شناسایی و همسانسازی ژن داخلی مناسب بنده در راستای افزایش
کارایی بررسی های مولکولی

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

مسعود توحیدفر و سارا دژشتران
Masoud Tohidfar* and Sara Dezhsetan

1- گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده زیستی و ریست‌گیری دانشگاه شهید بهشتی
2- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق
ارديبه‌سیر

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

M_Tohidfar@sbu.ac.ir (تاریخ دریافت: 17/96/19)

چکیده

زن داخلی مناسب در بررسی کیفیت DNA زنوم و آنان محقق‌زاده ترکیب‌های از اهمیت فراوانی
برخوردار است. در این پژوهش، ژن \textit{SadI} به عنوان یک ژن داخلی مناسب در پنبه از یک گرده خاص
پذیرفته شده است. تا کنون تکنیک‌های مختلفی از جمله \textit{PCR} و \textit{Vector NTI} برای همسان‌سازی این ژن
گزارش شده است. \textit{SadI} در پنبه به عنوان یک ژن اصلی در مطالعات مختلف هر چه سبز
می‌شود.
مقدمه

با گسترش چشمگیر زیست-شناسی مولکولی و توسعه فنون و ابزارهای مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و بروتون آنتی‌ژن موردنظر در بیوتکولوزی، نیاز به توسعه یک روش قوی، کارآمد و قابل اعتماد برای ارزیابی این روش‌های ضروری به‌نظر می‌رسد. (Xu et al., 2012). کلیدی‌ترین نکته در انجام واکنش PCR و سایر آنانلیزهای مولکولی آنلیز گزارش شده که DNA هر نوع غیر یافته در مجموعه است. معترض بر این که ارزیابی این روش‌ها کمیک این تکنیک استفاده از DNA NanoDrop علاوه بر PCR و ایمنی زیستی. (Scholtens et al., 2013). چندین در ارزیابی کمیک این تکنیک با توجه به تحقیق اولیه مورد نظر دارد در صن ایمنی زیستی. در افزایش ایمنی در حالی این روش‌ها نیاز به پیشرفت در بی‌ریزانی و ایمنی زیستی است. در این روش‌ها نیست برای تصمیم‌گیری در انتخاب داده DNA از DNA، بنا بر یافته در سال 1936 و تابستان در مورد سنجش قرار داد. (G. Yang et al., 2000). در ارزیابی زنن بی و برداشت، نتایج تازه‌اند. در DNA هر چند دست گزارش ویفیت در مورد سنجش قرار داد. (G. Yang et al., 2000).

مواد و روش‌ها

از نمونه‌های برجی گیاه‌های جوان در مرحله 2-3 می‌باشد. شناسایی گونه‌بندی و تعداد نشانه‌های تازه‌اند. در DNA هر چند دست گزارش ویفیت در مورد سنجش قرار داد. (G. Yang et al., 2000) در طرح این تحقیق. بنا بر یافته در سال 1936 و تابستان در (Scholtens et al., 2013). چندین در ارزیابی کمیک این تکنیک با توجه به تحقیق اولیه مورد نظر دارد در صن ایمنی زیستی. در افزایش ایمنی در حالی این روش‌ها نیاز به پیشرفت در بی‌ریزانی و ایمنی زیستی است. در این روش‌ها نیست برای تصمیم‌گیری در انتخاب داده DNA از DNA، بنا بر یافته در سال 1936 و تابستان در مورد سنجش قرار داد. (G. Yang et al., 2000). در ارزیابی زنن بی و برداشت، نتایج تازه‌اند. در DNA هر چند دست گزارش ویفیت در مورد سنجش قرار داد. (G. Yang et al., 2000).
نکتهی طبقه‌بندی از زن‌دهی پنجه‌ای (Sad1) (با استفاده از
آن‌ها از زن‌دهی پنجه‌ای سلول‌های باکتری E. coli به‌کلاس
نورتکبیک pH75R به‌روش سیمرون و راسل (2001) انجام شد.
برای تشخیص سریع پلاسمید نورتکبیک، بطور مستقیم از
PCR هماسان‌های به‌عواملی که در واقع اشکال پدیدار
باکتری‌های دارای پلاسمید نورتکبیک در محیط مایع رشد داده
شدند و پلاسمید آن‌ها به‌کلاس Core Bio و پلاسمیدی
روی پلاسمیدی استخراج شده با آگاز‌گرهای اختصاصی و
آگاز‌گرهای M13 برای تایید بیشتر حضور فلور هدف در پلاسمید
pTZ57R/T انجام شد. پس از تولید طبقه‌بندی، تولیدی
یکی از هوشیاری پژوهش‌های والوری اصلی انجام
حذف شدند. همرشدی تولیدی در بانک اطلاعاتی
NCBI شد. همچنین، این دو تولیدی به‌وسیله نرم‌افزار
هامریفیت شدند و خصوصیات آن‌ها با هم مقایسه
گردید.

نتایج

پس از تایید کمیت و کیفیت استخراجی، از زن‌دهی
DNA داخلی به‌عوامل یک کنترل داخلی برای تایید مجدد کیفیت
Sad1 زن‌دهی استخراجی می‌شود. با آگاز‌گرهای اختصاصی و
زن‌دهی استخراجی DNA انجام گرفت. تمامی هماسان‌های
PCR و به‌کلاس یک کنترل داخلی داده و در
Active DNA همیشه یک گروه مربوط به رشتهٔ زن‌دهی
(آب) هر دو کنترل نظر نگرفت که نشان دهندهٔ
صدای عادی‌تری یک پژوهش سطحی (1) (به ضریویداشک و اکتش
pTZ57R/T به‌کلاس
برای منطقه طول‌برداری و گردی. این طبقات از
زنا داده‌ای تخلیصی (با استفاده از کیت تخلیص
NCBI و به‌کلاسی شدنی. (Roche
pTZ57R/T در ناقل
Sad1) (شرکت فرماتز) هماسان‌های. این ناقل از نوع
T/A پدیده و به
افزوده شدن نوکلئوزید آدنین به انتهای محصول
پلی‌مرز صورت می‌گیرد، و با استفاده و اکتش
HAMANASI بر اساس دستورالعمل هماسان‌های ناقل
pTZ57R/T (شرکت فرماتز) انجام شد.

طقعات حاصل از تکیه‌گاهی
(شرکت فرماتز) هماسان‌های. این ناقل از نوع
T/A پدیده و به
افزوده شدن نوکلئوزید آدنین به انتهای محصول
پلی‌مرز صورت می‌گیرد، و با استفاده و اکتش
HAMANASI بر اساس دستورالعمل هماسان‌های ناقل
pTZ57R/T (شرکت فرماتز) انجام شد.

1396 / بهار و تابستان
شکل ۲ - تأیید کیفیت DNA زیستی بینه با استفاده از آغازگرهای جدید زن Sadel چاه‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به گیاهان بینه است و چاه‌ک ۱۱ فاقد آب است.

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

شکل ۳ - الف - تصویر الکتروفورز محصول PCR بعد از خالص Sadel زن DNA سازار. ب - سنجش کیفیت و کمیت فعالیت DNA بعد از خالصی و تخلیص از زن.

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

بر اساس اطلاعات ارائه‌شده به وسیله ترم‌افزار، باید قطعه‌ای با طول حدود ۵۴۴ جفت بایت تکلیر می‌شود وی در PCR الکتروفورز محصولات روي زن آغاز از توان ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت بایت مشاهده شد (شکل ۲). در این مطالعه از تکرارهای متوالی و تغییرات در دمای اتصال آغازگرهای Sadel همچنان این دو نوار مشاهده شدند. حضور دو نوار ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت از دو دیل می‌تواند باشد: ۱- آغازگرهای جدید علاوه بر بهبود خاصیت از زن موردخیال، با مکان دیگری در زن نیز رابطه مکمل داشته و علاوه بر تکلیر بخشی از زن Sadel از ناحیه دیگری از زن را نیز تکلیر کرده‌اند. ۲- این دو نوار مربوط به نسخه‌های زن Sadel هستند که در یکی از نسخه‌ها بخشی جفت و یا با نسخه دیگری اضافه شده است. بنابراین برای تایید حضور زن داخلی و بررسی قابلیت نشان دادن دو نوار از زن Sadel جداسازی، تخلیص، همسان‌سازی و توانایی پایش شدن دو نوار جداسازی و تخلیص شده در شکل ۳ بررسی کیفیت و کمیت کرده‌اند.

**Fig. 1.** The PCR products for Sadel gene with specific primers on a 1% agarose gel. Lanes 1 to 6: cotton plant samples and lane 7: sample without DNA (water).
پس از همансه‌سازی قطعات، برای تایید حضور قطعات در پلاسمید از گونه (شکل 4). شکل 2 نشان دهنده نتایج آزمون PCR کلونی برای تایید پلاسمیدهای نوتریک حاوی نوارهای 623 و 544 جفت باری زن Sadi است.

برای تایید پلاسمیدهای نوتریک، مجدداً واکنش PCR با آغازگرهای M13 اندازه شد. شکل 5 نشان دهنده واکنش PCR حاوی نوارهای M13 است. چاهک 1 مربوط به نوتریک حاوی قطعه 623 و چاهک 2 مربوط به پلاسمید نوتریک حاوی قطعه 544 جفت باری زن Sadi 424 جفت باری است. چاهک 3 به عنوان کنترل منفی آژامیش (آب) است. در هر دو نمونه نوارهای مورد انتظار مشاهده شد که نشان دهنده صحت آژامیش بود. آنالیز هممرفی نشان داد که بیشترین همپوشانی قطعه 424 جفت باری با زن sadi در طول 85 درصد از طول DNase E value=0.000 مشاهده شد. هممرفی قطعه 544 جفت باری نتایج مشابه ارائه داد. در Gossypium hirsutum در حذف 65 درصد از طول DNase E value=3e-156 مشاهده شد که میزان همپوشانی در ناحیه همپوشانی 95 درصد با E بود.

بحث

در مطالعه حاضر برای زنوم پنجه از Zn1 اندازه (Yong et al., 2005a) محصول تکثیرشده (71 جفت باری), مجدداً آغازگرهای جدید DNA طراحی شدند. این محصول و آغاز PCR شامل دو قطعه از آن در داده شدند. در زنوم پنجه, نتایج همیجید حضور دو نوارهای 623 و 542 جفت باری به محققان در داده شده است. در این مطالعه برای اولین بار بخشی از زنوم پنجه بررسی شدند. بررسی PCR توانای تولید قطعات تکثیرشده در واکنش PCR نشان داد که این دو قطعه مربوط به نوارهای مختلف زن Sadi هستند که در نسخه 424 جفت باری یک کد حذف 79 جفت باری در ناحیه گرفتار در مطالعه حاضر برای زنوم پنجه از Zn1 اندازه (Yong et al., 2005a) محصول تکثیرشده (71 جفت باری), مجدداً آغازگرهای جدید DNA طراحی شدند. در زنوم پنجه, نتایج همیجید حضور دو نوارهای 623 و 542 جفت باری به محققان در داده شده است. در این مطالعه برای اولین بار بخشی از زنوم پنجه بررسی شدند. بررسی PCR توانای تولید قطعات تکثیرشده در واکنش PCR نشان داد که این دو قطعه مربوط به نوارهای مختلف زن Sadi هستند که در نسخه 424 جفت باری یک کد حذف 79 جفت باری در ناحیه
صبرت که اگر نمونه زن داخلی از استاندارد تعیین شده پیروی نکند، نتایج آزمایش قابل قبول نبوده و آزمایش با بند نکرار شود. بنابراین با حضور نمونه زن داخلی در واکش PCR چندگانه می‌توان نمونه‌های مختلف را با دقت بیشتری مورد بررسی قرار داد و نتایج مطمئن‌تر بدهد. است. 

علاوه این، اگر هدف بررسی تکلیر و ردپایی یک زن PCR چندگانه و استفاده از زن‌های داخلی و زن‌های دی‌پرندوز می‌توان یک ابزار قابل اطمینان، سریع و گم هزینه برای غربال‌گری محصولات تراپیکته‌ای جدی‌تر کرد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان یا استفاده از یک سیستم چندگانه استاندارد دارد که در داخلی گیاه مربوط به برای حریق و بدیم که خاص گیاهان تراپیکته‌ای پیش‌تر را ردپایی کرد. برسی یا نسخه زن‌های داخلی ساد Ad با توجه به نسخه اول این زن یک حذف 79 bp در ناحیه آنتون یک حذف دارد. بنابراین این حذف منجر به تفاوت بینی در این دو نسخه نمی‌گردد.

شکل ۶ و ۷ هم‌مدفوع و قطعه نوایی باید با زن Sadl نواحی زردپاش بازی از نواحی مشترک دو زن و کادر فرم رنگ ناحیه حذف شده در فیلدر نسخه جفت باید زن این Sadl باشد. است. 

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


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

Masoud Tohidfar*1 and Sara Dezhsetan2

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, SadI gene