

غربالگری موتاسیونی آراییدوپسیس ترا ریخته در مسیر ژنتیک فعالیت

نواحی کنترلی ژن متالوتایونین جو

سعید نواب پور^{۱*} و حسین صبوری^۲

۱- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گنبد

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

جو زراعی
نوترون پرسرعت
موتاسیون
پیشبر متالوتایونین
ژن گاس

به منظور بررسی تغییرات عوامل انتقال پیام در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین جو از روش غربالگری موتاسیونی استفاده شد. با شناسایی ناحیه پیشبر ژن مزبور در گیاه جو و ترکیب آن با ژن گزارشگر گاس، انتقال ترکیب حاصل به گیاه مدل آراییدوپسیس صورت گرفت. بذور M_0 ترا ریخته حاصله توسط ۴ دوز (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ واحد) نوترون پرسرعت بمباران شدند. بر اساس نتایج آماری در یک طرح کاملاً تصادفی ترکیب شیمیایی تری آمینوترایزول (3-AT) در غلظت ۲۰ میلی مولار به عنوان بهترین محرک فعالیت ژن گاس (پیشبر متالوتایونین) شناسایی شد. گیاهچه‌های نسل M_2 ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی با 3-AT غلظت ۲۰ میلی مولار برای تفرق نسبت ۳ به ۱ بیان ژن گاس با کمک روش سنجش بیوشیمیایی پروتئین گاس ارزیابی شدند. از مدل ممانعت که نسبت ۷۵ درصد بیان گاس و ۲۵ درصد عدم بیان را شامل می‌شد، جهت شناسایی عوامل کنترلی استفاده شد. طی چندین نوبت ارزیابی تعداد ۳۰ گیاهچه ۱۵۰۰ لاین جهیده M_2 بررسی شد. در نهایت ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسب برای جهیده مورد نظر در مسیر فعالیت پیشبر مزبور معرفی شد. ترکیب لاین‌های کاندید شامل ۳، ۹، ۵ و ۳ بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای ۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۴۰ واحد نوترون پرسرعت بودند. لاین‌های مزبور جهت بررسی دقیق‌تر با استفاده از روش طیف‌سنجی فعالیت پروتئین گاس مورد ارزیابی قرار گرفته و به عنوان جهیده‌های احتمالی در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین جهت انجام پژوهش‌های بعدی معرفی شدند.

مقدمه

ژن‌های گزارشگر^۶ بسیار مفید و مؤثر است (Fukuzawa *et al.* 2004).

معرفی جهیده‌های *cpr1* و *nrpl* آراییدوپسیس که با استفاده از پیشبر ژن *PR1a* که با ژن گزارشگر *gus* ترکیب شده بودند، از جمله مثال‌های موفق این روش هستند (Cao *et al.* 1994; Glazebrook 1997). جهیده *nrpl* مانع بیان ژن مقاومت *VPR* به عامل بیماری‌زا شده و افزایش حساسیت به بیماری را موجب می‌شود. در مقابل جهیده *cpr1* با تداوم بیان پروتئین *PR* مقاومت پایداری را ایجاد می‌کند. استفاده از جهیده‌های مزبور منجر به معرفی مسیرهای کنترل ژنتیک توسط اسید سالیسیک به‌عنوان یک عامل انتقال پیام شد (Van Loon 1999; Pieterse and Old and Primrose 1994). در این پژوهش پیشبر ژن متالوتایونین در گیاه جو شناسایی و پس از همسانه سازی ضمن ترکیب با ژن گزارشگر *gus*، به گیاه مدل آراییدوپسیس منتقل شد. بذور جهیده *M2* به منظور یافتن نسبت جهشی ۳ به ۱ (برای بیان و عدم بیان *gus*) در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر مزبور ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

بذور *M0* گیاهان تراریخته آراییدوپسیس (رقم کلمبیا) واجد پیشبر متالوتایونین ترکیب شده با ژن گزارشگر گاس توسط چهار دوز نوترون پرسرعت (d)، پرتوتابی شدند. دوزهای اعمال شده شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گری^۱ بود. با کشت بذور *M0* در شرایط اتاقک رشد کنترل شده، بذور *M1* برداشت و پس از آن بذور *M1* جداگانه کشت و بذور *M2* به‌طور جداگانه برداشت شدند. با ارزیابی تصادفی گیاهان *M2* از تأثیر پرتوتابی در بروز جهش اطمینان حاصل شد. بازه‌ای از عوامل شیمیایی احتمالی فعال‌کننده پیشبر متالوتایونین (بیان ژن گاس) مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت ترکیب تری آمینوترایزول (3-AT) به‌عنوان بهترین محرک شناسایی شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار مورد استفاده قرار گرفت. با انجام یک سری آزمایش‌های تکرار دار و تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد نتایج حاصل از اثر (3-AT) بر بیان

گروه ژن‌های متالوتایونین (MTs) رمز کننده پروتئین‌هایی با خصوصیتی چون وزن مولکولی پائین، غنی از اسید آمینه سیستئین، وفور در محیط سلولی و اغلب اندامک‌ها و وجود یک یا چند ناحیه حساس در واکنش به یون‌های فلزی هستند (Colye *et al.* 2002). از حدود ۵۰ سال گذشته که متالوتایونین از کلیه اسب استخراج شد تا به امروز بیش از ۲۰۰ نوع متالوتایونین در موجودات مختلف پست و عالی شناسایی شده‌اند (Cobbett Goldsbrough. 2002; Zhou *et al.* 2005). تقسیم‌بندی‌های متفاوتی بر اساس ساختمان و نوع فعالیت این پروتئین صورت گرفته است (Chatthai *et al.* 2004; Liu *et al.* 2000). نقش متالوتایونین در سمیت‌زدایی یون‌های سمی فلزی و حفاظت سلول‌ها با ایجاد شرایط هموستاتیک ثابت شده است (Akashi *et al.* 2004; Wong *et al.* 2004). در عین حال شواهد انکار ناپذیری دال بر نقش این ژن در کمک به بقای سلول در مرحله پیری به‌منظور امکان انتقال مواد و ماکرومولکول‌ها به اندام‌های ذخیره‌ای به‌ویژه دانه گزارش شده است (Navabpour *et al.* 2003). بررسی نواحی ژن متالوتانین در برخی موجودات از جمله انسان، موش، مخمر و آراییدوپسیس با ژن گزارشگر گاس انجام شده است (Haq *et al.* 2004; Navabpour *et al.* 2003; Wong *et al.* 2003).

استفاده از غربالگری جهشی یک روش قوی جهت شناسایی و در پی آن همسانه کردن ژن یا گروهی از ژن‌ها که در سطح پیش رونویسی^۱ فعالیت می‌کنند، است. در اساس در بیشتر موارد امکان شناسایی ژن‌هایی که به‌عنوان عوامل انتقال پیام^۲ یا عوامل رونویسی^۳ عمل می‌کنند، با استفاده از روش‌های مرسوم مولکولی مثل روش شناسایی تفرقی^۴ یا دورگ‌سازی کاهشی^۵ وجود ندارد (Hsing *et al.* 2007; Lee *et al.* 2005). در عین حال روش غربالگری موتاسیونی معمولاً روشی طولانی و وقت‌گیر است، به منظور افزایش کارایی و سرعت عمل در این روش استفاده از

- 1 -Pre-transcription
- 2 -Signaling factors
- 3 -Transcription factors
- 4 -Differential screen
- 5 -Subtractive hybridization

- 6 -Reporter gene markers
- 7 -Pathogen resistance
- 8 -Grays

سانتریفیوژ شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول فوقانی برداشت و با ۴۴ میکرولیتر بافر سنجش گاس به خوبی مخلوط شد. واکنش با افزودن مقدار ۵۰ میکرولیتر متیل آمبلی فریل گلوکوناید (MUG) ۱۰mM آغاز شد. توضیح اینکه ترکیب MUG بوسیله فعالیت آنزیم ژن گاس به MU و X-Gluc تجزیه می شود. ترکیب MU یک ماده فلورسنت بوده و توسط فلورسنت اسپکترومتر اندازه گیری شد. بالا بودن میزان MU نشان دهنده فعالیت بالاتر گاس بوده که به نوبه خود نشانه فعالیت پیشبر متالوتایونین است. میزان جذب بر اساس طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر توسط دستگاه جذب فلئومترنوری (Prink Elmer 3000 Fluorescence Spectrometer) اندازه گیری شد. نتایج بر حسب منحنی استاندارد بر حسب واحد (nmoles MU/min/mg protein) تنظیم شد.

نتایج و بحث

تعداد ۳۰ گیاهچه از حدود ۱۵۰۰ لاین M₂ با استفاده از روش سنجش بیوشیمیایی گاس برای نسبت ۳ به ۱ (فعالیت و عدم بیان ژن گاس) ارزیابی شد. از مدل ممانعت (Inhibition Model) در جهت شناسایی جهیده های مورد نظر استفاده شد (شکل ۱). نتایج بررسی آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور تعیین بهترین سطح غلظت (3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazole) در دو شرایط اتافک رشد (A: ۲۲±۲ درجه سلسیوس و B: ۲۲±۲ درجه سلسیوس) نشان داد که غلظت ۲۰ میلی مولار در شرایط A بهترین و یکنواخت ترین نتایج را برای القاء فعالیت پیشبر متالوتایونین فراهم می آورد. ترکیب 3-AT به عنوان یک محدود کننده فعالیت آنزیم کاتالاز معرفی شده است (Sanchez-Casas and Klessig, 1994). آنزیم کاتالاز در فرآیند احیا پراکسید هیدروژن (H₂O₂) به آب و اکسیژن نقش مهمی دارد (Kindle 1982). بر این اساس به نظر می رسد کنترل سطح H₂O₂ در روند تحریک فعالیت گاس و به بیان دقیق تر القای فعالیت پیشبر متالوتایونین، نقشی کلیدی دارد. در روند انجام غربالگری به منظور افزایش دقت، لاین های جهیده ای که شانس احتمالی داشتند طی ۴ مرحله ارزیابی شدند و در نهایت تعداد ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسبی برای داشتن جهیده دلخواه در مسیر فعالیت پیشبر متالوتایونین شناسایی شد. ترکیب تعداد لاین های کاندید شامل ۳، ۹، ۵ و ۳ بود که به ترتیب

گاس در گیاه کامل شباهت قابل توجهی به روند بیان آن در گیاهچه های مربوطه دارد، بر این اساس به منظور سرعت عمل بیشتر از گیاهچه های نسل M₂ استفاده شد. تعداد ۳۰ گیاهچه ۲۰ روز پس از کشت، توسط محلول پاشی 3-AT با غلظت ۲۰ میلی مولار تیمار شد. میزان فعالیت ژن گاس ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی توسط روش بیوشیمیایی برای نسبت ۳ به ۱ (بیان و عدم بیان گاس) ارزیابی شد.

سنجش بیوشیمیایی فعالیت گاس^۹

نمونه های برگ به طور جداگانه در محلول بافر X-Gluc (بافر فسفات سدیم ۵۰mM، 1mM X-Gluc، تریتون X-۱۰۰، فریسیاناید پتاسیم ۴mM و کلروم فنیک ۱۰۰g/mL) قرار گرفت. در همین وضعیت به مدت ۴ دقیقه اینفیلتر^{۱۰} شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس بافر حذف شد و اتانول مطلق به منظور از بین بردن رنگ سبز برگ ها جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت اتانول حذف و گلیسرول ۵۰٪ جایگزین شد و در نهایت میزان فعالیت گاس (میزان رنگ آبی ظاهر شده) با لنز بزرگنما بررسی شد. هم چنین درصد سلول های مرده نیز به وسیله میکروسکوپ فلئورسنت ارزیابی شد.

اندازه گیری میزان فعالیت مارکر گاس ژن^{۱۱}

سنجش میزان فعالیت آنزیمی ژن گاس که نشان دهنده میزان فعالیت پیشبر متالوتایونین است، توسط روش جفرسون و همکاران (۱۹۸۷) (Jefferson et al. 1987) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد.

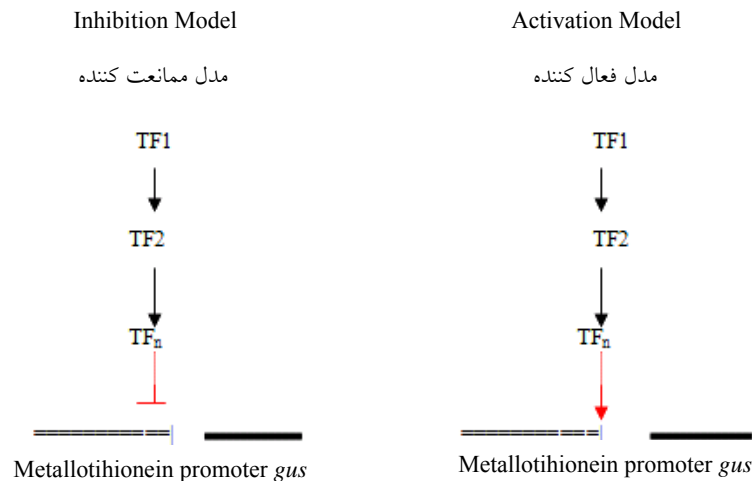
نمونه کوچک بافت برگ گیاه کامل جهیده های (M₂) کاندید (انتخابی با استفاده از سنجش بیوشیمیایی) برداشت و میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر سنجش گاس (بافر سدیم ۵۰mM (pH=۷/۲) EDTA ۱۰، سارکوزیل^{۱۲} ۰/۱ درصد، تریتون ۱۰۰ بار ۰/۱ درصد، مرکاپتواتانول ۱۰mM) اضافه و به طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط هموژنیزه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه

9 -Histochemical analysis

10 -In filter

11 -Fluorometric analysis of β -glucuronidase activity

12 -Sarcosyl



شکل ۱- مدل‌های فرضی روش ارزیابی فعالیت پیشبر ژن متالوتاینین. در مدل ممانعت (Inhibition Model) در آخرین مرحله با جلوگیری از ساخت عامل رونویسی بیان ژن رخ می‌دهد و در مدل فعال کننده (Activation Model) در مرحله آخر با ساخت عامل رونویسی فعالیت پیشبر محقق می‌شود.

Figure 1- Putative models for expression of metallothionein promoter. In the inhibition model transcription changes result in lifting the repression and in activation model transcription changes that result in the activation.

مربوط به اعمال تیمارهای با غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ واحد نوترون پرسرعت (d) بودند. لاین‌های مزبور برای انجام بررسی دقیق‌تر تا مرحله گیاه کامل با مراقبت ویژه نگهداری شدند. در مرحله حداکثر رشد رویشی (آغاز گلدهی) با نمونه‌برداری از ۳۰ گیاه کامل هر لاین، طیف سنجی میزان MU صورت گرفت. نتایج مربوط در جدول ۱ برای هر یک از ۲۰ لاین کاندید انتخابی ارائه شده است. چنانچه اشاره شد محدوده نسبت ۳ به ۱ برای بیان GUS (مقدار نسبتاً بالای MU) به عدم بیان (مقدار نسبتاً پایین MU) می‌تواند دلیل موجهی بر وقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک بیان ژن متالوتاینین تلقی شود.

تعداد ۵ جهیده که با علامت ستاره در جدول ۱ مشخص شده است با اطمینان آماری معنی‌داری ($\alpha=1\%$) نسبت ۳ به ۱ را برای میزان MU (فعالیت گاس) و عدم بیان گاس نشان می‌دهد. این مسئله نشانگر شانس بیشتر این جهیده‌ها برای وقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر ژن متالوتاینین است. بر این اساس جهیده‌های مزبور به نسل بعد برده شده و ارزیابی‌های انجام شده و یکنواختی نتایج به دست آمده نشان داد دو جهیده

د₂₀(10) و d₃₀(5) کاندیدهای خوبی برای انجام بررسی‌های بیشتر مولکولی و پژوهش‌های بیوانفورماتیک هستند. نتایج پژوهش‌های برخی پژوهشگران نشان داده است که تجزیه و تحلیل پیشبر ژن متالوتاینین ترکیب شده با ژن نشانگر گاس پیچیده بوده و توسط عوامل مختلف درون سلولی و محرک‌های خارجی تحریک می‌شود (Lü et al.2007; Obertello et al.2007). براساس نتایج پژوهش‌های رن و ژو (۲۰۰۹) این مسئله به دلیل وجود عناصر همسوساز^{۱۳} در نواحی کنترلی ژن متالوتاینین است (Ren 2009).

10. Jefferson R.A. Kavanagh T.A. Bevan M.W (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
11. Kindle H. Lazarow (eds) P.B (1982) Peroxisomes and glyoxisomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 385: 1-550.
12. Lee J.Y. Levesque M. Benfey P.N (2005) High-throughput RNA isolation technologies. New tools for high-resolution gene expression profiling in plant systems. *Plant Physiology* 138: 585–590.
13. Liu J.Y. Lu T. Zhao N.M (2000) Classification and nomenclature of plant metallothionein-like proteins based on their cysteine arrangement patterns. *Acta Botanica Sinica* 42:649–652.
14. Lü S. Gu H. Yuan X. Wang X. Wu A.M. Qu L. Liu J.Y (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissuespecific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Research* 16: 177–191.
15. Navabpour S. Morris K. Allen R. Harrison E. Mackerness S. and Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence –enhanced genes in response to oxidative stress. *Experimental Botany* 54(391) :2285 -2292.
16. Obertello M. Wall L. Laplaze L. Nicole M. Auguy F. Gherbi H. Bogusz D. and Franche C (2007) Functional analysis of the metallothionein gene *cgMT1* isolated from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Mol. Plant Microbe Interact* 20: 1231-1240.
17. OLD R.W. and Primrose S.B (1994) Principles of gene manipulation and introduction to genetic engineering P 474.
18. Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Sciences* 4: 52-58.
19. Ren Y. and Zhao J (2009) Functional analysis of the rice metallothionein gene *OsMT2b* promoter in transgenic *Arabidopsis* plants and rice germinated embryos. *Plant Sciences* 176: 528-538.
20. Sanchez-Casas P. and Klessig D.F (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology* 106: 1675-1679.
21. Vasak M. Hasler D (2000) Metallothioneins: new functional and structural insight. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 177–183.
22. Wong H.L. Sakamoto T. Kawasaki T. Umemura K. Shimamoto K (2004) Down-regulation of Metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase *OsRac1* in rice. *Plant Physiology* 135: 1447–1456.
23. Zhou G.K. Xu Y.F. Liu J.Y (2005) Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J. Plant Physiology* 162: 686–696.