

جداسازی بخشی از cDNA ژن ترانسفرین (*Ttf*) از رقم بزم گندم زراعی تحت تیمار تنش شوری

Isolation of partial cDNA of transferring gene (*Ttf*) from Bam wheat cultivar under salinity stress treatment

نادر رحیمی اسفنجانی^۱ و علیرضا تارنی نژاد^{۲*}

Nader Rahimi Esfanjani¹ and Alireza Tarinejad^{2*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

1- MSc. Student of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan
Shahid Madani University.

2- Assistant Professor of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture,
Azarbaijan Shahid Madani University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: atarinejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن
ژن ترانسفرین (*Ttf*)
رقم بزم گندم زراعی
تنش شوری

در میان تنش‌های غیرزنده، تنش شوری شدیدترین تنش محیطی است که پاسخ به آن، بیان ژن‌های گوناگونی را در گیاه القا می‌کند که محصولات آن‌ها به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در حفاظت از گیاهان در مقابل تنش نقش دارند. خاک‌ها به‌طور معمول دارای ۵-۱ درصد آهن کل هستند که به‌راحتی برای گیاهان قابل استفاده نیست. ترانسفرین‌ها پروتئین‌های عمومی حامل آهن در سلول‌های جانوری هستند و در پیوند شدن، متحرک کردن و تحویل دادن یون‌های فریک نقش دارند. در این پژوهش سعی شد وجود ژن ترانسفرین (که تاکنون وجود آن در گیاهان عالی گزارش نشده است) در گندم زراعی بررسی و در صورت وجود، جداسازی، کلون و سپس تعیین توالی شود. برای این منظور، بذور رقم بزم گندم زراعی در گلدان‌ها کشت و با آب نمک با ECهای ۱۰ و ۱۵ (ds/m) به ترتیب به مدت ۵ و ۱۰ روز تحت تنش شوری قرار گرفتند و در مراحل مختلف رشد بوته‌ها، از برگ‌های جوان آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. آر.ان.ای کل با استفاده از تریزول استخراج و سپس ساخت cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV انجام شد. از روی cDNA ساخته شده توالی ژن هدف با واکنش پی.سی.آر تکثیر شد و در نهایت، واکنش لیگاسیون بین دی.ان.ای الحاقی (بخشی از ژن ترانسفرین) و وکتور pGEM-TEasy انجام و کلنی‌های ترانسفورم شده از طریق سیستم گزینش بلو-وایت شناسایی شدند. بعد از همسانه سازی ژن *Ttf* جداسازی شده و تعیین توالی، توالی بدست آمده شباهت ۸۴ درصدی با توالی ثبت شده موجود در NCBI نشان داد. نتایج این پژوهش وجود ژن ترانسفرین در گیاهان عالی و نیز نقش آن در مقاومت به تنش شوری در آن‌ها را به اثبات رساند و این اولین گزارش از حضور ژن ترانسفرین در گیاهان عالی بعد از جلبک‌ها است.

مقدمه

(Lamberta et al., 2005).

انتقال آهن از غشا سلولی توسط ترانسفرین، از طریق یک مکانیسم فاگوسیتوتیک (اندوسیتوتیک) و با وساطت یک گلیکوپروتئین غشایی به نام گیرنده ترانسفرین انجام می‌شود. احتمال دارد گیرنده‌های ترانسفرین به استثنا سلول‌های بسیار تمایز یافته روی تمام سلول‌ها بیان شوند (در مقادیر بسیار متفاوت). بیان گیرنده‌های ترانسفرین توسط آهن خارج سلولی و از طریق عناصر پاسخگو به آهن (¹IREs) موجود بر روی ناحیه ۳' غیر ترجمه‌ای mRNA گیرنده ترانسفرین، در مرحله پس از رونویسی به طور منفی تنظیم می‌شود. IREها توسط پروتئین‌های سیتوپلاسمی ویژه به نام IRPs (پروتئین‌های تنظیمی آهن) تشخیص داده می‌شوند که در غیاب آهن به IREهای mRNA گیرنده ترانسفرین متصل می‌شوند و از تجزیه آنها جلوگیری می‌کنند. جذب آهن از ترانسفرین شامل اتصال ترانسفرین به گیرنده ترانسفرین، درونی‌سازی ترانسفرین به داخل یک کیسه اندوسیتوتیک از طریق گیرنده واسطه در اندوسیتوز و رها کردن آهن از پروتئین ترانسفرین از طریق کاهش در pH داخلی کیسه اندوسیتوتیک است (Litwin and Calderwood, 1993; Schwarz et al., 2003). pH و زیگول اندوسیتوزی ۵/۵ یا کمتر از آن است که این باعث تفکیک آهن از کمپلکس گیرنده-ترانسفرین می‌شود، اما آپوترانسفرین (ترانسفرین عاری از آهن) متصل به این گیرنده باقی می‌ماند. آهن داخل سلول باقی می‌ماند و مجموعه‌ی گیرنده‌های آپوترانسفرین به سطح سلول بازیافت می‌شوند (Dautry-Varsat et al., 1983). جلبک تک‌سلولی *Dunaliella Salina* نیز با مکانیسمی مشابه آهن را وارد سلول کرده و در واکوئل‌های اسیدی درونی‌سازی می‌کند (Pick et al., 2006). این جلبک یک گیاه مدل استثنایی برای آشکار کردن مکانیسم‌های مقاومت به شوری موجودات فتوسنتتیک است که توانایی زنده ماندن در شوری‌های با غلظت بالاتر از اشباع NaCl را دارد (Fisher et al., 1997).

کمبود آهن دو پروتئین شبه‌ترانسفرین عمده در غشا پلاسمایی جلبک *D. salina* القاء می‌کند، TTF یا p150، یک پروتئین ۱۵۰

خاک‌ها به طور معمول دارای ۵-۱ درصد آهن کل هستند. بیشتر آهن موجود در خاک به شکل مواد معدنی سیلیکاتی یا اکسید و هیدروکسید آهن است که به راحتی برای گیاهان قابل استفاده نیستند. گیاهان می‌توانند آهن را به اشکال Fe^{2+} (فروس) و Fe^{3+} (فریک) جذب کنند. گیاهان دو مکانیسم عمده برای جذب آهن به کار می‌گیرند که یکی شامل کلاته کردن آهن از طریق ترشح ترکیباتی به نام سیدروفورزها که با پیوند شدن با آهن قابلیت حل شدن آن را افزایش می‌دهد و دیگری، ترشح پروتون (H^+) و احیاکننده‌ها توسط ریشه گیاهان برای کاهش مقدار pH در ناحیه اطراف ریشه برای افزایش محلولیت آهن است (Cohen et al., 1998).

گندم یک گیاه متحمل به شوری زیاد است و بسیاری از کولتivarهای آن تا شوری‌های ۱۵ ds/m با حفظ توان تولید ۵۰ درصد ماده خشک، قدرت رشد دارند. ترانسفرین‌ها پروتئین‌های عمومی حامل آهن در سلول‌های جانوری هستند و در پیوند شدن، متحرک کردن و تحویل دادن یون‌های فریک نقش دارند (Fisher et al., 1997). ترانسفرین پلازما یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی در حدود ۸۰ کیلودالتون، با دو ناحیه همولوگ در انتهای C و N برای پیوند شدن با آهن است. در اصل، همه آهن در گردش پلازما به طور طبیعی متصل به ترانسفرین است (Ponka and Lok, 1999). یون فریک برای جفت شدن با ترانسفرین فقط به مشارکت یک آنیون (به طور معمول کربنات) نیاز دارد. هم‌چنین پروتئین‌های ترانسفرین در برقراری همئوستازی آهن سلول، از طریق کمک کردن به سلول‌ها برای تنظیم میزان جذب آهن از سطح خارج سلولی، نقش ایفا می‌کنند. در کشت سلولی نیز، برای افزایش کیفیت و کمیت سلول‌ها به محیط کشت سلول، ترانسفرین اضافه می‌کنند تا سلول‌ها به اندازه کافی با آهن تجهیز شده باشند (Laskey, 1998). خانواده ترانسفرین بین مهره‌داران و بی‌مهرگان پلی را برقرار می‌کند، چرا که باقی‌مانده‌های مرتبط با پیوندشوندگی آهن و آنیون در بین انواع ترانسفرین‌ها (ترانسفرین سرم، اووترانسفرین، لاکتوفرین، ملانوترانسفرین، مهارکننده کربونیک‌انه‌یدراز، یک پروتئین از خرچنگ و یک پروتئین از جلبک سبز) حفاظت شده هستند

^۱ Iron Response Elements عناصر پاسخ به آهن، یک ساختار کوتاه حلقه-ساقه حفاظت شده هستند که توسط پروتئین‌های تنظیمی آهن (IRPs) متصل می‌شوند.

مدارک زیادی وجود دارد که شوری، آنزیم‌های فتوسنتزی، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها را تحت اثر قرار می‌دهد. این نیز ثابت شده است که شوری ناشی از نمک NaCl روی کارایی فتوسیستم II اثر منفی دارد (Qin et al., 2010). تنش شوری غشاهای زیستی را ناپایدار کرده و در محلولیت بسیاری از یون‌ها و سوبستراهای ضروری اثرگذار است (Katz et al., 2007; Jitesh et al., 2006). شوری خاک مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک بوده که مهم‌ترین علت آن هم آبیاری با آب‌های شور است (Turan et al., 2010). شور شدن خاک اثرهای منفی زیادی روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، میکروارگانیزم‌های آن و نیز گیاهان دارد. تجمع نمک‌ها در خاک pH آن را تحت اثر قرار می‌دهد که مهم‌ترین ویژگی شیمیایی خاک به شمار می‌رود چرا که روی قابلیت دسترسی مواد مغذی برای گیاهان اثرگذار است. در pH‌های بالای خاک، عناصری مثل Zn، Cu، Mn و Fe قابلیت دسترسی کم‌تری دارند. آهن در pH‌های بین ۴ تا ۷ قابلیت دسترسی بالایی دارد. آهن یک عنصر ضروری برای بقا همه موجودات زنده است. موجودات فتوسنتتیک نیاز ضروری برای آهن به‌عنوان کوفاکتور برای چندین عنصر دیگر در سیستم انتقال الکترون خود دارند (Paz et al., 2007). کمبود آهن یک عامل محدودکننده برای رشد گیاهان بوده و عملکردهای مهمی در گیاهان دارد که می‌توان به نقش آن در ساختمان و عملکرد کلروفیل، انتقال انرژی در داخل گیاه، تثبیت نیتروژن، به‌عنوان جز ساختاری برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها و نقش اصلی آن که در فرآیندهای فتوسنتز و تنفس است، اشاره کرد (Connolly and Guerinet, 2002).

هدف از انجام این پژوهش جداسازی ژن بیان‌کننده ترانسفرین و بررسی وجود آن در ارقام ایرانی گندم زراعی بود. با توجه به اینکه گندم یک گیاه به‌طور نسبی متحمل به شوری و دسترسی پایین آهن بود، بنابراین فرضیه وجود ژن ترانسفرین در گندم کولتوار بم مقاوم به شوری شکل گرفت.

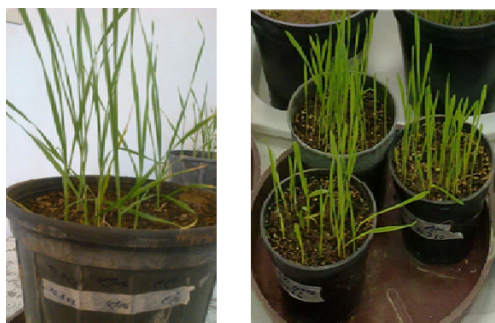
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ژنتیک

در این پژوهش از بذور رقم بم گندم زراعی به‌عنوان رقم متحمل

کیلودالتونی و یک پروتئین دیگر به نام idi-100 که از نظر توالی اسیدآمینهای تنها ۳۰ درصد به TTF شباهت دارد (Schwarz et al., 2003). در جلبک *Dunaliella* افزایش قابل‌توجه مقدار پروتئین TTF یا P150 (یک پروتئین شبه‌ترانسفرین) با بالا رفتن میزان شوری محیط کشت و یا تخلیه آهن از آن از طریق نشان‌دار کردن پروتئین با ^{59}Fe به اثبات رسیده است (Fisher et al., 1997; Katz et al., 2007). تایید شده است که جذب آهن در این گیاه به‌واسطه پروتئین TTF که به یون‌های Fe^{3+} پیوند می‌خورد، انجام می‌گیرد (Paz et al., 2007). این پروتئین یک پروتئین سطحی غشا پلاسمایی ۱۵۰ کیلودالتونی است که براساس توالی استنباط شده از cDNA آن به خانواده پروتئین‌های ترانسفرین که تا سال ۱۹۹۶ فقط در جانوران شناسایی شده بود تعلق دارد. این اولین گزارش از وجود یک پروتئین شبه‌ترانسفرین در یک موجود فتوسنتتیک بود (Fisher et al., 1997). این پروتئین مشخصات مشابهی از قبیل اختصاصی بودن میل ترکیبی بالا برای یون‌های Fe^{3+} ، وابستگی شدید روی یون‌های کربنات و بیکربنات و فعالیت خیلی پایین در pH‌های اسیدی با ترانسفرین‌های جانوری نشان داد. اثبات شده است که یون‌های فلزی دیگر، جذب آهن را مختل نمی‌کنند و یک گزینش بسیار قوی در سیستم انتقال یون‌های Fe^{3+} حاکم است (Fisher et al., 1998). القا پروتئین TTF در غلظت‌های بالای شوری احتمال دارد به دلیل کاهش آهن در دسترس موثر باشد. این کاهش ممکن است نتیجه اثر نمک روی محلولیت Fe^{3+} و یا دخالت نمک در ماشین جذب آهن باشد (Fisher et al., 1997). ثابت شده است که شرایط شوری شدید به‌طور مستقیم باعث تجمع پروتئین TTF نمی‌شود و اثر آن به‌طور غیرمستقیم و با کم کردن قابلیت دسترسی آهن است و نیز ثابت شده است که میل ترکیبی یون‌های آهن به سختی به‌وسیله شوری شدید تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Katz et al., 2007). این نتایج نشان می‌دهد که ترانسفرین‌هایی که تا سال ۱۹۹۶ فقط در جانوران شناسایی شده بودند در سیستم‌های گیاهی نیز در انتقال آهن حضور و نقش دارند (Fisher et al., 1998). تنش شوری ناشی از نمک NaCl باعث کاهش رشد رویشی، عدم تعادل ریزمغذی‌ها، مهار فتوسنتز، کمبود آب و سمیت یونی مرتبط با Cl^- و Na^+ اضافی، در گیاهان می‌شود (Turan et al., 2010).

مقدار ۲۵۰-۲۰۰ mg از آن در تیوب ml RNase Free ۱/۵ استریل ریخته شد. مقدار ۵۰۰ μ l تریزول به آن اضافه و ۴۰ ثانیه ورتکس



شکل ۱- تصویر بوته‌های رقم بام گندم زراعی. الف: ۱۵ روز پس از کاشت. ب: ۳۵ روز پس از کاشت.

Figure 1- Image of Bam wheat cultivar plants. A: 15 days after planting. B: 35 days after planting.

و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس مقدار ۲۰۰ μ l کلروفرم به آن اضافه و با محتویات تیوب مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام و فاز بالایی به تیوب ml RNase Free ۱/۵ استریل منتقل شده و آر.ان.ای با استفاده از روش ایزوپروپانول خالص‌سازی شد و آر.ان.ای در نهایت در ۲۰ μ l آب مقطر استریل حل شد. آر.ان.ای استخراج شده به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل رقیق شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و رقت ۱ به ۷۰ غلظت آن به‌طور میانگین برآورد شد. برای بررسی کیفیت آر.ان.ای، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند.

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA، محلول واکنش شامل آب مقطر استریل به مقداری که حجم واکنش به ۲۰ μ l برسد، ۴ μ g از آر.ان.ای استخراج شده، ۵۰ μ M آغازگر معکوس، ۵۰ μ M آغازگر پلی T، ۵۰ μ M آغازگر Random Hexamer، ۱۰ mM مخلوط dNTP در حجم ۲۰ μ l در تیوب استریل ۰/۵ ml تهیه شده و ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (در دستگاه ترمومیکسر) و سپس بلافاصله ۲ دقیقه در داخل یخ قرار داده شد. در مرحله بعدی، ۴ μ l بافر تامپون ۱۰X مخصوص آنزیم M-MuLV، ۱ میکرولیتر ۱۸M DTT، ۱ میکرولیتر ۵۰mM $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر

به شوری استفاده شد. در طول مراحل انجام این تحقیق از تریزول شرکت Merck، نژاد باکتری *Escherichia coli* Top10، ساخت cDNA، مارکر VC 1kb DNA Ladder و آنزیم و بافر T4 DNA ligase شرکت ViVantis، PCR Master Mix شرکت Promega، سیستم pGEM-T Vector شرکت Fermentas، کلریدسديم شرکت Merck، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و آغازگرهای 5'-AAGGCTAGCCAGTGTGGA-3' و 3'-AGATGGTGTACTCCACGTCA-5' استفاده شد. pGEM-T یک وکتور خطی با Tی منفرد آویزان انتهایی در انتهای 3' است که به این شکل از حلقوی شدن وکتور جلوگیری کرده و کارایی واکنش لیگاسیون را با فرآورده تکثیری پی.سی.آر تولید شده با دی.ان.ای پلیمرزهای معین مقاوم به حرارت که یک A به انتهای 5' آنها اضافه می‌کنند، افزایش می‌دهد. این وکتور، یک وکتور high-copy-number بوده و شامل پروموتورهای T7 و SP6RNA پلیمرز که در طرفین ناحیه سایت‌های برشی (Multiple Cloning Region) آن قرار دارند، است. ناحیه سایت‌های برشی آن هم در داخل ناحیه کدکننده α -پپتید آنزیم β -گالاکتوزیداز واقع شده است.

کشت گیاهان و اعمال تیمار تنش شوری

در این پژوهش، بذور با تراکم ۸-۱۰ بذر در هر گلدان (گلدان‌های با ظرفیت ۵/۳ لیتر)، که با خاک معمولی پر شده بودند در عمق ۱ سانتی‌متری کشت شدند. سپس به مدت دو هفته، هر گلدان با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب آبیاری معمولی، هر چهار روز یکبار آبیاری شد. پس از دو هفته که گیاهچه‌ها تا ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری رشد کرده بودند تنش شوری به مدت ۱۰ روز با آب نمک با EC ۱۵ ds/m (۸g نمک NaCl در یک لیتر آب مقطر) و سپس به مدت ۵ روز با آب نمک با EC ۱۰ ds/m (۴/۹۶g نمک NaCl در یک لیتر آب مقطر) جهت القا بیان ژن‌های مقاومت به تنش شوری اعمال شد (شکل ۱). پس از این دوره، برگ‌های جوان برداشت شدند و پس از شستشو با آب مقطر بلافاصله مورد استخراج آر.ان.ای قرار گرفتند.

استخراج آر.ان.ای و تعیین کمیت و کیفیت آن

نمونه‌های برگ با استفاده از ازمایع در هاون چینی پودر شده و

باکتری از فریزر -۷۰- درجه سانتی گراد و محصول واکنش لیگاسیون از فریزر -۲۰- درجه سانتی گراد خارج شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس نصف محصول واکنش لیگاسیون (۵ μl) به روی ۵۰ μl سلول مستعد *E.coli* اضافه و به آرامی مخلوط شدند و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها ۴۲ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و به سرعت ۲ دقیقه به روی یخ منتقل شدند. در ادامه ۸۵۰ میکرولیتر محیط کشت LBی مایع بدون آنتی‌بیوتیک به نمونه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۸۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. در نهایت حدود ۲۰۰-۲۰۰ μl از سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده، روی محیط LBی جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب و IPTG و X-Gal کشت شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس کلنی‌های سفیدرنگ با انجام پی.سی.آر روی آنها تایید شدند و با استفاده از روش استخراج پلاسمید پیشنهاد شده توسط بیرن‌بوم و دالی (۱۹۷۹)، که به اختصار Miniprep نامیده می‌شود، مورد استخراج پلاسمید قرار گرفتند. با انجام پی.سی.آر دیگری روی پلاسمیدهای استخراج شده و تایید آنها، برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شدند.

نتایج و بحث

تیمار تنش شوری

با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، رایج‌ترین روش اعمال تنش شوری، با نمک NaCl روی گیاهان رشد کرده در محیط *in vitro* و نمونه‌برداری حدوداً ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش بوده است ولی در این پژوهش سعی شد شرایط اعمال تنش به‌طور تقریبی مشابه شرایط مزرعه‌ای باشد و بنابراین کشت بذور در خاک انجام شد. با در نظر گرفتن این شرایط، که ریشه گیاهان مانند شرایط *in vitro* در تماس مستقیم با محلول نمکی نبوده‌اند پیش‌بینی شد که تنش شوری روی گیاهان نسبت به شرایط *in vitro* دیرتر موثر واقع شود و از این‌رو نمونه‌های برگ‌گی ۱۰ روز پس از اعمال تنش نمونه‌برداری شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

RNasine و ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV به محلول واکنش اضافه شده و نمونه‌ها ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از اتمام این مراحل، cDNA حاصل به نسبت ۱ به ۱ با آب مقطر استریل رقیق شد و از cDNA رقیق شده در واکنش پی.سی.آر استفاده شد. برای نگهداری cDNA ساخته شده، نمونه‌ها در دمای -۲۰- سانتی گراد قرار داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و خالص‌سازی فرآورده تکثیری

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) برای تکثیر ژن مورد نظر از روی cDNA و اثبات حضور فیزیکی ژن در وکتور کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه ۲۰ میکرولیتر واکنش پی.سی.آر، ۴ μl Master mix، ۰/۲ μl آغازگر Forward، ۰/۲ μl آغازگر معکوس و ۵۰ نانوگرم cDNA، به ۱۴/۶ μl آب مقطر استریل اضافه شد. برنامه‌ی استاندارد پی.سی.آر شامل مرحله‌ی واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه مرحله‌ی تکثیر که شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و ۸۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک مرحله‌ی پایانی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. نیمی از فرآورده تکثیری پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند، تا باندهای تکثیر شده، جدا و تجزیه شوند. پس از آنکه باند موردنظر مشاهده شد، باقی‌مانده فرآورده تکثیری پی.سی.آر تایید شده با استفاده از فنل کلروفرم و نمک NaCl ۵ مولار خالص‌سازی و رسوب داده شد.

لیگاسیون قطعات دی.ان.ای

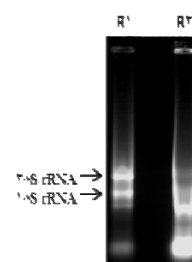
برای اتصال دو قطعه‌ی دی.ان.ای، مواد لازم برای ۱۰ μl واکنش لیگاسیون شامل ۳۰۰-۱۰۰ ng دی.ان.ای وکتور pGEM-T، دی.ان.ای الحاقی (فرآورده تکثیری پی.سی.آر) خالص‌سازی شده به نسبت ۳ برابر وکتور (۹۰۰ ng یا ۱ μl)، ۵ μl بافر T4-DNA ligase ۲×، ۵ واحد آنزیم T4-DNA ligase (۰/۵ μl) و ۳ μl آب مقطر استریل در تیوب استریل ۰/۵ ml ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

استحاله سلول‌های باکتریایی به روش شوک حرارتی (Heat-shock)

برای استحاله به روش شوک حرارتی، ابتدا سلول‌های مستعد

استخراج آر.ان.ای

استخراج آر.ان.ای از نمونه‌های برگ‌ی پودر شده با استفاده از روش ترايزول انجام گرفت. کمیت آر.ان.ای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری به‌طور میانگین $1/276 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ برآورد شد. کیفیت آن هم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل ۲). با توجه به این شکل، تکرار شماره یک آر.ان.ای کیفیت بهتری نشان داد بنابراین برای ساخت cDNA از آن استفاده شد.



شکل ۲- نتیجه‌ی سنجش کیفیت آر.ان.ای استخراج شده. مشاهده‌ی باندهای ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA و عدم وجود حالت اسمیر در نمونه‌های آر.ان.ای استخراج شده، نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب آر.ان.ای است. R1 و R2 دو تکرار مستقل از هم هستند.

Figure 3- Quality assessment of extracted RNA. Observation of 28S and 18SrRNA fragments and absence of smear band in the RNA samples showed the good quality of extracted RNA. R1 and R2 are two independent replications.

تکثیر cDNA جزئی ژن Transferrin

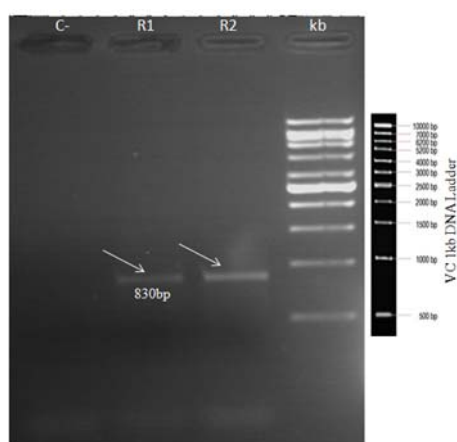
بر اساس روش RT-PCR، پس از ساخت cDNAی گندم، تکثیر cDNA جزئی ژن ترانسفرین با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که براساس توالی‌های موجود در سایت NCBI با کد دسترسی U77059.1 طراحی شده بودند، انجام شد و باند ۸۳۰ جفت بازی که با اندازه‌ی مورد انتظار برای بخشی از ژن ترانسفرین مطابقت داشت، تکثیر شد (شکل ۳).

کلونینگ cDNA تکثیر شده در وکتور pGEM-T

cDNA تکثیر شده از واکنش RT-PCR برای بخشی از ژن ترانسفرین، پس از خالص‌سازی از روی باقی‌مانده محصول پی.سی.آر، در وکتور pGEM-T کلون شد. در این وکتور غیرفعال شدن α -پپتید با وارد شدن دی.ان.ای الحاقی، اجازه شناسایی

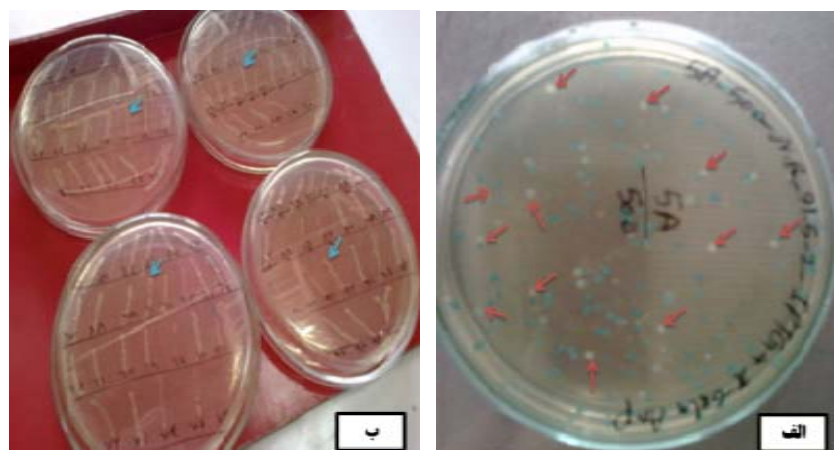
نوترکیب‌ها (کلنی‌های سفید) را از طریق غربال‌گری blue-white می‌دهد (شکل ۴). با استناد به این ویژگی وکتور، تعدادی از کلنی‌های نوترکیب (سفید) انتخاب و درستی واکنش لیگاسیون با انجام پی.سی.آر روی آن کلنی‌ها تایید شد (شکل ۵).

وکتور pGEM-T-TTf به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* انتقال یافته، و سلول‌ها روی محیط حاوی $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ آمپی‌سیلین گزینش شدند (شکل ۴ الف). برخی از قطعات الحاقی که وارد وکتور نشده‌اند ولی در محیط کشت گزینشی بلو-وایت به تصادف در مجاورت کلنی‌های نوترکیب (سفید) قرار گرفته‌اند، ممکن است هنگام انجام واکنش پی.سی.آر روی کلنی، همراه پلاسمید نوترکیب وارد تیوب واکنش پی.سی.آر شده و به‌عنوان الگوی واکنش واقع شوند. برای رفع این احتمال، از هر کلنی نوترکیب مورد نظر از طریق تماس دادن با خلال دندان استریل یک خط به طول تقریبی ۱ سانتی‌متر روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشیده شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش پی.سی.آر برای



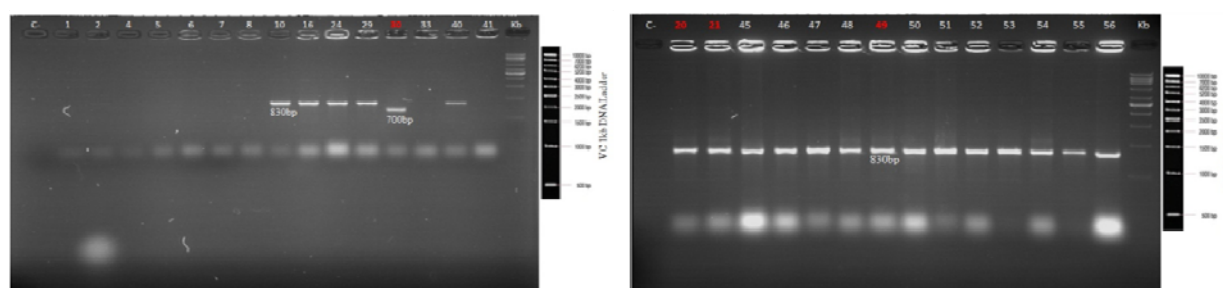
شکل ۳- الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از تکثیر cDNA جزئی ژن ترانسفرین، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده. باند ۸۳۰ جفت بازی که با اندازه‌ی مورد انتظار برای بخشی از ژن ترانسفرین مطابقت داشت، با استفاده از آغازگرهای پیشرو و پسرو تکثیر شد. R1 و R2 دو تکرار مستقل از هم هستند.

Figure 3- Electrophoresis of PCR product Obtained from partial cDNA amplified by using specific primers of transferrin gene. 830 bp fragment in accordance with the expected size of partial transferrin gene amplified by Forward and Reverse primers. R1 and R2 are two independent replications.



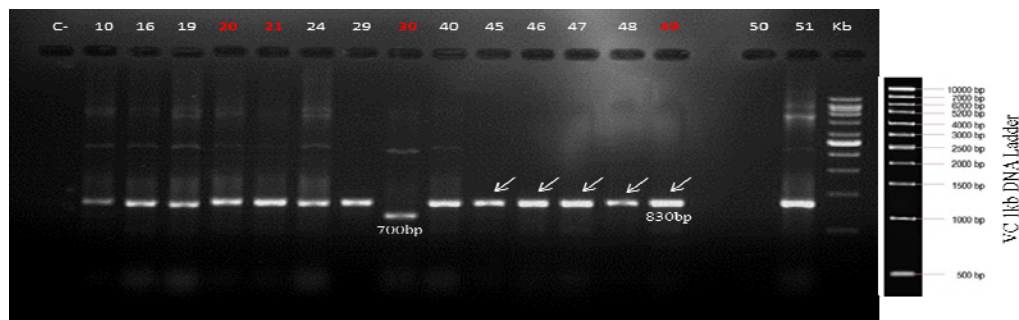
شکل ۴- الف- تصویر باکتری‌های رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین + IPTG + X-Gal، پس از استحالته آنها با وکتور pGEM-T-Ttf. پیکان‌ها برخی از کلنی‌های سفید را نشان می‌دهند. ب- تصویر باکتری‌های رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، پس از کشت دوباره کلنی‌های موجود در شکل ۴ الف با استفاده از خلال دندان استریل. اعداد بالای کلنی‌های خطی، شماره کلنی مربوطه است. پیکان‌ها برخی از کلنی‌های خطی را نشان می‌دهند.

Figure 4- A: Bacteria image was grown on LB medium containing ampicillin + X-Gal + IPTG after transformation with the pGEM-T-Ttf vector. Arrows show some white colonies. B: Bacteria grown on solid LB medium containing ampicillin after colonies re-culture (in 4a figure) using a sterile toothpick. Numbers on the linear colonies is the number of colonies. Arrows show some linear colonies.



شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از بررسی تعدادی از کلنی‌های نو ترکیب رشد کرده روی محیط انتخابی پس از استحالته با محصول لیگاسیون با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی بخشی از ژن ترانسفرین. الف و ب: هر کدام تعدادی از کلنی‌های نو ترکیب که واکنش پی.سی.آر روی آن‌ها صورت گرفته، نشان می‌دهد. مشاهده‌ی باند ۸۳۰bp حضور فیزیکی قطعه کلون شده در کلنی‌ها را تایید می‌کند. Kb: نشانگر اندازه، C-: کنترل منفی، اعداد: شماره بیست و نه کلنی از کلنی‌های رشد کرده در محیط انتخابی، اعداد به رنگ قرمز: شماره کلنی‌هایی که دی.ان.ای پلاسمید آنها برای توالی‌یابی ارسال شده است.

Figure 5- Electrophoresis image of PCR products by using specific Primers for the partial transferrin gene on a few of recombinant colonies grown on the selective medium after transformation with Ligation products. A and B respectively show a number of recombinant colonies was carried out PCR reactions on them. Observation the 830 bp fragment is confirmed physical presence of the amplified fragment in the colonies. Kb: size marker, C-: negative control, Numbers: Twenty-nine number from colonies grown on selective medium, Red numbers: Number of colonies that their DNA plasmid was sent for sequencing.



شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از بررسی تعدادی از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی بخشی از ژن ترانسفرین. مشاهده‌ی باند ۸۳۰bp حضور فیزیکی قطعه کلون شده در کلنی‌ها را تایید می‌کند. Kb: نشانگر اندازه، C-: کنترل منفی، اعداد: شماره شانزده کلنی از کلنی‌های رشد کرده در محیط انتخابی، فلش‌ها: تک‌باند واضح کلنی‌های شماره ۴۵ تا ۴۹، اعداد به رنگ قرمز: شماره کلنی‌هایی که دی.ان.ای پلاسمید آنها برای توالی‌یابی ارسال شده است.

Figure 6- Electrophoresis image of PCR products to a number of recombinant plasmid by using specific primers of the transferrin gene. Observation of 830 bp fragment confirmed physical presence of the amplified fragment in the colonies. Kb: size marker, C-: negative control, Numbers: Sixteen colonies grown on selective medium, Arrows: Obvious band of 45 to 49 colonies, Red numbers: Colonies that their DNA plasmid was sent for sequencing.

TCGCTAGCCAGTTTGGAAAGTTCCTCTCTTTTATTTAAACCTGTGCGGCTTAGACTGGCGGGCTAGGTTTACTCACTCTTTCT
GCGGAGATTGTTATCGCTGGATATCTTGGCCCTGCCACGAGGTACTCGCGCTTGTCTTTCTTTCCCTGAAATCTGATGAGCAC
AGTTACCAATAATTACCATGACCCCTAGTGTCTACATGTCATTTCCTACGTTTTGTATCTTGTGCTTTGTGATTAGTTTCC
CCCTTATCAATAATCTTTACTGGGAGCCTTCGGAGGAGAGAACTCGGCTGCTTTATATGGCCAACAGGATACCGTAATTCTGG
AAACTGTTTTTCAAGAAAAGCGCGGGCTGCCAGTTGCGGGCGTATTGAGGTGGCTCCTTTCCCCAGGGAGTAAATGAACT
GCCAGGCCTCGAAGAGTAAGCCAGCTATATTCCTTCAATGACCATGACAGCAGTTCTTGTCTTAAGCATGCGTCTTCT
CGCCGGGCTCAAACCTGGTGATTGCTCCTCTCGGGGATCAACAGAGCCTGAAATGACAATCTTGTCTCTATGCTGGTTTC
ACTGTCCAGGGAGTGTCCCTCTTCCTCATTCTCGCAGTGTACTTGTCAAATACACTGCCTGTCTCCTGCCCCATCACCGTT
TCGATCAGGGTAACGATTCTTGTCTTTCTTTTAAAA

شکل ۷- توالی کلنی شماره ۴۹.

Figure 7- No. 49 colony Sequence.

استخراج پلاسمید انتخاب شدند. پس از استخراج پلاسمید، برای تایید نهایی حضور cDNA کلون شده، پی.سی.آر دیگری روی دی.ان.ای پلاسمید استخراج شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در کلونینگ انجام شد. نتیجه این واکنش نشان داد که قطعه‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۸۳۰ جفت باز در این وکتور کلون شده است (شکل ۶). بنابراین، تعداد ۴ عدد از نمونه‌های دی.ان.ای وکتور حاصل برای تعیین توالی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شد.

نتایج توالی‌یابی cDNA کلون شده

برای بررسی توالی cDNA کلون شده، ۴ نمونه از پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های ارزیابی شده در مراحل قبلی، جهت توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شد. نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با بخشی از توالی ثبت شده برای cDNA ژن

تایید کلنی‌های نوترکیب روی این کلنی‌های جدید انجام گرفت (شکل ۴ ب).

مراحل تایید کلنی‌ها برای حضور بخشی از ژن ترانسفرین پس از

استحاله *E. coli* با وکتور Ttf - pGEM-T

با توجه به اینکه توالی‌یابی قطعه cDNA کلون شده برای بخشی از ژن ترانسفرین هنوز مشخص نشده بود، بنابراین تعدادی از کلنی‌های رشد کرده پس از واکنش استحاله با پلاسمید pGEM-T -Ttf (حداقل ۲۹ کلنی) برای تایید وجود قطعه‌ی کلون شده در دو مرحله آزمایش شدند. بدین ترتیب که ابتدا کلنی‌های انتخاب شده به روش پی.سی.آر و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در کلونینگ، مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۵). در مرحله‌ی دوم، تعدادی از کلنی‌هایی که در پی.سی.آر مثبت بودند (باند مورد نظر را نشان دادند) برای

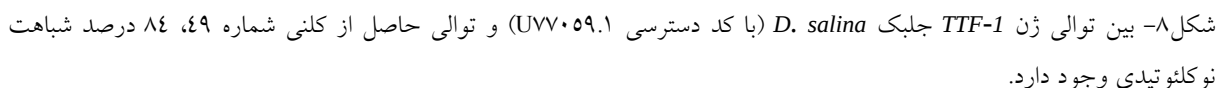


Figure 8- There is 84% nucleotide similarity between TTF-1 gene sequence of *D. salina* (with 77059.1U access code) algae and sequence of No. 49 colony.

(2013).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به شباهت سیستم‌های گیاهی و جلبک‌ها، جفت آغازگر مورد استفاده در این پژوهش بر اساس توالی CDS ژن *Ttf-1* (با کد دسترسی U77059.1) طراحی شد. با استناد به نتیجه این پژوهش و تشابهاتی که بین ژن‌های ترانسفرین انسانی و جلبک *D. salina* وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که توالی کلنی شماره ۴۹ به یک ژن ترانسفرین در گیاه گندم زراعی تعلق دارد. این اولین گزارش از وجود ژن ترانسفرین در سیستم گیاهان عالی است. البته با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر وجود ژن ترانسفرین در سیستم گیاهان عالی وجود ندارد، لازم است این آزمایش با استفاده از همین جفت آغازگر و آغازگرهای دیگر این ژن، تکرار و مجدداً تایید شود. لازم به ذکر است با اینکه اندازه‌ی باند مربوط به کلنی شماره ۴۹ در روی ژل آگارز ۸۳۰ جفت باز بوده ولی فقط ۷۰۹ جفت باز آن قرائت شده و بقیه به علت قطع شدن چارچوب قرائت، توالی‌یابی نشده است.

با اثبات وجود ژن ترانسفرین در گیاهان، دیگر نیازی به تولید گیاهان تراریخته این ژن نخواهد بود و هم‌چنین پروتئین ترانسفرین گیاهی نسبت به ترانسفرین‌های جانوری که خطر آلودگی به پاتوژن‌های انسانی را دارند، برای کاربردهای پزشکی ایمن‌تر خواهد بود.

تشکر و قدردانی: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر در اختیار قرار دادن امکانات مالی این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Cohen C K, Fox T C, Garvin D F, Kochian L V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072.
2. Connolly E L, Guerinot M L. 2002. Iron stress in plants. *Genome Biology* 3(8): 1024.1-1024.4.
3. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish H F. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Cell Biology* 80:2258-2262.
4. Fisher M, Gokhman I, Pick U, Zamir A. 1997. A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *The Journal*

of Biological Chemistry 272(3-17): 1565-1570.

ترانسفرین در سایت NCBI (شماره دستیابی U77059.1) با استفاده از نرم‌افزار آنالین MultAlin مقایسه شد (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). نتایج بدست آمده نشان داد که یک مورد از توالی‌های تجزیه شده، با ۸۴ درصد شباهت، منطبق بر توالی ثبت شده بودند (شکل ۸). توالی کلنی شماره ۴۹ در شکل ۷ مشاهده می‌شود.

ترانسفرین سرم انسانی کاربرد گسترده‌ای در محیط‌های کشت سلولی برای تولید پروتئین‌های زیست دارویی و واکسن‌ها (برای اطمینان از تجهیز سلول‌ها به آهن) دارد و هم‌چنین استفاده از آن به‌عنوان یک سیستم درمانی و رهاسازی هدفمند دارو (با توجه به حضور گیرنده ترانسفرین در تمام سلول‌ها به استثناء سلول‌های بسیار تمایز یافته) برای درمان تعدادی از بیماری‌ها در حال بررسی و کشف است. در حال حاضر به دلیل نگرانی‌های ناشی از آلودگی‌های عوامل پاتوژنیک ترانسفرین حاصل از پلاسمای انسانی، تولید ترانسفرین نوترکیب انسانی در سیستم‌های بیان هترولوگوس گوناگون مورد هدف واقع شده است. به‌عنوان مثال ترانسفرین نوترکیب انسانی فعال از نظر زیستی، در دانه‌های برنج (*Oryza sativa* L.) در یک سطح بیان بالا تولید شده است (تقریباً ۴۰ درصد کل پروتئین محلول یا ۱ درصد وزن خشک دانه) و هم‌چنین در گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum* L.) بیان ترانسفرین نوترکیب انسانی فعال از لحاظ زیستی، به‌طور معنی‌داری کمتر بود (۰/۲۵ درصد کل پروتئین محلول). ولی با این حال هزینه بالا و عملکرد محدود ترانسفرین نوترکیب از چالش‌های اصلی بسیاری از سیستم‌های بیان است (Zhang,

Of Biological Chemistry 272(3-17): 1565-1570.

5. Fisher M, Zamir A, Pick U. 1998. Iron uptake by the halotolerant alga *Dunaliella* is mediated by a plasma membrane transferrin. *The Journal Of Biological Chemistry* 273(28): 17553-17558.
6. Jithesh M N, Prashanth S R, Sivaprakash K R, Parida A K. 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics* 85(3): 237-254.
7. Katz A, Waridel P, Shevchenko A, Pick U. 2007. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella alina* as revealed by blue native gel electrophoresis and Nano-LC-MS/MS

- analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1459-1472.
8. Lamberta L A, Perri H, Halbrooks P J, Masonb A B. 2005. Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Biochemistry and Molecular Biology* 142(2):129-141.
 9. Laskey J, Webb I, Schulman H M, Ponka P. 1988. Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Experimental Cell Research* 176(1):87-95.
 10. Litwin C M, Calderwood S B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Review* 6(2):137-149.
 11. Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Lizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K. 2008. A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20(11): 3148-3162.
 12. Paz Y, Shimoni E, Weiss M, Pick U, 2007. Effects of iron deficiency on iron binding and internalization into acidic vacuoles in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 144(3): 1407-1415
 13. Pick U, Katz A, Weiss M, Levine E, Paz K, Ventrella R. 2006. Survival at extreme salinity and iron deficiency. *Life Sciences* 200-202.
 14. Ponka P, Lok C N. 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. *International Journal Biochem Cell Biology* 31(10):1111-1137.
 15. Qin J, Dong W Y, He K N, Yu Y, Tan G D, Han L, Dong M, Zhang Y Y, Zhang D, Li A Z, Wang Z L. 2010. NaCl salinity-induced changes in water status, ion contents and photosynthetic properties of *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. Seedlings. *Plant Soil Environment* 56(7): 325-332.
 16. Schwarz M, Sal-Man N, Zamir A, Pick U. 2003. A transferrin-like protein that does not bind iron is induced by iron deficiency in the alga *Dunaliella salina*. *Biochimistry Biophysics Acta* 1649(2):190-200.
 17. Turan M A, Hassan A, Elkarim A, Taban N, Taban S. 2010. Effect of salt stress on growth and iron distribution and accumulation in shoot and root of maize plant. *African Journal of Agricultural Research* 3(7): 584-588.
 18. Zhang D. 2013. Plant seed-derived human transferring: expression, characterization, and applications. *OA Biotechnology* 2(2):17.

