بررسی مقایسه‌ای بیان آنزیم اندونوکلئاز CEL I در چند گیاه از خانواده چتریان به روش مقایسه نیمه‌کمی RT-PCR

جعفر ذوالعلی*- محمد فارسی - احمدرضا بهرامی - مریم مقدم متین - مهدی قبولی[1]

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۱

چکیده

آنزیم اندونوکلئاز CEL I یک گلیکوپروتئین با کاربرد تحقیقاتی از خانواده نوکلئازهای S1 است که مناطق هترودوپلکس را در قطعات DNA در شرایط آزمایشگاه با کارآیی بسیار خوب برش می‌دهد. ویژگیهای ارزشمند فعالیت آنزیمی CEL I سبب شده است که روش آنالیز هترودوپلکس مبتنی بر آن از جمله ساده‌ترین و موثرترین روشهای شناسایی مکان جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی در مولکول‌های DNA محسوب شود. فعالیت آنزیمی CEL I را اولین بار اولیکفسکی و همکاران در گیاه کرفس کشف کردند. در این تحقیق با هدف شناسایی رقمی از کرفس که آنزیم CEL I را بیشتر از سایر ارقام تولید نماید و یا شناسایی منابع گیاهی بهتر از کرفس برای تولید این آنزیم، از مقایسه بیان آن در سطح RNA استفاده شد. میزان بیان ژن *cel I* در ۱۲ نمونه گیاهی شامل ۷ رقم کرفس و ۵ گونه خویشاوند آن با استفاده از روش مقایسه نیمه‌کمی RT-PCR بررسی و مقایسه شد. اگرچه دو رقم کرفس GSB و ویکتوریا بیان کمتری را نسبت به دیگر ارقام نشان دادند، معذالک تفاوت بیان آنزیم موردنظر در بین ارقام مختلف کرفس چندان قابل ملاحظه نبود. این تفاوت بیان در گونه‌های مورد آزمایش مشهودتر بود، بطوریکه دو گیاه شوید و رازیانه بیان بسیار بیشتری نسبت به کرفس نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: مقایسه نیمه‌کمی RT-PCR، آنزیم CEL I، الگوی بیان ژن، خانواده چتریان

مقدمه

اولیکفسکی و همکاران ، آنزیم نوکلئاز CEL I از خانواده اندونوکلئازهای S1 را در گیاه کرفس کشف کردند. این آنزیم انتهای ´۳ لوپ تشکیل شده در مناطق هترودوپلکس قطعات DNA را برش می‌دهد و قابلیت منحصربفردی، که آن را از سایر آنزیم‌های مشابه نظیر نوکلئاز S1 و نوکلئاز P1 متمایز می‌نماید، فعالیت بسیار مطلوب در شرایط آزمایشگاه در محدوده pH خنثی است (۹ و ۱۱). آنزیم مذکور یک گلیکوپروتئین با گروه گلیگوزیدی مانوزیل است که در حضور Zn^{+2} و Mg^{+2} از فعالیت بسیار مطلوب در محدوده pH = ۵/۵ – ۹ برخوردار می‌باشد (۱۲). با کشف این آنزیم ارزشمند، اولیکفسکی و همکاران(۹) توانستند روش آنالیز هترودوپلکس را ارتقاء داده و بعنوان تکنیکی ساده، ارزان و موثر برای شناسایی و آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در مولکول‌های DNA مطرح نمایند.

۱.به ترتیب دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و استادیاران گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد

*. نویسنده مسئول Email: jafar zolala@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژنتیک و پزشکی از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت است. این آشکارسازی ممکن است با هدف شناسایی ژن‌های جهش یافته مرتبط با بیماریهای لاعلاج نظیر بیماریهای ارثی و انواع سرطان، شناسایی ژن‌های عامل مقاومت به بیماریها در انسان، دام و گیاهان (۱۳)، تشخیص وقایع ژنتیکی عامل ناهنجاریها، تشخیص هویت (۸)، تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی‌های فیلوژنتیکی در جمعیت‌ها (۳)، و تعیین عملکرد ژنهای ناشناخته‌ای که توالی آنها مشخص می‌باشد (۴)، صورت پذیرد. تکنیکهای متعددی برای آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی ابداع گردیده است که هر یک با قابلیتهای خاص خود برای آشکارسازی این جهش‌ها در توالی‌های ژنومی مورد استفاده قرار می گیرند (۳). معذالک، آنچه که در این زمینه بسیار مطلوب خواهد بود، وجود تکنیکی است که علاوه بر قابلیت بکارگیری در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف، کم هزینه و نیازمند به امکانات آزمایشگاهی کمتر بوده و بتوان آنرا بطور گسترده برای غربال کردن ژنوم‌ها مورد استفاده قرار داد (۵). تکنیک آنالیز هترودوپلکس مبتنی بر CEL I، روشی بسیار ساده، کم‌هزینه، سریع و حساس برای آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی بوده و از جنبه‌های کاربردی و تحقیقاتی بسیار گسترده‌ای برخوردار می‌باشد (۶).

دسترسی به آنزیم اندونوکلئاز CEL I که تکنولوژی خالص‌سازی و استفاده گسترده از آن تنها در اختیار چند آزمایشگاه پیشتاز در این زمینه است، راهگشای بسیاری از تحقیقات مبتنی بر SNP برای محققان بیولوژی مولکولی خواهد بود. یانگ و همکاران (۲۰۰۰)، دستورالعمل خالص‌سازی آنزیم CEL I را از عصاره اندام‌های رویشی گیاه کرفس ارائه نموده و ضمن توصیف خصوصیات مولکولی آنزیم، توالی mRNAی کد کننده آن را نیز کلون و توصیف کردند (۱۲). اگرچه برای دسترسی به فعالیت آنزیمی CEL I نیاز به انجام تمام دستورالعمل ارائه شده توسط یانگ و همکاران (۱۲) نیست، معذالک بایستی به عصاره‌ای با خلوص حداقل ۵۰۰ برابر عصاره خام دست یافت که به نوبه خود وقت‌گیر و هزینه‌بر است (۹).

اگرچه فعالیت آنزیمی شبیه به CEL I منحصر به گیاه کرفس نمی‌باشد و این فعالیت آنزیمی در بسیاری از گیاهان مشاهده می شود، بدلیل بروز بسیار بارز این فعالیت در گیاه کرفس، این گیاه بعنوان منبع آنزیم مزبور شناخته می شود (۹). در این تحقیق سعی شده است، برای افزایش راندمان تولید CEL I، به شناسایی یک منبع گیاهی که این آنزیم را به مقدار نسبی بیشتری نسبت به سایر گیاهان تولید نماید، اقدام شود. گیاهان مورد نظر با استفاده از روش مقایسه نیمه کمی RT-PCR از نظر بیان ژن *cel I* در سطح RNA مقایسه شدند. با در نظر گرفتن قرابت ژنتیکی برای مقایسه گیاهان در سطح مولکولی، گیاهان یکساله گشنیز (*Coriandrum sativum*)، شوید (*Anethum graveolens*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، و گیاهان دو ساله هویج (*Daucus carota*) و جعفری (*Petroselinum sativum*) از خانواده چتریان (Apiaceae) همراه با ارقام مختلف کرفس (*Apium graveolens*) مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور کرفس ارقام لاتوم سلف بلانچینگ (Lathom Self Blanching)، گلدن سلف بلانچینگ (Golden Self Blanching)، سلبریتی (Celebrity)، ویکتوریا (Victoria)، و برایدونز پرایز رد(Brydons Prize Red) از شرکت نیکیز نرسری (Nicky's Nursery) انگلستان، یک رقم از شرکت خاک تهران و یک توده بومی از مشهد تامین شد. بذور شوید و جعفری از شرکت مام گل تهران، گشنیز و رازیانه از شرکت خاک تهران و هویج از شرکت آوند تهران تهیه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

اندام‌های رویشی گیاهان دو ماهه پرورش یافته در گلخانه در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۰ ساعت تاریکی با دمای ۲ ± ۱۵ درجه سانتیگراد، برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند.

آغازگرهای RT-PCR

الیگونوکلئوتیدهای ۱۹ مری با توالی:

۵´ - TTTGTGAAAACTCTCACCG - ۳´ بعنوان آغازگر رفت و ۱۸ مری با توالی:

۵´ - GTCTGAGCACCAAATGGA - ۳´ بعنوان آغازگر برگشت بر اساس توالی mRNAی کد کننده پروتئین عمومی یوبی‌کوئیتین کرفس ثبت شده در بانک ژن و الیگونوکلئوتیدهای ۲۰ مری با توالی:

۵´ - GTGTTCTTTCTTTTGTTGGC - ۳´ بعنوان آغازگر رفت و ۱۹ مری با توالی:

۵´ - AGGCTGATGAATATCTCCC - ۳´ بعنوان آغازگر برگشت بر اساس توالی mRNAی کد کننده آنزیم CEL I گیاه کرفس ثبت شده در بانک ژن، بنحوی طراحی شدند که بترتیب تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۲۰۸ bp از cDNA مربوط به توالی کد کننده پروتئین یوبی‌کوئیتین و قطعه‌ای به اندازه ۴۳۸ bp از cDNA مربوط به توالی کد کننده آنزیم CEL I را هدایت نمایند. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Primer Premier v.3.5 انجام شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از دستورالعمل آسیف و همکاران (۱) استفاده شد. تمام محلول‌ها در آب عاری از RNase تیمار شده با DEPC تهیه گردیدند. کلیه مراحل کار در دمای صفر درجه سانتی گراد یخ و مراحل رسوب‌گذاری در سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. قطعات یک گرمی بافتهای گیاهی در هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر گردید. پودر حاصل در ۱۰ میلی لیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی مول Tris-HCl pH ۸/۲، ۱/۴ مول کلرید سدیم، ۲۰ میلی مول EDTA pH ۸، ۲٪ CTAB) با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد هموژنیزه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتیگراد، عصاره شفاف سلولی در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه تهیه شد. محلول کلروفورم : ایزوآمیل الکل (۲۴ : ۱) به نسبت حجمی ۱ : ۱ به عصاره فوق اضافه شد و پس از سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ بمدت ۶ دقیقه، فاز آبکی (محلول رویی) به تیوب اپندورف جدید منتقل شد. ۳۰۰ میکرولیتر کلرید لیتیوم ۱۰ مولار به هر میلی لیتر محلول برداشته شده اضافه شد و بمدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد، تا RNA رسوب نماید. رسوب RNA با استفاده از سانتریفیوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه بدست آمد. رسوب RNA در ۷۰۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد. بمنظور حذف باقیمانده پروتئین و پلی‌ساکارید، ابتدا محلول RNA با استفاده از محلول ۱ : ۱ فنل اسیدی : کلروفورم، و سپس با افزودن یک‌سی‌ام حجم استات سدیم و ۰/۱ حجم اتانول مطلق سرد عصاره‌گیری شد. رسوب تمیز RNA با استفاده از رسوب‌گذاری در حضور اتانول تهیه گردید و در ۳۰ میکرولیتر آب عاری از RNase تیمار شده با DEPC حل و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از سنجش جذب نوری در طول موج ۲۶۰ nm اندازه‌گیری و بمنظور تعیین خلوص آن از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲٪ با ولتاژ ۱۲۰ ولت بمدت ۲۰ دقیقه استفاده شد (۱).

واکنش نسخه‌برداری معکوس

رشته اول cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MuLV در واکنش‌های ۲۰ میکرولیتری با ترکیب ۰/۴ میکروگرم RNA کل نمونه‌های گیاهی، ۱۰۰ پیکومول

Archive of SID

www.SID.ir

OligodT، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix، ۰/۵ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۲۰۰ واحد آنزیم M-MuLV و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه ساخته شد. دناتوراسیون RNA در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه، بسط در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد بمدت ۷۰ دقیقه، و غیر فعال شدن آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت (۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر بیومترا مدل T-gradiant انجام شد. مقدار ۲ میکرولیتر از مخلوط واکنش ساخت رشته اول cDNA به هر واکنش PCR وارد شد. برای آنکه شدت باند تکثیر شده در هر واکنش PCR متناسب با مقدار DNAی الگوی وارد شده به واکنش باشد، این واکنشها قبل از پایان مرحله تصاعدی تکثیر (سیکل ۲۵) خاتمه داده شدند. در هر واکنش از ترکیب ۲ میکرولیتر محصول رشته اول cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ X، ۱/۲۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳ دقیقه برای سیکل اول و در سیکل‌های دوم به بعد بمدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد برای یوبی‌کوئیتین و ۵۶ درجه سانتیگراد برای CEL I بمدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه و در سیکل آخر بمدت ۶ دقیقه انجام شد. محصولات PCR تکثیر اختصاصی قطعات DNA موردنظر در ژل آگاروز ۱/۲٪ و بافر TBE ۰/۵ X، با ولتاژ ۸۰ ولت بمدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. قطعات DNAی تفکیک شده در ژل آگاروز در محلول اتیدیوم بروماید ۵۰ میلی مولار رنگ‌آمیزی شده و در دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه باندهای تکثیر شده، بر اساس نشانگر اندازه ۱ کیلوبازی (GeneRuller 1 kb DNA ladder) تخمین زده شد.

متوازن‌کردن مقدار RNA وارد شده به واکنش‌ها

برای آنکه بتوان شدت باند تکثیر شده در هر واکنش را ملاک مقایسه بین نمونه‌ها قرار داد، بایستی مقدار RNAی کل وارد شده به تمام واکنش‌ها یکسان باشد. بدین منظور از متوازن‌کردن باند یوبی‌کوئیتین استفاده می‌شود. واکنش‌های مکرر PCR برای تکثیر قطعه‌ای از cDNAی کدکننده پروتئین عمومی یوبی‌کوئیتین همراه با رقیق‌سازی مکرر استوک cDNA هر نمونه در هر سری PCR انجام می‌شود. این سری واکنش‌ها ادامه می یابد تا در نهایت به غلظت‌هایی از استوکهای cDNA برسیم که در صورت وارد کردن مقادیر مساوی از cDNA هر نمونه با غلظت تهیه شده به واکنشهای PCR مجزا در شرایط یکسان، باند تکثیر شده یوبی‌کوئیتین آنها همسان شود (۷). پس از ساخت رشته اول cDNA، مقادیر ۲ میکرولیتری از هر نمونه به واکنشهای PCR وارد شد. پس از الکتروفورز نتایج، نمونه‌ای که ضعیف‌ترین باند قابل مشاهده را نشان داد، بعنوان شاخص در نظر گرفته شد. در سری‌های متوالی واکنش‌های PCR، استوک‌های cDNAی نمونه‌ها به تناسب شاخص با رقیق‌سازیهای مکرر به غلظت‌هایی رسیدند که با وارد کردن مقادیر مساوی از آنها در آخرین سری PCR، باندهای تکثیر شده یوبی‌کوئیتین در تمام نمونه‌ها از غلظت چشمی یکسان برخوردار گردیدند.

نتایج و بحث

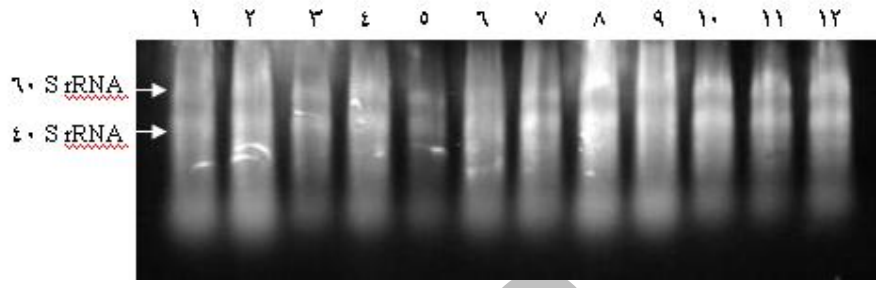
استخراج RNA

نتایج استخراج RNAی کل ۱۲ نمونه گیاهی که در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شده است در تصویر ۱ نشان

Archive of SID

www.SID.ir

داده شده است، حضور دو باند قوی RNAی ریبوزومی S ۶۰ و S ۴۰ یوکاریوتی مبین استخراج موفق RNA از نمونه‌های گیاهی مورد آزمایش می باشد.



تصویر ۱- استخراج RNAی کل از ۱۲ نمونه گیاهی، (۱) شوید، (۲) جعفری، (۳) رازیانه، (۴) گشنیز، (۵) هویج، (۶) کرفس نمونه شرکت خاک، (۷) کرفس LSB، (۸) کرفس BPR، (۹) کرفس نمونه مشهد، (۱۰) کرفس سلبریتی، (۱۱) کرفس GSB، (۱۲) کرفس ویکتوریا.

موازنه باند cDNA استاندارد یوبی کوئیتین

تصویر ۲- الف، باندهای یوبی‌کوئیتین تکثیریافته در واکنش‌های PCR با مقادیر مساوی از غلظت‌های نهایی cDNAی هفت رقم کرفس را نشان می‌دهد که پس از ۲۵ چرخه PCR، توازن مقداری آنها مشهود است. تصاویر ۳- الف و ۳- ب، این موضوع را در مقایسه ۵ گونه گیاهی مورد آزمایش نشان می‌دهد. پروتئین یوبی‌کوئیتین بعنوان یک پروتئین خانه‌دار در سلول شناخته می‌شود که mRNAی کد کننده آن در سلولهای بافتها و اندامهای مختلف در بین موجودات یک رده سهم تقریبا یکسانی از mRNAی کل سلول را به خود اختصاص داده است و از طرفی غلظت کل تک رشته cDNA در واکنش نسخه‌برداری معکوس برابر با غلظت کل mRNAی وارد شده به واکنش است. بنابراین با وارد ساختن غلظت‌هایی از cDNAی نمونه‌های مختلف به واکنشهای PCR که باند یوبی‌کوئیتین آنها یکسان شود، در حقیقت مقادیر مساوی از mRNAی کل به هر واکنش وارد شده است.

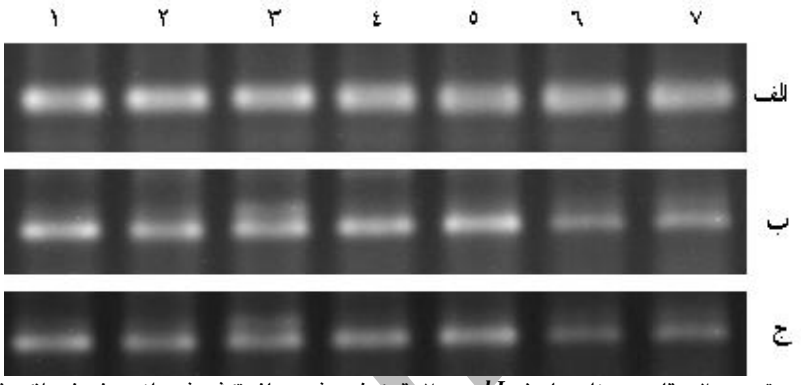
مقایسه بیان ژن *cel I* در ارقام مختلف کرفس

در صورتیکه مقادیر مساوی از cDNAی کل نمونه‌های مختلف (از استوک‌هایی با غلظت یکسان) به واکنشهای مقایسه‌ای PCR برای تکثیر قطعه‌ای از cDNAی ژن موردنظر وارد شود، می‌توان غلظت باند تکثیر شده در هر نمونه را بعنوان شاخص میزان بیان ژن مورد مطالعه در نظر گرفت. نمونه‌ای که باند تکثیر شده قوی‌تری را نشان می‌دهد، سهم نسبی cDNAی موردنظر در cDNAی کل آن بیشتر است که این تناسب را بطور مستقیم می‌توان به غلظت mRNA نسبت داد (۱۰). پس از همسانه‌سازی غلظت cDNA کل نمونه‌ها بر اساس غلظت یوبی‌کوئیتین، مقادیر ۲ میکرولیتری از cDNAی هر نمونه به واکنش PCR در حضور آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر قطعه‌ای از cDNAی آنزیم CEL I وارد شد. تصاویر ۲- ب و ۲- ج، مبین غلظت تقریبا یکسان mRNAی آنزیم CEL I در اکثر نمونه‌های مربوط به ارقام مختلف کرفس است. با اینحال دو رقم GSB و ویکتوریا بیان کمتری نسبت به ۵ رقم دیگر نشان می‌دهند. بنابراین تفاوت بیان ژن *cel I* در بین ارقام مختلف کرفس مشهود است، اما با توجه به اینکه هیچیک از ارقام بررسی شده بیان بیشتری را نسبت به سایرین نشان نمی‌دهد و میزان بیان ژن *cel I* در اکثر نمونه‌ها مشابه است، بنظر می‌رسد که نتوان رقم کاملا شاخصی را از این میان

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب کرد. معذالک می‌توان مجموعه‌ای از ارقام را بعنوان ارقام بهتر کرفس برای استخراج آنزیم CEL I معرفی نمود که دو نمونه کرفس بومی ایران نیز در این مجموعه قرار می‌گیرند.



تصویر ۲- مقایسه میزان بیان ژن *cel I* در ۷ رقم کرفس؛ شدت باند تکثیر شده از هر نمونه ملاک مقایسه نمونه‌ها می باشد. الف) توازن باند تکثیر یافته یوبی‌کوئیتین پس از ۲۵ چرخه PCR در غلظتهای وارد شده از هر نمونه به واکنشهای مقایسه، ب) باند تکثیر شده cDNA آنزیم CEL I از هر نمونه در شرایط یکسان پس از ۳۰ چرخه PCR، ج) باند تکثیر شده cDNA آنزیم CEL I از هر نمونه در شرایط یکسان پس از ۲۵ چرخه PCR. ۱) نمونه شرکت خاک، ۲) رقم LSB، ۳) رقم BPR، ۴) نمونه بومی مشهد، ۵) رقم سلبریتی، ۶) رقم GSB، ۷) رقم ویکتوریا.

مقایسه بیان ژن *cel I* در گونه‌های مختلف

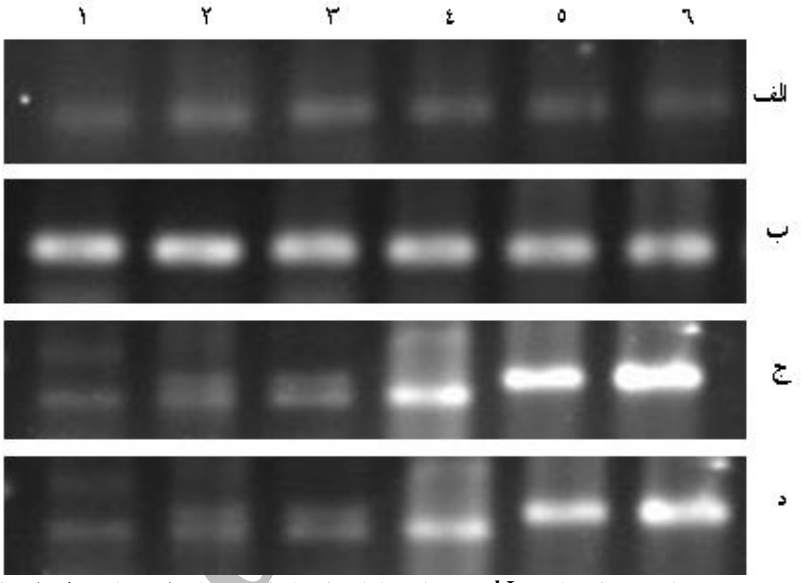
پس از مشخص شدن این نکته که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین اکثر ارقام مختلف کرفس از نظر بیان ژن *cel I* مشاهده نمی‌شود، رقم لاتوم سلف بلانچینگ به آزمایشات مقایسه با ارقام انتخاب شده از گیاهان خانواده کرفس شامل شوید، گشنیز، جعفری، هویج و رازیانه وارد شد. در این سری آزمایشات نیز ابتدا غلظت cDNAی کل نمونه‌ها با استفاده از واکنشهای PCR با آغازگرهای یوبی‌کوئیتین همسانه شد (تصاویر ۳- الف و ۳- ب) و سپس غلظت cDNAی آنزیم CEL I در نمونه‌های مورد آزمایش مقایسه گردید. چنانچه تصاویر ۳- ج و ۳- د نشان می‌دهند، تکثیر باندهایی با شدت و غلظت متفاوت مبین این امر است که بیان ژن *cel I* در گونه‌های مختلف متفاوت می باشد. بنابراین اگرچه ژن و به تبع آن mRNAی کد کننده آنزیم CEL I در اکثر ارقام کرفس با شدت تقریبا یکسانی تظاهر می یابد، لیکن این تظاهر در گونه‌های مختلف بطور بارزی متفاوت است. چنانچه مشاهده می‌شود میزان تظاهر آنزیم CEL I در گیاه شوید و به نسبت کمتر از آن در گونه رازیانه بسیار بارز و قابل توجه است، بطوریکه بیان ژن *cel I* در سطح RNA در دو گیاه شوید و رازیانه بترتیب با شدت تقریبا چهار برابر و دو برابر نسبت به کرفس که منبع اصلی شناخته شده برای این آنزیم است مشاهده می‌شود. درحالیکه تظاهر این آنزیم در سطح RNA در گیاه کرفس نسبت به سه گونه هویج، جعفری، و گشنیز بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است.

نکته دیگری که بر اساس نتایج قابل ذکر است این است که چنانچه تصاویر ۳- ج و ۳- د نشان می‌دهند، باند ۴۴۰ کیلوبازی مورد انتظار برای تکثیر در واکنشهای PCR با آغازگرهای اختصاصی CEL I که بر اساس mRNAی کد کننده این آنزیم در گیاه کرفس طراحی شده‌اند، در تمام گونه‌های مورد آزمایش تکثیر شده است. با توجه به اینکه واکنشهای PCR در شرایط یکسان و همگی با دمای اتصال آغازگر ۵۶ درجه سانتیگراد انجام شده است، این امر می‌تواند مبین همولوژی زیاد mRNAی کد کننده این آنزیم و حفاظت توالی ژن آن در گونه‌های مختلف گیاهی باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

با اینحال، انحراف اندک جایگاه الکتروفورزی باندهای تکثیر یافته مربوط به گونه‌های مختلف با چشم‌پوشی از خطای الکتروفورز می‌تواند حاکی از اختلاف اندازه mRNAی کد کننده این آنزیم و وجود ایزوآنزیمهای آن در گونه‌های مختلف باشد.



تصویر ۳- مقایسه میزان بیان ژن *cel I* در ۶ گونه گیاهی از خانواده چتریان؛ شدت باند تکثیر شده از هر نمونه ملاک مقایسه نمونه‌ها می‌باشد. الف) توازن باند تکثیر یافته یوبی‌کوئیتین پس از ۱۸ چرخه PCR در غلظتهای وارد شده از هر نمونه به واکنشهای مقایسه، ب) توازن باند تکثیر یافته یوبی‌کوئیتین پس از ۲۵ چرخه PCR در غلظتهای وارد شده از هر نمونه به واکنشهای مقایسه، ج) باند تکثیر شده cDNA آنزیم CEL I از هر نمونه در شرایط یکسان پس از ۳۰ چرخه PCR، د) باند تکثیر شده cDNA آنزیم CEL I از هر نمونه در شرایط یکسان پس از ۲۵ چرخه PCR. ۱) هویج، ۲) جعفری، ۳) گشنیز، ۴) کرفس رقم LSB، ۵) رازیانه، ۶) شوید.

نتایج این آزمایش ایده‌های ارزشمندی را در مورد آنزیم CEL I بدست می‌دهد. نخست آنکه آیا تفاوت بیان CEL I در گونه‌های مختلف که در سطح RNA مشاهده شده است، در سطح پروتئین نیز نمود می یابد؟ پاسخ این سئوال در گرو انجام آزمایشات مقایسه‌ای در سطح پروتئین با استفاده از تکنیکهای معتبر نظیر لکه‌گذاری وسترن است که لازمه آن در دسترس بودن آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌باشد. ابهام دیگر در رابطه با اختلاف توالی کد کننده آنزیم در گونه‌های مختلف است که در آزمایشات تعیین توالی قابل بررسی خواهد بود. سرانجام با توجه به آنکه هدف نهایی این پروژه شناسایی یک منبع گیاهی برتر برای تولید آنزیم CEL I اندوژن می باشد، در صورتیکه آنزیم یا ایزوآنزیم CEL I در سطح پروتئین نیز در دو گیاه شوید و رازیانه بیشتر از گیاه کرفس بروز یابد و فعالیت آنزیمی CEL I در سطح قابل مقایسه با عصاره خام گیاه کرفس در عصاره خام این گیاهان نیز مشاهده شود، هر یک از این دو گیاه می‌تواند منبع مولد بهتری برای تولید آنزیم اندوژن CEL I باشد. این موارد تحت بررسی و تحقیق می‌باشند.

قدردانی

از حمایت‌های فکری گروه تحقیقاتی پروفسور دیوید هورنبی، دانشگاه شفیلد انگلستان قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. Asif, M.H., Dhavan, P. and Pravendra, N. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 109-115.

۲. Bahrami, A.R., Matin, M.M. and Andrews, P. 2005. The CDK inhibitor p27 enhances neural differentiation in pluripotent NTERA2 human EC cells, but does not permit differentiation of 2102Ep nullipotent human EC cells. Mechanisms of Development, 122: 1034-1042.

۳. Gupta, P.K., Roy, J.K. and Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. Current Science, 80(4): 524-534.

۴. Henikoff, S., Till, B.J. and Comai, L. 2004. TILLING, traditional mutagenesis meets functional genomics. Plant Physiology, 135: 630-636.

۵. Henikoff, S. and Comai, L. 2003. Single nucleotide mutations for plant functional genomes. Annual Reviews in Plant Biology, 54: 375-401.

۶. McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. and Henikoff, S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiology, 123: 439- 442.

۷. Nebenfuhr, A. and Lomax, T.L. 1998. Multiplex titration RT-PCR: rapid determination of gene expression patterns for a large number of genes. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 323-339.

۸. Nickerson, D.A., Tobe, V.O. and Taylor, S.L. 1997. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. Nucleic Acids Research, 25(14): 2745-2751.

۹. Oleykowski, C.A., Mullins, C.R.B., Godwin, A.K. and Yeung, A.T. 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease. Nucleic Acids Research, 26: 4597-4602.

۱۰. Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Aeschbacher, R.A. and Boller, T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. Molecular Plant Microbe Interaction, 13(7): 763-777.

۱۱. Till, B.J., Bortner, C., Comai, L. and Henikoff, S. 2004. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. Nucleic Acids Research, 32(8): 2632-2641.

۱۲. Yang, B., Wen, X., Kodali, N.S., Oleykowski, C.A., Miller, C.G., Kulinski, J., Besack, D. and Yeung, A.T. 2000. Purification, cloning and characterization of the CEL I nuclease. Biochemistry, 39: 3533-3541.

۱۳. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R. and Day, I.N.M. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Research, 29(17): 1-8.

Archive of SID

www.SID.ir

The comparison of *cel I* endonuclease gene expression in some Apiaceae plants using semi-quantitative RT-PCR

A.R. Bahrami - M. Moghaddam Matin - M. Ghabooli[1] M. Farsi - [*]- J. Zolala

Abstract

The CEL I enzyme, a technical glycoprotein associated with the S1 family of endonucleases, is the first eukaryotic nuclease known for cleaving DNA with high specificity at sites of base–substitution mismatch and DNA distortion. CEL I assay is a highly sensitive method for detecting both polymorphisms and disease-causing mutations in DNA molecules, with a wide range of applications to research and medical genetics. So far, this enzyme has been produced in native form by isolating it from celery tissues according to Yang *et al*., 2000, but it appears to be a complex and expensive method for obtain this valuable enzyme. In this research, with the aim of improving the efficiency of enzyme isolation, we are seeking the best CEL I producing cultivar of celery or a plant source better than celery to produce the enzyme. The expression of CEL I RNA was compared in some plants belong to the Apiaceae family using semi-quantitative RT-PCR. The expression levels of the *cel I* gene were investigated in 12 plants including 7 cultivars of celery and five of its relative species from the Apiaceae famuly. The differentiall expression of the *cel I* gene was observed in both different celery cultivars and the plant species. Although 5 celery cultivars showed the same expression level, 2 cultivars, GSB and Victoria, showed a some lower expression. Differentially expression of *cel I* gene was more obvious among different Apiaceae family plants where *Anethum graveolens* and *Foeniculum vulgare*, showed considerably higher levels of *cel I* gene expression than celery.

Key words: Semi-quantitative RT-PCR, CEL I enzyme, Differential gene expression, Apiaceae

Archive of SID

*. Corresponding author Email: jafar zolala@yahoo.com
1 . Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad

www.SID.ir