ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۴۷۳ - ۴۶۹

انتخاب ژن‌های مرجع مناسب جهت real-time PCR در برگ پرچم گندم تحت تنش خشکی

Selection of suitable reference genes for real-time PCR in wheat flag leaves under drought stress

فاطمه ملکی[۱]، خدیجه زارعی[۱]، رضا فتوت*[۱]، زهرا سادات شبر[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، استادیار، دانشگاه زنجان، ایران
۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، کرج، ایران

Maleki F[1], Zarei KH[1], Fotovat R[*1], Shobbar ZS[2]

1- Former MSc Students, Assistant Professor, University of Zanjan, Iran
2- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r_fotovat@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

بسیاری از مطالعات در زمینه‌ی مکانیزم‌های دفاعی و تنش در گیاهان به بیان ژن متکی است. پایداری بیان ژن‌های مرجع مورد استفاده در real-time PCR مرحله‌ای اصلی در نرمال‌سازی داده‌ها می‌باشد. به‌منظور اعتبارسنجی ژن‌های مرجع به‌عنوان کنترل داخلی در برگ پرچم گندم تحت تنش خشکی، پایداری بیان هشت ژن کاندید شامل ribosomal RNA (*18S rRNA*) subunit، ubiquitin (*WUB* و *UBQ*)، actin (*ACT*) ، glyseraldehyd-3-(*GAPDH*) phosphate dehydrogenase، RNase L inhibitor-like protein (*RLI*)، beta-(*b-TUB*) tubulin 4 26sproteasomeregulatory subunit ATP-dependent (*Ta.22845*) با استفاده از نرم‌افزارهای NormFinder و BestKeeper مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده *RLI* و *UBQ* پایدارترین ژن‌های مرجع بوده درحالی‌که ژن *18S rRNA* بیان ناپایداری داشت. بنابراین این دو ژن می‌توانند جهت نرمال‌سازی بیان ژن‌ها در برگ پرچم گندم در مطالعات مربوط به تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرند.

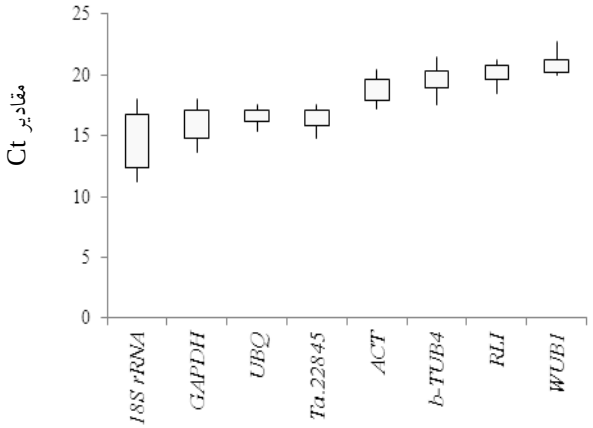
واژه‌های کلیدی
خشکی
ژن خانه‌دار
نرمال سازی
BestKeeper
NormFinder
real-time PCR

امروزه روش‌های متنوعی مانند تکنولوژی ریزآرایه[1] و تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS) با کارایی بالا با قابلیت ارزیابی هزاران ژن به‌طور همزمان در مطالعات بررسی بیان ژن‌های دخیل در ایجاد تحمل به تنش در گیاهان به‌کار می‌روند. با این‌حال روش real-time PCR با وجود محدودیت در تعداد ژن مورد بررسی، به‌علت تکرارپذیری، حساسیت و اختصاصی بودن، کاربرد زیادی در بررسی بیان ژن‌ها و هم‌چنین اعتبارسنجی سایر روش‌ها از جمله روش‌های با کارایی بالا مثل ریزآرایه دارد (Coito et al. 2012). در روش کمیت سنجی نسبی، ژن‌های خانه‌دار یا مرجع به شکل گسترده‌ای برای نرمال‌سازی نتایج بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ژن‌ها بایستی در بافت‌های مختلف و تحت شرایط متفاوت آزمایشگاهی دارای بیان پایدار باشند (Kozera and Rapacz, 2013). با بررسی مقالات منتشر شده با روش real-time PCR ملاحظه می‌شود که ژن‌های خانه‌دار دخیل در فرآیندهای اساسی سلول همچون *18s rRNA*، *UBQ*، *ACT*، *TUB* و *GAPDH* با فرض این‌که بیان یکنواختی دارند به صورت گسترده‌ای به‌عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gachon et al. 2004). با این حال بررسی‌ها نشان داده است که سطوح رونوشت این ژن‌ها نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت برخی شرایط مختلف آزمایشی تغییر می‌کند و برخی از شرایط مانند تنش‌های غیرزیستی باعث تغییر در بیان ژن‌های خانه‌دار می‌شود (Nicot et al. 2005). این نوسان در بیان ژن‌های مرجع تفاوت‌های حقیقی در بیان ژن هدف را نادرست جلوه می‌دهد (Guénin et al. 2009).

در آزمایش حاضر، پایداری بیان هشت ژن‌خانه‌دار به‌منظور معرفی مناسب‌ترین ژن مرجع جهت نرمال‌سازی داده‌های real-time PCR حاصل از نمونه‌های بافت برگ پرچم در گندم تحت تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان انجام شد. سطح آبیاری در مرحله زایشی گندم (نرمال و توقف آبیاری) به‌عنوان فاکتور اصلی و ارقام گندم داراب۲ (مقاوم به خشکی) و شیراز (حساس به خشکی) به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. بذور گندم پس از ضدعفونی در گلدان‌هایی حاوی بافت خاک شامل نسبت ۶:۳:۱ از کود دامی پوسیده، ماسه و خاک در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان کشت شدند. آبیاری با توجه به ظرفیت زراعی خاک تا رسیدن به مرحله زایشی انجام شد. آبیاری گلدان‌های تحت تیمار تنش، با ظهور برگ پرچم قطع شد. پنج روز بعد از اعمال تنش خشکی، نمونه برداری از برگ پرچم انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل شده و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور استخراج RNA کل از بافت برگ پرچم از ترایزول (Invitrogen, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. بعد از سنجش کمیت RNA، توسط NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Walthman, MA, USA) کیفیت آن نیز از طریق رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور ساخت cDNA طی واکنش رونویسی معکوس از RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Canada) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. بر اساس بررسی منابع، ژن‌های خانه‌داری که از معمول‌ترین و مطرح‌شده‌ترین ژن‌های مرجع مورد استفاده می‌باشند انتخاب شدند (جدول۱).



شکل۱- سطوح بیان ژن‌های مرجع کاندید در نمونه‌های برگ پرچم گندم تحت تنش خشکی (جعبه‌ها نشان‌دهنده انحراف استاندارد و خطوط عمودی نشان‌دهنده طیف بیان هر ژن در تمامی نمونه‌ها است).

[1] Microarray

جدول ۱- شرح ژن‌های مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real-time PCR

Unigene	Gene symbol	Accession GenBank	Primer sequences		Tm (°C)
Ta.1868	*ACT*	AB181991.1	Fw	5'-GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG-3'	60.3
			Rev	5'-GTACCACACAATGTCGCTTAGG-3'	60.3
Ta.54533	*GAPDH*	HG670306.1	Fw	5'-CTAACTGCCTTGCTCCTCTTG-3'	59.8
			Rev	5'-CTTGGAATGATGTTGAAGCTGG-3'	58.4
Ta.44405	*b-TUB4*	U76895.1	Fw	5'-CGAGGAGGAGGAGGAGAAC-3'	61.4
			Rev	5'-GCCACAGGAGGAAACCACAC-3'	61.4
Ta.90786	*WUB1*	HP632215	Fw	5'-AACATCCAGAAGGAGTCCACC-3'	59.8
			Rev	5'-GACAGACACAGGCACCATTCG-3'	61.8
Ta.18S rRNA	*18S rRNA*	AY049040	Fw	5'-TCATCGTGATGGGGATAGATC-3'	57.9
			Rev	5'-GGACCATTCAATCGGTAGGAG-3'	59.8
Ta.22845	-	HG670306.1	Fw	5'-GCTGGCTCGTTCAACTGATG-3'	59.4
			Rev	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC-3'	60.3
Ta.2776	*RLI*	AY059462.1	Fw	5'-GATGAGCCAAGTGCATATCTCG-3'	60.3
			Rev	5'-CTTGTCCGCTAAGTAGGTTGC-3'	59.8
Ta.50503	*UBQ*	DQ086482.1	Fw	5'-GCACCTTGGCGGACTACAAC-3'	61.4
			Rev	5'-GACACCGAAGACGAGACTTG-3'	59.4

واکنش‌های qPCR با دستگاه Rotor-Gene 3000 (Corbett, Australia) با استفاده از *AccuPower*® 2X *GreenStar*TM qPCR Master Mix (Bioneer, Korea) حاوی رنگ آشکارساز سایبرگرین در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام شد. از نرم‌افزارهای NormFinder (Andersen et al. 2004) و BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) به‌منظور رتبه‌بندی پایداری بیان ژن‌های مرجع در تمامی نمونه‌ها استفاده شد. برای نرم‌افزار NormFinder از مقادیر نسبی بیان استفاده شد. بدین ترتیب که ارزش‌های Ct با استفاده از رابطه‌ی ΔCt و فرمول $2^{-\Delta Ct}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل شدند (Vandesompele et al. 2002). در حالی‌که نرم‌افزار BestKeeper از مقادیر Ct تبدیل نشده استفاده می‌کند. سطوح بیان ژن‌های مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی متفاوت بود (شکل ۱). ژن *18S rRNA* کم‌ترین Ct را داشت (میانگین Ct برابر با ۱٤/۵۸) که نشان‌دهنده بالاترین سطح بیان ژن است. در حالی‌که *WUB1* (با میانگین Ct برابر با ۲۰/۷۱) دارای پایین‌ترین سطح بیان بود. در میان تمامی نمونه‌ها *WUB1* کم‌ترین تغییرات بیان ژن (CV=۲/۵۱٪) و *18S rRNA* بیش‌ترین تغییرات بیان ژن (CV=۱٤/۹٦٪) را نشان داد. نرم‌افزار Normfinder واریانس بین و درون گروه‌های ژن‌های مرجع را محاسبه و پایداری بیان را تعیین می‌کند (Zhong et al. 2011). در نتایج بدست آمده با این نرم‌افزار تأثیر ژنوتیپ در میزان پایداری ژن‌ها مشهود بود و تنش خشکی نیز ترتیب پایداری ژن‌ها را تغییر داد (جدول ۲).

جدول۲- پایداری بیان ژن‌های مرجع در برگ پرچم دو رقم گندم تحت تنش خشکی و شرایط نرمال محاسبه شده با نرم‌افزار Normfinder

Rank	NSh	NDa	DSh	DDa
1	*UBQ*	*ACT*	*UBQ*	*b-TUB4*
Stability	0.064	0.336	0.087	0.297
2	*b-TUB4*	*UBQ*	*RLI*	*RLI*
Stability	0.132	0.415	0.160	0.554
3	*GAPDH*	b-TUB4	ACT	*UBQ*
Stability	0.140	0.607	0.190	0.800
4	*RLI*	*GAPDH*	*WUB1*	ACT
Stability	0.140	0.764	0.269	1.003
5	*Ta.22845*	*Ta.22845*	*Ta22845*	*GAPDH*
Stability	0.461	0.797	0.386	1.247
6	ACT	*RLI*	*b-TUB4*	*Ta22845*

Stability	0.567	0.843	1.051	1.390
7	*18S rRNA*	*WUB1*	*18S rRNA*	*18S rRNA*
Stability	0.802	1.057	1.060	1.587
8	*WUB1*	*18S rRNA*	*GAPDH*	*WUB1*
Stability	2.421	1.369	1.670	2.011

(NSh: رقم شیراز در شرایط کنترل، NDa: رقم داراب۲ در شرایط کنترل، DSh: رقم شیراز در شرایط تنش خشکی، DDa: رقم داراب۲ در شرایط تنش خشکی)

جدول۳- پایداری بیان ژن‌های مرجع در برگ پرچم دو رقم گندم تحت تنش خشکی و شرایط نرمال محاسبه شده با نرم‌افزار BestKeeper

(NSh: رقم شیراز در شرایط کنترل، NDa: رقم داراب۲ در شرایط کنترل، DSh: رقم شیراز در شرایط تنش خشکی، DDa: رقم داراب۲ در شرایط تنش خشکی)

Rank	NSh	NDa	DSh	DDa
1	*UBQ*	*WUB1*	*WUB1*	*b-TUB4*
CV± SD	3.28± 0.53	0.74± 0.15	1.03± 0.21	0.23± 0.04
2	*b-TUB4*	*RLI*	*UBQ*	*RLI*
CV± SD	3.29± 0.62	1.95± 0.39	1.82± 0.3	1.04± 0.215
3	*RLI*	*UBQ*	*RLI*	*GAPDH*
CV± SD	3.31± 0.64	2.90± 0.48	1.89± 0.39	1.48± 0.25
4	*GAPDH*	*b-TUB4*	*Ta22845*	*UBQ*
CV± SD	3.44± 0.48	3.29± 0.66	3.07± 0.52	1.80± 0.31
5	*WUB1*	*GAPDH*	*b-TUB4*	*Ta22845*
CV± SD	3.76± 0.70	4.00± 0.63	3.32± 0.67	2.70± 0.44
6	*Ta.22845*	*ACT*	*ACT*	*ACT*
CV± SD	4.81± 0.76	4.32± 0.83	4.54± 0.86	3.30± 0.60
7	*ACT*	*Ta22845*	*GAPDH*	*WUB1*
CV± SD	5.90± 1.11	4.54± 0.74	5.07± 0.84	4.24± 0.90
8	*18S rRNA*	*18S rRNA*	*18S rRNA*	*18S rRNA*
CV± SD	15.23± 2.25	13.57± 1.91	18.83± 2.93	8.78± 1.22

با این‌حال به‌طور نسبی ژن‌های *UBQ*، *ACT* و *b-TUB4* به‌عنوان پایدارترین ژن‌ها شناخته شدند. در نرم‌افزار BestKeeper ژن‌های مرجعی که کم‌ترین انحراف استاندارد و ضریب تغییرات (CV±SD) را نشان دهند بیان پایدارتری دارند (Chang et al. 2012). نتایج به‌دست آمده کاملاً با نتایج نرم‌افزار Normfinder منطبق نبود با این حال بر اساس نتایج مرتب شده BestKeeper نیز ژن‌های *UBQ*، *b-TUB4*، *WUB1* و *RLI* پایدارترین بیان را داشتند. این نتایج به وضوح نشان می‌دهد که تنش خشکی و ژنوتیپ میزان بیان پایدار ژن‌های خانه‌دار را تغییر می‌دهد. نشان داده شد که تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان در میزان پایداری ژن‌های مرجع تأثیر می‌گذارد (Nicot et al. 2005; Coito et al. 2012). با بررسی نتایج بدست آمده می‌توان گفت که ژن-های *RLI* و *UBQ* نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه در این آزمایش دارای بیان نسبتاً پایداری بودند. از طرف دیگر ژن‌های معروفی مثل *18S rRNA* و *GAPDH* که به فراوانی در مطالعات بیان ژن به‌عنوان ژن مرجع به‌کار می‌روند بیش‌ترین میزان تغییرات سطح بیان را در تمامی تیمارهای آزمایشی نشان دادند و به‌دلیل تغییرات سطح بیان در ژنوتیپ‌های گندم و نیز تنش خشکی برای کمی کردن بیان ژن‌ها در تنش خشکی مناسب نمی‌باشد (جداول۲ و۳). ناپایداری بیان ژن *18S rRNA* را می‌توان به سطوح بالای بیان آن نسبت به میزان mRNA ژن هدف، میزان کمتر تخریب آن در مقایسه با mRNA، تاثیرپذیری بیان آن از نوع بافت و شرایط آزمایشی، عدم تعادل نسبت rRNA به mRNA در بین نمونه‌های مختلف و نیاز به استفاده از آغازگرهای تصادفی برای ساخت cDNA نسبت داد (Brunner et al. 2004). ژن *GAPDH* نیز غیر از نقش اصلی آن در چرخه سوخت و ساز سلولی، در بسیاری از

دیگر فعالیت‌های سلولی که لازمه آن‌ها تنظیم بیان ژن در اثر تنش است نقش دارد (Glare et al. 2002). لذا ممکن است در اثر تنش خشکی تغییر بیان داشته باشد. تفاوت در پایداری بیان یک ژن مرجع در شرایط متفاوت آزمایشی ممکن است تا حدودی با این حقیقت که این ژن‌ها نه تنها در متابولیسم‌های اساسی سلول بلکه در سایر وظایف سلولی نیز مشارکت دارند مرتبط باشد. یک راه حل برای این مشکل استفاده از بیش از یک ژن‌خانه‌دار در مطالعات بیان ژن می‌باشد (Pfaffl et al. 2004). زیرا استفاده از یک ژن جهت نرمال‌سازی ممکن است منجر به ایجاد خطاهای نسبتاً بزرگی شود.

منابع

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (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 Res 64.

Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. Trends Plant Sci 9.

Chang E, Shi S, Liu J, Cheng T, Xue L, Yang X, Yang W, Lan Q, Jiang Z (2012) Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) Using Real-Time PCR. PLOS ONE 7:e33278.

Coito JL, Rocheta M, Carvalho L, Amâncio S (2012) Microarray-based uncovering reference genes for quantitative real time PCR in grapevine under abiotic stress. BMC Research Notes 5:220.

Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? J Exp Bot 55:1445-1454.

Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH (2002) beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. Thorax 57:765-770.

Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp Bot 60.

Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. Journal of Applied Genetics 54:391-406.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of Experimental Botany 56:2907-2914.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26:509-515.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 18,3.

Zhong HY, Chen JW, Li CQ, Chen L, Wu JY, Chen JY, Lu WJ, Li JG (2011) Selection of reliable reference genes for expression studies by reverse transcription quantitative real-time PCR in litchi under different experimental conditions. Plant Cell Reports 30:641-653.

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

Selection of suitable reference genes for real-time PCR in wheat flag leaves under drought stress

Maleki F[1], Zarei KH[1], Fotovat R[*1], Shobbar ZS[2]

1. Former MSc Students, Assistant Professor, University of Zanjan, Iran
2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), karaj, Iran
* Corresponding Author, Email: r_fotovat@znu.ac.ir

A B S T R A C T

Many studies on the defence and stress mechanisms in plants are based on gene expression. The stability of the reference genes expression used in real-time PCR is a further major step in data normalization. For validation of reference genes as internal control in wheat flag leaves under drought stress , the expression stability of eight candidate genes, including ribosomal RNA subunit (*18S rRNA*), ubiquitin (*UBQ and WUB*), Actin (*ACT*), glyseraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), RNase L inhibitor-like protein (*RLI*), beta-tubulin 4 (*bTUB*) and ATP-dependent 26s proteasome regulatory subunit (*Ta.22845*), was evaluated using NormFinder and BestKeeper softwaresResults indicated that *RLI* and *UBQ* were the most stable genes, whereas *18S rRNA* was least stable gene among the eight tested genes for the normalization of gene expression in wheat flag leaf under drought and normal conditions.

Key Words

BestKeeper, drought, reference genes, NormFinder, real-time PCR