فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال ششم، شماره اول، بهار ۱۳۹۷

# شناسایی و تعیین خصوصیات ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز کلاس Mu در ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

سلمان احمدی[۱]، حسین غفوری[۲]*، سجاد صاری‌خان[۳]

تاریخ دریافت: آذر ۹۵ تاریخ پذیرش: فروردین ۹۶

**چکیده**

گلوتاتیون اس- ترانسفرازها (GSTs) یکی از آنزیم‌های کلیدی فاز دوم متابولیسم داروها هستند که در سم‌زدایی سلول‌ها و متابولیسم استرس اکسیداتیو پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها نقش دارند و این کار را از طریق اتصال گلوتاتیون احیا به گزنوبیوتیک‌ها انجام می‌دهند. با توجه به نقش این آنزیم‌ها در مقابله با آلودگی‌های زیست محیطی و افزایش چشمگیر آلودگی دریای خزر در سال‌های اخیر، شناخت نقش و عملکرد این آنزیم‌ها، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش شناسایی، توالی‌یابی و تعیین خصوصیت ایزوفرم Mu گلوتاتیون اس- ترانسفراز (GSTM) ماهی‌سفید دریای خزر است. مراحل استخراج RNA، ساخت cDNA تک‌رشته‌ای و تکثیر ژن GSTM در PCR انجام شد. سپس ژن مورد نظر درون حامل pTZ57R/T قرار گرفت. حامل نوترکیب، به روش ترانسفورماسیون شیمیایی به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5α انتقال یافت. پس از استخراج حامل و توالی‌یابی نوکلئوتیدی، توالی GSTM با ۶۲۵ نوکلئوتید به دست آمد. نتایج حاصل از هم‌ردیفی، حاکی از همسانی بالای ۸۹ درصد GSTM ماهی سفید با سایر گونه‌های خانواده کپورماهیان است که ناحیه N-terminal آن همسانی بالاتری را در مقایسه با ناحیه C-terminal نشان می‌دهد. بیشترین آمینواسید موجود در ساختار GSTM لیزین است که نقش کلیدی را در ساختار گلوتاتیون اس- ترانسفراز بازی می‌کند. توالی نوکلئوتیدی GSTM با شماره دسترسی KY211992 در پایگاه NCBI به ثبت رسید.

**واژگان کلیدی:** *گلوتاتیون اس- ترانسفراز، کلاس Mu، دریای خزر، ماهی سفید.*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- مربی پژوهشی، بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

**مقدمه**

گلوتاتیون اس- ترانسفرازها (GST)[1] آنزیم‌های دیمر با عمل چندگانه هستند که در سم‌زدایی ترکیبات درون‌زاد (متابولیت‌های درون سلولی) و برون‌زاد (داروها، حشره‌کش‌ها و سایر آلودگی‌ها) نقش دارند (Hayes and Pulford, 1995). بر این اساس، عملکرد گلوتاتیون اس- ترانسفرازها به عنوان شاخصی برای آلودگی‌های زیست محیطی به اثبات رسیده است (Wan et al., 2009). گلوتاتیون اس- ترانسفرازها اعضای یک خانواده چندژنی[2] هستند که در تمام موجودات پروکاریوت و یوکاریوت یافت می‌شوند. تنوع ساختاری در میان ایزوآنزیم‌های[3] خانواده گلوتاتیون اس- ترانسفرازها، امکان اتصال آن‌ها را با طیف وسیعی از ترکیبات فراهم می‌کند (Hedges and Kumar, 2002). گلوتاتیون اس- ترانسفرازها این کار را از طریق اتصال گروه تیول گلوتاتیون به ترکیبات آلکیله کننده الکتروفیلیک، انجام می‌دهند (Forman et al., 2009) که در نهایت سبب تسهیل دفع این ترکیبات، از طریق افزایش قدرت انحلال آن‌ها در آب می‌شود (Wilce and Parker, 1994).

این آنزیم‌ها به سه خانواده مجزا تقسیم می‌شوند: سیتوزولی، میتوکندریایی و متصل به غشا (Hayes et al., 2005). GSTهای سیتوزولی اندازه‌ای در حدود ۲۸-۲۳ کیلودالتون داشته، به صورت همودیمر یا هترودیمر وجود دارند. این GSTها به طور کلی به ۱۳ زیر رده مختلف یعنی $\pi$، $\nu$، $\alpha$، $\beta$، $\delta$، $\varepsilon$، $\zeta$، $\theta$، $\mu$ و $\omega$ ،$\sigma$ ،$\tau$ ،$\varphi$ تقسیم می‌شوند (Richardson et al., 2009). گلوتاتیون اس- ترانسفرازهای میتوکندریایی (GSTK)، متعلق به کلاس کاپا (Kappa) هستند. در حالی که گلوتاتیون اس- ترانسفرازهای سراسری غشایی متعلق به کلاس MGST یا MAPEG هستند[4] (Mannervik et al., 1992). گلوتاتیون اس- ترانسفرازهای سیتوزولی عمدتا آنزیم‌هایی دیمر هستند که در متابولیسم ترکیبات داخلی و خارجی مضر دخالت دارند (Hayes and Pulford, 1995). اعضای این خانواده فعالیت ایزومریزاسیون[5] توانایی اتصال کوالان و غیرکوالان لیگاند و تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال[6] را از خود نشان می‌دهند (Gulick and

1- Glutathione S-transferase
2- Multigenic
3- Isoenzyme

4 Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism
5 Isomerisation
6 Signal Transduction Pathway

Fahl, 1995). گلوتاتیون اس- ترانسفرازهای سیتوزولی و میتوکندریایی فعالیت پراکسیدازی را نیز از خود نشان می‌دهند. اعضای خانواده MAPEG نیز هموتریمرهای متصل به غشا هستند که غالبا در بیوسنتز لوکوترین‌ها[1] و پروستانوئیدها[2]نقش دارند. در حالی که بعضی از آن‌ها دارای فعالیت پراکسیدازی بالایی هستند و سبب محافظت غشا در برابر لیپید پراکسیدازها می‌شوند (Jakobsson et al., 1999). تاکنون پروتئین‌های چند ایزوآنزیم مختلف گلوتاتیون اس- ترانسفراز، از چندین گونه ماهی استخوانی شامل نمونه‌های رودخانه‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان[3] ماهی خاردار دریایی[4] و گربه ماهی قهوه‌ای[5] تخلیص شده‌اند (Kim et al., 2010). با توجه به روند رو به افزایش آلودگی‌های زیست محیطی دریای خزر در سال‌های اخیر، شامل ورود فاضلاب‌های شهری و صنعتی و نیز ورود انواع سموم کشاورزی به آن و حساسیت ماهی سفید[6] به عنوان یک گونه شاخص در این اکوسیستم، مسلما نقش مهم گلوتاتیون اس- ترانسفرازها در مقابله با آلودگی‌های محیطی و دفع سمیت بدن آبزیان انکار ناپذیر است. در مطالعه حاضر، توالی نوکلئوتیدی GSTM ماهی سفید دریای خزر شناسایی و تعیین توالی شد که شناخت این مهم، کلید انجام سایر مطالعات ساختاری، آنزیمی و تخلیص بر روی این آنزیم است.

## مواد و روش‌ها

### طراحی آغازگرها و استخراج RNA

طراحی توالی آغازگرهای[7] رفت و برگشت با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner و با هم‌ردیفی توالی‌های ثبت شده گلوتاتیون اس- ترانسفراز سایر ماهی‌های خانواده کپورماهیان[8] که در سایت NCBI[9] موجود است، انجام گرفت. سنتز آغازگرها نیز توسط شرکت Macrogen (کره جنوبی) صورت گرفت که توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج RNA با استفاده از TRIzol (Invitrogen، آمریکا) انجام شد و به منظور بررسی کیفی آن، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

1 Leukotriene
2 Prostanoid
3 Rainbow Trout
4 Sea Bass
5 Brown Bullheads
6 Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*)
7 Primer
8 Cyprinidae
9 National Center for Biotechnology Information

**جدول ۱: آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن GSTM**

| نام آغازگر | توالی آغازگر (´۳ → ´۵) | دمای ذوب[۱] (درجه سانتی‌گراد) |
|---|---|---|
| **آغازگر رفت**[۲] | TATTGGGATATACGCGGGCT | ۵۴/۸ |
| **آغازگر برگشت**[۳] | CCCATTTGGCCATCTTGTTG | ۵۳/۸ |

۱: Melting Temperature
۲: Forward Primer
۳: Reverse primer

پس از استخراج RNA، سنتز cDNA تک‌رشته‌ای در واکنش نسخه‌برداری معکوس[1] با استفاده از کیت سنتز cDNA تک‌رشته‌ای (Fermentas، آمریکا) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب که پس از اضافه کردن ۱ میکرولیتر از آغازگر Oligo (dT)18 به ۲ میکرولیتر RNA، نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵X، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP mM ۱۰، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL) و ۱ میکرولیتر RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) به آن اضافه شد و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتا برای پایان عمل آنزیم، به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. cDNA تک‌رشته‌ای سنتز شده، به عنوان رشته الگو برای تکثیر ژن GSTM با آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2]به کار برده شد. PCR مورد نظر برای این ژن با نسبت‌های ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس EmeraldAmp MAX HS (10X) (TaKaRa، ژاپن)، ۰/۷ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر cDNA تک‌رشته‌ای و ۷/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

**استخراج ژن GSTM از ژل**

به منظور حذف آغازگر دیمرها[3] و الیگونوکلئوتیدهای غیراختصاصی احتمالی

1- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2- polymerase Chain Reaction (PCR)
3 Primer Dimer

**جدول ۲: برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن GSTM**

| تعداد سیکل | مرحله | دما (°C) | زمان |
|---|---|---|---|
| ۱ سیکل | دناتوراسیون اولیه[۱] | ۹۴ | ۵ دقیقه |
| ۳۰ سیکل | دناتوراسیون | ۹۴ | ۳۵ ثانیه |
| | اتصال آغازگر[۲] | ۵۶ | ۳۵ ثانیه |
| | بسط[۳] | ۷۲ | ۳۵ ثانیه |
| ۱ سیکل | بسط نهایی* | ۷۲ | ۲۰ دقیقه |

۱: Initial Denaturation

۲: Annealing

۳: Extension

*: مرحله بسط نهایی، برای بسط دادن دم‌های پلی‌آدنینی انتهاهای ژن و قرارگیری مطمئن‌تر ژن درون حامل pTZ57R/T، به مدت ۲۰ دقیقه اجرا شد.

موجود، تک باند مورد نظر از روی ژل جدا شد و سپس استخراج از ژل با استفاده از کیت (GeneAll، کره جنوبی) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. سپس محصول PCR تخلیص شده، برای انجام T/A Cloning در مراحل بعدی به کار برده شد.

**کلونینگ و ترانسفورماسیون ژن GSTM**

برای انجام T/A Cloning، با استفاده از کیت (Fermentas، آمریکا)، ابتدا ۴ میکرولیتر ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز، ۳ میکرولیتر حامل pTZ57R/T، ۶ میکرولیتر بافر لایگیشن (5X) و ۱۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، به صورت شبانه در دمای ۴°C در معرض ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase قرار گرفت تا ژن، درون حامل pTZ57R/T الحاق شود. سپس حامل نوترکیب حاصل، طی مراحل ترانسفورماسیون شیمیایی[۱] (Froger and Hall, 2007)، به درون سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α انتقال یافت. پس از انجام ترانسفورماسیون، به باکتری‌های ترانسفورم شده، یک میلی لیتر محیط LB[۲] مایع بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد و سپس به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور شیکردار با ۲۲۰rpm انکوبه شد و در نهایت به مدت ۵ دقیقه با

1 Chemical Transformation
2 Luria-Bertani

۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین (µ۱۰۰g/mL)، X-gal (۲۰mg/mL) و IPTG (۱۰۰Mm)، به صورت سفره‌ای کشت داده شد و سپس پلیت حاصل به مدت یک شب در ۳۷°C انکوبه شد.

**غربالگری باکتری‌های حاوی حامل نوترکیب**

به منظور تشخیص کلنی‌های حاوی DNA نوترکیب از کلنی‌های حاوی DNA غیرنوترکیب با استفاده از تکنیک Blue-White Screening، از محیط کشت انتخابی حاوی Amp + X-gal + IPTG با غلظت‌های فوق الذکر استفاده شد. در این روش کلنی‌های نوترکیب با رنگ سفید مشخص می‌شوند. در نهایت برای تایید و بررسی کلونینگ، روی کلنی‌های نوترکیب به دست آمده Colony PCR صورت گرفت که برنامه مراحل انجام آن مطابق با جدول ۲ انجام شد با این تفاوت که مدت زمان مرحله دناتوراسیون اولیه و بسط نهایی آن به ترتیب به ۱۰ دقیقه و ۵ دقیقه تغییر یافت.

**استخراج حامل**

کلنی‌های نوترکیب با PCR مثبت، در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی µ۱۰۰g/mL به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با ۲۲۰rpm کشت داده شد و از آن استخراج حامل به روش لیز قلیایی با استفاده از کیت استخراج حامل (GeneAll، کره جنوبی) و مطابق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. پس از استخراج حامل، برای تایید وجود ژن GSTM در حامل، از آن برای انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (مطابق جدول ۲) استفاده شد با این تفاوت که مدت زمان مرحله دناتوراسیون اولیه و بسط نهایی آن، به ترتیب به ۱۰ دقیقه و ۵ دقیقه تغییر یافت. حامل استخراج شده برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد.

مقایسه درصد همسانی (Identity) نواحی N-terminal و C-terminal گلوتاتیون اس-ترانسفراز ماهی سفید، با چند گونه دیگر و انسان به صورت تئوریک و با استفاده از وب‌سایت «https://www.expasy.org» انجام شد. همچنین شاخص‌های وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک[1] با استفاده از وب‌سایت «web.expasy.org/protparam» به دست آمد.

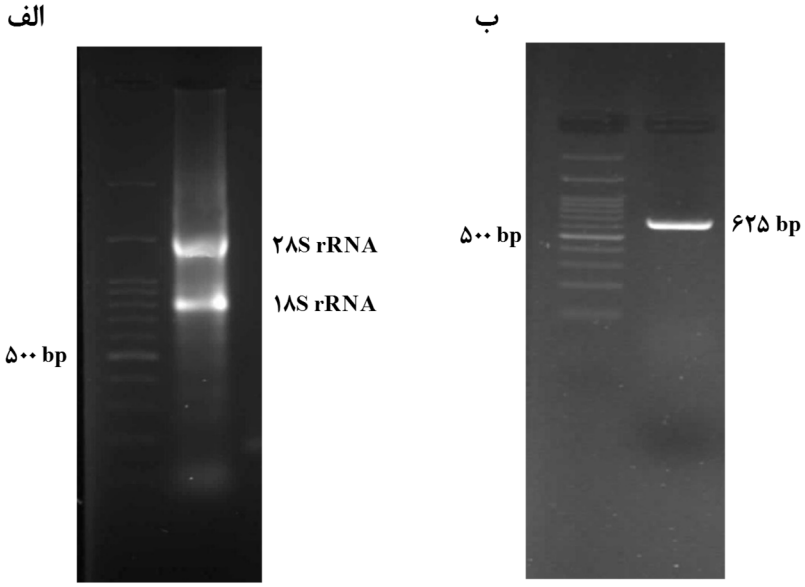
1- Isoelectric Point

## نتایج

برای تایید کیفیت RNA استخراج شده و همچنین تکثیر اختصاصی ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز در PCR، از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد که نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است.

پس از استخراج حامل نوترکیب از باکتری *E. coli* و ارسال آن برای توالی‌یابی نوکلئوتیدی، توالی نسبی ۶۲۵ نوکلئوتیدی آن با درصد GC برابر با ۴۵/۳ درصد به دست آمد که توالی آن در شکل ۲ آورده شده است.

نتایج حاصل از هم‌ردیفی نوکلئوتیدی ژن GSTM ماهی سفید با سایر ماهی‌های خانواده کپورماهیان، همسانی بالای ۸۹ درصد را با اعضای این خانواده نشان داد. مقایسه درصد همسانی نواحی N-terminal و C-terminal گلوتاتیون اس- ترانسفراز ماهی سفید، با چند گونه دیگر و انسان در جدول ۳ آورده شده است.




**شکل ۱: الف) RNA استخراج شده از کبد ماهی سفید نر؛ ستون ۱ (چپ) مارکر 100bp و ستون ۲ (راست) RNA استخراج شده. ب) محصول PCR مربوط به GSTM؛ ستون ۱ (چپ) مارکر 100bp و ستون ۲ (راست) ژن GSTM.**

>*Rutilus frisii kutum* glutathione S-transferase mu mRNA, partial cds (Accession number: KY211992)

TATTGGGATATACGCGGGCTTGCCCAGCCAATCCGCCTGCTGTTGGAATACACT
GGTACTAAGTATGAGGAGAAGTTCTATTCTTGTGGTGACTCTCCCAACTATGACA
GAAGCTGTTGGCTTAATGAGAAGGAGAAACTTGGGATAGACTTTCCTAATTTGC
CCTACCTGGAGGATGGTGACACAAAGATAGTCCAAAGCAATGCCATCATGAGAT
ACATCGCCCGCAAAAACAACCTCTGTGGGGAAACTGAAGAAGAGCAGGTGAAA
GTTGACATCATGGAAAACCAGGCGATGGACTTCCGCAATGGTTTTGTCCAGCTC
TGCTACGGAGACTTTGACAAAACCAAATCATGTTACACTGAGAAACTGCCAGGA
ACTCTAAAACAGTTCTCTGACTTCCTTGGTGACAGGAAGTGGTTTGCTGGGTGCA
AGATCACATTTGTGGACTTCATCATGTACGAGTTGTTGGATCAGCATCGTATGTT
TGACCCAGCATGCCTGGATGACTACAAAAACCTTAGATGTTTCCTGGATCGCTTT
GAGAGTATTGAGAAGATTGCAGGATACATGAAGTCAAGCAAGTTCATGAAAAC
ACCCGTGAACAACAAGATGGCCAAATGGG

**شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی نسبی ژن GSTM**

**جدول ۳: مقایسه مشخصات GSTM ماهی سفید با چند ماهی دیگر و انسان**

| نام ماهی | تعداد نوکلئوتید (جفت باز) | درصد GC | همسانی کل | همسانی N-terminal | همسانی C-terminal |
|---|---|---|---|---|---|
| *Rutilus kutum / Cyprinus carpio* | ۶۲۵ - ۷۶۰ | ۴۵/۳ – ۴۷/۴ | ۹۲ | ٪۸۹ | ٪۸۶ |
| *Rutilus kutum / Danio rerio* | ۶۲۵ - ۷۲۷ | ۴۵/۳ – ۴۴/۳ | ٪۸۹ | ٪۸۹ | ٪۸۶ |
| *Rutilus kutum / Megalobrama amblycephala* | ۶۲۵ - ۱۰۱۱ | ۴۵/۳ – ۴۰/۳ | ٪۹۲ | ٪۹۰ | ٪۸۴ |
| *Rutilus kutum / Homo sapiens* | ۶۲۵ - ۶۵۱ | ۴۵/۳ - ٪۴۳/۸ | ٪۶۳/۶ | ٪۷۵/۶ | ٪۵۵/۵ |

همچنین لازم به ذکر است که توالی ژنی به دست آمده با شماره ثبت[1] KY211992 در پایگاه داده GenBank وب‌سایت NCBI به ثبت رسید.

توالی ریشه‌های آمینواسیدی ژن GSTM ماهی سفید در شکل ۳ آورده شده است که ۲۰۸ آمینواسید با وزن مولکولی ۲۴/۶ kDa و نقطه ایزوالکتریک برابر با ۵/۴۱ دارد. توالی به دست آمده غنی از یکسری آمینواسیدهای دارای فعالیت شاخص است که در جدول ۴ فراوان‌ترین و مهمترین آن‌ها لیست شده است.

2- Accession Number
3- National Center of Biotechnology Information

Glutathione S-transferase Mu, partial [*Rutilus frisii kutum*]

YWDIRGLAQPIRLLLEYTGTKYEEKFYSCGDSPNYDRSCWLNEKEKLGIDFPNL
PYLEDGDTKIVQSNAIMRYIARKNNLCGETEEEQVKVDIMENQAMDFRNGFVQ
LCYGDFDKTKSCYTEKLPGTLKQFSDFLGDRKWFAGCKITFVDFIMYELLDQH
RMFDPACLDDYKNLRCFLDRFESIEKIAGYMKSSKFMKTPVNNKMAKW

1-82 GST N-terminal
84-201 GST C-terminal

**شکل ۳: توالی ریشه‌های آمینواسیدی ژن GSTM در ماهی سفید**

**جدول ۴: فراوانی آمینواسیدهای شاخص در توالی GSTM ماهی سفید**

| آمینواسید | فراوانی (N) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *Rutilus frisii kutum* | *Danio rerio* | *Cyprinus carpio* | *Megalobrama amblycephala* | *Sinocyclocheilus grahami* |
| **لیزین (K)** | ۲۰ | ۲۱ | ۲۲ | ۱۸ | ۲۳ |
| **آسپارتات (D)** | ۱۸ | ۱۷ | ۱۹ | ۱۹ | ۲۰ |
| **گلوتامات (E)** | ۱۵ | ۱۹ | ۱۸ | ۱۶ | ۱۶ |
| **گلیسین (G)** | ۱۲ | ۱۱ | ۱۲ | ۱۱ | ۱۲ |

با توجه به این که ماهی سفید جزء خانواده کپورماهیان به شمار می‌رود، آمینواسیدهای شاخص در توالی GSTM آن با چند ماهی دیگر همین خانواده مقایسه شده است که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است.

## بحث

باتوجه به نقش گلوتاتیون اس- ترانسفرازها در دفع سموم بدن موجودات مختلف، ضروری به نظر می‌رسد که ساختار آن نیز در جهت کمک به ایفای نقش سمیت‌زدایی آن تکامل پیدا کرده باشد که از این منظر می‌توان توالی آمینواسیدی آن را مورد بررسی قرار داد. فراوان‌ترین آمینواسید موجود در ساختار GSTM ماهی سفید و اکثر ماهی‌های دیگر لیزین است. لیزین بیش از آن که در جایگاه فعال نقش داشته باشد، در جایگاه اتصال پروتئین‌ها دارای عملکرد است (Richardson, 1981) که این مسئله موید نقش گلوتاتیون اس- ترانسفرازها در اتصال به گزنوبیوتیک‌های

مختلف برای از بین بردن اثرات سمی آن‌ها است. گلوتاتیون اس- ترانسفرازها پس از اتصال به گزنوبیوتیک‌ها، سمیت‌زدایی را از طریق افزایش انحلال آن‌ها در آب انجام می‌دهند. در این راستا نیز لیزین که در میان‌کنش با آب نقش کلیدی دارد، یکی از آمینواسیدهای حل کننده پروتئین در آب است (Richardson, 1981). بنابراین میزان بالای لیزین در گلوتاتیون اس- ترانسفرازها، برای تسهیل ایفای نقش آنزیمی آن‌ها است.

آمینواسیدهای آسپارتات و گلوتامات تمایل زیادی برای قرارگیری در پیچ‌ها[1] دارند (Richardson, 1981) که فراوانی پیچ‌ها در ساختار گلوتاتیون اس- ترانسفرازها نیز به علت وفور همین آمینواسیدها است (Ji et al., 1994).

گلیسین نیز یکی از مهم‌ترین آمینواسیدهای برهم زننده نظم ساختار پروتئین‌ها است که به دلیل نداشتن کربن بتا می‌تواند زوایای مختلفی را در نمودار راماچاندران به خود بگیرد و به همین دلیل باعث افزایش انعطاف‌پذیری ستون فقرات پروتئین‌ها می‌شود (Richardson, 1981) که با توجه به میزان بالای این آمینواسید در ساختار GSTM ماهی سفید، این خود می‌تواند یکی دیگر از دلایل وجود پیچ‌های موجود در ساختار آن باشد.

با توجه به داده‌های به دست آمده از جدول ۳ مشخص است که توالی N-terminal گلوتاتیون اس- ترانسفراز Mu ماهی سفید، با آن که تنها ۸۲ ریشه آمینواسیدی را از مجموع ۲۰۸ ریشه آمینواسیدی به خود اختصاص داده است اما همسانی بیشتری را با همین توالی در سایر ماهی‌ها و انسان نشان می‌دهد که احتمال می‌رود بیشتر دومین‌های عملکردی و تاثیرگذار در نقش آنزیمی گلوتاتیون اس- ترانسفراز در همین قسمت N-terminal آن قرار گرفته باشند.

از داده‌های به دست آمده از وب‌سایت «http://myhits.isb-sib.ch» مشخص شد که آمینواسیدهای ۲۷-۲۱ در جایگاه تیروزین کینازی آنزیم نقش دارند و همچنین آمینواسیدهای ۱۲۳-۱۲۱، ۱۲۹-۱۲۷ و ۱۹۵-۱۹۳ در جایگاه فسفریلاسیون پروتئین کیناز C، ایفای نقش می‌کنند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش، مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه گیلان بابت حمایت‌های مالی و همچنین از مرکز تکثیر،

1- Turn

پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت بابت در اختیار گذاشتن ماهی سفید مورد نیاز در این پژوهش اعلام می‌دارند.

## منابع

**Forman H.J., Zhang H. and Rinna A. 2009.** Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Molecular Aspects of Medicine, 30(1): 1–12.

**Froger A. and Hall J.E. 2007.** Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. Journal of Visualized Experiments, 2007(6): 1–15 (e253).

**Gulick A.M. and Fahl W.E. 1995.** Mammalian glutathione S-transferase: Regulation of an enzyme system to achieve chemo-therapeutic efficacy. Pharmacology and Therapeutics, 66(2): 237–257.

**Hayes J.D. and Pulford D.J. 1995.** The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemo-protection and drug resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 30(6): 445–600.

**Hayes J.D., Flanagan J.U. and Jowsey I.R. 2005.** Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45: 51–88.

**Hedges S.B. and Kumar S. 2002.** Vertebrate genomes compared. Science, 297(5585): 1283–1285.

**Jakobsson P.J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. and Persson B. 1999.** Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. Protein Science, 8(03): 689–692.

**Ji X., Johnson W.W., Sesay M.A., Dickert L., Prasad S.M. and Ammon H.L. 1994.** Structure and function of the xenobiotic substrate binding site of a glutathione S-transferase as revealed by X-ray crystallographic analysis of product complexes with the diastereomers of 9-(S-glutathionyl)-10-hydroxy-9, 10-dihydrophenanthrene. Biochemistry, 33(5): 1043–1052.

**Kim J.H., Dahms H.U., Rhee J.S., Lee Y.M., Lee J., Han K.N. and Lee J.S. 2010.** Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). Comparative Biochemistry and Physiology C, 151: 99–106.

**Mannervik B., Awasthi Y., Board P., Hayes J., Di Ilio C. and Ketterer B. 1992.** Nomenclature for human glutathione transferases. Biochemical Journal, 282: 305–316.

**Richardson J.S. 1981.** The anatomy and taxonomy of protein structure. Advances in Protein Chemistry, 34: 167–339.

**Richardson K.L., Gold-Bouchot G. and Schlenk D. 2009.** The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: Loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). Comparative Biochemistry and Physiology C, 150: 279–284.

**Wan Q., Whang I., Lee J.S. and Lee J. 2009.** Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. Comparative Biochemistry and Physiology C, 150(4): 558–568.

**Wilce M.C. and Parker M.W. 1994.** Structure and function of glutathione S-transferases. Biochimica et Biophysica Acta, 1205(1): 1–18.

**Aquatic Physiology and Biotechnology**
**Vol. 6, No. 1, Spring 2018**

# Identification and characterization of glutathione S-transferase class Mu from the *Rutilus frisii kutum*

**Salman Ahmadi[1], Hossein Ghafouri[2]*, Sajjad Sarikhan[3]**

Received: December 2016 Accepted: April 2017

**Abstract**

Glutathione S-transferases are one of the key enzymes in phase II of drug metabolism which play role in detoxification and oxidative stress metabolism in prokaryote and eukaryote cells, by binding reduced glutathione to the xenobiotics. Considering the importance of these enzymes in defying against pollution and in regard to the increasing amount of pollution in the Caspian Sea during recent years, a deeper knowledge about role and function of this enzyme as a key part of detoxification against the pollutants seems crucial. The goal of this study is identification and gene sequencing of glutathione S-transferase Mu in *Rutilus frisii kutum*. After RNA extraction from male fishes' liver tissue, cDNA synthesis was the next step followed by PCR. Then the desired gene was inserted into vector pTZ57R/T followed by chemical transformation into *E. coli* DH5α competent cells. After plasmid extraction and gene sequencing, the partial GSTM sequence with 625 nucleotides was obtained. The nucleotide BLAST result shows more than 89% of identity with GSTM in other members of Cyprinidae that N-terminal region has a greater portion of this identity compared with C-terminal. The most abundant residue found in the GSTM sequence was lysine which has an important role in glutathione S-transferase structures. The GSTM nucleotide sequence was registered at the NCBI database with accession number KY211992.

**Key words:** *Glutathione S-transferase, Mu Class, Caspian Sea,* Rutilus frisii kutum.

1- M.Sc. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Scientific Member in Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.
*Corresponding Author: h.ghafoori@guilan.ac.ir