Crop Biotech.
Winter (2014) 8: 1-10.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هشتم، زمستان ۱۳۹۳ (۱۰-۱)

بررسی ژن‌های رفرنس موجود در برگ کنجد تحت تنش شوری به روش Real- Time PCR

سمیرا شاکری[1*]، دکتر سید کمال کاظمی‌تبار[2]، سید حمیدرضا هاشمی[3]
۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح‌نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۲، دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳، دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/٤- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵)

Study of Reference Genes in Sesame Leaves under Salt Stress by Real-Time PCR Method

Samira Shakeri[1], Seyed Kamal Kazemitabar[2*], Seyed Hamid Reza Hashemi[3]
1. M.Sc. Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Sari, Iran.
2. Associate Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.
3, Ph.D student in Biotechnology, Tabarestan Institute of Genetics and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Sari, Iran
(Received: 25 Dec. 2014 -Accepted: 16 Mar. 2015)

چکیده

تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء لاینفک مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده بشمار می‌رود. Real-time PCR تکنیک بسیار قوی برای بررسی بیان کمی ژن می‌باشد. با این حال، علاوه بر قابل اعتماد بودن، دارای یک سری مشکلات خاص، از جمله انتخاب ژن (های) کنترل داخلی مناسب برای نرمال‌سازی داده‌ها می‌باشد. این تحقیق در خصوص انتخاب ژن‌های رفرنس در گیاه کنجد در مراحل مختلف نمو و تحت تنش شوری، مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور چهار ژن کنترل داخلی شامل Alpha- Tubulin، Beta- Actin، eIF4- A و UBQ5 که معمولاً به عنوان ژن خانه‌دار در گیاهان استفاده می‌شود انتخاب و پایداری بیان آنها در سطوح مختلف شوری (صفر و ۷۵ میلی‌مولار) و مراحل مختلف نموی در شش دوره زمانی (۰ ساعت، ٦ ساعت، ۱ روز، ٤ روز، ۸ روز و ١٦ روز) در بافت برگ مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی بیان ژن‌های رفرنس با استفاده از نرم‌افزار geNORM نشان داد که ژن‌های eIF4- A و Beta-Actin از پایداری بیان بیشتری نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی در مراحل نمو و تنش شوری در نمونه بافت برگی برخوردار بودند. استفاده از این ژن‌ها می‌تواند در نرمال‌سازی بیان ژن به وسیله آنالیز Real-Time PCR مفید باشد. نتایج این تحقیق را می‌توان به عنوان ژن‌های رفرنس درآنالیز بیان ژن در Real-Time PCR در گیاه کنجد استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش شوری، ژن رفرنس، کنجد.

Abstract

Analysis of gene expression is considered as an essential part of functional genomics studies in all living organisms. Real-time PCR technique is very strong one to study the expression of a gene. However, despite its reliability, it has a set of specific problems, such as internal control gene selection which are suitable for normalization of the data. The study about selection reference of genes in sesame plant, at different developmental stages and under salinity stress of were studied. For this purpose, four internal control genes consists of eIF4- A, UBQ5, Alpha-Tubulin and Beta-Actin which are commonly used as housekeeping genes in plants, are selected and the stability of its expression in different salinity levels (zero and 75 mM) and different growth stages in five time periods (0 h, 6 h, 1 day, 4 days, 8 days and 16 days) in leaf tissue were examined. Study of the expression of reference genes using geNORM software showed that, in developmental stages and salinity in the leaf tissues, eIF4-A and Beta-Actin genes have more stable expression than other investigated genes. Using these genes can be useful in normalization of gene expression by Real-Time PCR analysis. The results can be used as reference genes for gene expression analysis in the Real-Time PCR.

Keywords: Gene expression, Salt stress, Reference genes, *Sesamum indicum* L.

* نویسنده مسئول: سمیرا شاکری
E-mail: s.shakeri2010@yahoo.com

مقدمه

کنجد (*Sesamum indicum* L.) به دلیل دارا بودن آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی از قبیل سزامین و سزامول، بطور سنتی برای مصرف مستقیم و بصورت منبعی از روغن با کیفیت عالی، استفاده می‌شود. فعالیت سلول‌ها در همه موجودات با فعال‌کردن و غیرفعال‌کردن بیان ژن‌ها تنظیم می‌شود. بیان ژن به طور مستقیم به تعداد نسخه‌های mRNA ژن در یک بافت مرتبط بوده که خود رابطه مستقیمی با میزان پروتئین مربوطه دارد. تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء لاینفک مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده بشمار می‌رود (Jain *et al*., 2006). در بیولوژِی نوین، آنالیز صحیح بیان ژن، برای جستجوی رونوشت‌هایی با سطح بیان پایین روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. این رونوشت‌ها با مقادیر بسیار کم در زیست‌فناوری یا تشخیص بیماری‌ها کاربرد دارند (Bustin, 2000).

PCR یکی از روش‌های انتخابی برای تعیین اختصاصی نوع ژن‌های بیان‌شده در مواد گیاهی است (Martin and Rygiewicz, 2005). جداسازی محصولات PCR در الکتروفورز، قابلیت آنالیز کمی نمونه‌های DNA را ندارد (McCartney *et al*., 2003). روش Real-Time PCR، یک روش جدید برای تعیین کمیت و میزان بیان ژن‌ها بوده که نتایج آن از صحت و دقت بالاتری نسبت به روش‌های قبلی برخوردار است (McCartney *et al*., 2003). اختراع و معرفی تکنیک Real-time PCR سبب انقلابی در روش‌های بیولوژی مولکولی، خصوصاً مطالعات آنالیز بیان ژن گردیده است. از مهم‌ترین مزیت‌های این تکنیک می‌توان به حساسیت بالا، کمیت‌سنجی دقیق اشاره نمود(Jain *et al*., 2006).

در مطالعات آنالیز بیان ژن در سطح ترانسکریپتوم، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی جهت حداقل‌سازی خطای نمونه‌برداری بسیار حایز اهمیت می‌باشد. این خطاها اصولاً در طی مراحل مختلف آزمایش شامل مراحل نمونه‌برداری، استخراج RNA، ساخت cDNA و ... حادث می‌شوند (Dheda *et al*., 2004). روش‌های مختلفی برای برآورد و رفع این خطاها پیشنهاد شده است. یکی از ساده‌ترین روش‌ها، نرمال‌سازی در سطح RNA بوده که خود نیاز به روش‌های کمیت‌سنجی دقیق می‌باشد از این گذشته این نوع نرمال‌سازی مراحل بعدی آنالیر یعنی ساخت cDNA، کارایی PCR و ... را در برنمی‌گیرد. روش دیگر نرمال‌سازی با استفاده از ژن‌های رفرنس[1] می‌باشد که امروزه بطور گسترده استفاده می‌شود که خود به عنوان یکی از مهم‌ترین مخاطرات در روش Real-time PCR ارزیابی می‌شود.

بطورکلی سطوح بیان ژن‌های رفرنس در بین سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط مختلف آزمایشی ثابت فرض می‌شود (Thellin *et al*., 1999)، که در صورت نقض این فرض، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی تحت شعاع قرار گرفته و نتایج اشتباه دور از ذهن نخواهد بود (Bustin, 2000). بدین نحو که نوسانات تصادفی ژن‌های رفرنس در بین نمونه‌ها منجر به عدم امکان تعیین اختلافات اندک ژن‌های هدف خواهد گردید. از این گذشته در صورت تاثیرپذیری مستقیم این ژن‌ها نسبت به شرایط آزمایشگاهی و محیطی، فرایند نرمال‌سازی با چالش مواجه می‌گردد (Dheda *et al*., 2004). تا چندی پیش فرایند نرمال‌سازی داده‌های بیانی با استفاده از ژن‌های رفرنس درگیر در فرایندهای ساختاری سلولی، نظیر 18S rRNA، یوبیکویتین[2] (UBQ)، اکتین[3] (ACT)، بتاتوبولین[4] (TUB) و گلایسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز[5] (GAPDH)

1. House keeping
2. Ubiqutin
3. Actin
4. B-Tubulin
5. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

که از بیان یکنواختی برخوردار بودند که به عنوان کنترل‌های داخلی استفاده می‌گردیدند (Jain *et al*., 2006). هرچند برخی از مطالعات جدید حاکی از متغیر بودن سطح بیان این ژن‌ها تحت شرایط مختلف آزمایشگاهی می‌باشد (Czechowski *et al*., 2005; Lee *et al*., 2002; Suzuki *et al*., 2000). Garg و همکاران (۲۰۱۰) برای انتخاب ژن‌های رفرنس، ۱۲ ژن کاندید شامل ACT1، EF1a، GAPDH، IF4a، TUB6، UBC، UBQ5، UBQ10، 18SrRNA، 25SrRNA، GRX و HSP90 در ۱۸ نمونه از بافت‌ها، مراحل رشدی و شرایط استرس در گیاه نخود را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مقادیر بیان EF1a و HSP90 در سراسر اندام‌های مختلف ثابت و به طور مشابه، سطح بیان IF4a و GAPDH در سراسر تنش‌های مختلف ثابت باقی ماندند. در مطالعه‌ای توسط Caldana و همکاران (۲۰۰۷) به منظور شناسایی مناسب‌ترین ژن مرجع در سه رقم مختلف برنج تحت تنش شوری ۷ ژن به قرار زیر انتخاب شدند: 18S-rRNA، UBQ، ACT، ACT1، TUB، CYC و EF-1α که معمولاً به عنوان ژن خانه‌دار در گیاهان استفاده می‌شود. به جز CYC که مقدار M (شاخص میانگین پایداری بیان ژن[1]) برابر با ۱/۸۸ داشت تمام ژن‌های رفرنس دیگر مقادیر زیر آستانه ۱/۵ را داشتند که ثبات خود را اثبات کردند. EF-1α بیان پایداری داشته و به طبع بهترین ژن مرجع می‌باشد. Wei و همکاران (۲۰۱۳) به منظور انتخاب ژن رفرنس در گیاه کنجد، ده ژن کاندید شامل SiACT، SiUBQ6، SiTUB، Si18S rRNA، SiEF1α، SiCYP، SiHistone، SiDNAJ، SiAPT و SiGAPDH را در ۳۲ نمونه شامل بافت‌ها و تنش‌های مختلف بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که ده ژن کاندید را می‌توان به عنوان ژن رفرنس در کنجد استفاده شود. لازم بذکر است Liu و همکاران (۲۰۱۲) به منظور انتخاب مناسب‌ترین ژن رفرنس در گیاه کنجد تحت بیماری پوسیدگی ساقه ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina*، ۹ ژن شامل 18S rRNA، NADHD، GAPDH، β-actin، α-tubulin، UBQ5، RPL4، eIF4A و eEF1α را مورد بررسی قرار دادند که سه ژن UBQ5، eIF4A و α-tubulin از بیان پایداری تری برخوردار بودند. هر چند، تعدادی ژن رفرنس در گیاه کنجد گزارش شده است، اما ژن رفرنسی در سطوح مختلف یک تنش مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا در این مطالعه درصدد انتخاب ژن‌های مرجع مناسب برای نرمال‌کردن داده بیان ژن در گیاه کنجد در مراحل مختلف نمو و تحت تنش شوری در بافت برگ می‌باشیم.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

بذرهای گیاه کنجد رقم قائم از موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه شد. بذرها با نسبت ۱:۱ خاک برگ و پرلیت کشت شدند و در گلخانه شرایط ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی پرورش یافتند. بعد از گذشت ۳ هفته گیاهچه‌ها به محیط هیدروپونیک هوگلند انتقال داده شدند و تنش شوری اعمال گردید. برای اعمال تنش شوری از غلظت ۷۵ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم به صورت دوره زمانی در شش تیمار ۰، ۶ ساعت، ۱، ۴، ۸، و ۱۶ روز استفاده شد. سپس نمونه برگ بلافاصله پس از برداشت در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردیدند.

جهت انتخاب ژن کاندید و طراحی پرایمر از ژن‌های مرجع براساس داده‌های منتشر شده در NCBI برای گیاه کنجد انتخاب گردید. که این ژن‌های انتخاب شده شامل آلفا توبولین (Alpha-tubulin)، بتا- اکتین (Beta-actin)، eIF4- A و

1. Average expression stability (M) value

UBQ5 می‌باشند. به منظور طراحی پرایمر برای تکثیر چهار ژن خانه‌دار ابتدا توالی‌های این ژن‌ها که در پایگاه اینترنتی NCBI موجود است، استخراج شد و سپس با استفاده از سایت پرایمر ۳ و نرم افزار OLIGO (ورژن ۱,۱,۲,۱۹) جهت طراحی پرایمر، آغازگرهای مناسب رفت و برگشت برای تکثیر قسمتی از ژن واقع در منطقه حفاظت شده آن (CDS) طراحی شد. طول پرایمرهای مذکور bp ۱۷۰-۷۰ و دمای ذوب پرایمر ۶۰ در نظر گرفته شد.

برای استخراج RNA از بافت برگ از روش ترایزول که حاوی گوانیدین‌ایزوسیانات است، استفاده گردید (Chomczynski and Sacchi, 1987). برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده عمل الکتروفورز انجام گردید. برای این منظور از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ با ولتاژ ثابت ۶۵ ولت استفاده شد. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراجی، تیمار با آنزیم *DNase*I (Fermentase) انجام شد.

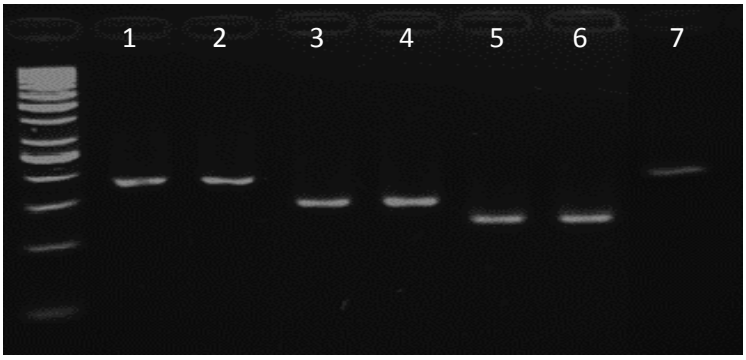
روش ساخت cDNA براساس دستورالعمل کیت خریداری شده (کیاژن) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۵ میکرولیتر 2× Real-Time PCR Master Mix، آغازگر رفت و برگشت ۰/۳ میکرولیتر، نمونه cDNA ۱ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۳/۴ میکرولیتر فراهم گردید. جهت انجام Real-Time PCR از چرخه حرارتی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. جهت بررسی نمودار منحنی ذوب نیز، میزان جذب فلورسنس توسط آمپلیکن‌ها در دامنه دمایی ۶۰ تا ۹۵ مورد بررسی قرار گرفت. بیان پایدار ژن‌های رفرنس به وسیله qRT- PCR با استفاده از اندازه‌گیری بیان ژن پایدار (M) در نرم‌افزار geNORM محاسبه می‌شود (Pattyn *et al*., 2003; Pfaffl *et al*., 2004). تعیین ثبات ژن مرجع با متوسط تغییرات Pair-wise (V) در نظر گرفته می‌شود که ژن در مقایسه با همه ژن‌های مرجع تست می‌شوند. ژن‌ها باید حداقل مقدار M را داشته باشند که در نتیجه بیان پایدارتری دارند (حد پیشنهادی M<۱/۵) (Vandesompele *et al*., 2002; Hellemans *et al*., 2007).

نتایج

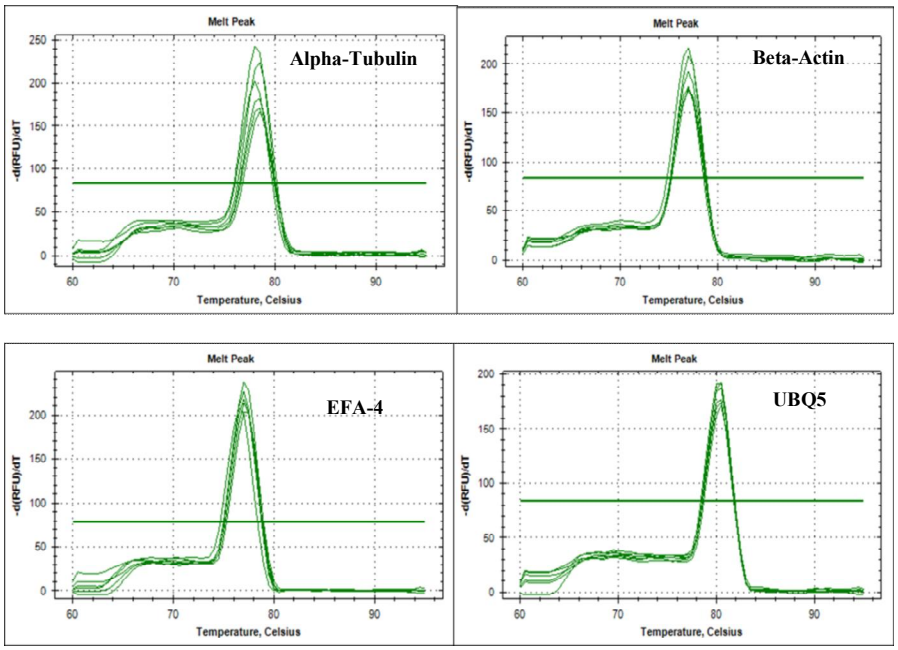
ژن‌های انتخاب شده برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن در کنجد در مراحل مختلف نمو و تحت تنش شوری در بافت برگ شامل آلفا توبولین (Alpha-tubulin)، بتا-اکتین (Beta-actin)، eIF4- A و UBQ5 می‌باشند، که نقش ژن‌های مرجع در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد و مقایسه آن با نشانگر وزنی استاندارد (۱ kb) نشان داد که RNAهای استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ از کمیت و کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. پس از ساخت cDNA و تکثیر آن توسط Real-Time PCR (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی)، الکتروفورز ژل اگارز ۳/۵ درصد انجام پذیرفت تا از اختصاصی بودن تکثیر محصولات بدست آمده و عدم وجود پرایمر دایمر اطمینان حاصل شود. بعبارت دیگر نتایج حاصله پس از طراحی صحیح آغازگرها و تکثیر اختصاصی ژن موردنظر بود و هیچ باند اضافی دیده نشد (شکل ۱). آنالیز مرحله ذوب نشان دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می‌باشد که در واقع تاییدی بر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد. همانطور که در شکل ۲ ژن‌های رفرنس مشاهده می‌شود هیچ نوع پیک اضافی که حاکی از تکثیر غیراختصاصی ژن مورد نظر و وجود پرایمر دایمر باشد دیده نمی‌شود.

جدول ۱- انتخاب ژن‌های مرجع برای کنجد و اطلاعات مربوط به جفت پرایمرها

نقش و عملکرد	TM	طول محصول (bp)	توالی پرایمر	نام ژن	لوکوس شناسایی
آلفا- توبولین	60 60	137	GGTTGCAGGGATTCTTGGTC CTGAGGCGAAGGGTAAATGG	Alpha-tubulin	JQ658356
بتا- اکتین	60 60	115	CTCAACCCCAAGGCTAACAG GTACGCCCACTAGCATACAG	Beta-actin	JQ658353
عامل ضروری برای سنتز پروتئین	61 60	182	CCCAGGACGAGTGTTTGACAT CAGGTGGCATAGTAGCAGAG	eIF4- A	JQ658354
تغییر پروتئین و مسیر کاتابولیسم پروتئین	60 60	182	CACTCTCGCCGACTACAACA TGCACCTTTCCCGAATCGTC	UBQ5	JQ658357

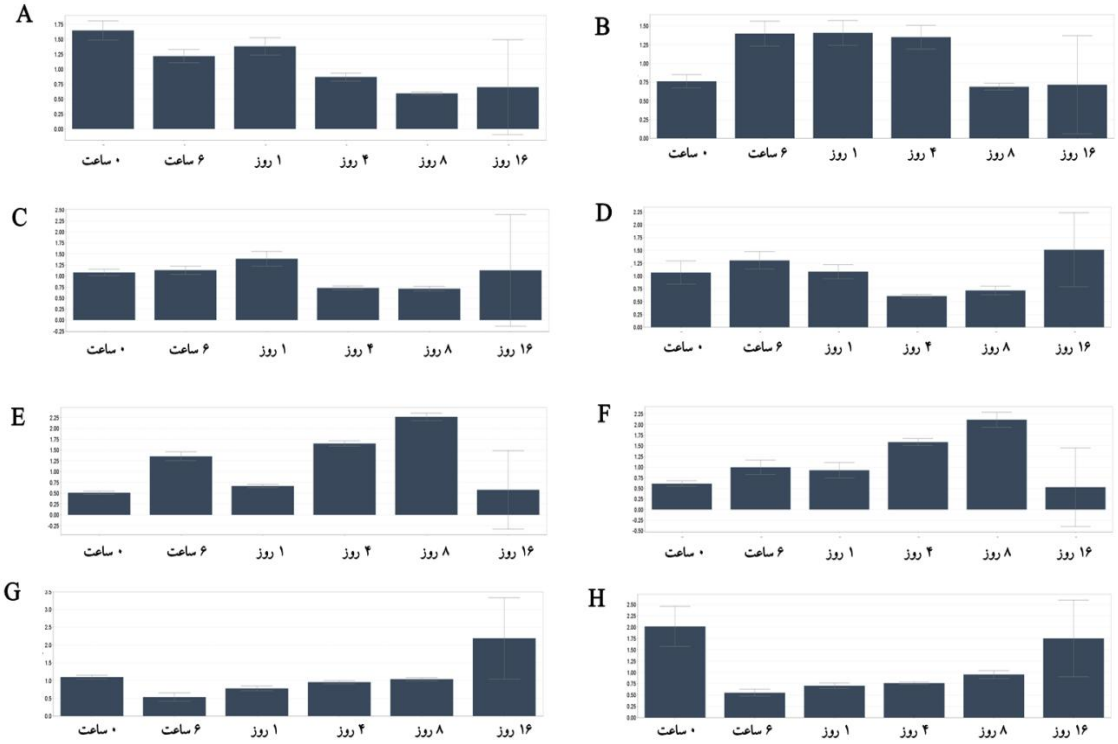


شکل ۱- الکتروفورز محصولاتPCR با پرایمرهای دقیق Real-Time PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد با مارکر وزنی ۵۰ bp (چاهک ۱ و ۲: eIF4- A ، ۱۸۲ bp- چاهک ۳ و ۴: Alpha_ Tubulin، ۱۳۷ bp - چاهک ۵ و ۶: Beta_ Actin، ۱۱۵ bp- چاهک ۷: UBQ5، ۱۸۲ bp).



شکل ۲- منحنی ذوب محصولات PCR ژن Alpha- Tubulin، Beta- Actin، eIF4- A و UBQ5 که نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر می‌باشد که نقطه‌ی ذوب آنها به ترتیب حدود ۷۸/۵۰، ۷۷، ۷۷ و ۸۰ می‌باشد.

فرایند نرمال‌سازی داده‌های بیانی با استفاده از ژن‌های رفرنس درگیر در فرایندهای ساختاری سلولی، که از بیان یکنواختی برخوردار بودند به عنوان کنترل‌های داخلی استفاده گردیدند، بدین منظور چهار ژن کنترل داخلی شامل eIF4-A، UBQ5، Alpha-Tubulin و Beta-Actin که معمولاً به عنوان ژن خانه‌دار در گیاهان استفاده می‌شود و توالی آنها در گیاه کنجد در پایگاه داده NCBI ثبت شده بود انتخاب شدند و ثبات بیان آن در مراحل نمو گیاه و تحت تنش شوری در شش دوره زمانی در بافت برگ تست شدند (شکل۳).

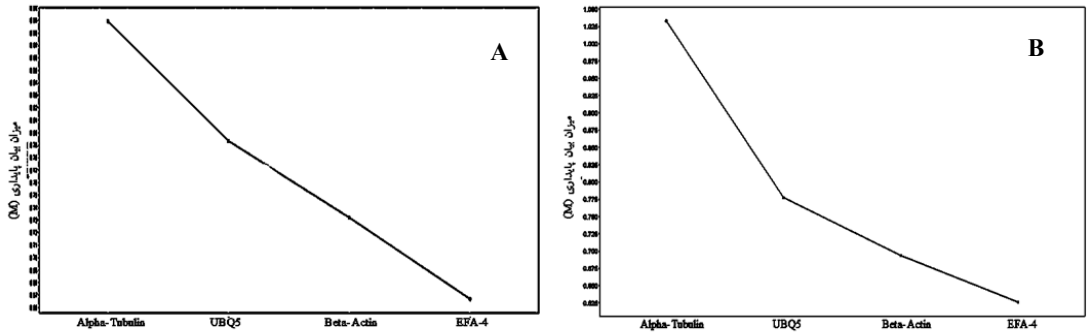


شکل ۳- بیان ژن‌ها در مراحل مختلف رشدی تحت شرایط نرمال به ترتیب Alpha Tubulin–eIF4- A –Beta- Actin و UBQ5 (G, E, C, A)، تحت تنش شوری Alpha Tubulin –eIF4- A –Beta- Actin و UBQ5 (H, F, D, B) .

مقادیر میانگین پایداری بیان ژن‌ها (M) با استفاده از نرم‌افزار geNORM تعیین شد. علاوه بر این نرم‌افزار، نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder نیز برای بررسی پایداری بیان ژن‌های رفرنس استفاده می‌گردند (Andersen *et al*., 2004). نرم‌افزار geNORM بیش از ۴۰۰۰ بار، BestKeeper و NormFinder به ترتیب ۶۵۰ و ۵۰۰ بار برای آنالیز پایداری استفاده شده است (Pettengill *et al*., 2012). نتایج حاصل از نرم‌افزار geNORM نشان داد که در بافت برگ در مراحل مختلف نمو تمام ژن‌های رفرنس میانگین پایداری بیان زیر حد آستانه ۱/۵را داشتند که بیانگر پایداری بیان آنها می‌باشد که در بین این ژن‌ها، Beta-Actin و eIF4-A به ترتیب با حداقل مقادیر ۰/۶۷ و ۰/۷۳ بیان پایدارتری داشتند (شکل ۴، A). ثبات بیان بالای یک ژن۱، نشان‌دهنده‌ی آن است که می‌توان از آن به عنوان یک ژن کنترل داخلی مناسب استفاده شود.

1. Most stable genes-expression

برخی از مطالعات جدید حاکی از متغیر بودن سطح بیان این ژن‌ها تحت شرایط مختلف آزمایشگاهی می‌باشند (Czechowski *et al*., 2005; Lee *et al*., 2002; Suzuki *et al*., 2000). در نتیجه علاوه بر انتخاب ژن رفرنس در مراحل مختلف نمو گیاه، ضروری است اثرات تنش شوری روی ثبات بیان در ژن‌های انتخاب شده آزمایش شود. نتایج حاصل نشان داد که در بافت برگ ژن‌های رفرنس آزمایش شده مقادیر میانگین پایداری بیان (M) زیر حد آستانه ۱/۵ را داشتند که در بافت برگ ژن‌های eIF4-A و Beta-Actin با حداقل مقادیر M به ترتیب ۰/۶۲۵ و ۰/۷ بیان پایدارتری داشتند (شکل ۴، B) که می‌توان از آنها به عنوان ژن رفرنس جهت برای نرمال‌سازی بیان ژن در Real-Time PCR بهره جست.

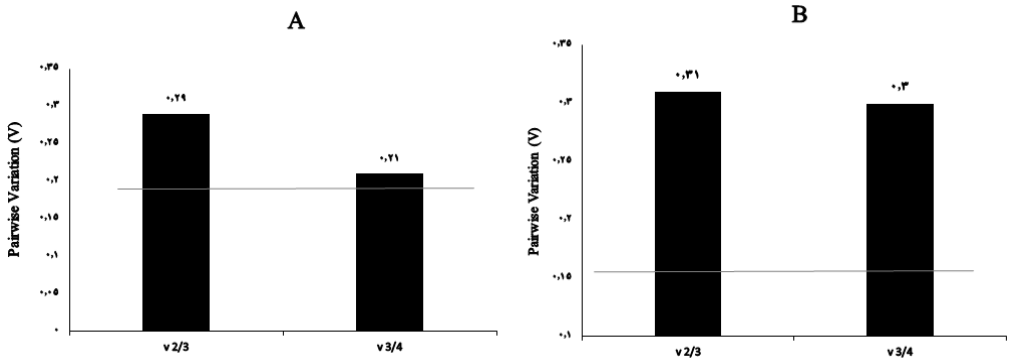


شکل ۴- میانگین مقادیر پایداری بیان (M) ژن‌های مرجع کاندید با استفاده از آنالیز geNorm، در بافت برگ، A: تحت شرایط نرمال طی ۶ دوره زمانی رشد، B: تحت تنش شوری در ۶ دوره زمانی رشد

با استفاده از برنامه geNorm، محاسبه NF و محاسبه عدد مطلوب برای ژن‌های مرجع مورد نیاز برای نرمالیزاسیون امکانپذیراست. تغییرات دو به دو بین دو NFs Vn/Vn+1 پی‌درپی، که با پایدارترین ژن‌ها شروع می‌شود برای تعیین اینکه آیا اضافه کردن پایدارترین ژن بعدی برای نرمالیزاسیون مناسب مورد نیاز است، استفاده شد. Vandesompele و همکاران (۲۰۰۲) یک حد برآورد شده ۰/۱۵ را گزارش کردند. در مطالعه حاضر، تغییرات دو به دو با استفاده از مراحل مختلف رشد و با در نظر گرفتن محاسبات مقدار M برای تمام مراحل با هم، نشان داد که برای نرمالیزاسیون مناسب در برگرفتن تعداد ۲ ژن مرجع پایدار لازم به صورت $V_{2/3}, V_{3/4} > 0.15$ بود (شکل ۵، A)، دو ژن می‌تواند برای نرمالیزاسیون در سراسر مرحله رشدی کافی باشد، در ضمن برای تنش شوری تعداد ۲ دو ژن مرجع پایدار لازم به صورت $V_{2/3}, V_{3/4} > 0.15$ می‌تواند برای نرمالیزاسیون در سراسر مرحله رشدی تحت تنش شوری کافی باشد (شکلB۵).

در گزارش‌های اخیر صحت و درستی بیان پایدار ژن‌های رفرنس را که در گونه‌ها، بافت‌ها و شرایط مختلف بیان ثابت دارند، برای آنالیز qPCR تست می‌کنند (Chen *et al*., 2011; Guenin *et al*., 2009; Vashisth *et al*., 2011). مطالعات قبلی در قهوه و گل اطلسی نشان داد که ژن رفرنس در بافت‌های مختلف در یک ژنوتیپ و همچنین بافت یکسان در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت است، این ناپایداری در ثبات ژن رفرنس تاکید بر اهمیت تست همه نمونه‌ها در آزمایش‌ها را برای تایید پایداری ژن رفرنس دارد (Mallona *et al*., 2010; Barsalobres-Cavallari *et al*., 2009). ژن کنترل داخلی ایده‌آل، باید سطح بیان ثابتی در تمام

شرایط آزمایش داشته باشد. با این‌حال، هیچ ژنی وجود ندارد که بیان بسیار ثابت در تمام شرایط داشته باشد. هنگام انتخاب ژن‌های رفرنس، جانب احتیاط باید رعایت شود حتی هنگامی که بیان آن ژن رفرنس تحت چندین شرایط و گونه وابسته به هم ثابت باشد. در همین ارتباط Caldana و همکاران (۲۰۰۷) نیز در مطالعه‌ای بر روی برنج نیز به همین نتیجه دست یافتند.



شکل ۵- تغییرات Pairwaise Variation (V) در بافت برگ، A: گیاهان کنترل. B: گیاهان تحت تنش شوری

همچنین آنها نشان دادند که ثبات بیان در بافت ساقه و ریشه در ارقام مختلف برنج قابل تشخیص می‌باشد. و اعلام داشتند که در برنج گزارشات قبلی 18S-rRNA، GADPH، UBI5 و EF-1α را به عنوان ژن مرجع مناسب پیشنهاد کرده‌اند. گرچه همه ژن‌ها مقدار M زیر حد آستانه داشتند TIP41 حداقل پایداری بیان ژن را در هر دو بافت داشت. در گیاه کنجد هر چند Wei و همکاران (۲۰۱۳) به منظور انتخاب ژن رفرنس، ده ژن کاندید را در ۳۲ نمونه شامل بافت‌ها و تنش‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌دادند، تنش شوری را در یک زمان (۵ ساعت بعد از تنش) ارزیابی کرده که با تحقیق حاضر که ژن رفرنس را در سری زمانی تنش (۶ دوره زمانی) انجام داده متفاوت می‌باشد. در نتیجه در این آزمایش بر روی نمونه‌های برگی موفق شدیم که بیان متفاوتی از ژن‌های رفرنس را در مراحل مختلف رشدی بیابیم.

نتایج آزمایش نشان داد که ژن‌های EIF4-A و Beta-Actin دارای حداقل مقادیر میانگین پایداری بیان (به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۷۳) بودند که بیان پایدارتری را در برگ در شرایط نمو گیاه نشان دادند. همچنین مشخص شده است که پایداری بیان ژن‌های رفرنس تحت تنش‌های مختلف مشابه نیستند و تحت تنش شوری در بافت برگ ژن‌های eIF4-A و Beta-Actin (با حداقل مقادیر M، به ترتیب ۰/۶۲۵ و ۰/۷) بیان پایدارتری داشتند. همچنین Liu و همکاران (۲۰۱۲) سه ژن UBQ5، eIF4A و α-tubulin را تحت بیماری پوسیدگی ساقه که از بیان پایداری‌تری برخوردار بودند را به عنوان ژن رفرنس در کنجد معرفی کردند. در نهایت ژن‌های eIF4-A و Beta-Actin را می‌توان به عنوان ژن کنترل داخلی مناسب برای نرمال‌سازی Real-Time PCR در کنجد استفاده نمود.

REFERENCES

Andersen C, Jensen J, Orntoft T (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. Canc. Res. 64(15): 5245-5250.

Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP, Maia IG (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. BMC Mol. Biol. 10: 1.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25: 169-193.

Caldana C, Scheible W, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Meth. 3(7).

Chen L, Zhong H, Kuang J, Li J, Lu W, Chen J (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. Planta. 234(2): 377–390.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Signal-Step Method of RNA Isolation by Acid GuanidiniumThiocyanate-Phenol -Chloroform Extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol. 139: 5-17.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques. 37: 112-114.

Garg R, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M (2010) Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochem. Biophys. Res. Comm. 396: 283–288.

Guenin 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(2): 487-493.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biol. 8(19).

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. Biochem. Biophys. Res. Comm. 345: 646-651.

Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ (2002) Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome. Res. 12: 292-297.

Liu LM, Liu HY, Tian BM (2012) Selection of reference genes from sesame infected by *Macrophomina phaseolina*. Acta Agron. Sin. 38: 471-478.

Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in Petunia hybrid. BMC Plant Biol. 10: 4.

Martin KJ, Rygiewicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol. 5: 28.

McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Manag. Sci. 59: 129-142.

Pattyn F, Speleman F, Depaepe A, Vandesompele J (2003) RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe

database. Nucleic Acids Res 1: 122-123.

Pettengill AE, Parmentier-Line C, Coleman GD (2012) Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populu*s for use in photoperiod and low-temperature studies. BMC Res Notes. 5: 366.

Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. 26(6): 509-515.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. Biotechniques. 29: 332-337.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J. Biotechnol. 75: 291-295.

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 Biol. 3: 7.

Vashisth T, Johnson LK, Malladi A (2011) An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. Plant Cell Rep. 30(12): 2167-2176.

Wei L, Miao H, Zhao R, Han X, Zhang T, Zhang H (2013) Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. Planta. 237(3): 873-889.