

ساخت و تکثیر cDNA از mRNA ژن رمز گردان آنزیم P5CS گیاه *Arabidopsis thaliana*

علیرضا عباسی^۱، فردوس رستگار جزی^۲، بهمن یزدی صمدی^۳ و اشرف‌الدین سخن سخج^۴
۱، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهران
۳، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ۲، ۴، استادیاران مرکز ملی مهندسی ژنتیک
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۱/۳۰

چکیده

گیاهان وقتی در معرض خشکی و شوری قرار می‌گیرند با تنش اسمزی مواجه می‌شوند که برای مقابله با تنش اسمزی ایجاد شده تجمع اسمولیت‌هایی همچون پرولین، گلیسین بتانین و یا سایر ترکیبات مشابه را افزایش می‌دهند. در مسیر بیوستز این اسمولیت‌ها آنزیم‌هایی دخالت دارند که بعضی از آنها کلیدی به حساب می‌آیند و با تغییر در تظاهر ژن‌هایی که این آنزیم‌ها را کد می‌کنند می‌توان فراورده نهایی که اسمولیت مورد نظر میباشد را افزایش داد. این تحقیق بر روی آنزیم دلتا-۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) که یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوستز پرولین میباشد، انجام شد. ابتدا اقدام به ساخت cDNA از روی mRNA حاصل از گیاه آرآیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) گردید. برای اینکار RNA کل از برگ‌های گیاه آرآیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)، که در معرض تنش شوری قرار گرفته بود، استخراج گردید و سپس با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس اقدام به ساخت DNA مکمل شد و کل mRNA به cDNA تبدیل گردید و با دو جفت آغازگر اختصاصی به طول‌های ۲۷ و ۳۵ نوکلئوتید، و به کمک دستگاه ترموسایکلر، cDNA مربوط به آنزیم P5CS دو رشته‌ای گردید و تکثیر شد. برای جفت پرایمر به ترتیب در انتهای 5، مکان برشی برای آنزیم‌های *EcoRI* و *BamHI* در نظر گرفته شد تا در همسانه سازی cDNA تکثیر شده مشکلی وجود نداشته باشد. سپس با استفاده از پروب صحت انجام کار به تأیید رسید.

واژه‌های کلیدی: cDNA، mRNA، P5CS، آرآیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)،

پرولین

مقدمه

که محدود کننده رشد می‌باشند. یکی از راهکارهای مقابله با عوامل محدود کننده، ایجاد گیاهان متحمل در برابر این عوامل می‌باشد. بهبود صفات تحمل به خشکی و شوری به دلیل اینکه این نوع صفات، صفات کمی هستند و با تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند، از طریق اصلاح نباتات کلاسیک با مشکلاتی همراه بوده است که بخشی از این مشکلات با به‌کارگیری روش‌های مولکولی جدید مرتفع می‌گردد (۸، ۱۰، ۱۶).

در حال حاضر بیش از ۱۳٪ زمین‌های زیر کشت در جهان و ۳۰ تا ۵۰٪ زمین‌های تحت آبیاری در دنیا با مشکل شوری روبرو هستند (۸، ۱۰، ۱۶). خشکی هوا و کمبود نزولات آسمانی باعث

جمعیت ساکن کره زمین در حال حاضر ۶ میلیارد نفر می‌باشد که با رشد ۱/۷ درصد در حال افزایش است. برای تأمین غذای مورد نیاز جمعیت در حال افزایش کره زمین، سطح زیر کشت و عملکرد در واحد سطح را باید بالا برد و از ضایعات و تلفات محصولات کشاورزی نیز باید جلوگیری کرد. لازم به ذکر است که در مورد اول محدودیت‌های فراوانی وجود دارد. که یکی از آن محدودیت‌ها ثابت بودن سطح زیر کشت است.

گیاهان در طول دوره رشد با انواع مختلفی از تنش‌ها مواجه می‌باشند که خشکی و شوری نیز از جمله این تنش‌ها هستند

Delauney & Hu در سال (۱۹۹۲) با استفاده از روش نورترن بلات (Northern blot) مشخص کردند که آنزیم P5CS در اثر تیمار گیاه Vigna با ۲۰۰ میلی مولار نمک تحریک شده است. سپس Yoshiba و همکاران در سال ۱۹۹۵ فراوانی رونوشت mRNA ژن P5CS را در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) در اثر تنش خشکی و شوری گزارش و پیشنهاد کردند که P5CS یک تنظیم کننده اسمزی است. آنها در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که تولید بیش از حد پرولین در گیاهان منجر به افزایش تحمل اسمزی می شود. Yoshiba & Nanja در سال ۱۹۹۸ برای اثبات نقش پرولین، گیاه تراریختی با آنتی سنس cDNA (Anti sense cDNA) ژن P5CS تولید کردند که در آن تجمع پائین پرولین دلیلی بر نقش کلیدی P5CS در تولید پرولین تشخیص داده شد.

با نگاهی بر تحقیقات انجام شده و نقش پرولین در ایجاد تحمل بالاتر در برابر تنش اسمزی و نقش کلیدی آنزیم P5CS در مسیر بیوسنتز پرولین می توان نتیجه گرفت که با ایجاد گیاهان تراریخت حامل ژن کد کننده آنزیم P5CS می توان به گیاهانی دست یافت که تجمع پرولین بالاتری دارند و به دنبال آن تحمل بالاتری نسبت به تنش اسمزی از خود نشان می دهند.

هدف از این بررسی جدا کردن rRNA کل از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا *Arabidopsis thaliana* و ساختن cDNAی مکمل از روی آن و سپس جدا و تکثیر کردن cDNAی مربوط به آنزیم P5CS بوده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذر آرابیدوپسیس تالیانا رقم کلومبیا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۳۰ درصد وایتکس تجاری (هیپوکلریت سدیم ۰/۲۵٪) و ۰/۰۳٪ درصد تریتون ۱۰۰-X ضد عفونی گردید و سپس ۶ مرتبه در آب مقطر استریل شستشو داده شد، بذره‌های ضد عفونی شده در محیط کشت MS جامد، ۱/۲ غلظت معمول، حاوی ۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی مولار نمک NaCl کشت داده شد. به منظور جوانه زنی یکنواخت، محیطهای حاوی بذر ضد عفونی شده به مدت یک روز در ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس به محیط رشد مناسب انتقال یافتند.

افزایش املاح موجود در خاک می شود که در اثر آن زمینهای حاصلخیز به زمینهای کم بازده تبدیل می شود. با گذشت زمان این زمینها به علت املاح زیاد به زمینهایی تبدیل می شوند که گیاهان قادر به رشد مطلوب در آنها نیستند.

در حدود ۹۰٪ انواع محصولات زراعی به نوعی با شرایط نا مساعد محیطی روبرو هستند (۸، ۱۰، ۱۶)، این شرایط نامساعد محیطی به حدی بر رشد تأثیر می گذارد که در حدود ۶۹/۱٪ از عملکرد گیاه توسط مجموعه این عوامل کاهش می یابد (۸، ۱۰، ۱۶). تنشهای محیطی و از جمله خشکی و شوری مشکلات جدی برای افزایش سطح زیر کشت و عملکرد در واحد سطح محسوب می گردند و به این جهت برای افزایش تولید لازم است به این دو تنش توجه کافی مبذول گردد.

گیاهان در برابر تنشهای متعددی که به آنها وارد می شود از خود واکنش نشان می دهند تا آثار محدود کننده این تنشها را خنثی نموده یا از آن بکاهند. یکی از واکنشهایی که گیاه اعمال می کند واکنشهای متابولیکی است و یکی از بهترین آنها تجمع اسمولیتهای آلی می باشد (۸، ۱۰، ۱۶). در اغلب اوقات اسمولیت آلی را پرولین تشکیل می دهد (۷).

Csonka معتقد بوده است که در گیاهان تجمع پرولین می تواند یک نقش مستقیم در خنثی کردن تنش اسمزی داشته باشد. پرولین غشاها و پروتئینها را در برابر آثار مختلف غلظتهای بالای یونهای معدنی و دماهای بالا محافظت می کند و به عنوان یک پاک کننده رادیکالهای هیدروکسیل عمل می نماید (۷، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۱). تنش اسمزی بیوسنتز پرولین را افزایش می دهد و این افزایش بواسطه تحریک کردن یا فعال کردن آنزیمهایی است که در مسیر بیوسنتز پرولین دخالت دارند (۷، ۹، ۱۱، ۱۴).

در مسیر اصلی بیوسنتز پرولین در گیاهان، L - گلوتامیک اسید با آنزیم P5CS به گلوتامیک ۵- سمی آلدئید تبدیل می شود که پس از تبدیل به دلتا ۱- پرولین ۵- کربوکسیلات به کمک آنزیم P5CR به L - پرولین تبدیل می شود (۵، ۶).

اولین آنزیمی که در مسیر بیو سنتز پرولین نقش کلیدی دارد آنزیم P5CS می باشد (۵). جدا سازی و خالص سازی ژن P5CS و انتقال آن به گیاه باعث افزایش پرولین می گردد و تحمل گیاه را نسبت به تنش اسمزی بالا می برد (۵، ۶، ۷).

آنزیمهایی که فاقد مکان برشی در توالی بودند، دو مکان برشی *EcoRI* و *BamHI* برای پرایمرهای اختصاصی در نظر گرفته شد. با استفاده از توالی mRNA ژن P5CS و مکانهای برشی دو آنزیم فوق دو پرایمر زیر به عنوان بهترین پرایمرهای ممکن برای انجام تکثیر قطعه ژن مورد نظر انتخاب شدند.

F : 5 GGGGATCCCTGATATTTATTTTCTTACCT 3

R : 5 CGGAATTCGCTAATTAATGTTCTTCATC 3

همچنین دو پرایمر اختصاصی دیگر برای ژن تیوبولین بعنوان استاندارد درونی انتخاب شدند و از آنها به عنوان کنترل مثبت در آزمایش استفاده گردید.

با دادن توالی mRNA ژن P5CS به رایانه میزان همولوژی این ژن با ژنهای دیگر موجودات بدست آمد که این کار برای تهیه پروب ضروری بود. از این راه ژنی در گیاه *Moth Bean* که نوعی لوبیا می باشد یافت گردید که ۷۵٪ همولوژی با ژن مورد نظر ما داشت که از آن به عنوان پروب استفاده شد. این ژن از پروفیسور ورما (Prof. Verma) از دانشگاه Ohio دریافت گردید.

با استفاده از کلرید کلسیم سرد از باکتریهای *E.coli.DH5α* سلولهای توانا (Competent Cell) تهیه گردید و پلاسمید حاوی قطعه دریافت شده به باکتری *E.coli.DH5α* انتقال داده شد (۱۸) و باکتریهای تراریخت شده به کمک عامل انتخاب، کانامایسین، جدا گردیدند. با استفاده از روش Mini-prep پلاسمید مورد نظر که حاوی قطعه دریافت شده بود از باکتریهای تراریخت شده استخراج گردید (۱۸). از طریق هضم آنزیم پلاسمید استخراج شده، قطعه مورد نظر جدا گردید و سپس از قطعه جدا شده نشانگر مورد نظر تهیه گردید. تهیه نشانگر با استفاده از روش Dig DNA Labeling صورت گرفت. با لکه گذاری نقطه‌ای (Dot Blotting) و انجام عمل هیبریداسیون cDNA مکمل ساخته شده با پروب تهیه شده و ژن تیوبولین بعنوان کنترل، صحت ساخت cDNA به تأیید رسید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

برای انجام این واکنش از دو آنزیم PwoDNA Polymerase و TaqDNA Polymerase استفاده به عمل آمد. ۴۰ پیکو مول از هر یک از آغازگرهای اختصاصی F و R برای دو ژن P5CS و تیوبولین و ۱۰۰ پیکو مول از cDNA تک رشته‌ای

گیاهچه‌های ۲۰ روزه از محیط جدا شدند و سپس محیط اطراف ریشه شسته شد، ریشه و ساقه گیاهچه‌ها از هم جدا گردیدند و پس از منجمد کردن آنها در ازلت مایع به طور جدا گانه در ۷۰ °C- نگهداری شدند.

استخراج RNA

یک گرم برگ گیاه آرابیدوپسیس تالیانا که در ۷۰ °C- نگهداری شده بود برداشته شد و با استفاده از ازلت مایع در هاون چینی پودر گردید و با روش پیشنهادی Lessard و همکاران (۱۹۹۳) RNA کل از بافت گیاه استخراج شد (۱۲). از جمله مواردی که در استخراج RNA خیلی اهمیت دارد توجه به آنزیم RNase است. این آنزیم مولکول RNA را به طریق آندونوکلئازی و اگزونوکلئازی تخریب می کند. برای جلوگیری از فعالیت آنزیم RNase از بازدارنده‌های فعالیت ریبونوکلئازها استفاده به عمل آمد (۳، ۴، ۷، ۱۵). از جمله بازدارنده‌های فعالیت ریبونوکلئازها که در این تحقیق از آنها استفاده شد می توان به گوانیدین تیوسیانات، لیتیم کلراید، فنل، هیدروکسی کوبونولین و DEPC اشاره کرد. بعد از استخراج RNA کل با استفاده از اسپکتروفتومتر کمیت و کیفیت RNA استخراج شده تعیین گردید (۱۰، ۱۵).

ساخت cDNA مکمل

RNA استخراج شده در مرحله قبل حاوی mRNA و tRNA و rRNA می باشد با توجه به اینکه یکی از خصوصیات mRNA داشتن پایانه پلی A می باشد از این خصوصیت استفاده گردید و با استفاده از آغازگر الیگو (dT) و آنزیمهای رونویسی معکوس، از RNA استخراج شده بافت گیاهی و در دمای مناسب فعالیت آنزیمهای رونویسی معکوس، cDNA مکمل (cDNA) تک رشته‌ای ساخته شد. در این مرحله نیز از بازدارنده‌های فعالیت ریبونوکلئازی که در مرحله استخراج به کار برده شد استفاده به عمل آمد که از مهمترین بازدارنده‌ها در این مرحله RNase inhibitor می باشد.

بررسی رایانه ای

توالی mRNA ژن P5CS از بانک ژنی گرفته شد و سپس نوع آنزیمهایی که در این توالی دارای مکان برشی بودند و آنهایی که فاقد مکان برشی در این توالی بودند مشخص گردید. با آگاهی از مکان برشی آنزیمهای پلاسمید pBI121 و

استخراج RNA

نتایج بدست آمده از کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش‌های چامسینسکی^۱ و نیز با روش لیسارد^۲ نشان داد که برای استخراج از بافت‌های گیاهی روش لیسارد روش مناسب‌تری می‌باشد. (جدول ۱)

جدول ۱- کیفیت و کمیت RNA استخراج شده روش های

چامسینسکی و لیسارد

روش استخراج	کمیت RNA =			ضریب رقت $\times 40 \times A260$
	A260	A280	A260/A280	
لیسارد	۰/۲۱۷	۰/۱۱۳۶	۱/۹۱	۲/۴۶ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
چامسینسکی	۰/۱۷۴	۰/۱۰۵	۱/۶۵	۱/۳۰۲ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

با توجه به برتری روش لیسارد نسبت به روش چامسینسکی به لحاظ کیفی و کمی بنابراین برای استخراج RNA گیاهی که ماندگاری مناسبی نیز داشته باشد از روش لیسارد استفاده گردید.

بعد از استخراج RNA جهت تأیید صحت استخراج RNA روش‌های متعددی وجود دارد که یکی از این روش‌ها الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز می‌باشد به دلیل اینکه RNA استخراج شده حاوی tRNA ، rRNA و m RNA می‌باشد و به دلیل اینکه مقدار rRNA در سلول بسیار زیاد است و حدود ۸۵ درصد کل RNA را تشکیل می‌دهد و میزان m RNA بسیار پایین می‌باشد به طوری که حدود کمتر از ۵ درصد RNA کل را تشکیل می‌دهد بنابراین وجود باندهای rRNA ۱۸ S و rRNA ۲۸ S را می‌توان دلیلی بر صحت استخراج RNA دانست .

شکل ۲ استخراج RNA به روش لیسارد را نشان می‌دهد که نواحی قابل تفکیک مربوط به rRNA ۱۸ S و rRNA ۲۸ S می‌باشد و کشیدگی بین دو باند rRNA ۱۸ S و rRNA ۲۸ S و بالا و پایین این دو باند مربوط به m RNA می‌باشد. به دلیل اینکه از m RNA استخراج شده باید در مراحل بعدی کار در دماهای بالا ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد

ساخته شده مورد استفاده واقع شد. گلیسرول ۱۰٪ و مخلوط نوکلئوتیدها به غلظت نهایی ۰/۴ میلی مولار و کلرید منیزیم با غلظت ۱/۷ میلی مولار به کار برده شد. با بررسیهایی که برای یافتن دمای ذوب (Tm) مناسب به عمل آمد با استفاده از فرمولهای مختلفی که برای تخمین دمای ذوب مناسب وجود داشت، درجه حرارت مناسب برای اتصال اولیه 57°C تعیین شد (۱، ۳، ۱۳، ۱۷، ۲۳). مخلوط واکنش آماده شده برای تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Perkins Elmer) قرار گرفت. مشخصات واکنش به شرح زیر است:

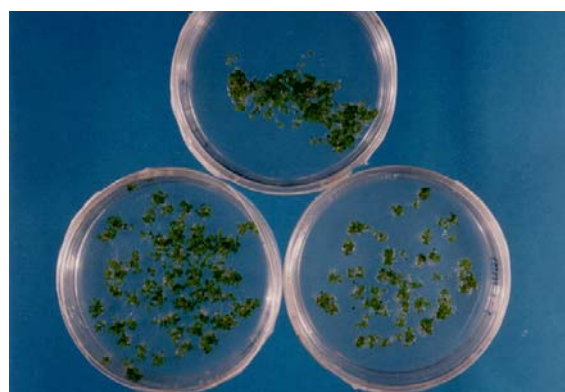
قسمت اول شامل 94°C به مدت ۲ دقیقه جهت تک رشته‌ای کردن قطعه DNA .

قسمت دوم ۱۴ مرتبه : 94°C به مدت یک دقیقه، 51°C به مدت یک دقیقه برای اتصال آغازگرها به رشته cDNA و در هر مرتبه 5°C به این دما اضافه گردید ، 72°C به مدت ۲/۵ دقیقه برای بسط ساخت قطعه مکمل .

قسمت سوم ۲۰ مرتبه شامل : 94°C به مدت یک دقیقه ، 57°C به مدت یک دقیقه و 72°C به مدت ۲/۵ دقیقه و در هر مرتبه ۵ ثانیه به زمان بسط اضافه گردید . قسمت چهارم: 72°C به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل بسط.

نتایج و بحث

وضعیت کشت گیاه : گیاهانی که در سه محیط حاوی ۰ ، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نمک کشت داده شدند در شکل (۱) دیده می شوند . همانطور که از شکل (۱) مشخص است گیاهان در محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک رشد ضعیف تری نسبت به محیط عاری از نمک نشان دادند (شکل ۱)

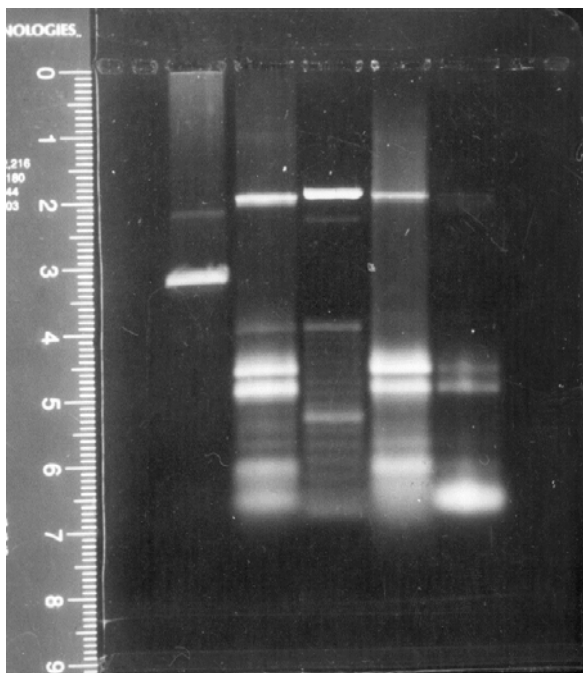


شکل ۱- نتایج گیاهان رشد یافته در غلظتهای مختلف نمک NaCl

A - صفر میلی مولار B - ۵۰ میلی مولار C - ۱۰۰ میلی مولار

1. Chomezynski
2. Lessard

استفاده می‌گردید برنامه بلاست (BLAST) می‌باشد. توالی mRNA ژن P5CS به برنامه موجود در رایانه داده شد و سپس میزان همولوژی این ژن با ژنهای دیگر موجودات به دست آمد. این کار برای تهیه پروب ضروری است. از این راه ژنی در گیاه Moth Bean که نوعی لوبیا می‌باشد یافت گردید که ۷۵٪ همولوژی با ژن مورد نظر ما را داشت که از آن به عنوان پروب استفاده شد. سپس با تعیین ژن مورد نظر این ژن از پروفوسور ورما (Prof. Verma) از دانشگاه Ohio دریافت گردید.



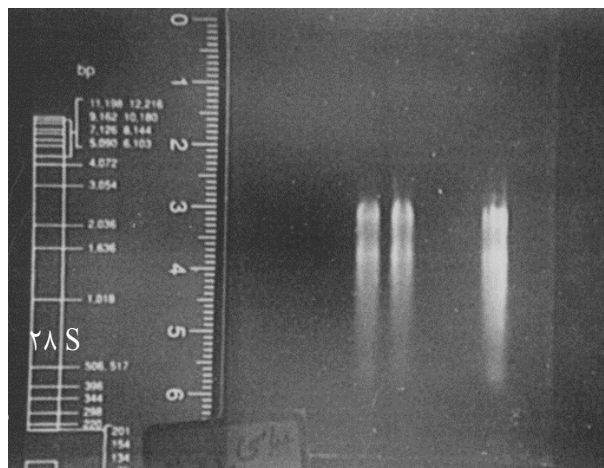
شکل ۳- نتایج الکتروفورزی محصول PCR ژنهای تیوبولین و P5CS

- ۱- الکتروفورزی محصول PCR ژن تیوبولین
- ۲- الکتروفورزی محصول PCR ژن P5CS
- ۳- نشانگر XIII (50- 2642 bp)
- ۴- الکتروفورزی محصول PCR ژن P5CS
- ۵- الکتروفورزی محصول PCR ژن P5CS

نتایج بلاست ژن P5CS و ژنهای سایر موجودات و همچنین گیاه آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) در شکل (۴) داده شده است. با استفاده از این نتایج یکی از این موارد که ۷۵٪ همولوژی با ژن P5CS داشت به عنوان پروب مورد استفاده واقع شد.

استفاده می‌گردید و همچنین mRNA بدست آمده باید نگهداری می‌شد تا در مراحل بعدی استفاده گردد بنابراین جهت تایید ماندگاری در دمای بالا و زمان طولانی در ۶۵ درجه سانتیگراد و در دمای اتاق تیمار گردید.

۱ ۲ ۳



شکل ۲- نتایج الکتروفورزی استخراج RNA گیاهی

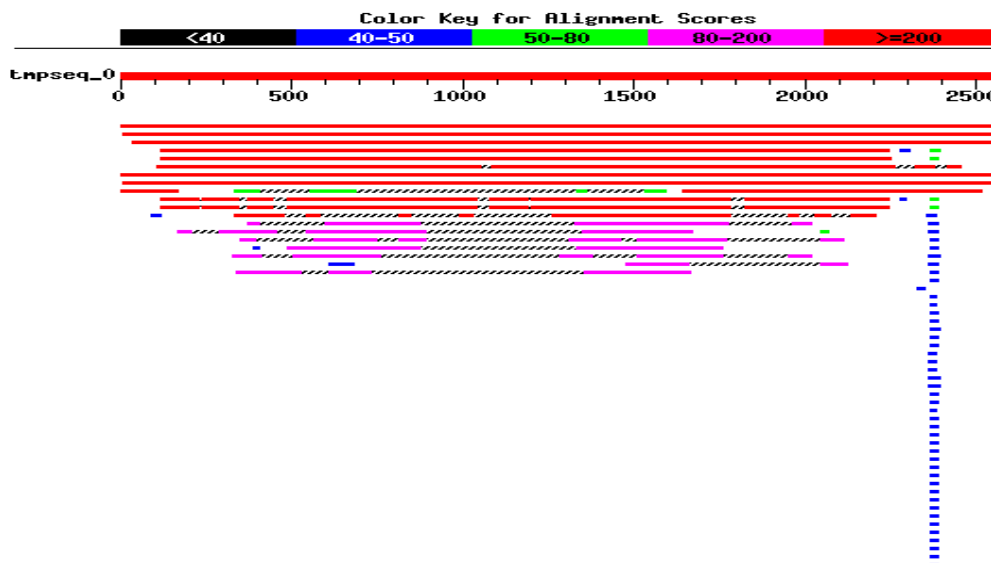
به روش لیسارد

- ۱- الکتروفورزی RNA استخراج شده از بافت گیاهی
- ۲- الکتروفورزی RNA استخراج شده که به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ تیمار شده است.
- ۳- الکتروفورزی RNA استخراج شده که به مدت یک روز در دمای اتاق قرار گرفته است.

پس از آنکه cDNA تک رشته‌ای ساخته شد نیاز بود که در ابتدا cDNA ساخته شده دو رشته‌ای گردد و سپس cDNA دو رشته‌ای شده تکثیر گردد. برای تکثیر cDNA ساخته شده ابتدا از آغازگرهای اختصاصی ژن تیوبولین استفاده گردید تا در صحت ساخت cDNA مورد نظر تردیدی وجود نداشته باشد سپس اقدام به تنظیم دمای اتصال اولیه و تغییر سایر پارامترهای دخیل در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گردید که در این مرحله از آغازگرهای اختصاصی ژن P5CS استفاده گردید.

در شکل ۳ نتایج مربوط به الکتروفورزی محصول PCR دو ژن تیوبولین و ژن P5CS ارائه شده است که آغازگرهای اختصاصی این ژنها برای تکثیر این قطعات استفاده گردیده است.

جهت ادامه کار از نرم افزارهای موجود در شبکه اینترنت استفاده گردید. برنامه‌ای که جهت تعیین میزان همولوژی از آن



Sequences producing significant alignments: (bits) Value
[dbj|D32138.1|ATHATP5CS](#) Arabidopsis thaliana mRNA for delta1... [5056](#) 0.0
[emb|X87330.1|ATP5COSMR](#) A.thaliana mRNA for pyrroline-5-carb... [4979](#) 0.0
[emb|X86777.1|ATP5CSAGN](#) A.thaliana mRNA for pyrroline-5-carb... [4941](#) 0.0
[emb|Y09355.1|ATP5CS2](#) A.thaliana mRNA for pyrroline-5-carbox... [1852](#) 0.0
[gb|AF314812.1|AF314812](#) Brassica napus delta 1-pyrroline-5-c... [1749](#) 0.0
[gb|AF314811.1|AF314811](#) Brassica napus delta 1-pyrroline-5-c... [1543](#) 0.0
[gb|AC003000.2|AC003000](#) Arabidopsis thaliana chromosome II s... [781](#) 0.0
[emb|X89414.1|ATDNAP3CG](#) A.thaliana DNA for pyrroline-5-carbo... [781](#) 0.0
[emb|AJ275979.1|ATH275979](#) Arabidopsis thaliana gene for GDP... [644](#) 0.0
[dbj|AB022784.1|AB022784](#) Arabidopsis thaliana gene for delta... [335](#) 8e-89
[emb|X86778.1|ATP5CSBGN](#) A.thaliana p5csB gene [216](#) 5e-53
[emb|AL161667.1|ATF1116](#) Arabidopsis thaliana DNA chromosome ... [216](#) 5e-53
[emb|AJ005686.1|VVI5686](#) Vitis vinifera mRNA for pyrroline-5-... [204](#) 2e-49
[gb|AF067967.1|AF067967](#) Mesembryanthemum crystallinum pyrrol... [190](#) 3e-45
[dbj|AB056452.1|AB056452](#) Vigna unguiculata VuP5CS mRNA, comp... [173](#) 7e-40
[gb|U60267.1|SLU60267](#) Solanum lycopersicum delta 1-pyrroline... [153](#) 6e-34
[gb|M92276.1|VIRPYRR](#) Vigna aconitifolia pyrroline-5-carboxyl... [117](#) 3e-23
[gb|U92286.1|ADU92286](#) Actinidia deliciosa pyrroline-5-carbox... [113](#) 5e-22
[emb|X98422.1|MSP5CS2](#) M.sativa mRNA for delta-1-pyrroline-5-... [113](#) 5e-22
[emb|X98421.1|MSP5CS1](#) M.sativa mRNA for delta-1-pyrroline-5-... [94](#) 5e-16
[dbj|D49714.1|D49714](#) Oryza sativa mRNA for delta-pyrroline-... [66](#) 1e-07
[gb|AF022914.1|AF022914](#) Triticum aestivum pyrroline-5-carbox... [52](#) 0.002
[dbj|AB025780.1|AB025780](#) Octopus vulgaris OvGai mRNA for G p... [52](#) 0.002
[gb|AY022368.1](#) Oryza sativa microsatellite MRG4693 containi... [50](#) 0.007

شکل ۴- نتیجه همولوژی ژن P5CS با ژنهای مشابه در سایر موجودات

از روش Dig DNA Labeling صورت گرفت. با لکه گذاری نقطه‌ای (Dot Blotting) و انجام عمل هیبریداسیون DNA مکمل ساخته شده با پروب تهیه شده و ژن تیوبولین به عنوان کنترل، صحت ساخت cDNA به تأیید رسید. نتایج لکه گذاری نقطه‌ای cDNA ساخته شده دو ژن P5CS و تیوبولین و پروب اختصاصی این دو ژن در شکل (د) نشان داده شده است.

بعد از ساخته شدن cDNA ژن مورد نظر و سپس تکثیر آن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یکی از راههای تأیید درستی انجام کار استفاده از روش لکه گذاری نقطه‌ای (Dot Blotting) است، جهت انجام این کار با هضم آنزیمی پلاسمید استخراج شده، قطعه مورد نظر جدا گردید و سپس از قطعه جدا شده نشانگر (Probe) تهیه گردید تهیه نشانگر با استفاده

فقط با پروب اختصاصی خود هیبرید شد و با پروب اختصاصی P5CS هیچ هیبریدی نشان نداد.

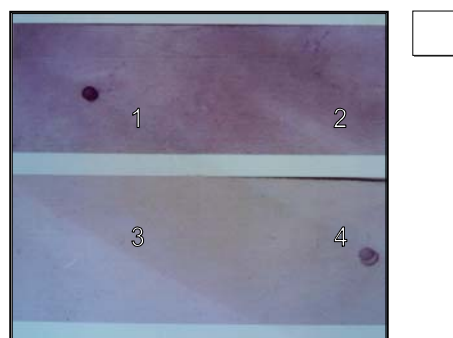
با توجه به نتایج بدست آمده به کارگیری روش RT-PCR باعث تسهیل و تسریع در عمل cDNA سازی و همسانه سازی شده است و این روش نسبت به روش ایجاد مخزن ژنی آسان تر و سریع تر می باشد. همچنین ضرورتی در استخراج mRNA در این کار مشاهده نگردید و با پرایمرهای اختصاصی الیگو (dT) و سیستم آنزیمی مناسب می توان از RNA کل اقدام به ساخت cDNA نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله ازمسئولین و اعضاء هیات علمی مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی بخاطر تأمین کلیه امکانات این تحقیق، از پروفوسور Verma بخاطر اهداء پروب و از آقای دکتر سمیعی بخاطر ساخت پرایمرهای مورد نیاز قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Brown, T.A. Gene cloning : an introduction / T . A. Brown - 3 rd ed. - London: chapman and Hall, (1995).
2. Brown, T.A. Genetic: A molecular approaches. T. A. Brown. – London: champon & Hall, (1989).
3. Chirgwin, J.M. (1979) isolation of biologically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease Biochemisery 18-5294.
4. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium – phenole chlorophorm extraction. Anal Biochem 162-156.
5. Delauney, A.J. , H.u. , C.A. , Kishor, P.B , Verma, D.P. (1993) Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. J. Biol. Chem. 268: 18673-18678.
6. Delauney, A.J. , Verma, D.P. (1990) A soybean delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. Mol. Gen. Genet. 221: 299-305.
7. Delauney, A.J. , Verma, D.P. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal 4: 215-223.
8. Dix, P.J. (1980), Environmenal stress resistance .in plant cell culture PP:183-186
9. Elthon, T.E. , Stewart, C.R. (1982) Proline oxidation in corn mitochondria. Plant Physiol. 70: 567-572.
10. Francois, L. E , Donovan, T. J., Lorenze, k. & Mass, E. V. (1989), salinity effect on rye grain yield, quality, vegetative growth & emergence. Agron. J. 81: 707-712
11. Fukutoku, Y., Yamada, Y. (1984) Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ¹⁵N-labelled protein. Physiol. Plant. 61: 622-628.
12. Lessard, P., Decroocq, V. , Thomas, M. (1997) Extraction of RNA, cloning and subtractive hybridization. In Plant Molecular Biology, a laboratory manual, ed MS
13. Newton, C.R. & Graham, A. (1997). PP: 24.
14. Pollard, A., WynJones, R. G. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. Planta 144: 291-298.



شکل ۵- نتایج لکه گذاری نقطه ای cDNA دو ژن تیوبولین و P5CS
 ۱- نمونه cDNA تکثیر شده ژن P5CS + پروب اختصاصی ژن P5CS
 ۲- نمونه cDNA تکثیر شده ژن تیوبولین + پروب اختصاصی ژن P5CS
 ۳- نمونه cDNA تکثیر شده ژن P5CS + پروب اختصاصی ژن تیوبولین
 ۴- نمونه cDNA تکثیر شده ژن تیوبولین + پروب اختصاصی ژن تیوبولین

همانطور که از نتایج لکه گذاری نقطه ای (Dot Blotting) معلوم می شود، cDNA های ساخته شده P5CS با پروب اختصاصی خود هیبرید شدند و با پروب اختصاصی تیوبولین هیبرید را تشکیل ندادند. cDNA ساخته شده تیوبولین نیز

15. Rayapati, P.J. , Stewart, C.R. (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.* 95: 787-791.
16. Rhodes, D. (1987) Metabolic responses to stress. In "The Biochemistry of Plants" (DD Davies ed), Vol. 12, Academic Press, New York, pp. 201-241.
17. Robert, E. , Farrell, J.R. Methodology of RNA a laboratory guide for isolation characterization (1994). 32-92
18. Sambrook, J , Fritsh, E. F. , Maniatis, T. : Molecular cloning a laboratory manual. (1992)
19. Songstad, D. D., Duncan, D. R. , Widholm, J. M. (1990). Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 41: 289-294.
20. Stewart, C. R. (1980) The mechanism of abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaves. *Plant Physiol.* 66: 230-233.
21. Tal, M., Katz, A. (1980). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: the effect of proline on the growth of callus tissue of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* under salt and water stress. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 98: 283-288.
22. Verma, D. P., Hu, C. A., Delauney, A. J., Miao, G. H. , Hong, Z. (1992) Deciphering proline biosynthesis pathways in plants by direct, trans-, and co-complementation in bacteria. In "Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants" (BK Singh, HE Flores, JC Shannon eds), American Society of Plant Physiologists, Waverly Press, Baltimore, MD, pp. 128-138.
23. Verma, D. P. , Zhang, C. S. (1999) Regulation of proline and arginine biosynthesis in plants. *In* (BK Singh ed.) "Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology", Marcel Dekker, NY, pp 249-265.
24. Wu, D.Y. , ugozzoli, L. (1991) *DNA and cell Biol*, 10, 233.
25. Yoshiba, Y. , Kiyosue, T. , Katagiri, T. , Ueda, H. , Mizoguchi, T. Yamaguchi-Shinozaki, K. , Wada, K. , Harada, Y. , Shinozaki, K (1995) Correlation between the induction of a gene for delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal* 7: 751-760.
26. Yoshiba, Y. , Kiyosue, T. , Nakashima, K. , Yamaguchi-Shinozaki, K. , Shinozaki, K. (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38: 1095-1102.
27. Yoshiba, Y. , Nanja, T. (1993). Stress-responsive and developmental regulation of delta (1)-pyrro line -5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expretion in *Arabidorsis thaliana*.
28. Zhang, C.S. , Lu, Q. , Verma, D.P. (1995). Removal of feedback inhibition of delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270: 20491-20496.

**Production of cDNA from mRNA of P5CS Coding Gene in
*Arabidopsis thaliana***

**A. R. ABBASI¹, F. RASTEGAR-JAZI², B. YAZDI-SAMADI³
AND A. SOGHANSANG⁴**

**1, 3, Former Graduate Student and Professor, Faculty of Agriculture,
University of Tehran, Karaj, Iran, 2, 4, Assistant Professors NRCGEB**

Accepted Feb, 19, 2003

SUMMARY

Plants encountered with drought and salinity produce osmolytes such as proline to help them overcome the stress. Proline is synthesized in a two-step pathway, in which Δ^1 -proline-5-carboxylate synthase (P5CS) is the key enzyme. To produce cDNA from mRNA, total RNA was extracted from leaves of *Arabidopsis thaliana* exposed to saline conditions. cDNA first strand was made through application of oligo (dT) primer and amplification of P5CS mRNA was carried out by two specific primers and polymerase chain reaction. Application of labeled probe, confirmed the amplification.

Key word: cDNA, mRNA, P5CS coding gene, proline, *Arabidopsis thaliana*