ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۸۰ - ۷۱

# طراحی RNA دو رشته‌ای با راندمان بالا برای ایجاد ناقل RNAi امگا گلیادین در گندم

# Double stranded RNA design with high efficiency for RNAi vector omega gliadin in wheat

بهرام باغبان کهنه‌روز[۱]، مهدی آذری آنپار[۲]، محمدعلی ابراهیمی[*۲]

۱- دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

**Baghban-Kohnehrouz B[1], Azari-Anpar M[2], Ebrahimi MA[*2]**

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Tabriz University, Tabriz, Iran
2- Former MSc Student, Associate Professor, Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ma_ebrahimi@pnu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

## چکیده

**فناوری ریبونوکلئیک اسید مداخله‌گر (RNAi) به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای خاموشی بیان ژن هدفگیری شده برپایه تشابه توالی نوکلئوتیدی می‌باشد. RNA مداخله‌گر می‌تواند در کاهش بیان ژنی اپی‌توپ‌های امگاگلیادین که باعث ایجاد حساسیت غذایی وابسته به گندم (WDEIA) می‌شود، مورد استفاده قرار گیرد. حساسیت غذایی یا آنافیلاکسی وابسته به گندم از آنجا منشا می‌گیرد که آنتی‌بادی‌ها، به خصوص IgE در فرد بیمار، نقشی مخالف عمل محافظت کنندگی خود دارند. در گیاهان، RNA دو رشته‌ای با انتهای آزاد دو یا سه نوکلئوتیدی بخاطر قابلیت شناسایی با آنزیم Dicer یکی از ارکان مهم RNA مداخله‌گر محسوب می‌شود. بنابراین توجه به ایجاد انتهای آزاد ′۳ با نوکلئوتیدهای گوانین-سیتوزین در RNAi دورشته‌ای اختصاصی ژن امگا گلیادین با عملکرد بالا هدف‌گیری شد. در این تحقیق عملکرد بالای ساختار ثانویه RNA دو رشته‌ای با محتوای نوکلئوتیدی گوانین-سیتوزین ۳۵ تا ۵۰ درصد بررسی شد. قطعات سنس و آنتی‌سنس طبق نقشه کاست در ناقل pTG19-T همسانه‌سازی شده و سپس برای تولید و ارزیابی مولکول RNAi مورد نظر به ناقل بیانی pAHC25 منتقل شد. انرژی آزاد موثر برای آنزیم Dicer، تغییرات نوکلئوتیدی برای نواحی RNA دو رشته‌ای و درصد گوانین-سیتوزین مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند. بطوری‌که در ناحیه انتخابی برای ساخت کاست، میزان نوکلئوتیدهای گوانین- سیتوزین در حدود ۳۵/۷ الی ۴۵/۲ درصد و انرژی آزاد ۲۴/۷- الی ۲۸/۷- کیلوکالری برمول ارزیابی شد. پس از همسانه‌سازی موفق قطعه سنس، شباهت ۱۰۰ درصدی برای ناحیه تشکیل دهنده ساقه‌سنجاق‌سری (hair-pin stem) به‌طول ۱۸۵ جفت باز حاصل شد. طبق نقشه کاست توالی باقی‌مانده از قطعه سنس نیز نقش فاصله انداز و یا تشکیل دهنده لوپ در مولکول RNAi را ایفا نمود. سرانجام، با انتقال کاست RNAi به ناقل بیانی pAHC25، ناقل خاموشی اختصاصی و با راندمان بالا برای ژن امگا گلیادین نوع 1D حاوی اپی‌توپ WDEIA تولید شد.**

**واژه‌های کلیدی**

**امگا گلیادین**
**آنزیم Dicer**
**ناقل**
**RNA دو رشته‌ای**
**RNA مداخله‌گر**
**WDEIA**

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

## مقدمه

RNA مداخله‌گر[1] فرآیندی است که طی آن مولکول RNA دو رشته‌ای کوتاه از بیان ژن هدف جلوگیری می‌کند. این ژن، ضرورتاً از نظر توالی با RNA دو رشته‌ای کوتاه همولوگ است. در سال ۱۹۹۸ دو رشته مکمل Sense RNA و Antisense RNA همزمان به بدن نماتد[2] (*Caenorhabditis elegans*) وارد شد و به‌دلیل اثر بازدارندگی آن، اولین بار این پدیده RNA مداخله‌گر یا RNA interference نامیده شد (Paddison et al. 2002; Fire et al. 1998). RNAi نقش مؤثری در تخریب بخش مهمی از رونوشت‌های ژن در گیاهان بعد از تبدیل RNA اولیه به mRNA بالغ برعهده دارد. در سال‌های اخیر کارایی سازه‌های RNAi و انتقال آن از طریق *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58C1:Pgv2260 به گیاهانی مثل توتون و بیان آن حدود ۹-۷ روز بعد از تراریختی مشاهده شده‌است (Senthil-Kumar and Mysore 2011). با استفاده از فناوری RNAi، ژن‌های عامل بیماری سلیاک (بیماری ناشی از گلوتن‌گندم) کاهش قابل ملاحظه‌ای را در ترکیب گلوتن گندم بعد از انتقال ژن، با استفاده از ناقل بیانی pAHC25، نشان دادند. تشکیل ساختار ساقه–حلقه (hair-pin) پس از بیان ژنی کاست RNAi بواسطه سه توالی (سنس، فاصله انداز و آنتی‌سنس) درج شده در کاستRNAi، از موارد کلیدی برای شناسایی ژن هدف بواسطه آنزیم Dicer به‌شمار می‌رود (Senthil-Kumar and Mysore 2011; Gil-Humanes et al. 2010).

گلیادین‌ها یکی از بخش‌های مونومریکی موجود در گلوتن گندم (مواد تامین کننده انرژی در رژیم غذایی بشر) به شمار می‌روند که از زیر واحدهای آلفا، گاما و امگا گلیادین تولید شده از ژن‌های مستقر در بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک هر سه ژنوم A، B و D تشکیل شده‌است. گلیادین‌های گندم موجب واکنش‌های حساسیت‌زای غذایی در خردسالان و بزرگسالان مبتلا به بیماری آنافیلاکسی می‌شوند (Jarvinen et al. 2003; Moneret-Vautrin et al. 2000). افراد مبتلا خصوصاً بزرگسالان، به مصرف محصولات حاصل از گندم واکنش‌های شدید و فراوانی از آنافیلاکسی (شوک حساسیت) را نشان می‌دهند (Matsuo et al. 2004; Mullins 2003; Palosuo 2003). آنافیلاکسی یک واکنش حساسیت‌زای جدی است که به‌طور ناگهانی آغاز شده و می‌تواند منجر به مرگ فرد شود (Matsuo et al. 2005; Kidd et al. 1983; Romano et al. 1995). تعداد بیماران مبتلا به آنافیلاکسی گندم به‌خصوص افراد مبتلا به آنافیلاکسی ناشی از فعالیت ورزشی وابسته به گندم[3] به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حال افزایش است (Matsuo et al. 2005; Harada et al. 2000; Dohi et al. 1991). در مطالعات انجام شده روی بیماران مبتلا به WDEIA گزارش شده که فعالیت ورزشی و استفاده از آسپرین، حساسیت ناشی از گندم را نیز افزایش می‌دهد (Matsuo et al. 2005).

امگاگلیادین‌های موجود در گندم، در توالی‌های تکراری خود دارای ۹ ناحیه مختلف برای اپی‌توپ‌های پیوندی ایمنوگلوبولین E است. در بیمارانی که دچار حساسیت ناشی از پروتئین‌های گلوتن گندم هستند گزارش شده که ایمنوگلوبولین E دارای یک پپتید تکراری برای امگا و گاما گلیادین‌ها از نوع QPQQPFP می‌باشد (Battais et al. 2005). گزارشات حاکی از آن بوده که واحد تکراری اکتاپپتیدی یا یک توالی محتوی PQQP، نقش مهمی را در آلرژی ناشی از حساسیت به گلوتن را ایفا می‌کند (Ensari et al. 1998).

در مطالعات اخیر درخصوص عملکرد RNAi، نشان داده شده‌است که شناسایی آنزیم Dicer برای برش انتهای آویزان دو یا سه نوکلئوتیدی RNA دو رشته‌ای کوتاه[4] در مقایسه با انتهای بسته (فاقد ۲ یا ۳ نوکلئوتیدی) RNA دو رشته‌ای برای قطعه سنس–آنتی سنس با عملکرد بیشتری اتفاق می‌افتد. این گزارشات به‌طور واضح بر این نکته اشاره دارند که انتهای آویزان دارای انرژی آزاد مؤثری است که تثبیت کننده مارپیچ[5] RNA برای شناسایی و برش موفقیت‌آمیز با آنزیم Dicer است. هم‌چنین وجود تغییرات نوکلئوتیدی بعد از تکثیر قطعه سنس و مشاهده آن در داخل RNA دورشته‌ای کوتاه، کاهش عملکرد RNAi را نشان می‌دهد (Ohmichi et al. 2002). هدف از اجرای این تحقیق، ساخت

[1] RNA interference (RNAi)
[2] Nematode
[3] Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis (WDEIA)
[4] double strand RNA (dsRNA)
[5] Helix



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

اولین کاست RNAi با دو قطعه وارونه به اندازه مختلف بدون نیاز به توالی فاصله‌انداز بر پایه مطالعه و شناسایی توالی RNA دو رشته‌ای کوتاه بدون تغییرات نوکلئوتیدی، مربوط به ژن امگا گلیادین بود. به‌طوری‌که سازه با راندمان بالا برای مدیریت WDEIA یا حساسیت وابسته به امگا گلیادین در مصرف غلات فراهم شد.

## مواد و روش‌ها

بذر گندم رقم آذر ۲ پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۸ دقیقه و سپس شستشو با آب استریل، بر روی کاغذ صافی واتمن در دمای اتاق با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفت. جوانه‌زنی بعد از چهار روز آغاز و مرحله دو تا سه برگی برای برداشت نمونه‌ها انتخاب شد. سپس استخراج DNA ژنومی به روش CTAB از نمونه‌ها انجام و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Murray and Thompson 1980). برای تکثیر قطعات سنس و آنتی‌سنس، آغازگرهای مورد نظر در نواحی از ژن امگا گلیادین که بیشترین dsRNA کوتاه را نمایش می‌دهد، طراحی شد.

به‌منظور شناسایی dsRNA کوتاه ابتدا توالی DNA نوکلئوتیدی ژن امگا گلیادین (accession number: KF412579) توسط نرم‌افزار آنلاین in-silico[1] به RNA تبدیل شد. سپس ساختار توالی‌های سنس مربوط به RNA دو رشته‌ای کوتاه به طول ۲۱ نوکلئوتید توسط نرم‌افزار pssRNAit[2] انتخاب شد. بعد از آن، با وارد نمودن توالی مربوط به قطعه سنس در نرم‌افزار unafold[3] مکمل آن یعنی توالی آنتی سنس به‌دست آمد. توالی آنتی‌سنس مهم‌ترین بخش در طراحی توالی‌های dsRNA کوتاه می‌باشد. ساختار کلی برای dsRNA کوتاه با دو نوکلئوتید آویزان برای کلیه ریبونوکلئوتیدها (A، U، G و C) در انتهای ′۳ آن به‌واسطه نرم‌افزار unafold پایه‌ریزی شد. هم‌چنین مطلوب‌ترین انرژی آزاد (ΔG°) برای آنزیم Dicer، برای شکستن RNA دو رشته‌ای بلند ژن امگا گلیادین و به‌وجود آوردن انواع RNA دو رشته‌ای کوتاه با کارایی بالا تعیین شد. بخشی از ژن امگا گلیادین که تراکم بالایی از dsRNA کوتاه را نشان داد به‌عنوان بهترین ناحیه برای طراحی آغازگر انتخاب شد.

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ابتدا آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از اطلاعات توالی ثبت شده در بانک اطلاعاتی ژن (NCBI) به شماره KF412579، توسط نرم‌افزار Primer3[4] طراحی شد (جدول ۱). در ابتدای آغازگرهای رفت و برگشتی طراحی شده، مکان‌های برش آنزیمی لازم برای اتصال قطعات سنس به آنتی‌سنس تعبیه شد.

[1] http://in-silico.net/tools/biology/sequence_conversion

[2] (plantgrn.noble.org/pssRNAit/)

[3] (http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-melting)

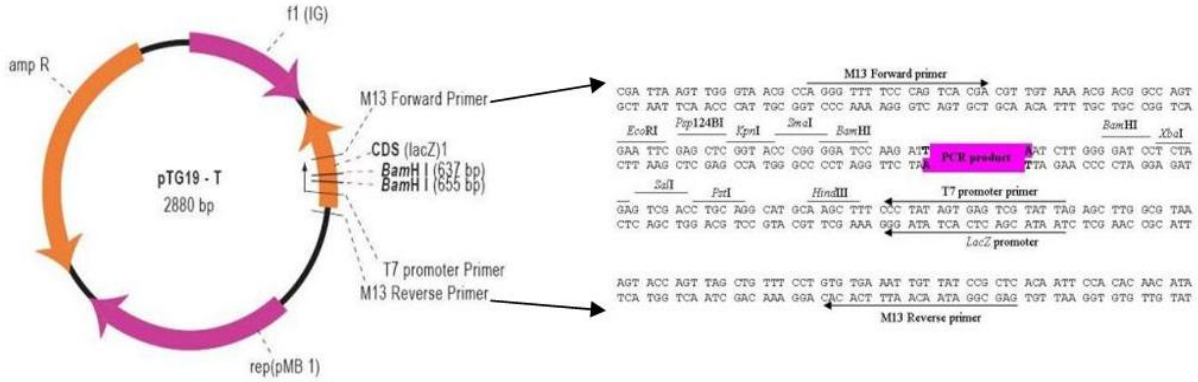
[4] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)

جدول ۱- آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر بخشی از ژن امگا گلیادین به همراه توالی‌های برش آنزیمی

| ناقل مورد استفاده | دمای اتصال (°C) | توالی (′۳→′۵) | آغازگرها | قطعات |
|---|---|---|---|---|
| pAHC25 و pTG19-T | ۶۰-۶۸ | AG*GCTAGC*AACCATATCCACAACAACCATA (*Nhe*I) | آغازگر رفت | قطعه سنس (۲۶۶bp) |
| | | AG*CCCGGGCCATGGG*ATTGTTGGGTCTGGGGAAA (*Sma*I) (*Nco*I) | آغازگر برگشت | |
| pAHC25 و pTG19-T | ۶۲-۶۳ | AG*GCTAGC*AACCATTTCCCACACCCCAA (*Nhe*I) | آغازگر رفت | قطعه آنتی‌سنس (۱۹۱bp) |
| | | AG*GAGCTCGAATTC*TGTTGTGGTTGCCAGGGA (*Sac*I) (*Eco*RI) | آغازگر برگشت | |



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]




شکل ۱- نقشه فیزیکی ناقل خطی pTG19-T (شرکت سیناکلون-ایران) به همراه مکان درج قطعه سنس که به رنگ قرمز نشان داده شده‌است.

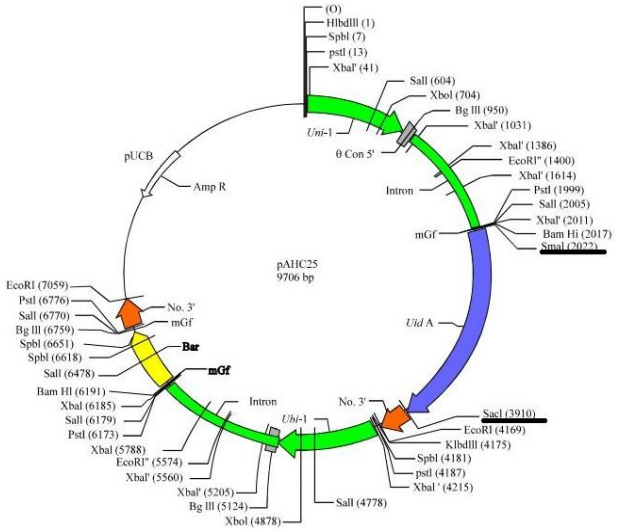
واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای دو قطعه سنس و آنتی‌سنس در حجم ۲۵ µL شامل بافر PCR master mix (شرکت Bioneer-کشور کره جنوبی) به میزان ۱۲/۵ µL، یک میکرولیتر از هر آغازگر، یک میکرولیتر (۱۰۰ ng) DNA ژنومی و ۱۰/۵ µL آب استریل دوبار تقطیر انجام شد. برنامه دمایی Gradient-PCR شامل یک دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، انجام ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دماهای گرادیان (جدول ۱) به مدت ٤٥ ثانیه، و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. ژن تکثیر شده (قطعه سنس) با استفاده از کیت AccuPrep Gel Purification (شرکت Bioneer- کشور کره جنوبی) خالص‌سازی و در ناقل pTG19-T (شکل ۱) همسانه‌سازی شد. در این همسانه‌سازی از باکتری *E.coli* DH5α مستعد شده به روش TSS[1] (Chung et al. 1989) استفاده شد. غربالگری باکتری‌های تراریخته در محیط LBA[2] حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ mg/mL و X-gal mg/mL ۱۰۰ با تشکیل کلونی‌های آبی- سفید انجام گرفت (Sambrook and Russell 2001). جهت تایید حضور قطعه ژن امگا ۲ گلیادین از روش PCR و برش آنزیمی با *Nco*I (طبق دستور العمل شرکت فرمنتاز-کشور آلمان) استفاده شد. محلول واکنش شامل ۳ µL DNA پلاسمیدی، بافر تانگو (فرمنتاز - کشور آلمان) به میزان ۲ µL، دو میکرولیتر آنزیم و در نهایت ۱۳ µL آب‌مقطر بود. سپس میکروتیوپ، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تایید به‌روش‌آنزیمی نیز ۵ µL از پلاسمید برش یافته روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در ولتاژ ۹۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. در نهایت با تعیین توالی پلاسمید استخراجی با کیت استخراج پلاسمید (Plasmid Mini Extraction) (شرکت Bioneer، کشور کره جنوبی) صحت قطعه ژن مورد نظر تایید شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن امگا۲گلیادین، از نوکلئوتید سوم به بعد تبدیل توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی در نرم‌افزار آنلاین in-silico[3] انجام شد. تکثیر قطعه آنتی‌سنس از پلاسمید نوترکیب (pTG19-sense) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده حاوی جایگاه‌های آنزیمی مشخص شده در انتهای ′۵ (جدول ۱) انجام پذیرفت. سپس، از برش آنزیمی برای ایجاد مکان‌های اتصال قطعه آنتی‌سنس به قطعه سنس موجود در ناقل pTG19-sense استفاده شد. طی فرآیند اتصال با آنزیم T4 DNA Ligase (Sambrook and Russell 2001) دو قطعه سنس و آنتی سنس بهم متصل شده و سازه pTG19-RNAi تولید شد. سپس قطعه ترکیبی سنس و آنتی‌سنس توسط آنزیم‌های *Sma*I و *Sac*I در ناقل بیانی pAHC25 وارد شد (شکل ۲). در برش‌های آنزیمی، محلول واکنش در هر کدام شامل سه میکرولیتر DNA پلاسمیدی، دو میکرولیتر بافر تانگو، دو میکرولیتر آنزیم و در نهایت ۱۳ میکرولیتر آب‌مقطر بود. باکتری *E.coli* سویه DH5α حاوی سازه خاموشی ژن مورد نظر در محیط LB مایع و تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت شبانه کشت داده شد. پس از استخراج DNA پلاسمیدی برای تائید نهایی کاست RNAi از آنزیم *Nhe*I استفاده

[1] Transformation and storage solution
[2] Luria Bertani Agar
[3] http://in-silico.net/tools/biology/sequence_conversion



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

شد و بدین ترتیب وجود قطعه سنس-آنتی سنس کلون شده در ناقل بیانی مورد تایید قرار گرفت. در این بررسی از نرم‌افزار pssRNAit و unafold استفاده شد. با وارد نمودن توالی انتخابی ٢٦٦bp برای ژن امگاگلیادین (قطعه سنس) در نرم‌افزار pssRNAit بیش‌ترین فراوانی قطعات آنتی‌سنس حاصل شد. بعد از شناسایی شش آنتی‌سنس موثر برای قطعه سنس، از توالی‌های مربوطه در نرم‌افزار unafold استفاده نموده و کلیه انتهاهای ′٣ آزاد با نوکلئوتیدهای متغیر برای dsRNA کوتاه با عملکرد و انرژی آزاد متغیر با موفقیت به‌دست آمد (شکل ٣).




شکل ٢- نقشه فیزیکی ناقل بیانی pAHC25 به‌طول ٩/٧ کیلو باز (Abdul Kader et al. 2012). جایگزینی ژن *gus* (Uid A) توسط قطعه سنس-آنتی‌سنس ژن امگا گلیادین با استفاده از هضم آنزیم‌های *Sma*I و *Sac*I انجام شده‌است.

## نتایج و بحث

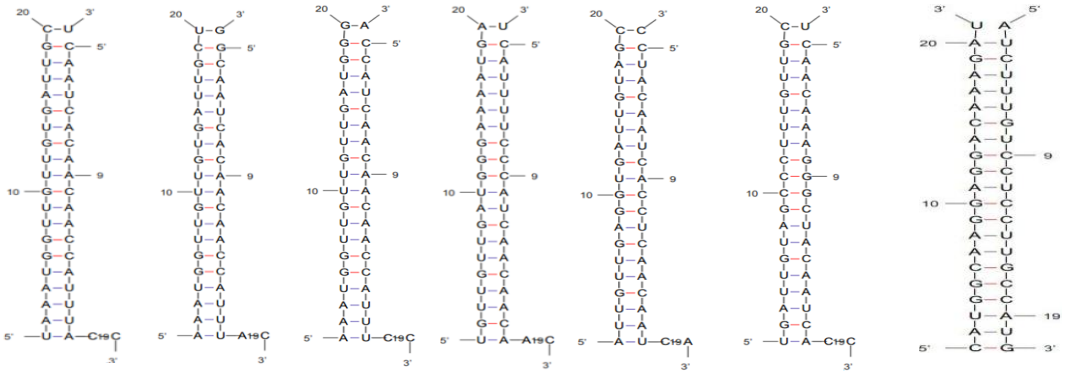
ساختار ثانویه dsRNA کوتاه برای شش توالی آنتی‌سنس (شکل ٤- II، III، IV، V، VI، VII) نشان دهنده این موضوع است که آنزیم Dicer با انرژی مطلوبی می‌تواند خصوصیات برشی خود را در انتهای آزاد دو نوکلئوتیدی این ساختارهای ثانویه (با کارایی بالا) اعمال نماید (Chen et al. 2008; Paddison et al. 2012). کارایی آنزیم RISC برای شش توالی یاد شده زمانی می‌تواند بیش‌ترین عملکرد را برای از بین بردن mRNA هدف داشته باشد که ساخت dsRNA کوتاه توسط آنزیم Dicer با در نظر گرفتن محتوای GC پائین بین ٣٠ الی ٥٠ درصد و غنی بودن انتهای ′٥ توالی آنتی‌سنس با نوکلئوتیدهای AU انجام شود. شروع فعالیت آنزیم RISC از انتهای ′٥ آنتی‌سنس dsRNA کوتاه، به‌دلیل پائین بودن انرژی آزاد آن ناحیه انجام می‌شود (Reynolds et al. 2004; Pradhan et al. 2015). با انتخاب تصادفی یک توالی فرضی از ژن امگاگلیادین و بررسی آن در نرم‌افزار unafold (شکل ٤-I) معلوم شد که از درصد بالای نوکلئوتیدهای GC با انرژی آزاد بالا (٣٣/٨- کیلوکالری بر مول) برخوردار بوده و متفاوت از بقیه عمل خواهد کرد (جدول ٣). در جدول ٣، رابطه مستقیمی بین درصد AU، GC و انرژی آزاد برای ساختار ثانویه dsRNA کوتاه مشاهده می‌شود، به این معنی که در dsRNA کوتاه با انتهای ′٣ آزاد ٢ نوکلئوتیدی، با افزایش درصد AU، درصد GC کاهش و با کاهش GC، انرژی آزاد کاهش می‌یابد که در نتیجه عملکرد آنزیم RISC را در درگیری و حذف ژن هدف افزایش می‌دهد (Ohmichi et al. 2002; Reynolds et al. 2004).

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در گرادیان دمایی ٦٠-٦٨ درجه سانتی‌گراد از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای قطعه سنس (٢٦٦ جفت‌بازی) ژن امگاگلیادین، کلیه دماهای آزمایشی منجر به تکثیر موفق شدند و محصول واکنش همه آن‌ها روی ژل ٠/٨ درصد آگارز الکتروفورز شد و باندی در محدوده ٢٦٦ جفت‌بازی مشاهده شد که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن کدکننده پروتئین‌های القا کننده آلرژی‌زا می‌باشد (شکل ٤).

پس از انتقال ژن امگا گلیادین توسط پلاسمید pTG19-T به داخل باکتری *E.coli* سویه DH5α به‌عنوان میزبان و کشت آن بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین و X-gal، کلونی‌های سفید و آبی تشکیل شد که نشان دهنده انتقال پلاسمید به درون کلنی‌های باکتریایی سفید بود. همچنین جهت تائید وجود قطعه ژنی نوترکیب در پلاسمید pTG19-T از کلونی‌های سفید طبق دستورالعمل ذکرشده در مواد و روش‌ها و جدول ١ و از واکنش Colony-PCR استفاده شد و با الکتروفورز محصول واکنش، وجود قطعه موردنظر (٢٦٦ جفت‌بازی) تائید شد (شکل ٥).



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

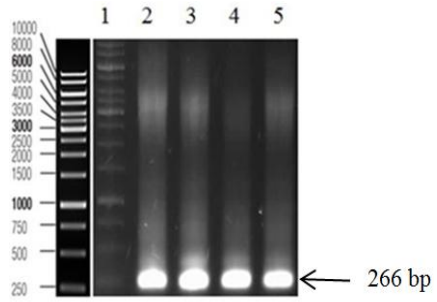


شکل ۳- مقایسه توالی‌های دو رشته‌ای کوتاه برای توالی KF412579 و ناحیه مربوطه برای انتخاب در سازه RNAi: ۱) توالی نامناسب با انتهای ′۳ بسته در ناحیه غیر از قطعه تکثیر شده، ۲،۳،۴،۵،۶،۷) توالی‌های دو رشته‌ای کوتاه مثبت برای ساخت سازه RNAi.

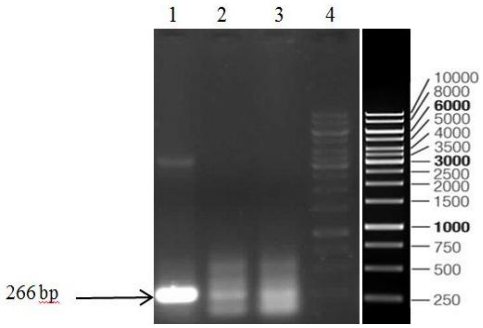
جدول ۳- نمایش توالی‌های آنتی‌سنس در dsRNA کوتاه برای توالی ژن امگا گلیادین گندم

| آنتی سنس (′۳→′۵) | محتوای GC(٪) با توالی مکمل | همپوشانی(٪) | انتهای آزاد ′۳ سنس–آنتی‌سنس | انرژی آزاد (ΔG°) با توالی مکمل | دما (°C) |
|---|---|---|---|---|---|
| CAUGGCAAGGAGGACAAAGAU | 47.6 | 95.2 | 1-1 | -33.8* | 37 |
| UGAUUGUAGCCCUUUGUUGCU | 45.2 | 90.5 | 2-2 | -28.7 | 37 |
| AUUGUUGAGGUGAUUGUAGCC | 40.4 | 90.5 | 2-2 | -26.4 | 37 |
| UGUUGUUGAUGGGAAAAUGAU | 35.7 | 90.5 | 2-2 | -27.7 | 37 |
| AAAUGGUUGUUGUUGAUGGGA | 40.4 | 90.5 | 2-2 | -27 | 37 |
| AAAUGGUUGUUGUGAUUGCUG | 38.0 | 90.5 | 2-2 | -28 | 37 |
| UAAAUGGUUGUUGUGAUUGCU | 35.7 | 90.5 | 2-2 | -24.7 | 37 |

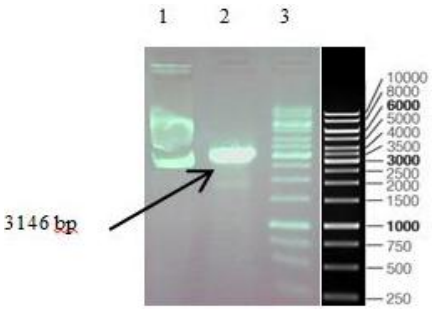
*علامت منفی در انرژی آزاد به معنی مصرف ATP سلولی برای آنزیم Dicer در بوجود آمدن RNA دو رشته‌ای کوتاه از RNA دو رشته‌ای بلند می‌باشد.




شکل ٤- محصول Gradient-PCR قطعه سنس از ژن امگا گلیادین از DNA ژنومی. ۱- نشانگر وزنی مولکولی (DNA ۱kb - شرکت فرمنتاز) ۲،۳،۴،۵- محصول PCR در دماهای ٦٠، ٦٢/٦، ٦٥/٣ و ٦٨ درجه سانتی‌گراد.




شکل ٥- آنالیز محصولات Colony-PCR. ۱- تکثیر قطعه ژن امگا گلیادین موجود در کلون باکتری نوترکیب، ۲ و۳- کنترل کلون آبی باکتریایی فاقد ژن امگا گلیادین، ٤- نشانگر وزنی مولکولی (DNA ۱kb - شرکت فرمنتاز).




شکل٦- استخراج DNA پلاسمیدی و برش آنزیمی. ۱- پلاسمید حاوی ژن مورد نظر (قطعه سنس) بدون برش آنزیمی، ۲- محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۳۱٤٦ نوکلئوتیدی، ۳- نشانگر وزنی مولکولی (DNA ۱kb - شرکت فرمنتاز).



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

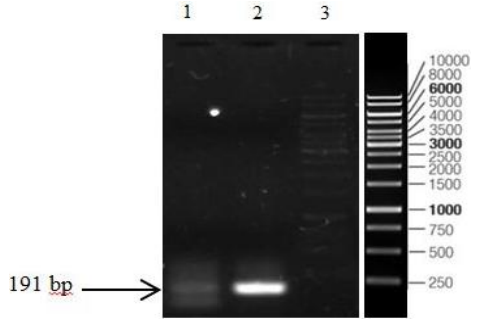
```
47 QPYPQQPYPSQQPYPSQQPFPTPQPQFPQQSQQPFTQPQQPTPLQPQQPF     96
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||.||||||||
 1 QPYPQQPYPSQQPYPSQQPFPTPQPQFPQQSQQPFPQPQQPIPLQPQQPF     50

97 PQQPQQPQQPFPQPQQPFPWQPQQPFPQTQQ    127
   ||||||||||||||||||||||||||||||
51 PQQPQQPQQPFPQPQQPFPWQPQQPFPQTQQ     81
```

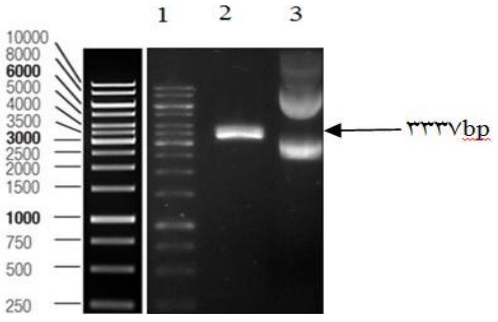
شکل ۷- مقایسه توالی اسیدامینه‌ای قطعه ژن امگاگلیادین با اطلاعات ثبت شده در ncbi.

در ادامه پس از تائید کلون نوترکیب با PCR، برای تائید با روش آنزیمی، کلون‌های حاوی ژن کشت داده شد و پلاسمید استخراج‌شده توسط آنزیم برشی *Nco*I بریده شد. در الگوی الکتروفورزی آن یک باند خطی بطول ۳۱٤٦ جفت‌بازی که نشان دهنده وجود قطعه ژن امگاگلیادین کلون شده به‌همراه وکتور می‌باشد مشاهده شد (شکل ٦). در نهایت تعیین توالی ژن ۲٦٦ نوکلئوتیدی مورد نظر و مقایسه آن با ژن ثبت شده در NCBI نشان داد که این توالی با ژن امگا گلیادین با شماره KF412579 ثبت شده در بانک جهانی ژنی، ۹۹ درصد هم‌خوانی دارد. به عبارت دیگر تنها در سه نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف داشتند. اگر فرض بر این باشد که این تغییرات مربوط به خطای تکثیر توسط DNA پلی‌مراز نباشد و ذاتا در ژن گیاه مورد استفاده برای این ازمایش بوده باشد نه تنها مشکل‌ساز نبوده بلکه با تشابه ۱۰۰درصدی به mRNA هدف متصل و آنرا خاموش می‌نماید. پشتوانه این گمانه‌زنی مثبت این بوده که ترجمه توالی قطعه ژن همسانه‌سازی شده با توالی اسیدامینه‌ای امگا گلیادین در سطح پروتئین تشابه نودونه درصدی نشان می‌دهد (شکل ۷).

بعد از انجام PCR برای قطعه آنتی‌سنس (شکل ۸)، تخلیص قطعه ۱۹۱ نوکلئوتیدی مربوطه از ژل آگارز انجام گرفت. جهت اتصال قطعه آنتی‌سنس با قطعه سنس مستقر در وکتور pTG19 عمل برش با آنزیم‌های برشی در دو انتهای قطعه آنتی‌سنس و ناقل حاوی قطعه سنس با موفقیت انجام شد. پس از اجرای واکنش اتصال و موفقیت در ترانسفورماسیون باکتریایی، انتقال DNA نوترکیب پلاسمیدی (با دو قطعه سنس-آنتی‌سنس) به داخل باکتری *E.coli* DH5α انجام یافته و با انجام برش نهایی از پلاسمید استخراج شده، قطعه به‌طول ۳۳۳۷ نوکلئوتیدی (pTG-sense-antisense) با انجام الکتروفورز در ژل ۰/۸ درصد آگارز تائید شد (شکل ۹). پس از آن، ناقل بیانی pAHC25 و قطعه سنس-آنتی‌سنس از ناقل pTG-sense-antisense با استفاده از آنزیم‌های *Sma*I و *Sac*I برش یافته، و با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase و قطعه سنس-آنتی‌سنس به ناقل بیانی pAHC25 اتصال یافت. پس از ترانسفورماسیون موفق باکتریایی و استخراج پلاسمید از باکتری‌های نوترکیب، از طریق برش آنزیمی و خطی کردن پلاسمید نوترکیب pTG-sense-antisense با استفاده از آنزیم *Nhe*I صحت ناقل بیانی مورد نیاز تایید شد (شکل ۱۰- چپ). یکی از مهم‌ترین روش‌های موجود برای جلوگیری از بیماری‌های حساسیت‌زای ناشی از مواد غذایی مثل بادام، گوجه و گندم قبل از پیشروی این نوع حساسیت‌ها در فرد بیمار، پرهیز کامل از تغذیه با این مواد غذایی توسط بیمار می‌باشد (Morita et al. 2009).



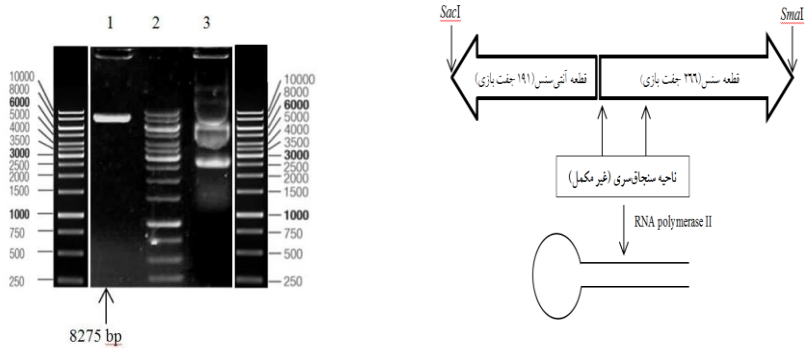

شکل۸- محصول Colony-PCR. ۱) فقدان تکثیر قطعه آنتی‌سنس از کلون آبی رنگ ۲) تکثیر قطعه آنتی‌سنس از کلون سفید رنگ و ۳) نشانگر وزنی مولکولی( ۱kb DNA - شرکت فرمنتاز).




شکل ۹- تایید آنزیمی کاست RNAi در ناقل pTG-sense-antisense. ۱) نشانگر وزنی مولکولی (۱kb DNA - شرکت فرمنتاز)، ۲) محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۳۳۳۷ نوکلئوتیدی، ۳) DNA پلاسمیدی حاوی قطعه سنس و آنتی‌سنس برش نیافته.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]




شکل ۱۰- سمت راست) نمایش جهت‌گیری قطعه سنس-آنتی‌سنس بعد از اتصال بهم در ناقل بیانی pAHC25. سمت چپ) ناقل بیانی pAHC25 حاوی کاست نهایی RNAi. ۱) پلاسمید هضم شده با *NheI*: پلاسمید خطی pAHC25 (فاقد ژن uidA ۱۸۸۸ جفت بازی) به همراه قطعه سنس-آنتی‌سنس ۸۲۷۵ نوکلئوتیدی، ۲) نشانگر وزنی مولکولی( ۱kb DNA - شرکت فرمنتاز)، ۳) پلاسمید هضم نشده pAHC25 .

گندم به‌عنوان یک ماده غذایی مهم و انرژی‌زا در جیره غذایی مردم به‌شمار می‌آید اما بدلیل وجود بعضی از بیماری‌ها مانند بیماری سلیاک و WDEIA در بعضی از افراد حساس، باید گندم و محصولات فرآوری شده از آن به‌طور کامل از رژیم غذایی آن‌ها خارج شود (Matsuo et al. 2005). روش دیگر برای مقابله با این بیماری استفاده از فناوری RNAi برای تولید گندم بدون زیر واحدهای امگا گلیادینی و یا با محتوای کمتر و زیر آستانه بیماری‌زایی می‌باشد. این موفقیت مرهون وجود چند عامل است. یکی از آن‌ها وجود قطعات سنس-آنتی‌سنس (مکمل هم) مناسب با شناسایی و تحلیل dsRNA کوتاه برای mRNA هدف می‌باشد به گونه‌ای که به‌طور منحصر به فرد برای از بین بردن (۱۰۰ درصد) اپی‌توپ‌های ایجاد کننده عامل بیماری در ناحیه مورد نظر موثرباشد. نوین بودن این تکنیک و طراحی آن بدون نیاز به قطعه فاصله‌انداز برگرفته از مکان‌های ژنی مختلف در گندم و یا سایر گونه‌های غلات مثل برنج نیز از دلایل توجه به آن‌هاست. راندمان بالای dsRNA کوتاه برای قطعات سنس و خصوصا آنتی‌سنس (مکمل mRNA هدف)، بازدهی ساخت کاست RNAi را با ضریب اطمینان بالا فراهم نموده است.

ژن امگا گلیادین واقع بر کروموزوم ژنوم ۱B گندم نان یکی از عوامل ایجاد کننده WDEIA به‌شمار می‌رود که با وجود توالی‌های تکراری متعدد، شرایط برای همسانه‌سازی و ساخت کاست RNAi برای امگا۵گلیادین (۱B) با موفقیت مهیا شد. یکی دیگر از زیر واحدهای مربوط به ژن امگا گلیادین که به نوبه خود عامل اصلی ایجاد کننده WDEIA است واقع بر کروموزوم ژنوم ۱D (امگا۲گلیادین) گندم نان قرار گرفته است (Gil-Humanes et al. 2010; Altenbach and Allen 2011). با بررسی جامعی که انجام شد، می‌توان بیان داشت که در این تحقیق با وجود توالی‌های تکراری، همسانه‌سازی ژن مورد نظر در ناحیه‌ای از ژن امگاگلیادین که بیشترین اپی‌توپ‌ها را در بردارد، برای اولین بار با دو همسانه‌سازی موفقی که برای قطعات سنس و آنتی سنس انجام شد، ساخت کاست RNAi امگا۲گلیادین را گزارش می‌کند. ساخت کاست RNAi برای ژن‌های مورد هدف مثل امگا۵گلیادین با ترکیب قطعات سنس- فاصله انداز اینترونی-آنتی‌سنس برای تولید گیاهان تراریخته به انجام رسیده است (Gil-Humanes et al. 2010; Altenbach and Allen 2011). با توجه به اینکه فناوری RNAi برای اپی‌توپ‌های رایج در امگا۲ گلیادین تا به‌حال انجام نشده‌است، در این تحقیق علاوه بر ساخت کاست RNAi برای امگا۲ گلیادین سعی شد تا با حذف تکثیر و همسانه‌سازی توالی اینترونی (ناحیه غیر کدکننده بر گرفته از خود گیاه یا گونه‌های دیگر غلات) در زمان و هزینه صرفه‌جویی شود. با توجه به شکل ۱۱، به استثنای ۷۵ نوکلئوتید از انتهای ′۵ قطعه سنس که به‌عنوان ناحیه غیر مکمل با قطعه آنتی‌سنس به‌شمار می‌رود بقیه نواحی قطعه سنس با آنتی‌سنس مکمل می‌باشند. این



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

ناحیه غیرمکمل به‌عنوان لوپ ناحیه سنجاق سری (hair-pin) محسوب می‌شود.

در بیشتر تحقیقات انجام گرفته در دنیا برای خاموشی ژن‌هایی مثل امگا۵گلیادین، با بی‌توجهی به نقش RNA دو رشته‌ای کوتاه، اقدام به ساخت کاست RNAi از توالی‌های دلخواه شده که این موضوع باعث حذف توالی‌های ژنی خارج از هدف در گندم نان شده است (Altenbach and Allen 2011). انتخاب و شناسایی ۲۱ dsRNA نوکلئوتیدی کارآمد و با راندمان بالا در ناحیه قطعه آنتی‌سنس کاست RNAi می‌تواند نقش بسزایی در کاهش فوق‌العاده تاثیرات خارج از هدف داشته باشد. هم‌چنین به‌دلیل تاثیر آنزیم Dicer در تولید dsRNA کوتاه، توالی ۲۱ نوکلئوتیدی (سنس-آنتی‌سنس) با انتهای آزاد دو نوکلئوتیدی مورد نظر برای آنزیم Dicer باید مشخصه‌ای با انرژی آزاد پایین و محتوای نوکلئوتیدی (G و C) ۳۵ الی ۵۰ درصدی داشته باشد (Reynolds et al. 2004; Ohmichi et al. 2002). یکی از عوامل موثر در افزایش انرژی آزاد برای ژن امگا۲ گلیادین، حساسیت تغییرات نوکلئوتیدی بعد از تکثیر ژن امگا گلیادین می‌باشد. در صورت تغییرات نوکلئوتیدی، حتی برای یک نوکلئوتید، امکان ساخت کاست RNAi با موفقیت بالا، کاهش می‌یابد. در این تحقیق، تمامی توالی‌های ۲۱ نوکلئوتیدی شناسایی شده با انتهای آزاد دو نوکلئوتیدی، در ناحیه آنتی‌سنس کاست RNAi بدون تغییر نوکلئوتیدی (بعد از توالی‌یابی)، برای ساخت یک پلاسمید کاهش دهنده با ضریب اطمینان خیلی بالا مورد استفاده قرار گرفت. به کمک این روش ساخت نوعی کاست RNAi موثر برای افزایش خاموشی ژن هدف[1] بدون تاثیر در ژن‌های دیگر و فاقد تغییرات نوکلئوتیدی میسر شد. به‌طوری‌که ضمن کاهش زمان تولید کاست از نواحی رمزگردان اپی‌توپ‌های ایجاد کننده WDEIA در کاست RNAi نیز استفاده شده‌است و روشی کوتاه برای ساخت کاست RNAi موثر و انتقال آن به موجود هدف محسوب می‌شود.

## سپاسگزاری

نویسندگان از آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و پژوهشکده بیوتکنولوژی حیان دانشگاه تبریز و دانشگاه پیام نور که امکان انجام این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

[1] target gene

## منابع

Abdul Kader A, Almeslemani M, Baghdady A, Alzubi H, Alasaad N, Ali Basha N, Dameriha A, Jacobsen HJ, Hassan F (2012) Isolation, characterization of the *hva1* gene from Syrian barley varieties and cloning into a binary plasmid vector. International Journal of Botany 8: 117-126.

Pradhan A, Naik N, Sahoo K Kumar (2015) RNAi mediated drought and salinity Stress tolerance in plants. American Journal of Plant Sciences 6: 1990-2008.

Altenbach SB, Allen PV (2011) Transformation of the US bread wheat 'Butte 86' and silencing of omega-5 gliadin genes. Genetically Modified Crops 2-1: 66-73.

Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodinier M, Denery Papini S (2005) Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. Allergy 60: 815-821.

Chen JF, Murchison EP, Tang R (2008) Targeted deletion of dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2111-6.

Chung CT, Suzanne LN, Roger HM (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175.

Dohi M, Suko M, Sugiyama H, Yamashita N, Tadokoro K, Juji F, Okudaira H, Sano Y, Ito K, Miyamoto T (1991) Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis: a study on 11 Japanese cases. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 87: 34-40.

Ensari A, Marsh MN, Moriarty KJ, Moore CM, Fido RJ, Tatham AS (1998) Studies in vivo of ω-gliadins in gluten sensitivity (coeliac sprue disease). Clinical Science 95: 419-424.

Fire A, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE (1998) Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811.

Gil-Humanes J, Piston F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitiopes by RNA



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]

interference. Proceedings of National Academy of Sciences 39: 17023-17028.
Harada S, Horikawa T, Icihashi M (2000) A study of food-dependent exercise-induced anaphylaxis by analyzing the Japanese cases reported in the literature. Arerugi 49: 1066-1073.
Jarvinen KM, Turpeinen M, Suomalainen H (2003) Concurrent cereal allergy in children with cow's milk allergy manifested with atopic dermatitis. Clinical and experimental allergy 33: 1060-1066.
Kidd JM, Cohen SH, Sosman AJ, Fink JN (1983) Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 71: 407-411.
Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, Niihara H, Hide M, Morita E (2005) Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. Clinical and experimental allergy 35: 461-466.
Matsuo H, Kohno K, Morita, E (2005) Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. FEBS. Journal 272: 4431-4438.
Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, Ikezawa Z, Kaneko S, Kohno K, Dekio S (2004) Identification of the IgE-binding epitope in ω-5 gliadin, a major allergen in wheat dependent exercise-induced anaphylaxis. The Journal of Biological Chemistry 279: 12135-12140.
Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guerin L, Flabbee J, Lemerdy P (2000) The multifood allergy syndrome. Allergie et immunologie 32: 12-15.
Morita E, Matsuo H, Chinoki Y, Takahashi H, Dahlstrom J, Tanaka A (2009) Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis- Importance of Omega-5 Gliadin and HMW-Glutenin as Causative Antigens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. Allergology International 58: 493-498.
Mullins RJ (2003) Anaphylaxis: risk factors for recurrence. Clinical and experimental allergy 33: 1033-1040.
Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.
Ohmichi T, Karimata H, Sugimoto N (2002) Effect of secondary structure of short double-stranded RNA on RNAI efficiency. Nucleic Acids Research Supplement 2:63-4.
Paddison P, Caudy A, Hannon G (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 99: 1443-8.
Palosuo K (2003) Update on wheat hypersensitivity. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 3: 205-209.
Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. Nature Biotechnology 22: 326-30.
Romano A, Di Fonso M, Giuffreda F, Quaratino D, Papa G, Palmieri V, Zeppilli P, Venuti A (1995) Diagnostic work-up for food-dependent, exercise-induced anaphylaxis. Allergy 50: 817-824.
Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
Senthil-Kumar M, Mysore KS (2011) Caveat of RNAi in plants: the off-target effect. Methods in Molecular Biology 744:13-25.

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.8.8 ]