دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای مطالعه تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن‌ها و تعیین عملکرد آنها

راحله خادمیان[۱]، نادعلی بابائیان جلودار[۲]، سید محتبی خیام نکوئی[۳]، محسن مردی[۳] و بابک ناخدا[۴]

۱- استادیار، دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین، (نویسنده مسوول: r_khademian2005@yahoo.com)
۲- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳ و ۴- دانشیار و استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۱

چکیده

اطلاعات زیادی در مورد توالی بسیاری از ژن‌ها بدون آنکه عملکرد این توالی‌ها شناخته شده باشد، وجود دارد. از این رو تحقیقات فراوانی از طریق روش‌های ژنتیکی معکوس برای پر کردن شکاف بین ساختار و عملکرد این توالی‌ها انجام گرفته است. بدین منظور آزمایشی با هدف چگونگی طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن، که بتوانند تنوع تک نوکلئوتیدی و تاثیر آن بر عملکرد ژن را تعیین نمایند، در مرکز بین المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ICARDA) انجام گرفته است. ژن‌های مورد بررسی در این آزمایش دو ژن متحمل به تنش شوری در جو، CBL4 و HvHKT1، بوده است و هشت جفت پرایمر برای این دو ژن طراحی گردید. کارآیی پرایمرها برای تکثیر منطقه مورد نظر و نشان دادن تنوع تک نوکلئوتیدی از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱] و توالی یابی قطعات تکثیری مورد ارزیابی قرار گرفت. همه پرایمرهای طراحی شده دارای قابلیت بالایی از نظر تکثیر قطعات ژنومی مربوط و تعیین تنوع تک نوکلئوتیدی بودند. این پرایمرها اختصاصی بوده و از مناطق کدکننده ژن طراحی شدند. لذا به کمک آنها می‌توان نقش تنوع نوکلئوتیدی موجود بین ژنوتیپ‌های مختلف در تغییر عملکرد ژن را مورد مطالعه قرار داد. همچنین انتخاب به کمک این مارکرهای اختصاصی دارای کارآیی بیشتری نسبت به انتخاب بر اساس مارکرهای پیوسته با ژن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پرایمر اختصاصی ژن، تنوع تک نوکلئوتیدی، جو، CBL4، HvHKT1

مقدمه

مطالعات ژنومی نشان داد که وجود تنوع ژنتیکی در خارج از مناطق کدکننده ژن (اینترون) و حتی خارج از مناطق ژنی در بروز صفات کمّی و کیفی اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۲،۵). مطالعات بعدی مناطق اینترونی و مناطق بین ژنی مشخص نمود که این مناطق حامل تقریباً ۹۰٪ از کل SNPهای ژنوم می‌باشند که در گذشته نادیده گرفته می‌شدند (۱۱). توالی یابی استاندارد DNA در جمعیت‌های بزرگ، با هدف تعیین موتاسیون‌های نادر، وقت‌گیر و پر هزینه است به همین دلیل شناخت آلل های نادر در جمعیت‌های بزرگ بسیار مشکل است. تشخیص موتاسیون‌های هتروزیگوس بستگی به کیفیت توالی‌یابی دارد و در زمینه پر تراکم صفحه کروماتوگرام تشخیص آنها بسیار دشوار می‌باشد. (۱۷،۸). به‌علاوه بسیاری از تکنولوژی‌های رایج پیش غربالگری مانند آنالیز ترکیبی پلی مورفیسم تک رشته‌ای یا الکتروفورز ژل گرادیانت صرفاً بخش‌های کوچکی از DNA را مورد مطالعه قرار می‌دهند (مانند dHPLC) و یا قادر به آنالیز با راندمان بالا نمی‌باشند بنابراین تکنیک‌هایی مطلوب هستند که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده و تشخیص آنها از حساسیت و راندمان بالایی برخوردار باشند (۱۷،۷).

یکی از مستقیم‌ترین روش‌های تعیین عملکرد یک ژن، یافتن موتاسیون در ژن مورد نظر و مرتبط نمودن این موتاسیون به تغییر فنوتیپی در موجود موتانت است. این تکنیک بر مبنای شناخت تغییر ساختار یا تغییر عملکرد ژن و سپس آنالیز تأثیر این تغییرات در فنوتیپ گیاه می‌باشد. در این تکنیک، دانستن توالی کامل ژنوم گیاه مورد مطالعه ضروری نیست بلکه می‌توان از اطلاعات ژنومی سایر گیاهان که در پایگاه‌های اطلاعات ژنومی موجود است، استفاده نمود. برای مثال در گیاهی مانند جو که ژنوم آن به طور کامل توالی‌یابی نشده است، می‌توان از داده‌های مربوط به برنج و یا آرابیدوپسیس برای آنالیز ژن استفاده نمود. توالی ژن مورد نظر در بسیاری از گونه‌های گیاهی را می‌توان از پایگاه‌های اطلاعاتی مانند GenBank

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) استخراج نمود و سپس همولوگ نزدیک به آن ژن را تعیین کرد. در مورد جو، همولوگ‌های کلون شده آنالیز عملکرد را امکان‌پذیر می‌سازند. برای تکثیر منطقه کدکننده ژن، توالی‌های mRNA یا آمینو اسید به عنوان توالی مورد نظر از پایگاه داده‌های EST استفاده می‌گردند. معروف‌ترین پایگاه داده‌های EST، پایگاه جمع‌آوری نسخه‌های گیاهی TIGR (http://plantta.jcvi.org/) با ۴۵۶۴۱۰ رکورد از EST جو (آخرین گزارش ماه جولای سال ۲۰۰۷ میلادی) و پایگاه آزمایشگاه بیولوژی محاسبه‌ای و ژنومیکس عملکردی (http://compbio.dfci.harvard.edu) با ۵۰۲۶۰۶ رکورد از EST جو می‌باشد (آخرین گزارش، ماه مارس سال ۲۰۱۱ میلادی). این ESTها از طریق بلاست با همولوگ‌های برنج و آرابیدوپسیس مطابقت داده شده و آنهایی که دارای بیشترین شباهت هستند به عنوان الگویی برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند. توالی قطعات تکثیر شده توسط این پرایمرها، که همه آنها متعلق به یک توالی کامل کدکننده جو هستند، با استفاده از نرم افزار دیگری مانند CodonCode Aligner (http://www.codoncode.com/aligner) با یکدیگر ترکیب می‌شوند. این نرم‌افزار قادر است توالی‌ها را با هم مقایسه نموده و سپس آنها را به صورت یک توالی نهایی مرتب نماید. پس از آن که توالی کامل کدکننده جو به دست آمد، با توالی‌های ژنومی برنج مطابقت داده می‌شود تا مناطق مرزی بین اگزون و اینترون مشخص گردد. این کار می‌تواند با استفاده از الگوریتم BLASTN یا نرم‌افزاری مانند Splign (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi) انجام گیرد. نرم‌افزار اخیر می‌تواند مدل گرافیکی ژن را نیزارائه نماید (۱۰). برای به دست آوردن مدل ژنی در جو، توالی‌های کد کننده و ژنومی با استفاده از BLASTN یا نرم‌افزار Splign تطبیق داده می‌شوند. توالی آمینو اسیدی بر اساس توالی کد کننده و از طریق ترجمه آزمایشگاهی تعیین می‌شود. مرحله نهایی تایید ویژگی ارتولوگی همولوگ کلون شده است که با استفاده از GreenPhyl (http://greenphyl.cirad. fr/) صورت می‌گیرد. GreenPhyl شامل توالی‌های ژنی ۱۲ ژنوم کامل است که طبقه‌بندی گیاهی را به طور خودکار انجام می‌دهد (۱۳).

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ICARDA) انجام گرفته است.

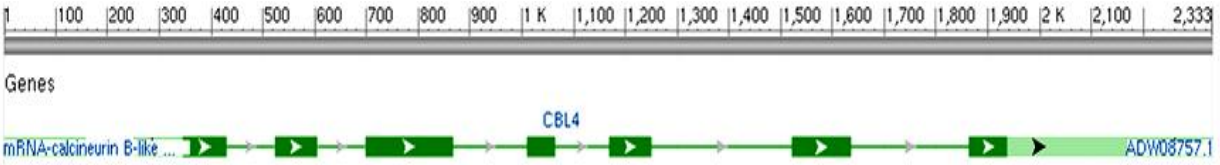
مواد گیاهی

در این تحقیق از ۲۰ ژنوتیپ جو که منشأ جغرافیایی آنها مناطق مختلف شور در دنیا می‌باشد، به عنوان مواد گیاهی استفاده گردید. هدف از انتخاب این مواد بررسی کارآیی پرایمرهای طراحی شده در نشان دادن حداکثر تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های متعلق به این مناطق بوده است. زیرا طبق مطالعات قبلی، ژنوتیپ‌هایی که در مناطق شور رشد و نمو می‌یابند دارای تنوع بیشتری از نظر دارا بودن ژن‌های متحمل به شوری می‌باشند.

طراحی پرایمر

طراحی پرایمرها با استفاده از داده‌های ژنومی جو موجود در پایگاه اطلاعاتی GeneBank انجام گرفت. با توجه به اینکه این پرایمرها اختصاصی بوده و برای مطالعه عملکرد ژن طراحی شدند، از مناطق کدکننده به‌عنوان توالی‌های اولیه برای طراحی پرایمر استفاده گردید. ژن‌های مورد مطالعه شامل CBL4 وHvHKT1 بوده است. برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار آنلاین Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) استفاده شد. در شکل ۱ مدل ژنی ژن CBL4 نشان داده شده است. همچنین توالی کامل مناطق کدکننده و غیرکدکننده این ژن در شکل ۲ نشان داده شده است. مناطق کدکننده به صورت رنگی نمایش داده شده اند. چهار پرایمر برای این ژن طراحی گردید که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است.

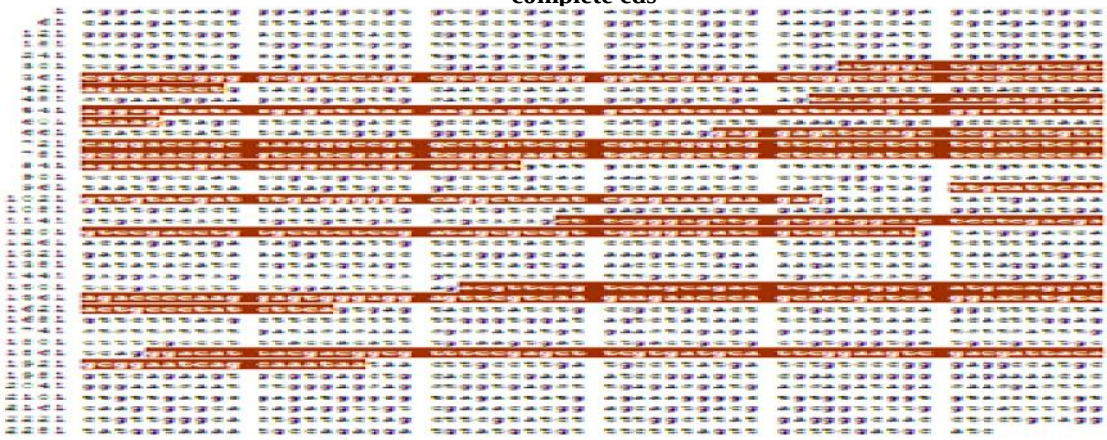
توالی مناطق کدکننده و غیرکدکننده ژن HvHKT1 در شکل ۳ آمده است. چهار پرایمر برای این ژن طراحی شد که توالی آنها در جدول ۱ آمده است. مدل ژنی ژن HvHKT1 در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱- منطقه کد کننده پروتئین ژن calcineurin B-like protein 4 (CBL4) در رقم Clipper جو

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

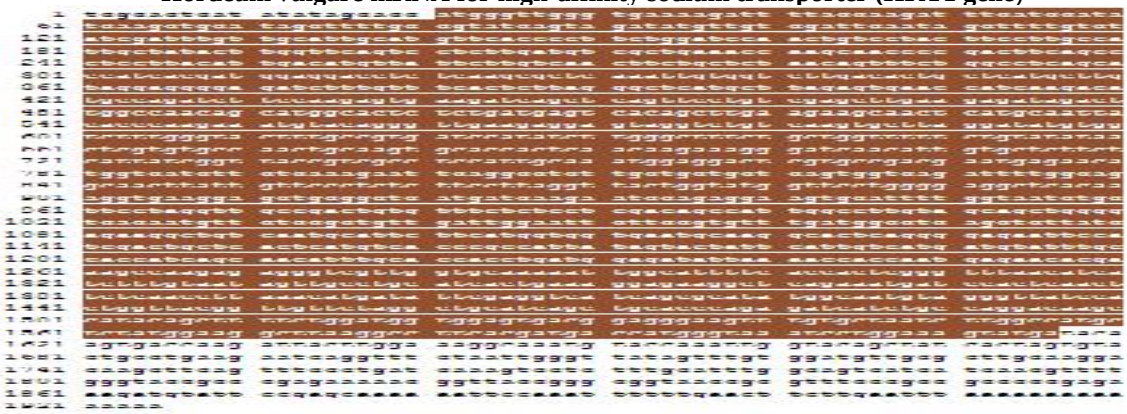
Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Clipper calcineurin B-like protein 4 (CBL4) gene, complete cds

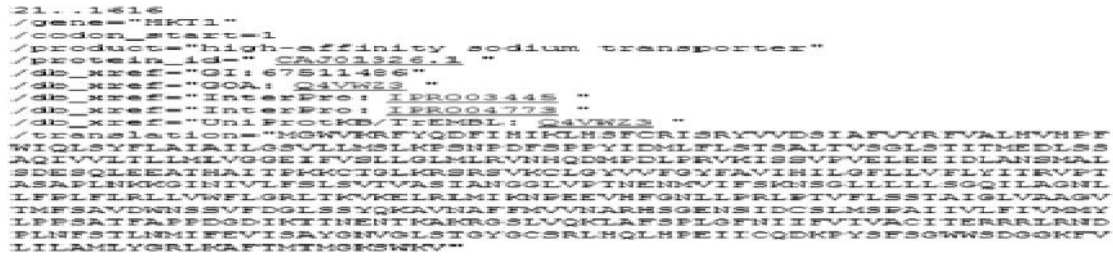


```
join(345..429,523..605,698..866,1011..1063,1169..1249,
1523..1635,1865..1937)
/gene="CBL4"
/codon_start=1
/product="calcineurin B-like protein 4"
/protein_id="ADW08757.1"
/db_xref="GI:320090215"
/translation="MGCVSSSPGRSRRAPGYEDPAVLASQTSFTVNEVEALYELYKKL
SYSIFKDGLIHKEEFQLALFRTSKGPSLFADRVFDLFDLKRNGVIEFGEFVRSLSIFH
PKAPESDKAAFAFKLYDLRGTGYIEKEELRELVVALLDESDLCLSDSAVEEIVDNTFS
QADSNGDDRIDPKEWEEFVKKNPASLRNMSLPYLQDITTAFPSFVMHSEVDDYSGISK
```

شکل ۲- توالی کامل ژن CBL4 و مشخصات منطقه کدکننده و توالی آمینو اسیدی در این ژن

Hordeum vulgare mRNA for high-affinity sodium transporter (HKT1 gene)





شکل ۳- توالی کامل ژن HvHKT1 و منطقه کدکننده و توالی آمینو اسیدی در این ژن

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

شکل ۴- مدل ژنی ژن HvHKT1

جدول ۱- نام و توالی پرایمرهای طراحی شده

شماره	نام	توالی (5´ _ 3´)
۱	CBL4-1	F: ATGGGTGGTTGTGTTTCTGTTAG R: AGAGGTCGAACACCCTGTCG
۲	CBL4-2	F: CCTCAACTCATCTCATCTCATCTG R: GATCTCCTCAACGGCGCTAT
۳	CBL4-3	F: GAACTTCGGTTAACTGATTGCAT R: CGGCAGATAAGTACTCACTGAAGA
۴	CBL4-4	F: GAATGGCGATGACAGGATAGAC R: GAGCTCCGGATTTTCGAGGT
۵	HKT1-1	F: ACTCATATATAGCACCATGGGTTG R: CCCTGTACATTTCTTGGGTGTAAT
۶	HKT1-2	F: AAGAGTGAAGATCAGCTCAGTTCC R: CCTAGGAAGCAGATTACCAAAATG
۷	HKT1-3	F: ATTGTTCCCTCTCTTCCTTAGGTT R: AGGTTGAGAAGTTGAGTGGATCAT
۸	HKT1-4	F: AAGCCAAGAGAGGGTCGTTG R: AGCGCAACATCCACAAACTATAAC

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ابتدا DNAی ژنومی از هر ژنوتیپ طبق روش ساگای- مروف و همکاران (۱۶) با اندکی تغییرات استخراج گردید و سپس مناطق محدود به توالی فوروارد و ریورس هر جفت پرایمر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شده و محصولات PCR روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تکثیر قطعات ژنومی مورد نظر ابتدا یک چرخه دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۱۰ چرخه دمایی شامل، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه اعمال گردید که در هر چرخه یک درجه دمای انلینگ (۶۸ درجه) کاهش یافته و پس از چرخه دهم این دما به ۵۸ درجه سانتی‌گراد تقلیل یافت. سپس ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه اعمال گردید. در انتها ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا تکثیر قطعات تکمیل گردد.

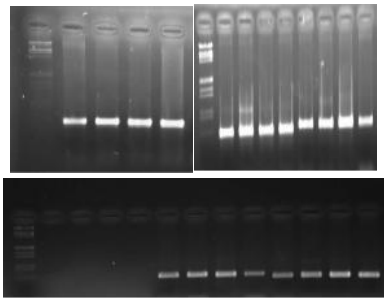
آزمون کارآیی پرایمرهای طراحی شده برای نشان دادن تنوع تک نوکلئوتیدی

برای آزمون قابلیت پرایمرهای طراحی شده، برای نشان دادن پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن‌های کنترل‌کننده شوری، ژنوتیپ‌های جو از مناطق مختلف جغرافیایی در سطح جهان که با مشکل شوری مواجه می‌باشند جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفتند. زیرا این ژنوتیپ‌ها دارای تنوع بالقوه بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌هایی هستند که دارای منشأ جغرافیایی یکسانی می‌باشند. ابتدا قطعات ژنی مورد نظر در این ژنوتیپ‌ها با استفاده از پرایمرهای طراحی شده تکثیر گردیده و سپس وجود تنوع تک نوکلئوتیدی در این قطعات از طریق توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان کامل از نتایج توالی‌یابی، هر دو پرایمر فوروارد و ریورس در واکنش‌های جداگانه برای تکثیر یک قطعه مورد نظر و سپس توالی یابی آن قطعه استفاده شدند. در نهایت، نتایج این توالی‌ها با توالی اصلی ژن که در GeneBank گزارش شده (توالی‌هایی که پرایمرها از روی آنها طراحی شدند)، مقایسه گردیدند. توالی یابی به کمک دستگاه ABI 3100 انجام گرفته است. قطعات ژنی تکثیر شده توسط پرایمرها، روی ژل آگارز ۱/۲ درصد تست گردید.

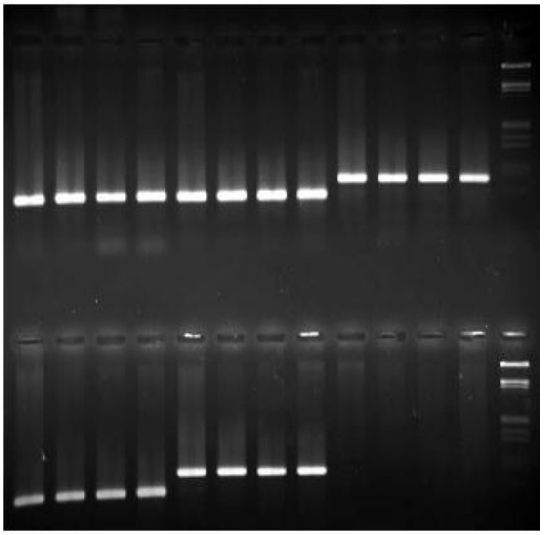
نتایج و بحث

شکل ۵ قطعات تکثیری ۲۰ ژنوتیپ که توسط یک پرایمر تکثیر شدند را نشان می‌دهد و در شکل ۶، پنج پرایمر که هر یک در چهار ژنوتیپ مورد مطالعه قرار گرفتند، نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ملاحظه می‌گردد در هر چهار ژنوتیپ پرایمرها قادر به تکثیر منطقه مورد نظر ژن بودند. ضمناً با مشاهده تک باند قوی برای هر پرایمر می‌توان استنباط نمود که شرایط بهینه برای واکنش PCR وجود داشته و نکات اصلی در طراحی هر پرایمر شامل اندازه پرایمر، دمای Tm و میزان GC به درستی انتخاب شد که به این ترتیب از تکثیر قطعات غیر اختصاصی جلوگیری گردید.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021



شکل ۵- محصول PCR یک پرایمر در ۲۰ ژنوتیپ



شکل ۶- محصول PCR ۵ پرایمر که هر یک در چهار ژنوتیپ تست شدند.

توالی‌یابی

مقایسه نتایج توالی‌یابی نشان داد که همه پرایمرهای طراحی شده قابلیت تعیین و تشخیص تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) را داشتند. برای مثال، شکل زیر بخشی از قطعه تکثیر شده توسط پرایمرهای ژن HKT1 در دو ژنوتیپ و مقایسه آنها با توالی اصلی ژن در GeneBank (سطر اول) را نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد در شکل الف برای قطعه تکثیرشده توسط پرایمر HKT1-1، در محل SNP در ژنوتیپ اول در هر دو رشته تکثیر شده فوروارد و ریورس، باز آدنین (رنگ قرمز) ، در ژنوتیپ دوم باز گوآنین (رنگ سبز) و در توالی اصلی ژن (در سطر اول) نیز باز گوانین (رنگ زرد) قرار گرفته است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ژنوتیپ اول حامل یک SNP می‌باشد. همچنین در شکل ب قطعات تکثیری حاصل از پرایمر HKT1-3 وجود یک SNP در ژنوتیپ اول را نشان می‌دهند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

الف)

```
<HKT1-1.TXT        #401     TGGATCCAGA AGGGGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
<HKT1-1F.AB1       #288     TGGATCCAGA AGGAGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
>HKT1-1R.AB1       #361     TGGATCCAGA AGGAGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
<HKT1-2F2.AB1       #385    TGGATCCAGA AGGGGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
>HKT1-2R2.AB1       #365    TGGATCCAGA AGGGGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
                            ...........................................
                   #401     TGGATCCAGA AGGGGTGAAC ATGCAATGCA ACAAATCGAT
                                                                    *
```

ب)

```
>HKT1-3.TXT        #561     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACCAC
>HKT1-3- 1F.ab1    #518     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACTAC
<HKT1-3-1R.AB1     #456     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACTAC
>HKT1-3- 2F.ab1    #524     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACCAC
<HKT1-3-2R.AB1     #362     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACCAC
                            ...........................................
                   #561     CAGCAACATT TGCACCACCT GATGGAGATA TTAAAACCAC
                                                                    *
```

شکل ۶- توالی نوکلئوتیدی بخشی از قطعات تکثیر شده توسط پرایمر الف) HKT1-1 و ب) HKT1-3 که حامل SNP می‌باشند. TXT توالی اصلی قطعه مورد نظر است که در GeneBank گزارش شده، 1F و 1R قطعات تکثیر شده توسط پرایمرهای فوروارد و ریورس در ژنوتیپ اول و 2F و 2R قطعات تکثیر شده توسط پرایمرهای مشابه در ژنوتیپ دوم می‌باشند.

به این ترتیب ۶ پرایمر دیگر نیز در ژنوتیپ‌های متفاوت مورد مطالعه قرار گرفته و کارآیی آنها برای نشان دادن تنوع نوکلئوتیدی از طریق توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی نشان داد که همه پرایمرهای طراحی شده قابلیت تعیین و تشخیص پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی را داشتند. مشخصات پلی مورفیسم‌های تعیین شده توسط هر پرایمر در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- انواع پلی مورفیسم‌های تعیین شده توسط پرایمرهای دو ژن CBL4 و HKT1

نام	پلی مورفیسم	طول قطعه تکثیری (bp)
CBL4-1	A/T, A/C, A/G	۵۶۰
CBL4-2	T/G, C/T	۶۳۰
CBL4-3	A/T, C/G, GG/TC	۵۶۰
CBL4-4	C/T, T/C, G/C,	۴۹۰
HKT1-1	G/A	۵۶۰
HKT1-2	A/G, T/C, AC/ TA	۵۶۰
HKT1-3	C/T	۵۶۰
HKT1-4	A/G, A/T	۴۹۰

از پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق می‌توان به عنوان مارکرهای SNP و برای تعیین عملکرد ژن استفاده نمود. این مارکرها در گروه مارکرهای عملکردی[1] قرار گرفته و می‌توانند در مواردی مانند ۱) تثبیت موثرتر آلل‌ها در جمعیت‌ها، ۲) انتخاب متعادل کنترل شده، ۳) غربالگری آلل‌ها درجمعیت‌های طبیعی مشابه جمعیت‌های اصلاحی و ۴) تعیین ساختار هاپلوتیپ‌های پیوسته با FM مورد استفاده قرار گیرند (۱). فراوان‌ترین مارکرهای مولکولی در ژنوم گیاهی و جانوری پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) هستند که شامل تنوع تک باز در توالی DNA می‌باشند. آنها مارکرهای انتخابی در اصلاح نباتات هستند زیرا به سهولت در برنامه‌های اتوماسیون و در مقیاس بزرگ قابل استفاده می‌باشند. در نتیجه منابع ژنومی مبتنی بر SNP به سرعت در حال توسعه بوده (۳) و از اهمیت زیادی برخوردار هستند. عملکرد آلل‌های ژنی از دو طریق مستقیم و غیرمستقیم ارزیابی و تأیید می‌گردد. در روش غیرمستقیم، از مارکرهای عملکردی برای تعیین توالی‌های آللی پلی‌مورف استفاده می‌شود (۱). پرایمرهای

1- Functional marker (FM)

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

طراحی شده در این تحقیق نمونه‌ای از این مارکرها هستند و می‌توانند برای بررسی و آنالیز غیرمستقیم عملکرد ژن‌های مورد مطالعه استفاده گردند. در این آزمایش از مقایسه نتایج توالی‌یابی قطعات تکثیری توسط این پرایمرها برای یافتن محل‌های پلی‌مورف نوکلئوتیدی استفاده شده است. انواع تغییرات تک باز نوکلئوتیدی در ژن‌های کدکننده پروتئین که در ژنومیکس عملکرد مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل تغییراتی است که منجر به ایجاد موتاسیون‌های بی‌معنی، نقص پروتئین تولید شده توسط ژن و برش و اتصال دو پروتئین متفاوت می‌شود (۶). در یک تحقیق، طیف و انواع موتاسیون‌های عملکردی حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی در ۱۳ ژن از خانواده ژنی Dhn در یک جمعیت موتانت از رقم LUx جو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که از مجموع ۱۸۰ موتاسیون نوکلئوتیدی یافت شده در این جمعیت، ۴۴/۴٪ از نوع موتاسیون دگرمعنی، ۳۶/۱٪ موتاسیون خاموش کننده فعالیت ژن، ۱/۷٪ موتاسیون بی‌معنی و مابقی مربوط به انواع جابجایی‌های نوکلئوتیدی بوده است (۱۴). در تحقیق حاضر، تنوع نوکلئوتیدی در بخشی از ژن که عملکرد آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد، مطالعه گردید. زیرا از پرایمرهای اختصاصی ژن برای این منظور استفاده شد. همچنین روشی مانند توالی‌یابی، که در این مطالعه بکار برده شد، برای آنالیز تنوع نوکلئوتیدی دارای دقت بالایی می‌باشد (۴). لذا، از نتایج توالی‌یابی برای بررسی کارآیی پرایمرهای طراحی شده از نظر قابلیت تعیین تنوع نوکلئوتیدی در تعداد اندکی ژنوتیپ استفاده شد تا در آینده بتوان از آنها در مطالعات ژنتیک معکوس در جمعیت‌های بزرگ استفاده نمود.

مارکرهای عملکردی مانند مارکرهای SNP برای اهداف گوناگون اصلاحی از جمله مقاومت به تنش های زنده و غیرزنده، پاتوژن‌ها و بیماری‌ها استفاده می‌گردند. در تحقیق کنونی، از این مارکرها برای مطالعه ژن‌های مقاوم به تنش شوری استفاده گردید. بیرجیت و همکاران (۲) از مارکرهای عملکردی SNP در ژن AOX برای ردیابی مسیرهایی که در تحمل به تنش‌های غیر زنده نقش دارند، استفاده کردند. آنها بیان نمودند که مارکرهای SNP باید رفتار رشدی در سلول‌ها و بافت‌هایی که به طور اختصاصی برای تثبیت عملکرد تحت شرایط تنش سازگار شده‌اند را نشان دهند (۲). لذا می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مارکرهای SNP یکی از بهترین مارکرها برای مطالعه مکانیسم تحمل به تنش‌ها در ژن‌های بیان شده می‌باشند. اینگواردسن و همکاران (۹) استفاده از مارکرهای عملکردی برای اصلاح مقاومت به پاتوژن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند. آنها گزارش دادند که این مارکرها از محل‌های پلی‌مورف در داخل ژن‌های ایجاد کننده تنوع فنوتیپی مشتق می‌گردند و مزیت اصلی آنها این است که مکمل عدم تعادل لینکاژی در ژن‌های مربوط هستند. با در اختیار داشتن مجموعه کامل SNPهای یک ژن می‌توان آنها را دسته‌بندی و سپس عملکرد هر دسته را مطالعه و بررسی نمود (۹). چنانکه، لِونستین وکلین (۱۵) از گروه‌بند SNPهای مهم بر اساس خواص تنظیمی مانند تغییرات اپی‌ژنتیک و محل‌های اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری، به‌علاوه گروه‌بندی‌های مبتنی بر ساختار ژن و محل‌های حفاظت شده اختصاصی هرگونه برای پیش‌بینی عملکرد این مارکرها استفاده کردند. آنها اظهار نمودند که می‌توان از این استراتژی برای تعیین ارتباط قوی بین مارکرهای SNP و یک صفت فنوتیپی مانند بیماری استفاده نمود در عین حال که این مارکرهای SNP با SNPهای دیگر دارای تعادل لینکاژی نبوده و یا از هر ژن مشخص دیگر فاصله زیادی داشته باشند. آنها گزارش نمودند که گروه‌بندی SNPها با این روش احتمالا در تشریح نتایج حاصل از توالی یابی کل ژنوم نیز مفید خواهد بود (۱۵). یوجینو ایهارا و همکاران (۱۸) برای تعیین مارکرهای SNP کارآ در *Cryptomeria japonica*، اطلاعات حاصل از پایگاه داده‌های EST و نتایج آنالیز دمای ذوب با وضوح بالا (HRM)[1] را با یکدیگر ترکیب نمودند (۱۸). نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب غربالگری SNPهای حاصل از داده‌های EST با آنالیز نتایج HRM روش کارآیی برای توسعه مارکرهای SNP در ژن‌های بیان شده است. این روش در هر دو مورد تهیه نقشه ژنتیکی و یافتن SNPها در موجودات غیرمدل نقش خواهد داشت (۱۸). برای این هدف می‌توان از روش‌های دیگر مانند توالی‌یابی مستقیم قطعات مورد نظر به عنوان جایگزین روش HRM همراه با مقایسه داده‌های EST استفاده نمود. زیرا امروزه با پیشرفت تکنولوژی در تکنیک توالی‌یابی و وجود نرم‌افزارهای مربوط برای آنالیز داده‌های توالی، این روش با صرف هزینه و زمان کمتر نسبت به سایر روش‌ها امکانپذیر می‌باشد. به طوری که، یکی از جدیدترین روش‌های غربالگری SNPها در جمعیت‌های بزرگ طبیعی و اصلاحی استفاده از روش توالی‌یابی است. به این دلیل، در مطالعه حاضر از این تکنیک برای جستجو و مطالعه SNPها استفاده گردید.

در هر مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی، استفاده از پرایمرهای مناسب دارای اهمیت بسیار زیادی است. به گونه‌ای که نتیجه چنین مطالعه‌ای مستقیماً وابسته به کارآیی پرایمرهای طراحی شده می‌باشد.

1- High resoulation melting

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

همچنین استفاده از پرایمرهای اختصاصی متناسب با هر تکنیک مستلزم برخورداری از اطلاعات و آگاهی لازم در زمینه مورد نظر و مهارت استفاده از نرم افزارها و امکانات موجود برای طراحی پرایمرها می‌باشد. امروزه ژنتیک عملکردی[1] که از تکنیک‌های ژنتیک معکوس بهره می‌گیرد یکی از جدیدترین روش‌های آنالیز ژن است که به مطالعه عملکرد ژن می‌پردازد. پرایمرهای مورد استفاده در این‌گونه آنالیزها پرایمرهای اختصاصی ژن می‌باشند که نمونه‌ای از آنها در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از آنها حتی می‌توان نقش عملکردی بخش‌های اینترونی که قبلاً چندان مورد توجه نبودند را مطالعه و بررسی نمود. همچنین می‌توان از این پرایمرها برای توالی‌یابی، طبقه‌بندی هاپلوتیپ‌ها، نقشه‌یابی، آنالیز ترکیبی، تعیین میزان تنوع ژنتیکی در یک گونه و تعیین تنوع زیستی استفاده نمود.

منابع

1. Andersen, J.R. and T. Lu.¨ Bberstedt. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science, 8: 554-560.
2. Birgit, A.S., J.H. Costa and D.F. de Melo. 2006. AOX–a functional marker for efficient cell reprogramming under stress. Trends in Plant Science, 11: 281-287.
3. Close, T.J., R.B. Prasanna, L.S. Lonardi, Y. Wu, N. Rostoks, L. Ramsay, A. Druka, N. Stein, J.T. Svensson, S. Wanamaker, S. Bozdag, M.L. Roose, M.J. Moscou, S. Chao, R.K. Varshney, P. Szűcs, K. Sato, P.M. Hayes, D.E. Matthews, A. Kleinhofs, G.J. Muehlbauer, J. DeYoung, D.F. Marshall, K. Madishetty, R.D. Fenton, P. Condamine, A. Graner and R. Waugh. 2009: Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. BMC Genomics, 10: 582-594.
4. Cseri, A., M. Cserha´ti, M.V. Korff, B. Nagy, G.V. Horva´th, A. Pala´gyi, J. Pauk, D. Dudits and O. To¨rje´k. 2011. Allele mining and haplotype discovery in barley candidate genes for drought tolerance. Euphytica. DOI 10.1007/s10681-011-0445-7.
5. Heid, IM., E. Boes, A.M. Müller, B. Kollerits, C. Lamina,S. Coassin, C. Gieger, A. Döring, N. Klopp and R. Frikke-Schmidt. 2008. Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA Study sheds new light on intergenic regions. Circ Cardiovasc Genetics, 1: 10-20.
6. Henikoff, S. and L. Comai. 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. Annual Review Plant Biology, 54: 375-401.
7. Hestekin, C.N. and A.E. Barron. 2006. The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection. Electrophoresis, 27: 3805-3815.
8. Holmila, R. and K. Husgafvel-Pursiainen. 2006. Analysis of TP53 gene mutations in human lung cancer: comparison of capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism assay with denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. Cancer Detection Prevention, 30: 1-6.
9. 9. Ingvardsen, C.R., B. Schejbel and T. Lübberstedt. 2008. Functional markers in resistance breeding. Progress in botany, 69: 61-78.
10. Kapustin, Y., A. Souvorov, T. Tatusova and D. Lipman. 2008. Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. Biology Direct Journal, 3: 20-33.
11. Ke, X., M.S. Taylor and L.R. Cardon. 2008. Singleton SNPs in the human genome and implications for genome-wide association studies. European Journal of Human Genetics, 16: 506-15.
12. Kronenberg, Florian. 2008. Genome-wide association studies in agingrelated processes such as diabetes mellitus, atherosclerosis and cancer. Experimental Gerontology, 43: 39-43.
13. Kurowska, M.A. Daszkowska-Golec, D. Gruszka, M. Marzec, M. Szurman, I. Szarejko and M. Maluszynski. 2011. TILLING-a shortcut in functional genomics. Journal of Applied Genetics, 52: 371-390.
14. Lababidi, S., N. Mejlhede, S.K. Rasmussen, G. Backes, W. Al-Said, M. Baum and A. Jahoor. 2009. Identification of barley mutants in the cultivar _Lux_ at the Dhn loci through TILLING. Plant Breeding, 128: 332-336.
15. Levenstien, M.A. and R.J. Klein. 2011. Predicting functionally important SNP classes based on negative selection. http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/26.
16. Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendalian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 81: 8014-18.
17. Till, B.J., T. Zerr, E. Bowers, E.A. Greene, L. Comai and S. Henikoff . 2006. Highthroughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. Nucleic Acids Res. 34:e99. Erratum in: Nucleic Acids Research, 34: 5352-5363.
18. 18. Ujino-Ihara, T., Y. Taguchi, Y. Moriguchi and Y. Tsumur. 2010. An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis. http://www.biomedcentral.com/1756-0500/3/51.

1- Functional genomics

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 3:32 +0430 on Sunday June 20th 2021

Designing Specific Primers to Study Single Nucleotide Diversity (SNP) of Genes and to Determine their Performance

Raheleh Khademian[1], Nad Ali Babaeian Jelodar[2], Seyed Mojtaba Khayam Nekouie[3], Mohsen Mardi[3] and Babak Nakhoda[4]

1- Assistant Professor, Imam Khomeini International University, Qazvin
(Corresponding author: r_khademian2005@yahoo.com)
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3 and 4- Associate Professor and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Karaj
Received: February 29, 2012 Accepted: April 30, 2012

Abstract

There is a lot of information about genes sequence but their functions are still unknown. So, to fill the gap between structure and function of these sequences many reverse genetic researches have been done. Current experiment studying, how to design gene-specific primers, that can determine single nucleotide diversity and its impact on gene function.This research was condacted at International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Genes studied in present experiment include two genes responsible for salinity tolerance in barley, CBL4 and HvHKT1, in which eight primer pairs were designed. Primers efficiency for amplification of desired regions and demonstration of the single nucleotide variation was assessed through polymerase chain reaction and sequencing the fragments. All primers were designed with high function for_amplification of genomic fragments and the associated single nucleotide diversity. These specific primers were designed from gene coding regions. They can therefore help to study nucleotide diversity between different genotypes and their roles in changes in gene function. Also, selection based on gene-specific markers would be more efficient than linked markers.

Keywords: Gene Specific Primer, Single nucleotide variation, Barley, CBL4 and HvHKT1