

## بررسی پروتئومیکی گیاهان تراریخت شده با *GR-RBP2* در مقایسه با گیاه وحشی

مهناز اقدسی

گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۸

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۸

### چکیده

*GR-RBP2* یکی از ۸ عضو خانواده *GR-RBP* در گیاه آرابیدوپسیس است که پس از ترجمه در میتوکندری جای می‌گیرد. مطالعه حاضر به منظور بررسی پروتئومیکی گیاهان تراریخت شده با *GR-RBP2* در مقایسه با گیاه وحشی صورت گرفته است. در این مطالعه ژن *GR-RBP2* از گیاه آرابیدوپسیس جداسازی و در پلاسمید pBIN19 کلون شد. سپس پلاسمید نو ترکیب از طریق باکتری *Agrobacterium tumefaciens* و به روش Floral Dipping به گیاه آرابیدوپسیس انتقال یافت. با انتقال کامل *GR-RBP2* بیست و یک لاین به دست آمد. گیاهان تراریخت شده از نظر فنوتیپی و زمان گلدهی تفاوتی را با گیاه وحشی نشان نداده و قادر به تولید بذر بودند. میزان بیان ژن در سه لاین تراریخت شده مختلف و گیاه وحشی تعیین شد. میزان mRNA در گیاهان تراریخت شده ۲ برابر بیشتر از گیاه وحشی بود. آنالیز پروتئومیکی با استفاده از دو سیستم ژل مختلف صورت گرفت: 2D IEF/ SDS PAGE و 2D Blue-native/SDS PAGE. تمام ژلها با نقره رنگ آمیزی شدند. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز ۲ بعدی نشان داد که پروتئین *GR-RBP2* در لاینهای تراریخت شده افزایش بیان داشته است. این نتایج نشان داد که پروتئینهای زنجیره تنفسی در لاینهای تراریخت شده مورد بررسی و گیاه وحشی به فراوانی وجود دارد. کمپلکس V زنجیره تنفسی (کمپلکس F1) تا حدودی تخریب شده بود اما این امر در تمام لاینهای تراریخت شده و گیاه وحشی مشابه بود. آنالیز طیفهای MS به شناسایی ۱۱۰ لکه پروتئینی منجر شد که ۶ لکه پروتئینی در لاینهای تراریخت شده در مقایسه با گیاه وحشی افزایش نشان داد. نگاهی به برخی پروتئینهای شناخته شده نشان داد که هیچ تغییری عمده ای که نشاندهنده تحریک یا سرکوب برخی مسیرهای متابولیکی باشد وجود ندارد.

واژه های کلیدی: *GR-RBP2*، آنالیز پروتئومیکی، میتوکندری و انتقال ژن

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۰۱۰۶۲۲۰۴، پست الکترونیکی: Aghdasi46@yahoo.com

### مقدمه

RNA عمل سایر فاکتورهای تنظیمی را تعدیل می‌کند (۹ و ۱۰).

تاکنون تعداد ۱۹۶ پروتئین در گیاه آرابیدوپسیس شناخته شده که توانایی اتصال به RNA را دارند. این پروتئینها، پروتئین اتصال RNA یا RNA Binding Protein نامیده می‌شوند. گروهی از این پروتئینها یک منطقه غنی از اسید آمینه گلیسین در خود داشته و اصطلاحاً پروتئین اتصال RNA غنی از گلیسین یا *GR-RBP* نام دارند. خانواده *GR-RBP* در گیاه آرابیدوپسیس هشت عضو دارد که به نامهای

در یوکاریوتها تنظیم بیان ژن فرآیندی پیچیده بوده که در سطوح مختلفی صورت می‌گیرد. یکی از روشهای اصلی تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها تنظیم پس از رونویسی است. سطوح مختلف تنظیم پس از رونویسی شامل پردازش، انتقال، پایداری و ترجمه mRNA است. در این مراحل تنظیم بیان ژن بطور مستقیم و یا غیر مستقیم صورت می‌گیرد. در حالت اول تنظیم بیان ژن با اتصال پروتئین اتصال RNA صورت می‌گیرد. اما در شکل دوم پروتئین اتصال

شکستن خواب بذور قبل از انتقال به اتافک کشت به مدت ۲-۴ روز در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**خالص سازی DNA ژنومیک و PCR:** DNA ژنومیک گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از کیت ویژه استخراج DNA (The pure gene DNA isolation, Amersham Pharmacia Biotech, England) جداسازی ژن مورد نظر به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت ویژه صورت گرفت. با انجام PCR قطعه حد واسط به طول تقریبی 500bp تکثیر شد.

**کلون کردن ژن GR-RBP2 در پلاسمید pGEM-T Easy Vector:** به منظور تکثیر بیشتر ژن *GR-RBP2* این قطعه توسط آنزیم T4 DNA ligase در پلاسمید pGEM-T Easy Vector کلون شد. سپس پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  منتقل شدند. باکتریهای حامل پلاسمید نوترکیب بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین گزینش شدند. این پلاسمیدها به روش لیز قلیایی استخراج و به منظور اثبات قطعه مورد نظر از آنزیم *ECOR1* استفاده شد.

**ساخت پلاسمید pBIN19/35S/NOS:** ابتدا پلاسمید pUC18 به کمک آنزیم *EcoRV* برش داده شده و سپس قطعه CaMV35s-NOS از آن جداسازی شد. سپس ناقل pBIN19 به کمک *EcoRI* و *HindIII* برش داده شد و قطعه CaMV35s-NOS در این ناقل کلون شد. عملیات کلون کردن توسط آنزیم T4 DNA ligase صورت گرفت. به منظور جلوگیری از خودجوشی پلاسمید از آنزیم الکالین فسفاتاز استفاده شد. پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  گزینش بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب به روش لیز قلیایی استخراج و به منظور اثبات قطعه مورد نظر از آنزیمهای *XmnI* و *XbaI* استفاده شد.

GR-RBP1 تا GR-RBP8 معرفی شده اند (۱۳، ۱۱). تمام اعضای این خانواده دارای یک پایانه آمینی و یک پایانه کربوکسیلی محافظت شده هستند. پایانه آمینی در شناسایی RNA نقش داشته و اصطلاحاً به آن RRM یا RNA **Recognition Motif** گفته می‌شود (۱۰، ۸). در پایانه کربوکسیلی نیز یک منطقه غنی از گلیسین وجود دارد که به نظر می‌رسد در برهم کنش پروتئین-پروتئین نقش داشته باشد (۱۳). شواهد نشان می‌دهد که انواع GR-RBPها در کنترل وقایع پس از رونویسی نقش مهمی را ایفاء می‌کند (۹، ۱۵). همچنین نشان داده شده است که برخی از اعضای این خانواده در مقاومت به تعدادی از تنشهای محیطی نقش دارند. به عنوان مثال گیاهان تراریخت شده با *GR-RBP7* و *GR-RBP8* نسبت به سرما مقاوم بوده و یا گیاهان تراریخت شده با *GR-RBP4* نسبت به شوری مقاوم هستند (۱۲).

یکی از انواع *GR-RBP*ها *GR-RBP2* است که در میتوکندری جای دارد. پروتئین حاصل از این ژن از ۱۵۳ اسید آمینه ساخته شده است (۱۳). به منظور مطالعه نقش *GR-RBP2* در مقاومت به تنشهای محیطی ابتدا ژن مورد نظر در گیاه آرابیدوپسیس تراریخت شده و پس از بررسی ویژگیهای ریختی و مورفولوژیکی، بیان ژن و پروتئومیکس گیاهان به دست آمده مورد بررسی قرار گرفته تا در ابتدا گیاهان تراریخت شده در شرایط طبیعی با گیاه شاهد مورد مقایسه قرار گیرند.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی و شرایط کشت:** بذور آرابیدوپسیس (کلمبیا-صفر) به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و به دنبال آن ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور گیاهان تراریخت شده نیز با بخار حاصل از اسید کلریدریک- آب ژاول ضدعفونی شده و در محیط کشت MS 1/2 حاوی ۸ درصد آگار کشت شدند. به منظور

**استخراج میتوکندری:** در ابتدا گیاهچه های وحشی و تراریخت شده آراییدوپسیس در فضای گلخانه در شرایط بلند روز به مدت ۳-۴ هفته کشت شدند. استخراج میتوکندری از ۳۰ گرم برگ تازه و به روش سانتریفیوژ گسیون افتراقی صورت گرفت (۶). به منظور جلوگیری از پروتئولیز پروتئینها از Protease inhibitor Coctail Compleat (Roche, Indianapolis, IN, USA) استفاده شد. میزان پروتئین به روش برادفورد و همکاران (۱۹۷۶) سنجش شده است (۴).

**2D Blue-Native/ Tricine SDS PAGE:** پس از استخراج میتوکندریها میزان خلوص نمونه تهیه شده به روش فوق تعیین شد (۳). ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین در ۷۵ میکرولیتر از بافر ACA (۶-امینو-کاپرویک اسید ۶ میلی مولار- محلول تریس ۵۰ میلی مولار با pH 7) حل شده و سپس ۱۵ میکرولیتر از N-دودسیل مالتوزید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی با ۲۰ میکرولیتر از محلول کوماسی بلو مخلوط و در ژل آکریلامید (از نوع گرادیان) ۴/۵ تا ۱۰ درصد بارگیری شد.

**2D IEF/Tricine SDS PAGE:** آنالیز پروتئینهای میتوکندری به روش 2D IEF/Tricine SDS PAGE صورت گرفت. این روش با استفاده از IPG Phore System (Amersham Pharmaciabiotec, England) با استفاده از ژل Dyestrip Immobilin انجام شد (۳). ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین در ۱۰ میکرولیتر از محلول قلیایی A (اوره ۸ مولار- محلول ۴ درصد تریتون X-100- تریس ۴۰ میلی مولار- DTT با غلظت ۵۰ میلی مولار و محلول ۰/۱ مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید) حل شده و پس از ۱ ساعت انکوبه کردن در حرارت اتاق ۳۴۰ میکرو لیتر از محلول Drystrip به آن اضافه شد. همه ژلها با نقره رنگ آمیزی شدند.

**کلون کردن GR-RBP2 در پلاسمید pBIN19/35S/NOS:** به منظور انتقال ژن GR-RBP2، پلاسمید pBIN19/35S/NOS با آنزیم SmaI برش داده شد. سپس ژن تکثیر شده توسط آنزیم T4 DNA ligase در پلاسمید نوترکیب کلون شد.

**انتقال ژن به آگروباکتریوم و گیاه آراییدوپسیس:** برای انتقال پلاسمید نوترکیب pBIN1935S/GR-RBP2/NOS به آگروباکتریوم pGV2260 از روش الکتروشوک استفاده شد. انتقال آگروباکتریوم حامل پلاسمید نوترکیب pBIN1935S/GR-RBP2/Nos به گیاهچه های گلدار آراییدوپسیس به روش Floral Dipping صورت گرفت (۵).

**استخراج RNA, RT-PCR و Q-PCR:** استخراج RNA گیاهچه های ۱۰ روزه با استفاده از RNeasy plant mini kit (QIAGEN USA, Valencia, CA) انجام گرفت. غلظت RNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 260nm تعیین شد. به منظور حذف DNA ژنومیک ۱۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با ۲ واحد از DNase (DNA-free, Ambion, Austin, USA) تیمار شد. پس از تایید عدم وجود DNA ژنومیک به کمک PCR، ۱ نانوگرم از RNA تیمار شده جهت ساخت cDNA استفاده شد. RT-PCR به کمک M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) انجام شد. Q-PCR با استفاده از دستگاه ABI-prism 7700 equence detection system و SYBR Green method و *AtACTIN* به عنوان ژن مرجع صورت گرفت. توالی پرایمر های رفت و برگشت مورد استفاده به شرح ذیل می باشد: (3' tcaactcggtgacgttggtg 5' و 5' atgtgacgaccattcagttcct 3' و 5' gccaaagtattgtggagactc 3' و 5' gaccaaagacggagactctt3'). این آزمایش با ۳ بار تکرار صورت گرفته است.

*RBP2* در مقایسه با گیاه وحشی فنوتیپ طبیعی داشته و از نظر شکل ظاهری و زمان گلدهی تفاوتی را نشان ندادند. کلیه گیاهان تراریخت شده قادر به تولید بذر بوده و بذر ها نیز قابلیت رویش داشتند.

**بررسی بیان ژن:** به منظور اطمینان از آنکه تغییرات احتمالی پروتئومیکی به دست آمده ناشی از تغییرات در سطح mRNA پروتئین مورد نظر است بیان ژن *GR-RBP2* در گیاه وحشی در مقایسه با گیاهان تراریخت شده مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه بیان ژن در گیاهچه های ۱۰ روزه که بر روی محیط کشت 1/2 MS در شرایط روز بلند کشت شده بودند با روش RT-PCR و Q-PCR صورت گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن در گیاهان تراریخت شده به طور معنی داری از گیاهچه های وحشی بالاتر است. شکل ۱ نشان دهنده بیان ژن *GR-RBP2* در گیاه وحشی در مقایسه با ۳ لاین تراریخت شده است. تجزیه بیان ژن سایر لاینها در این شکل نشان داده نشده است.

مطالعات بعدی نیز تنها بر روی ۳ لاین ۳۳، ۳۶ و ۳۸ صورت گرفته است. در روی ژل حاصل از تکنیک 2D Blue- Native/ SDS PAGE پروتئینهای متعددی مشاهده شد که از آن جمله کمپلکس های پروتئینی زنجیره تنفسی را می توان نام برد. کمپلکس V زنجیره تنفسی تا حدودی تخریب شده بود. که این امر در هر سه لاین تراریخت شده و نیز گیاه وحشی مشابه بوده است. میزان کمپلکس I زنجیره تنفسی نسبت به حالت ابر کمپلکس آن با کمپلکس III2 کمتر است. این امر نیز در کلیه گیاهان مورد بررسی یکسان بوده است (شکل ۲).

نتایج حاصل از تکنیک IEF/SDS و آنالیز طیفهای MS به شناسایی حدود ۱۱۰ لکه پروتئینی در گیاه وحشی و تراریخت شده انجامید. در جدول ۱ مشخصات برخی از پروتئینهای شناسایی شده آمده است.

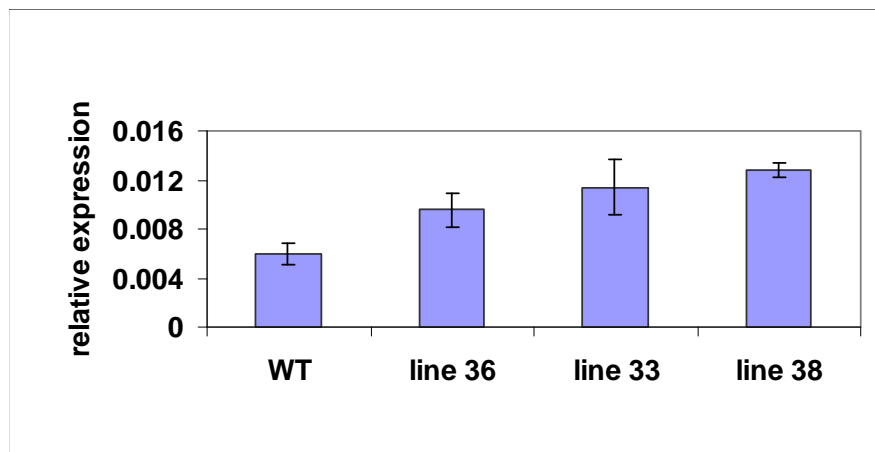
**شناسایی پروتئینها و بررسی اسپکترومتری جرم:** پس از بریدن لکه های پروتئینی از ژل دوبعدی؛ این پروتئینها در اپندورف حاوی  $250 \mu\text{l}$  از محلول  $25 \text{mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در نهایت پروتئینها پس از لیوفیلیزه شدن با  $20 \mu\text{l}$  از محلول هضم ( $0.5 \mu\text{g}$  تریپسین [Promega, Madison, WI] در  $20 \mu\text{l}$  از محلول  $35 \text{mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) به مدت ۴ ساعت در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد به نمونه ها  $100 \mu\text{l}$  از محلول  $50 \text{mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس فاز رویی جداسازی و در ظرفی جداگانه نگهداری شد.

خالص سازی پپتید های جداسازی شده با استفاده از Zip-Tips (Millipore, Bedford, MA) و با استفاده از روش کار پیوست صورت گرفت. آنالیز پپتید های جداسازی شده به کمک دستگاه اسپکترومتری جرمی از نوع MALDI TOF/ TOF صورت گرفت. سکوانسینگ پپتید ها و شناسایی پروتئینها با کمک برنامه ProteinProbe و Peptide Sequencing مربوط به نرم افزار BioLynx (Version 3.4, Micromass) صورت گرفت. کلیه عملیات مربوط به مقایسه سکوانهای به دست آمده در سایت آرآییدوپسیس ([www.Arabidopsis.org](http://www.Arabidopsis.org)) صورت گرفت. محاسبه وزن مولکولی و PI پروتئینها به کمک COMPUTE ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) صورت گرفت.

## نتایج

تکثیر و خالص سازی ژن *GR-RBP2* از گیاه آرآییدوپسیس با استفاده از PCR صورت گرفت. با انتقال ژن *GR-RBP2* به گیاه آرآییدوپسیس و گزینش دانه رستهای تراریخت شده بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین ۲۱ گیاهچه تراریخت شده به دست آمد.

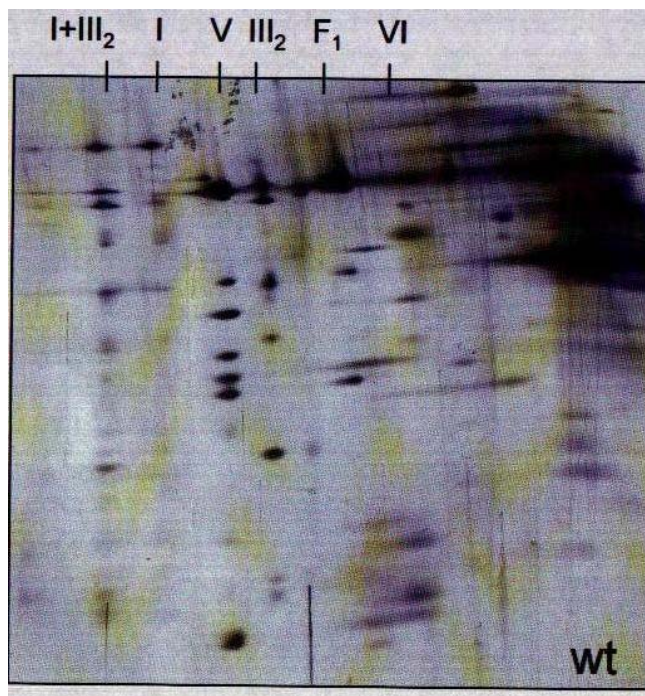
**ویژگیهای ریختی گیاهان تراریخت شده در مقایسه با گیاه وحشی (کلمیا-صفر):** گیاهان تراریخت شده با *GR-*



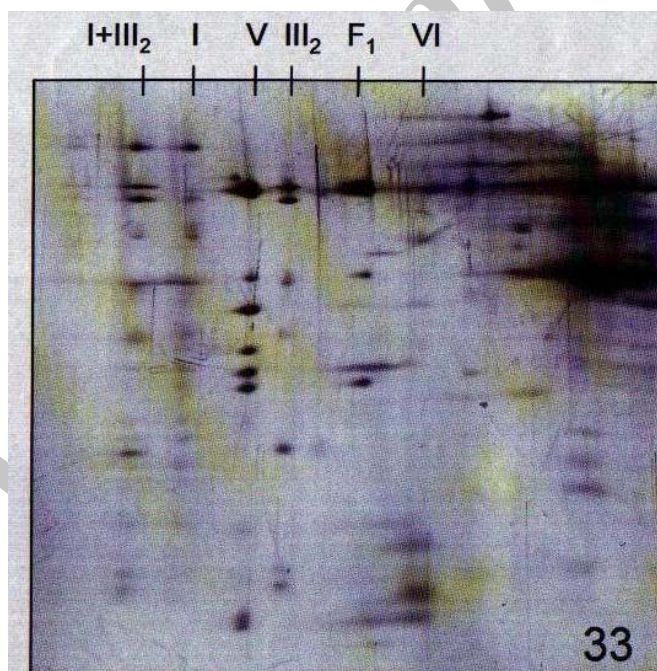
شکل ۱- بیان ژن *GR-RBP2* در گیاه وحشی در مقایسه با ۳ لاین تراریخت شده مورد بررسی.

جدول ۱- مشخصات تعدادی از پروتئینهای میتوکندریای شناخته شده گیاه آرابتیدوپسیس

شماره لکه	پروتئین شناسایی شده	جرم مولکولی
۱	ATP سینتاز، زیر واحد d	۱۹,۵
۲	ATP سینتاز، زیر واحد δ'	۱۸,۵
۳	کمپلکس ۱، زیر واحد ۱۸ کیلو دالتونی	۱۷,۹
۴	پروتئین ناشناخته میتوکندریایی	۱۸,۴
۵	GR-RBP	۱۱,۶
۹	نوکلئوزید دی فسفات کیناز	۱۷,۱
۱۰	اینوزیتول-۵- منوفسفات دهیدروژناز	۱۸,۶
۱۳	ATP سینتاز، زیر واحد δ	۲۲,۲
۱۴	سوپر اکسید دسموتاز	۲۲,۵
۱۸	پروتئین ناشناخته میتوکندریایی	۱۹,۷
۲۱	ATP سینتاز، زیر واحد ۲۴ کیلو دالتونی	۲۴
۲۶	پیروات دهیدروژناز، زیر واحد E1β	۲۹
۲۹	سوکسینیل کوانزیم لیگاز A، زیر واحد β	۴۲,۴
۳۰	ATP سینتاز، زیر واحد β	۵۴,۲
۳۳	NAD ملات دهیدروژناز	۳۳,۳
۳۵	سوکسینیل کوانزیم لیگاز A، زیر واحد α	۳۱,۷
۳۷	سیتوکروم b <sub>5</sub> ردکتاز	۲۷,۳
۴۱	پورین میتوکندریایی	۲۹,۱
۴۲	پورین میتوکندریایی	۲۹,۳
۵۵	ATP سینتاز، زیر واحد α	۵۵



(الف)



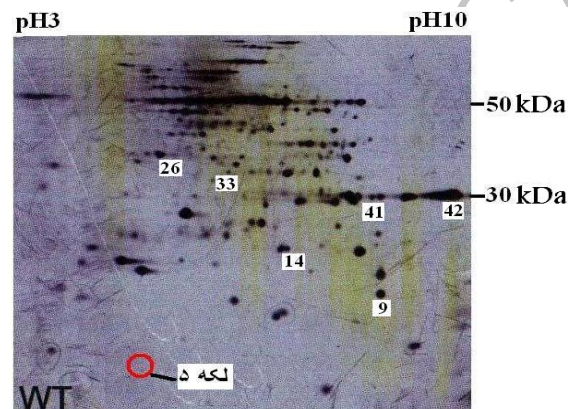
(ب)

شکل ۲- ژل الکتروفورز حاصل از سیستم 2D Blue-Native/Tricine SDS PAGE در الف) گیاه وحشی (Wt) و ب) تراریخت شده (لاین ۳۳). I: کمپلکس I, II: کمپلکس II, V, کمپلکس V, F1, منطقه F1: کمپلکس V, III2, I: کمپلکس I+III2 زنجیره تنفسی

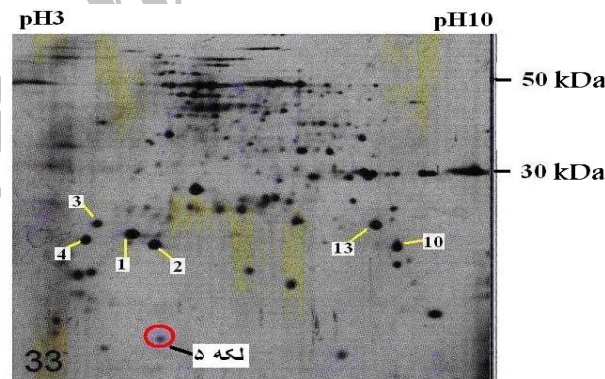
در این مقایسه پروتئین GR-RBP2 لکه شماره ۵ است. میزان حضور لکه شماره ۵ در گیاه وحشی بسیار کم‌رنگ بوده، در حالی که در لاینهای تراریخت شده امکان تشخیص آن به راحتی وجود داشت (شکل ۳).

مقایسه این دو ژل نشان می‌دهد که در لاینهای تراریخت شده با ژن *GR-RBP2*، پروتئینهای سنتتاز ساب یونیت d (لکه ۱) ATP سنتتاز ساب یونیت δ' (لکه ۲) - کمپلکس I زیر واحد ۱۸ کیلو دالتونی (لکه ۳) - پروتئین ناشناخته میتوکندریایی (لکه ۴) - ۵ مونو فسفات اینوزین دهیدروژناز (لکه ۱۰) - ATP سنتتاز ساب یونیت δ (لکه

۱۳) افزایش بیان داشته‌اند (شکل ۳). اما در مورد سایر پروتئینها تفاوتی را نشان نمی‌دهد. نگاهی به برخی پروتئینهای شناخته شده میتوکندریایی نظیر نوکلئوزید دی فسفات کیناز (لکه ۹) - سوپر اکسید دسموتاز (لکه ۱۴) - پیرووات دهیدروژناز (لکه ۲۶) - پورین (لکه ۴۱ و ۴۲) - NAD مالات دهیدروژناز (لکه ۳۳) و سیتوکروم B ردکتاز نشان می‌دهد که هیچ تغییری مشخصی که نشان دهنده فعال شدن یا سرکوب مسیره‌های متابولیکی باشد وجود ندارد (شکل ۳).



(الف)



(ب)

شکل ۳- ژل الکتروفورز حاصل از تکنیک IEF/SDS در الیف (گیاه وحشی (Wt), ب) تراریخت شده (لاین ۳۳) در IEP بین ۳ و ۱۰ و وزن مولکولی بین ۳۰ تا ۵۰ کیلو دالتون. ژلها با نقره رنگ آمیزی شدند. محل پروتئین GR-RBP2 با دایره مشخص شده است. لکه ۱: ATP سنتتاز ساب یونیت d، لکه ۲: ATP سنتتاز ساب یونیت δ'، لکه ۳: کمپلکس I زیر واحد ۱۸ کیلو دالتونی، لکه ۴: پروتئین ناشناخته میتوکندریایی، لکه ۱۰: ۵ مونو فسفات اینوزین دهیدروژناز، لکه ۱۳: ATP سنتتاز ساب یونیت δ.

## بحث

میتوکندری اندامکی است که در گیاهان نقشهای متعددی را بر عهده دارد. این اندامک به طور غیر مستقیم در فتوسنتز و نیز یک مرحله از تنفس نوری دخالت دارد.

امروزه آنالیز پروتئومیک به یک ابزار قوی در تحقیق فرآیند های پیچیده سلولی تبدیل شده است. این روش در مطالعات ژنتیکی و فیزیولوژی گیاهان نیز بسیار موفق بوده است (۱۶). به عنوان مثال مقایسه الگوهای پلی پپتیدی حاصل از الکتروفورز تأثیر شوری را در سنتز پروتئینهای گیاه تحت تنش نشان می دهد (۱). اخیراً نیز تغییرات الگوی بیان پروتئینها در مراحل مختلف باززایی گیاهان در شرایط کشت بافت نیز مورد توجه قرار گرفته است (۲).

آنالیز پروتئوم میتوکندریای به کمک ژل الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی نقره (در شرایط استاندارد) توانسته ۶۵۰ پروتئین مختلف را شناسایی کند (۱۱ و ۱۴). نتایج نشان داده که تعداد کل ژنهای آرابیدوپسیس که پروتئینهای میتوکندری را کد می کند بین ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ است. بر طبق این مطالعات حدود ۱۰ درصد از میزان کل ژنوم آرابیدوپسیس بایستی پروتئینهایی را کد کند که در میتوکندری جای دارد (۷).

GR-RBP2 یک پروتئین میتوکندریایی است. این پروتئین از ۱۵۳ آمینو اسید ساخته شده است. اسید آمینه های ۳۳-۱

## منابع

۱- امین پناه، ه. (۱۳۸۳). اثر نیترات کلسیم بر الگوی الکتروفورزی پروتئینها و میزان پروتئینهای محلول جوانه‌های برنج در شرایط شوری. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱۷، شماره ۱، ص ۱۱-۲۳.

سکوانسهای گذر پروتئین مزبور هستند که آن را به سمت میتوکندری هدایت می کند (۱۳). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تراریخت کردن گیاه آرابیدوپسیس با ژن *GR-RBP2* تغییری در میزان و نوع پروتئینهای گیاه آرابیدوپسیس در شرایط طبیعی به وجود نمی آورد. در بین ۱۱۰ پروتئین مورد بررسی تنها بیان برخی از زیر واحد های ATP سنتتاز تغییر نشان داده است. در ارتباط با پروتئینهای شناخته شده میتوکندریایی که در مسیرهای متابولیکی اصلی نقش دارند. نیز شواهدی که نشان دهنده تغییری در مسیرهای متابولیکی باشد یافت نشده است. این نتایج نشان می دهد که در شرایط طبیعی پروتئین GR-RBP2 تغییراتی را در بیان سایر پروتئینها به وجود نمی آورد. احتمالاً در شرایط استرس GR-RBP2 بیان پروتئینهایی را تغییر می دهد که در مقاومت گیاه در شرایط استرس نقش دارند. بررسی گیاهان تراریخت شده در مقایسه با گیاه وحشی در شرایط استرسی مختلف نظیر شوری، سرما و یا خشکی می تواند مدعای فوق را به اثبات رسانده و نقش *GR-RBP2* را در گیاهان نشان دهد.

## تشکر و سپاسگزاری

از دکتر پیتر براون و همکاران ایشان در دانشگاه هانور به جهت همکاری در انجام Mass spectrometry و آنالیز داده های آن تشکر و قدردانی می گردد.

۲- ابراهیم زاده، م. (۱۳۸۷). بررسی تغییرات پروتئینها در مراحل مختلف رویانزائی بدنی از قطعات برگ. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۳، ص ۳۶۹-۳۸۱.

- 3- Berkemeyer, M., Schieble, R. and Ocheretina, O. 1998., A novel non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. J. Biol. Chem. 273: 27927-27933.
- 4- Bradford, M.M. 1976., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochem. 72: 248-254.

- 5- Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998., Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16:734-745



- 6- Day, Da. and Neuburger, M. 1985., Douce, R. Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Aust. J.Plant Physiol.* 12: 219-228
- 7- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and Von heijene, G. 2000., Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300:1005-1016
- 8- Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Ringau, J., Puigdomenech, P. and Pages, P. 1998., A gene induced by the plant hormone abscisc acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature.* 334: 262-264
- 9- Higgins, C.F. 1991., Stability and degradation of mRNA. *Current Opinion in Cell Biology.* 3: 1013-1018
- 10- Kenan, D.J., Query, C.C. and Keen, J.D. 1991., RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends in Biochemical Science.* 16: 214-220
- 11- Krufft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W., and Braun, H.P. 2001., Proteomic approach to identity novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1694-1710.
- 12- Kwak, K.J., Kim, Y.O. and Kang, H. 2005., Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. experimental Botany.* 421:3007-3016
- 13- Lorkovic, Z.J. and Barta, A. 2002., Genomic analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Researach.* 30: 623-635
- 14- Schagger, H., Cramer, WA. and Von Jagow, G.1994., Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complex by two-dimentional native electrophoresis., *Anal. Biochem.* 217: 220-230
- 15- Simpson, G.G. and Fillipowicz, W. 1996., Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organization of spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology.* 32:1-41
- 16- Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Polmion, C., Rossignol, M., Santoni, V., Vienne, D. and Zivy, M.1999., Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis.* 20: 2013-2026

Archive

## Proteomic analysis of transgenic *Arabidopsis* plants over expressing *GR-RBP2* in comparison with Wild Type

Aghdasi M.

Biology Dept., Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, I.R. of IRAN

### Abstract

Glycine-Rich RNA Binding Protein2 (GR-RBP2) is one of the eight GR-RBP family members in *Arabidopsis thaliana* which is located in mitochondria after translation. Here we employed a proteomic approach to compare transgenic *Arabidopsis* plants over expressing *GR-RBP2* with Wild Type. In this study, *GR-RBP2* gene was isolated from *Arabidopsis* and cloned into pBIN19 vector. Recombinant vector was transferred to *Arabidopsis* (Col-0) via *Agrobacterium tumefaciens* by Floral Dipping method. Transformation with full length cDNA of *GR-RBP2* yielded 21 lines. Over expressing plants are indistinguishable from WT seedlings. The whole lines are unchanged with regard to flowering time and are fully fertile. Gene expression levels were determined in different over expressing lines compare with WT seedlings. The mRNA level in over expressing lines was 2 times higher than WT. Proteomic analysis of over expressing lines were carried out on two different gel systems: 2D IEF/SDA PAGE and 2D Blue-native/SDS PAGE. All gels were silver stained. 2D gel electrophoresis revealed that GR-RBP2 was induced in over expressing lines. Results showed that respiratory chain looks very much in the same investigated lines and WT. Complex V was partially degraded (F1 complex), but this also is the same in all samples. Approximately 110 spots were identified by mass spectrometry. Six protein spots were increased in over expressing lines compared to WT. A look at some well known proteins showed that there is no major change indicating induction or repression of metabolic pathways.

**Keywords:** GR-RBP2, Proteomic analysis, Mitochondria, Gene transformation