OPEN ACCESS

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

روش‌های مولکولی تجزیه و تحلیل بیان ژن در گیاهان در سطح ترنسکریپتوم

مونا بردبار[۱]، رضا درویش‌زاده[۲] و مقصود پژوهنده[۳]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، (نویسنده مسوول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۱
صفحه: ۸۳ تا ۱۰۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تنش‌های محیطی از قبیل تنش خشکی، شوری، سرما و گرما به‌عنوان یکی از پیامدهای تغییر اقلیم از عوامل عمدهٔ کاهش در محصولات کشاورزی هستند. بررسی بیان ژن‌ها (مطالعات ترنسکریپتومیک) نقش اساسی در درک سازوکار گیاهان در مقابله با تنش‌های محیطی دارند. بیان ژن فرآیندی است که طی آن اطلاعات رمزگذاری شده در ژن به‌صورت رونوشت (Transcript) تهیه می‌شود که غالب اوقات خود رونوشت یا محصول پروتئینی آن در فرایندها و مکانیسم‌های مختلف مولکولی در سلول و نهایتاً حیات ارگانیسم درگیر می‌شود. ارزیابی سطح بیان ژن گام مهمی در جهت روشن نمودن عملکردهای ژنی به لحاظ زمانی و مکانی است.

مواد و روش‌ها: مقاله حاضر یک مقاله مروری می‌باشد که به شیوه تحلیل محتوا (Content analysis) با جستجوی کلید واژه‌های تجزیه ترنسکریپتوم، توالی‌یابی آران‌ای، هیبریداسیون کاهشی بازدارنده، ریزآرایه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقاله‌های مرتبط در پایگاه‌های اینترنتی Google Scholar، Web of Science، PubMed و Scopus بدست آمده است.

یافته‌ها: دهه‌ها پیش، مطالعات بر روی ژن‌ها به‌صورت محدود و عمدتاً به روش‌هایی از قبیل نوردرن بلات، وسترن بلات، هیبریداسیون ریزآرایه، هیبریداسیون کاهشی (Subtractive hybridization)، هیبریداسیون حذفی کاهشی (Suppression subtractive hybridization)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real time polymerase chain reaction) متمرکز بود، در حالی که اکنون محققان قادر به بررسی یک‌بارهٔ ژنوم از طریق روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی (Sequencing based approaches) شامل روش توالی‌یابی RNA هستند. ارتقاء سطح توانمندی به معرفی رویکردهای سیستم بیولوژی کمک می‌کند که به موجب آن شبکه‌های عملکردی سلول را می‌توان در تمامیت آنها موشکافی کرد تا اجزای بالقوه فعل و انفعالات عملکردی روشن شود. ظهور زیست‌شناسی سیستم‌ها همراه با پیشرفت‌های شگرف در فناوری امکان شناسایی سریع همه رونوشت‌های RNA موجود در نمونه‌های بیولوژیکی مورد مطالعه را فراهم می‌نمایند. با این وجود، فناوری‌های قبلی که محدود به بررسی ژن‌های منفرد یا زیرمجموعه‌ای از ژن‌ها بودند، هنوز جایگاه خود را در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی حفظ کرده‌اند.

نتیجه‌گیری: هدف در اینجا تشریح انواع روش‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل بیان ژن در پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده است. انتخاب روش و یا استراتژی مورد استفاده بسته به سطح فناوری، هزینه اجرا و محدودیت روش‌ها انجام می‌شود. هنگام انتخاب روشی برای یک تحقیق خاص، باید در نظر داشت که محدودیت‌ها از نظر روش شناختی یا آماری به حداقل برسند تا نتایج قابل اعتماد و تکرارپذیر حاصل شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ترنسکریپتوم، توالی‌یابی آر ان ای، ریزآرایه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، هیبریداسیون کاهشی بازدارنده

مقدمه

بیان ژن سازوکاری کاملاً تنظیم شده است که عملکرد و سازگاری تمام سلول‌های زنده را کنترل می‌کند که در آن اطلاعات ژنی به یک محصول ژنی کاربردی تبدیل می‌شود که می‌تواند پروتئین یا ژن‌های غیررمز کننده مانند ریبونوکلئیک اسید انتقالی (tRNA) یا RNA هسته‌ای کوچک (snRNA) باشد (۲۷). نکته اصلی در کنترل بیان ژن در درک تعامل ژنوتیپ با فنوتیپ است (۵۰). زیرا این فرایند برای تمام حیات که تا به امروز شناخته شده‌اند (All known life)، استفاده می‌شود. سنتز پروتئین شامل چهار مرحله اصلی است: رونویسی، ویرایش RNA، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه. در حین رونویسی، یک mRNA تک رشتهٔ مکمل از یک رشته DNA الگو توسط RNA پلی‌مراز کپی می‌شود. به دنبال رونویسی، برخی تغییرات در mRNA، به عنوان نمونه، ویرایش RNA، که در آن اینترون‌ها از توالی حذف می‌شوند اتفاق می‌افتد. پس از آن، از mRNA جدید به عنوان الگویی برای ساختن زنجیره‌ای از اسیدهای آمینه برای سنتز پروتئین استفاده می‌شود (۹۵). بیان ژن در سطح ترنسکریپتوم، میزان mRNA رونویسی شده در یک سیستم بیولوژیکی و اهمیت آن برای عملکرد سلول را مطالعه می‌کند. برای درک اهمیت بررسی بیان ژن کافی است در نظر گرفته شود که تنها حدود دو درصد از ژنوم انسان به‌صورت پروتئین بیان می‌شود و بیان آنها هم بسته به نوع سلول، بافت، مرحله‌ی نموی و زمان متفاوت است. روش‌های تعیین توالی که منجر به آگاهی از کل توالی‌های رونویسی شده از ژنوم می‌شوند، محققان را برای تعیین عملکرد ژن‌ها تشویق کرده است (۵۰). از آنجا که ژن‌ها با عملکردهای مرتبط معمولاً از الگوی تنظیمی مشابهی برخوردارند، روش‌هایی که بیان ژن را ارزیابی می‌کنند، راهی مهم برای شناسایی و خوشه‌بندی اولیه این ژن‌ها فراهم می‌کنند. خوشه‌بندی توالی‌های ژن‌های عملکردی اطلاعات کافی را برای هدایت آزمایش‌های تکمیلی در تعیین عملکرد دقیق یک محصول ژنی خاص فراهم می‌کند. تجزیه و تحلیل بیان ژن را می‌توان با هدف قرار دادن یک ژن خاص انجام داد، که به عنوان روش‌های با سرعت پایین[۱] شناخته می‌شوند (مثل ژن گزارشگر[۲]، نوردرن بلات[۳]، وسترن بلات[۴]، FISH[۵]، لکه‌گذاری نقطه‌ای[۶]، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیمه کمّی و کمّی[۷]، و تست محافظت از نوکلئاز[۸]) همچنین، بررسی همه ژن‌هایی که از نظر بیان در نمونه‌های مختلف متفاوت هستند نیز قابل انجام است که به عنوان روش‌های با سرعت بالا[۹] شناخته می‌شوند (هیبریداسیون کاهنده[۱۰]، نمایش افتراقی[۱۱]، تجزیه ترتیبی تظاهر ژن[۱۲]، هیبریداسیون ریز آرایه[۱۳]، توالی‌یابی RNA[۱۴] (۵۸).

1- Low- to mid-plex techniques 2- Reporter gene 3- Northern blot 4- Western blot
5- Fluorescence *in situ* hybridization 6- Slot and dot blotting 7- Semiquantitative and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction 8- Nuclease protection assays 9- Higher-plex techniques 10- Subtractive hybridization
11- Differential display 12- Serial analysis of gene expression 13- Microarray hybridization 14- RNA sequencing

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

روش‌های قدیمی مانند نوردرن‌بلات، تست محافظت از نوکلئاز، Plaque hybridization و وسترن بلات از لحاظ اندازه‌گیری میزان یک رونوشت در یک زمان و خودکار نمودن روش سخت بودند. روش‌های جدید برای تجزیه و تحلیل بیان ژن عبارتند از: الف) سیستم‌های جامع باز مانند SAGE، DD، RAP-PCR[1]، READS[2]، AFLP[3]، TOGA[4] و RT-PCR[5]، qPCR[6]. ب) سیستم‌های بسته متمرکز مانند HDFCA[7]، هیبریداسیون حذفی کاهشی(SSH)[8]، FISH، DS[9]، ریزآرایه‌ی دی‌ان‌آ[10]، و توالی‌یابی RNA. گاهی اوقات، ترکیبی از این سیستم‌ها برای افزایش حساسیت و اختصاصیت استفاده می‌شود. در حالی که سیستم‌های بسته متمرکز برای غربالگری اولیه‌ی تعداد زیاد توالی مطلوب هستند.

مواد و روش‌ها

مقاله حاضر یک مقاله مروری می‌باشد که با جستجو در مقاله‌های مرتبط در سایت‌های معتبر (Google Scholar, Web of Science, PubMed, Scopus) بدست آمده است و با هدف بررسی مهمترین روش‌ها برای تجزیه و تحلیل بیان ژن در سطح ترنسکریپتوم نمونه‌های مختلف تجربی، برجسته کردن مزایا و معایب هر یک و برخی از کاربردها ارائه می‌شود.

بحث و نتایج

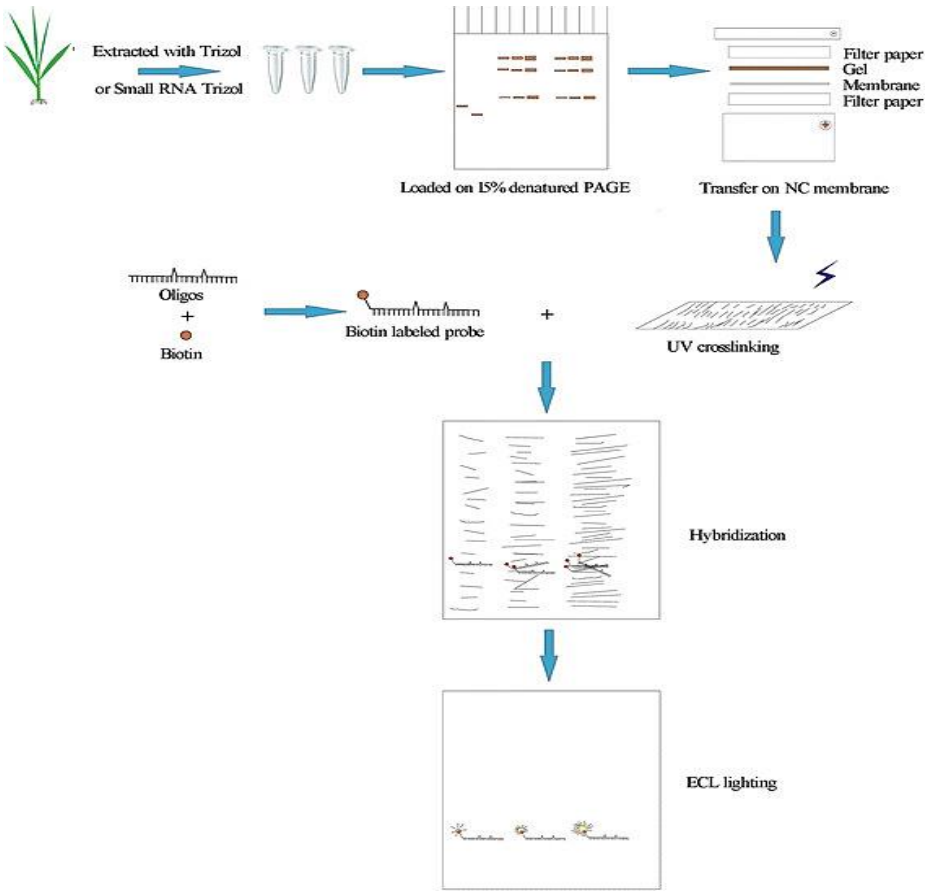
روش‌هایی که برای تعیین کمیت و کیفیت ترنسکریپت‌ها وجود دارد به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند: الف) روش‌های متکی بر هیبریداسیون (Hybridization based approaches) که شامل: نوردرن بلات، وسترن بلات، RPA، روش هیبریداسیون ریزآرایه، SH و SSH و روش بررسی تفاوت قابل نمایش (RDA)[11] هستند. ب) روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر (PCR) که شامل: qPCR، کتابخانه‌های دی.ان.ا مکمل[12] (cDNA)، سی.دی.ان.ا- ا.اف.ال.پی[13] (cDNA-AFLP)، DD و RAP-PCR هستند. ج) روش‌های متکی بر توالی‌یابی (Sequencing based approaches) که شامل: روش MPSS[14]، SAGE، EST و روش توالی‌یابی RNA هستند.

نوردرن بلات و نوردرن بلات معکوس

نوردرن بلات یک روش بیولوژی مولکولی است که برای جستجوی جمعیت‌های خاص RNA در مخلوطی از RNAهای کل استفاده می‌شود. این روش در سال ۱۹۷۷ توسط جیمز الوین و جوج استارک در دانشگاه استنفورد معرفی شد (۳) و هنوز هم به عنوان روش استاندارد در تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی برای مطالعه سطح بیان یک ژن خاص یا تأیید نتیجه‌ی یک روش دیگر در نظر گرفته می‌شود که گزارش‌های اخیر گواه این ادعا است؛ به عنوان مثال، تجزیه و تحلیل پروفایل بیان ژن آسکوربات پراکسیداز (Ascorbat peroxidase; *APX*) در پنبه تحت تنش اکسیداتیو (۲۴) و ژن *GhMT3a* متالوتیونئین پنبه تحت تنش‌های غیرزنده (۹۸)، مطالعه بیان ژن *TaMBF1c* دخیل در تحمل تنش گرما در گندم (۷۰)، مطالعه بیان عامل پروتئین ریبوزومی پلاستیک S5 دخیل در تحمل تنش سرما در *Arabidopsis* (۱۰۰) و Fe-chelatase (FeCh) در برابر تنش اکسیداتیو (۳۶). تعداد نسخه‌های mRNA در مورد هر ژن منحصر به فرد، دقیقاً نشان دهندهٔ میزان بیان آن ژن مورد نظر است. ردیابی کمیت بیان یک ژن در نهایت نشان دهندهٔ شدت نسخه‌برداری از آن ژن و بیان آن است. روش نوردرن بلات یکی از اولین روش‌ها جهت نشان دادن اختلاف در تعداد mRNAهایی که به وسیله‌ی هر ژن تولید می‌شود، هست. نام این روش به‌صورت متضاد از نام ساترن بلاتینگ گرفته شده است (۳). در این روش ابتدا mRNA از نمونه‌های بیولوژیکی استخراج و سپس این mRNA از بقیه مواد سلولی شامل DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و دیگر محتویات سلولی جداسازی می‌شود. قطعات مختلف mRNA به وسیله‌ی ژل الکتروفورز از هم جدا می‌شوند و سپس این قطعات به یک غشا منتقل شده که به این، روش لکه‌گذاری (Blotting) گفته می‌شود. برای شناسایی نسخه‌هایی از mRNA که از ژن خاصی، مثلاً تحت شرایط تنش ناشی از بیمارگر تولید می‌شوند، نمونه‌ها را با یک قطعه‌ی کوچک به نام شناساگر (Probe) از توالی‌های یک رشته‌ای RNAیا DNA لکه‌گذاری می‌کنند (۹۴). شناساگرها معمولاً با استفاده از مولکول‌های رادیواکتیو نشاندار می‌شوند. پروب یا شناساگر بر اساس توالی mRNA ژن مورد نظر طراحی و سپس با توالی مورد نظر متصل می‌شود. بعد از اینکه پروب با توالی مورد نظر متصل شد از نوکلئوتیدهای رادیواکتیو مورد استفاده در ساخت پروپ اشعهٔ X ساطع می‌شود، و اشعه متصاعد شده از آنها باعث ایجاد لکه بر روی فیلم رادیولوژی می‌گردد (شکل ۱). شدت باندی که بر روی فیلم عکاسی نقش بسته است به محققان نشان می‌دهد که مقدار mRNA در نمونه اولیه به چه میزان بوده است، و این موضوع به وسیله‌ی شدت این لکه مشخص می‌شود. در این روش برای نرمال و استاندارد کردن آزمایش، از ژنی که بیان آن در طی تنش همواره ثابت می‌ماند به عنوان ژن خانه‌دار استفاده می‌شود (۷۲). روش دیگری که برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده می‌شود نوردرن بلات معکوس است. نوردرن بلات معکوس یک نوع از نوردرن بلات است که در آن اسیدنوکلئیک خاص به‌صورت ثابت روی یک غشا لکه‌گذاری می‌شود، به‌صورتیکه این لکه مجموعه‌ای از قطعات cDNAتکثیرشده یا ژن هدف مورد نظر است. در این روش بعد از اینکه DNA بر روی غشا لکه‌گذاری شد با استفاده از شناساگرهای cDNA ساخته شده از RNAهای استخراج شده از بافت‌ها، واکنش هیبریداسیون انجام می‌شود. بنابراین از این روش به‌صورت معمول، جهت بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها و همچنین جهت بررسی بیان تعداد زیادی ژن در یک ارگانیسم استفاده می‌شود (۳۸).

1- RNA arbitrarily primered PCR
2- Restriction endonucleolytic analysis of differentially expressed sequences
3- Amplified restriction fragment length polymorphism
4- Total gene expression analysis
5- Reverse transcription PCR
6- Quantitative or real time PCR
7- High density cDNA filter hybridization
8- Suppression subtractive hybridization
9- Differential screening
10- DNA microarray
11- Representational difference analysis
12- Complementry DNA
13- Complementry DNA amplified fragment length polymorphism
14- Massively parallel signature sequencing

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل ۱- تصویری شماتیک از روش نوردرن بلات با شناساگر نشاندار شده با بیوتین (۲۹)
Figure 1. Schematic of the nodern blot method with a biotin-labeled probe (29)

در سال ۲۰۱۶ سه تحقیق به وسیله‌ی غلام‌نژاد و همکاران با عناوین ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های خانه‌دار در برهمکنش گندم با بیمارگر *Mycosphaerella graminicola*، بررسی تغییرات بیان ژن‌های رمز کننده‌ٔ پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۱ Hsp و Hsp91در پاسخ به آلودگی به*M. graminicola* و همچنین بررسی تغییرات بیان ژن رمزکننده‌ٔ پروتئین Ethylene 3 insensitive در پاسخ به آلودگی به *M. graminicola* با استفاده از روش نوردرن بلات معکوس (Reverse northern blot dot) انجام گرفت. نتایج این تحقیقات به ترتیب بیانگر بیشترین ثبات در بیان ژن توبولین، تغییر افزایشی بیان دو ژن رمز کننده‌ٔ پروتئین‌های شوک حرارتیِ ۷۰ Hsp و ۹۰ Hsp و همچنین کاهش بیان ژن رمز کننده‌ٔ پروتئین Ethylene 3 insensitiveدر طول ۲۴ ساعت بعد از تلقیح با این بیمارگر بود (۲۱).

مزیت‌های روش نوردرن بلات

از مزایای اصلی روش نوردرن بلات سادگی نسبی، مقرون به صرفه بودن و امکان ارائه اطلاعات ارزشمند در مورد نوع، اندازه و فراوانی RNA است (۳۳). علاوه بر این، این روش اجازه می‌دهد تا انواع مختلف بیان یک ژن خاص (اَشکال مختلف اسپیلایسینگ RNA) در یک نمونه تشخیص داده شود. همچنین برای تشخیص تغییرات کوچک در میزان بیان ژن به اندازه کافی حساس است. به همین دلیل، این روش هنوز برای تأیید یافته‌های سایر روش‌ها، مانند تجزیه و تحلیل‌های رونویسی استفاده می‌شود. سرانجام، می‌توان غشاهای لکه‌دار را از شناساگرها جدا کرد و برای ترکیب با cDNA هدف دیگر دوباره مورد استفاده قرار داد. غشاهای لکه‌دار را نیز می‌توان خشک و ذخیره کرد تا مدت‌ها بعد دوباره مورد استفاده قرار گیرد. مزیت دیگر این است که می‌توان از نوردرن بلات غیر رادیواکتیو (به عنوان مثال، شناساگرهای دارای بیوتین) برای شناسایی RNAهای کوچک در گیاهان استفاده کرد (۲۹).

معایب روش نوردرن بلات

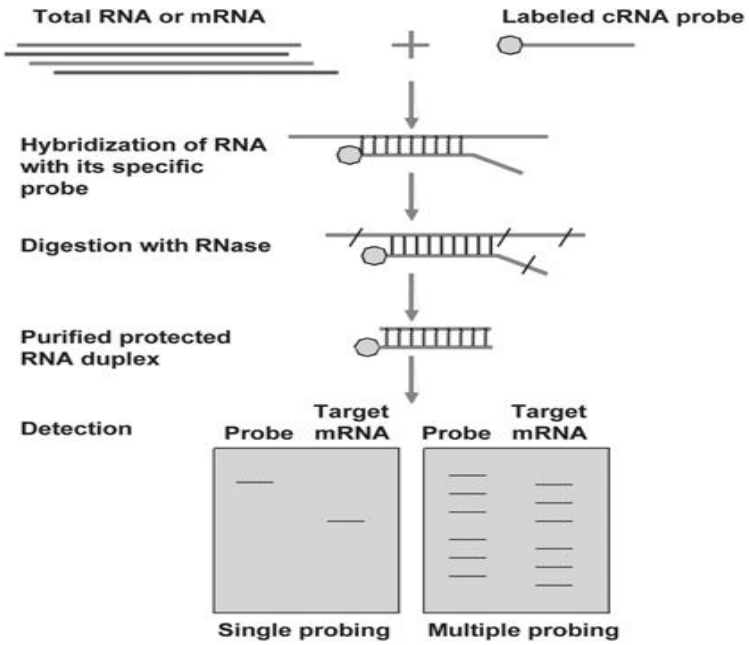
مهمترین محدودیت روش نوردرن بلات این است که فقط یک ژن در یک زمان مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. مقدار قابل توجهی از RNA و شناساگر لازم است. خطرات دیگر شامل خطرات تجزیه RNA توسط آلودگی RNases در محیط کار است. با این حال، می‌توان با استفاده از مهار کننده‌های RNase مانند دی اتیل پیروکربنات (Diethyl pyrocarbonate; DEPC) و با دقت و سرعت کار در محیط آزمایشگاه و استفاده از مواد استریل شده، این مشکل را کاهش داد.

روش سنجش حفاظت RNases (RPA)

سنجش حفاظت RNase (RNase protection assay) در دهه ۱۹۹۰ (۶) به‌عنوان یک روش آزمایشگاهی استاندارد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

برای تعیین کمیت میزان mRNA ژن موردنظر در یک بافت خاص، مرحله رشد یا زمان مشخص معرفی شد. در گیاهان، برای تجزیه و تحلیل بیان خانواده ژن ایزوپروپیل مالات سینتاز (Isopropylmalate synthase; IPMS) در *Arabidopsis thaliana*، از این روش استفاده شد (۳۴). حتی اگر مثال‌های اخیر کاربرد در تحقیقات علوم گیاهی را نشان ندهد؛ هنوز هم در علوم دامی استفاده می‌شود (۱۰۱). روش RPA همانند نوردرن بلات به اتصال اختصاصی توالی DNA یا RNA مکمل متکی است. یک کاوشگر با برچسب ایزوتوپ‌های فسفر (P33 یا P32) (۵۳) یا بیوتین (۷۳) برای RNAهای موردنظر سنتز می‌شود. در مرحله بعدی، RNAهای کل استخراج و با شناساگر (پروب) ترکیب می‌شوند. ریبونوکلئازها برای هضم همه رشته‌های منفرد اضافه می‌شوند؛ در حالی که محصولات هیبریدی را دست نخورده باقی می‌گذارند. RNAهای دو رشته‌ای هضم‌نشده نشان‌دهنده‌ی توالی‌های مکمل پروب‌های آنتی‌سنس مربوط به ژن‌های موردنظر هستند. سپس RNaseها با تیمار پروتئیناز K از واکنش حذف می‌شوند. جمعیت‌های RNA دو رشته‌ای را می‌توان با استفاده از روش استخراج فنل‌کلروفرم استخراج کرد (۷۵). رشته‌های دوتایی RNA استخراج شده سپس الکتروفورز می‌شوند و با یک فیلم اتورادیوگرافی شناسایی می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۲– تصویری شماتیک از روش RPA (۷۱)
Figure 2. Schematic representation of the RPA method (71)

مزایای روش RPA

روش حفاظت RNase یک روش بسیار اختصاصی و حساس برای تشخیص و اندازه‌گیری فراوانی mRNAهای خاص در نمونه‌ای از مخلوط‌های RNA است (۴۶). سطح حساسیت آن حدود ۲۰–۵۰ برابر بیشتر از نوردرن بلات است (۹). از روش RNase می‌توان برای تعیین کمیت سطح mRNA ژن‌ها با درجه بالایی از تشابه توالی (به‌عنوان مثال، اعضای خانواده ژن‌ها) استفاده کرد (۹). همچنین درجه بالاتری از تخریب RNA را تحمل می‌کند؛ بدون اینکه کیفیت داده‌های بدست آمده خدشه‌دار شود. علاوه بر این، این روش امکان انجام سنجش‌های چند کاوشگر (۸۵) و نقشه‌برداری از سایت‌های شروع رونویسی و اتصالات اینترون و اگزون، یا تجزیه و تحلیل انواع مختلف اتصال را فراهم می‌کند (۶۷).

معایب روش RPA

اِشکال عمده روش حفاظت RNase کمبود اطلاعات در مورد اندازه رونوشت است (۷۱). در حقیقت، این اندازهٔ کاوشگرِ سنتز شده است که طول قطعه محافظت‌شده هیبرید (مولکول‌های دو رشته‌ای) را تعیین می‌کند. اِشکال دیگر این است که کاوشگر آنتی‌سنس باید کاملاً مشابه با RNA مورد هدف باشد تا از هضم توسط اندونوکلئازها محافظت شود. همچنین، روشی نسبتاً سخت و زمان‌بر است. برخی اصلاحات برای افزایش کارایی روش حفاظت RNase و کاهش زمان و هزینه آن پیشنهاد شده است. به عنوان مثال، یک روش استخراج سریع‌تر و تک‌مرحله‌ای RNA می‌تواند جایگزین پروتئیناز K و استخراج فنل‌کلروفرم شود (۳۰).

هیبریداسیون ریزآرایه، ریزآرایه DNA/RNA

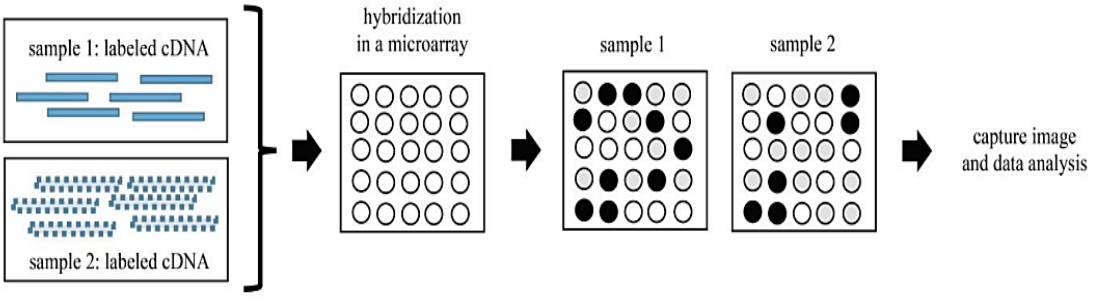
روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون مانند ریزآرایه (میکرو اَرِی) به رونوشت‌های متصل به اسلایدهای آرایه متکی و محدود به آن هستند (۵۰). فناوری ریزآرایه برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ ارایه شد (۷۹). با این حال، بهبود و تغییر در روش‌ها و تجهیزات ریزآرایه‌ها هنوز آن را به یکی از متداول‌ترین و جدیدترین روش‌ها در زمینه‌های مختلف تبدیل کرده است (۸۱). حتی با این وجود، ریزآرایه‌ها به اندازه داده‌های

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

بیوانفورماتیک موجود برای ژنوم و ترنسکریپتوم (مجموعه کامل رونوشت‌ها در یک سلول) موجودات مدل، خوب هستند (۲۸). امروزه انواع مختلفی از پروتکل‌های ریزآرایه‌ها مانند ریزآرایه پروتئینی، ریزآرایه RNA، ریزآرایه DNA و ریزآرایه گلیکان در دسترس است. تفاوت بین آن‌ها در چیزی است که اندازه‌گیری می‌کنند. به‌عبارت دیگر، اگر از ریزآرایه برای اندازه‌گیری میزان RNA استفاده شود به آن ریزآرایه RNA گفته می‌شود (۸۱).

این روش شامل مراحل زیر است:

استخراج و خالص‌سازیRNA: RNA از بافت‌های مخصوص استخراج می‌شود و سعی می‌شود RNA را با بالاترین خلوص و کیفیت ممکن بدست آورد. رونوسی معکوس: برای تبدیل mRNA به cDNA. تکثیر RNA: RNA توسط PCR تکثیر می‌شود تا هیبریداسیون تسهیل شود؛ زیرا مقدار mRNA در سلول‌ها ممکن است کافی نباشد. برچسب زدن پروب‌ها: cDNA تکه تکه شده و با بیوتین برچسب‌گذاری می‌شود. بعد از آن، مولکول فلورسانس متصل به بیوتین اضافه می‌شود. هیبریداسیون کاوشگرها: زمان مورد نیاز برای هیبریداسیون کامل با غلظت نمونه کاملاً متناسب است. در پایان این فرآیند، ریزآرایه هیبریدشده شستشو داده می‌شود تا رشته‌های هیبریدنشده از بین بروند. اسکن ریزآرایه: تشخیص نور فلورسانس نشان می‌دهد که هیبریداسیون در یک نقطه خاص از یک توالی خاص رخ داده است. خواندن توسط لیزر انجام می‌شود و فلورسانس با اسکن ثبت می‌شود. میزان حساسیت به فلورسنس متناسب با مقدار پروب متصل به هر نمونه است (شکل ۳) (۴۶).



شکل ۳- هیبریداسیون ریزآرایه. این روش شامل رونویسی معکوس mRNA از دو نمونه (به عنوان مثال، نمونه کنترل و آزمایش) به cDNA و برچسب‌گذاری آن‌ها است. همه cDNA ها در یک ریزآرایه با قطعات DNA ژن‌های اختصاصی مختلف هیبرید می‌شوند. هر نمونه هنگام ایجاد هیبریداسیون سیگنالی تولید می‌کند. شدت سیگنال متناسب با فراوانی mRNA اولیه مورد استفاده است. سیگنال‌های نمونه‌های مختلف برای شناسایی تفاوت در بیان ژن مقایسه می‌شوند (۵۸)

Figure 3. Microarray hybridization. This procedure involves the reverse transcription of mRNA from two samples (e.g., a control and test sample) into a cDNA and their labeling. All cDNAs are hybridized in a microarray with DNA fragments of different specific genes. Each sample generates a signal when hybridization occurs. The signal strength is proportional to the initial mRNA frequency used. Signals from different samples are compared to identify differences in gene expression (58)

سه نوع مختلف از ریزآرایه‌ها به‌صورت تجاری موجود است: ۱- ریزآرایه‌هایی که شامل تراشه‌های الیگونوکلئوتید ساخته شده توسط سنتز الیگوهای کوتاه به طور مستقیم بر روی اسلاید شیشه (فناوری Affymetrix) هستند، ۲- ریز آرایه‌های ساخته شده با لکه‌گذاری الیگوهای از قبل سنتز شده به اسلایدهای شیشه‌ای یا غشاهای نایلونی و ۳- ریزآرایه‌های cDNA ساخته شده توسط لکه‌گذاری محصولات PCR تکثیر شده از کلون‌های کتابخانه cDNA بر روی اسلایدهای شیشه‌ای یا غشاهای نایلونی (۵۸). انتخاب قطعات ژنی که به عنوان کاوشگر نیز شناخته می‌شوند و روی آرایه لکه‌گذاری می‌شوند، یکی از مهمترین قسمت‌ها است. حتی اگر انتخاب بیش از ۳۰۰۰ تا ۱۰ هزار توالی امکان‌پذیر باشد، ممکن است این توالی‌ها بهترین معرف برای یک نوع آزمایش نباشد (۵۸). هر آزمایش باید کتابخانه cDNA / DNA خود را داشته باشد و استفاده از کنترل لازم است.

تجزیه و تحلیل داده‌های آرایه در سه مرحله اصلی انجام می‌شود: شناسایی و تعیین مقدار سیگنال هیبریداسیون، مصورسازی (Visualization) داده‌ها و خوشه‌بندی. مرحله خوشه‌بندی شامل سازماندهی ژن‌ها در گروه‌هایی با الگوی بیان مشابه است و می‌تواند توسط چندین نرم‌افزار موجود انجام شود (۱۸). فناوری ریزآرایه یک روش دقیق، حساس، کمّی و کیفی در نظر گرفته شده است. اگرچه به تجهیزات تکنولوژیکی و اختصاصی با هزینه بالا نیاز دارد، اما مهم‌ترین روشی است که در تحقیقات بیان ژن استفاده می‌شود (۸۱).

تجزیه ریزآرایه به محققین علوم زیستی اجازه می‌دهد تا آزمایش‌های خود را در کوتاه‌ترین زمان و در مقیاس وسیع انجام دهند. با این حجم وسیع اطلاعات از میزان بیانِ ژن‌ها می‌توان به روابط بین DNA، RNAو پروتئین پی برد و با سایر موجودات در طول تکامل مقایسه نمود. برای موجودات مختلف مانند انسان، موش، گیاه آرابیدوپسیس و تعداد دیگری از موجودات کیت‌های از قبل آماده شده وجود دارد. ریزآرایه در شاخه‌های مختلف علوم مانند پزشکی، صنایع دارویی و غذایی و همچنین علوم کشاورزی کاربرد دارد. این روش در علوم پزشکی در تشخیص سرطان‌ها و همچنین بیمارگرهای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

میکروبی و ویروسی بسیار کارآمد است. این روش در کشاورزی برای تشخیص بیمارگرهای گیاهی و همچنین ردیابی میزان تغییرات بیان ژن‌هایی که در فرایند مقاومت به بیماری‌ها نقش دارند به کار می‌رود. از روش ریزآرایه برای مقایسه‌ی ژن‌هایی که در مسیر SAR (Systemic acquired resistance) در گیاه ارابیدوپسیس شرکت دارند، استفاده شد. اطلاع از توالی‌های ژنومی این گیاه، محققین را قادر به شناسایی راه‌اندازهای ژن‌هایی کرد که در واکنش SAR بیان می‌شدند. در این مطالعه از ریزآرایه‌ای استفاده شد که دارای ۱۰۰۰۰ توالی برچسب بیانی یا ESTs بود (۴۷).

مزایای روش ریزآرایه

آرایه‌های DNA ابزاری قدرتمند برای کشف بنیان مولکولی و ژنتیکی فرایندهای بیولوژیکی در مقیاس بزرگ هستند که با استفاده از روش‌های معمول غیرقابل دستیابی است. اولین و مهمترین مزیت آرایه‌های DNA سرعت، قابلیت انعطاف‌پذیری و توانایی بالای تجزیه و تحلیل بیولوژیکی است (به عنوان مثال، هزاران ژن یا کل ژنوم در یک آزمایش در طی یک روز یا بیشتر کاوش می‌شوند). کارهایی که به کمک رویکردهای کلاسیک ماه‌ها یا سال‌ها زمان نیاز دارند، بسته به روش آرایه DNA که انتخاب می‌شوند، حداکثر ظرف چند روز، چند هفته یا چند ماه انجام می‌شوند. آرایه‌های DNA نیز به اندازه کافی قابل تولید و حساس هستند؛ اگرچه اغلب برای تأیید نتایج بدست آمده از روش آرایه DNA، انجام یک روش دیگر توصیه می‌شود (۶۲).

معایب روش ریزآرایه

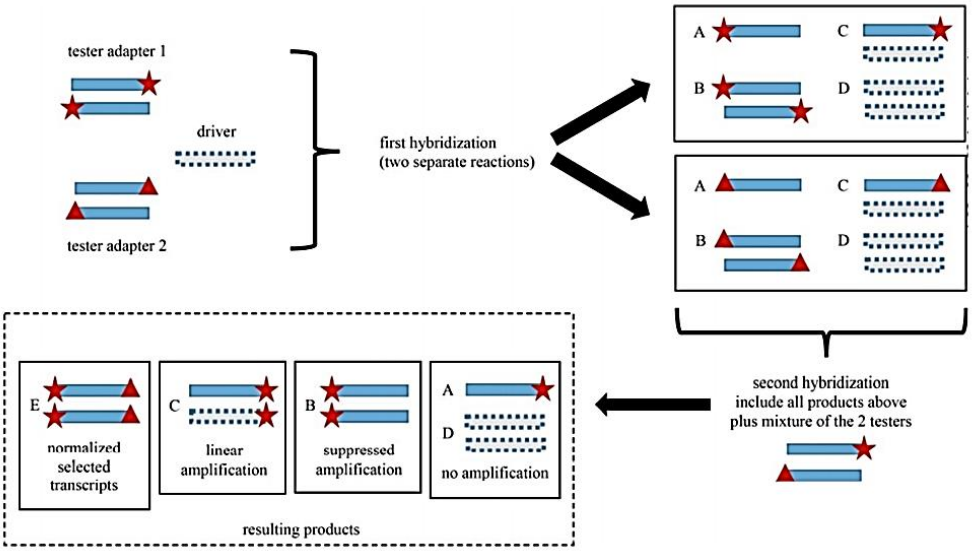
ریزآرایه‌های بیان، اطلاعات زیادی تولید می‌کنند اما محدودیت‌هایی نیز دارند. برخی از محدودیت‌های اصلی استفاده از ریزآرایه ها به شرح زیر است: ۱- وابسته به دانش موجود: فقط می‌توان توالی ژنوم شناخته شده را مطالعه کرد یک خطا در پایگاه داده می‌تواند نتایج را بدتر کند. ۲- محدوده دینامیکی کم برای تشخیص ترانسکریپت‌ها: بنابراین آن‌ها برای مطالعه‌ی ژن‌هایی با بیان کم یا بسیار زیاد مناسب نیستند. ۳- مقایسه دشوار بین آزمایش‌ها: آنها برای مقایسه سطح بیان در آزمایش‌های مختلف به روش‌های نرمال‌سازی پیچیده‌ای نیاز دارند. ۴- عدم توانایی در تشخیص ترانسکریپت‌های جدید. ۵- هیبریداسیون متقابل: بین ژن‌هایی با توالی مشابه، امکان تشخیص وجود ندارد. ۶- ضرورت اعتبارسنجی: ریزآرایه‌ها به qPCR برای به دست آوردن داده‌های قابل اعتماد نیاز دارند (۲۰).

روش هیبریداسیون کاهشی (SH) و هیبریداسیون حذفی کاهشی (SSH)

روش هیبریداسیون کاهشی برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط Sargent و Dawig برای ایجاد یک کتابخانه cDNA (۷۸) و پروب‌های تولید شده (۱۶) از ژن‌های مختلف بیان شونده، توصیف شد. اصل این روش، تمایز ژن‌های بیان شده با هیبریداسیون cDNA از یک نمونه (نمونه مورد آزمایش) با تعداد زیادی از mRNA از نمونه دوم یا شاهد است. رونوشت‌هایی که در هر دو نمونه بیان می‌شوند، هیبریدی از مولکول‌های mRNA / cDNA را تشکیل می‌دهند، در حالی که توالی‌های بیان شده فقط در نمونه مورد آزمایش به عنوان یک تک رشته cDNA حفظ می‌شوند. سپس، دو رشته و یک رشته‌ها با استفاده از کروماتوگرافی Hydroxylapatite جدا می‌شوند و می‌توان تک رشته‌های شسته شده را همسانه‌سازی، توالی‌یابی یا مستقیماً به‌عنوان کاوشگر برای غربالگری کتابخانه‌ها استفاده کرد. از مشکلات این روش، نیاز به‌مقدار زیادی mRNA می‌باشد. این پروتکل در طول زمان به روز شده است و یک پروتکل مشابه معروف به هیبریداسیون حذفی کاهشی (Suppression subtractive hybridization:)های بیان شده متفاوت و حذف مرحله جداسازی رشته‌های تک و دو رشته‌ای از روش SH متفاوت است (۱۷). این پروتکل بر اساس استخراج mRNA از دو نمونه است (نمونه مورد آزمایش و شاهد) و RT-PCR، که منجر به تشکیل cDNA می‌شود. سپس cDNA نمونه‌های مورد آزمایش با دو الیگونوکلئوتید آداپتور مختلف (۱و۲) پیوند می‌خورند بعد هیبریداسیون دوم، واکنش سازگارساز ۱ و ۲ انجام می‌شود. اولین هیبریداسیون کاهشی تعداد زیادی cDNA را با نمونه مورد آزمایش در دو واکنش جداگانه ترکیب می‌کند که در آن واشرسته سازی (دناتوراسیون) رخ می‌دهد و مولکول‌های تک‌رشته می‌توانند دوباره هیبرید شوند. پس از هیبریداسیون اول، چهار مولکول احتمالی ممکن است به وجود بیایند: تک رشته‌ای، دو رشته‌ای، هیبرید شاهد–نمونه و شاهد دو رشته‌ای. هیبریداسیون دوم تمام محصولات را با دو نوع آداپتور مخلوط می‌کند. سپس، نتیجه می‌تواند یک دو رشته باشد که دارای دو نوع آداپتور است یا دو رشته با یک نوع آداپتور، نمونه مورد آزمایش تک رشته‌ای ۱ یا ۲، آداپتور دو رشته‌ای ۱ یا ۲ با یک نمونه، یا یک نمونه تک رشته‌ای. PCR با استفاده از آغازگرهایی انجام می‌شود که آداپتور ۱ (آغازگر رو به جلو) و ۲ (آغازگر معکوس) را تشخیص می‌دهد. این واکنش منجر به تکثیر cDNA دو رشته‌ای حاوی دو نوع سازگارساز می‌شود (شکل ۴).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل ۴- هیبریداسیون حذفی کاهشی (SSH). این روش شامل دو مرحله واکنش است. اولین مرحله با دو واکنش جداگانه انجام می‌شود، هر رمزام با تعداد زیادی شاهد و یک نوع آداپتور تستر. از هر واکنش چهار نوع محصول حاصل می‌شود: رونوشت تستر تک رشته‌ای (A) رونوشت تستر دو رشته‌ای (B) هیبریدی از نسخه تستر و شاهد (C) شاهد دو رشته‌ای (D). مرحله هیبریداسیون دوم شامل محصولات تولید شده از مرحله اول به علاوه مقدار زیادی cDNAشاهد دناتوره شده. محصولات احتمالی حاصل شامل همان نوع محصولات از مرحله اول به‌علاوه یک شاهد دو رشته‌ای که توسط دو نوع آداپتور تشکیل شده است (E). یک واکنش نهایی PCR انجام می‌شود تا به‌صورت اختصاصی شاهد (E) را تکثیر کند (۵۸)

Figure 4. Suppression subtractive hybridization (SSH). This method consists of two reaction steps. The first step is performed with two separate reactions, each with a large number of controls and a type of tester adapter. Four types of products are obtained from each reaction: single-stranded tester copy (A) doubal-stranded tester (B) hybrid copy of the tester version and (C) double-stranded control (D). The second hybridization step consists of products produced from the first step plus a large amount of denatured control cDNA. Possible products include the same type of products from the first stage plus a dual-stranded control composed of two types of adapters (E). A final PCR reaction is performed to specifically amplify control (E) (58)

مطالعه ژن‌های دخیل در مکانیسم‌های بیماری‌زایی *F. graminearum* چهار ژن (*Abc2*، *Lyp1*، *Rrr1* و*Zbc1*) را شناسایی کرد که به طور بالقوه در بیماری‌زایی و توسعه این قارچ در گندم نقش دارند (۲۲). مطالعه دیگری که شامل پاتوژن *F. graminearum* بود نشان داد که ۲۴ ژن به‌طور متفاوتی در تعامل بین این قارچ و گندم بیان می‌شوند، که ۸ ژن با ژن‌های پاتوژن و ۱۶ ژن با ژن‌های گندم، از جمله ژن‌هایی که سیتوکروم P450، فاکتورهای دپلیمریزه‌کننده که اکتین، کیتیناز، هیستون H4، پیروات دکربوکسیلاز و اس-آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز را رمز می‌کنند، هومولوژی نشان دادند (۳۷).

مزایای روش SSH

مزیت استفاده از SSH این است که برای جداسازی آن نیاز به دانش قبلی از توالی رونوشت یا تجهیزات و تجزیه و تحلیل تخصصی مثل کیت‌های صنعتی نیست.

معایب روش SSH

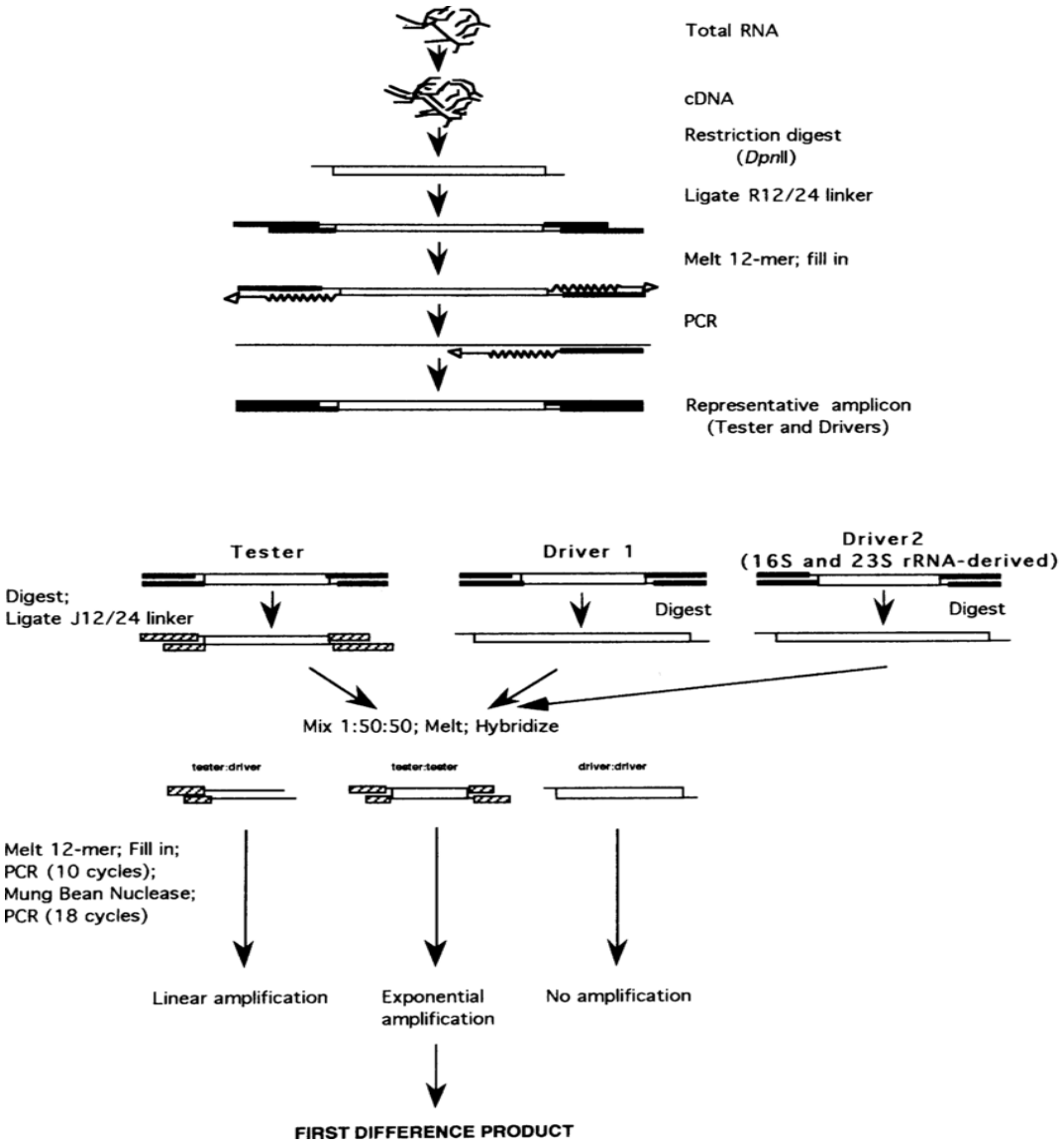
با این حال، محدودیت این روش این است که فقط می‌تواند برای مقایسهٔ جفت شدن انجام شود و این یک روش کمی نیست (۵۸).

روش بررسی تفاوت قابل نمایش (RDA)

روش RDA (Representational difference analysis) کتابخانه‌های تفریقی را با تکثیر در PCR باهم ترکیب می‌کند (۴۱) و نتیجه، غنی‌سازی قطعات بیان شده متفاوت است. به عبارت دیگر، RNA به cDNA تبدیل شده و توسط آنزیم‌های برشی هضم می‌شود. آداپتورها به قطعات متصل شده و توسط PCR تکثیر می‌شوند. نمونه تستر دوباره هضم و به آداپتورهای جدید (مکمل آن‌هایی است که قبلاً استفاده شده است) متصل می‌شود؛ اما نمونه شاهد با آنزیم‌های برشی هضم می‌شود. این دو نمونه در تماس با هم قرار می‌گیرند و فقط هیبرید تستر-تستر (با آداپتورهای اضافی) به‌صورت نمایی تکثیر می‌شود (۱۰) (شکل ۵).

مطالعه‌ای برای ارزیابی پاسخ غیر میزبانی *Polymyxa graminis* بر روی چغندر تایید کرد که حدود ۱۷ ژن در این تعامل تنظیم می‌شوند (۵۱). این ژن‌ها به متابولیسم (به‌عنوان مثال NADP-isocitrate دهیدروژناز)، سنتز و پردازش پروتئین (به‌عنوان مثال پروتئین توسعه یوبی‌کویتین)، تنش اکسیداتیو (به‌عنوان مثال پیش‌ساز کیتیناز کلاس VII)، ساختار دیواره سلول و تمایز (به‌عنوان مثال پروتئین غنی از گلیسین) و انتقال سیگنال (به‌عنوان مثال پروتئین کیناز سرین/ ترئونین) ارتباط دارند. مطالعه‌ای برای شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده از *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri که تحت شرایط مختلف روی برگ های گیاهان نارنج شیرین (*Citrus sinensis*) رشد می‌کند، بیان افتراقی ژن‌های مربوط به سنتز پروتئین، متابولیسم سلول، بیماری‌زایی و عناصر ترانسپوزون را شناسایی نمود (۵۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل۵- تصویری شماتیک از روش RDA (۲)

Figure 5. Schematic representation of the RDA method (2)

PCR زمان واقعی (qPCR)

در سال ۱۹۸۴، کری مولیس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1](PCR) را ابداع نمود. این روش بخش خاصی از DNA را تکثیر کرده؛ صدها میلیون نسخه را در چند ساعت می‌توان بدست آورد (۷۴). این برای مطالعات کیفی مورد استفاده قرار گرفت و تنها در سال ۱۹۹۲ بود که Higuchi و همکارانش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (qPCR) را توسعه دادند، که از روش PCR برای مطالعات بیان ژن استفاده می‌کند (۴۸). علاوه بر این، آن‌ها سیستمی را طراحی کردند که قادر به شناسایی محصولات PCR در زمان واقعی است. این سیستم از دوربینی استفاده می‌کند که افزایش میزان فلورسنت را تشخیص می‌دهد (۲۶). بنابراین، در qPCR یا PCR در زمان واقعی، فرایندهای تکثیر و تشخیص همزمان در یک واکنش صورت می‌گیرد. از مهم‌ترین کاربردهای Real time PCR تعیین کمّی مقدار ژنِ بیان شده است که به دو روش کمیت‌سنجی مطلق (Quantification Absolute) و نسبی (Quantification Relative) انجام می‌گیرد. بررسی بیان ژن‌ها (مطالعات ترنسکریپتومیک) نقش اساسی در درک سازوکار گیاهان در مقابله با تنش‌های زیستی (۳۱،۶۳) و تنش‌های غیرزیستی (۸۷، ۸۲، ۵۹، ۷۶) دارند که با استفاده از این روش می‌توان مورد مطالعه قرار داد.

با استفاده از این روش می‌توان اثر یک یا چند دارو یا تیمار را بر روی بیان ژن خاصی مورد مطالعه قرار داد. با استفاده از این روش می‌توان عوامل بیماری‌زای عفونی مانند HIV و HBV را ردیابی و میزان دقیق آن را تشخیص داد. با استفاده از این روش می‌توان آلودگی‌های مواد غذایی را تشخیص داد. با استفاده از این روش سرطان‌هایی مانند سرطان خون و تعیین خطر بازگشت آن مشخص می‌شود. در ژن درمانی از این روش استفاده‌های مفیدی می‌شود. در این حالت برای تعیین دوز وکتور حاوی ژن مورد نظر یا تعداد نسخه‌ی آن و ارزیابی

1- Polymerase chain reaction

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

اینکه وکتور وارد چه سلول‌ها یا بافتی شده است از Real time PCR استفاده می‌شود (۱۹). با استفاده از این روش می‌توان اختلاف بیان ژن‌های دفاعی گیاهی در شرایط مختلف رشدی و تنشی بین دو یا چند نمونه گیاه بیمار و سالم را مورد مشاهده و بازبینی قرار داد (۲۱). به‌عنوان نمونه در تحقیقی بیان متفاوت ژن‌های دفاعی بین برهم‌کنش‌های سازگار و نیمه سازگار آفتابگردان و قارچ *Phoma macdonaldii* مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴).

مزایای روش qPCR

مزایای اصلی این روش به شرح زیر است (۳۵):
سرعت: زمان آزمایش تقریباً ۱ الی ۲ ساعت است درحالی که در PCR معمولی با انجام مراحل الکتروفورز ۴ تا ۴/۵ ساعت طول می‌کشد. سادگی: این روش به یک جفت آغازگر، یک آنزیم، dNTP و به طور اختیاری به یک کاوشگر نیاز دارد که امروزه این مواد به‌صورت مسترمیکس عرضه می‌شود. راحتی: به پردازش پس از تکثیر نیاز ندارد. حساسیت: نمونه‌هایی که نسخه بسیار کمی از RNA پیام‌رسان را دارند می‌توانند کمّی شوند. اختصاصیت: یک روش کارآمد با اختصاصیت بالا است. عملکرد بالا: هزاران واکنش را می‌توان در یک آزمایش انجام داد و تفسیر نتایج به کمک آنالیز منحنی ذوب است. آشنایی: PCR شناخته شده است. مزایا و معایب آنها به خوبی درک شده است. قیمت معرف‌ها مقرون به صرفه است و با حجم واکنش کم، هزینه‌ها کاهش می‌یابد.

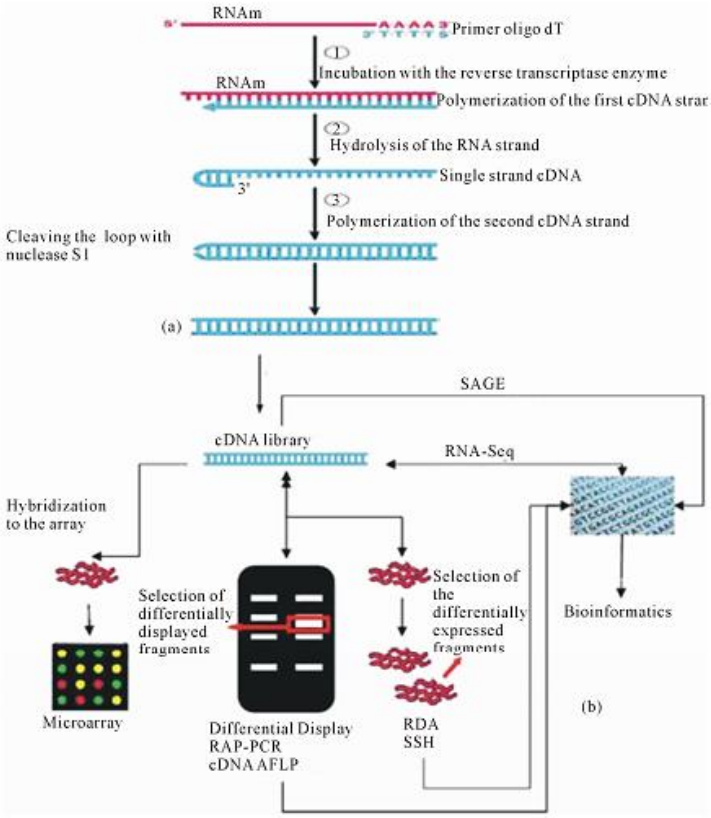
معایب روش qPCR

از آنجا که رنگ SYBR Green می‌تواند به هر DNA دو رشته‌ای متصل شود، مهم‌ترین عیب PCR در زمان واقعی با این رنگ این است که ممکن است تکثیرهای مثبت کاذب (به عنوان مثال اتصال به توالی DNA دورشته‌ای غیر اختصاصی) ایجاد کند. با این حال، برای کاهش این مسئله، طراحی آغازگر مناسب مورد نیاز است و همچنین می‌توان تجزیه و تحلیل منحنی ذوب را در طول چرخه‌های تکثیر کنترل کرد. این مشکل هنگام استفاده از پروب‌های فلورسنت یا پروب‌های هیبریداسیون دوتایی چالش کمتری دارد. یک کاوشگر در انتهای ۳ پریم انتهایی خود یک فلوروفور دهنده را حمل می‌کند و دیگری فلوروفور گیرنده در انتهای ۵ پریم خود مانند TaqMan، Molecular beacon حمل می‌کند (۵). با این حال، این گزینه‌ها هزینه‌بر هستند. PCR در زمان واقعی نیز به ترموسایکلرها و کیت‌های تجاری ویژه (بافر، رنگ و آغازگرهای فلورسنت) نیاز دارد که معمولاً برای آزمایشگاه‌های متوسط گران قیمت هستند. همچنین باید تأکید کرد که در این روش طراحی دقیق آغازگر، بهینه‌سازی و انتخاب ژن‌های مرجع پایدار نیز ضروری است. با این حال، برنامه‌های تجاری و رایگان برای کمک به غلبه بر این مسائل موجود است. برای استاندارد و نرمال‌سازی دقیق و بهینه داده‌های qRT-PCR، می‌توان از چندین ژن کنترل داخلی (۹۰) یا استفاده از روش تخمین واریانس مبتنی بر مدل برای چندین ژن استفاده کرد (۴).

کتابخانه‌های مکمل DNA (cDNA)

برای ایجاد کتابخانه‌های cDNA برای استفاده در مطالعات بیان ژن بر اساس مکمل بودن، که در آن RNA پیام‌رسان به عنوان الگویی برای شناسایی ژن رمزگذار و مطالعه آن در تنظیم و عملکرد استفاده می‌شود و ترانس‌کریپتاز معکوس برای تبدیل RNA به cDNA کاربرد دارد (شکل ۸) (۶۶). این تبدیل با استفاده از الگوی mRNA، dNTPها، ترانس‌کریپتاز معکوس و آغازگرهای الیگو dT، که به دم Poly-A mRNA متصل شده و فرآیند تبدیل را شروع می‌کنند. قطعات به دست آمده توسط این فرآیند سپس به وکتورها متصل می‌شوند، همسانه‌سازی و توالی‌یابی می‌شوند. این توالی‌ها را می‌توان با جستجوی پایگاه داده‌های موجود برای همانندجویی تجزیه و تحلیل کرد و یا می‌توان در ریزآرایه‌ها یا روش‌های نمایش اختلاف بیان برای ارزیابی بیان متفاوت ژنها استفاده کرد (۴۹). این توالی‌ها همچنین می‌توانند در آزمایش‌های همسانه‌سازی ژن یا برای ساخت کتابخانه‌های پپتیدی استفاده شوند (۹۹). از آغازگرهای اختصاصی که متناسب با مناطق خاصی از توالی هستند نیز می‌توان استفاده کرد، اما نیاز به آگاهی از توالی ژن هدف دارد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل ۸- (a) شماتیک تبدیل mRNA به cDNA (b) استراتژی‌ها و روش‌ها برای به دست آوردن کتابخانه‌های cDNA و انجام مطالعات بیان ژن (۱۲)

Figure 8. (a) Schematic of mRNA to cDNA conversion (b) Strategies and methods for obtaining cDNA libraries and conducting gene expression studies (12)

از کتابخانه‌های مختلف cDNA در شناسایی و مطالعه ساختار ژن و روشن‌سازی مکانیسم‌های مولکولی استفاده شده است. بیان متفاوت این توالی‌ها امکان تجزیه و تحلیل توزیع مکانی و زمانی محصولات ژنی را در هر دو عامل بیماری زا و میزبان فراهم می‌کند (۲۳). مطالعه تعاملات سازگار و ناسازگار بین گندم و (Pst) *Puccinia striiformis* یک کتابخانه cDNA از ۵۷۹۳ توالی بیان شده تولید کرد که ۲۷۴۳ توالی منحصر به فرد مربوط به تعامل سازگار گندم و Pst بود (۴۵). این مطالعه همچنین نشان داد که بیان متفاوت ژن‌ها در طی مراحل مختلف آلودگی رخ داده است و این تفاوت‌ها به سازگاری یا ناسازگاری نوع تعامل گیاه و پاتوژن بستگی زیادی دارد. بیان متفاوت ژن در سویای آلوده به *Phakopsora pachyrhizi* با استفاده از کتابخانه‌های cDNA به دست آمده توسط تعیین توالی mRNA بررسی شده است. با این روش، در میان چیزهای دیگر، افزایش بیان چاپرون‌های مس *Clostridium stercorarium* subsp. stercorarium (CSS)، سیتوکروم P450، O-متیل ترانسفرازها و ردوکتازها، کیتیناز کلاس چهار، β-۱،۳گلوکانازها، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، لیپوکسیژناز ۲، انتقال دهنده‌های کاست اتصال ATP (انتقال‌دهنده‌های ABC)، هیدرولازهای dienelactone و پروتئین‌های با موتیف EF Hand تشخیص داده شده است (۸۹). بیشتر این ژن‌ها به طور مستقیم یا غیرمستقیم با مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان مرتبط هستند. به عنوان مثال، چاپرون‌ها، پروتئین‌های گیرنده فلزی هستند که مس را به سیتوپلاسم و محفظه‌های داخل سلولی یا به مکان‌های خاصی مانند آنزیم‌های وابسته به مس منتقل می‌کنند. در گیاهان، سه عضو (CCH، CCS و COX17) از این خانواده شناسایی و طبقه بندی شده‌اند. مس در چندین فرآیند فیزیولوژیکی، از جمله فرآیندهای مربوط به دفاع، مانند تنش اکسیداتیو و سنتز گیرنده‌های هورمون گیاهی اتیلن نقش دارد (۸). مثال دیگر سیتوکروم P450 است که در فرایندهای سم‌زدایی سلولی مانند سم‌زدایی از علف‌کش‌ها و بیوسنتز Cutin و هورمون‌هایی مانند براسینواستروئیدها نقش دارد (۶۰). کیتینازهای کلاس چهار با از بین بردن پیوندهای گلیکوزیدی در دیواره‌های قارچ به عنوان قارچ‌کش عمل می‌کنند (۸۸).

روش cDNA-AFLP

در این روش، RNA به cDNA تبدیل شده و متعاقباً با دو آنزیم برشی؛ یکی با ناحیه‌ی برش نادر (Rare-cutter) مثل *EcoRI* و دیگری با ناحیه‌ی برش زیاد (Frequent-cutter) مثل *MseI*، هضم می‌شود. پیوند دهنده‌های مصنوعی به انتهای cDNA متصل می‌شوند و از آغازگرهای مکمل این پیوند دهنده‌های مصنوعی برای تکثیر قطعات استفاده می‌شود، و روی ژل مقایسه می‌شوند (شکل ۹). قطعات مختلف در اندازه‌های مختلف (نمایانگر ژن‌های با بیان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

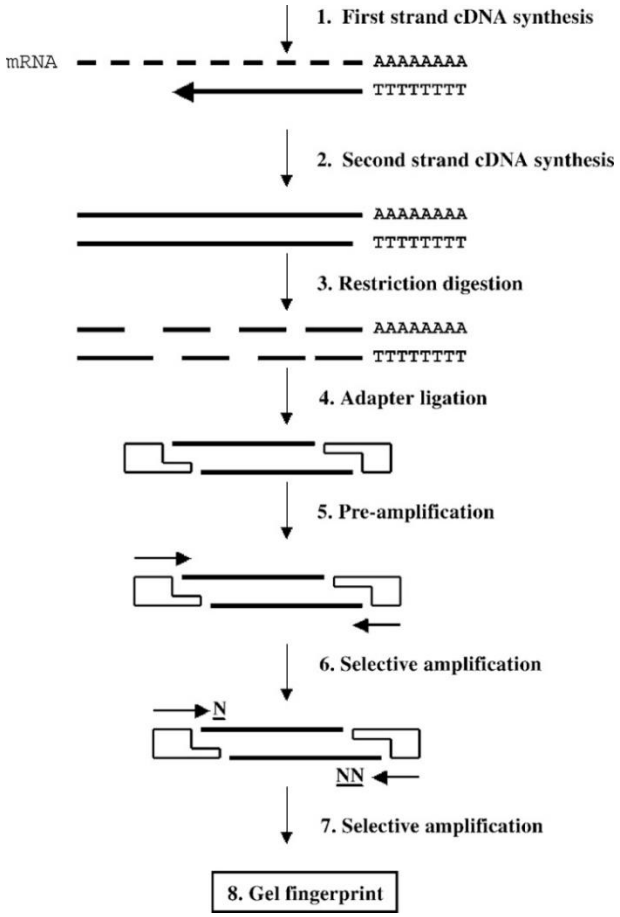
متفاوت) می‌توانند جدا شده و توالی‌یابی شوند (۷). در یک مطالعه که در آن گندم به *Puccinia striiformis* آلوده شد، با cDNA-AFLP، ۲۵۵ نسخه با تغییرات بیان پس از عفونت شناسایی شد، که ۱۶۱ مورد آنها به عنوان پایه طبقه‌بندی شده‌اند؛ زیرا در هر دو فعل و انفعالات سازگار و ناسازگار القا می‌شوند؛ در حالی که ۹۴ مورد به طور ترجیحی در تعامل ناسازگار بیان می‌شوند (۹۳). این توالی‌ها همسانی با ژن‌های مربوط به متابولیسم و فتوسنتز، دفاع و انتقال سیگنال، رونویسی، حمل و نقل، متابولیسم پروتئین و ساختار سلول را نشان داد.

مزایای روش cDNA-AFLP

این روش با استفاده از تجهیزات استاندارد کارآمد، نسبتاً ارزان و از نظر فنی ساده است. علاوه بر این، هیچ دانش قبلی در مورد ژنوم مورد نیاز نیست. سختگیری زیاد در شرایط PCR باعث کاهش محصولات کاذب و جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی آغازگرها می‌شود. در نتیجه، این روش قابل اطمینان و قادر به شناسایی mRNAهای نادر است. در نظرگرفتن چندین کنترل برای یک شرایط خاص یا دوره‌های زمانی در یک ژل امکان‌پذیر است. علاوه بر این، با انجام چندین واکنش PCR می‌توان تعداد mRNAهای غربال شده را افزایش داد. این روش انعطاف‌پذیری و پوشش مناسب mRNA را ارائه می‌دهد. سرانجام، قطعات cDNA تولید شده به طور معمول بزرگتر از ۱۰۰ جفت باز هستند و بنابراین نسبتاً آسان است که ارتباط آنها به یک ژن را یافت (۶۲).

معایب روش cDNA-AFLP

مقایسه ژن با ژن امکان پذیر نیست. تمام قطعات موردنظر باید از ژل برش داده شده و برای تعیین توالی همسانه‌سازی شوند. شناسایی ژن‌های مورد علاقه نسبتاً زمان‌بر است. بعضی از قطعات ممکن است به درستی تکثیر نشوند، بنابراین نمی‌توان پوشش کاملی را بدست آورد (۶۲).



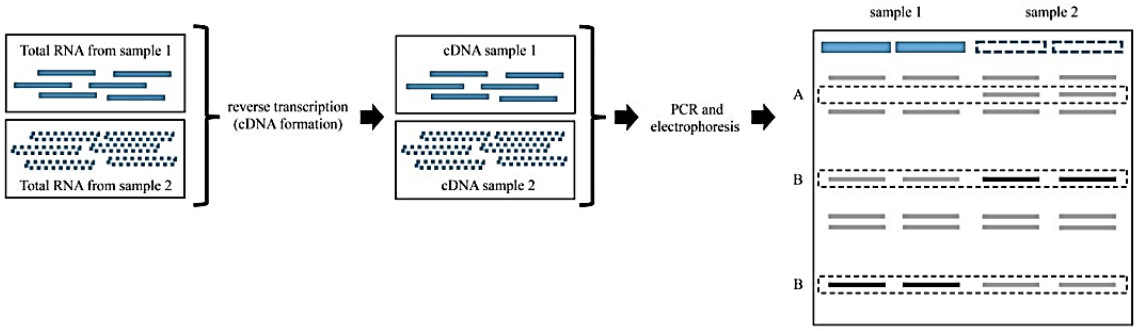
شکل ۹- تصویری شماتیک از مراحل cDNA-AFLP
Figure 9. Schematic representation of cDNA-AFLP steps

روش نمایش افتراقی (DD) و انگشت‌نگاری RNA با آغازگرهای اختیاری (PAR-PCR)

روش اثر انگشت RNA شامل دو پروتکل مختلف است: نمایش افتراقی و انگشت‌نگاری RNA با آغازگرهای اختیاری (RAP-PCR). هر دو پروتکل مبتنی بر تکثیر با PCR بصورت تصادفی از دو یا چند نمونه است که منجر به الگوی متفاوتی از باندها خواهد شد که در حین الکتروفورز مشاهده می‌شوند. این الگوی "منحصر به فرد" اثر انگشت RNA نامیده می‌شود (۶۹). این روش‌ها شامل استخراج RNA، RT-PCR برای تشکیل cDNA و یک واکنش اصلی PCR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

است که در آن یک نوع آغازگر رو به جلو و ۱۲ تا ۲۰ آغازگر معکوس مختلف استفاده می‌شود. این واکنش PCR منجر به تولید بیش از ۲۴۰ ترکیب توالی می‌شود که برای نشان دادن تمام mRNA موجود در نمونه RNA اصلی کافی است. پس از این واکنش، محصولات PCR برچسب‌گذاری شده و الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید انجام می‌شود (شکل۱۰).



شکل۱۰– نمایش افتراقی (روش اثر انگشت RNA). این روش شامل استخراج RNA کل از دو یا چند نمونه است که به cDNA تبدیل می‌شوند. سپس، cDNA های تصادفی با استفاده از ترکیب‌های مختلف آغازگرهای جلو و معکوس با استفاده از PCR تکثیر می‌شوند. محصولات تکثیر شده توسط ژل الکتروفورز مشاهده می‌شوند و هر نمونه الگوی "منحصر به فرد" محصولات رونوشت را دارد. بعضی از قطعات ممکن است فقط در یک نمونه وجود داشته باشد اما در نمونه دیگر وجود ندارد (A)، بعضی از آنها ممکن است در مقایسه با نمونه دیگر دارای شدت کم یا زیاد باشند (۵۸). تفاوت اصلی بین نمایش افتراقی و RAP-PCR این است که در روش نمایش تفاوت از آغازگر لنگر استفاده می‌شود که دم Poly-A را در mRNA ها تشخیص می‌دهد؛ در حالی که RAP-PCR از آغازگر با توالی اختصاصی دلخواه با تقریباً ۱۰ جفت باز استفاده می‌کند (۴۰). از مزایای آن می‌توان به مقایسه چندین نمونه و شناسایی ژن‌هایی با کاهش و افزایش بیان اشاره کرد. با این حال، هر دو پروتکل کمی نیستند و زمان‌بر هستند. چندین مورد مثبت کاذب نیز گزارش شده است (۳۲)

Figure 10. Differentuial display (RNA fingerprint method). This technique involves extracting whole RNA from two or more samples that are converted to cDNA. Then, random cDNAs are amplified using different combinations of forward and reverse primers using PCR. Amplified products are observed by gel electrophoresis, and each sample has a "unique" pattern of transcript products. Some components may be present in only one sample but not in another (A), some may be more or less intense compared to another (58). The main difference between the differential display and RAP-PCR is that the differential display method uses an anchor primer that detects Poly-A tails in mRNAs, while RAP-PCR uses a primer with an arbitrary specific sequence with approximately Uses 10 bp (40). Its advantages include comparing several samples and identifying genes by decreasing and increasing expression. However, both protocols are time consuming. Several false positives have also been reported (32)

مطالعه بیان افتراقی گندم در پاسخ به زنگ زرد با استفاده از روش DD، بیان افتراقی ۱۴ قطعه ژن را نشان داد؛ برخی از آنها با ژن‌های درگیر در سنتز سیکلوفیلین‌ها و یوبی‌کویتین‌های ضد قارچ (Rad6) همولوژی نشان داد (۱۱). این محققین همچنین نشان دادند که این توالی‌ها در روند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و مکانیسم‌های دفاعی و مقاومت نقش دارند.

مزایای روش DD

DD-PCR از مزایای مختلفی از جمله سرعت و حساسیت برخوردار است. فقط مقادیر کمی RNA برای مقایسه همزمان چندین شرایط یا متغیرها و شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بیش از یک جمعیت مورد نیاز است (۸۶).

معایب روش DD

اگرچه روش DD-PCR نسبتاً ساده است، اما غیرقابل تکرار بودن و قرائت مثبت کاذب ممکن است در شرایط سخت PCR که برای آغازگرهای غیر اختصاصی استفاده می‌شود، مشاهده شود (۸۶).

ژن با بیان متفاوت با مقایسه حضور و یا شدت باندها در نمونه‌های مختلف مشخص می‌شود (۴۰). این محصولات PCR ممکن است انتخاب و از ژل خالص‌سازی شوند و با استفاده از PCR مجدداً تکثیر شوند تا در تعیین توالی و سایر روش‌ها استفاده شوند.

روش MPSS

روش MPSS روش دیگری است که برای تعیین میزان کمّی نسخه‌های mRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نظر نتایج مانند روش SAGE است، و تفاوت آن با روش SAGE به کارگیری یکسری مراحل بیوشیمیایی و توالی‌یابی متفاوت است. این روش سطوح بیانی همه‌ی ژن‌ها را در یک نمونه به وسیله‌ی شمارش تعداد مولکول‌های منحصربفرد mRNA که به وسیله‌ی هر ژن تولید می‌شود، تجزیه می‌کند. در این روش به آماده‌سازی ژن‌هایی که قرار است مورد بررسی قرار بگیرند، نیازی نیست. در روش MPSS مقدار بسیار کم مولکول‌های mRNA نیز قابل بررسی هستند و داده‌های خروجی آن نیز به‌صورت دیجیتال هستند؛ در نتیجه کار با آن‌ها آسان می‌باشد. اخیراً تکنولوژی‌های بسیاری بر پایه‌ی ریزآرایه و غیر ریزآرایه وجود دارد، و این روش کمک بسیار زیادی به آزمایش‌هایی که در زمینه‌ی زیست‌شناسی دیجیتال انجام می‌شود خواهد کرد. این تکنولوژی در مورد برهمکنش بیمارگر و گیاه زیاد مورد استفاده قرار نگرفته است، اما برای پایش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

تنظیم نسخه‌برداری در گیاه زیاد مورد مطالعه قرار گرفته است. در مورد بیمارگرهای یوکاریوتیک مانند قارچ‌ها، اومیست‌ها و یا حیوانات خسارت‌زننده این روش می‌تواند جهت پایش وقایع نسخه‌برداری به طور همزمان با میزبان مورد استفاده قرار بگیرد (۹۷).

تجزیه و تحلیل سریالی بیان ژن (SAGE)

روش SAGE برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط ولکولسکو و همکارانش در دانشگاه جان هاپکینز آمریکا ارایه شد (۹۱). اخیراً در تحقیقات سرطان همراه با نسل جدید EST مورد استفاده قرار گرفته است. این روش ترکیبی که به آن Tagseq نیز گفته می‌شود، شناسایی بیشتر ژن‌ها را در مقایسه با پروتکل SAGE امکان‌پذیر می‌کند. محققان این روش را در سرطان پستان آزمایش کردند و نتیجه گرفتند که این یک روش دقیق، حساس و کاربردی برای تولید پروفایل بیان ژن در سرطان‌ها است (۶۱). علاوه بر سرطان، این روش همچنین برای مطالعه مشخصات بیان ژن در سایر مسیرهای بیماری نیز مرتبط است.

در واقع، SAGE نسخه تسریع شده‌ای برای تعیین توالی EST است که در آن از برچسب‌های توالی کوتاه (برچسب‌های SAGE) برای شناسایی رونوشت ژن استفاده می‌شود (شکل ۱۱). این پروتکل شامل استخراج RNA و انجام RT-PCR با استفاده از یک آغازگر دارای برچسب بیوتین است. cDNA حاصل توسط یک اندونوکلئاز خاص معروف به NlaIII هضم می‌شود که توالی چهار جفت باز CATG را تشخیص می‌دهد. قطعات هضم شده خالص شده و سپس دو اتصال‌دهنده دهنده (لینکر) A و B در واکنش‌های جداگانه اضافه می‌شوند. این اتصال‌دهنده‌ها توالی مکمل آغازگرهای PCR هستند و به عنوان توالی شناسایی برای یک اندونوکلئاز دیگر FokI عمل می‌کنند. بنابراین، مرحله دوم هضم انجام می‌شود. FokI اتصال‌دهنده‌ها را تشخیص داده و cDNA را ۹ جفت باز در پایین‌دست می‌شکافد. محصولات دوباره خالص شده، با هم پیوند خورده و توسط PCR تکثیر می‌شوند. مرحله نهایی هضم با استفاده از NlaIII برای جدا کردن اتصال‌دهنده‌ها، تولید ditags با ۹ جفت باز از دو رونوشت متفاوت انجام می‌شود. چندین ditags به هم پیوند داده می‌شوند؛ برای تولید داده‌های توالی SAGE همسانه‌سازی و توالی‌یابی می‌شوند (۵۸). به طور خلاصه، برچسب SAGE یک توالی نه جفت بازی است که به طور اختصاصی در پایین‌دست از آخرین جایگاه شناسایی اندونوکلئاز یک رونوشت قرار دارد. هر برچسب منحصر به فرد SAGE رونوشت منحصر به فردی را نشان می‌دهد و به شما اجازه می‌دهد تا مروری بر همه ژن‌های بیان شده در نمونه RNA اصلی داشته باشید. تفاوت در بیان ژن را می‌توان با مقایسه مقدار برچسب‌های خاص SAGE در کتابخانه‌های مختلف شناسایی کرد (۱۵).

از جمله کاربردهای رایج SAGE در مطالعات گیاهی می‌توان به مطالعه برهمکنش میزبان با پاتوژن، بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی، مطالعه‌ی متابولیسم مواد سمی و بررسی پروفایل‌های بیانی بافت یا ارگان بخصوص اشاره نمود. هر چند اغلب این بررسی‌ها بر روی مدل‌های گیاهی برنج و آرابیدوپسیس صورت گرفته است ولی استفاده از روش SAGE در مطالعه سایر گیاهان نیز روز به روز در حال گسترش است (۹۷). در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای با عنوان تجزیه بیان ژن‌ها در برهمکنش میزبان گیاهی و بیمارگر با استفاده از روش Super SAGE انجام گرفت. در این مطالعه با استفاده از این روش، پروفایل بیان ژنی در هر دو موجود برنج و قارچ بیمارگر به‌صورت همزمان بررسی شد. با استفاده از این روش، ژن‌هایی که در این برهمکنش در پاسخ به الیسیتور بیمارگر مقدار بیان آنها زیاد و کم شده بود، شناسایی شدند. بررسی‌ها نشان دادند که تعداد زیادی از ژن‌هایی که میزان بیان آنها کاهش پیدا می‌کند مربوط به پروتئین‌هایی هستند که در فرایند فتوسنتز نقش دارند. این بررسی نشان داد که Super SAGE یک روش بسیار مفید برای بررسی ترانسکریپتوم سلول در برهمکنش میزبان و بیمارگر، مخصوصاً در مورد موجوداتی که هیچ اطلاعاتی در مورد ژنوم آنها نیست، می‌باشد (۸۰).

مزایای روش SAGE

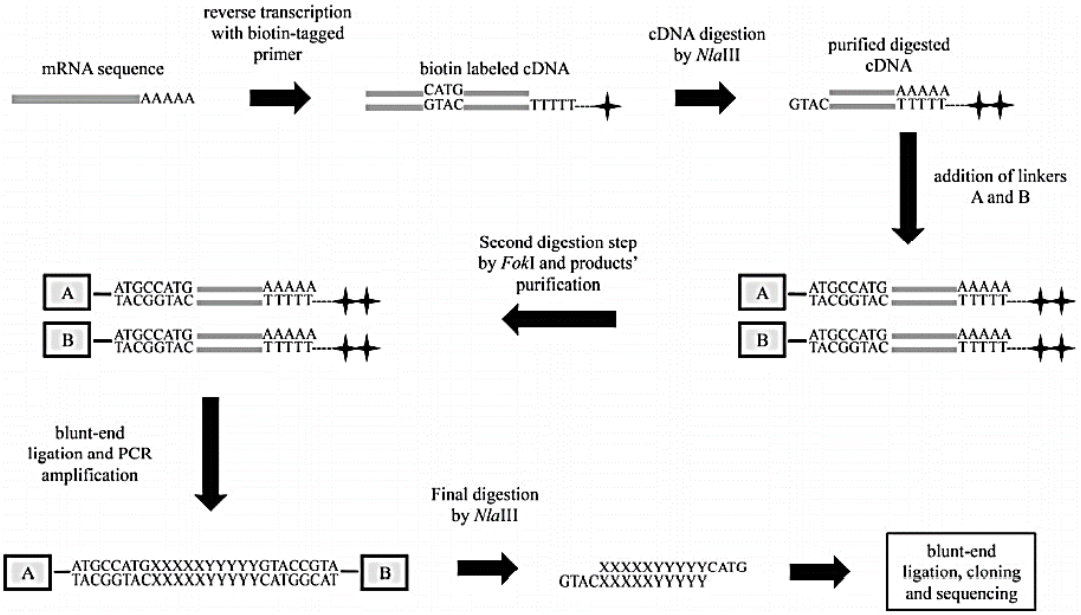
مزایای SAGE این است که یک روشِ دقیق، کمّی و تجمعی است و روش SAGE اجازهٔ تجزیه وسیع رونوشت‌های mRNA را بدون داشتن دانش اولیه در مورد ترانسکریپتوم ارگانیسم فراهم می‌نماید. توالی هر tag برای جستجوی آن در پایگاه اطلاعاتی کافی است و فراوانی هر tag مستقیماً نشان دهنده فراوانی رونوشت مربوطه می‌باشد (۸۰).

معایب روش SAGE

معایب آن این است که به تجهیزات خاصی احتیاج دارد و شناسایی اشتباه برچسب‌ها ممکن است رخ دهد. شناسایی اشتباه شامل تولید خطاهای توالی تا شناسایی نادرست دومین و موتیف‌ها در یک پایگاه داده است. علاوه بر این، بسته به آنزیم خاصی که در پروتکل استفاده می‌شود، ممکن است در شناسایی نسخه‌ها موفق نباشد (۲۵).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

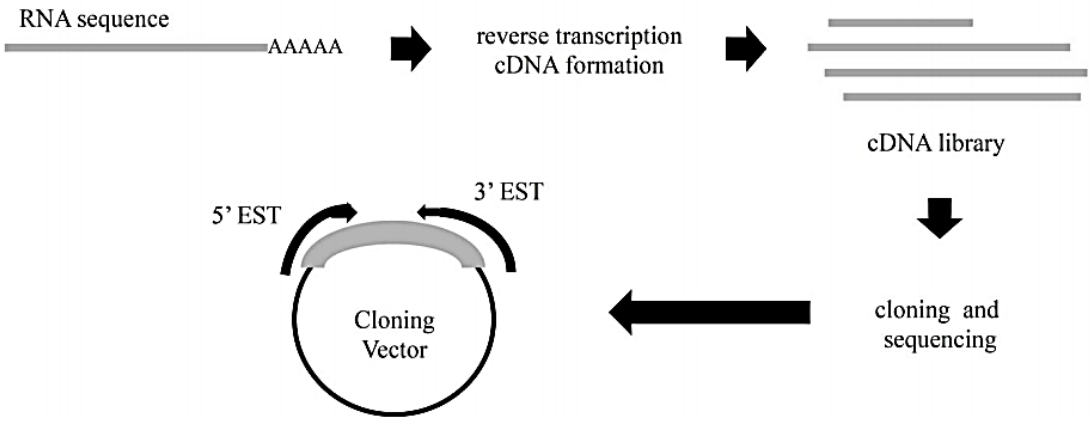
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل ۱۱- تحلیل سریالی بیان ژن (SAGE) (۵۸)
Figure 11. Serial analysis of gene expression (SAGE) (58)

برچسب توالی بیان شونده (EST)

مفهوم EST (Expressed sequence tag) اولین بار در سال ۱۹۹۱ ذکر شد (۱). این اصل شامل انتخاب تصادفی کلون‌ها از کتابخانهcDNA و دسته‌بندی آنها به منظور رسیدن به یک توالی واحد ۳۰۰-۵۰۰ جفت باز است (شکل ۱۲). ژن‌های متفاوت بیان شده با تعداد مختلفی که در کتابخانه EST ظاهر می‌شوند در مقایسه با یک نمونه شاهد مشخص می‌شوند. تعداد بیشتر دفعات شمارش در کتابخانه EST به معنای بیان بالاتر ژن است (۸۴). روش EST معمولاً باید با روش‌های مختلف بیان ژن دیگر ترکیب شود؛ زیرا این یک داده کمّی و کیفی دقیق نیست و اغلب از کتابخانه‌های cDNA نرمال تولید می‌شود.



شکل ۱۲- برچسب توالی بیان شونده (EST). EST یک دنباله فرعی کوتاه از cDNA است که از یک کتابخانه cDNA با طول ۳۰۰-۵۰۰ جفت باز انتخاب شده است. ژن‌های مختلف بیان شده با توجه به مقدار توالی‌های تولید شده آن‌ها توسط کلون‌ها در مقایسه با یک نمونه شاهد مشخص می‌شوند (۵۸)
Figure 12. Expressed sequence tag (EST). EST is a short cDNA sequence selected from a 300-500 bp cDNA library. The different genes expressed are identified by the amount of sequences produced by the clones compared to a control sample (58)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

توالی‌یابی RNA[1] (RNA-Seq) یا توالی‌یابی شاتگان کل ترنسکریپتوم[2] (WTSS):

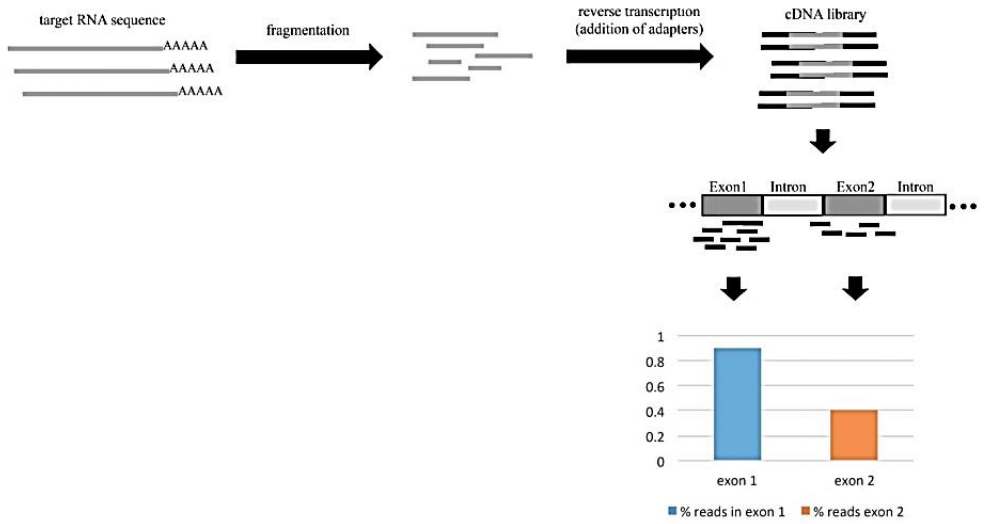
در سال ۱۹۶۴، Holley اولین توالی‌یابی کامل یک ژن را انجام داد. در دهه ۱۹۷۰، ماکسام و گیلبرت یک فن‌آوری توالی‌یابی DNA را بر اساس تغییرات شیمیایی DNA و به‌دنبال آن شکافتن در بازهای مشخص ایجاد کردند، در حالی که سانگر یک روش تعیین توالی DNA را بر اساس روش ختم زنجیره ایجاد کرد. تعیین توالی سانگر با تأثیر زیاد و رادیواکتیویته پایین به عنوان توالی‌یابی نسل اول مشهور شد (۴۳،۱۳). در سال ۲۰۰۵، انقلاب بزرگی در زمینه تعیین توالی DNA رخ داد، اولین توالی با عملکرد بالا در بازار ظاهر شد. اکنون چندین شرکت مسئول توالی‌یابی‌ها با توان بالا هستند (۱۳). RNA-Seq یک رویکرد قدرتمند و جدید در تجزیه و تحلیل رونوشت‌ها است که با استفاده از قابلیت‌های توالی‌یابی نسل‌بعدی (NGS[3]) رونوشت مورد نظر از یک ژنوم را در هر لحظه شناسایی و کمّی می‌کند (۶۴). این روش، اندازه‌گیری دقیق‌تر سطح رونوشت‌ها و ایزوفرم‌های آنها و تجزیه و تحلیل بهتر ترنسکریپتوم ژنوم با وضوح بالاتر را فراهم می‌کند (۶۴). این روش جمعیت‌های مختلف RNA را شامل می‌شود که شامل RNA کل، RNAهای کوچک مانند miRNA، tRNA و ریبوزومی است، که به عنوان بازیگران اصلی در توسعه و پیشرفت سرطان نیز شناخته می‌شوند (۹۲). یکی از مهمترین اهداف آزمایش‌های RNA-Seq تشخیص تغییرات بیان ژن‌ها در دو یا چند شرایط و تیمار متفاوت می‌باشد. سطح بیان هر RNA توسط اندازه‌گیری تعداد قطعات توالی‌یابی شده برای هر رونوشت خاص تعیین می‌شود (۴۴). RNA-Seq به‌عنوان روشی مؤثر برای مقایسه بیان RNA در شرایط تنش و غیرتنش در گیاهان مختلف از جمله ذرت، آربیدوپسیس، هلو، برنج و گیاهان دیگری استفاده شده است (۴۴) و نشان‌دهنده اهمیت و کارایی این روش در بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی است. تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم با رهیافت شبکه در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری با استفاده از توالی‌یابی RNA انجام شد (۵۵). در سال ۲۰۲۲ با استفاده از توالی‌یابی RNA، ژن‌های با بیان متفاوت در آفتابگردان متحمل به شوری شناسایی شد (۸۳). در مطالعه‌ای مقایسه تجزیه ترنسکریپتوم در دو ژنوتیپ ذرت با سطح تحمل متفاوت به تنش شوری در سال ۲۰۲۲ به کمک روش توالی‌یابی RNA انجام شد (۵۶).

در سال ۲۰۱۰ با استفاده از روش‌های توالی‌یابی mRNA برنج تحت شرایط تنش شوری ۲۱۳ ژن تغییر بیان یافته در ساقه و ۴۱۹ ژن تغییر بیان یافته در ریشه شناسایی شد (۶۲). برای این ۶۳۲ ژن هیچ‌گونه تفسیری در بانک‌های اطلاعاتی گزارش نشده بود؛ بعضی از آن‌ها که پروتئین‌های فرضی را رمز می‌کنند، و در پاسخ به تنش شوری تفاوت بیان نشان می‌دهند. Kakumanu و همکاران (۲۰۱۲) ترنسکریپتوم ذرت را با استفاده از روش RNA-Seq تحت شرایط شاهد (نرمال) و تنش خشکی بررسی کردند (۵۴). این گروه گزارش کردند که تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات و ژن‌های مرتبط با متابولیسم ساکارز و نشاسته در بافت جنین اتفاق می‌افتد، که با کاهش میزان نشاسته و فعالیت انتقال ساکارز همراه بوده است، در حالی که در مریستم برگ چنین تغییراتی مشاهده نشد. همچنین گزارش شد که شروع فرایندهای وابسته به اسیدآبسزیک تنها در بافت جنین اتفاق می‌افتد (۵۴). پیشرفت‌های اخیر در توالی‌یابی نسل بعد باعث شده که بازه پوشش توالی‌یابی نوکلئوتیدهای DNA و همچنین مقدار نمونه ورودی برای توالی‌یابی افزایش پیدا کند. این پیشرفت‌ها، توالی‌یابی رونوشت‌های RNA سلول را تسهیل و این امکان را به‌وجود می‌آورد که رونوشت‌های پردازش شده (Spliced) ژن، تغییرات پس از رونویسی، همجوشی ژن‌ها (Gene fusion)، جهش‌ها و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism: SNP) و در نهایت تغییرات در بیان ژن بررسی شود (۵۴).

اجزای اساسی تکنولوژی RNA-Seq شامل پنج مرحله مهم است: ۱- انتخاب بافت موردنظر که قرار است رونوشت‌ها در آن بافت مطالعه شود. ۲- استخراج RNA از نمونه‌ها. ۳- تهیه کتابخانه cDNA. ۴- تعیین توالی. ۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک (۶۸) (شکل ۱۳). میلیون‌ها خوانش کوتاه به دست می‌آید که به ژنوم یا ترنسکریپتوم منطبق می‌شوند. خوانش‌ها باید برای جمع‌بندی همه داده‌ها تراز شوند. سرانجام، داده‌ها نرمال می‌شوند و از آزمون‌های آماری برای مطالعه بیان افتراقی ژن استفاده می‌شود و در نتیجه طبقه‌بندی ژن‌ها با سطح بیان، مقادیر p (P-value) و تغییرات چند برابر (Fold-change) انجام می‌شود (۶۸).

1- RNA sequencing 2- Whole transcriptome shotgun sequencing 3-Next-Generation Sequencing

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]



شکل ۱۳- روش RNA-Seq (۵۷)
Figure 13. RNA-Seq method (57)

مزایا و معایب RNA-Seq:

فناوری RNA-seq مزایای متعددی نسبت به روش‌های دیگر که هدف آنها بررسی بیان ژن است دارد:
وضوح یک باز: می‌تواند تغییرات را در سطح یک نوکلئوتید (SNP) در رونوشت‌ها، ریزماهواره‌ها، ایزوفرم‌ها و انواع آلل‌ها تشخیص دهد. دامنه پویایی گسترده: محدودیتی برای تعیین کمیت وجود ندارد و با تعداد توالی‌های بدست آمده ارتباط دارد. بنابراین، می‌تواند ژن‌های بیان شده در سطح بسیار پایین یا بسیار بالا را تجزیه و تحلیل کند که توسط سایر روش‌ها تشخیص داده نمی‌شود. سیگنال پس زمینه پایین به بهبود دامنه دینامیکی کمک می‌کند. قرائت کوتاه: قرائت از ۳۰ جفت‌باز برای دستیابی به اطلاعات دقیق در مورد نحوه اتصال دو اگزون. بسیار دقیق: با مطالعات اعتبار سنجی با PCR کمّی نشان داده شده است. سطح بالای تکرارپذیری. نمونه RNA پایین: زیرا هیچ مرحله همسانه‌سازی وجود ندارد. نیازی به ژنوم مرجع نیست: یک قرائت را می‌توان بدون ژنوم مرجع انجام داد و رونویسی را می‌توان مجدداً مونتاژ (سرهم بندی) کرد. این یک مزیت برای گونه‌هایی است که ژنوم آنها هنوز توالی‌یابی نشده است (۱۳). با این حال، این روش محدودیت‌هایی از قبیل هزینه زیاد دارد. در مقایسه با سایر روش‌ها به منابع زیادی نیاز دارد. مجموعه داده‌ها گسترده و پیچیده است، مقدار زیاد داده‌های تولید شده تفسیر را دشوار می‌کند و به طور مشترک به یک مشاور بیوانفورماتیک نیاز است (۷۷).

نتیجه‌گیری کلی

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی یک استراتژی مؤثر و کارآمد برای مطالعه مسیرهای سلولی بیولوژیکی است زیرا اجازه می‌دهد ژن‌ها را شناسایی کرده و مکانیسم‌های مولکولی مربوط به پدیده‌های فیزیولوژیکی، انتقال سیگنال، متابولیسم اولیه و ثانویه، مکانیسم‌های دفاعی، فشار تنش و سایر عوامل ژنتیکی و فیزیولوژیکی را توضیح داد. روش‌ها و استراتژی‌های مختلفی وجود دارد که می‌تواند برای مطالعه بیان افتراقی به کار گرفته شوند و با در نظر گرفتن محدودیت‌های ذاتی هر یک، از تمام روش‌های مورد بحث در این مقاله می‌توان در این زمینه استفاده کرد (جدول ۱). انتخاب روش و یا استراتژی مورد استفاده توسط فناوری موجود به همراه هزینه و محدودیت‌های تجزیه تعیین می‌شود. هنگام انتخاب روش‌های مورد استفاده در یک تحقیق خاص، این محدودیت‌ها باید از نظر روش‌شناختی یا آماری به حداقل برسد تا نتایج قابل اعتماد و نماینده وضعیت مورد مطالعه باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

جدول ۱- مزایا و محدودیت‌های ذاتی روش های بررسی بیان ژن

Table 1. Advantages, critical points and inherent limitations of differential expression analysis methodologies

Method روش	Advantages مزیت‌ها	Disadvantages معایب	Application in the field of plants کاربرد در زمینه گیاهان
Northern blot	Relative simplicity, cost-effectiveness and the possibility of providing valuable information about the type, size and abundance of RNA, detecting different forms of RNA splicing سادگی نسبی، مقرون به صرفه بودن و امکان ارائه اطلاعات ارزشمند در مورد نوع، اندازه و فراوانی RNA، تشخیص اشکال مختلف اسپیلایسینگ RNA	Analysisng a gene in one reaction requires a large amount of RNA and a probe. تجزیه یک ژن در یک واکنش، نیاز به مقدار زیاد RNA و شناساگر (پروب)	Evaluation of changes in the expression of housekeeping genes in the interaction of wheat with the pathogen; *Mycosphaerella graminicola*, investigation of changes in the expression of genes encoding heat shock proteins Hsp 71 and Hsp91 in response to infection with *M. graminicola*, and also investigation of changes in the expression of protein encoding Ethylene 3 insensitive gene in response to infection with *M. graminicola* (21). ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های خانه‌دار در برهمکنش گندم با بیمارگر *Mycosphaerella graminicola*، بررسی تغییرات بیان ژن‌های رمز کنندهٔ پروتئین‌های شوک حرارتی Hsp 71 وHsp91در پاسخ به آلودگی به *M. graminicola* و همچنین بررسی تغییرات بیان ژن رمزکننده پروتئین Ethylene 3 insensitive در پاسخ به آلودگی به *M. graminicola* (21).
RPA	High specificity and sensitivity, quantification of the mRNA level of genes with a high degree of sequence similarity, the possibility of performing multi-probe assays and mapping of transcription start sites and intron and exon junctions. اختصاصیت و حساسیت بالا، تعیین کمیت سطح mRNA ژن‌ها با درجه بالایی از تشابه توالی، امکان انجام سنجش‌های چند کاوشگر و نقشه‌برداری از سایت‌های شروع رونویسی و اتصالات اینترون و اگزون	Relatively difficult and time-consuming, lack of information on transcript size, perfect matching of antisense with template RNA to protect digestion by endonucleases نسبتاً سخت و زمان‌بر، کمبود اطلاعات در مورد اندازه رونوشت، مشابهت کامل آنتی سنس با RNA الگو جهت محافظت از هضم توسط اندونوکلئازها	Expression analysis of the isopropyl malate synthase (IPMS) gene family in *Arabidopsis thaliana* (34). تجزیه و تحلیل بیان خانواده ژن ایزوپروپیل مالات سینتاز (IPMS) در *Arabidopsis thaliana* (34).
Microarray	Speed, flexibility and high ability in biological analysis of several genes simultaneously سرعت، قابلیت انعطاف‌پذیری و توانایی بالای تجزیه و تحلیل بیولوژیکی چندین ژن به‌صورت همزمان	Dependent on existing knowledge, low dynamic range for detecting transcripts, difficult comparison between experiments, inability to detect new transcripts, need for validation وابسته به دانش موجود، محدوده دینامیکی کم برای تشخیص ترانسکریپت‌ها، مقایسه دشوار بین آزمایش‌ها، عدم توانایی در تشخیص ترانسکریپت‌های جدید، ضرورت اعتبارسنجی	Comparison of the expression of genes involved in the SAR pathway in Arabidopsis (47). مقایسه‌ی بیان ژن‌هایی که در مسیر SAR در گیاه ارابیدوپسیس شرکت دارند (47).
SSH	No need for prior knowledge on the transcript sequence to isolate single strands or specialized equipments and analysis such as industrial kits عدم نیاز به دانش قبلی از توالی رونوشت جهت جداسازی تک رشته‌ها یا تجهیزات و تجزیه و تحلیل تخصصی مثل کیت‌های صنعتی	Usable only for pairing comparisons قابل استفاده فقط برای مقایسه جفت شدن	Identification of 4 pathogenicity genes of *F. graminearum* in wheat (22), differential expression of 24 genes in the interaction between *F. graminearum* and wheat (37). شناسایی4 ژن بیماریزایی *F. graminearum* در گندم (22)، بیان متفاوت 24ژن در تعامل بین *F. graminearum* و گندم (37).
RDA	Identification of rare transcripts by amplification شناسایی رونوشت‌های نادر با تکثیر	Need for a large amount of template RNA, use of different restriction enzymes, importance of replication cycles in obtaining sequences with different expression. نیاز به مقدار زیاد RNA الگو، استفاده از آنزیم‌های محدود کننده مختلف، مهم بودن چرخه‌های تکثیر در به دست آوردن توالی-های با بیان متفاوت	Evaluation of non-host response of *Polymyxa graminis* (51), identification of genes with different expression from *Xanthomonas axonopodis pv.* Citri (52). ارزیابی پاسخ غیر میزبانی *Polymyxa graminis* (51)، شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت از *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri (52).
qPCR	Speed and simplicity, sensitivity and specificity and high performance, no need for post-amplification processing سرعت و سادگی، حساسیت و اختصاصیت و عملکرد بالا، عدم نیاز به پردازش پس از تکثیر	Requirement on prior knowledge about gene sequence, possibility of non-specific replication نیاز به دانش قبلی در مورد توالی ژن، امکان تکثیر غیراختصاصی	Differential expression of defense genes between compatible and semi-compatible interactions of sunflower and fungus; *Phoma macdonaldii* (14). بیان متفاوت ژن‌های دفاعی بین برهم‌کنش‌های سازگار و نیمه سازگار آفتابگردان و قارچ *Phoma macdonaldii*(14).
cDNA-AFLP	No need for prior knowledge on the genome, reliable and able to identify rare mRNAs, flexibility and appropriate coverage of the mRNA range. عدم نیاز به دانش قبلی در مورد ژنوم، قابل اطمینان و قادر به شناسایی mRNAهای نادر، انعطاف پذیری و پوشش مناسب از گستره mRNA	It is not possible to compare gene with gene, it is time-consuming to identify the desired genes امکان‌پذیر نبودن مقایسه ژن با ژن، زمانبر بودن شناسایی ژن‌های مورد نظر	Investigation of expression in wheat infected with *Puccinia striiformis* (93). بررسی بیان در گندم آلوده به *Puccinia striiformis* (93).
DD	High speed and sensitivity, requiring small amounts of RNA سرعت و حساسیت بالا، نیاز به مقادیر کم RNA	Irreproducibility, false positive reading غیرقابل تکرار بودن، خواندن مثبت کاذب	Differential expression study in wheat in response to yellow rust (11). مطالعه بیان افتراقی در گندم در پاسخ به زنگ زرد (11).
SAGE	Accurate, quantitative and cumulative method, no need for prior knowledge on gene sequence روش دقیق، کمی و تجمعی، عدم نیاز به دانش قبلی از توالی ژن	Need for special equipment, misidentification of tags, non-production of tags by one gene, or production of too many tags by one gene نیاز به تجهیزات خاص، شناسایی اشتباه برچسب‌ها، تولید نکردن برچسب توسط یک ژن و یا تولید برچسب زیاد توسط یک ژن	Analysis of gene expression in the interaction between rice and pathogenic fungi (80). تجزیه بیان ژن‌ها در برهمکنش برنج و قارچ بیمارگر (80).
RNA-Seq	Finding the relationship between exons and other transcripts, identifying SNPs, sensitive and reproducible analysis. پیدا کردن ارتباط بین اگزون‌ها و رونوشت‌های دیگر، شناسایی SNPها، تجزیه و تحلیل حساس و قابل تکرار	The large volume of data, the effect of the size of transcripts on replication, the need for a next-generation sequencing platform, the need to use multiple computer programs for data analysis. حجم زیاد داده، تأثیر اندازه رونوشت‌ها بر تکثیر، نیاز به پلتفرم توالی‌یابی نسل جدید، نیاز به استفاده از برنامه‌های رایانه‌ای متعدد برای تجزیه و تحلیل داده‌ها.	Identification of genes with different expression in salinity tolerant sunflower (83), study of transcriptome analysis in two maize genotypes with different levels of tolerance to salinity stress (56). شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در آفتابگردان متحمل به شوری (83)، مطالعه‌ی تجزیه ترنسکریپتوم در دو ژنوتیپ ذرت با سطح تحمل متفاوت به تنش شوری (56).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

منابع

1. Adams, M.D., J.M. Kelley, J.D. Gocayne, M. Dubnick, M.H. Polymeropoulos, H. Xiao and R.F. Moreno. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science, 252(5013): 1651-1656.
2. Ahmed, F.E. 2002. Molecular techniques for studying gene expression in carcinogenesis. Journal of Environmental Science and Health, 20(2): 77-116.
3. Alwine, J.C., D.J. Kemp and G.R. Stark. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12): 5350-5354.
4. Andersen, C.L., J.L. Jensen and T.F. Ørntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research, 64(15): 5245-5250.
5. Arya, M., I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya and H.R. Patel. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5(2): 209-219.
6. Azrolan, N and J.L. Breslow. 1990. A solution hybridization/RNase protection assay with riboprobes to determine absolute levels of apoB, AI, and E mRNA in human hepatoma cell lines. Journal of Lipid Research, 31(6): 1141-1146.
7. Bachem, C.W., R.S. Van Der Hoeven, S.M. De Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau and R.G. Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal, 9(5): 745-753.
8. Balandin, T. and C. Castresana. 2002. AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. Plant Physiology, 129(4): 1852-1857.
9. Bartlett, J.M. 2000. RNase protection assay analysis of mRNA for TGFβ1-3 in ovarian tumors. Methods Mol Med, 39: 431-7. doi: 10.1385/1-59259-071-3:431.
10. Bowler, L.D., M. Hubank and B.G. Spratt. 1999. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. Microbiology, 145(12): 3529-3537.
11. Bozkurt, O., T. Unver and M.S. Akkaya. 2007. Genes associated with resistance to wheat yellow rust disease identified by differential display analysis. Physiol. Mol. Plant Pathology, 71(4-6): 251-259.
12. Casassola, A., S.P. Brammer, M.S. Chaves, J.A. Martinelli, M.F. Grando and N.D. Denardin. 2013. Gene expression: a review on methods for the study of defense-related gene differential expression in plants. American Journal of Plant Sciences, 4(12C): 64-73.
13. Costa, V., C. Angelini, I. De Feis and A. Ciccodicola. 2010. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, Article ID 853916.
14. Darvishzadeh, R., T. Hewezi, L. Gentzbittel and A. Sarrafi. 2008. Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower–*Phoma macdonaldii* interactions. Crop Protection, 27(3-5): 740-746.
15. Datson, N.A., J. Vander Perk-de Jong, M.P. Van den Berg, E.R. De Kloet and E. Vreugdenhil. 1999. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. Nucleic Acids Resaerch, 27(5): 1300-1307.
16. Davis, M.M., D.I. Cohen, E.A. Nielsen, M. Steinmetz, W.E. Paul and L. Hood. 1984. Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: the localization and orientation of Ad alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81(7): 2194-2198.
17. Diatchenko, L., Y.F. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang and P.D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(12): 6025-6030.
18. Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(25): 14863-14868.
19. Espy, M.J., J.R. Uhl, L.M. Sloan, S.P. Buckwalter, M.F. Jones, E.A. Vetter and T.F. Smith. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, 19(1): 165-256.
20. Fernández, A.I., C. Óvilo, A. Fernández, C. Barragán, M.A. Toro, C. Rodríguez and L. Silió. 2008. Luces y sombras del análisis de expresión génica utilizando microarrays. Un Ejemplo en Cerdo Ibérico. ITEA, 104(2): 99-105.
21. Gholamnezhad, J., F. Sanjarian, E. Mohammadi Goltapeh, N. Safaei and K.h. Razavi. 2016. Study of changesgraminicola on wheat. 2th International and 14th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran.
22. Goswami, R.S., J.R. Xu, F. Trail, K. Hilburn and H.C. Kistler. 2006. Genomic analysis of host–pathogen interaction between Fusarium graminearum and wheat during early stages of disease development. Microbiology, 152(6): 1877-1890.
23. Guigo, R., P. Agarwal, J.F. Abril, M. Burset and J.W. Fickett. 2000. An assessment of gene prediction accuracy in large DNA sequences. Genome Resaerch, 10(10: 1631-1642.
24. Guo, K., X. Du, L. Tu and W. Tang, M. Pengcheng, Wang, Z. Liu and X. Zhang. 2016. GhUB7-Fibre elongation requires normal redox homeostasis modulated by cytosolic ascorbate peroxidase in cotton (*Gossypium hirsutum*). Journal of Experimental Botany, 67: 3289-3301.
25. Hanriot, L., C. Keime, N. Gay, C. Faure, C. Dossat, P. Wincker and O. Gandrillon. 2008. A combination of LongSAGE with Solexa sequencing is well suited to explore the depth and the complexity of transcriptome. BMC Genomics, 9(1): 1-9.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

26. Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 10(4): 413-417.
27. Hoopes, L. 2008. Introduction to the gene expression and regulation topic room. Nature Education, 1(1): 160.
28. Howard, B. E., Q. Hu, A.C. Babaoglu, M. Chandra, M. Borghi, X. Tan and S. Heber. 2013. High-throughput RNA sequencing of pseudomonas-infected Arabidopsis reveals hidden transcriptome complexity and novel splice variants. PLoS One, 8(10): e74183.
29. Huang, Q., Z. Mao, S. Li, J. Hu and Y. Zhu. 2014. A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting. Rice 7(1): 1-7.
30. Ilyin, S.E., D. Gayle and C.R. Plata-Salamán. 1998. Modifications of RNase protection assay for neuroscience applications. Journal of Neuroscience Methods, 84(1-2): 139-141.
31. Jamshidi, E., M. Parvini Kohneh Shahri and R. Darvishzadeh. 2019. Transcript analysis of telomerase enzyme gene in sunflower infected by sclerotinia stem rot disease. Journal of Plant Molecular Breeding, 7(1): 31-36.
32. Janzen, M.A., D.L. Kuhlers, S.B. Jungst and C.F. Louis. 2000. ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate. Journal of Animal Science, 78(6): 1475-1484.
33. Josefsen, K. and H. Nielsen. 2011. Northern blotting analysis. Methods Mol Biol,703: 87-105. doi: 10.1007/978-1-59745-248-9_7.
34. Junk, D.J and G.S. Mourad. 2002. Isolation and expression analysis of the isopropylmalate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 53(379): 2453-2454.
35. Kessler, H.H. 2014. Molecular diagnostics of infectious diseases. Published by De Gruyter 2014. https://doi.org/10.1515/9783110328127.
36. Kim, J.G., K. Back, H.Y. Lee, H.J. Lee, T.H. Phung, B. Grimm and S. Jung. 2014. Increased expression of Fe-chelatase leads to increased metabolic flux into heme and confers protection against photodynamically induced oxidative stress. Plant Molecular Biology, 86(3): 271-287.
37. Kong, L., J.M. Anderson and H.W. Ohm. 2005. Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. Genome, 48(1): 29-40.
38. Krumlauf, R. 1994. Analysis of gene expression by northern blot. Molecular Biotechnology, 2(3): 227-242.
39. Kuang, W.W., D.A. Thompson, R.V. Hoch and R.J. Weigel. 1998. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. Nucleic Acids Research, 26(4); 1116-1123.
40. Liang, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 257(5072): 967-971.
41. Lin, S.M. and K.F. Johnson. (Eds.) 2002. Methods of microarray data analysis: papers from CAMDA'00. Boston: Kluwer Academic Publishers.
42. Lisitsyn, N and M. Wigler. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. Science, 259(5097): 946-951.
43. Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong and M. Law. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012. https://doi.org/10.1155/2012/251364
44. Lu, T., G. Lu, D. Fan, C. Zhu, W. Li, Q. Zhao and B. Han. 2010. Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. Genome Research, 20(9): 1238-1249.
45. Ma, J., X. Huang, X. Wang, X. Chen, Z. Qu, L. Huang and Z. Kang. 2009. Identification of expressed genes during compatible interaction between stripe rust (*Puccinia striiformis*) and wheat using a cDNA library. BMC Genomics, 10(1): 586.
46. Ma, Y.J., G.A. Dissen, S.R. Rage and Ojeda. 1996. RNase protection assay. Methods, 10(3): 273-278.
47. Makkouk, K.M and S.G. Kumari. 2006. Molecular diagnosis of plant viruses. Arab Jornal of Plant Protection, 24(2): 135-138.
48. Mallona, González, I. 2008. Selección de genes de normalización para RT-PCR cuantitativa en Petunia hybrida. Ciencia y Tecnología Agraria, Izaskun Mallona González Press.
49. Malone, G., P.D. Zimmer, G.E. Meneghello, E. Binneck and S.T. Peske. 2006. Prospecção de Genes em Bibliotecas de cDNA. Current Agricultural Science and Technology, 12(1).
50. Mantione, K.J., R.M. Kream, H. Kuzelova, R. Ptacek, J. Raboch, M. Samuel and G.B. Stefano. 2014. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. Medical Science Monitor Basic Research, 20: 138.
51. McGrann, G.R., L.D. Martin, C.S. Kingsnorth, M.J. Asher, M.J. Adams and E.S. Mutasa-Göttgens. 2007. Screening for genetic elements involved in the nonhost response of sugar beet to the plasmodiophorid cereal root parasite Polymyxa graminis by representational difference analysis. J Gen Plant Pathol, 73(4): 260-265.
52. Mehta, A. and Y.B. Rosato. 2005. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by representational difference analysis of cDNA. Genetics and Molecular Biology, 28(1): 140-149.
53. Meisinger, C and C. Grothe. 1996. A sensitive RNase protection assay using 33 P labeled antisense riboprobes. Molecular Biotechnology, 5(3): 289-291.
54. Mizuno, H., H. Kawahigashi, Y. Kawahara, H. Kanamori, J. Ogata, H. Minami and T. Matsumoto. 2012. Global transcriptome analysis reveals distinct expression among duplicated genes during sorghum-*Bipolaris sorghicola* interaction. BMC Plant Biology, 12(1): 1-15.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

55. Mohasseli, T., S. Dezhsetan, R. Darvishzadeh. 2022. Network-based transcriptome analysis in salt tolerant and salt sensitive maize (*Zea mays* L.) genotypes. Iranian Journal of Crop Sciences, 24(1): 79-92. (In Persian).
56. Mohasseli, T., R. Seyed Rahmani, R. Darvishzadeh, S. Dezhsetan and K. Marchal. 2022. Comparative transcriptome analysis of two maize genotypes with different tolerance to salt stress. Cereal Research Communications, 1-14.
57. Monobe, M.M.D.S. and R.C.D. Silva. 2016. Gene expression: an overview of methods and applications for cancer research. Veterinaria e Zootecnia, 23(4): 532-546.
58. Moody, D.E. 2001. Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. Journal of Animal Science, 79(suppl_E), E128-E135.
59. Moradbeygi, H., R. Jamei, R. Heidari, R. Darvishzadeh. 2020. Fe2O3 nanoparticles induced biochemical responses and expression of genes involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway in *Moldavian balm* under salinity stress. Physiologia Plantarum, 169(4): 555-570.
60. Morant, M., S. Bak, B.L. Møller and D. Werck-Reichhart. 2003. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. Current Opinion in Biotechnology, 14(2): 151-162.
61. Morrissy, A.S., R.D. Morin, A. Delaney, T. Zeng, H. McDonald, S. Jones and M.A. Marra. 2009. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling. Genome Research, 19(10): 1825-1835.
62. Moustafa, K. and J.M. Cross. 2016. Genetic approaches to study plant responses to environmental stresses: an overview. Biology, 5(2): 20.
63. Musa-Khalifani, K.H., R. Darvishzadeh and M. Abrinbana. 2021. Resistance against Sclerotinia basal stem rot pathogens in sunflower. Tropical Plant Pathology, 46(6): 651-663.
64. Nagalakshmi, U., K. Waern and M. Snyder. 2010. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. Current Protocols in Molecular Biology, 89(1): 4-11.
65. Nagalakshmi, U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein and M. Snyder. 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Science, 320(5881): 1344-1349.
66. Nascimento, S., E.R. Suarez and M.A.S. Pinhal. 2010. Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine field. Revista Brasileira de Medicina, 67: 7-19.
67. Newman, C.S and P.A. Krieg. 1999. Ribonuclease protection analysis of gene expression in Xenopus. Molecular Methods in Developmental Biology, 29-40.
68. Oshlack, A., M.D. Robinson and M.D. Young. 2010. From RNA-seq reads to differential expression results. Genome Biology, 11(12): 1-10.
69. Parmigiani, G., E.S. Garrett, R.A. Irizarry and S.L. Zeger. 2003. The Analysis of Gene Expression Data: An Overview of Methods and Software. In: Parmigiani, G., Garrett, E.S., Irizarry, R.A., Zeger, S.L. (eds) The Analysis of Gene Expression Data. Statistics for Biology and Health. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-21679-0_1.
70. Qin, D., F. Wang, X. Geng, L. Zhang, Y. Yao, Z. Ni and Q. Sun. 2015. Overexpression of heat stress-responsive TaMBF1c, a wheat (*Triticum aestivum* L.) Multiprotein Bridging Factor, confers heat tolerance in both yeast and rice. Plant Molecular Biology, 87(1-2): 31-45.
71. Qu, Y. and M. Boutjdir. 2007. RNase protection assay for quantifying gene expression levels. In Cardiac Gene Expression (pp. 145-158). Humana Press.
72. Rabbani, M.A., K. Maruyama, H. Abe, M.A. Khan, K. Katsura, Y. Ito and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiology, 133(4): 1755-1767.
73. Rosenau. C., B. Kaboord and M.W. Qoronfleh. 2002. Development of a chemiluminescence-based ribonuclease protection assay. Biotechniques, 33(6): 1354-1358.
74. Saiki, R.K., S. Scharf. F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230(4732): 1350-1354.
75. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2006. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. Cold Spring Harb Protocols. 2006(1), pdb-prot3932.
76. Sanami, S., M. Pazhouhandeh, R. Valizadeh Kamran and K. Azizpour. 2018. The effect of salt stress on the relative expression of CAT1 and ASX1 genes and some physiological traits in two varieties of tomato. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 6 (2): 281-292.
77. Santos, C.A., D.V. Blanck, and P.D. de Freitas. 2014. RNA-seq as a powerful tool for penaeid shrimp genetic progress. Frontiers in Genetics, 5: 298.
78. Sargent, T.D and I. B. Dawid. 1983. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. Science, 222(4620): 135-139.
79. Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis and P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270(5235): 467-470.
80. Schenk, P.M., S.R. Thomas-Hall, A.V. Nguyen, J.M. Manners, K. Kazan and G. Spangenberg. 2008. Identification of plant defence genes in canola using Arabidopsis cDNA microarrays. Plant Biology, 10(5): 539-547.
81. Sealfon, S.C., T.T. Chu. 2011. RNA and DNA microarrays. Methods Molecular Biology, 671: 3-34.
82. Shahabzadeh, Z., R. Darvishzadeh, R. Mohammadi, M. Jafari. 2019. Isolation, characterization, and expression profiling of nucleoside diphosphate kinase gene from tall fescue (*Festuca arundinaceous* Schreb.) (FaNDPK) under salt stress. Plant Molecular Biology Reporter, 38 (2): 175-186.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

83. Sharifi Alishah, M., R. Darvishzadeh, M. Ahmadabadi, Y. Piri Kashtiban and K. Hasanpur. 2022. Identification of differentially expressed genes in salt-tolerant oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotype by RNA sequencing. Molecular Biology Reports, 49(5):3583-3596.
84. Soares, M.B., M.D.F. Bonaldo, P. Jelene, L. Su, L. Lawton and A. Efstratiadis. 1994. Construction and characterization of a normalized cDNA library. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(20): 9228-9232.
85. Stalder, A.K., A. Pagenstecher, C.L. Kincaid and I.L. Campbell. 1999. Analysis of gene expression by multiprobe RNase protection assay. In: Neurodegeneration methods and protocols. (pp. 53-66). Humana Press.
86. Sturtevant, J. 2000. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. Clinical Microbiology Reviews, 13(3): 408-427.
87. Teymouri, M., M. Parvini Kohneh Shahri, R. Darvishzadeh. 2020. Salt-induced differences during the gene expression of telomerase enzyme in sunflower. Iranian Journal of Biotechnology, 19 (1): e2579.
88. Tharanathan, R.N and F.S. Kittur. 2003. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. Crit Rev Food Sci Nutr, 43(1): 61-87.
89. Tremblay, A., P. Hosseini, N.W. Alkharouf, S. Li and B.F. Matthews. (2011). Gene expression in leaves of susceptible Glycine max during infection with Phakopsora pachyrhizi using next generation sequencing. Sequencing, 2011, Article ID 827250, https://doi.org/10.1155/2011/827250.
90. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3(7): 1-12.
91. Velculescu, V.E., L. Zhang, B. Vogelstein and K.W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. Science, 270(5235): 484-487.
92. Wan, M and J. Wang. (2014). RNA sequencing and its applications in cancer diagnosis and targeted therapy. North American Journal of Medicine and Science, *7*(4): 156-162.
93. Wang, X., W. Liu, X. Chen, C. Tang, Y. Dong, J. Ma and Z. Kang. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. BMC Plant Biology, 10(1): 1-15.
94. Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10(1): 57-63.
95. Watson, J.D., T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine and R. Losick. 2014. Expression of the genome. Genetic. Molecular., 5: 343-74.
96. Watson, M.A and T.P. Fleming. 1994. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. Cancer Research, 54(17): 4598-4602.
97. Westermann, A.J., S.A. Gorski and J. Vogel. 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. Nature Reviews Microbiology, 10(9): 618-630.
98. Xue, T., X. Li, W. Zhu, C. Wu, G. Yang and C. Zheng. 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. Journal of Experimental Botany, 60(1): 339-349.
99. Ying, S.Y. 2004. Complementary DNA libraries. Molecular Biotechnology, 27(3): 245-252.
100. Zhang, J., H. Yuan, Y. Yang, T. Fish, S.M. Lyi, T.W. Thannhauser and L. Li. 2016. Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 67(9): 2731-2744.
101. Zubo, Y.O., V.V. Kusnetsov, T. Börner and K. Liere. 2011. Reverse protection assay: a tool to analyze transcriptional rates from individual promoters. Plant Methods, *7*(1): 1-13.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]

Molecular Techniques for Plants Gene Expression Analysis at the Transcriptomics Level

Mona Bordbar[1], Reza Darvishzadeh[2] and Maghsoud Pazhouhandeh[3]

1- PhD Student in Genetics and Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, (Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
3- Associate professor, Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Iran
Received: 17April, 2022 Accepted: 2 August, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Environmental stresses such as drought, salinity, cold and heat stress as one of the consequences of climate change are the main factors of reduction in agricultural products. Study of gene expression (transcriptomic studies) plays an essential role in understanding the mechanism of plants in dealing with environmental stresses. Gene expression is the process by which information encoded in a gene is produced in the form of a transcript, which often the transcript itself or its protein product involves in various molecular processes and mechanisms in the cell and ultimately in the life of the organism. Assessing gene expression levels is an important step in elucidating gene functions temporally and spatially.

Material and Methods: This review article is a content analysis study that has been performed by searching Transcriptome analysis, RNA sequencing, suppression subtractive hybridization, microarray, polymerase chain reaction keywords in related articles on google scholar, science direct, PubMed and scopus websites.

Results: Decades ago, typical studies were focusing on a few genes individually via techniques such as northern blot, or RNA blot, western blot, microarray hybridization, subtractive hybridization (SH), suppression subtractive hybridization (SSH), real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), whereas now researchers are able to examine whole genomes at once thanks to sequencing based approaches such as RNA sequencing (RNA-seq). The upgrade of throughput levels aided the introduction of systems biology approaches whereby cell functional networks can be scrutinized in their entireties to unravel potential functional interacting components. The birth of systems biology goes hand-in-hand with huge technological advancements and enables a fairly rapid detection of all transcripts in the studied biological samples. Even so, earlier technologies that were restricted to probing single genes or a subset of genes still have their place in the research laboratories.

Conclusion: The objective of this study was to describe the types of methods used in the gene expression analysis in plant responses to environmental stresses, or, more generally, any other conditions of interest. The choice of technique or strategy used is determined by the available technology and equipments along with the costs and limitations of the analysis. In selection of techniques for a particular study, these limitations should be minimized methodologically or statistically so that the results are reliable and representative of the situation under study.

Keywords: Microarray, Polymerase chain reaction, RNA sequencing, Suppression subtractive hybridization, Transcriptome analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.15.45.83]