

شناسایی و همسانه‌سازی ژن داخلی مناسب پنبه در راستای افزایش کارایی بررسی‌های 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 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 تراریخته از اهمیت فراوانی برخوردار است. در این پژوهش، ژن *Sad1* به‌عنوان یک ژن داخلی بالقوه در پنبه ارزیابی گردید. ابتدا DNA ژنومی استخراج گردید و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده 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 نو ترکیب 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 جفت‌بازی 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 *Sad1*

مقدمه

با گسترش چشمگیر زیست‌شناسی مولکولی و توسعه فنون و ابزارهای مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 DNA الگو است. معتبرترین و گسترده‌ترین روش‌های ارزیابی کیفیت اسید نوکلئیک علاوه بر NanoDrop، استفاده از ژن داخلی مناسب است (Scholtens et al., 2013). ژن داخلی مناسب علاوه بر اینکه در ارزیابی کیفیت DNA الگو نقش دارد در نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن نیز مهم است.

برای تشخیص موجودات تغییر یافته ژنتیکی، یک ژن داخلی مرجع به‌عنوان استاندارد برای تایید شناسایی گونه مورد نظر و تعیین کیفیت DNA ژنومی کل مورد نیاز است. مطالعات مختلفی برای دستیابی به ژن داخلی مرجع در گیاهان انجام شده است و چندین ژن داخلی برای گیاهان از جمله ژن‌های *zssIIb* و *invertase1* (Hernandez et al., 2004؛ Pan et al., 2006؛ Terry and Harris, 2001؛ Van Duijn et al., 1999)، ژن- سویا *BnACCg8*، *cruciferin* یا *HMGLY* در کلزا (Hernandez et al., 2001؛ Weng et al., 2005)، *LAT52* و *Mcp1* 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؛ Yang et al., 2007؛ 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). علاوه بر 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 نتایج 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* مورد بررسی و تأیید قرار دادند. ژن *Sad1* دو نسخه در هر ژنوم هاپلوئید پنبه دارد و رمزکننده یک پروتئین غیراشباع حامل اسید-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 برگ گیاهچه‌های جوان در مرحله ۲-۳ 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 نانودراپ ارزیابی شد. همچنین کیفیت DNA استخراجی با ژل آگارز ۰/۸ درصد نیز سنجیده شد.

تراریخته سازی سلول‌های باکتری *E. coli* با پلاسمید نوترکیب pTZ57R به روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام شد. برای تشخیص سریع پلاسمید نوترکیب، به طور 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 استخراج شده با آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای M13 برای تأیید بیشتر حضور قطعه هدف در پلاسمید pTZ57R/T انجام شد. پس از توالی‌یابی قطعات، توالی‌های اضافی مربوط به ناقل به نرم‌افزار Vector NTI از توالی اصلی حذف شدند. هم‌ردیفی توالی‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. همچنین، این دو توالی به وسیله نرم‌افزار Vector NTI با هم هم‌ردیف شدند و خصوصیات آنها با هم مقایسه گردید.

نتایج

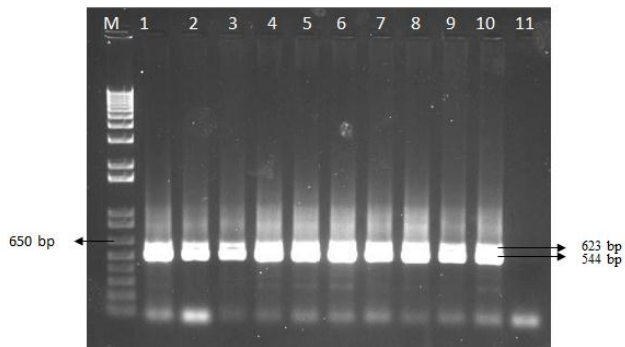
پس از تأیید کمیت و کیفیت DNA استخراجی، از ژن داخلی به‌عنوان یک کنترل داخلی برای تأیید مجدد کیفیت DNA ژنومی استفاده می‌شود. با آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی *SadI* واکنش PCR انجام گرفت. تمامی نمونه‌های DNA استخراج شده یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مربوط به ژن داخلی نشان دادند و در نمونه فاقد DNA (آب) هیچ تکثیری صورت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

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

تکثیر قطعه‌ای از ژن داخلی پنبه (*SadI*) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (5'-GGTATAGGCTGTCTGGTG3' و 3'-ATCGTGTACGTAGTGGTG3' - R) 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 میلی-مولار)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq DNA polymerase*، ۱ میکرولیتر DNA 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.

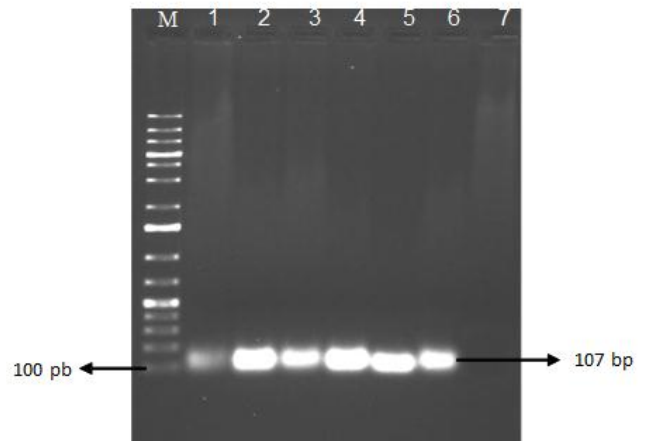
تفکیک محصولات واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت. با استفاده از آغازگرهای *SadI*، یک نوار ۱۰۷ جفت بازی مشاهده شد. به دلیل کوچک بودن اندازه نوار حاصل و عدم امکان تشخیص نوار حاصل از آغازگر دایمر، توالی ژن *SadI* از پایگاه داده NCBI دریافت و جفت آغازگر جدید (F- 5'GTAGTGCTCAAGGTAGGTTTC و R- 5'GTGGTCTGTCCGATATGG) برای ژن *SadI* طراحی شد که دو قطعه طولی‌تر 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 *SadI* 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* پلیمرز صورت می‌گیرد، وابسته است. واکنش اتصال و همسانه‌سازی بر اساس دستورالعمل همسانه‌سازی ناقل pTZ57R/T (شرکت فرمتاز) انجام شد.



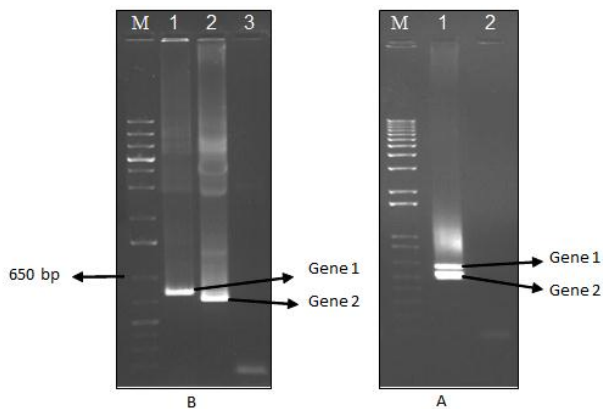
شکل ۲- تأیید کیفیت DNA ژنومی پنبه با استفاده از آغازگرهای جدید ژن *sad1* چاهک‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به گیاهان پنبه است و چاهک ۱۱ فاقد DNA (آب) است.

Fig. 2. Quality confirmation of cotton genomic DNA using new primers of *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.

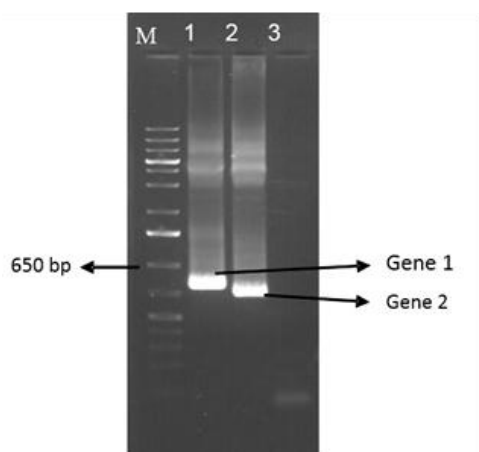
Fig. 1. The PCR products for *Sad1* gene with specific primers on a 1% agarose gel. Lanes 1 to 6: cotton plant samples and lane 7: sample without DNA (water).



شکل ۳- الف- 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.

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 ۶۲۳ و ۵۴۴ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۲). در ابتدا تصور شد که یکی از نواریها 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 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 توالی‌یابی شدند. دو نوار جداسازی و تخلیص‌شده در شکل ۳ بررسی کیفیت و کمیت گردید.



شکل ۵- محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آغازگرهای M13. Lane 1: 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.

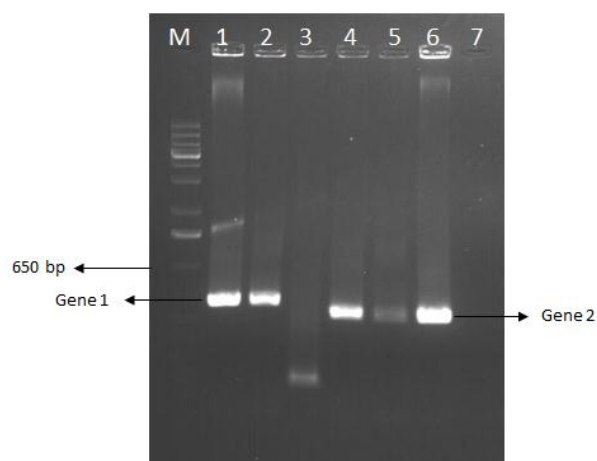
Fig. 5. PCR product of recombinant plasmids using the primers M13. Lane 1: recombinant plasmid containing a 633 bp DNA fragment. Lane 2: recombinant plasmid containing a 544 bp DNA fragment and lane 3: negative control (water) test.

در انتها آنالیز توالی یابی قطعات ۵۴۴ و ۶۳۳ جفت بازی ژن *Sad1* نشان داد که این ژن دارای دو نسخه در ژنوم 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. به دلیل کوچک بودن اندازه محصول تکثیرشده (۱۰۷ جفت باز)، مجدداً آغازگرهای جدید طراحی شدند. ولی محصول واکنش PCR شامل دو قطعه DNA با اندازه‌های نزدیک به هم (۵۴۴ و ۶۳۳ جفت باز) بود. با وجود 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

پس از همسانه‌سازی قطعات، برای تأیید حضور قطعات در پلاسمید از PCR کلونی استفاده گردید (شکل ۴). شکل ۴ نشان‌دهنده نتایج آزمون PCR کلونی برای تأیید پلاسمیدهای نوترکیب حاوی نوارهای ۶۳۳ و ۵۴۴ جفت بازی ژن *Sad1* است. برای تأیید بیشتر پلاسمیدهای نوترکیب، مجدداً واکنش PCR با آغازگرهای M13 انجام شد. شکل ۵ نشان‌دهنده 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 موردانتظار مشاهده شد که نشان‌دهنده صحت آزمایش بود. آنالیز هم‌ردیفی نشان داد که بیشترین هم‌پوشانی قطعه ۵۴۴ جفت بازی با ژن *sad1* در ژنوم *Gossypium hirsutum* در حدود ۶۵ درصد است که در ناحیه هم‌پوشان، میزان همسانی ۹۴ درصد با $E \text{ value}=0.000$ مشاهده شد. هم‌ردیفی قطعه ۶۳۳ جفت بازی نتایج مشابهه ارائه داد به طوری که ۸۵ درصد با ژن *Sad1* در ژنوم *Gossypium hirsutum* مشابهت داشت که میزان همسانی در ناحیه هم‌پوشان ۹۵ درصد با $E \text{ value}= 3e^{-156}$ 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).

صورت که اگر نمونه ژن داخلی از استاندارد تعریف‌شده 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 تراریخته 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 تراریخته ایجاد کرد.

به‌طور 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 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.

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 *Jvr*، *Pa*، *Sad1*، *sps*، *Lec* و *FatA* به ترتیب در گیاهان تراریخته رایج شامل پایایا (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 به دست آمده دست یافت. مثلاً در گل کلم Bt ژن *cryIAC* (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 *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 دستگاه پی برد. به این



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 *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-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, Zaaier 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, Poppelman 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 *SadI* gene as a potential reference gene in cotton. At the first, DNA was extracted, and then a PCR reaction was done using appropriate primers designed for Vector NTL. 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 appropriate 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