مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۸۴-۷۷

شناسایی و همسانه‌سازی ژن داخلی مناسب پنبه در راستای افزایش کارایی بررسی های مولکولی

Identification and Cloning of a Cotton Appropriate Reference Gene for Increasing Efficiency of Molecular Analysis

مسعود توحیدفر*[۱] و سارا دژستان[۲]
Masoud Tohidfar*[1] and Sara Dezhsetan[2]

۱- گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده زیستی و زیست‌فناوری دانشگاه شهید بهشتی
۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

1. Department of Plant Biotechnology, College of Science and Biotech, Shahid Beheshti University, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

ژن داخلی مناسب در بررسی کیفیت DNA ژنوم و آنالیز محصولات تراریخته از اهمیت فراوانی برخوردار است. در این پژوهش، ژن *SadI* به‌عنوان یک ژن داخلی بالقوه در پنبه ارزیابی گردید. ابتدا DNA ژنومی استخراج گردید و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده با نرم‌افزار Vector NTI، واکنش PCR انجام گرفت. محصول واکنش PCR دو قطعه ۶۲۳ و ۵۴۴ جفت‌بازی بود. قطعات موردنظر در پلاسمید pTZ57R/T همسانه شدند. پلاسمیدهای نوترکیب از طریق PCR کلونی با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای M13 شناسایی شدند و در ادامه توالی‌یابی صورت گرفت. نتایج توالی‌یابی نشان داد که این دو قطعه مربوط به نسخه‌های مختلف ژن *Sad1* هستند که در نسخه اول یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه اینترون دوم اتفاق افتاده است. این تحقیق، اولین گزارش از توالی‌یابی ژن داخلی پنبه است که وجود دو نسخه متفاوت ژن *Sad1* را نشان می‌دهد، و تایید می‌کند که آن یک ژن داخلی مناسب در مطالعات مختلف است.

واژه‌های کلیدی

پنبه،
ژن داخلی،
همسانه‌سازی،
بیوانفورماتیک،
ژن *SadI*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

مقدمه

با گسترش چشمگیر زیست‌شناسی مولکولی و توسعه فنون و ابزارهای مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در بیوتکنولوژی، نیاز به توسعه یک روش قوی، کارآمد و قابل‌اعتماد برای ارزیابی این روش‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (Xu *et al.*, 2012). کلیدی‌ترین نکته در انجام واکنش PCR و سایر آنالیزهای مولکولی مانند لکه‌گذاری سادرن کیفیت DNA الگو است. معتبرترین و گسترده‌ترین روش‌های ارزیابی کیفیت اسید نوکلئیک علاوه‌بر NanoDrop، استفاده از ژن داخلی مناسب است (Scholtens *et al.*, 2013). ژن داخلی مناسب علاوه‌بر اینکه در ارزیابی کیفیت DNA الگو نقش دارد در نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن نیز مهم است.

برای تشخیص موجودات تغییریافته ژنتیکی، یک ژن داخلی مرجع به‌عنوان استاندارد برای تایید شناسایی گونه موردنظر و تعیین کیفیت DNA ژنومی کل موردنیاز است. مطالعات مختلفی برای دست‌یابی به ژن داخلی مرجع در گیاهان انجام شده است و چندین ژن داخلی برای گیاهان از جمله ژن‌های *زئین*، *invertase1* و *zssIIb* در ذرت (Zimmermann *et al.*, 1998؛ Hernandez *et al.*, 2004؛ Pan *et al.*, 2006)، *لکتین* و ژن‌های *شوک حرارتی* در سویا (Van Duijn *et al.*, 1999؛ Terry and Harris, 2001)، ژن‌های *BnACCg8*، *ACC*، *cruciferin* یا *HMGI/Y* در کلزا (Hernandez *et al.*, 2001؛ Weng *et al.*, 2005)، *LAT52* و *Mcpi* در گوجه فرنگی (Hernandez *et al.*, 2003؛ Yang *et al.*, 2005b؛ Chhabra and Guleria, 2009) ژن‌های *Oryzain β*، *Gos9*، *ppi-PPF* و *SPS* در برنج (Hernandez *et al.*, 2005؛ Chaouachi *et al.*, 2007)، ژن *Sad1* در پنبه (Yang *et al.*, 2005a)، ژن *SRK* در تیره براسیکا (Randhawa *et al.*, 2008) و ژن *β-fructosidase* در تیره سولاناسه (Chaouachi *et al.*, 2008) شناسایی و به‌کار برده شده است.

تکثیر ژن داخلی و تأیید کیفیت DNA ژنومی به‌عنوان یک کنترل داخلی برای افزایش کارایی PCR و کاهش نتایج منفی کاذب آن ضروری است (Randhawa *et al.*, 2009). در واقع ژن داخلی برای شناسایی دقیق گیاهان تراریخته نیز به‌کار می‌رود. یک ژن داخلی مناسب بایستی مختص گونه بوده و تعداد نسخه کمی در ژنوم داشته باشد و ناهمگنی آن در بین ارقام مختلف همان گونه کم باشد (Yang *et al.*, 2005a). علاوه‌بر این، روش‌های مختلفی از جمله real-time PCR به‌منظور بررسی بیان ژن وجود دارد. با وجود مزایای متعدد، مهمترین مشکل real-time PCR نیاز به نرمال‌سازی داده‌های حاصل توسط یک ژن داخلی مناسب است (Bustin and Nolan, 2004). به‌منظور کمی‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن، می‌توان میزان بیان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان بیان یک ژن داخلی مورد سنجش قرار داد (Bustin, 2000).

در ارزیابی ژنوم پنبه و ردیابی نتاج تراریخته، یک ژن داخلی مناسب نیاز است. سابقاً یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2005a) ژن *Sad1* را به‌عنوان ژن مرجع داخلی پنبه در خانواده *G. hirsutum* موردبررسی و تأیید قرار دادند. ژن *Sad1* دو نسخه در هر ژنوم هاپلوئید پنبه دارد و رمزکننده یک پروتئین غیراشباع حامل اسیل–استرویل است که یک پیوند دوگانه بین کربن ۹ و ۱۰ اسید چرب C18 برای تولید اسید اولئیک غیراشباع ایجاد می‌کند که به نوبه خود میزان چربی غیراشباع غشاء و روغن دانه در گیاه پنبه را تنظیم می‌کند (Yang *et al.*, 2005a). بر اساس آغازگرهای موجود در منابع، اندازه محصول PCR ژن داخلی *Sad1* در حدود ۱۰۷ جفت باز است که گاهی اوقات با آغازگر دایمر اشتباه می‌شود. بنابراین شناسایی ژن داخلی مناسب در پنبه، دارای محصول PCR مطلوب (بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز) که با آغازگر دایمر اشتباه نگردد، از اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

از نمونه‌های برگی گیاهچه‌های جوان در مرحله ۲–۳ برگی DNA ژنومی استخراج شد. نمونه‌های برگی برداشت‌شده درون ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شدند و DNA ژنومی آنها به روش CTAB (Doyle, 1991) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. همچنین کیفیت DNA استخراجی با ژل آگارز ۰/۸ درصد نیز سنجیده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

تکثیر قطعه‌ای از ژن داخلی پنبه (*Sad1*) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (F- 5'GGTATAGGCTGTCTGGTG3' و R – 5'ATCGTGTACGTAGTGGTG3') انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. اجزای واکنش شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۲ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی-مولار)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase، ۱ میکرولیتر DNAی الگو (۲۰۰ نانوگرم) و ۱۰/۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تفکیک محصولات واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت. با استفاده از آغازگرهای *Sad1*، یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مشاهده شد. به‌دلیل کوچک بودن اندازه نوار حاصل و عدم‌امکان تشخیص نوار حاصل از آغازگر دایمر، توالی ژن *Sad1* از پایگاه داده NCBI دریافت و جفت آغازگر جدید (F-5'GTAGTGCTCAAGGTAGGTTC و R-5'GTGGTCTGTCGGATATGG) برای ژن *Sad1* طراحی شد که دو قطعه طویل‌تر تولید گردید. این قطعات از ژل جداسازی، تخلیص (با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل، شرکت Roche) و همسانه‌سازی شدند.

قطعات حاصل از تکثیر ژن *Sad1* در ناقل pTZ57R/T (شرکت فرمنتاز) همسانه شدند. این ناقل از نوع T/A بوده و به افزوده شدن نوکلئوتید آدنین به انتهای محصول PCR که توسط آنزیم *Taq* پلیمراز صورت می‌گیرد، وابسته است. واکنش اتصال و همسانه‌سازی بر اساس دستورالعمل همسانه‌سازی ناقل pTZ57R/T (شرکت فرمنتاز) انجام شد.

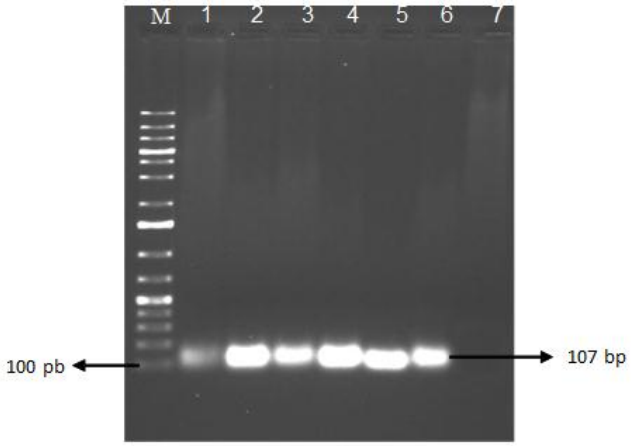
تراریخته‌سازی سلول‌های باکتری *E. coli* با پلاسمید نوترکیب pTZ57R به روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد. برای تشخیص سریع پلاسمید نوترکیب، به‌طور مستقیم از همسانه‌های *E. coli* به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. باکتری‌های دارای پلاسمید نوترکیب در محیط مایع رشد داده شدند و پلاسمید آنها با کیت Core Bio استخراج شد. واکنش PCR روی پلاسمیدهای استخراج‌شده با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهایM13 برای تأیید بیشتر حضور قطعه هدف در پلاسمید pTZ57R/T انجام شد. پس از توالی‌یابی قطعات، توالی‌های اضافی مربوط به ناقل با نرم‌افزار Vector NTI از توالی اصلی حذف شدند. همردیفی توالی‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. همچنین، این دو توالی به‌وسیله نرم‌افزار Vector NTI با هم همردیف شدند و خصوصیات آن‌ها باهم مقایسه گردید.

نتایج

پس از تایید کمیت و کیفیت DNA استخراجی، از ژن داخلی به‌عنوان یک کنترل داخلی برای تأیید مجدد کیفیت DNA ژنومی استفاده می‌شود. با آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی *Sad1* واکنش PCR انجام گرفت. تمامی نمونه‌های DNA استخراج‌شده یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مربوط به ژن داخلی نشان دادند و در نمونه فاقد DNA (آب) هیچ تکثیری صورت نگرفت که نشان-دهنده عدم‌آلودگی واکنش PCR بود (شکل ۱).

به‌دلیل کوچک بودن قطعه تکثیرشده (۱۰۷ جفت بازی) و احتمال اشتباه شدن با آغازگر دایمر، آغازگرهای جدید برای ژن داخلی *Sad1* بر اساس توالی ژن موجود در پایگاه داده NCBI طراحی شدند.

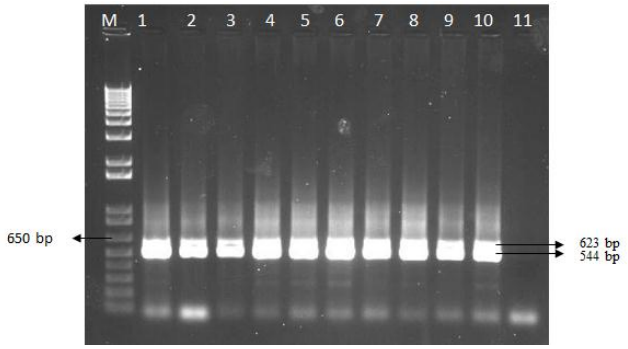
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]



شکل ۱- محصول PCR برای ژن داخلی *SadI* با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ الی ۶ نمونه‌های گیاهی پنبه و چاهک ۷ نمونه فاقد DNA (آب) هستند.

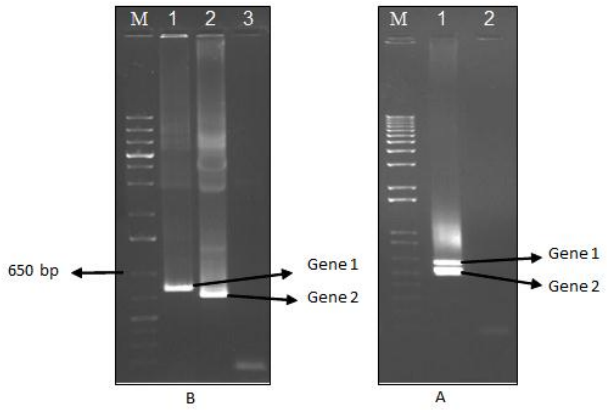
Fig. 1. The PCR products for *SadI* gene with specific primers on a 1% agarose gel. Lanes 1 to 6: cotton plant samples and lane 7: sample without DNA (water).

بر اساس اطلاعات ارایه‌شده به‌وسیله نرم‌افزار، باید قطعه‌ای با طول حدود ۵۴۴ جفت بازی تکثیر می‌شد ولی در الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز دو نوار ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۲). در ابتدا تصور شد که یکی از نوارها غیراختصاصی بوده و ناشی از چرخه‌های حرارتی نامناسب است. بعد از تکرارهای متوالی و تغییراتی در دمای اتصال آغازگرها، همچنان این دو نوار مشاهده شدند. حضور دو نوار ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت بازی به دو دلیل می‌تواند باشد: ۱- آغازگرهای جدید علاوه‌بر بخشی از ژن موردنظر، با مکان دیگری در ژنوم نیز رابطه مکملی داشته و علاوه‌بر تکثیر بخشی از ژن *Sad1*، بخشی از ناحیه دیگری از ژنوم را نیز تکثیر کرده‌اند؛ ۲- این دو نوار مربوط به نسخه‌های ژن *Sad1* هستند که در یکی از نسخه‌ها بخشی حذف و یا در نسخه دیگر اضافه شده است. بنابراین برای تأیید حضور ژن داخلی *Sad1* و بررسی‌های بیشتر، دو نوار از ژل جداسازی، تخلیص، همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند. دو نوار جداسازی و تخلیص‌شده در شکل ۳ بررسی کیفیت و کمیت گردید.



شکل ۲- تأیید کیفیت DNA ژنومی پنبه با استفاده از آغازگرهای جدید ژن *sad1*. چاهک‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به گیاهان پنبه است و چاهک ۱۱ فاقد DNA (آب) است.

Fig. 2. Quality confirmation of cotton genomic DNA using new primers of *SadI* gene. Lanes 1 to 10: cotton plant samples and lane 11: sample without DNA (water).



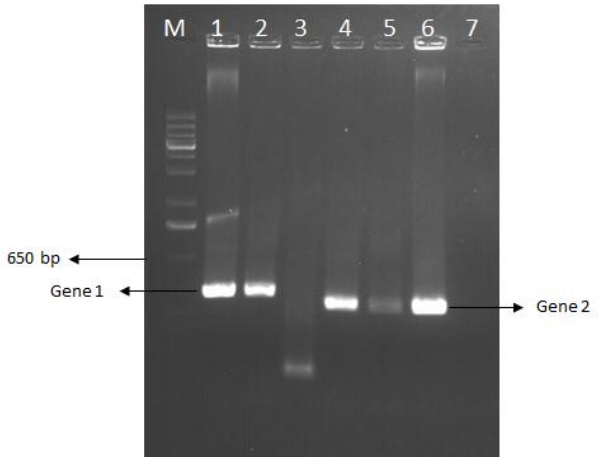
شکل ۳- الف- تصویر الکتروفورز محصول PCR ژن *Sad1* بعد از خالص سازی. ب- سنجش کیفیت و کمیت قطعات DNA بعد از خالص‌سازی و تخلیص از ژل.

Fig. 3. A- Schematic of gel electrophoresis of *Sad1* gene PCR product after purification. B- Measuring the quality and quantity of DNA fragments after purification and extraction from the gel.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

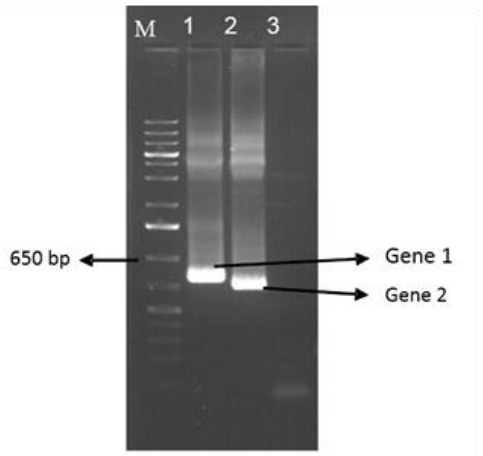
پس از همسانه‌سازی قطعات، برای تایید حضور قطعات در پلاسیمد از PCR کلونی استفاده گردید (شکل ۴). شکل ۴ نشان‌دهنده نتایج آزمون PCR کلونی برای تأیید پلاسمیدهای نوترکیب حاوی نوارهای ۶۲۳ و ۵۴۴ جفت بازی ژن *Sad1* است.

برای تأیید بیشتر پلاسمیدهای نوترکیب، مجدداً واکنش PCR با آغازگرهای M13 انجام شد. شکل ۵ نشان‌دهنده‌ی واکنش PCR با آغازگرهای M13 است. چاهک ۱ مربوط به نوترکیب حاوی قطعه ۶۳۳ و چاهک ۲ مربوط به پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ۵۴۴ جفت بازی است. چاهک ۳ به‌عنوان کنترل منفی آزمایش (آب) است. در هر دو نمونه نوارهای موردانتظار مشاهده شد که نشان‌دهنده صحت آزمایش بود. آنالیز همردیفی نشان داد که بیشترین همپوشانی قطعه ۵۴۴ جفت بازی با ژن *sadI* در ژنوم *Gossypium hirsutum* در حدود ۶۵ درصد است که در ناحیه همپوشان، میزان همسانی ۹۴ درصد با E value=0.000 مشاهده شد. همردیفی قطعه ۶۳۳ جفت بازی نتایج مشابه ارایه داد به‌طوریکه ۸۵ درصد با ژن *SadI* در ژنوم *Gossypium hirsutum* مشابهت داشت که میزان همسانی در ناحیه همپوشان ۹۵ درصد با E value= $3e^{-156}$ بود.



شکل ۴- PCR کلونی برای تأیید پلاسمید نوترکیب. چاهک‌های ۱ تا ۳ مربوط به همسانه‌های حاوی قطعه ۶۳۳ جفت بازی، چاهک‌های ۴ تا ۶ مربوط به همسانه‌های حاوی قطعه ۵۴۴ جفت بازی و چاهک ۷ مربوط به نمونه کنترل منفی (آب) بودند.

Fig. 4. Colony PCR for confirmation of recombinant plasmid. Lanes 1 to 3: clones contain a 633 bp DNA fragment, Lanes 4 to 6: clones contain a 544 bp DNA fragment and lane 7: negative control (water).



شکل۵- محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آغازگرهای M13. چاهک ۱ مربوط به پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ۶۳۳، چاهک ۲ مربوط به پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ۵۴۴ جفت بازی و چاهک ۳ به‌عنوان کنترل منفی آزمایش (آب) است.

Fig. 5. PCR product of recombinant plasmids using the primers M13. Lane 1: recombinant plasmid containing a 633 bp DNA fragment. Lane 2: recombinant plasmid containing a 544 bp DNA fragment and lane 3: negative control (water) test.

در انتها آنالیز توالی‌یابی قطعات ۵۴۴ و ۶۳۳ جفت بازی ژن *Sad1* نشان داد که این ژن دارای دو نسخه در ژنوم پنبه است، در نسخه ۵۴۴ جفت بازی یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه اینترون دوم وجود دارد (شکل ۶).

بحث

در مطالعه حاضر برای ژنوم پنبه، از ژن داخلی *Sad1* (Yong *et al.*, 2005a) استفاده شد. به‌دلیل کوچک بودن اندازه محصول تکثیرشده (۱۰۷ جفت باز)، مجددا آغازگرهای جدید طراحی شدند. ولی محصول واکنش PCR شامل دو قطعه DNA با اندازه‌های نزدیک به هم (۵۴۴ و ۶۲۳ جفت باز) بود. باوجود تأیید حضور دو نسخه از ژن *Sad1* در ژنوم پنبه، تاکنون هیچ مطالعه‌ای روی این دو نسخه انجام نشده است. در این مطالعه برای اولین بار بخشی از این دو نسخه بررسی شدند. بررسی توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیرشده در واکنش PCR نشان داد که این دو قطعه مربوط به نسخه‌های مختلف ژن *Sad1* هستند که در نسخه ۵۴۴ جفت بازی یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

اینترون دوم اتفاق افتاده است. بنابراین، با اثبات وجود دو نسخه متفاوت برای ژن *Sad1*، می‌توان در مطالعات مختلفی از آن به‌عنوان ژن داخلی مناسب استفاده کرد. از ژن‌های داخلی *Pa*، *Ivr*، *Lec*، *sps*، *Sad1* و *FatA* به‌ترتیب در گیاهان تراریخته رایج شامل پاپایا (انبه هندی)، ذرت، سویا، برنج، پنبه و کلزا در PCR چندگانه استفاده شده است (Xu *et al.*, 2012). فن PCR چندگانه همچنین برای ردیابی همزمان ژن‌های هدف و کنترل داخلی توسعه یافته است و از این طریق می‌توان به صحت نتایج به‌دست آمده دست یافت. مثلاً در گل کلم Bt ژن *cry1Ac* (ژن هدف) و ژن داخلی *SRK* (Randhawa *et al.*, 2008a) و در گوجه فرنگی ژن *osmotin* برای تحمل تنش خشکی و ژن داخلی *LAT52* (Chhabra and Guleria, 2009) و همچنین در سیب زمینی Bt ژن *cry1Ac* (ژن هدف) و ژن داخلی *UGPase* با PCR چندگانه همزمان مورد بررسی قرار گرفتند تا تاییدی بیشتری بر صحت نتایج باشد (Randhawa *et al.*, 2009b).

همچنین با استفاده از نمونه ژن داخلی، به‌راحتی می‌توان به اشتباهات به‌دلیل خطاهای دستی و دستگاه پی برد. به این صورت که اگر نمونه ژن داخلی از استاندارد تعریف‌شده پیروی نکند، نتایج آزمایش قابل‌قبول نبوده و آزمایش باید تکرار شود. بنابراین با حضور نمونه ژن داخلی در واکنش PCR چندگانه می‌توان نمونه‌های مختلف را با دقت بیشتری مورد بررسی قرار داد و نتایج مطمئن‌تری به‌دست آورد.

علاوه‌بر این، اگر هدف بررسی تکثیر و ردیابی یک ژن خاص در موجود تراریخته باشد، به‌وسیله PCR چندگانه و استفاده از ژن‌های داخلی و ژن موردنظر می‌توان یک ابزار قابل اطمینان، سریع و کم هزینه برای غربالگری محصولات تراریخته ایجاد کرد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان با استفاده از یک سیستم PCR دوگانه استانداردشده و ژن داخلی گیاه مربوطه، به‌راحتی و با زمان و هزینه کمتری گیاهان تراریخته پنبه را ردیابی کرد. بررسی دو نسخه ژن *Sad1* نیز نشان داد در نسخه اول این ژن یک حذف ۷۹ bp در ناحیه اینترون دوم وجود دارد. بنابراین این حذف منجر به تفاوت بیانی در این دو نسخه نمی‌گردد.

شکل ۶- همردیفی دو قطعه توالی‌یابی‌شده با ژن *Sad1*. نواحی زردرنگ بخشی از توالی مشترک دو ژن و کادر قرمز رنگ ناحیه حذف‌شده ۷۹ جفت بازی نسخه ۵۴۴ جفت بازی ژن *Sad1* است.

Fig. 6. Alignment of two sequenced fragments with *sadI* gene. Yellow areas were part of common sequence of two genes and red box were deleted area (79 bp) from 544 bp copy of *SadI* gene.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

منابع

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25: 169-193.

Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Biomolecular Techniques155–166.

Chaouachi M, El Malki R, Berard A, Romaniuk M, Laval V, Brunel D, *et al*. 2008. Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1818-1828.

Chaouachi M, Giancola S, Romaniuk M, Laval V, Bertheau Y, Brunel D. 2007. A strategy for designing multi-taxa specific reference gene systems. Example of application-ppi Phosphofructokinase (ppi-PPF) used for the detection and quantification of three taxa: maize (*Zea mays*), cotton (*Gossypium hirsutum*) and rice (*Oryza sativa*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 8003-8010.

Chhabra R, Guleria S. 2009. Molecular diagnosis of transgenic tomato with osmotin gene using multiplex polymerase chain reaction. Current Science 96: 123-134.

Doyle J. 1991. DNA protocols for plants, Molecular techniques in taxonomy. Springer, pp. 283-293.

Hernandez M, Duplan MN, Berthier G, Vaitilingom M, Hauser W, Freyer R, *et al*. 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4632-4637.

Hernandez M, Esteve T, Pla M. 2005. Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 7003-7009.

Hernandez M, Ferrando A, Esteve T, Saloméprat PP, Pla M. 2003. Real-time and conventional polymerase chain reaction systems based on the metallo-carboxypeptidase inhibitor gene for specific detection and quantification of potato and tomato in processed food. Journal of Food Protection 66: 1063-1070.

Hernandez M, Rio A, Esteve T, Prat S, Pla M. 2001. A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 3622-3627.

Pan A, Yang L, Xu S, Yin C, Zhang K, Wang Z, *et al*. 2006. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3′-transgene integration sequence. Journal of Cereal Science 43: 250-257.

Randhawa GJ, Chhabra R, Singh M. 2008. Molecular characterization of Bt cauliflower with multiplex PCR and validation of endogenous reference gene in Brassicaceae family. Current Science 95: 1729-1731.

Randhawa GJ, Chhabra R, Singh M. 2009. Multiplex PCR-based simultaneous amplification of selectable marker and reporter genes for the screening of genetically modified crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 5167-5172.

Sambrook J, Russel D. 2001. Molecular Cloning. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Scholtens I, Laurensse E, Molenaar B, Zaaijer S, Gaballo H, Boleij P, *et al*. 2013. Practical experiences with an extended screening strategy for genetically modified organisms (GMOs) in real-life samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 9097-9109.

Terry CF, Harris N. 2001. Event-specific detection of Roundup Ready soya using two different real time PCR detection chemistries. European Food Research and Technology 213: 425-431.

Van Duijn G, Van Biert R, Bleeker-Marcelis H, Peppelman H, Hessing M. 1999. Detection methods for genetically modified crops. Food Control 10: 375-378.

Weng H, Yang L, Liu Z, Ding J, Pan A, Zhang D. 2005. Novel reference gene, high-mobility-group protein I/Y, used in qualitative and real-time quantitative polymerase chain reaction detection of transgenic rapeseed cultivars. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists 88: 577-584.

Xu W, Zhai Z, Huang K, Zhang N, Yuan Y, Shang Y, *et al*. 2012. A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. PLoS One 7: 133-143.

Yang L, Chen J, Huang C, Liu Y, Jia S, Pan L, *et al*. 2005a. Validation of a cotton-specific gene, Sad1, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic cottons. Plant Cell Reports 24: 237-245.

Yang L, Pan A, Jia J, Ding J, Chen J, Cheng H, *et al*. 2005b. Validation of a tomato-specific gene, LAT52,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]

used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 183-190.

Zimmermann A, Hemmer W, Liniger M, Lüthy J, Pauli U. 1998. A sensitive detection method for genetically modified MaisGard^{TM} corn using a nested PCR-system. LWT-Food Science and Technology 31: 664-667.

Identification and Cloning of a Cotton Appropriate Reference Gene for Increasing Efficiency of Molecular Analysis

Masoud Tohidfar*[1] and Sara Dezhsetan[2]

1. Department of Plant Biotechnology, College of Science and Biotech, Shahid Beheshti University, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

*Corresponding Author: M_Tohidfar@sbu.ac.ir

Abstract

An appropriate reference gene for assessment of DNA genome quality and analysis of transgenic crops is very important. In this research, we have evaluated the *SadI* gene as a potential reference gene in cotton. At the first, DNA was extracted, and then a PCR reaction was done using appropriative primers designed for Vector NTI. The PCR products were 623 and 544 bp fragments. The fragments were cloned in pTZ57R/T plasmid. Recombinant plasmids were identified by colony PCR with appropriative primers and M13 primers and then were sequenced. The sequencing results showed that these two fragments are related to two different copies of the *SadI* gene that in one of copies a 79 bp deletion had occurred in the second intron. This research is the first report from sequencing of a cotton reference gene that showing the presence of two different copies of *SadI* gene, and confirmed that it is a suitable reference gene for different studies

Key words: Bioinformatics, Cloning, Cotton, Reference gene, *Sad1* gene

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.14.6]