

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

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

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

مسعود توحیدفر^{۱*} و سارا دژستان^۲
Masoud Tohidfar¹ and Sara Dezhsetan²

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 ترا ریخته از اهمیت فراوانی برخوردار است. در این پژوهش، ژن SadI به عنوان یک ژن داخلی بالقوه در پنبه ارزیابی گردید. ابتدا DNA ژنومی استخراج گردید و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با نرم افزار PCR NTI، واکنش PCR انجام گرفت. محصول واکنش PCR دو قطعه ۵۴۴ و ۶۲۳ پریمر بازی بود. قطعات مورد نظر در پلاسمید pTZ57R/T همسانه شدند. پلاسمیدهای نوترکیب از طریق PCR کلونی با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای M13 شناسایی شدند و در ادامه توالی‌بایی صورت گرفت. نتایج توالی‌بایی نشان داد که این دو قطعه مربوط به نسخه‌های مختلف ژن SadI هستند که در نسخه اول یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه ایترنون دوم اتفاق افتاده است. این تحقیق، اولین گزارش از توالی‌بایی ژن داخلی پنبه است که وجود دو نسخه متفاوت ژن SadI را نشان می‌دهد، و تأیید می‌کند که آن یک ژن داخلی مناسب در مطالعات مختلف است.

واژه‌های کلیدی

پنبه،

ژن داخلی،

همسانه‌سازی،

بیوانفورماتیک،

SadI ژن

مقدمه

ژن داخلی مناسب بایستی مختص گونه بوده و تعداد نسخه کم 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 به منظور 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). به منظور 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 پنه و ردیابی نتاج تاریخته، یک ژن داخلی مناسب نیاز است. سابقاً یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2005a) ژن *Sad1* را به عنوان ژن مرجع داخلی پنه در خانواده *G. hirsutum* موردنظری و تأیید قرار دادند. ژن *Sad1* دو نسخه در هر ژنوم هایلوئید پنه دارد و رمزکننده یک پروتئین غیراشباع حامل اسیل-استروپل 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 پنه 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 پنه، 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 ۳-۲ برگی DNA ژنومی استخراج شد. نمونه‌های برگی برداشت شده 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 نانو دراپ ارزیابی شد. همچنین کیفیت DNA استخراجی با ژل آگارز ۰/۸ درصد نیز سنجیده شد.

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 قابل اعتماد برای ارزیابی این روش‌ها ضروری به نظر می‌رسد (Xu *et al.*, 2012). کلیدی‌ترین نکته در انجام واکنش PCR و سایر آنالیزهای مولکولی مانند لکه‌گذاری سادرن کیفیت الگو DNA است. معترض‌ترین و گستردۀ‌ترین 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 الگو نقش دارد در نرمال‌سازی داده‌ای حاصل از بیان ژن نیز مهم است.

برای تشخیص موجودات تغییریافته ژنتیکی، یک ژن داخلی مرجع به عنوان 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، Hernandez *et al.*, 1998 و *cssIIb* در ذرت (Pan *et al.*, 2006)، لکتین و ژن‌های شوک حرارتی در سویا (Van Duijn *et al.*, 1999)، ژن‌های (Terry and Harris, 2001)، *HMGIV* در کلزا (Weng *et al.*, 2005)، *cruciferin ACC BnACCg8* و *LAT52* (Hernandez *et al.*, 2001) در گوجه فرنگی (Yang *et al.*, 2003)، *McpI* (Hernandez *et al.*, 2003)، *Oryzain β* (Chhabra and Guleria, 2009)، *Gos9* (Hernandez *et al.*, 2005) در برنج (*SPS ppi-PPF*) و *ppi-PPF* (Yang *et al.*, 2007)، ژن *Sad1* در پنه (Chaouachi *et al.*, 2007)، ژن *SRK* در تیره براسیکا (Randhawa *et al.*, 2008) و ژن *β-fructosidase* در تیره سولاناسه (Chaouachi *et al.*, 2005a) شناسایی و به کار برده شده است.

تکثیر ژن داخلی و تأیید کیفیت DNA ژنومی به عنوان 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 تاریخته نیز به کار می‌رود. یک

تراریخته سازی سلول های باکتری *E. coli* با پلاسمید نوترکیب pTZ57R به روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد. برای تشخیص سریع پلاسمید نوترکیب، به طور مستقیم از همسانه های *E. coli* به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. باکتری های دارای پلاسمید نوترکیب در محیط مایع رشد داده شدند و پلاسمید آنها با کیت Core Bio استخراج شد. واکنش PCR روی پلاسمید های استخراج شده با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای M13 برای تأیید بیشتر حضور قطعه هدف در پلاسمید pTZ57R/T انجام شد. پس از توالی یابی قطعات، توالی های اضافی مربوط به ناقل با نرم افزار Vector NTI از توالی اصلی حذف شدند. هم رده بیانی توالی ها در بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. همچنین، این دو توالی به وسیله نرم افزار Vector NTI با هم هم رده بودند و خصوصیات آنها باهم مقایسه گردید.

نتایج

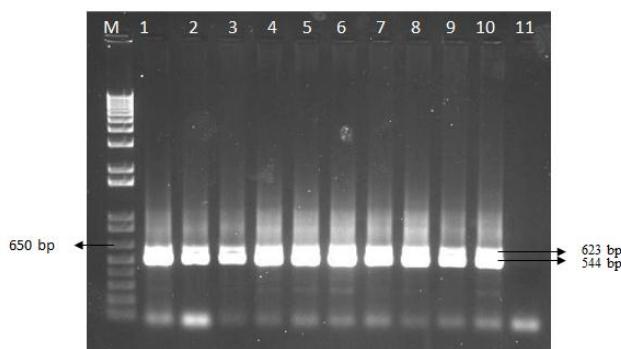
پس از تأیید کمیت و کیفیت DNA استخراجی، از ژن داخلی به عنوان یک کنترل داخلی برای تأیید مجدد کیفیت DNA ژنومی استفاده می شود. با آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی *Sad1* واکنش PCR انجام گرفت. تمامی نمونه های DNA استخراج شده یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مربوط به ژن داخلی نشان دادند و در نمونه فاقد DNA (آب) هیچ تکثیری صورت نگرفت که نشان دهنده عدم آلودگی واکنش PCR بود (شکل ۱).

به دلیل کوچک بودن قطعه تکثیر شده (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.

تکثیر قطعه ای از ژن داخلی پنه (Sad1) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ('Sad1' با استفاده از F- 5'GGTATAGGCTGTCTGGTG3' و R- 5'ATCGTGTACGTAGTGGTG3' در حجم ۲۰ میکرو لیتر انجام گرفت. اجزای واکنش شامل ۲ PCR میکرو لیتر بافر (۱۰X)، ۲ میکرو لیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرو لیتر MgCl₂ (۲۵ میلی مولار)، ۱ میکرو لیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرو لیتر *Taq* DNA polymerase و میکرو لیتر آنزیم گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل چرخه های حرارتی شامل یک چرخه و اسرسنجه سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و اسرسنجه سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

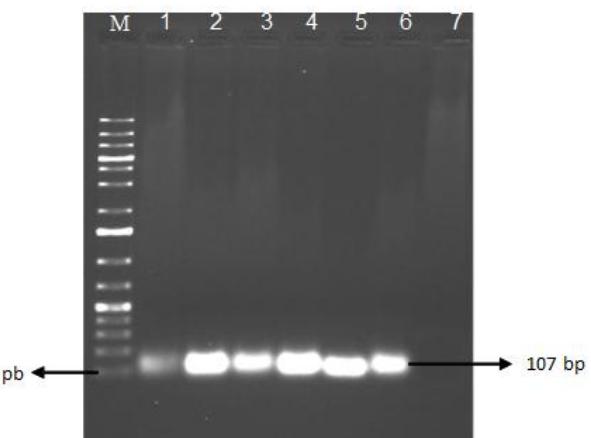
تفکیک محصولات واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت. با استفاده از آغازگرهای *Sad1*، یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مشاهده شد. به دلیل کوچک بودن اندازه نوار حاصل و عدم امکان تشخیص نوار حاصل از آغازگر دایمر، توالی ژن *Sad1* از پایگاه داده NCBI دریافت و جفت آغازگر جدید (F- 5'GTAGTGCTCAAGGTAGGTTCT و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

قطعات حاصل از تکثیر ژن *Sad1* در ناقل pTZ57R/T (شرکت فرمتاز) 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 می گیرد، وابسته است. واکنش اتصال و همسانه سازی بر اساس دستورالعمل همسانه سازی ناقل pTZ57R/T (شرکت فرمتاز) انجام شد.



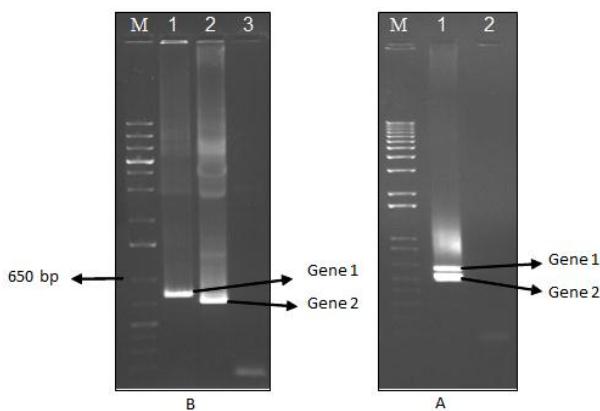
شکل ۲- تأیید کیفیت DNA ژنومی پنبه با استفاده از آغازگرهای جدید ژن چاهک‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به گیاهان پنبه است و چاهک ۱۱ فاقد DNA (آب) است.

Fig. 2. Quality confirmation of cotton genomic DNA using new primers of *Sad1* gene. Lanes 1 to 10: cotton plant samples and lane 11: sample without DNA (water).



شکل ۱- محصول PCR برای ژن داخلی *Sad1* با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ الی ۶ نمونه‌های گیاهی پنبه و چاهک ۷ نمونه فاقد DNA (آب) هستند.

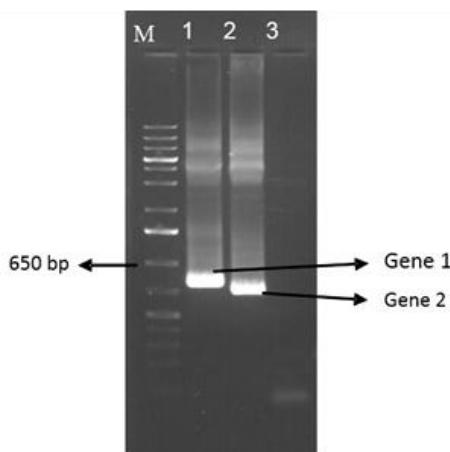
Fig. 1. The PCR products for *Sad1* gene with specific primers on a 1% agarose gel. Lanes 1 to 6: cotton plant samples and lane 7: sample without DNA (water).



شکل ۳- الف- تصویری 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.

بر اساس اطلاعات ارایه شده به وسیله نرم افزار، باید قطعه-ای 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 آغازگرهای، همچنان این دو نوار مشاهده شدند. حضور دو نوار ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت بازی به دو دلیل می‌تواند باشد: ۱- آغازگرهای جدید علاوه بر بخشی از ژن موردنظر، با مکان دیگری در ژنوم نیز رابطه مکملی داشته و علاوه بر 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 توالی یابی شدند. دو نوار جداسازی و تخلیص شده در شکل ۳ بررسی کیفیت و کمیت گردید.



شکل ۵- 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 به عنوان 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.

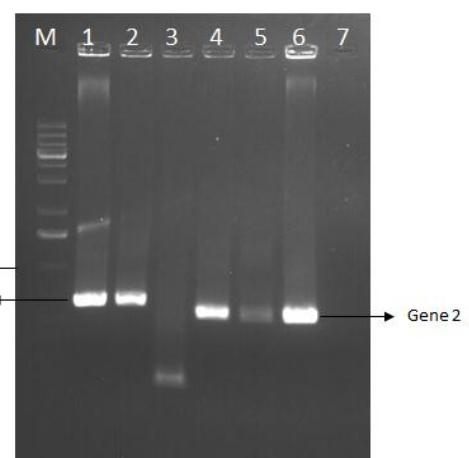
در انتها آنالیز توالی یابی قطعات ۵۴۴ و ۶۳۳ جفت بازی ژن *Sad1* نشان داد که این ژن دارای دو نسخه در ژنوم پنه است، در نسخه ۵۴۴ جفت بازی یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه ایترون دوم وجود دارد (شکل ۶).

بحث

در مطالعه حاضر برای ژنوم پنه، از ژن داخلی *Sad1* استفاده شد. به دلیل کوچک بودن اندازه محصول تکثیر شده (۱۰۷ جفت باز)، مجدداً آغازگرهای جدید طراحی شدند. ولی محصول واکنش PCR شامل دو قطعه DNA با اندازه های نزدیک به هم (۵۴۴ و ۶۲۳ جفت باز) بود. با وجود تأیید حضور دو نسخه از ژن *Sad1* در ژنوم پنه، تاکنون هیچ مطالعه ای روی این دو نسخه انجام نشده است. در این مطالعه برای اولین بار بخشی از این دو نسخه بررسی شدند. بررسی توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده در واکنش PCR نشان داد که این دو قطعه مربوط به نسخه های مختلف ژن *Sad1* هستند که در نسخه ۵۴۴ جفت بازی یک حذف ۷۹ جفت بازی در ناحیه

پس از همسانه سازی قطعات، برای تایید حضور قطعات در پلاسمید از PCR کلونی استفاده گردید (شکل ۴). شکل ۴ نشان دهنده نتایج آزمون PCR کلونی برای تایید پلاسمیدهای نوترکیب حاوی نوارهای ۵۴۴ و ۶۲۳ جفت بازی ژن *Sad1* است.

برای تایید بیشتر پلاسمیدهای نوترکیب، مجدداً واکنش PCR با آغازگرهای M13 انجام شد. شکل ۵ نشان دهنده 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 به عنوان کنترل منفی آزمایش (آب) است. در هر دو نمونه نوارهای مورد انتظار مشاهده شد که نشان دهنده صحبت آزمایش بود. آنالیز هم ریفی نشان داد که بیشترین هم پوشانی قطعه ۵۴۴ جفت بازی با ژن *sad1* در ژنوم *Gossypium hirsutum* در حدود ۶۵ درصد است که در ناحیه هم پوشان، میزان همسانی ۹۴ درصد با $E\ value=0.000$ مشاهده شد. هم ریفی قطعه ۶۳۳ جفت بازی نتایج مشابه ارایه داد به طوریکه ۸۵ درصد با ژن *sad1* در ژنوم *Gossypium hirsutum* مشابه داشت که میزان همسانی در ناحیه هم پوشان ۹۵ درصد با $E\ value=3e^{-156}$ بود.



شکل ۴- PCR کلونی برای تایید پلاسمید نوترکیب. چاهک های ۱ تا ۳ مربوط به همسانه های حاوی قطعه ۶۳۳ جفت بازی، چاهک های ۴ تا ۶ مربوط به همسانه های 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).

صورت که اگر نمونه ژن داخلی از استاندارد تعریف شده پیروی نکند، نتایج آزمایش قابل قبول 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 به دست آورد.

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

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان با استفاده از یک سیستم PCR دوگانه استاندارد شده و ژن داخلی گیاه مربوطه، به راحتی و با زمان و هزینه کمتری گیاهان تاریخته پنهان را ردیابی کرد. بررسی دو نسخه ژن *Sad1* نیز نشان داد در نسخه اول این ژن یک حذف 79 bp در ناحیه ایترون دوم وجود دارد. بنابراین این حذف منجر به تفاوت بیانی در این دو نسخه نمی‌گردد.

ایترون دوم اتفاق افتاده است. بنابراین، با اثبات وجود دو نسخه متفاوت برای ژن *Sad1* می‌توان در مطالعات مختلفی از آن به عنوان ژن داخلی مناسب استفاده کرد. از ژن‌های داخلی *Pa*, *Ivr* و *FatA* به ترتیب در گیاهان تاریخته رایج PCR شامل پایایا (انه هندی)، ذرت، سویا، برنج، پنبه و کلزا در 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 به دست آمده دست یافت. مثلاً در گل کلم *cryIAc* ژن هدف (ژن هدف) و ژن داخلی *SRK* (Randhawa et al., 2008a) و در گوجه فرنگی *LAT52* ژن *osmotin* برای تحمل تنفس خشکی و ژن داخلی *Bt* (Chhabra and Guleria, 2009) و همچنین در سیب زمینی ژن *cryIAc* (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، به راحتی می‌توان به اشتباهات به دلیل خطاهای دستی و دستگاهی پی برد. به این



شکل ۶- هم‌دیفی دو قطعه توالی‌بایی شده با ژن *Sad1* نواحی زردرنگ بخشی از توالی مشترک دو ژن و کادر قرمز رنگ ناحیه حذف شده 79 جفت بازی نسخه ۵۴۴ جفت بازی *Sad1* است.

Fig. 6. Alignment of two sequenced fragments with *sad1* gene. Yellow areas were part of common sequence of two genes and red box were deleted area (79 bp) from 544 bp copy of *Sad1* gene.

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 Techniques* 155-166.
- 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-taxon 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,

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™ 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 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 *Sad1* 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 *Sad1* 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 *Sad1* gene, and confirmed that it is a suitable reference gene for different studies

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