

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 B¹, Azari-Anpar M², 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 ریونوکلیک اسید مداخله‌گر (RNAi) به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای خاموشی بیان ژن هدفگیری شده بر پایه تشابه توالی نوکلئوتیدی می‌باشد. RNA مداخله‌گر می‌تواند در کاهش بیان ژنی اپی‌توپ‌های امگا گلیادین که باعث ایجاد حساسیت غذایی وابسته به گندم (WDEIA) می‌شود، مورد استفاده قرار گیرد. حساسیت غذایی یا آنافیلاکسی وابسته به گندم از آنجا منشأ می‌گیرد که آنتی‌بادی‌ها، به خصوص IgE در فرد بیمار، نقشی مخالف عمل محافظت‌کنندگی 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. بطوری که در ناحیه انتخابی برای ساخت کاست، میزان نوکلئوتیدهای گوانین-سیتوزین در حدود ۳۵/۲ الی ۴۵/۲ درصد و انرژی آزاد ۲۴/۲- الی ۲۸/۲- کیلوکالری برمول ارزیابی شد. پس از همسانه‌سازی موفق قطعه سنس، شباهت ۱۰۰ درصدی برای ناحیه تشکیل دهنده ساقه‌سجاق‌سری (hair-pin stem) به طول 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 ۱D حاوی اپی‌توپ WDEIA تولید شد.

واژه‌های کلیدی

امگا گلیادین

آنزیم Dicer

ناقل

RNA دو رشته‌ای

RNA مداخله‌گر

WDEIA

مقدمه

RNA مداخله‌گر^۱ فرآیندی است که طی آن مولکول RNA 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^۲ (*Caenorhabditis elegans*) وارد شد و به دلیل 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 ۷-۹ روز بعد از تراریختی مشاهده شده است (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 کاست RNAi، از موارد کلیدی برای شناسایی ژن هدف بواسطه آنزیم Dicer به-شمار می‌رود (Senthil-Kumar and Mysore 2011; Gil 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 شده است. 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. 2003; Mullins 2003; Palosuo 2004). 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^۳ 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).

امگا گلیادین‌های موجود در گندم، در توالی‌های تکراری خود دارای ۹ ناحیه مختلف برای اپی‌توپ‌های پیوندی ایمنोगلوبولین E است. در بیمارانی که دچار حساسیت ناشی از پروتئین‌های گلوتن گندم هستند گزارش شده که ایمنोगلوبولین 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 شده است که شناسایی آنزیم Dicer برای برش انتهای آویزان دو یا سه نوکلئوتیدی RNA دو رشته‌ای کوتاه^۴ 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 RNA^۵ 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

³ Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis (WDEIA)

⁴ double strand RNA (dsRNA)

⁵ Helix

¹ RNA interference (RNAi)

² Nematode

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 به دست آمد. توالی آنتی سنس 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 به واسطه نرم‌افزار $unafold$ پایه‌ریزی شد. هم‌چنین مطلوب‌ترین انرژی آزاد (ΔG°) برای آنزیم Dicer، برای شکستن RNA دو رشته‌ای بلند ژن امگا گلیادین و به وجود 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 به عنوان 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 آنتی سنس تعبیه شد.

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>)

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

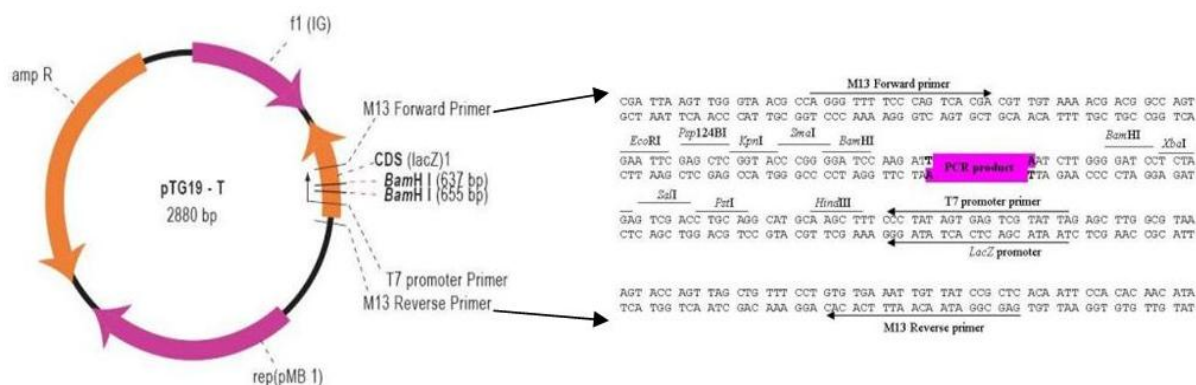
بذر گندم رقم آذر ۲ پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۸ دقیقه و سپس شستشو با آب استریل، بر روی کاغذ صافی واتمن در دمای اتاق با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفت. جوانه‌زنی بعد از چهار روز آغاز و مرحله دو تا سه برگی برای برداشت نمونه‌ها انتخاب شد. سپس استخراج DNA ژنومی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

به منظور شناسایی dsRNA کوتاه ابتدا توالی DNA نوکلئوتیدی ژن امگا گلیادین (accession number: KF412579) توسط نرم‌افزار آنالین^۱ in-silico به RNA تبدیل شد. سپس ساختار توالی‌های

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

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 (۵'→۳')	آغازگرها	قطعات
pTG19-T و pAHC25	۶۰-۶۸	AGGCTAGCAACCATATCCACAACAACCATA (NheI)	آغازگر رفت	قطعه سنس (۲۱۶bp)
		AGCCCGGGCCATGGGATTGTTGGGTCTGGGGAAA (SmaI) (NcoI)	آغازگر برگشت	
pTG19-T و pAHC25	۶۲-۶۳	AGGCTAGCAACCATTTCCACACCCCAA (NheI)	آغازگر رفت	قطعه آنتی سنس (۱۹۱bp)
		AGGAGCTCGAATTCTGTTGTGGTTGCCAGGGA (SacI) (EcoRI)	آغازگر برگشت	



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

میکروتیوپ، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تایید به‌روشن‌آزمی نیز ۵ μ L 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 امگا۲ گلیادین، از نوکلئوتید سوم به بعد تبدیل توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی در نرم‌افزار آنالین^۲ 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 T4 DNA استفاده شد. طی فرآیند اتصال با آنزیم T4 DNA Ligase (Sambrook and Russell 2001) دو قطعه سنس و آنتی‌سنس بهم متصل شده و سازه pTG19-RNAi تولید شد. سپس قطعه ترکیبی سنس و آنتی‌سنس توسط آنزیم‌های SmaI و SacI 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 آب مقطر بود. باکتری *E. coli* سویه DH5 α 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 تایید نهایی کاست RNAi از آنزیم NheI استفاده

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای دو قطعه سنس و آنتی‌سنس در حجم ۲۵ μ L شامل بافر PCR master mix (شرکت Bioneer-کشور کره جنوبی) به میزان ۱۲/۵ μ L، یک میکرولیتر از هر آغازگر، یک میکرولیتر DNA ژنومی و ۱۰/۵ μ L 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 ۴۵ 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* DH5 α مستعد شده به روش TSS^۱ (Chung et al. 1989) استفاده شد. غربالگری باکتری‌های تراریخته در محیط LBA^۲ حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ mg/mL و X-gal ۱۰۰ mg/mL با تشکیل کلونی‌های آبی-سفید انجام گرفت (Sambrook and Russell 2001). جهت تایید حضور قطعه ژن امگا۲ گلیادین از روش PCR و برش آنزیمی با NcoI (طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز-کشور آلمان) استفاده شد. محلول واکنش شامل ۳ μ L DNA پلاسمیدی، بافر تانگو (فرمنتاز-کشور آلمان) به میزان ۲، دو میکرولیتر آنزیم و در نهایت ۱۳ μ L آب مقطر بود. سپس

^۱ Transformation and storage solution

^۲ Luria Bertani Agar

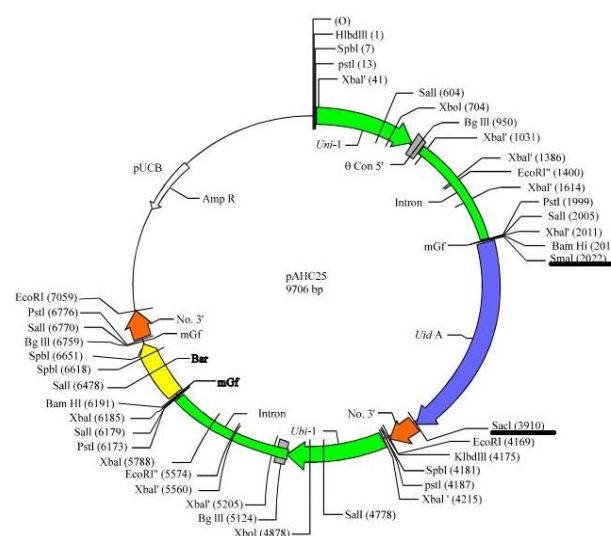
^۳ http://in-silico.net/tools/biology/sequence_conversion

محتوای GC پائین بین ۳۰ الی ۵۰ درصد و غنی بودن انتهای ۵' توالی آنتی‌سنس با نوکلئوتیدهای AU انجام شود. شروع فعالیت آنزیم RISC از انتهای ۵' آنتی‌سنس dsRNA کوتاه، به دلیل 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 ۴-۱) معلوم شد که از درصد بالای نوکلئوتیدهای GC با انرژی آزاد بالا (۳۳/۸- کیلوکالری بر مول) برخوردار بوده و متفاوت از بقیه عمل خواهد کرد (جدول ۳). در جدول ۳، 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 ۳' آزاد ۲ 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 ۶۰-۶۸ درجه سانتی‌گراد از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای قطعه سنس (۲۶۶ جفت‌بازی) ژن امگاگلیادین، کلیه دماهای آزمایشی منجر به تکثیر موفق شدند و محصول واکنش همه آن‌ها روی ژل ۰/۸ درصد آگارز الکتروفورز شد و باندی در محدوده ۲۶۶ جفت‌بازی مشاهده شد که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن کدکننده پروتئین‌های القاکننده آلرژی‌زا می‌باشد (شکل ۴).

پس از انتقال ژن امگا گلیادین توسط پلاسمید pTG19-T به داخل باکتری *E. coli* سویه DH5α به عنوان 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 تأیید وجود قطعه ژنی نو ترکیب در پلاسمید pTG19-T از کلونی‌های سفید طبق دستورالعمل ذکر شده در مواد و روش‌ها و جدول ۱ و از واکنش Colony-PCR استفاده شد و با الکتروفورز محصول واکنش، وجود قطعه مورد نظر (۲۶۶ جفت‌بازی) تأیید شد (شکل ۵).

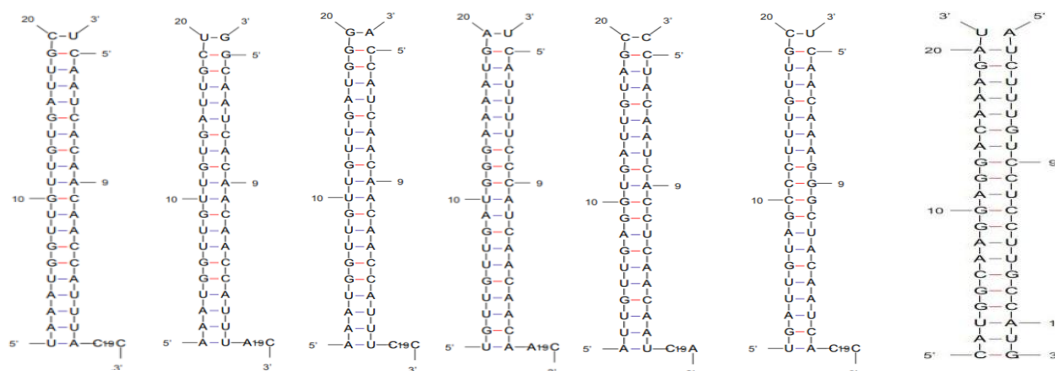
شد و بدین ترتیب وجود قطعه سنس-آنتی سنس کلون شده در ناقل بیانی مورد تأیید قرار گرفت. در این بررسی از نرم‌افزار *pssRNAit* و *unafold* استفاده شد. با وارد نمودن توالی انتخابی ۲۶۶bp برای ژن امگاگلیادین (قطعه سنس) در نرم‌افزار *pssRNAit* بیش‌ترین فراوانی قطعات آنتی‌سنس حاصل شد. بعد از شناسایی شش آنتی‌سنس موثر برای قطعه سنس، از توالی‌های مربوطه در نرم‌افزار *unafold* استفاده نموده و کلیه انتهای ۳' آزاد با نوکلئوتیدهای متغیر برای dsRNA کوتاه با عملکرد و انرژی آزاد متغیر با موفقیت به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۲- نقشه فیزیکی ناقل بیانی pAHC25 به طول ۹/۷ کیلو باز (Abdul Kader et al. 2012). جایگزینی ژن *gus* (Uid A) توسط قطعه سنس-آنتی‌سنس ژن امگا گلیادین با استفاده از هضم آنزیم‌های *SmaI* و *SacI* انجام شده است.

نتایج و بحث

ساختار ثانویه dsRNA کوتاه برای شش توالی آنتی‌سنس (شکل ۴- 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

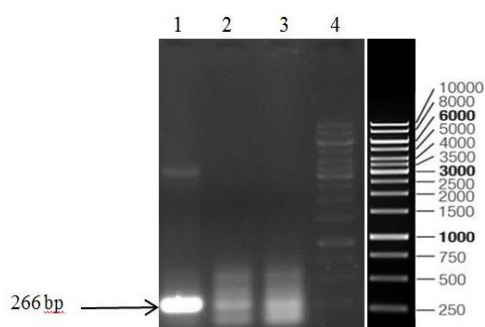


شکل ۳- مقایسه توالی‌های دو رشته‌ای کوتاه برای توالی KF412579 و ناحیه مربوطه برای انتخاب در سازه RNAi: ۱) توالی نامناسب با انتهای ۳' بسته در ناحیه غیر از قطعه تکثیر شده، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷) توالی‌های دو رشته‌ای کوتاه مثبت برای ساخت سازه RNAi.

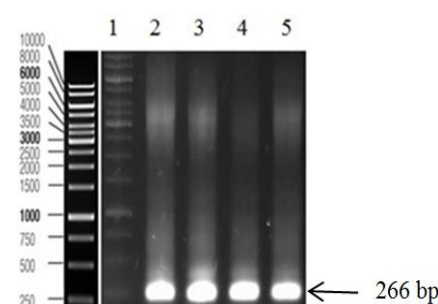
جدول ۳- نمایش توالی‌های آنتی‌سنس در dsRNA کوتاه برای ژن امگا گلیادین گندم

آنتی سنس (۵'→۳')	محتوای GC (%) با توالی مکمل	همپوشانی (%)	انتهای آزاد ۳' سنس-آنتی سنس	انرژی آزاد با توالی مکمل (ΔG°)	دما ($^\circ\text{C}$)
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

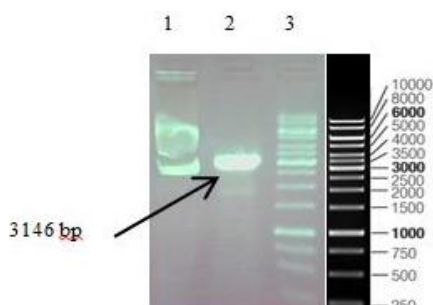
*علامت منفی در انرژی آزاد به معنی مصرف ATP سلولی برای آنزیم Dicer در وجود آمدن RNA دو رشته‌ای کوتاه از RNA دو رشته‌ای بلند می‌باشد.



شکل ۵- آنالیز محصولات Colony-PCR. ۱- تکثیر قطعه ژن امگا گلیادین موجود در کلون باکتری نوترکیب، ۲ و ۳- کنترل کلون آبی باکتریایی فاقد ژن امگا گلیادین، ۴- نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb DNA - شرکت فرمنتاز).

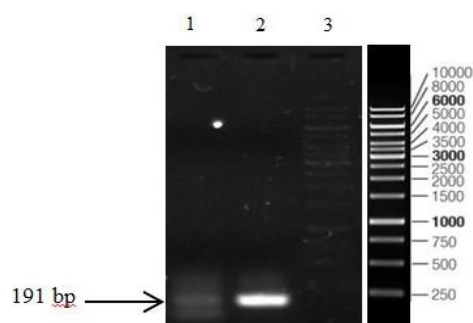


شکل ۴- محصول Gradient-PCR قطعه سنس از ژن امگا گلیادین از DNA ژنومی. ۱- نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb DNA - شرکت فرمنتاز) ۲، ۳، ۴، ۵- محصول PCR در دماهای ۶۰، ۶۲/۶، ۶۵/۳ و ۶۸ درجه سانتی‌گراد.

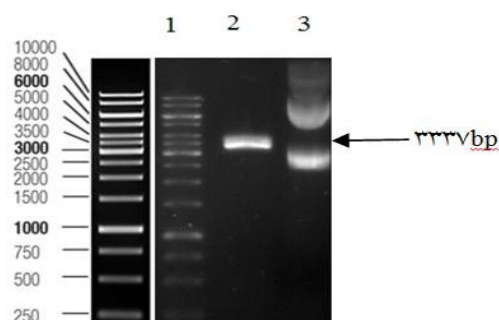


شکل ۶- استخراج DNA پلاسمیدی و برش آنزیمی. ۱- پلاسمید حاوی ژن مورد نظر (قطعه سنس) بدون برش آنزیمی، ۲- محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۳۱۴۶ نوکلئوتیدی، ۳- نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb DNA - شرکت فرمنتاز).

تائید شد (شکل ۹). پس از آن، ناقل بیانی pAHC25 و قطعه سنس-آنتی سنس از ناقل pTG-sense-antisense با استفاده از آنزیم‌های *SmaI* و *SacI* برش یافته، و با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase و قطعه سنس-آنتی سنس به ناقل بیانی pAHC25 اتصال یافت. پس از ترانسفورماسیون موفق باکتریایی و استخراج پلاسمید از باکتری‌های نو ترکیب، از طریق برش آنزیمی و خطی کردن پلاسمید نو ترکیب pTG-sense-antisense با استفاده از آنزیم *NheI* 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).



شکل ۸- محصول Colony-PCR. (۱) فقدان تکثیر قطعه آنتی سنس از کلون آبی رنگ (۲) تکثیر قطعه آنتی سنس از کلون سفید رنگ و (۳) نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb - DNA - شرکت فرمتاز).



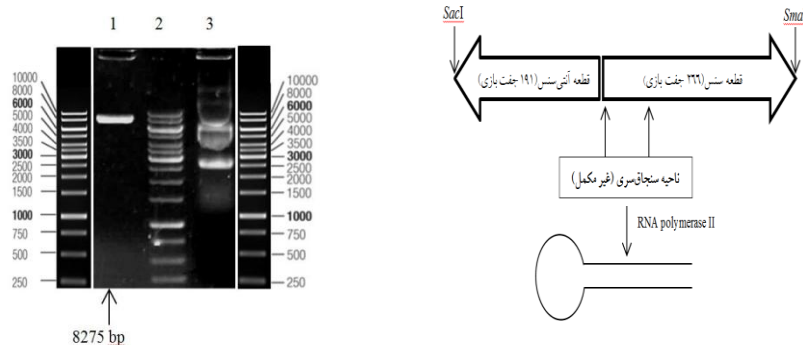
شکل ۹- تایید آنزیمی کاست RNAi در ناقل pTG-sense-antisense. (۱) نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb - DNA - شرکت فرمتاز)، (۲) محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۳۳۳۷ نوکلئوتیدی، (۳) DNA پلاسمیدی حاوی قطعه سنس و آنتی سنس برش نیافته.



شکل ۷- مقایسه توالی اسید آمینه‌ای قطعه ژن امگا گلیادین با اطلاعات ثبت شده در ncbi.

در ادامه پس از تائید کلون نو ترکیب با PCR، برای تائید با روش آنزیمی، کلون‌های حاوی ژن کشت داده شد و پلاسمید استخراج شده توسط آنزیم برشی *NcoI* بریده شد. در الگوی الکتروفورزی آن یک باند خطی بطول ۳۱۴۶ جفت‌بازی که نشان دهنده وجود قطعه ژن امگا گلیادین کلون شده به همراه وکتور می‌باشد مشاهده شد (شکل ۶). در نهایت تعیین توالی ژن ۲۶۶ 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 آزمایش بوده باشد نه تنها مشکل‌ساز نبوده بلکه با تشابه ۱۰۰ درصدی به mRNA هدف متصل و آنرا خاموش می‌نماید. پشتوانه این گمانه‌زنی مثبت این بوده که ترجمه توالی قطعه ژن همسانه‌سازی شده با توالی اسید آمینه‌ای امگا گلیادین در سطح پروتئین تشابه نودونه درصدی نشان می‌دهد (شکل ۷).

بعد از انجام PCR برای قطعه آنتی سنس (شکل ۸)، تخلیص قطعه ۱۹۱ نوکلئوتیدی مربوطه از ژل آگارز انجام گرفت. جهت اتصال قطعه آنتی سنس با قطعه سنس مستقر در وکتور pTG19 عمل برش با آنزیم‌های برشی در دو انتهای قطعه آنتی سنس و ناقل حاوی قطعه سنس با موفقیت انجام شد. پس از اجرای واکنش اتصال و موفقیت در ترانسفورماسیون باکتریایی، انتقال DNA نو ترکیب پلاسمیدی (با دو قطعه سنس-آنتی سنس) به داخل باکتری *E. coli* DH5α انجام یافته و با انجام برش نهایی از پلاسمید استخراج شده، قطعه به طول ۳۳۳۷ نوکلئوتیدی (-pTG-sense-antisense) با انجام الکتروفورز در ژل ۰/۸ درصد آگارز



شکل ۱۰- سمت راست) نمایش جهت گیری قطعه سنس-آنتی سنس 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-آنتی سنس ۸۲۷۵ نوکلئوتیدی، (۲) نشانگر وزنی مولکولی (۱ kb - DNA - شرکت فرمتاز)، (۳) پلاسمید هضم نشده pAHC25.

دیگر از زیر واحدهای مربوط به ژن امگا گلیادین که به نوبه خود عامل اصلی ایجاد کننده WDEIA است واقع بر کروموزوم ژنوم ۱D (امگا۲ گلیادین) 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 امگا گلیادین که بیشترین اپی‌توپ‌ها را در بردارد، برای اولین بار با دو همسانه‌سازی موفق که برای قطعات سنس و آنتی سنس انجام شد، ساخت کاست RNAi امگا۲ گلیادین را گزارش می‌کند. ساخت کاست RNAi برای ژن‌های مورد هدف مثل امگا۵ گلیادین با ترکیب قطعات سنس-فاصله انداز ایترونی-آنتی سنس 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 به حال انجام نشده است، در این تحقیق علاوه بر ساخت کاست RNAi برای امگا۲ گلیادین سعی شد تا با حذف تکثیر و همسانه‌سازی توالی ایترونی (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 به عنوان ناحیه غیر مکمل با قطعه آنتی سنس به شمار می‌رود بقیه نواحی قطعه سنس با آنتی سنس مکمل می‌باشند. این

گندم به عنوان یک ماده غذایی مهم و انرژی‌زا در جیره غذایی مردم به شمار 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 به طور 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-آنتی سنس (مکمل هم) مناسب با شناسایی و تحلیل dsRNA کوتاه برای mRNA هدف می‌باشد به گونه‌ای که به طور منحصر به فرد برای از بین بردن (۱۰۰ درصد) اپی‌توپ‌های ایجاد کننده عامل بیماری در ناحیه مورد نظر موثر باشد. 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 آنتی سنس (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 به شمار می‌رود که با وجود توالی‌های تکراری متعدد، شرایط برای همسانه‌سازی و ساخت کاست RNAi برای امگا۵ گلیادین (۱B) با موفقیت مهیا شد. یکی

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^۱ 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.

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 dsRNA ۲۱ 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. 2002; Ohmichi et al. 2004). یکی از عوامل موثر در افزایش انرژی آزاد برای ژن امگا۵‌گلیادین، حساسیت تغییرات نوکلئوتیدی بعد از تکثیر ژن امگا۵‌گلیادین می‌باشد. در صورت تغییرات نوکلئوتیدی، حتی برای یک نوکلئوتید، امکان ساخت کاست RNAi با موفقیت بالا، کاهش می‌یابد. در این تحقیق،

- 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 epitopes by RNA

interference. *Proceedings of National Academy of Sciences* 39: 17023-17028.

Harada S, Horikawa T, Ichihashi M (2000) A study of food-dependent exercise-induced anaphylaxis by analyzing the Japanese cases reported in the literature. *Alerugi* 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 multifoody 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, Quarantino 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.