Cereal Biotechnology and Biochemistry
Online ISSN: 2783-5170
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Comparison of the Protein Profile of Rejaw Wheat based on Changes in the pH Range

Mehdi Kakaei [1] ✉

[1] Associate Professor, Department of Agricultural Sciences, Payam Noor University, Tehran-Iran.
✉ Corresponding author. E-mail: m.kakaei@pnu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Today, wheat is grown on more land area than any other commercial crop and continues to be the most important food grain source for humans. Rejaw cultivar is adaptable to the conditions of rainfed cultivation and supplementary irrigation in the cold regions of Iran. Of course, it can play an essential role in increasing and sustaining the yield of rainfed wheat. Regarding the quality of the resulting flour, Rejaw has a high quality, increasing the bread quality and reducing bread waste. Two-dimensional electrophoresis is a combination of isoelectric focusing (IEF) in the first dimension and SDS-PAGE in the second dimension, which allows the separation of proteins based on electrical charge and molecular weight.

Materials and methods: In this study, Rejaw wheat variety was used to investigate the changes of protein spots in two different ranges of linear pH 4 to 7 and nonlinear pH 3 to 10. For this purpose, bread wheat seed sample of Rejaw cultivar obtained from the Dryland Agricultural Research Institute (Sararoud branch), Kermanshah, Iran, was grown in a greenhouse under normal conditions in a pot; during the experiment, the lighting period was 14 hours, and natural lighting and fluorescent lamps were used to adjust this light. The daily temperature was about 20 degrees Celsius and the night temperature was about 10 to 12 degrees Celsius. Finally, leaf samples were used in protein extraction to perform two-dimensional electrophoresis, and their total protein was extracted. The experiment was carried out in the greenhouse of Payam-Noor University and the protein department laboratory of the Medical Biology Research Center of Kermanshah University of Medical Sciences.

Results: The results showed the changes of the expressed proteins in two different pH 4 to 7 linear and 3 to 10 non-linear. Although the resolution of the image and the separation of the protein spots at pH 3 to 10 were nonlinear due to the wider pH range, the movement of the proteins in two-dimensional electrophoresis showed that these molecules, in addition to the pI difference, have a solvable behavior. Attention in the conditions of SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis, which is not seen in the usual SDS-PAGE method. In other words, in two-dimensional electrophoresis, proteins are separated based on electric charge and molecular weight but in one-dimensional electrophoresis, they are separated based on molecular weight. For this reason, a set of proteins may have the same molecular weight.

Conclusion: However, this degree of protein diversity and relatively heterogeneous electrophoretic behavior of the proteins obtained from the leaves of Rejaw cultivar, which was apparently only shown in this study with two-dimensional electrophoresis, is remarkable and requires more studies in other related species. The results obtained from the two-dimensional electrophoresis study in this study can open the way for proteomic studies in the future.

Keywords: Wheat, Soluble Leaf Protein, Linear and non-linear pH, IPG Strip.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 13 Dec 2023, **Revised:** 22 Jan 2023, **Accepted:** 16 Feb 2023, **Published online:** 28 Mar 2023

Cite this article: Kakaei, M. (2023). Comparison of the Protein Profile of Rejaw Wheat based on Changes in the pH Range. Cereal Biotechnology and Biochemistry, 2 (1), 94-104. DOI: 10.22126/cbb.2023.8928.1040

© The Author(s).
10.22126/cbb.2023.8928.1040

Publisher: Razi University

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات
شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

مقایسه پروفایل پروتئینی گندم نان رقم ریژاو بر اساس تغییرات بازه پی‌اچ

مهدی کاکایی[1] ✉

[1] گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.
✉نویسنده مسئول. رایانامه: m.kakaei@pnu.ac.ir

چکیده

مقدمه: گندم از مهم‌ترین غلات و قوت غالب مردم جهان است این گیاه منبع مهمی از کربوهیدرات بوده و دارای فیبر زیادی می‌باشد. رقم ریژاو سازگار با شرایط کشت دیم و آبیاری تکمیلی در مناطق معتدل- ایران می‌باشد و می‌تواند نقش مهمی در افزایش تولید و پایداری عملکرد گندم دیم ایفا کند. رقم ریژاو از کیفیت نانوایی بالایی برخوردار است که موجب افزایش کیفیت نان و کاهش ضایعات می‌شود. الکتروفورز دو بعدی در واقع ترکیبی از ایزوالکتریک فوکوسینگ[1] در بعد اول و SDS-PAGE در بعد دوم است که امکان جداسازی پروتئین‌ها را بر اساس بار الکتریکی و وزن ملکولی فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از رقم گندم ریژاو جهت مطالعه، شناسایی وضوح و تمرکز تصویر (تفاوت) لکه‌های پروتئینی در دو بازه مختلف ایزوالکتریک با پی اچ خطی ۴ تا ۷ و پی اچ غیرخطی ۳ تا ۱۰ استفاده گردید. برای این منظور بذر گندم نان رقم ریژاو از معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم سرارود تهیه شد و در گلخانه دانشگاه پیام‌نور و آزمایشگاه بخش پروتئین مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و در شرایط نرمال (طبیعی) در گلدان کشت گردید. در مدت آزمایش، دوره روشنایی ۱۴ ساعت بود و برای تنظیم این نور از روشنایی طبیعی و در حد نیاز از لامپ‌های فلورسانت استفاده شد. دمای روزانه حدوداً ۲۰ درجه سلسیوس و دمای شبانه نیز حدود ۱۰ تا ۱۲ درجه سلسیوس انتخاب گردید. نهایتاً نمونه‌های برگی جهت استفاده در استخراج پروتئین برای الکتروفورز دو بعدی تهیه و پروتئین کل آن استخراج گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان دهنده تغییرات وضوح پروتئین‌های بیان شده در دو پی اچ ۴ تا ۷ خطی و ۳ تا ۱۰ غیر خطی متفاوت بود به عبارت دیگر در هر دو بازه پی اچ لکه‌های پروتئینی امکان تشکیل داشتند. اگر چه وضوح تصویر و تفکیک لکه‌های پروتئینی در پی اچ ۳ تا ۱۰ غیر خطی به لحاظ وسیع تر بودن دامنه پی اچ بسیار مطلوب و مناسب بود، حرکت پروتئین‌ها در الکتروفورز دوبعدی نشان داد که این ملکول‌ها علاوه بر تفاوت نقطه ایزوالکتریک pI[2]، دارای رفتار و عملکرد قابل توجهی در شرایط SDS-PAGE و الکتروفورز دوبعدی هستند که در روش معمول SDS-PAGE دیده نمی‌شود. به عبارت دیگر در الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌ها بر اساس بار الکتریکی و نیز وزن مولکولی جدا می‌شوند ولی در الکتروفورز یک بعدی بر اساس وزن مولکولی تفکیک می‌شوند به همین دلیل ممکن است مجموعه‌ای از پروتئین‌ها دارای وزن مولکولی یکسان باشند.

نتیجه‌گیری: به طور کلی این درجه از تنوع پروتئینی و رفتار نسبتاً ناهمگون الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از برگ گندم رقم ریژاو که اولین مطالعه با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی در این رقم می‌باشد، نشان داده شده است، قابل تأمل و نیازمند مطالعات بیشتر در این گونه تحقیقات در سایر گونه‌های مرتبط می‌باشد. نتایج بدست آمده از مطالعه الکتروفورز دوبعدی در این مطالعه می‌تواند راهگشای مطالعات پروتئومیکی در آینده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، پروتئین محلول برگ، پی اچ خطی و غیر خطی، نوار IPG

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۱۱/۰۲ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۱/۲۷، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۱/۰۸

استناد: کاکایی، م. (۱۴۰۲). مقایسه پروفایل پروتئینی گندم نان رقم ریژاو بر اساس تغییرات بازه پی‌اچ. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات، ۲ (۱)، ۹۴-۱۰۴. DOI: 10.22126/cbb.2023.8928.1040

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

1- IEF: Isoelectric Focusing
2- Isoelectric point

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) هگزاپلوئید است (2n = 6 x = 42) و یکی از مهمترین منابع در تغذیه انسان در سراسر جهان می‌باشد (Kumar *et al.*, 2017) همچنین رژیم غذایی اصلی اکثریت جمعیت جهان است که حاوی کربوهیدرات‌ها، پروتئین، مواد معدنی، ویتامین‌های گروه B، فیبر غذایی و غیره می‌باشد (Adhikari *et al.*, 2016). به عبارت کامل‌تر گندم مهمترین و پر رشدترین محصول کشاورزی در جهان است. یکی از غلات عمده کشت شده در ایران و سراسر جهان است که کالری و پروتئین بالایی را فراهم می‌کند. گندم سازگاری وسیعی دارد و در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل، قادر به تحمل سرمای شدید (همچون برف) است و در فصل بهار در هوای گرم، رشد خود را با دانه‌بندی از سر می‌گیرد (Ninghot *et al.*, 2016 and Miri *et al.*, 2020). الکتروفورز دوبعدی ابزاری ارزشمند است که به کمک آن می‌توان هزاران پروتئین متفاوت را جداسازی نمود این تکنیک بسیار توانمند در شناسایی و تعیین تغییرات پس از ترجمه ژنوم است، به عبارت دیگر الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها را بر مبنای پارامترهای فیزیکی تفکیک می‌کند و یک ابزار توانا برای جداسازی کمپلکس پروتئین‌های مخلوط می‌باشد (Yang, *et al.*, 2011). در چند سال اخیر، پیشرفت قابل توجهی در تکنیک‌های جداسازی و شناسایی پروتئین، از جمله الکتروفورز ژل دوبعدی، کروماتوگرافی مایع، طیف‌سنجی جرمی و همچنین در دسترس بودن پایگاه‌های اطلاعاتی و جستجوی پایگاه داده وجود داشته است (Buts *et al.*, 2014). در میان متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده در پروتئومیکس، الکتروفورز دوبعدی امکان تفکیک و تجسم آسان هزاران گونه پروتئین روی یک ژل را فراهم می‌کند (Chevalier *et al.*, 2004). پروتئومیکس برای مطالعه بیان کمی و کیفی پروتئین‌ها در شرایط مختلف استفاده می‌شود (Beyene *et al.*, 2016). پروتئومیکس را می‌توان برای درک اینکه چگونه نواحی ژنوم با ترکیب پروتئین دانه، دخالت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های خاص در شرایط مختلف رشد درگیر می‌شوند، استفاده کرد (Leon *et al.*, 2009 and Leon *et al.*, 2010). به این ترتیب، پروتئومیکس در گندم ابزار قدرتمندی برای روشن کردن بیان پروتئین‌ها می‌باشد (Labuschagne *et al.*, 2020). در پروتئومیکس پیچیدگی و گستردگی تحقیقات بسیار بیشتر از ژنومیکس می‌باشد، زیرا ژنوم یک ارگانیسم پایدار و با ثبات می‌باشد در حالی که پروتئوم از یک سلول به سلول دیگر و حتی از یک زمان به زمان دیگر در یک سلول متفاوت می‌باشد تنها با تغییر یکی از شرایط محیطی در دو سلول، آنها پروتئوم‌های مختلفی را تشکیل خواهند داد (Kakaei, 2022). الکتروفورز دو بعدی در واقع ترکیبی از ایزوالکتریک فوکوسینگ[3] در بعد اول و SDS-PAGE در بعد دوم است که امکان جداسازی پروتئین‌ها را بر اساس بار و اندازه فراهم

[3]-IEF: Isoelectric focusing

می‌کند. در گذشته جهت انجام بعد اول، آمفولیت‌های حامل سنتز شده مورد استفاده قرار می‌گرفت که به جهت عدم تکرار پذیری در ترکیب اجزای سنتز شده، امروزه ژل‌های گرادیان pH تثبیت شده[4] مورد استفاده قرار می‌گیرند. رویکردها و روش‌های پروتئومیکسی، ابزاری ارزشمند برای شناسایی پروتئین‌ها و مکانیسم‌های درگیر در جنبه‌های مختلف مطالعات در گیاهان مختلف تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشند. در حقیقت تحقیقات پروتئومیکی مقایسه‌ای نشان داده‌اند که ارتباط بین پروتئین ایجاد شده و یا حذف شده در شرایط مختلف رشدی بسیار پیچیده می‌باشد. اکثر مطالعات پروتئومیکی در گیاهان از نوع مطالعات مقایسه‌ای هستند. به عبارت دیگر حرکت پروتئین‌ها در الکتروفورز دوبعدی نشان داد که این ملکول‌ها علاوه بر تفاوت در نقطه ایزوالکتریک، دارای رفتار قابل توجهی در شرایط SDS-PAGE و الکتروفورز دوبعدی هستند که در روش معمول SDS-PAGE دیده نمی‌شود. کاکایی و کیانی (Kakaei & Kiani, 2019) در مطالعه تنوع بیان پروتئین‌های محور جنین در دو رقم برنج با استفاده از الکتروفورز دوبعدی بیان کردند که تنوع موجود در الگوی پروتئینی محور جنین، در دو رقم برنج متحمل و حساس برنج به شوری (رقم حسنی و سنگ جو به ترتیب) مشخص گردید. همچنین با استفاده از مطالعات الکتروفورز دوبعدی می‌توان به سادگی با کمک نرم افزارهای مربوطه و همچنین آنالیزهای آماری تغییرات بیان معنی‌دار ناشی از تفاوت رقم در سطح پروتئوم جنین را مورد بررسی قرار داد و شاخص تغییرات را مشخص نمود. آنها همچنین بیان کردند که کاهشی بودن میزان بیان لکه‌ها در رقم حساس به شوری (سنگ جو) نشان‌دهنده تخریب پروتئین‌ها می‌باشد. در تحقیقات محققین کاربردهای وسیعی در خصوص کاربرد الکتروفورز دوبعدی مطالعه شده است (Kakaei, 2017-a)، تغییرات پروتئوم یونجه در برابر تنش ناشی از تغذیه شته خالدار یونجه (Kakaei, 2017-b) و واکنش پروتئوم لوبیا در اثر تغذیه کنه تارتن دو نقطه‌ای با رویکرد تکنیک پروتئومیکس (Kakaei, 2017-c)، در ارقام گندم نان تحت تنش فلزات کادمیوم و جیوه (Raeesi Sadati *et al.*, 2016)، در ژنوتیپ‌های مختلف سورگوم (Bangaru & Sarda, 2018)، مطالعه ارقام برنج در ارتباط با تنش اسمزی (Zhang & Komatsu, 2007) و در مطالعه پروتئوم برگ برنج در ارتباط با فاکتورهای محیطی (Kang *et al.*, 2010) انجام گرفت است. در مطالعه‌ای با عنوان شناسایی پروتئومی پروتئین‌های کوچک و پاسخ‌دهنده به مس در جنین‌های جوانه‌زده مورد مطالعه قرار گرفت که سیزده مورد از پروتئین‌های شناسایی شده، از جمله پروتئین شبه متالوتیونین، پروتئین شبه پروتئین مرتبط با غشاء، پروتئین کیناز مرتبط با دیواره، پروتئین‌های مرتبط با پاتوژنز و پروتئین کوچک متصل به GTP Rab2، به تنش مس مرتبط بودند (Zhang *et al.*, 2009). سه پروتئین، یک

[4]- IPG: Immobilized pH gradien

سیتوکروم کوچک احتمالی P450 (CYP90D2)، یک تیوردوکسین احتمالی و یک GTPase فرضی، توسط تنش مس مرتبط بودند و آنها همچنین بیان کردند که این مطالعه اولین شواهد پروتئومی را ارائه می‌دهد که متالوتیونین و پروتئین‌های پاسخگو به مس در گیاهان CYP90D2 هستند و نیز نتیجه گرفتند که این یافته‌ها ممکن است منجر به درک بهتر پاسخ‌های مولکولی گیاه به قرار گرفتن در معرض فلزات سمی شود.

همانطوری که پیش تر اشاره شد از جمله روش‌های مؤثر در تفکیک پروتئین ها از همدیگر روش الکتروفورز دوبعدی می‌باشد. در این تکنیک ابتداً پروتئین‌ها بر مبنای تنوع در نقاط ایزوالکتریک جدا می شوند. به این بخش از تکنیک الکتروفورز دوبعدی IEF، Isoelectric focusing گفته می‌شود، بر این مبنا هدف از مطالعه حاضر، بررسی و مطالعه تعیین موقعیت پروتئین‌ها (تشخیص تصویر ژل مناسب با وضوح برتر در پی اچ‌های مختلف و متعاقب آن انتخاب پی اچ مناسب) با استفاده از استریپ‌های نواری مختلف در بازه-های پی اچ ۴ تا ۷ خطی و ۳ تا ۱۰ غیرخطی توسط تکنیک الکتروفورز دوبعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: در این تحقیق از بذور گندم رقم ریژاو استفاده شد. این بذور از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (معاونت سرارود کرمانشاه) تهیه شدند. ابتداً بذور گندم را با استفاده از محلول ضد عفونی $HgCl_2$ یک درصد به اضافه چند قطره توین به مدت حدوداً ۸ دقیقه ضدعفونی گردیدند. بذرها داخل گلدان‌هایی به ابعاد ۳۰×۴۰ (قطر×ارتفاع) سانتی‌متر در بستر پرورشی که از ترکیب خاک مزرعه، کود دامی پوسیده و ماسه هریک به نسبت مساوی تهیه شده بود، در شرایط نرمال و استاندارد در گلخانه کشت شدند. در مدت آزمایش، دوره روشنایی ۱۴ ساعت بود و برای تنظیم این نور از روشنایی طبیعی و در حد نیاز از لامپ‌های فلورسانت استفاده شد. دمای روزانه حدوداً ۲۰ درجه سلسیوس و دمای شبانه نیز حدود ۱۰ تا ۱۲ درجه سلسیوس انتخاب گردید. رطوبت نسبی گلخانه در طول مدت آزمایش بین ۴۰ تا ۵۰ درصد در تغییر بود. جهت تجزیه پروتئوم، از برگ گیاهچه‌های مربوط به طور تصادفی به میزان ۵ گرم وزن شد و داخل فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای حدود ۸۰- درجه سلسیوس محافظت شدند.

استخراج پروتئین برگ رقم ریژاو مورد مطالعه: ابتدا نمونه ۲۵۰ میلی‌گرمی از برگ رقم ریژاو در داخل هاون چینی به همراهی ازت مایع کوبیده و پودر شدند. بافت برگ پودر شده درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری قرار داده شد و به هر نمونه ۰/۸ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. محتویات داخل هاون با بافر استخراج کاملاً مخلوط و به صورت همگن در آمد. میکروتیوپ‌ها به مدت یک ساعت در

یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند و سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط TCA-Acetone به میکروتیوپ‌ها اضافه شد، و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای C° ۲۰- نگهداری شد. سپس میکروتیوپ‌ها با دور rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده استون اضافه کرده و پس از ۰/۵ ساعت نگهداری در یخچال، به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس و با دور rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ انجام گرفت. بار دیگر محلول رویی دور ریخته شده و پودر سفید رنگ (پروتئین استخراجی) برای انجام مطالعات باقی ماند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (جدول ۱) به پروتئین استخراجی اضافه و به مدت یک ساعت نمونه‌ها شیک شدند. پس از آن محلول رویی جهت مطالعه و اندازه‌گیری میزان پروتئین استفاده شد. استخراج پروتئین با استفاده از روش (Damerval *et al.*, 1989) و با برخی تغییرات (Mostafaie, 2003) صورت پذیرفت.

جدول ۱- ترکیبات بافر لیز کننده الکتروفورز دو بعدی

Table 1- Two-dimensional electrophoresis lysis buffer compositions

مواد شیمیایی	مقدار (واحد)
Urea	۸ مولار
Tiurea	۲ مولار
CHAPS	۴ درصد
Tris	۳۵ میلی مولار
DTT	۸۰ میلی مولار
IPG Buffer	حداکثر ۲٪

سنجش پروتئین کل: اندازه‌گیری پروتئین کل بر اساس روش تغییر یافته برادفورد ۱۹۷۶، با استفاده از BSA به عنوان پروتئین استاندارد انجام گرفت.

الکتروفورز دو بعدی: در این مطالعه جهت جداسازی پروتئین‌ها از الکتروفورز دوبعدی استفاده گردید که در بعد اول از نوارهای IPG[5] با طول ۱۸ سانتیمتر و دو پی اچ

[5]- Immobilized pH Gradient

متفاوت ۴ تا ۷ خطی و پی اچ ۳ تا ۱۰ غیر خطی (تهیه شده از شرکت Bio Rad) استفاده شد. در آزمایش حاضر جهت وارد نمودن پروتئین‌ها به درون ژل‌ها، ابتدا پروتئین‌ها در محلول بازجذب[6] حل شدند و سپس با بازجذب بارگیری روی نمونه‌ها انجام گرفت. عمل باز جذب در طول شب و به طور متوسط ۱۲ ساعت به طول انجامید. برای انجام بعد اول الکتروفورز از دستگاه مولتی فور سه ساخت شرکت آمرشام بیوساینس[7] در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با برنامه مشخص (جدول ۲) استفاده شد. برای بارگیری پروتئین‌ها روی ژل ۱۸ سانتی‌متری به طور متوسط نیاز به ۵۴ هزار ولت ساعت (54KVh) است که این میزان در چندین مرحله با ولتاژهای مختلف تأمین گردید. پس از پایان بعد اول مرحله متعادل سازی نوارها صورت گرفت و سپس بعد دوم الکتروفورز با تکنیک SDS-PAGE انجام گرفت. برای انجام بعد دوم الکتروفورز، از ست کامل دستگاه الکتروفورز یک بعدی مخصوص SDS-PAGE ساخت شرکت پایا پژوهش پارس استفاده گردید. پس از تیمار شیشه‌ها با الکل و قرار دادن فاصله‌انداز شیشه‌ها کاست ژل را بسته و محلول اکریل آمید (۱۲ درصد) تهیه گردید و در آن ریخته شد. پس از ریختن محلول اکریل آمید روی سطح استریپ را با آگارز رقیق اشباع پوشانیده شد.

تصویر برداری از ژل: ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از کوماسی بلو بریلیانت R-250 انجام شد. ژل‌ها پس از رنگ-آمیزی با استفاده از دنسیتومتر Gs800 ساخت شرکت بیورد اسکن گردیده و به فرمت خام ژل‌های دوبعدی ذخیره گردیدند.

جدول ۲- برنامه فوکوسینگ مورد استفاده مولتی-فور III

Table 2- Focusing program used by multiphor III

زمان	ولتاژ (ولت)	برنامه
۲۰ دقیقه	۵۰۰	Gradient
۱:۱۰ ساعت	۵۰۰	Step
۱:۱۰ ساعت	۳۰۰۰	Gradient
۲ ساعت	۳۰۰۰	Step
۳:۳۰ ساعت	۸۰۰۰	Gradient
۳:۵۰ ساعت	۸۰۰۰	Step

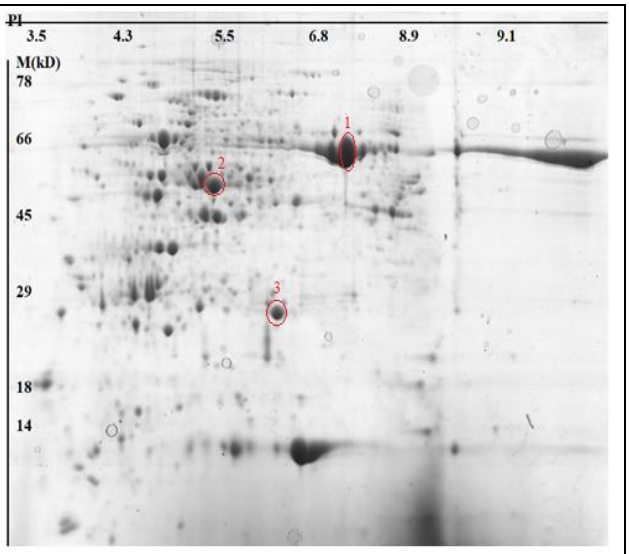
نتایج و بحث

در ایران تنش خشکی به عنوان مهمترین عامل محدود کننده تولیدات زراعی مطرح می‌باشد و مناطق وسیعی از اراضی تحت کشت گندم در ایران در بخش خشک و نیمه خشک قرار گرفته است. گندم ریژوا دارای ویژگی‌های مهم زراعی می‌باشد و جهت کشت در دیمزارهای مناطق معتدل کشور معرفی شده است (Haghparast *et al.*, 2013). جهت مطالعه و بررسی تغییرات لکه‌های پروتئینی در دو بازه مختلف پی اچ استفاده گردید. نتایج حاصل نشان دهنده تغییرات پروتئین‌های بیان شده در دو پی اچ متفاوت ۴ تا ۷ خطی و ۳ تا ۱۰ غیر خطی بود (شکل ۳ و ۴). وضوح تصویر

[6]- Rehydration
[7]- Ettan IPGphore III by Ge Healthcare

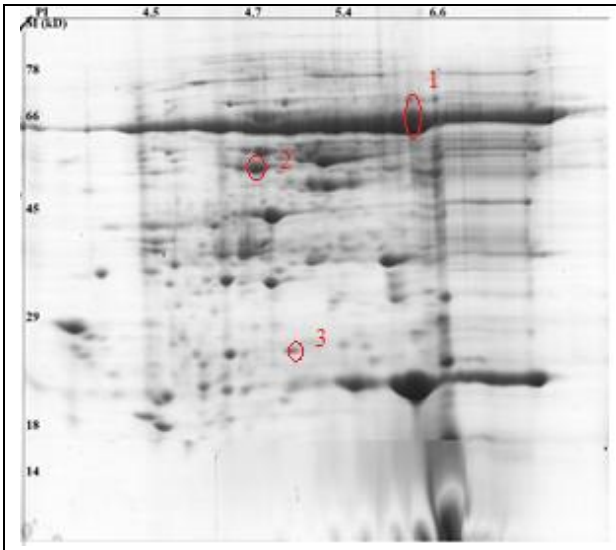
و تفکیک لکه‌های پروتئینی در پی اچ ۳ تا ۱۰ غیر خطی به لحاظ وسیع تر بودن دامنه پی اچ بسیار مطلوب و مناسب بود که راهگشای مطالعات پروتئومیکی در آینده می‌باشد. همانطوری که از شکل ۳، تصویر نمونه برگی در رقم ریژاو گندم نان در بازه پی اچ ۳ تا ۱۰ غیرخطی مشخص است پروتئین‌های نمونه برگی توانسته‌اند به صورت بسیار مناسبی از هم تفکیکی شوند لذا جهت مطالعات پروتئومیکسی استفاده از این پی اچ قابل پیشنهاد می‌باشد. در شکل ۴ یعنی تصویر نمونه برگی در رقم ریژاو گندم نان در بازه پی اچ ۴ تا ۷ خطی همانگونه که مشخص می‌باشد لکه‌های پروتئینی نتوانسته‌اند به وضوح پی اچ به کار رفته در شکل ۱، خود را ظاهر سازد و برخی از لکه‌ها دچار به هم ریختگی شده‌اند. به عبارت دیگر حرکت پروتئین‌ها در الکتروفورز دوبعدی نشان داد که این ملکول‌ها علاوه بر تفاوت pI، دارای رفتار قابل توجهی در شرایط SDS-PAGE و الکتروفورز دوبعدی هستند که در روش معمول SDS-PAGE دیده نمی‌شود. نتیجه‌گیری کلی آن که به هر حال این درجه از تنوع پروتئینی و رفتار نسبتاً ناهمگون الکتروفورزی پروتئین‌های حاصل از برگ گیاه ریژاو که ظاهراً تنها در این مطالعه با الکتروفورز دوبعدی نشان داده شده است، قابل تأمل و نیازمند مطالعات بیشتر در این گونه تحقیقات در سایر گونه‌های مرتبط می‌باشد. نتایج بدست آمده از مطالعه الکتروفورز دوبعدی در این مطالعه می‌تواند زمینه مطالعات پروتئومیکی را در آینده بیشتر هموار کند. در نتایج حاصل از الکتروفورز دوبعدی، افزایش تعداد پروتئین‌های توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی و توانمندی دستگاه طیف‌سنج جرمی برای شناسایی پروتئین‌ها و براساس تصاویر ژل (شکل ۳) حاصله از الکتروفورز دوبعدی پروتئین در مطالعه حاضر و با توجه به وزن ملکولی، نقطه ایزوالکتریک، شکل لکه و با بررسی سایت Swissprot- Swiss2d-Page و مطالعه مقالات در ارتباط با گیاه گندم، تعدادی از پروتئین-های ظاهر شده در ژل به شرح زیر مورد شناسایی احتمالی واقع شدند (Shafiei *et al.*, 2020).

لکه شماره ۱ در شکل ۳، با نقطه ایزوالکتریک فوکوسینگ ۷/۱۸ و وزن ملکولی حدود ۶۴ کیلودالتون احتمالاً پروتئینی به نام Ferredoxin-nitrite reductase Precursor-Oxidoreductase می‌باشد. نیتریت ردوکتاز (فردوکسین: نیتریت اکسیدو ردوکتاز)، احیای شش الکترونی نیتریت به یون‌های آمونیوم را در کلروپلاست‌ها/پلاستیدهای گیاهان عالی انجام می‌دهد. آپوپروتئین نیتریت ردوکتاز توسط DNAهسته‌ای کدگذاری می‌شود و به عنوان یک پیش ماده حامل یک پسوند N ترمینال، پپتید ترانزیت، سنتز می-شود که پروتئین را به داخل کلروپلاست/پلاستید هدف قرار می‌دهد. در آن گیاهان مورد بررسی تعداد ژن‌های آپوپروتئین نیتریت ردوکتاز در هر ژنوم هاپلوئید از یک (جو، اسفناج) تا چهار (توتون) متغیر است (Wray, 1993). لکه شماره ۲ در شکل ۳، با نقطه ایزوالکتریک فوکوسینگ ۴۸/۵ و وزن ملکولی حدود ۵/۵ کیلودالتون احتمالاً پروتئینی به



شکل ۱- ژل الکتروفورز دوبعدی برگ گندم ریژاو در بازه پی اچ ۳ تا ۱۰ غیرخطی

Figure 3- Two-dimensional electrophoresis gel of Rejaw wheat leaves in the non-linear range of pH 3 - 10



شکل ۲- ژل الکتروفورز دوبعدی برگ گندم ریژاو در بازه پی اچ ۴ تا ۷ خطی

Figure 4- Two-dimensional electrophoresis gel of Rejaw wheat leaves in the linear pH range of 4 - 7

نام Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform1- Carbohydrate metabolism می‌باشد. لکه شماره ۳ در شکل ۳، با نقطه ایزوالکتریک فوکوسینگ ۲۶/۵ و وزن ملکولی حدود ۶/۳ کیلودالتون احتمالاً پروتئینی به نام Dehydroascorbate reductase (DHAR)- Oxidoreductase می‌باشد. دهیدروآسکوربات ردوکتازها (DHARs) آنزیم‌های مهمی هستند که اسید دهیدروآسکوربیک (DHA) را به اسید آسکوربیک (ASC) دوباره تبدیل می‌کند. آنها در پاسخ گیاه به استرس اکسیداتیو، مانند آنچه که توسط مایکوتوکسین بووریسین (BEA) القا می‌شود، نقش دارند (Loi *et al.*, 2020).

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام‌نور، حمایت‌های معنوی جناب آقای دکتر علی مصطفایی (مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه) و همه عزیزانی که در طراحی و انجام این مطالعه همکاری کردند، قدردانی می‌شود.

References

Adhikari, B.M., Bajracharya, A. & Shrestha, A.K. 2016. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (Urtica dioica) flour with wheat and barley flours. Food Science and Nutrition, 4, 119-124.

Bangaru, N.T. & Sarda, M.N. 2018. Two-Dimensional Gel Electrophoresis Seed Proteome Map of Pigmented and Non Pigmented Sorghum Genotypes (Sorghum bicolor L. Moench). European Journal of Experimental Biology, 8 (6), 34-44. doi: 10.21767/2248-9215.100075.
Beyene, B., Haile, G., Matiwos, T. & Deribe, H. 2016. Review on proteomics technologies and its application for crop improvement. Innovative Systems Design and Engineering, 7, 7-15.
Buts, K., Michielssens, S., Hertog, M.L.A.T.M., Hayakawa, E., Cordewener, J., America, A.H.P., Nicolai, B.M. & Carpentier, S.C. 2014. Improving the identification rate of data independent label-free quantitative proteomics experiments on non-model crops: A case study on apple fruit. Journal of Proteomics, 105, 31-45.
Chevalier, F., Martin, O., Rofidal, V., Devauchelle, A.D., Barteau, S., Sommerer, N. & Rossignol, M. 2004. Proteomic investigation of natural variation between Arabidopsis ecotypes. Proteomics, 4, 1372-1381.
Damerval, C., Zivy, M., Granier, F. & Devienne, D. 1989. Two dimensional electrophoresis in plant biology. Advanced Electrophoresis, 2, 263-340.
Haghparast, R., Rajabi, R., Roustaii, M. & Aghaee Sarbarzeh, M. 2013. Rejaw, A New Bread Wheat Cultivar for Rainfed and Supplemental Irrigation in Moderate Cold Regions of Iran. Seed and Plant Journal, 29 (2), 401-403. DOI: 10.22092/spij.2017.111166.
Kakaei, M. 2017. c- Reaction of bean proteome due to the feeding of two-spotted tartan mite Tetranychus urticae Koch with the approach of proteomics technique. Journal of the Entomology Society of Iran, 3, 305 - 320. [In Persian].
Kakaei, M. 2022. Plant Proteomics and Industrial Oil Plants. Agrotechniques in Industrial Crops. Agrotechniques in Industrial Crops (ATIC), 2 (4), 213-220.
Kakaei, M. 2017. b- Changes in alfalfa proteome against the stress caused by the feeding of spotted aphid Monell Therioaphis Trifolii with the help of two-dimensional electrophoresis technique. Applied Biology, 4, 111-125. [In Persian].
Kakaei M. 2017. a- Application of two-dimensional electrophoresis in identifying sources of resistance and susceptibility to yellow rust disease (Puccinia striiformis f. sp. tritici West.) in bread wheat (Triticum aestivum L). Journal of Biotechnology in Agriculture, 9, 1-11. [In Persian].
Kang, S., Chen, S. & Dai, S. 2010. Proteomics characteristics of rice leaves in response to environmental factors. Frontiers in Biology, 5, 246–254. https://doi.org/10.1007/s11515-010-0027-4.
Komatsu, S. & Zang, X. 2007. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochemistry, 68 (4), 426-437. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.005.
Kumar, A., Sengar, R., Rao, V.P., Shukla, G., Dixit, R. & Singh, R. 2017. Assessment of genetic diversity in bread wheat (Triticum aestivum L.) using RAPD markers. Journal of Applied and Natural Science, 9, 1751-1755.
Loi, M., De Leonardis, S., Mulè, G., Logrieco, A.F., Paciolla, C.A. 2020. Novel and Potentially Multifaceted Dehydroascorbate Reductase Increasing the Antioxidant Systems is induced by Beauvericin in Tomato. Antioxidants, 9, 435. https://doi.org/10.3390/antiox9050435.
Labuschagne. M., Masci, S., Tundo, S., Muccilli, V., Saletti, R., & Biljon, A. 2020. Proteomic Analysis of Proteins Responsive to Drought and Low Temperature Stress in a Hard Red Spring Wheat Cultivar. Molecules, 17, 25(6):1366. doi: 10.3390/molecules25061366. PMID: 32192150; PMCID: PMC7144396.
León, E., Marín, S., Giménez, M.J., Piston, F., Rodríguez-Quijano, M., Shewry, P.R. & Barro, F. 2009. Mixing properties and dough functionality of transgenic lines of a commercial wheat cultivar expressing the 1Ax1, 1Dx5 and 1Dy10 HMW glutenin subunit genes. Journal of Cereal Science, 49, 148-156.
León, E., Piston, F., Rodríguez-Quijano, M., Shewry, P.R. & Barro, F. 2010. Stacking HMW-GS transgenes in bread wheat: Combining subunit 1Dy10 gives improved mixing properties and dough functionality. Journal of Cereal Science, 51, 13-20.
Miri, A., Sabouri, H., Hosseini Moghaddam, H., Soughi, H., Mollahshahi, M. & Sajadi, SJ. 2020. Investigation of the genetic structure of wheat (Triticum aestivum L.) grain characteristics by using image processing and generation mean analysis techniques. Journal of Genetic Resources, 6(2), 131-141. doi: 10.22080/jgr.2020.18575.1180.
Mostafaie, A. 2003. Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Yadavaran Publishers. [In Persian].

Raeesi Sadati, S.Y., Jahanbakhsh Godekahriz, S., Ebadi, A. 2016. Expression of Leaf Proteins in Two Cultivars of Bread Wheat under Cadmium and Mercury Stress Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Isfahan University of Technology. Journal of Crop Production and Processing, 5 (18), 233-244.

Shafiei, Y., Mehrabi, A.M., Mostafaie, A. 2020. Identifying the proteins contributing to different growth stages of wheat leaf development by using two dimensional electrophoresis. Modern Genetics Journal, 15 (3), 249-255.

Wray, J.L. 1993. Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher plants. Physiologia Plantarum, 89 (3), 607-612.

Yang, L., Tian, D., Luo, Y., Zhang, R., Ren, C.H. & Zhou, X. 2011. Proteomics-based identification of storage Metabolic and allergenic protein in wheat seed from 2-DE gels. African Journal of Agriculture Research, 6, 808-816.

Zhang, H., Lian, C. & Shen, Z. 2009. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of Oryza Sativa. Annals of Botany, 103(6), 923-30. doi: 10.1093/aob/mcp012. Epub Feb 5. PMID: 19201764; PMCID: PMC2707895.