزار GENETYX-MAC ver. 7 (GENETYX CORPORATION, Tokyo, Japan) استفاده شد. به این ترتیب که توالی آمینواسیدی آکوپورین‌های مذکور از بانک ژن NCBI استخراج و توسط نرم افزار هم ردیفی توالی آمینواسیدی آنها صورت گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به P_f با استفاده از آزمون آماری T-test و نرم افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

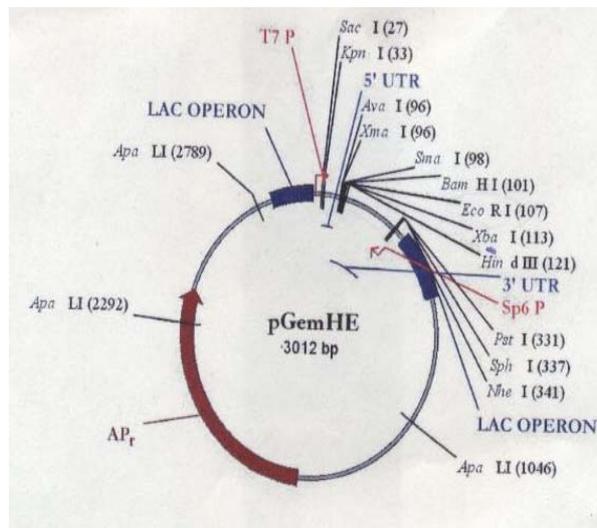
نتایج

ناحیه کد کننده ژن NtPIP2;1 با استفاده از کلون‌های cDNA مربوط به آن (۱۱) به عنوان الگو توسط پرایمرهای اختصاصی

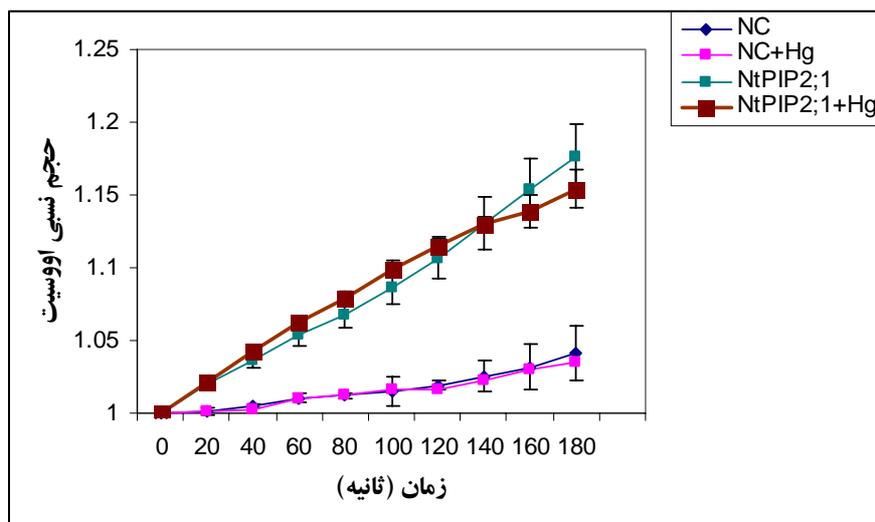
آکوپورین NtPIP1;1 فاقد فعالیت انتقال آب بوده پس امکان بررسی حساسیت آن نسبت به جیوه وجود ندارد (۱۱).



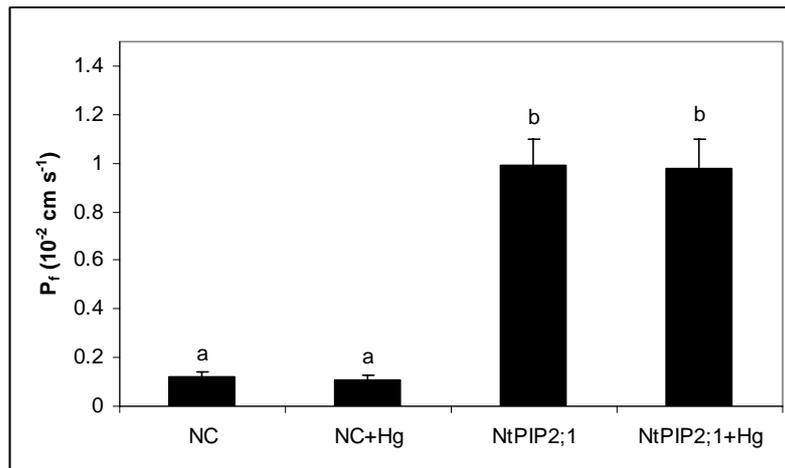
شکل ۱: ژل الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر ناحیه کدکننده ژن NtPIP2;1 از کلون‌های cDNA (به ترتیب از چپ به راست، مارکر وزن مولکولی، چاهک‌های شماره ۱ تا ۴ کلون‌های مختلف cDNA و چاهک شماره ۵ کنترل منفی). اعداد بر حسب base pairs (bp) بیان شده‌اند.



شکل ۲: نقشه وکتور بیانی pGEMHE (۹)



شکل ۳: تاثیر جیوه بر فعالیت انتقال آب آکوپورین NtPIP2;1 بیان شده در اووسیت‌های زنبوپس. مقادیر تغییر حجم نسبی ۸-۱۰ اووسیت در هر تیمار نسبت به زمان به صورت نمودار ترسیم شده است. NC (کنترل منفی)، گروه اووسیت‌های تزریق شده با آب، NC+Hg، گروه کنترل منفی تیمار شده با ۱ میلی مولار کلرور جیوه، NtPIP2;1، گروه اووسیت‌های تزریق شده با cRNA NtPIP2;1 و NtPIP2;1+Hg، گروه تیمار شده با کلرور جیوه می‌باشند.



شکل ۴: مقادیر ضریب نفوذپذیری آبی اسموتیک (P_r) اووسیت‌های تزریق شده با ۵۰ نانوگرم cRNA مربوط به NtPIP2;1 و یا ۵۰ نانولیترا آب (کنترل منفی، NC) در حضور و عدم حضور جیوه (Hg). نتایج میانگین ۸ اندازه‌گیری همراه با خطای معیار می‌باشند.

Nt PIP2;1.gnu	1	-----MSKDVIIEGQVHQHGHKDYVDPPPAPLDFAEELKLSFHRALIAEF	46
NtAQP1.gnu	1	MAENKEEDVVKLGANKFRRETQPLGTAQTID-KDYKEPPPAPLFEPELSSWSFYRAGIAEF	59
NtPIP1;1.gnu	1	MAENKEEDVNLGANKYRRETQPLGTAQTENKDYIEPPPAPLFEPELSSWSFYRAGIAEF	60
Nt PIP2;1.gnu	47	IATLFLFLYVTVATVIGERKLNAGADKCDGVGLGISWAFGGMIFVVLVYCTAGISGGHINPA	106
NtAQP1.gnu	60	MATFLFLYITILTVMGLKR--SDSLCSSVGIQGVAVAFGGMIFALVYCTAGISGGHINPA	117
NtPIP1;1.gnu	61	MATFLFLYITILTVMGLKR--SDSLCSSVGIQGVAVAFGGMIFALVYCTAGISGGHINPA	118
Nt PIP2;1.gnu	107	VTFGLFLARKVSLLRVAVSYIAQSLSGAICGVGLVKGFMKHYNTLGGGANFVQPGYNKGT	166
NtAQP1.gnu	118	VTFGLFLARKLSLTRAIFVIVMQCLGACGAGVVKGFMPYQRLGGGANVVNPGYTKGD	177
NtPIP1;1.gnu	119	VTFGLFLARKLSLTRAIFYVMQCLGACGAGVVKGFMPYQRLGGGANVVNPGYTKGD	178
Nt PIP2;1.gnu	167	ALGAEIIGTFVLVYTVFSATDPKRSARDSSHVPVLAFLPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINP	226
NtAQP1.gnu	178	GLGAEIIGTFVLVYTVFSATDAKRNARDSVVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINP	237
NtPIP1;1.gnu	179	GLGAEIIGTFVLVYTVFSATDAKRNARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINP	238
Nt PIP2;1.gnu	227	ARTFGAAVLYNTEKINWDDQWIFWVGPFGALVAAVYHQYELRGSIAIKALGFSRNSPTN	284
NtAQP1.gnu	238	ARSLGAALYNTDQAWDDHWIFWVGPFGAALAAVYHQIILRAIPFHKSS-----	287
NtPIP1;1.gnu	239	ARSLGAALIFNKKQAWDDHWIFWVGPFGAALAAVYHQIILRAIPFHS-----	286

شکل ۵: ردیف کردن (alignment) توالی آمینو اسیدی آکوپورین‌های غشاء پلاسمایی در گیاه توتون توسط نرم افزار GENETYX با استفاده از توالی موجود در بانک ژن NCBI. فلش در شکل نشان‌دهنده اسید آمینه ترئونین است که جایگزین سیستم حساس به جیوه در این محل شده است

سیستئین در لوپ B شود (Ala-73-Cys)، پروتئین نفوذپذیری آبی حساس به جیوه را نشان می‌دهد (۱۵). همچنین آکوپورین غیر حساس به جیوه RD28 از گیاه آرابیدوپسیس قادر است حساسیت به جیوه را در صورت معرفی اسید آمینه سیستمین بعد از دومین توالی NPA کسب نماید (۹). به هر حال در برخی آکوپورین‌ها نظیر AtPIP2;2 در گیاه آرابیدوپسیس اسید آمینه سیستمین قبل از دومین توالی NPA می‌باشد که موجب حساسیت آنها نسبت به جیوه می‌شود. در آکوپورین غیر حساس به جیوه NtAQP1 توتون اسید آمینه ترئونین (ترئونین شماره ۲۳۳) دقیقاً در این محل جایگزین سیستمین شده است (۱۰). گزارش شده است هنگامی که این اسید آمینه ترئونین در آکوپورین NtAQP1 با اسید آمینه سیستمین دقیقاً در مکانی مشابه با سیستمین موجود در آکوپورین حساس به جیوه

بحث

ترکیبات جیوه به طور معمول سبب بلوکه کردن آکوپورین‌ها می‌شوند (۳ و ۵). این ترکیبات از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل اسید آمینه سیستمین موجود در پروتئین ایفای نقش می‌کنند (۴ و ۹). به هر حال تمام اسیدهای آمینه سیستمین در این امر نقش ندارند. برای مثال ۴ سیستمین در آکوپورین حساس به جیوه AQP1 یافت می‌شود ولی تنها باقیمانده سیستمین در لوپ E (Cys-189 مجاور دومین توالی NPA) توسط جیوه ممانعت می‌شود. جهش این سیستمین به سرین (Cys-189-Ser) تاثیری بر فعالیت انتقال آب توسط این آکوپورین ندارد ولی منجر به تبدیل آن به یک آکوپورین غیر حساس به جیوه می‌شود. از طرفی هنگامی که آلانین جایگزین

specific channels in *Xenopus* oocytes. EMBO J. 1993; 12: 2241-2247.

6. Siefritz F, Biela A, Eckert M, Otto B, Uehlein N, Kaldenhoff R. The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. J Exp Botany. 2001; 52: 1953-1957.

7. Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. Plant Physiol. 2001; 126: 1358-1369.

8. Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. Plant Physiol. 2000; 122: 1025-1034.

9. Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast channel protein TIP. Plant Physiol. 1994; 106: 1325-1333.

10. Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. Plant J. 1999; 18: 565-570.

11. Mahdiah M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. Plant Cell Physiol. 2008; 49: 801-813.

12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74:5463-5467.

13. Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

14. Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibasaka M, Kasamo K. Functional analysis of water channels in barley roots. Plant Cell Physiol. 2002; 43: 885-893.

15. Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine-189 in the CHIP28 water channel. J Biol Chem. 1993; 268: 17-20.

AtPIP2;2 تعویض شود، آکوآپورین NtAQP1 نیز نسبت به جیوه حساس می‌شود (۱۰). هم ردیف کردن توالی آمینواسیدی آکوآپورین NtPIP2;1 کلون شده از گیاه توتون با آکوآپورین شناخته شده NtAQP1 غیر حساس به جیوه نشان می‌دهد که در NtPIP2;1 نیز ترئونین جایگزین سیستئین در محلی درست مشابه با NtAQP1 شده است که این خود تأییدی بر آزمایشات انبساط حجم انجام گرفته در اووسیت زنوپوس می‌باشد. به هر حال برای آزمایشات تکمیلی لازم است فرم جهش یافته NtPIP2;1 از طریق تعویض سیستئین با ترئونین مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

NtPIP2;1 یک آکوآپورین غیر حساس به جیوه را در گیاه توتون کد گذاری می‌کند و احتمالاً جایگزینی اسید آمینه ترئونین در موقعیت ۲۲۲ به جای سیستئین قبل از دومین توالی حفاظت شده NPA در این آکوآپورین عامل عدم ممانعت آن توسط جیوه است.

تشکر و قدردانی

مولفین بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه اراک به دلیل حمایت مالی این تحقیق تشکر نمایند.

منابع

1. Preston G.M, Agre, P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 11110-11114.
2. Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 12359-12364.
3. Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. Plant Physiol. 2001; 125: 1206-1215.
4. Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed Engl. 2004; 43: 4278-4290.
5. Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water