فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.14593.1362
Archive of SID

کاربرد سیستم الکتروفورز ژل عمودی پلی‌اکریل‌آمید بهینه و مقرون‌به‌صرفه با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آفتابگردان با استفاده از نشانگر مولکولی TRAP

Application of a High-throughput Polyacrylamide Electrophoresis Gel System with Ethidium Bromide Staining in Genetic Diversity Estimation of Sunflower Genotypes Using TRAP Markers

حسین زینل‌زاده تبریزی[۱*] و آرش حسین‌پور[۱]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۸

چکیده

در این پژوهش کاربرد روش جدید الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آفتابگردان با استفاده از نشانگر مولکولی نوین TRAP ارائه‌شده که نسبت به روش‌های متداول رنگ‌آمیزی نقره و نشان‌دار کردن آغازگرها با فلورسنت، دارای مزیت‌هایی همچون مقرون‌به‌صرفه بودن، سرعت بالای تجزیه، تجزیه تعداد زیادی نمونه در واحد زمان (۱۹۶ × ۲) در هر آزمایش و هم‌چنین استفاده مجدد از ژل‌ها می‌باشد. ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی نشانگر مولکولی TRAP به‌کاررفته توسط این روش الکتروفورز ۱۹ ترکیب نشانگری ایجاد کردند که از میان ۱۱۶ نوار ایجادشده توسط نشانگر TRAP، ۱۰۹ تای آن‌ها چندشکل بودند. میانگین تعداد نوارهای چندشکل ۵/۷۹ بود. اندازه قطعات آشکارشده بین ۲۵-۹۲۰ جفت باز بود. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) این نشانگر بین ۰/۰۳ و ۰/۵۰ با میانگین ۰/۳۳ بود. ترکیب نشانگری (MAX3BR و Sa12) با محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۴۹ چندشکل‌ترین جایگاه بود. نتایج آزمایش نشان داد که این روش نه‌تنها در آشکارسازی محصولات نشانگرهای ریزماهواره بلکه در سایر نشانگرها مانند TRAP که تعداد زیادی نوار چندشکل تولید می‌کنند می‌تواند بسیار مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، تنوع ژنتیکی، چندشکلی، الکتروفورز

۱. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، اردبیل (مغان)، ایران
*: نویسنده مسوول Email: h.zeinalzadeh@areeo.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اطلاع از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم و روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی می‌تواند به‌عنوان یک ابزار باارزش در به‌نژادی گیاهی موردتوجه قرار گیرد. هم‌اکنون روش‌های بسیاری برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مواد اصلاحی وجود دارد که بر اساس صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی استوار هستند *زینل‌زاده تبریزی* و همکاران (Zeinalzadeh-Tabrizi *et al.*, 2011). آشکارسازی محصولات حاصل از نشانگرهای مولکولی تکثیرشده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌وسیله سیستم‌های الکتروفورز افقی یا عمودی انجام می‌شود. متداول‌ترین سیستم الکتروفورز که در بسیاری از آزمایشگاه‌ها انجام می‌شود الکتروفورز ژل آگارز و پلی‌اکریل‌آمید هستند *نقوی* و همکاران (Naghavi *et al.*, 2005). الکتروفورز ژل آگارز برای جداسازی قطعات اسیدهای نوکلئیک بزرگ‌تر از ۵۰۰ جفت باز استفاده می‌شود و در مقایسه با ژل اکریلامید هزینه کم‌تری دارد و آماده‌سازی آن نیز راحت‌تر است. در مقابل برای تفکیک قطعات اسیدهای نوکلئیک با اندازه کوچک‌تر از ۵۰۰ جفت باز و هم‌چنین پروتئین‌ها از ژل اکریلامید استفاده می‌شود.

الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید در کنار داشتن مزیت‌هایی مانند وضوح بالا و قدرت تفکیک زیاد نسبت به ژل‌های آگارز، دارای معایبی همچون زمان‌بر بودن تهیه آن‌ها و هم‌چنین رنگ‌آمیزی دشوار و پرهزینه می‌باشند. از طرف دیگر در بسیاری از تجزیه‌های مولکولی نظیر نشانگرهای مولکولی و انگشت‌نگاری ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، زیاد بودن افراد و نمونه‌های مورد آزمایش باعث دشواری کار و صرف هزینه ساخت ژل‌های متعدد و هم‌چنین صرف زمان زیاد برای انجام آزمایش می‌شوند. به‌طور خلاصه دشواری استفاده از ژل‌های اکریلامید را می‌توان در مواردی همچون هزینه بالای ساخت ژل، زمان طولانی، رنگ‌آمیزی نقره (سمی و زمان‌بر)، تعداد نمونه‌های کمتر در مقایسه با ژل‌های آگارز (حداکثر ۴۹ نمونه در هر ژل) و منبع تغذیه مخصوص خلاصه کرد. از طرف دیگر مرور منابع علمی نشان می‌دهد که این روش بهینه و مقرون به‌صرفه تاکنون برای محققان داخل کشور پوشیده مانده است.

در پژوهش حاضر به دستگاه الکتروفورز ژل عمودی اکریلامید معرفی شده توسط *وانگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2003) جهت استفاده در نشانگرهای مولکولی مانند ریزماهواره‌ها پرداخته شده است. محققان مذکور این سیستم را برای تجزیه ریزماهواره‌ها در گندم معرفی کرده‌اند اما در پژوهش حاضر، علاوه‌بر کارآیی نشانگر ریزماهواره، نشانگر TRAP نیز موردبررسی و بحث قرار گرفته شده است. نشانگر مولکولی جدید TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) برای اولین بار در آفتابگردان در سال ۲۰۰۳ توسط *هو و ویک* (Hu and Vick, 2003) مورداستفاده قرار گرفت. در این نشانگر از توالی‌های بیان شده برچسب‌دار (EST) از پروژه ژنوم *Compositae* برای آفتابگردان استفاده می‌شود. در این نشانگر از یک آغازگر ثابت طراحی شده برای توالی بیان شده برچسب‌دار و یک آغازگر تصادفی برای ایجاد نشانگر چندشکل استفاده می‌شود. این نشانگر بین ۳۰-۵۰ قطعه چندشکل ایجاد می‌کند و به این دلیل جزو نشانگرهای با درجه چندشکلی بالا به‌شمار می‌رود (*هو و ویک*، 2003). باوجود معرفی این نشانگر در سال ۲۰۰۳، اولین گزارش استفاده از این نشانگر با سیستم الکتروفورز بهینه و مقرون به‌صرفه در گیاه آفتابگردان توسط *زینل‌زاده تبریزی* و همکاران (Zeinalzadeh-Tabrizi *et al.*, 2015a) در کشور ارائه شده است. هدف از این پژوهش معرفی ویژگی‌های سیستم بهینه و مقرون به‌صرفه الکتروفورز ژل عمودی پلی‌اکریل‌آمید با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و هم‌چنین کاربرد آن در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آفتابگردان با استفاده از نشانگر مولکولی TRAP بود.

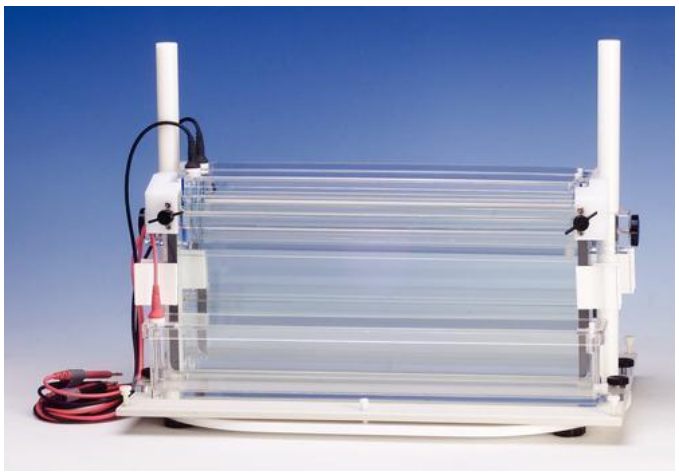
مواد و روش‌ها

ویژگی‌های دستگاه

دستگاه ژل عمودی اکریلامید ساخت شرکت (C.B.S Scientific Co. Del Mar, CA) به‌نام MEGA-GEL High Throughput Vertical Unit مدل (model C-DASG-400-50) شناخته می‌شود (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: نمای کلی دستگاه ژل الکتروفورز پلی‌اکریلامید با کارآیی بالا
Fig. 1: Overview of high-throughput electrophoresis polyacrylamide gel system

این دستگاه دارای دو ژل عمودی هم‌زمان با پایه چرخنده (برای دسترسی به هر دو ژل) است که می‌تواند هم‌زمان ۲۰۰ نمونه (۹۶ نمونه در هر طرف و ۴ جایگاه نشانگر وزنی) را هم‌زمان تجزیه کند. دو ژل می‌توانند به‌صورت مجزا یا هم‌زمان اجرا شوند. ژل‌ها در بین دو شیشه با طول ۵۰ و عرض ۲۲ سانتی‌متر و به ضخامت ۱/۵ میلی‌متر جای می‌گیرند. شیشه پشتی (دارای لبه‌های منحنی شکل) به‌صورت پشت‌نما ساخته شده که نور ماوراءبنفش را از خود عبور داده و برای عکس‌برداری از ژل بدون جداکردن آن از ساندویچ ژل به‌کار می‌رود. هر ژل دارای ۱۰۰ عدد چاهک می‌باشد که تمام ۹۶ نمونه حاصل از دستگاه PCR به‌همراه ۴ عدد نشانگر وزنی می‌تواند در هر ژل بارگذاری شود.

روش کار

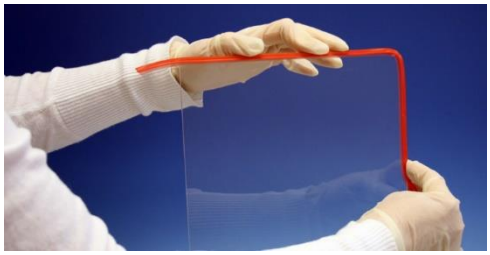
ژل اکریلامید معرفی شده در این روش بین دو شیشه که توسط دو جداکننده عمودی و یک جداکننده افقی در بین شیشه‌ها قرار می‌گیرند، ریخته می‌شود (شکل ۲).

برای جلوگیری از نشت ژل ریخته شده، از نوار ضدنشت همراه دستگاه استفاده شد (شکل ۲، ۳، ۴ و ۵). بعد از سوارکردن ساندویچ ژل و قراردادن جداکننده‌ها، از شش عدد گیره برای محکم نگه داشتن ساندویچ ژل و جلوگیری از نشت ژل تازه ریخته شده استفاده شد (شکل ۶ و ۷). در حالت کلی روش نصب ساندویچ ژل همانند سایر دستگاه‌های الکتروفورز پلی‌اکریلامید هست. برای تمیزکردن شیشه‌ها از پاک‌کننده‌های خانگی و آب مقطر استفاده شد. بعد از سوارکردن ساندویچ ژل می‌توان آن‌را به‌صورت ایستاده روی پایه‌های گیره جهت ریختن ژل قرار داد (شکل ۸).

شکل ۲: نحوه بستن نوار ضدنشت
Fig. 2: Gel casting using gel wrapgasket casting

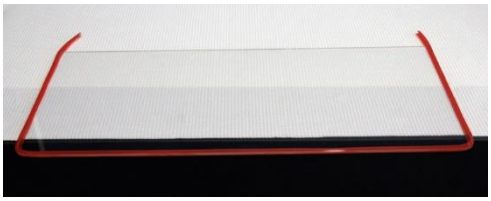
www.SID.ir

Archive of SID



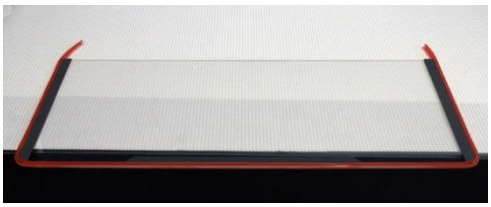
شکل ۳: نحوه بستن نوار ضدنشت

Fig. 3: Gel casting using gel wrapgasket casting



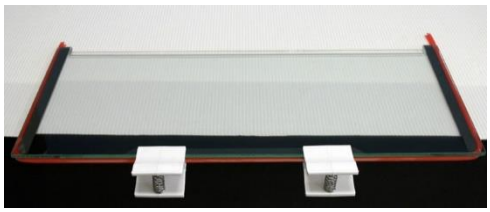
شکل ۴: شیشه پشت‌نما با نوار ضدنشت بسته شده که در هنگام عکس‌برداری از ژل در پایین قرار می‌گیرد

Fig. 4: Transparent glass is closed with a tape that is placed at the bottom when shooting the gel



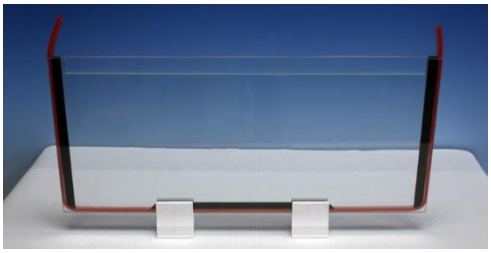
شکل ۵: قرارگیری جداکننده‌های عمودی در دو طرف و جداکننده افقی در پایین ساندویچ ژل

Fig. 5: Placing the spacers alongside the inside edges of the gasket



شکل ۶: بستن گیره‌ها جهت نگهداری ساندویچ ژل

Fig. 6: Placing the notched plate on top of the bottom assembly

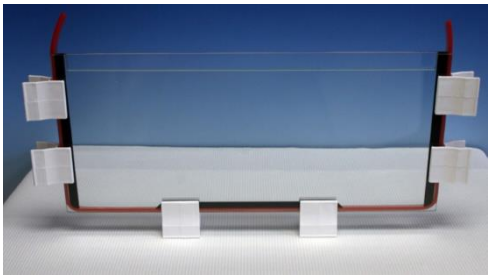


شکل ۷: قراردادن ساندویچ ژل به‌صورت عمودی

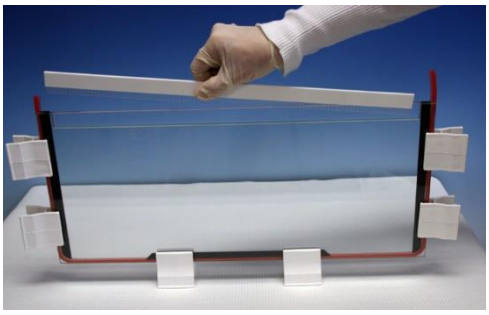
Fig. 7: Lifting the assembly and stand it on the base of the clamps

www.SID.ir

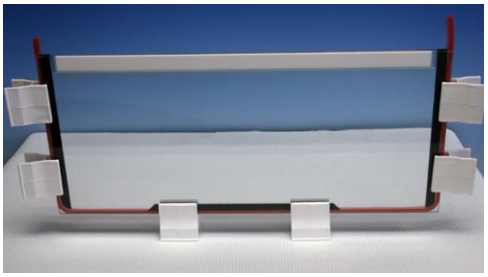
Archive of SID



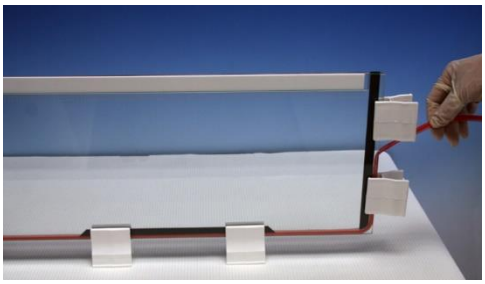
شکل ۸: بستن همه گیره‌ها
Fig. 8: Clamping the sides of the assembly



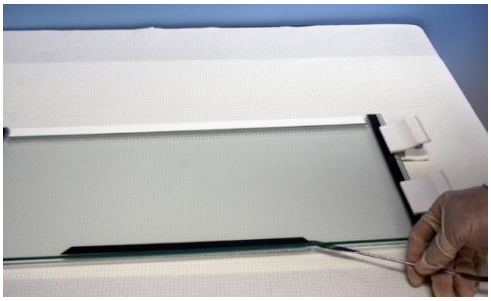
شکل ۹: قراردادن شانه بعد بلافاصله بعد از ریختن مواد ژل
Fig. 9: Leaving the comb in the plate sandwich until just before sample loading



شکل ۱۰: ژل در حال پلیمریزاسیون
Fig. 10: Gel polymerization



شکل ۱۱: جداکردن نوار ضدنشت و گیره‌ها بعد از پلیمریزاسیون ژل
Fig. 11: Disassembling clamping and gel wrapgasket casting after gel polymerization



شکل ۱۲: برداشتن جداکننده‌افقی
Fig. 12: Removing bottom spacer

www.SID.ir

Archive of SID

حدود ۱۸۰ میلی‌لیتر از بافر ژل برای ریختن هر سمت ژل موردنیاز است. غلظت نهایی ژل اکریلامید ۶ درصد (۱۹:۱) به همراه بافر TBE ۰/۵ درصد، آمونیوم پرسولفات ۰/۰۷ و TEMED ۰/۰۸ درصد می‌باشد. بعد از این‌که آمونیوم پرسولفات و TEMED به مخلوط ژل اضافه شدند بایستی بلافاصله مخلوط شده و در بین دوشیشه ساندویچ ریخته شوند. سپس شانه ۱۰۰ تایی در بالای ساندویچ قرار داده می‌شود و از دو گیره دیگر برای نگه‌داشتن آن استفاده می‌شود (شکل ۷، ۸ و ۹). برای پلیمریزاسیون ژل حدود ۴۰ دقیقه زمان در دمای اتاق موردنیاز است (شکل ۱۰).

پس از پلیمریزه‌شدن ژل، نوار ضدنشت به‌همراه گیره‌ها باز شده، جداکننده افقی برداشته شده و ساندویچ ژل در دستگاه قرار داده می‌شود (شکل ۱۱ و ۱۲). شانه ژل می‌تواند تا زمان قرارگیری نمونه‌ها در داخل ژل باقی بماند. هر طرف ژل با حدود ۱ لیتر از بافر TBE ۰/۵ درصد که برای هر کدام از تانک‌های بالا و پایین دستگاه ریخته می‌شود قابل اجرا هست. در این مرحله می‌توان ژل را تا دو روز نگه‌داری کرد. درست قبل از شروع الکتروفورز، ۵۰ میکرولیتر اتیدیوم‌بروماید به تانک پایینی دستگاه برای رنگ‌آمیزی اضافه می‌شود. با توجه به اینکه اتیدیوم‌بروماید در خلاف جهت DNA در دستگاه و از سمت پایین به بالا حرکت می‌کند، در طول الکتروفورز که DNA از سمت بالا به پایین حرکت می‌کند باعث رنگ‌آمیزی قطعات DNA می‌شود. برای یک محصول ۲۵ میکرولیتری PCR می‌توان ۳ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی (بافر بارگذاری) اضافه کرده و ۱۵ میکرولیتر از آن و حداکثر تا ۳۰ میکرولیتر را روی ژل بارگذاری نمود. الکتروفورز می‌تواند در ولتاژ ۳۵۰ و مدت زمان ۱ الی ۲ ساعت انجام شود. برای خنک نگه داشتن ژل و جریان هوا در طول الکتروفورز می‌توان از یک پنکه کوچک بین دو طرف ژل استفاده کرد. بعد از انجام الکتروفورز، بدون جداکردن ساندویچ ژل می‌توان عمل عکس‌برداری از ژل را توسط دستگاه UV به حالتی که شیشه پشت نما به سمت پشت (پایین) باشد انجام داد. برای وضوح بهتر عکس ژل می‌توان از فیلترهای زردرنگ مخصوص ضداتیدیوم‌بروماید استفاده کرد.

مواد گیاهی

۶۸ ژنوتیپ موردبررسی در این آزمایش همگی از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی - ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی تهیه شدند که در سال‌های اخیر در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی و تولید هیبریدهای جدید آفتابگردان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ژنوتیپ‌ها شامل ۲۳ لاین پدری برگداننده باروری)، ۳۰ لاین مادری نرعقیم باروری (CMS)، ۸ هیبرید تجاری خارجی، ۳ هیبرید ایرانی و ۴ رقم تجاری آزاد گرده‌افشان خارجی بودند (*زینل‌زاده تبریزی* و همکاران، 2015a).

استخراج DNA

از هر ژنوتیپ تعداد ۱۰ گیاه در شرایط گلخانه کشت شدند. نمونه‌های برگی از برگ‌های جوان ۱۵-۲۰ روزه صورت گرفته و قبل از استخراج در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی به روش بهینه‌سازی شده *زینل‌زاده تبریزی* و همکاران (Zeinalzadeh-Tabrizi *et al.*, 2015b) استخراج شد و در مقدار ۱۵۰میکرولیتر بافر TE (Tris 10mM, EDTA) 1mM; (TE; pH 8.0 حل شد.

انتخاب آغازگرهای TRAP

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی مورد استفاده در تحقیق *هو و ویک* (2003) بود (جدول ۱). بدلیل چندشکلی بسیار بالای نشانگر TRAP که حدود ۳۰-۵۰ ردیف چندشکل از خود نشان می‌دهد تنها از ۱۹ ترکیب آغازگری برای ایجاد نشانگر TRAP استفاده شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ۹۶ تایی (TC9600- MultiGene Gradient Thermal Cycler G-230V, Labnet International, Inc.) در حجم نهایی ۲۰µL شامل ۱µL DNA ژنومی با مقدار ۳۰-۵۰ ng/µL، ۲µL بافر 10X PCR، ۱µL منیزیم کلراید 25 mM $MgCl_2$، ۰/۵µL از 10 mM dNTP، ۰/۵µL 100 pmol از هر آغازگر و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز انجام شد. چرخه‌های دمایی در برنامه Touch down PCR به‌منظور جلوگیری از پدیده پرایمر-دایمر به‌صورت زیر انجام شد: برای واسرشت‌سازی DNA ۱ چرخه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۵ چرخه شامل ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۳۵°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه بعدی شامل ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه بود (*زینل‌زاده تبریزی* و همکاران، 2015a).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای ثابت و تصادفی نشانگر مولکولی TRAP

Table 1: Fixed and arbitrary primers in TRAP marker

نام آغازگر Primer		توالی بیان شده برچسب‌دار (EST) یا شماره بانک ژنی Expressed Sequence Tags or Gene Bank No.	توالی ′3–′5 5′–3 Sequence
آغازگر ثابت Fixed primer	MSP03	Putative male-sterile gene	GTTGCCATGGACATCAACAC
	A11D14F	QHA11D14	GGGGTTCTAAACAAGGTG
	B14G14B	QHB14G14	AATCTCAAGGACAAAAGG
	F15O11F1	QHF15O11	CTGGAGCCAAGACATCTG
	K11F05	QHK11F05	GAACCAAACTGGGGTATGTA
	MAX3BR	AT2G44990	ACGTTATGAGCCCCATGAAGA
آغازگر تصادفی Arbitrary primer	TRAP03	IR-700	CGTAGCGCGTCAATTATG
	Sa12	IR-700	TTCTAGGTAATCCAACAACA
	Sa4	IR-700	TTCTTCTTCCCTGGACACAAA
	TRAP13	IR-800	GCGCGATGATAAATTATC
	Ga3	IR-800	TCATCTCAAACCATCTACAC
	Ga5	IR-800	GGAACCAAACACATGAAGA

واکنش‌های TRAP

با استفاده از ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی و ۱۹ ترکیب آغازگری، ۵ گروه ژنوتیپ‌های آفتابگردان از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. آشکارسازی قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل آکریل‌امید ۶ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید با استفاده از روش *وانگ* و همکاران (2003) و بهینه‌سازی شده برای نشانگر TRAP به‌مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه در ۲۰۰ ولت انجام شد. عکس‌برداری با استفاده از دوربین Nikon Coolpix500 و دستگاه ژل داک (Vilber Lourmat, France) انجام شد.

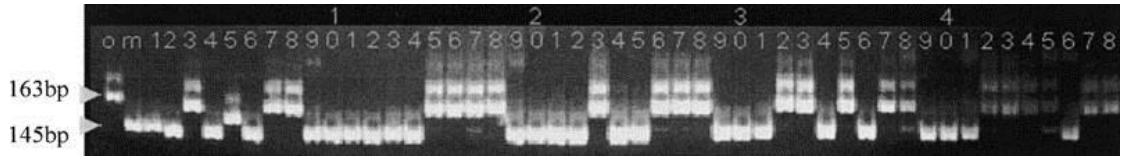
تجزیه داده‌ها

نوارهای حاصل از ۱۹ ترکیب آغازگری به‌صورت صفر (عدم حضور)، ۱ (حضور) و ۹ (عدم تکثیر و یا از دست رفته) نمره‌دهی شدند. تعداد آلل، تعداد آلل چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و درصد چندشکلی هر نشانگر یا ترکیب آغازگری محاسبه شد (جدول ۲).

نتایج و بحث

دستگاه الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید مورداستفاده در این پژوهش می‌تواند تا ۳ جفت باز اختلاف آلل‌های نشانگر ریزماهواره را نشان دهد (*وانگ* و همکاران، 2003). در شکل ۱۳، جداشدن دو آلل نشانگر ریزماهواره Xbarc196 را در ولتاژ ۳۵۰ بعد از ۱/۵ ساعت نشان داده شده است. دو آلل این نشانگر در ۱۸ جفت‌باز اختلاف نشان دادند (بین ۱۴۵ و ۱۶۳ جفت‌باز).

در شکل ۱۴، جداشدن آلل‌های نشانگر Xbarc222 در مکان‌های ۱۸۲ و ۱۸۵ جفت‌باز در ولتاژ ۳۵۰ بعد از ۱/۵ ساعت نشان داده شده است. برای جداشدن آلل‌های نشانگرهایی با ۲ جفت‌باز اختلاف، زمان الکتروفورزی بیشتری موردنیاز است. به‌عنوان مثال در شکل ۱۵، آلل‌های نشانگر Xbarc218 در مکان‌های ۲۱۰ و ۲۱۲ جفت‌باز در ولتاژ ۳۵۰ و پس از ۳ ساعت نشان داده شده است.

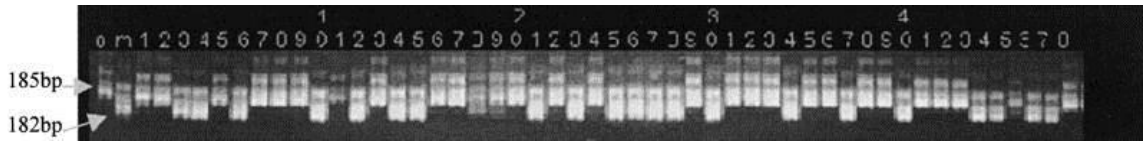


شکل ۱۳: آلل‌های نشانگر ریزماهواره Xbarc196 را در ولتاژ ۳۵۰ بعد از ۱/۵ ساعت (*وانگ* و همکاران، 2003)

Fig. 13: SSR alleles of Xbarc196 in 350 V after 1.5 hours (Wang *et al.*, 2003)

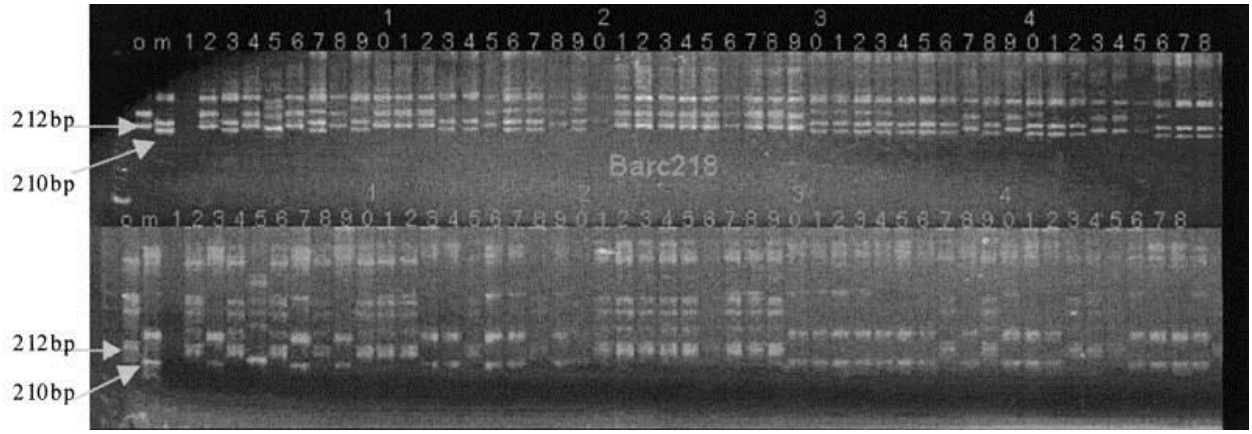
www.SID.ir

Archive of SID



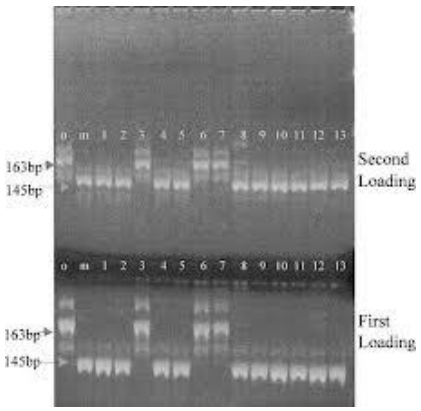
شکل ۱۴: آلل‌های نشانگر ریزماهواره Xbarc222 در مکان‌های ۱۸۲ و ۱۸۵ جفت‌باز در ولتاژ ۳۵۰ بعد از ۱/۵ ساعت (*وانگ* و همکاران، 2003)

Fig. 14: SSR alleles of Xbarc222 with allele sizes of 182 and 185 bp in 350 V after 1.5 hours (Wang *et al.*, 2003)



شکل ۱۵: آلل‌های نشانگر Xbarc218 در مکان‌های ۲۱۰ و ۲۱۲ جفت‌باز. تصویر بالا پس از ۱ ساعت الکتروفورز در ولتاژ ۳۵۰ و تصویر پایین پس از ۳ ساعت در ولتاژ ۳۵۰ (*وانگ* و همکاران، 2003)

Fig. 15: SSR marker Xbarc218 with allele sizes of 210 and 212 bp. The top section of the image was taken after 1 h of electrophoresis at 350 V and the bottom section of the image was taken after 3 h of electrophoresis at 350 V. (Wang *et al.*, 2003)



شکل ۱۶: استفاده از دو سری نمونه برای نشانگر Xbarc196 در بارگذاری ژل (*وانگ* و همکاران، 2003)

Fig. 16: Use of two successive loadings of the same microsatellite sample set using marker Xbarc196 (Wang *et al.*, 2003)

برای افزایش کارآیی دستگاه می‌توان در صورت اطلاع از اندازه نشانگرها و عدم هم‌پوشانی نشانگرهای مختلف، از چندین محصول PCR در یک چاهک مشابه استفاده کرد. هم‌چنین در صورت مشابه بودن مکان‌های آلل‌های نشانگرها می‌توان ابتدا یک نشانگر را اجرا کرده و بعد از عکس‌برداری نشانگر بعدی را روی ژل بارگذاری کرد و بدین ترتیب کارآیی ژل را افزایش داد. در شکل ۱۶، از دو سری نمونه برای نشانگر Xbarc196 استفاده شده است. نخست سری اول نمونه‌ها بارگذاری شد و بعد از ۱/۵ ساعت سری دوم نمونه‌ها بارگذاری شدند. هر دو آلل در هر دو سری از نمونه‌ها به‌خوبی از یکدیگر جدا شدند.

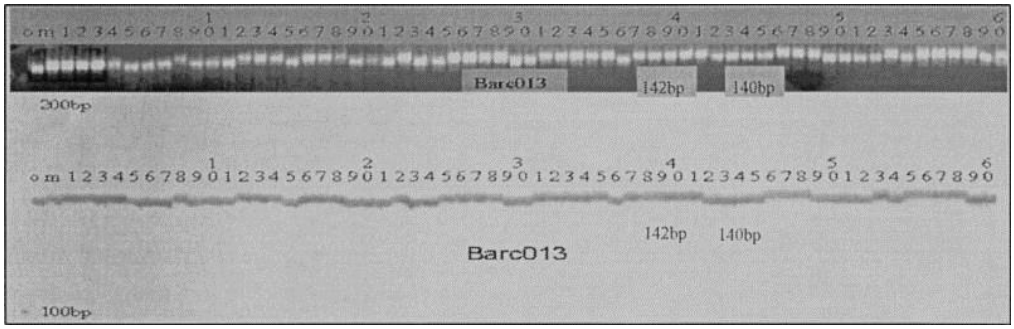
نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که این سیستم الکتروفورزی غیرواسرشت‌شونده در مقایسه با ژل اکریلامید واسرشت‌شونده وضوح بالایی از خود نشان داد. در شکل ۱۷، آلل‌های نشانگر Xbarc013 در مکان‌های ۱۴۰ و ۱۴۲ جفت‌باز در هر دو سیستم (ژل غیرواسرشت‌شونده و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید و ژل واسرشت‌شونده و رنگ‌آمیزی نقره) با هم

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه شده‌اند. این نتایج نشان‌دهنده کارآیی بالای سیستم جدید در مقایسه با سیستم‌های رایج می‌باشد و مناسب برای جداسازی آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره است. این سیستم می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشگاه‌هایی که هم‌اکنون از سیستم ژل واسرشت‌شونده و رنگ‌آمیزی نقره و یا از روش برچسب‌گذاری نشانگرها با فلورسنت استفاده می‌کنند باشد.

هزینه استفاده از روش معرفی شده در این آزمایش در مقایسه با روش‌های متداول دیگر بسیار مناسب و مقرون به‌صرفه است. این روش در مقایسه با روش رنگ‌آمیزی نقره بیش از ۵۰ درصد مقرون به‌صرفه‌تر است. هم‌چنین در روش رنگ‌آمیزی نقره حداکثر ۴۹ نمونه را در هر ژل می‌توان تجزیه نمود در صورتی که در این روش ۱۹۶ نمونه را هم‌زمان می‌توان تجزیه نمود. از طرف دیگر برای ساخت هر ژل واسرشت‌شونده و رنگ‌آمیزی نقره به یک روز کاری نیاز است اما در این روش در عرض حدود سه ساعت می‌توان دو سری ۱۹۶ نمونه را تجزیه کرد. نیاز به واسرشت‌سازی نمونه‌ها بعد از PCR، استفاده از دمای ثابت در اجرا کردن ژل‌های واسرشت‌شونده و هم‌چنین تهیه منبع تغذیه فراهم‌کننده چنین دمایی در کنار راحتی کار و نداشتن چنین مشکلاتی باعث می‌شود که سیستم جدید به سیستم‌های رایج ترجیح داده شود. از طرف دیگر، دراین روش می‌توان هر ژل را تا ۴ بار و هر بافر تانک را تا ۲ بار مورداستفاده قرار داد و بعد اینکه عکس‌برداری از ژل انجام گرفت الکتروفورز را ادامه داد تا جایی‌که نمونه‌ها از ژل خارج شده و وارد تانک پایین شوند و مجدداً از بالا نمونه‌های جدید را بارگذاری کرد.



شکل ۱۷: مقایسه تصویر ژل حاصل از روش نوین بدون واسرشت‌سازی (تصویر بالا) و روش واسرشت‌شونده رنگ‌آمیزی نقره (تصویر پایین) (*وانگ* و همکاران، 2003)

Fig. 17: Comparison of gel images from new nondenaturing system (top) and a denaturing silver staining system (bottom) (Wang *et al.*, 2003)

از زمان معرفی این روش بهینه الکتروفورز در سال ۲۰۰۳، پژوهشگران از این روش در گیاهان مختلف و با نشانگرهای متفاوت استفاده نموده‌اند. به عنوان مثال، *یوشیدا* (2004) در سورگوم با نشانگر SSR، *باراتا و کارنا* (2006) در ذرت با نشانگر SSR، *کادارو* و همکاران (2006) در برنج با نشانگر SNP، *ویگو* و همکاران (2007) در گونه‌های مختلف توت با نشانگرهای SSR و ISSR، *جلین* و همکاران (2007) در لوبیا با نشانگر SSR، *فو* و همکاران (2009) در سیب‌زمینی با نشانگر SSR، *جنووسی* و همکاران (2009) در علف سنت آگوستین با نشانگر EST-SSRs، میر و همکاران (2012) در گندم با نشانگر SSR، *دولینگ* و همکاران (2013) در ارزن با نشانگر EST-SSRs، *کوئزادا* و همکاران (2014) در میوه فیجوآ با نشانگرهای ISSR، AFLP و SSR، *فیوست* و همکاران (2015) در جو با نشانگر DArT-SSRs و *هناره* و همکاران (2016) در گوجه‌فرنگی با نشانگر ISSR از این روش بهینه الکتروفورز استفاده کردند.

کارآیی نشانگر TRAP

در این پژوهش ۶ آغازگر ثابت و ۶ آغازگر تصادفی ۱۹ ترکیب آغازگری ایجاد کردند که همگی الگوی نواری شفاف و قابل نمره‌دهی ایجاد کردند. تمام ترکیبات آغازگری نوار چندشکل ایجاد کردند که ترکیب آغازگری (MAX3BR و Sa12) با PIC ۰/۴۹ چندشکل‌ترین جایگاه بود (جدول ۲). از میان ۱۱۶ نوار ایجاد شده توسط نشانگر TRAP، ۱۰۹ تای آن‌ها چندشکل بود. میانگین تعداد نوارهای چندشکل ۵/۷۹ بود. اندازه قطعات آشکارشده بین ۲۵-۹۲۰ جفت باز بود. محتوای اطلاعات چندشکل این نشانگر بین ۰/۰۳ و ۰/۵۰ با میانگین ۰/۳۳ بود.

نتایج پژوهش حاضر با نشانگر جدید TRAP در گیاه آفتابگردان با استفاده از این روش بهینه نیز در راستای نتایج *وانگ* و همکاران (2003) بود. نشانگر TRAP به‌عنوان یک نشانگر جدید شناخته شده که اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط *هو و ویک* بر روی آفتابگردان با موفقیت انجام شده است. این نشانگر از اطلاعات در این نشانگر از توالی‌های بیان شده

www.SID.ir

Archive of SID

برچسب‌دار (EST) از پروژه ژنوم *Compositae بی‌نام* (Anonymous, 2017) برای آفتابگردان برای تجزیه ژنتیکی افراد استفاده می‌کند. یکی از آغازگرهای این نشانگر که آغازگر ثابت نامیده می‌شود با استفاده از همین توالی‌های بیان شده برچسب‌دار طراحی شده و آغازگر دوم به صورت تصادفی در مقابل آغازگر اول طراحی می‌شود. در گیاهانی مثل آفتابگردان و هم‌چنین سایر گیاهانی که پروژه ژنوم آن‌ها در دست تکمیل بوده و یا تکمیل شده‌اند برای استخراج ردیف توالی‌های بیان شده برچسب‌دار و طراحی آغازگر ثابت این نشانگر استفاده می‌شود. هر نشانگر TRAP می‌تواند بین ۳۰ تا ۵۰ نوار چندشکل تولید کند و از این بابت جزو نشانگرهای بسیار چندشکل و مفید در تجزیه‌های مولکولی نظیر بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (*زینل‌زاده تبریزی* و همکاران، 2015a).

در این بررسی، در تنوع ژنتیکی ۶۸ ژنوتیپ آفتابگردان از روش جدید الکتروفورز ژل عمودی با استفاده رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید استفاده شد (شکل ۱۸). نتایج نشان داد که این روش در مقایسه با روش‌های متداول رنگ‌آمیزی نقره و یا برچسب‌گذاری فلورسنت آغازگرها دارای مزیت‌هایی همچون راحتی کار، هزینه بسیار کمتر و سرعت بالای تجزیه را داراست. با استفاده از این روش می‌توان در هر روز تا ۴ نشانگر با ۱۹۶ نمونه در هر ژل را مورد آزمایش قرار داد. *هناره* و همکاران (2016) در بررسی ۹۳ تیپ بومی گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر ISSR نیز نتیجه مشابهی گرفتند.

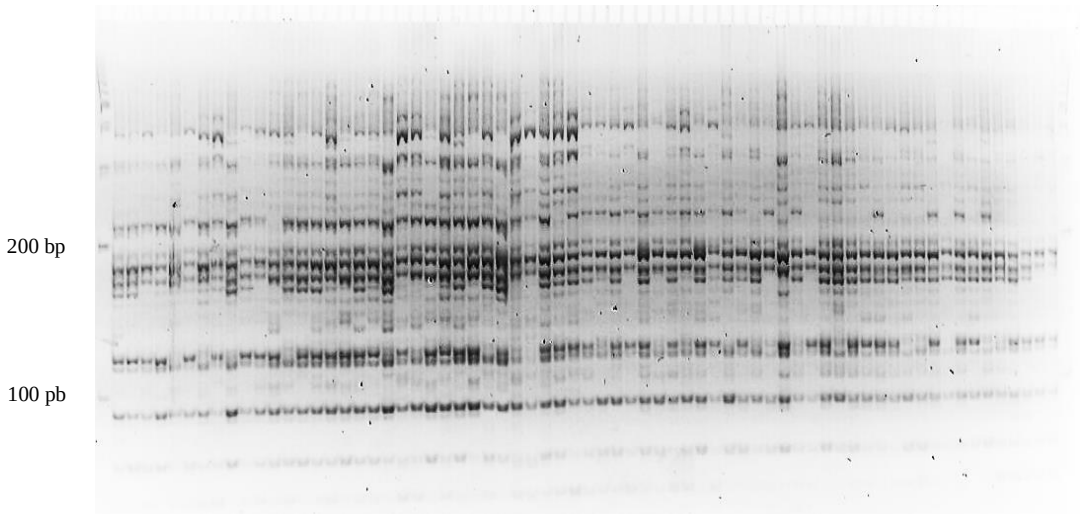
جدول ۲: تعداد آلل، تعداد آلل چندشکل، محتوای PIC و درصد چندشکلی نشانگرهای مورداستفاده

Table 2: Allele number, polymorphic allele number, PIC and polymorphism percentage of used markers

شماره No.	آغازگر ثابت Fixed primer	آغازگر تصادفی Arbitrary primer	تعداد آلل Allele No.	تعداد آلل چندشکل Polymorphic allele No.	محتوی اطلاعات چندشکل PIC	درصد چندشکل Polymorphism percentage
1	MSP03	TRAP03	11	11	0.43	100
2	MSP03	Sa12	5	5	0.42	100
3	MSP03	Sa4	11	11	0.36	100
4	A11D14F	TRAP03	11	10	0.27	90.1
5	A11D14F	Sa12	3	2	0.31	66.7
6	A11D14F	Sa4	5	4	0.39	80
7	B14G14B	Sa4	2	2	0.47	100
8	F15O11F1	TRAP03	8	7	0.22	87.5
9	F15O11F1	Sa12	6	6	0.38	100
10	F15O11F1	Sa4	5	5	0.21	100
11	F15O11F1	TRAP13	8	6	0.25	75
12	K11F05	TRAP03	3	2	0.13	66.7
13	K11F05	Sa12	5	4	0.24	80
14	K11F05	Sa4	5	5	0.21	100
15	K11F05	Ga3	6	6	0.43	100
16	MAX3BR	TRAP03	5	4	0.30	80
17	MAX3BR	Sa12	7	7	0.49	100
18	MAX3BR	Sa4	5	5	0.37	100
19	MAX3BR	Ga5	5	5	0.26	100

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۸: استفاده از آغازگرهای MSP03 به‌عنوان آغازگرثابت و TRAP03 به‌عنوان آغازگرتصادفی در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۸ ژنوتیپ آفتابگردان با استفاده از نشانگر TRAP

Fig. 18: Use of MSP03 marker as a fixed primer and TRAP03 marker as an arbitrary marker in genetic diversity of 68 sunflower genotypes

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که روش جدید الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید نسبت به روش‌های متداول رنگ‌آمیزی نقره و نشاندارکردن آغازگرها با فلورسنت، دارای مزیت‌هایی همچون مقرون به‌صرفه بودن، سرعت بالای تجزیه، تعداد زیاد تجزیه نمونه‌ها در هر ژل، استفاده مجدد از ژل‌ها و اجرا کردن نمونه‌ها در یک ژل می‌باشد. باوجود این‌که سال‌ها از معرفی این روش می‌گذرد، این سیستم برای محققان داخل کشور هنوز ناشناخته مانده است. از طرف دیگر نشان داده شد که این روش نه تنها در نشانگرهای ریزماهواره بلکه در سایر نشانگرها نظیر TRAP که تعداد زیادی نوار چندشکل تولید می‌کنند می‌تواند بسیار مفید واقع شود. در نهایت می‌توان این دستگاه الکتروفورز را برای آزمایشگاه‌های دانشگاهی و مراکز پژوهشی داخل که قصد خرید تجهیزات را دارند معرفی نموده و یا شرکت‌های داخلی که در زمینه تولید دستگاه‌های آزمایشگاهی و به‌خصوص الکتروفورز فعالیت دارند را حمایت و ترغیب به ساختن نمونه داخلی آن نمود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۴-۱۵ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir