



اثرات پارامترهای مختلف بر روی کیفیت نتایج حاصل از تکنیک cDNA-AFLP در مطالعه ترانسکریپتوم سیب زمینی

کبری مسلم خانی^{1*}، جواد مظفری²

¹ استادیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

² دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: 1390/07/16، تاریخ پذیرش: 1392/02/31

چکیده

آنالیزهای ترانسکریپتوم در ایجاد اطلاعات و درک کافی از سیستم های واکنشی گیاهان در برابر عوامل زیستی و غیر زیستی بسیار کارآمد هستند. cDNA-AFLP به عنوان روشی مناسب علاوه بر تکرار پذیری بالا، نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی ژن ها ندارد. البته عوامل متعددی در حساسیت، دقت و تکرار پذیری آن موثر هستند که توجه به این عوامل می تواند باعث افزایش کیفیت ارزیابی ها و دستیابی به اطلاعات صحیح گردد. در تحقیق حاضر cDNA-AFLP برای آنالیز واکنش گیاه سیب زمینی در برابر استرس ناشی از باکتری بیماریزای *Ralstonia solanacearum* در شرایط *in vitro* بهینه سازی گردید. در این راستا پارامترهای مختلف و اثر تعامل آنها با یکدیگر در افزایش حساسیت و تکرار پذیری این روش بررسی شد. نتایج نشان داد روش استخراج RNA و استفاده از mRNA از فاکتور های تاثیر گذار در موفقیت آزمون cDNA-AFLP است به طوری که RNA های استخراج شده با استفاده از روش مبتنی بر ستون از یکنواختی و کیفیت بالاتری برخوردار هستند و استخراج mRNA علاوه بر حذف RNA های ریبوزومی، در کاهش ممانعت کننده ها و اجرای صحیح سایر مراحل آزمون تاثیر گذار است. همچنین بهینه سازی فاکتورهایی از قبیل رقت مناسب محصول پیش تکثیر که به عنوان الگو در مرحله تکثیر انتخابی استفاده می شود، تعداد سیکل PCR در مرحله پیش تکثیر، غلظت مناسب $MgCl_2$ و Taq DNA Polymerase در مراحل پیش تکثیر و تکثیر انتخابی، نقش تعیین کننده ای بر روی تعداد و غلظت قطعات cDNA تکثیر شده و وضوح آن بر روی ژل دارد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، ترانسکریپتوم، سیب زمینی، cDNA-AFLP

مقدمه

ژن‌ها و توالی‌های موجود و نیز امکانات مالی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. روشهای مبتنی بر هیبریداسیون مانند Microarray با وجود کارایی بالا در ارزیابی بیان هزاران ژن در یک آزمون، به دلیل نیاز به اطلاعات اولیه در رابطه با توالی ژنهای موجود هدف و نیز هزینه بر بودن و عدم توانایی ردیابی ترانسکریپتوم در غلظت پایین، در ارتباط با برخی ارگانسیم‌ها و در تعداد زیادی از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی به ویژه در کشورهایی با توان اقتصادی پایین، قابل اجرا نمی‌باشد (Kivioja *et al.*, 2005). علاوه بر این، روش‌هایی مانند DD-RT-PCR با وجود آنکه از سرعت و حساسیت در تعیین تغییرات بیان ژن برخوردار است و نیاز به اطلاعات اولیه در زمینه توالی ژن‌ها ندارد اما به دلیل اشکالاتی نظیر تکرار پذیری پایین، واکنش مثبت دروغین مورد توجه قرار نگرفته و روش cDNA-AFLP به عنوان تکنیکی برای بررسی وسیع بیان ژنومی، جایگزین آن شده است (Bachem *et al.*, 1998, Fukumura *et al.*, 2003). روش cDNA-AFLP از توسعه DD-RT-PCR حاصل شده است و میزان اندک RNA مورد نیاز برای شروع آزمون، حساسیت بالا، سادگی، تکرارپذیری و عدم نیاز به اطلاعات اولیه ژنوم و امکان اتوماسیون با استفاده از رنگ‌های فلورسانت از مزایای آن به شمار می‌روند (Cho *et al.*, 2001; Breyne & Zabeau, 2001). همین امر باعث تمایل روزافزون استفاده از این روش در درک و شناسایی سیستم دفاعی

برای درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی مختلف در واکنش موجودات به ویژه گیاهان در برابر عوامل زیستی و غیر زیستی، آنالیز همزمان و وسیع ژن‌های دخیل در واکنش گیاه و ترانسکریپتوم موجود از اهمیت زیادی برخوردار است. آنالیز ترانسکریپتوم علاوه بر جنبه‌های مختلف دفاع و مقابله گیاه در برابر انواع تنش‌های زنده و غیر زنده، باعث شناخت ژن‌های جدید دفاعی و فرآیندهای جدید فیزیولوژیکی می‌گردد. این امر می‌تواند برای القاء عکس‌العمل‌های دفاعی گیاه در سیستم‌های تولید دارای تنش، استفاده گردد. این نوع تجزیه و تحلیل‌ها، همپوشانی فرایندهای پیام‌رسانی ناشی از دفاع در پاتوسیستم‌های مختلف و همچنین فرایندهای پیام‌رسانی ناشی از هورمون‌ها را مشخص می‌کند (Schenk *et al.*, 2000). تا کنون روش‌های مولکولی متفاوتی برای بررسی بیان متفاوت ژن‌ها معرفی شده است که می‌توان به روشهای RNA fingerprinting arbitrary primer PCR Differential display (Welsh *et al.*, 1992) و RT-PCR (DD-RT-PCR) (Liang and Pardee, 1992) cDNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) Suppression (Bachem *et al.*, 1998) Subtractive Hybridization (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996) اشاره نمود. هر یک از روش‌های ذکر شده مزایا و معایبی دارند و بر اساس هدف، میزان اطلاعات اولیه در مورد توالی

مواد و روشها

نمونه گیاهی

غده های بذری طبقه سوپرالیتم رقم مارفونا از مرکز تحقیقات کشاورزی اردبیل تهیه شد. از گیاهان سیب زمینی کاشته شده در گلخانه ریزنمونه هایی برداشت شد و پس از شستشوی سطحی با آب روان، نمونه ها در شرایط استریل ضد عفونی و سپس به محیط کشت MS (Murashing & Skoog, 1962) منتقل شدند. نمونه های کشت شده در دمای 22 تا 25 درجه سانتی گراد و فتوپریود 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی انکوبه شدند. پس از رشد کافی هر ماه عمل تکثیر و واکشت جوانه ها انجام شد.

آلوده سازی گیاهچه ها

جدایه SH₁₂ باکتری *Ralstonia solanacearum* که از گیاه سیب زمینی در خوزستان جداسازی شده بود از دانشگاه صنعتی اصفهان دریافت گردید و پس از انجام آزمون بیماریزایی روی رقم حساس و اطمینان از قدرت بالای بیماریزایی آن در انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

رقم حساس مارفونا پس از استقرار و تکثیر در شرایط درون شیشه ای برای آلوده سازی توسط باکتری با استفاده از روش غوطه ور نمودن گیاهچه ها با ریشه های بریده در سوسپانسیون باکتری مورد استفاده قرار گرفت (Fock et al., 2000).

Moslemkhani et al., 2011

گیاهچه هم اندازه و هم شکل که کاملا ریشه دار

گیاهان علیه بسیاری از تنش های زنده و غیر زنده می باشد (Ekkehard, 2001, Petters et al., 2002; Kemp et al., 2005; Samuelian et al., 2004; Esposito et al., 2008; Durrant et al., 2003; Neveu et al., 2000). با استفاده از این روش امکان بررسی بیان تعداد زیادی ژن بصورت همزمان وجود دارد. در واقع روش cDNA-AFLP روشی برای انگشت نگاری RNA است که از AFLP (Vos et al., 1995) روش انگشت نگاری DNA منتج شده است (Ekkehard, 2001).

با وجود اینکه به واسطه اتصال مولکول های آداپتور به cDNA تعداد واکنش های مثبت دروغین به صورت چشمگیری در این روش کاهش می یابد (Cho et al., 2001) اما نحوه استخراج RNA و کیفیت آن و نحوه تهیه cDNA با کیفیت و کمیت مناسب و نیز بهینه سازی آزمون PCR در صحت قطعات تکثیر شده و تعداد، شدت و وضوح قطعات حقیقی می تواند بسیار تاثیر گذار باشد. در این تحقیق علاوه بر مقایسه دو روش استخراج RNA مبتنی بر استفاده از ستون و روش معمول استخراج کلرید لیتیم (Mekuria et al, 2003)، تاثیر استخراج mRNA در مقایسه با استفاده از RNA تیمار شده با آنزیم DNase و نیز فاکتورهای مختلفی که باعث افزایش کیفیت محصول cDNA-AFLP، تکرار پذیری بالای آن و ظهور کامل بندها می شود، بحث شده است.

کلروفرم - ایزوآمیل الکل (1:24:25) حذف شدند و با انجام سانتریفوژ به مدت دو دقیقه در 14000 دور در دقیقه رسوب داده شدند. فاز رویی به ویال جدید منتقل و یک دهم حجم آن استات سدیم سه مولار (با اسیدیته پنج و دو دهم) و سه برابر حجم اتانول 95 درصد افزوده گردید ترکیب حاصله به مدت 15 دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت 30 دقیقه در 15000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد پس از حذف فاز رویی رسوب با اتانول 70 درصد شستشو داده شد. در نهایت بعد از خشک شدن رسوب (به مدت نیم ساعت در 37 درجه) در 15 میکرولیتر آب فاقد RNase حل گردید.

محلول total RNA استخراج شده از طریق ستون، طبق دستورالعمل کیت استخراج mRNA کپازن مجدداً از ستون، جهت خالص سازی mRNA عبور داده شد تا حتی الامکان، DNA و RNA های ریبوزومی حذف گردند.

تهیه cDNA دو رشته ای

در مرحله بعد با استفاده از کیت سنتز First strand cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت فرمتاس نمونه cDNA تک رشته ای تهیه شد و از محصول آن جهت تهیه Second strand cDNA بصورت زیر استفاده شد:

مقدار 20 میکرولیتر محصول First strand cDNA به همراه 7/5 میکرولیتر 10x cDNA buffer ، 2/5 میکرولیتر DNA polymerase I (10u/μ) (شرکت Promega) و 1/5 میکرولیتر RNaseH

بوده و رشد رویشی مناسبی داشتند انتخاب گردید. شش گیاهچه به عنوان شاهد بدون هر گونه تیمار، شش گیاهچه دیگر به عنوان نمونه شاهد منفی که تنها با آب تیمار شدند در نظر گرفته شد و 18 گیاهچه با باکتری تیمار شدند. شش گیاهچه، دو روز پس از آلودگی، شش گیاهچه، چهار روز پس از آلودگی و شش گیاهچه، هفت روز پس از آلودگی برداشت و پس از پودر شدن در ازت مایع در 80- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

به منظور انتخاب روش مناسب برای استخراج RNA و تهیه RNA با کیفیت بالا و یکنواخت، از دو روش استخراج کلرید لیتیم (Mekuria et al, 2003) و روش استخراج مبتنی بر ستون (کیت کپازن طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده) استفاده شد. سپس در total RNA بدست آمده از روش کلرید لیتیم، واکنش حذف DNA با استفاده از آنزیم DNase انجام شد. برای این منظور حدود 10 میکروگرم total RNA، 10 میکرولیتر 10X Reaction buffer، 55 میکرولیتر آب، 10 میکرولیتر آنزیم DNase (1u/μ) و یک میکرولیتر آنزیم Ribonuclease inhibitor با هم ترکیب و به مدت نیم ساعت در 37 درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ترکیب حاصل به مدت 10 دقیقه در 65 درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از انجام واکنش، آنزیم ها با استفاده از فنل -

سانتی گراد قرار داده شد، سپس با قرار دادن به مدت دو ساعت در دمای 65 درجه سانتی گراد فعالیت آنزیمی متوقف گردید.

قبل از انجام اتصال 50 μ M از آداپتورهای *EcoRI* و *MseI* در یک چرخه حرارتی شامل: پنج دقیقه در 94 درجه سانتی گراد 10 دقیقه در 65 درجه سانتی گراد و 10 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای انجام واکنش اتصال 20 میکرولیتر از محصول هضم با 3/5 میکرولیتر بافر اتصال، 0/35 میکرولیتر آنزیم *T4/DNA ligase* (3 u/ μ) (شرکت Promega) ، یک میکرولیتر آداپتور (*EcoRI* 5 μ M) و یک میکرولیتر آداپتور (*MseI* 50 μ M) ترکیب شده و به مدت سه ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. از محصول این مرحله به عنوان الگو در مرحله پیش تکثیر در روش cDNA-AFLP استفاده شد.

بهینه سازی مرحله پیش تکثیر و تکثیر انتخابی

تکنیک cDNA-AFLP

تعداد سیکل در مرحله پیش تکثیر، میزان رقیق سازی محصول پیش تکثیر برای استفاده در مرحله تکثیر انتخابی، غلظت $MgCl_2$ و غلظت *Taq DNA Polymerase* برای بهینه سازی نتیجه در محصول نهایی cDNA-AFLP حاصل از RNA بدست آمده از دو روش مختلف بررسی گردید.

(1/5u/ μ) (شرکت Promega)، 1/25 میکرولیتر dNTP (10mM) و 46/5 میکرولیتر آب ترکیب شده و به مدت دو ساعت در 16 درجه سانتی گراد قرار داده شد. قسمتی از محصول cDNA به منظور بررسی کمی و کیفی روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد و سپس بقیه محصول به منظور حذف آنزیمها تحت تیمار فنل - کلرفرم قرار گرفت. برای این کار حجم ترکیب، به وسیله آب مقطر استریل به 100 میکرولیتر رسانیده و به میزان هم حجم فنل - کلرفرم - ایزوآمیل الکل (1:24:25) اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن کامل به مدت پنج دقیقه در 13000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز رویی جدا شده و 45 میکرولیتر استات آمونیوم 7/5 مولار و 500 میکرولیتر اتانول مطلق سرد به آن اضافه شد. ترکیب به مدت 15 دقیقه روی یخ نگهداری و در 15000 دور به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ شد تا cDNA رسوب نماید. رسوب حاصله پس از شستشو با اتانول سرد 70 درصد، به مدت نیم ساعت در 37 درجه سانتی گراد قرار داده شده تا خشک شود سپس در 20 میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

هضم و اتصال

برای انجام واکنش هضم، 20 میکرولیتر از محصول cDNA با چهار میکرولیتر بافر 10x Tango، نیم میکرولیتر آنزیم *EcoRI* و نیم میکرولیتر آنزیم *MseI* و 15 میکرولیتر آب ترکیب شده و به مدت یک شب در 37 درجه

پیش تکثیر و تکثیر انتخابی

محصول مرحله اتصال با استفاده از آغازگرهایی که توالی آدپتور را شناسایی می نمایند در واکنش PCR مرحله پیش تکثیر قرار گرفت. واکنش در حجم 25 میکرولیتر، حاوی 3 میکرولیتر از محصول مرحله اتصال با 2/5 میکرولیتر 10xPCR buffer، 1/5 میکرولیتر 25mM MgCl₂، 2/5 میکرولیتر dNTP(2mM)، 1 میکرولیتر آغازگر EcoRI (10μM) و یک میکرولیتر آغازگر MseI (10μM) (جدول 1)، 0/2 میکرولیتر Taq DNA polymerase(5u/ μl) و 13/3 میکرولیتر آب تشکیل شد سپس واکنش تحت سیکلهای دمایی 30 ثانیه در 94 درجه سانتی گراد، 60 ثانیه در 56 درجه سانتی گراد و 60 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد به تعداد 15، 20 و 25 چرخه انجام گرفت. محصول واکنش PCR پیش تکثیر در روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد.

محصول مرحله پیش تکثیر به نسبت 1:1، 1:5، 1:10، 1:20، 1:50 و 1:200 رقیق شد. 3 میکرولیتر از هر یک از آن ها با 2 میکرولیتر 10xPCR buffer، 2 میکرولیتر dNTP(2mM)، 0/8 میکرولیتر آغازگر EcoRI NN (10μM) و 0/8 میکرولیتر

آغازگر MseI +NN (10μM) و 9/2 میکرولیتر آب مقطر استریل در واکنش PCR مورد تکثیر قرار گرفت. برای بهینه سازی واکنش، غلظت های مختلفی (0/4، 0/2 و 0/1) میکرولیتر Taq DNA polymerase(5u/ μl) و 1، 2 و 3 میلی مولار MgCl₂ استفاده شد و ترکیب های مختلف تحت چرخه های دمایی ذیل قرار گرفتند.

یک چرخه شامل 30 ثانیه در 94 درجه سانتی گراد، 30 ثانیه در 65 درجه سانتی گراد، 60 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد، 12 چرخه شامل 30 ثانیه در 94 درجه، 30 ثانیه در 65 درجه که در هر چرخه 0/7 درجه سانتی گراد دما کاسته می شود و 60 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد و در نهایت 23 چرخه شامل 30 ثانیه در 94 درجه، 30 ثانیه در 56 درجه و 60 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد.

به منظور اطمینان از اینکه واکنش با موفقیت صورت گرفته، نمونه ها ابتدا در روی ژل آگاروز 3٪ الکتروفورز شدند و پس از کسب اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه ها در روی ژل اکریل امید شش درصد الکتروفورز گردیدند تا تفکیک قطعات DNA محصول PCR با دقت و وضوح بیشتری صورت گیرد.

جدول 1- آغازگر های مورد استفاده در مرحله پیش تکثیر و تکثیر انتخابی در تجزیه cDNA-AFLP واکنش سیب زمینی رقم مارفونا در برابر *Ralstonia solanacearum*

Table 1- The primers used in the pre and selective amplification in cDNA-AFLP analysis of potato plant (cv. Marfona) against *Ralstonia solanacearum*.

مرحله آزمون Experiment step	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence
مرحله پیش تکثیر	<i>EcoRI</i> +0	5´ - GACTGCGTACCAATTCA - 3´
مرحله پیش تکثیر	<i>MseI</i> +0	5´ - GATGAGTCCTGAGTAAC - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>EcoRI</i> +CT	: 5´ - GACTGCGTACCAATTCCT - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>EcoRI</i> +AC	: 5´ - GACTGCGTACCAATTCAC - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>MseI</i> +GG	5´ - GATGAGTCCTGAGTAAGG - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>MseI</i> +CC	5´ - GATGAGTCCTGAGTAACC - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>MseI</i> +CA	5´ - GATGAGTCCTGAGTAACA - 3´
مرحله تکثیر انتخابی	<i>MseI</i> +AT	5´ - GATGAGTCCTGAGTAAAT - 3´

میکرولیتر اسید استیک، 10 میکرولیتر Bind-salin و 1900 میکرولیتر اتانول مطلق است تیمار گردید. پس از گذشت 10 دقیقه که شیشه ها خشک شدند با گذاشتن Spacer ها شیشه ها روی هم قرار داده شد. پس از بستن دستگاه، ژل بین دو شیشه تزریق گردید. پس از یک ساعت که ژل بسته شد نمونه ها الکتروفورز شدند. قبل از الکتروفورز در نمونه های 5 میکرولیتری محصول PCR، دو میکرولیتر DNA sequencing stop solution (حاوی سه میکرولیتر NaOH پنج مولار، 1439 میکرولیتر فرمامید 99 درصد، 1/5 میلی گرم بروموفنل بلو، 1/5 میلی گرم زایلن سیانول و 61 میکرولیتر آب) اضافه شد. سپس نمونه ها به منظور Denature شدن به مدت چهار دقیقه در 94 درجه سانتی گراد قرار

الکتروفورز محصول cDNA-AFLP روی ژل اکریل آمید شش درصد

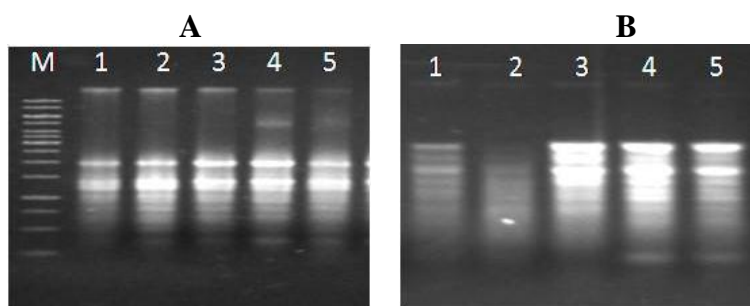
به منظور تهیه ژل پلی اکریل آمید، 70 میلی لیتر اکریل آمید شش درصد هواگیری شده و 80 میکرولیتر تمد (TEMED) و 70 میکرولیتر APS 25٪ آن افزوده شد. قبل از تزریق ژل، شیشه های دستگاه الکتروفورز عمودی (Biorad) تیمار شدند، بدین صورت که ابتدا هر دو شیشه با آب و صابون و سپس با الکل به خوبی و با دقت شسته شد و با استفاده از دستمال یا کاغذ صافی واتمن هر شیشه بطور کاملاً جداگانه خشک و تمیز شد. سپس شیشه بوسیله 300 میکرولیتر Repel تیمار گردید و جهت اتصال کامل ژل به شیشه ساده این شیشه بوسیله دو میلی لیتر ترکیب Bind-salin که حاوی 90 میکرولیتر آب، 10

دست آمده از روش استخراج مبتنی بر ستون نسبت به محصول روش کلرید لیتیم از کیفیت و یکنواختی بالاتری برخوردار است (شکل 1). روش مبتنی بر استفاده از ستون علاوه بر سرعت بالا، در حذف ممانعت کننده هایی نظیر پلی ساکاریدها، پلی فنل ها و سایر متابولیت های ثانویه که باعث کاهش کیفیت RNA می گردد (Loulakakis *et al.*, 1996) و می تواند در نسخه برداری معکوس و تهیه cDNA مشکلاتی جدی به همراه داشته باشد (Salzman *et al.*, 1999) موفق عمل نمود. در تمامی نمونه های استخراج شده به وسیله روش مبتنی بر ستون، RNA های ریبوزومی به صورت نوارهای بسیار مشخصی مشاهده می شوند که حاکی از سلامت و عدم خرد شدن نمونه های RNA است در حالیکه در برخی تکرارهای روش کلرید لیتیم، RNA از کیفیت لازم برای ساخت cDNA برخوردار نبود. در این صورت به دلیل خرد شدن زیاد RNA امکان از بین رفتن بعضی از توالی های سایت برشی و ایجاد خطا در آزمایشات به میزان زیادی افزایش می یابد (Tattersall *et al.*, 2005). استخراج total RNA با کیفیت بالا در موفقیت روشهای مولکولی مطالعه پروفایل بیان ژنها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. بنابراین ایجاد تمهیدات لازم برای مقابله با تجزیه سریع RNA بوسیله ریبونوکلازها گام مهم و ضروری است. تسریع در مراحل استخراج به میزان زیادی مانع از خرد شدن RNA می شود (Sambrook *et al.*, 1989).

گرفته و سریعاً به یخ منتقل و در 80 وات و دمای 55 درجه سانتی گراد در بافر TBE1x به مدت دو ساعت الکتروفورز شدند. پس از اتمام زمان مذکور، دو شیشه از هم باز شده و شیشه حاوی ژل به مدت 10 دقیقه در محلول فیکس (یک لیتر حاوی 100 میلی لیتر اتانول و 10 میلی لیتر اسید استیک) قرار گرفت پس از یک دقیقه شستشو به مدت سه دقیقه در محلول پیش تیمار (یک لیتر حاوی 15 میلی لیتر اسید نیتریک) قرار گرفت. پس از یک دقیقه شستشو، شیشه حاوی ژل، 20 دقیقه در محلول نیترات نقره 0/2٪ قرار گرفت و سپس دو بار به مدت 30 ثانیه با آب مقطر شستشو شد. سپس ژل دو بار هر بار به مدت 10 دقیقه در محلول ظهور (یک لیتر حاوی 30 گرم کربنات سدیم و 540 میکرولیتر فرمالدئید) قرار گرفت. پس از ظهور کامل بند های DNA، ژل به مدت پنج دقیقه در محلول Stop (یک لیتر حاوی 50 میلی لیتر اسید استیک) قرار گرفت (Abrinbana *et al.*, 2010). پس از خشک شدن ژل و تهیه عکس، تعداد بند های ظاهر شده و شدت وضوح آنها در شرایط مختلف آزمون بررسی و مقایسه شد.

نتایج و بحث

پارامتر های متعددی در بهبود نتایج cDNA-AFLP تاثیر گذار است. استخراج RNA با کیفیت بالا به عنوان اولین گام در اجرای صحیح این آزمون مطرح است. در بررسی صورت گرفته مشخص شد محصول RNA به

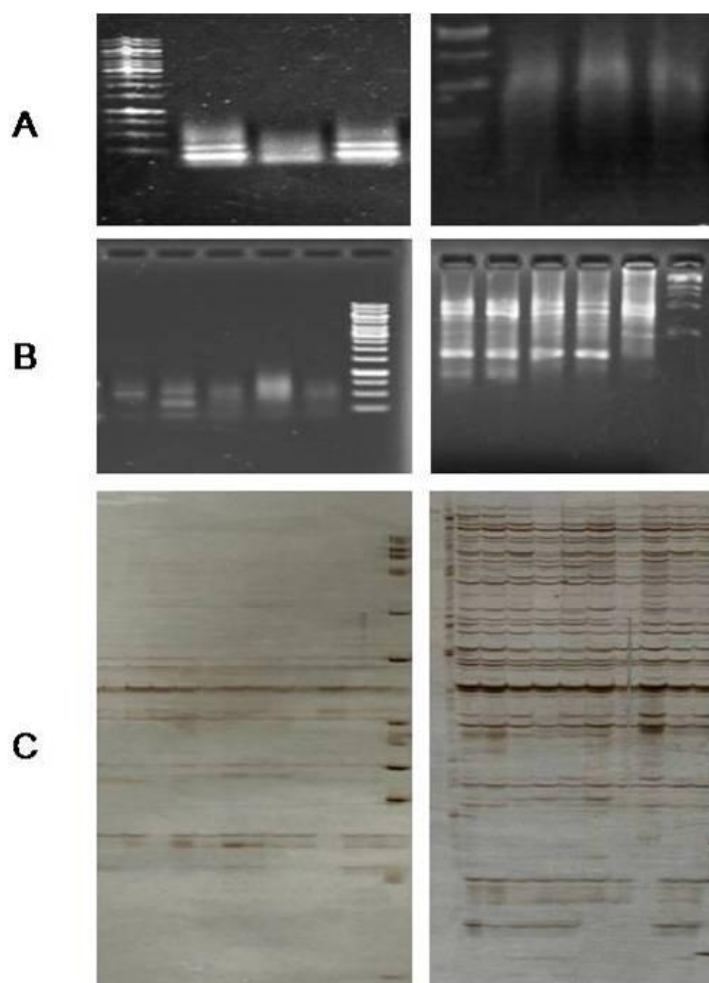


شکل 1- RNA های استخراج شده از گیاهچه های آلوده شده (نوارهای 1-4) و نشده (نوار 5) سیب زمینی با باکتری *Ralstonia solanacearum* با استفاده از روش استخراج مبتنی بر ستون (A) و روش استخراج کلرید لیتیم (B).

Figure 1- Extracted RNA from infected (lane 1 to 4) and not infected (lane 5) potato plantlets by *Ralstonia solanacearum*, Using column based method (A) or Lithium chloride method (B).

RNA ریپوزومی باشد (شکل 2) احتمالاً دلیل اصلی کاهش بندها، از دست رفتن برخی RNA ها در مراحل متعدد این روش خصوصاً در مرحله تیمار با فنل- کلروفرم می باشد. علاوه بر این حجم بالای ممانعت کننده ها در نمونه RNA با استفاده از روش کلرید لیتیم اشکالاتی در سنتز cDNA و PCR ایجاد می نماید (Salzman *et al.*, 1999; Tattersall *et al.*, 2005) mRNA تهیه cDNA از آن باعث کاهش حجم ممانعت کننده ها و عدم ایجاد اختلال در مراحل بعدی آزمایش و اجتناب از هضم غیر اختصاصی cDNA می گردد (Bachem *et al.*, 1998) و در نهایت موجب می شود که نتایج cDNA-AFLP از صحت بالاتری برخوردار باشند.

DNA موجود در total RNA باعث ایجاد باندهای کاذب در پروفایل بیان ژنها می گردد برای حذف آن ها به دو طریق تیمار total RNA با آنزیم DNase و استخراج mRNA از total RNA عمل شد. در روش دوم علاوه بر حذف DNA، تاحد زیادی RNA های ریپوزومی نیز حذف شدند و نتایج نهایی cDNA-AFLP نشان داد که در روش اول یعنی استخراج total RNA با کلرید لیتیم و تیمار DNase تعداد کل بندهای مشاهده شده در پروفایل ژنهای بیان شده نسبت به زمانی که از روش استخراج بر پایه ستون و در پی آن استخراج mRNA استفاده شده کمتر می باشد. علاوه بر آن برخی بندهای جدید نیز مشاهده می گردد که ممکن است مربوط به



شکل 2- محصول مرحله پیش تکثیر (A) و cDNA-AFLP بر روی ژل آگاروز سه درصد (B) و بر روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد (C) ژل های سمت راست مربوط به محصول بدست آمده از RNA های استخراج شده بوسیله کیت های استخراج total RNA و mRNA تهیه شده با استفاده از ستون و ژل های سمت چپ مربوط به محصول بدست آمده از RNA استخراج شده با روش کلرید لیتیم و تیمار DNase بدون جدا سازی mRNA می باشد.

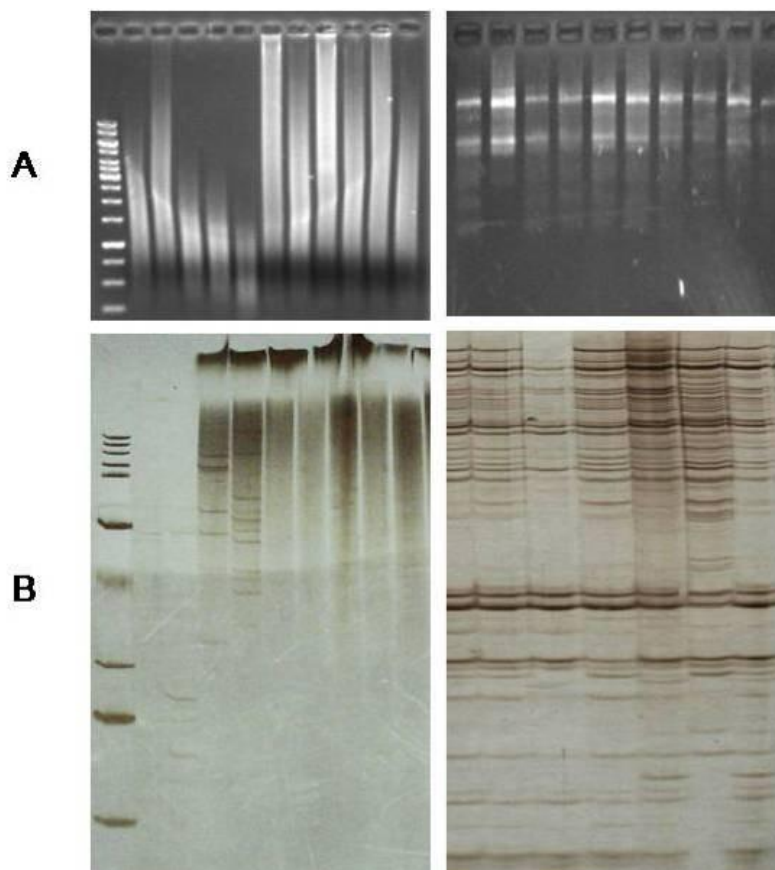
Figure 2- Pre-amplification (A) and cDNA-AFLP products on 3% agarose gel (B) and on 6% acrylamid gel (C). Products obtained from pictures belong to extracted RNA followed by mRNA isolation, using column based kit (right) or obtained from extracted total RNA using lithium chloride and DNase treatment (left).

در واکنش PCR مرحله تکثیر انتخابی فاکتورهای متعددی از جمله کیفیت و میزان الگو مورد استفاده، ترکیبات آغازگری، کنترل ممانعت کننده ها و اجتناب از آلودگیهای محیط کار و همچنین بهینه سازی غلظت و کیفیت ترکیبات PCR، تعداد و نوع سیکلهای دمایی در بهبود حساسیت و دقت نتایج این روش تاثیر گذار است (Kennedy & Oswald, 2011, Bachem *et al.*, 1998).

در مجموع cDNA-AFLP به عنوان روش مناسبی برای بررسی وسیع تغییرات بیان ژن ها در سطح ترانسکریپتوم در تعامل سیب زمینی با باکتری *R. solanacearum* معرفی می شود و نتایج حاصل از آن اطلاعات زیادی در ارتباط با مکانیسم های مولکولی در شرایط حساسیت و مقاومت فراهم می نماید. در این تحقیق با مطالعه بیان افتراقی ژن های سیستم دفاعی، الگو های متفاوتی از cDNA-AFLP در تعامل سیب زمینی با باکتری *R. solanacearum* مشاهده شد. البته در صحت و دقت نتایج حاصل از این تکنیک فاکتورهای متعددی از جمله کیفیت و کمیت RNA و cDNA مورد استفاده و همچنین شرایط آزمون های PCR دخالت دارند که در صورت عدم توجه، نتایج بدست آمده با اشکالات متعددی همراه خواهد بود.

به منظور بررسی اولیه نتایج تکثیر انتخابی قبل از انتقال آنها به روی ژل پلی اکریل آمید، محصولات روی ژل آگاروز سه درصد الکتروفورز شدند قبل از بهینه سازی تکنیک، محصول cDNA-AFLP بصورت اسمیر از داخل چاهک مشاهده گردید. با انتقال این نمونه ها به روی ژل پلی اکریل آمید همچنان اسمیر با حداقل میزان بند DNA و یا بدون وجود بند DNA خاص مشاهده شد (شکل 3).

پس از اطمینان از صحت اجرای مراحل استخراج RNA، سنتز cDNA و هضم و اتصال، بهینه سازی دو مرحله پیش تکثیر و تکثیر انتخابی از طریق انتخاب سطح بهینه فاکتور های متعددی از جمله غلظت ترکیبات موجود در واکنش PCR، تعداد سیکلهای PCR و غلظت الگوی مرحله تکثیر انتخابی انجام شد. نتایج نشان داد زمانیکه محصول مرحله اتصال رقیق نشود می توان تعداد سیکلهای PCR را به 15 سیکل و میزان رقت محصول مرحله پیش تکثیر را به یک پنجاهم کاهش داد. با استفاده از این محصول پیش تکثیر بعنوان الگو در مرحله تکثیر انتخابی و غلظت $MgCl_2$ 2mM، اسمیر به میزان زیادی حذف و بندهای cDNA ظاهر شدند (شکل 3).



شکل 3- محصول cDNA-AFLP بر روی ژل آگاروز سه درصد (A) و ژل پلی اکریل آمید شش درصد (B) مشاهده اسمیر زیاد قبل از بهینه سازی روش (سمت چپ) و حذف اسمیر و ظهور باندها بعد از بهینه سازی تکنیک (سمت راست).

Fig. 3. cDNA-AFLP products on 3% agarose gel and 6% acrylamid gel. Observation of smear before optimization (left) and observation of eliminated smears after optimization (right).

منابع

- Abrinbana M, Mozafari J, Shams-bakhsh M, Mehrabi R (2010). Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology* 59: 829–838
- Bachem CW B, Oomen R J F, Visser R (1998). Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A step by step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 157- 173.
- Breyne P, Zabeau M (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 136–142.
- Cho YJ, Meade JD, Walden JC, Chen X, Guo Z, Liang P (2001). Multicolor fluorescent differential display. *BioTechniques* 30: 562–572.
- Chunsheng X, Shu-qin X, Guo-ying W, Jie N, Ke Z (2005). cDNA-AFLP reveals differential gene expression profiles of maize inbred line-Huang-zaosi induced by Sugarcane mosaic virus-Beijing isolate. *Acta Phytopathologica sinica* 3:6-12.

- Cooper B (2001). Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant Journal* 26: 339–349.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025-30.
- Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones JD (2000). cDNA-AFLP reveal a striking overlap in race specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977.
- Ekkehard K (2001). From library screening to microarray technology: Strategies to determine gene expression profile and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* 87: 139-155.
- Esposito N, Ovchinnikova OG, Barone A, Zoina A, Holst O, Evidente A (2008). Host and non host plant response to Bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant pathogen interaction. *Chemistry and Biodiversity* 5: 2662-2675.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon MC, Petitot AS, Maria C (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5: 527-36.
- Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise, A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D (2000). Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum Phureja*. *Plant Science* 160: 165-175.
- Fukumura R, Takahashi H, Saito T, Tsutsumi Y, Fujimori A, Sato S, Tatsumi K, Araki R, Abe M (2003). A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res* 31: 94.
- Kemp B, Beeching J, Cooper R (2005). cDNA-AFLP reveals genes differentially expressed during the hypersensitive response of cassava. *Molecular Plant Pathology* 6: 113–23.
- Kennedy S, Oswald N (2011). PCR Troubleshooting and Optimization. Caister Academic Press. Norfolk, UK.
- Kivioja T, Arvas M, Saloheimo M, Penttil, M and Ukkonen, E (2005). Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. *Bioinformatics* 21: 2573-2579.
- Liang P, Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis, KA, Kanellis AK (1996). Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47:181-185.
- Mekuria G, Ramesh SA, Alberts E, Bertozzi T, Wirthensohn M, Collins G, Sedgley M (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and Prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods* 114: 65–69.
- Moslemkhani, C., Mozafari, J., Alizadeh, A., Shamsbakhsh, M. and Mohamadi Goltapeh, E. 2011. Evaluation of potato cultivars for resistance to *Ralstonia solanacearum* under in vitro and green house conditions. *Seed Plant Improvement Journal*. 26(4):501-515.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- Neveu C, Jaubert S, Abad P, Castagnone-Sereno P (2003). A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines encode secreted proteins. *Molecular Plant–Microbe Interaction* 16: 1077–1084.

- Petter J, Gubel C, Scheel D, Rosahl S (2002). A pathogen responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation induced phosphatase. *Plant Cell Physiology* 43: 1049-1053.
- Ros B, Tummler F, Wenzel G (2004). Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans*. *Infect Molecular Plant Pathology* 5: 191-201.
- Russo P, Slack SA (1998). Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus resistance transgenic potato plants. *Phytopathology* 88: 437-441.
- Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reports* 17: 11-17.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Samuelian S, Kleine M, Puyter-Spira CP, Klein-Lankhorst RM, Jung C (2004). Cloning and functional analysis of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection. *Plant Molecular Biology* 10: 1-10.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000). Coordinated plant defence responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 11655–11660.
- Tattersall E, Ergul A, AlKayal F, DeLuc L, Cushman C, Cramer GR (2005). Comparison of Methods for Isolating High-Quality RNA from Leaves of Grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 400-406
- Vos P, Hogers R, Bleeker M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D. and McClelland M (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 20: 4965– 4970.

Effects of various parameters influencing the quality of results in a cDNA-AFLP technique used for transcriptom analysis of potato

Moslemkhani C.*¹, Mozafari J.²

¹ Seed and Plant Certification and Registration Institute. Karaj, Iran

² Department of Plant Genetics and National Plant Gene-bank, Seed and Plant Improvement Institute, Fahmideh St, Karaj, Iran

Transcriptome analysis reveals novel insights in the plant responses against biotic and abiotic stresses. cDNA-AFLP is appropriate and repeatable method for genome wide expression analysis when genomic information is limited. Although several factors may affect sensitivity, accuracy and repeatability of cDNA-AFLP technique so attention to these factors increases quality of results. In this study cDNA-AFLP technique was optimized for analysis of potato against *Ralstonia solanacearum* under *in vitro* conditions through examining various factors and their interactions, that affecting the results of such analysis. Results showed that RNA extraction method and the use of mRNA has large effects on the reliability of results. RNAs extracted based on using a purification column were monotonous. Ribosomal RNA and inhibitors alleviated by mRNA extraction, Also optimization of factors such as concentrations of template RNA, MgCl₂ and *Taq* DNA polymerase, in pre and selective amplification has significant effects on number, clarity and concentration of amplified cDNA fragments.

Key words: gene expression, transcriptome, cDNA-AFLP, potato.

