Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Comparative analysis of two-dimensional electrophoresis of rice endosperm and embryo proteins by using Image Master software

Mehdi Kakaei[1] & Leila Akbari[2]

[1] Associate Professor of Plant Breeding, Faculty of Engineering, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

[2] Assistant Professor of Biotechnology, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Engineering Sciences, Razi University Agriculture and Natural Resources Campus, Kermanshah, Iran.

Corresponding author. E-mail: m.kakaei@pnu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Rice (*Oryza sativa* L.) feeds more than half of the world's population. Rice is considered a model plant in biological and agriculture field research due to its small genome compared with other plants. Storage proteins in the aleurone layer of rice seeds include albumin and globulin, as well as the endosperm, prolamin, and glutelin proteins. To determine the number of proteins and identify the protein spots between the tissues of two embryo samples and rice endosperm, the protein spots were matched according to their expression level in the images obtained from two-dimensional gel electrophoresis.

Materials and methods: The profile of proteins in the endosperm and embryo of rice seeds was determined using isoelectric focusing (IEF) and polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) methods. The Image Master software was utilized to analyze the two-dimensional gels. Considering the importance of local rice consumption in Iran and the significant production of this economically important crop in the country, this study aimed to determine the diversity and differences in the expression of protein spots within the linear pH range of 4 to 7. The two-dimensional electrophoresis method was employed on the Hasan-Sarai variety of rice indigenous to the region of Guilan. For this research, the cultivar being examined was procured from the Guilan Rice Research Center. Subsequent stages of the experiment, including sample separation and total protein extraction, were conducted at the Payame Noor University laboratory in Asadabad. Ultimately, the protein samples obtained were sent to the Health Research Institute at the Faculty of Pharmacy, where two-dimensional electrophoresis was carried out using an isoelectric focusing device. Finally, the extracted protein samples were transferred to the Health Research Institute of the Faculty of Pharmacy to perform two-dimensional electrophoresis using an isoelectric focusing device.

Results: Based on the results of the two-dimensional gel analysis, a large part of the protein spots are present in the pH range of 4 to 7. The analysis of protein profile based on standard proteins with specific molecular weight and isoelectric point indicates that embryo tissue and endosperm based on isoelectric point and molecular weight showed that 284 protein spots in the embryo and 123 protein spots in endosperm have been identified. Among the identified spots, 57 common protein spots showed increased and decreased expression between the two samples. The presence of remaining protein spots in the two samples showed a significant difference between protein content in the embryo and endosperm.

Conclusion: Image master software was used to determine the isoelectric point and molecular weight of protein spots and expression changes between common spots. Analysis was done in protein databases and possible proteins were identified in embryo tissue and endosperm. The proteins identified in rice endosperm and embryo tissue in two-dimensional electrophoresis included grain storage proteins, glutelin precursors, acidic and alkaline glutelins, globulins, prolamins, HSPs, and hypothetical proteins. Therefore, in this way, it is possible to identify the level of expression of proteins and also their biosynthetic pathways.

Keywords: Rice, Embryo, Endosperm, Isoelectric focusing, Molecular Weight, Point Isoelectric.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 14 Nov 2023, **Revised:** 23 Nov 2023, **Accepted:** 07 Dec 2023, **Published online:** 22 Dec 2023

Cite this article: Kakaei, M. & Akbari, L. (2023). Comparative analysis of two-dimensional electrophoresis of rice endosperm and embryo proteins by using Image Master software. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, *2*(4), 418-431. DOI: 10.22126/cbb.2024.10492.1069

© The Author(s).
10.22126/cbb.2024.10492.1069

Publisher: Razi University

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های آندوسپرم و جنین برنج با استفاده از نرم افزار Image Master

مهدی کاکائی[۱] ✉ و لیلا اکبری[۲]

[۱] دانشیار اصلاح‌نباتات، دانشکده فنی مهندسی، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

[۲] استادیار بیوتکنولوژی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

✉ نویسنده مسئول. رایانامه: m.kakaei@pnu.ac.ir

چکیده

مقدمه: گیاه برنج (*Oryza sativa* L.) در تغذیه بیش از نیمی از جمعیت جهان نقش اساسی را ایفا می‌کند. به دلیل کوچک بودن ژنوم این گیاه نسبت به سایر غلات در پژوهش‌های زیستی به عنوان یک گیاه مدل و هم‌چنین در عرصه زراعت یک گیاه اساسی به شمار می‌رود. پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود لایه آلورون در دانه برنج شامل آلبومین و گلوبولین و در آندوسپرم آن شامل پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین می‌باشد. با توجه به اهمیت مصرف برنج‌های محلی در ایران و هم‌چنین میزان تولید این گیاه مهم اقتصادی در کشور، در این مطالعه با هدف تعیین تنوع و تفاوت بیان لکه‌های پروتئینی در بازه اسیدیته خطی چهار تا هفت با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی از برنج بومی گیلان استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: جهت تعیین پروفایل پروتئین‌های موجود در آندوسپرم و جنین دانه برنج از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) به همراه ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) استفاده گردید. جهت تعیین تعداد پروتئین‌ها و هم‌چنین شناسائی لکه‌های پروتئینی بین بافت دو نمونه جنین و آندوسپرم برنج، تطبیق لکه‌های پروتئینی با توجه به میزان بیان آن‌ها در تصاویر حاصل از ژل الکتروفورز دو بعدی از نرم افزار Image master استفاده گردید. برای این منظور رقم حسن‌سرایی از مرکز تحقیقات برنج گیلان تهیه گردید و اجرای بخشی از آزمایش، جداسازی نمونه‌ها و استخراج پروتئین کل سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور اسدآباد انجام شد. در نهایت نمونه‌های پروتئینی استخراج شده جهت انجام مراحل الکتروفورز دوبعدی با استفاده از دستگاه ایزوالکتریک فوکوسینگ به پژوهشکده سلامت دانشکده داروسازی انتقال داده شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ژل‌های دو بعدی، بخش وسیعی از لکه‌های پروتئینی در بازه پی اچ چهار تا هفت حضور داشته‌اند. در بررسی پروفایل پروتئینی نمونه‌های بافت جنین و آندوسپرم بر اساس نشانگرهای پروتئینی استاندارد با وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک مشخص در مرحله دوم الکتروفورز دو بعدی ۲۸۴ لکه پروتئینی در جنین و ۱۲۳ لکه پروئینی در آندوسپرم بر اساس وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک شناسائی شدند. از بین لکه‌های شناسائی شده تعداد ۵۷ لکه پروتئینی مشترک افزایش و کاهش بیان را بین دو نمونه نشان دادند. حضور لکه‌های پروتئینی باقی مانده در دو نمونه اختلاف معنی‌داری بین محتوای پروتئین در جنین و آندوسپرم را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: جهت تعیین احتمالی نوع پروتئین بر اساس نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی و تغییرات بیان بین لکه‌ها با استفاده از نرم افزار، جستجو در بانک‌های اطلاعاتی پروتئینی انجام شد و پروتئین‌های احتمالی تولید شده در بافت جنین و آندوسپرم شناسایی شدند. پروتئین‌هایی که در بافت آندوسپرم و جنین برنج در الکتروفورز دو بعدی شناسایی شدند شامل پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه پیش سازهای گلوتلین، گلوتلین‌های اسیدی و قلیایی، گلوبولین‌ها، پرولامین‌ها، HSPs و Hypothetical Proteins بودند. بنابراین از این طریق می‌توان میزان بیان پروتئین‌ها و هم‌چنین مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها را نیز شناسایی نمود.

واژه‌های کلیدی: برنج، جنین، آندوسپرم، ایزو الکتریک فوکوسینگ، وزن مولکولی، بار الکتریکی.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۹/۰۲ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۶، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

استناد: کاکائی، م. و اکبری، ل. (۱۴۰۲). تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های آندوسپرم و جنین برنج با استفاده از نرم افزار Image Master. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۲ (۴)، ۴۱۸-۴۳۱. DOI: 10.22126/cbb.2024.10492.1069

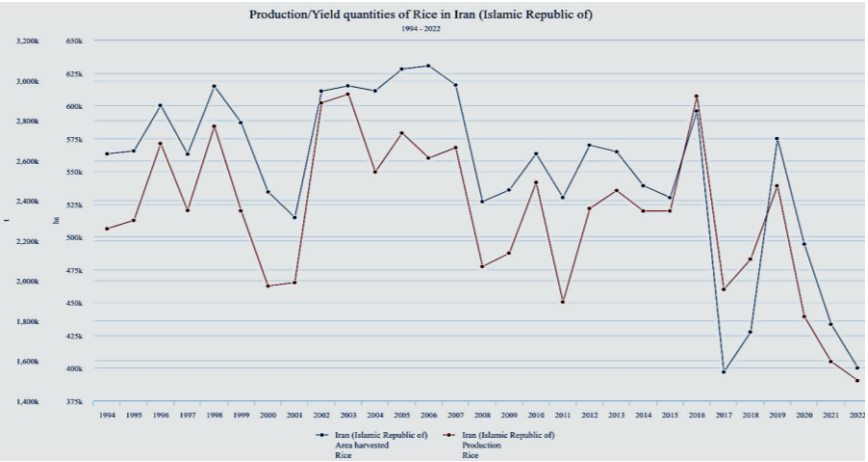
ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

نیمی از مردم دنیا از برنج (*Oryzae sativa* L) به عنوان غذای اصلی استفاده می‌کنند و به علت کوچک بودن ژنوم آن نسبت به سایر غلات به عنوان یک گیاه مدل در پژوهش‌های زیستی مورد توجه می‌باشد (Kakaei, 2023 & Komatsu *et al*., 2003 & Toorchi, 2015). دانه برنج منبع اصلی پروتئین برای انسان، به ویژه در آسیا است. در مقایسه با سایر غلات، برنج دارای محتوای پروتئین نسبتاً کمی است که از ۷ تا ۱۰ درصد وزن خشک دانه متغیر است.



شکل ۱- میزان تولید و سطح زیر کشت برنج به عنوان سومین محصول اقتصادی دنیا در ایران بر اساس آمار(FAO, 2022)

Figure 1- Production and cultivated area of rice as the world's third economic product in Iran according to statistics (FAO, 2022)

کشورهای چین، هند، اندونزی، بنگلادش، ویتنام، تایلند، میانمار، فیلیپین، ژاپن و برزیل به ترتیب بزرگ‌ترین تولید کننده برنج در دنیا هستند. سهم قاره‌ها به ترتیب در تولید برنج بر اساس آمار فائو، قاره‌های آسیا، آمریکا، آفریقا، اقیانوسیه و اروپا به ترتیب ۹۰/۵ ٪، ۴۵/۱ ٪، ۳/۸ ٪، ۰/۱ ٪ و اروپا ۰/۵ ٪ از تولید برنج دنیا را بر عهده دارند. میزان سطح زیر کشت و میزان تولید برنج در ایران به ترتیب برابر با ۴۰۰ هزار (هکتار) و یک میلیون و پانصد هزار تن گزارش شده است (FAO, 2022). بیش از ۱۳ درصد از پروتئین‌های مورد نیاز بدن انسان توسط غلات تأمین می‌گردد، در میان غلات برنج به عنوان ارزان‌ترین منبع انرژی، هم‌چنین قابلیت نگه‌داری برای مدت زمان طولانی شناخته شده است (Francais,2007).

برنج یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی و منبع اصلی تغذیه برای حدود ۲/۵ میلیارد نفر در سراسر جهان است که از خانواده Poaceae است. جنس *Oryza* شامل ۲۵ گونه پراکنده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است. محصول برنج می‌تواند به طور مؤثر در طیف گسترده‌ای از شرایط کشاورزی- اقلیمی زنده بماند و رشد کند (Kim *et al*., 2014). برنج به طور کلی حاوی ۸۰

درصد کربوهیدرات، هفت تا هشت درصد پروتئین، سه درصد چربی و سه درصد فیبر و سرشار از عناصر پتاسیم، سدیم، منیزیم، روی و کلسیم است.

الکتروفورز ژل پلی آکریلامید سدیم دودسیل سولفات ابزار مفیدی برای مطالعه تنوع ژنتیکی است(Akbar *et al*., 2012). SDS-PAGE یک روش قابل اعتماد برای تجزیه و تحلیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در مدت زمان کوتاهی می باشد، زیرا این پروتئین ها تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و چند شکلی بالایی را نشان می‌دهند (Zada *et al*., 2013). در سال ۱۹۷۵روش الکتروفورز دوبعدی به‌منظور الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی توسط O' farrell بکار برده شد، با توجه به توانایی بالای این روش در جداسازی پروتئین‌ها ، مشکلاتی از قبیل حساسیت‌ها بالا و سختی‌های کار نیز در مراحل انجام این تکنیک وجود دارد. در تکنیک پروتئومیکس علاوه بر شناسایی پروتئین‌هایی که در یک سلول و در یک شرایط خاص بیان می‌شوند، رفتار و عملکرد پروتئین‌ها، برهم کنش‌های پروتئین‌های مختلف، تغییرات پس از ترجمه بر روی پروتئین‌ها و هم‌چنین نیمه عمر آن‌ها در سلول نیز مورد بررسی قرار می گیرد (Mechin *et al*., 2003). بررسی پروتئوم بافت‌های مختلف شامل برگ، ساقه، دانه و کالوس در گیاهان مختلف یکی از کاربردهای پروتئومیکس در اصلاح نباتات می‌باشد (Kahrizi, 2016). در فرآیندی بنام الکتروفورز دوبعدی، با ترکیب ایزوالکتریک و الکتروفورز با SDS[1] می‌توان مجموعه‌ای از پروتئین‌های درون سلول‌ها را تفکیک نمود. تکنیک الکتروفورز دو بعدی نسبت به روش‌های الکتروفورز ساده، به عنوان یک روش تحلیلی با حساسیت بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد. با الکتروفورز دوبعدی، پروتئین‌های دارای وزن مولکولی مشابه با PI[2] متفاوت و هم‌چنین پروتئین-هایی با مقادیر مشابه نقطه ایزوالکتریک و وزن‌های مولکولی متفاوت، قابل جداسازی و تفرق هستند. پیشرفت‌ها در حوزه‌ی پروتئومیکس سبب گردید که الکتروفورز دوبعدی به عنوان یک روش بسیار جذاب به-منظور جداسازی نمونه‌های پروتئینی تبدیل گردد (Mohammadi, 2016). پیشرفت‌های حاصل از تکنیک الکتروفورز دوبعدی را می‌توان به حضور دستگاه طیف سنج جرمی جهت شناسایی پروتئین‌ها و افزایش تعداد پروتئین‌های توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی از جمله عواملی هستند که باعث توانمندی روش پروتئومیکس در تشخیص پروتئین کل بیان شده و پروتئوم سلول‌ها در شرایط تنوع می‌باشد (Mehrabi *et al*., 2013). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برنج به طور کلی به آلبومین‌های محلول در آب، گلوبولین‌های محلول در نمک، پرولامین‌های محلول در الکل و گلوتلین‌های محلول در اسید یا قلیایی تقسیم‌بندی می‌شوند. ارزش غذایی برنج را می‌توان با افزایش محتوای پروتئین آن افزایش داد.

در بررسی بر روی گرده بالغ آرابیدوپسیس تالیانا با استفاده از الکتروفورز دو بعدی نتایج نشان داده است که

[1] Sodium dodecyl sulfate

[2] Point Isoelectric

گرده بالغ شامل پروتئین‌هایی برای جوانه‌زنی و رشد سریع لوله گرده است (Rachel *et al.*, 2005).

در مطالعه پروتئوم دانه گندم در دو مرحله توسعه (۱۷ روز بعد از گلدهی) و بلوغ (۴۵ روز بعد از گلدهی) با الکتروفورز دو بعدی حدود ۱۳۰۰ پلی پپتید شناسایی شده است. جداسازی بعد اول با ایزوالکتروفوکوسینگ با دو دامنه۱۱-۷ و۶-۴ انجام شد. در کل ۳۲۱ پروتئین ارائه شدندکه از این میان در همه ژل‌ها ۵۵ درصد لکه های مشترک حضور داشته‌اند. پروتئین‌های بیان شده در دو مرحله مورد بررسی توسط نرم افزار Image master مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق، تأثیر شرایط محیطی را روی پروفایل پروتئینی در مراحل مختلف رشدی گیاه را فراهم کرد(Skylas *et al.*, 2004).

پروتئین‌های دانه گندم با استفاده از دو پیش ماده جوانه زنی، برای مطالعه پروفایل پروتئینی ارقام حساس و ارقام مقاوم با تکنیک الکتروفورز دو بعدی در حضور IEF با نوارهایی با pH سه تا ده مورد بررسی قرار گرفته اند. بر اساس نتایج پروفایل‌های پروتئینی حاصل در نه گروه شامل: متابولیسمی، ذخیره‌ای، فتوسنتزی، آمینواسیدی، حساسیتی، تنشی، سنتزی، آنزیمی و پروتئین‌های فرضی دسته‌بندی شدند(Abu Hena *et al.*, 2010).

در بررسی پروفایل پروتئینی دانه گندم و جو و هم چنین مقایسه محتوای پروتیینی دو نمونه با استفاده از الکتروفورز دو بعدی در محدوده pH (۱۱-۳) و هم چنین محدوده pH (۶-۱۱) جهت شناسایی پروتئین-های گلوتن، پس از بررسی و آنالیز ژل‌های حاصل با استفاده از نرم افزار نتایج نشان داده است که قسمت عمده پروتئین های دانه غلات پروتئین‌های ذخیره ای است. در بررسی سایر پروتئین‌ها پروتئین‌های بازدارنده آلفا-آمیلاز و بازدارنده آلفا-آمیلاز تریپسین بیشترین بیان را در هر دو نمونه گندم و جو داشته‌اند. پروتئین‌های ذخیره‌ای جو شباهت بیشتری به پروتئین‌های پرولامین گندم داشته است، اما در برخی از مشاهدات تفاوت در مقدار پروتئین نیز مشاهده شده است. بیشترین شباهت بین پروتئین‌ها در محدوده pH=۷-۱۰ مشاهده شده است که پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۵۵-۴۵ کیلو دالتون را داشته‌اند(Milan *et al.*, 2012).

در مطالعه‌ای با عنوان مقایسه پروتئینی گندم نان رقم ریژاو بر اساس بازه‌ی اسیدیته نتایج نشان داد که تغییرات وضوح پروتئین‌های بیان شده در دو اسیدیته چهار تا هفت خطی و سه تا ده غیرخطی متفاوت بود و به عبارت دیگر در هر دو بازه اسیدیته لکه‌های پروتئینی امکان بروز داشته‌اند و هم‌چنین بر اساس تحقیق فوق بیشتر پروتئین‌های گیاهی در بازه‌ی اسیدیته چهار تا هفت بیان خود را نشان داده اند (Kakaei, 2023). در پژوهشی دیگر در ارزیابی تنوع بیان پروتئین‌های محور جنین در دو رقم برنج حسنی و سنگ جو با کمک الکتروفورز دوبعدی بیان داشته‌اند که در بررسی ژل‌های الکتروفورز دوبعدی در محور جنین برنج، ۳۲۸ لکه تکرارپذیر مشاهد گردید که ۶۳ لکه در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. هم‌چنین از بین تمامی پروتئین‌های پاسخ

دهنده ۷۶/۲ درصد لکه‌ها دارای افزایش بیان و ۲۳/۸ درصد دارای کاهش بیان بودند که در واقع رقم متحمل به شوری سنگ‌جو تحمل تقریباً مناسبی نسبت به شوری داشته است (Kakaei & Kiani, 2019). پیشرفت‌های اخیر درباره تکنیک الکتروفورز دوبعدی سبب توسعه روش‌های استخراج پروتئین (Herbert, 1999) و بارگذاری عصاره پروتئینی در ژل‌ها و تجزیه آن‌ها گردیده است (Molloy, 2000). این تحقیق با هدف بررسی پروفایل پروتئینی بافت جنین و آندوسپرم دانه برنج رقم حسن‌سرایی(رقم محلی) با کمک تکنیک الکتروفورز دوبعدی به نوع پروتئین‌های بیان شده، اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

برنج رقم حسن سرایی جزء ارقام مقاوم به شوری و دارای آمیلوز مناسب جهت پخت است. از لحاظ شکل ظاهری به صورت یک دست و استخوانی و دارای کیفیت پخت و عطر مطلوب می‌باشد. این رقم به عنوان توده محلی استان گیلان از مرکز تحقیقات برنج شمال کشور تهیه گردید. این بررسی جهت مطالعه الگوی پروتئوم بافت آندوسپرم و جنین دانه در سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور اسد آباد (همدان) و آزمایشگاه پژوهشکده سلامت دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی (کرمانشاه) انجام شد.

استخراج پروتئین از بذر برنج

در این تحقیق، استخراج پروتئین از نمونه‌های بافت دانه برنج به روش شین و همکاران (Shen *et al.*, 2002) با اندکی تغییرات انجام گردید. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از آرد آندوسپرم و جنین برنج در بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار، EDTA[3] ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میلی‌مولار PMSF[4]، ۱ میلی‌مولار DTT [5] و ۱٪ تریتون X-100 حل گردید و بعد از هموژن کردن و ورتکس کردن آردها در بافر، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰g (۱۳۰۰۰rpm) و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی به تیوپ جدید منتقل و به آن ۵ برابر حجم محلول استون حاوی ۱۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید[6]TCA و ۲۰ میلی‌مولار DTT اضافه سپس در فریزر ۲۰- به مدت یک شب نگهداری گردید. تیوب‌ها را در ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی جدا و رسوب حاصل ۵ مرتبه با محلول استون حاوی ۲۰ میلی‌مولار DTT شسته شد. در پایان هر مرحله مطابق مراحل قبل سانتریفیوژ انجام و مجدداً شستشو انجام می‌گردید (Yang *et al.*, 2006). رسوب را در بافر(لیز الکتروفورز) تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۸ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴٪ Chaps، ۸۰ میلی‌مولار DTT، ۲ ٪ IPG buffer و ۱ میلی‌مولار PMSF حل کرده و جهت انجام مراحل بعدی در یخچال نگه داری گردید (Mustafaei, 2012).

---

[3]- Ethylene diamine tetra acetic acid
[4]- Phenyl methyl sulfonyl fluoride
[5] Dithiothreitol
[6] Trichloro acetic acid

تعیین غلظت (مقدار کمی) پروتئین

تعیین غلظت پروتئین‌های به‌دست آمده (پروتئین کل نمونه‌ها) با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) و با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام گردید.

الکتروفورز بعد اول (Iso Electric Focusing)

بعد اول با استفاده از دستگاه Ettan IPGphor 3 ساخت شرکت GE انجام شد و ۴۵ کیلوولت ساعت به مدت ۱۲ ساعت به استریپ‌ها با pH ۴ تا ۷ با اندازه ۰/۵×۳×۱۸۰ میلی‌متر ساخت Amersham Bioscience اعمال شد (جدول ۱). بعد دوم آن بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲/۵ درصد انجام گردید (Mustafaei, 2012). نهایتاً ژل‌ها با اسکنر تصویربرداری، با فرمت TIFF ذخیره و با نرم افزار Image master از نظر اختلاف در بیان پروتئین‌ها مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- برنامه فوکوسینگ مورد استفاده مولتی‌فورIII

Table 1- Focusing programme used 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

الکتروفورز بعد دوم(SDS-PAGE)

جهت انجام بعد دوم از تانک الکتروفورز ساخت شرکت پارس ژن استفاده گردید. ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد انتخاب گردید. بعداز تهیه ژل SDS-PAGE، نوار ژل(strip) بعد اول به مدت ۲۰ دقیقه در محلول متعادل کننده قرار داده شد و بعد از اتمام بعد دوم رنگ‌آمیزی با کمک کوماسی‌بلوبریلیانت R-250 صورت پذیرفت. پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با دستگاه Image scanner II ساخت شرکت فارماسیا اسکن گردید و به فرمت TIFF ذخیره شدند. جهت مطالعه کمی و کیفی لکه‌ها در نمونه‌های مختلف از نرم‌افزار Melanie 6 (Gene Bio, Geneva, Switzerland) استفاده گردید. بعد از شناسایی لکه‌ها بر روی ژل و ویرایش دستی با کمک نرم‌افزار لکه‌ها بطور اتوماتیک با هم جفت شدند و بر مبنای درصد حجمی لکه‌های معنی‌دار بین دو تیمار به عنوان لکه‌های نامزد در نظر گرفته شدند. وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی در ژل-

ها با الکتروفورز هم‌زمان نشانگرهای پروتئین‌های استاندارد تخمین زده شد. نقطه ایزوالکتریک یا محل قرار گرفتن لکه پروتئینی بر روی نوار ۱۳ سانتی‌متری با محدوده pH=4-7 خطی مشخص شد. جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای هر لکه تعیین شد و با جستجو در مقالاتی که در این زمینه مورد بررسی قرار گرفته بودند، اطلاعات موجود لکه‌ها، محل قرار گرفتن لکه‌ها و هم‌چنین تفاوت شکل آن‌ها لکه‌ها به طور احتمالی شناسایی شدند.

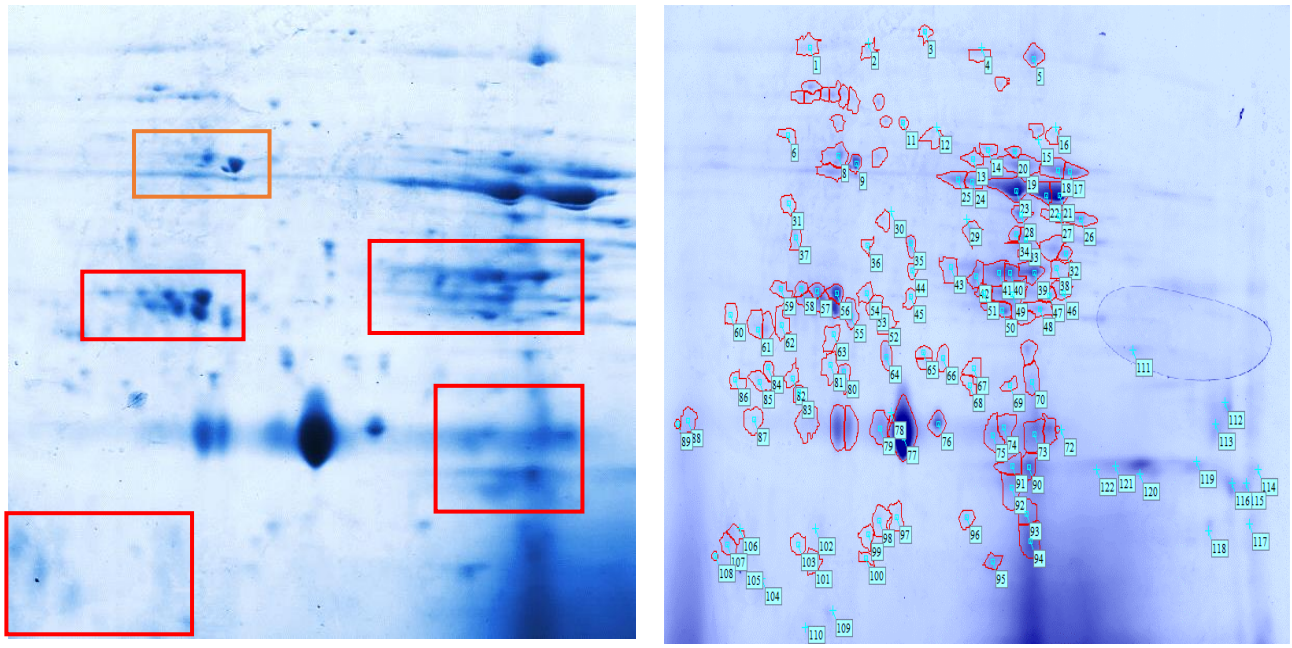
نتایج و بحث

در ارزیابی و سنجش جامع تغییرات مولکولی ایجاد شده در بیان پروتئین‌های محور جنین و آندوسپرم برنج با روش الکتروفورز دوبعدی، تنوع موجود در الگوی پروتئینی جنین در مقایسه با آندوسپرم تعداد و بیان بیشتری را به خود اختصاص داده است. تجزیه و تحلیل پیگیری و شناسایی کل پروتئین‌های آندوسپرم و جنین در رقم برنج حسن سرایی نشان داد، که گلوتلین و پیش‌ساز گلوتلین بیشترین تغییرات را در بین پروتئین‌های دانه و در میان آن‌ها پروتئین‌های مرتبط با کیفیت اصلی نشان داده‌اند(شکل ۲ و ۳). پیش ساز گلوتلین ممکن است از طریق الگوهای برش متفاوت به زیر واحدهای پروتئینی مختلف پردازش شود. پیش ساز گلوتلین نوع A_2 از طریق شکاف در برنج کشت شده به زیرواحد پروتئین سه نقطه پردازش شده است، در حالی که از طریق یک روش برش جدید پس از ترجمه به زیر واحدهای پروتئینی سه نقطه دیگر نیز تبدیل می‌شود و نتایج مربوط به پروتئین‌های دانه در برنج توسط سایر محققین در این زمینه گزارش شده است(Koshino *et al.*, 2008; Kawa katsu *et al.*, 2010).

ترکیبات دانه برنج شامل پروتئین، چربی، مواد معدنی و ویتامین‌ها است. با توجه به اینکه بخش اعظم محتوای آندوسپرم برنج را نشاسته تشکیل می‌دهد . بر اساس تصاویر دو بعدی حاصل از محتوای پروتئین آندوسپرم و جنین رقم مورد مطالعه، نتایج حاکی از آن است که محتوای پروتئین در جنین برنج بیشتر از آندوسپرم بوده است(شکل ۲ و ۳). در لایه‌ی آلورون میزان پروتئین‌ها، چربی و ویتامین‌ها به مراتب بیشتر از بخش آندوسپرم است و نتایج حاصل از تصاویر الکتروفورز دو بعدی و تفسیر آن‌ها با نتایج تحقیقات دیگر در این خصوص مطابقت دارد (Jiang *et al.*, 2014 a).

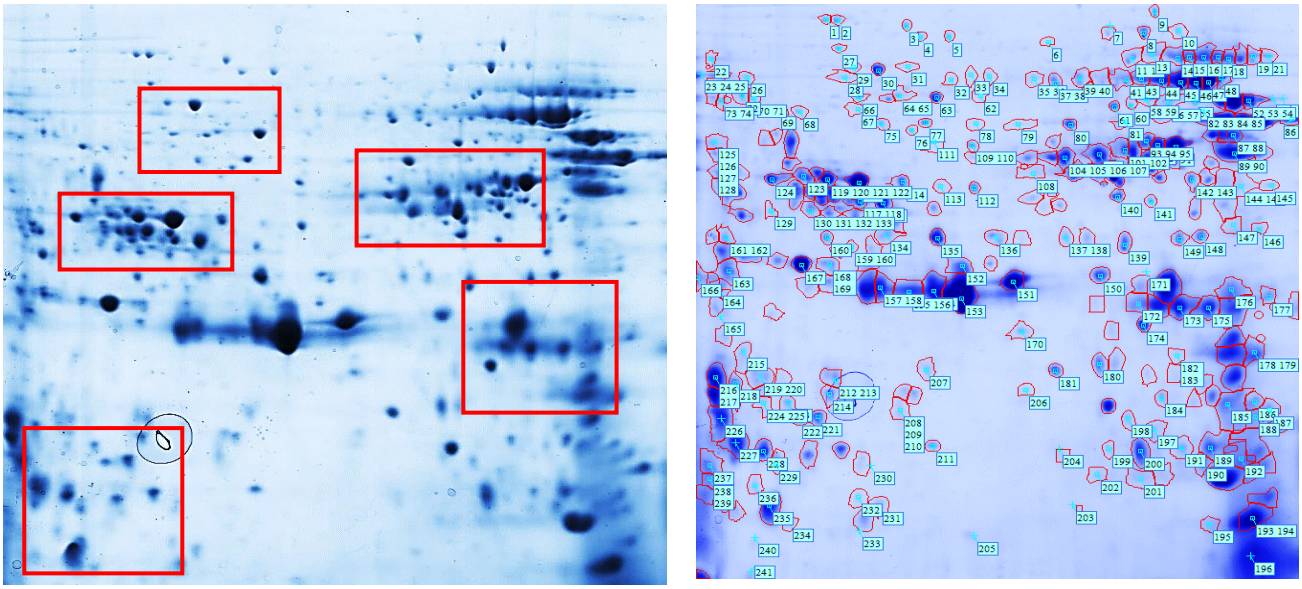
در خصوص مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای نیز بر اساس وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک، لکه‌های پروتئینی گلوتلین در محدوه‌ی ۳۴ کیلودالتون و نقاط ایزوالکتریک ۵/۵، ۵/۷۲ و ۵/۹۵ قرار گرفته‌اند و بیان آن‌ها در پروفایل جنینی بیشتر از آندوسپرم بوده است(شکل ۴). بخش اعظم پروتئین‌های دانه برنج شامل، زیر واحدهای اسیدی، پیش سازهای گلوتلین و زیر واحدهای پایه گلوتلین می‌باشد. علاوه بر موارد فوق، پروتئین‌های مربوط به چرخه سلولی، آلرژن‌ها، بتاگلوکوسیداز، پروتئین های شوک حرارتی و موارد یگری نیز بیان داشته‌اند. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از نرم افزار Image master و تحقیقات مختلف بر روی دانه برنج می‌توان بیان داشت که زیرواحدهای آلفا گلوبولین و گلوتلین در محدوده‌ی ۱۵

تا ۲۰ کیلودالتون قرار دارند. پیش سازهای پروگلوتلین با دو زیر واحد در محدوه‌ی ۶۰-۵۵ و ۷۰ کیلودالتون قرار گرفته‌اند(شکل ۲ و۳). با توجه به اینکه پرولامین‌ها در مطالعات مختلف نیز در وزن‌های مولکولی مختلف به دست آمده‌اند. حضور پرولامین در این تحقیق در محدوه‌ی ۳۵ کیلودالتون با نقطه‌ی ایزوالتریک ۷/۳۶می‌باشد و نتایج نشان داده است که با توجه به حضور بیشتر پرولامین‌ها در آندوسپرم میزان بیان این پروتئین در آندوسپرم بیشتر از بافت جنین بوده است(شکل ۴).



شکل ۲- الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی و شناسائی لکه‌های پروتئینی آندوسپرم برنج در محدوده اسیدیته ۴ تا ۷ با نرم افزار Image Master

Figure 2- The pattern resulting from two-dimensional electrophoresis of extracted proteins and identification of rice endosperm protein spots in the acidity range of 4 to 7 with Image Master software.

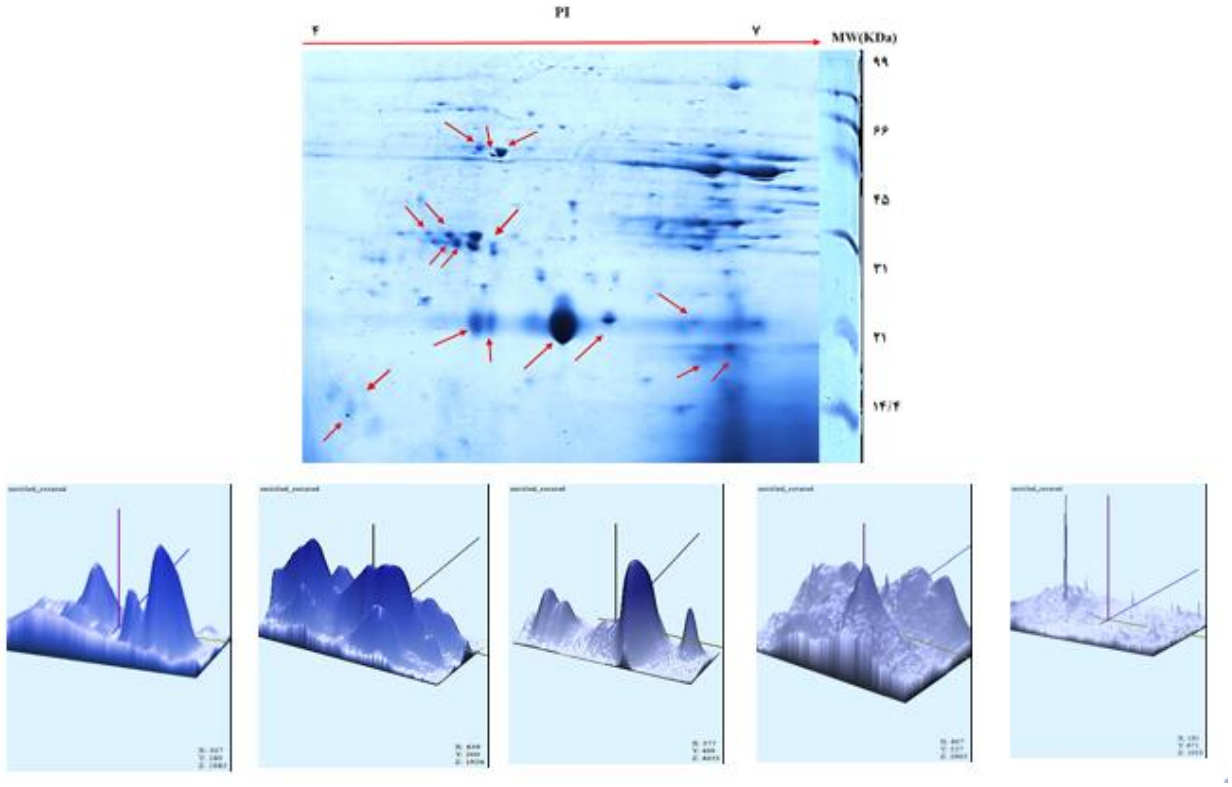


شکل ۳- الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی و شناسائی لکه‌های پروتئینی جنین برنج در محدوده‌هاسیدیته۴ تا ۷ با استفاده از نرم افزار Image Master

Figure 3- The pattern resulting from the two-dimensional electrophoresis of the extracted proteins and the identification of the protein spots of the rice embryo in the acidity range of 4 to 7 using Image Master software.

پروتئین‌های دانه برنج در دو نوع پروتئینی PB-I (PB) و PB-II قرار دارند. PB-I حاوی پرولامین است، در حالی که PB-II غنی از گلوتلین و گلوبولین است. علاوه بر این، PB-I کمتر از PB-II قابل هضم است(Jiang *et al.*, 2014 (a,b). نشان می دهد که پرولامین موجود در PB-I از نظر تغذیه‌ای کمتر از گلوتلین در PBII برای مصرف انسان معنی‌دار است (Yamagata *et al.*, 1982). پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک (HSPs) گروه متنوعی از پروتئین‌ها هستند و در گونه‌های گیاهی بسیار فراوان هستند. HSPs ها به طور خاص در دانه بیان می-شوند. در بررسی پروفایل پروتئینی بین آندوسپرم و جنین نیز نتایج نشان داده است که پروتئین‌های شوک حرارتی بیان بیشتری را در تعداد نسبت به لکه‌های پروتئینی در آندوسپرم داشته‌اند. با توجه به تحقیقات متعدد پروتئین‌های شوک حرارتی با وزن مولکولی بین ۱۸- ۲۰ کیلو دالتون در مراحل خشک شدن دانه بیان بیشتری داشته‌اند و به عنوان مولکول‌های چاپرون عمل می‌کنند. فعالیت چاپرونی OsHSP18.2 افزایش را نشان داده است، زیرا در جلوگیری از غیرفعال‌سازی حرارتی سیترات سنتاز مؤثر بوده است. OsHSP18.2 یک پروتئین مرتبط با پیری و قدرت بذر است. OsHSP18.2 یک ژن بدون اینترون است که برای پروتئین آن ۱۶۶ اسید آمینه با نقطه ایزوالکتریک ۵/۶۱ و جرم مولکولی پیش بینی شده ۱۸/۲ کیلو دالتون را کد می‌کند (Kaur *et al.*, 2015). درنتیجه‌ی آنالیز ژل‌های الکتروفورز دوبعدی در محور جنین برنج در دو رقم متحمل و حساس

به شوری (به‌ترتیب حسنی و سنگ‌جو) ، ۳۲۸ لکه تکرارپذیر مشاهده گردید که ۶۳ لکه در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. اختلاف معنی‌دار بین دو رقم، نشان داد که احتمالاً رقم متحمل جهت مقابله با تنش شوری ویژگی تحمل به تنش را داشته‌اند. با توجه به تعداد بیش‌تر بیان لکه‌های افزایشی در رقم متحمل حسنی نسبت به تنش شوری، و کاهشی بودن بیان لکه‌ها در رقم حساس سنگ جو، می‌توان بیان داشت که رقم متحمل بیان پروتئین بیشتری داشته است(Kakaei & Kiani, 2019).



شکل ۴- تصاویر سه بعدی لکه‌های پروتئینی بین دو نمونه آندوسپرم و جنین برنج رقم حسن سرایی در پنج موقعیت با بیشترین اختلاف

Figure 4- Three-dimensional images of protein spots between two samples endosperm and embryo rice of Hasan Saraei variety in five positions with the greatest difference.

تحقیقات بر روی HSP های کوچک بیشتر به سمت تحمل به تنش گیاهی تأکید شده است، با این حال، نقش آن‌ها در فیزیولوژی بذر به درستی مشخص نشده است، به ویژه در برنج که اکثر HSPs ها به طور خاص در دانه بیان می‌شوند و هم‌چنین در تحمل خشکی و افزایش طول عمر بذر نیز نقش اساسی دارند(Sarkar *et al.*, 2009). به‌طورکلی، نتایج حاصل از بررسی پروفایل پروتئینی آندوسپرم و جنین دانه برنج نشان داد که با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی و هم‌چنین نرم‌افزار و آنالیزهای آماری، به سادگی می‌توان تغییرات بیان

معنی‌دار ناشی از تفاوت بین دو بافت را در سطح پروتئوم بذر مورد ارزیابی قرار داد و تغییرات شاخص را با تکنیک ایزوالکتریک فوکوسینگ مشخص نمود.

نتیجه‌گیری

بر اساس پروفایل پروتئینی دانه برنج می‌توان بیان داشت که میزان پروتئین دانه در برنج در مقایسه با سایر غلات بسیار کمتر است. با توجه به مراحل الکتروفورز دو بعدی می‌توان پروتئین‌های بیشتری را در مقایسه با روش معمول SDS-PAGE در نمونه‌های مختلف شناسائی کرد. بر این اساس گلوتلین و پرولامین دو پروتئین ذخیره اصلی در دانه برنج هستند. گلوتلین حاوی مقدار بیشتری اسید آمینه ضروری لیزین است و پرولامین به طور کلی غنی از اسید آمینه لوسین است. اما از نظر لیزین و اسیدهای آمینه حاوی گوگرد ضعیف است(Kawakatsu *et al.*, 2010). با توجه به تعیین پروفایل پروتئینی آندوسپرم و جنین برنج و اهمیت این محصول اقتصادی در صورت امکان می‌توان بیان داشت که ارزش غذایی برنج را می‌توان با استفاده از روش‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی و هم‌چنین با توجه به تنوع بالای ارقام برنج محلی در کشور، با افزایش محتوای پروتئین های ذخیره‌ای گلوتلین و گلوبولین به واسطه هضم آسان‌تر آن‌ها و در عین حال کاهش میزان پرولامین تغییر و افزایش داد.

سپاسگزاری

از کمک‌های معنوی دکتر علی مصطفایی و سرکار خانم سارا کیانی به خاطر راهنمایی‌های مربوط به آزمایشگاه الکتروفورز دو بعدی در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و دکتر علی عبادی مرکز تحقیقات برنج گیلان جهت در اختیار قرار دادن بذر رقم برنج مورد مطالعه و همه عزیزانی که در شکل‌گیری این مطالعه دخیل بودن کمال احترام و سپاسگزاری را داریم.

References

Abu Hena, M. K., K, Kim., K, Shin., J, Choi., B, Baik., H, Tsujimoto., H, Young Heo., Ch, Park and S, Woo. 2010. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Australian Journal of Crop Science. 4, 3, 196-208.

Akbar, F., Y, Nahida., R, Malik., S, Zabta, M, Mehraj. 2012. Study of total seed proteins pattern of sesame (Sesamum indicum L.) landraces via sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Pakistan Journal of Botany. 44, 2009-2014.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. Anal. Biochemistry. 72: 680-685.

Francais, E. 2007. The biology of (Triticum turgidum ssp. Durum). Biology document: 1-20.

Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilization for two- dimensional electrophoresis. Electrophoresis. 2, 660-663. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683.

Jiang, C., Cheng, Z., Zhang, C., Yu, T., Zhong, Q., Shen, J. Q., & Huang, X. 2014. Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the Oryza genus. Proteome Science, 12, 1, 51. https://doi.org/10.1186/s12953-014-0051-4.(a)

Jiang, L, L., H,W, Zhou., H, Y, Zhang., P, A, Zhong., Y, J, Huang. 2014. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress. Journal of Experimental Botany, 65, 2, 655–671. https://doi.org/10.1093/jxb/ert435.

Kahrizi, D. 2016. New topics in biotechnology. Razi University Press. (In Persian)

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. https://doi: 10.22126/cbb.2023.8928.1040.

Kakaei, M., & Kiani, S. 2019. Evaluation of Proteins Expression Differences of Royan Axes in Two Cultivar of Rice with Two-dimensional Electrophoresis., biannual journal of biotechnology in agriculture (scientific-research). 10, 1, 43-53. https://doi: 10.22084/ab.2020.18624.1404.

Kaur, H., Petla, B. P., Kamble, N. U., Singh, A., Rao, V., Salvi, P., Ghosh, S., & Majee, M. 2015. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. Frontiers in plant science, 6, 713. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00713.

Kawakatsu, T., Hirose, S., Yasuda, H. and Takaiwa, F. 2010. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. Plant Physiol. 154: 4. 1842-1854.

Khan, S. A., Shinwari, Z. K., & Rabbani, M. A. 2013. Study of total seed protein pattern of rice (Oryza sativa L.) breeding lines of Pakistan through SDS-PAGE. Pakistan Journal of Botany, 45, 3, 871-876. http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45(3)/20.pdf.

Kim, H., Lee, K., Hwang, H., Bhatnagar, N., Kim, D. Y., Yoon, I. S., Byun, M. O., Kim, S. T., Jung, K. H., & Kim, B. G. 2014. Overexpression of PYL5 in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. Journal of experimental botany. 65(2), 453–464. https://doi.org/10.1093/jxb/ert397.

Komatsu, S., Konishi, H., Shen, S., Yang, G. 2003. Rice Proteomics, A step toward functional analysis of the rice genome. Molecular & Cellular Proteomics. 2, 1, 1-10. https://doi: 10.1074/mcp. R200008-MCP200.

Koshino, L.L., Gomes, C.P., Silva, L.P. Eira, M.T.S., JR, C.R., Franco, O.L., Mehta, A.N. 2008. Comparative Proteomical Analysis of Zygotic Embryo and Endosperm from Coffea arabica Seeds. Journal of Agricultural Food Chemistry. 56, 10922–10926. https:// doi: 10.1021/jf801734m.

Mechin, V., L, Consoli., M, Guilloux and C, Damerval. 2003. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. Proteomics 3, 1299-1302. https://doi: 10.1002/pmic.200300450.

Mehrabi A M, Mostafaie A, Majidi Harvan A, Haghparast R, Kahrizi D.2013. The comparison of leaf protein patterns between two tolerant and susceptible varieties of wheat under drought stress. International Journal of Food. Agriculture & Environment 19, 935-946. https://doi: 10.4141/CJPS2013-155.

Milan, Ch., E, Palencarova., Z, Galova., Z, Balazova and M, Tomka. 2012. Proteomics Analysis of Wheat and Barely grain. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 1, 622-631.

Mohammadi Alagoz, S.M., Toorchi, M., & Bandehagh, A. 2016. Canola seedling response to NaCl stress – a proteomic approach. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-napoca, 44, 361-366. https://doi:10.15835/NBHA44210462.

Molloy M. P. (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. Analytical biochemistry, 280(1), 1–10. https://doi.org/10.1006/abio.2000.4514.

Mustafaei, A. 2012. Theoretical and practical guide for protein electrophoresis in gel. Kermanshah University of Medical Sciences - second edition, 178 pp. (In Persian)

O'Farrell. P.H., 1975. High resolution tow-dimensional electrophoresis of proteins.

Rachel, H., C. K. Tanaka., W. H. Vensel., W. J. Hurkman and Sh., McCormick. 2005. Proteome mapping of mature pollen of Arabidopsis Thaliana. Journal of Proteomics. 5, 4864–4884.

Sarkar, N. K., Kim, Y. K., and Grover, A. (2009). Rice HSPs genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. BMC Genomics 10, 393. https://doi: 10.1186/1471-2164-10-393.

Skylas, D, J., D, Van Dyk., C.W. Wrigley. 2004. Proteomics of wheat grain. Journal of Cereal Science. 41: 165-179. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.08.010.

Shen, S., Matsubae, M., Takao, T., Tanaka, N. and Komatsu, S. 2002. A proteomic analysis of leaf sheats from rice. Journal of biochemistry. 132,4,613-20.

Toorchi, M. 2015. The response of rice root to time course water deficit stress-two dimensional electrophoresis approach. Journal of Crop Eco physiology, 9, 371-385. (In Persian).

Xu, H., Zhang, W., Gao, Y., Zhao, Y., Guo, L. and Wang, J. 2012. Proteomic analysis of embryo development in rice (Oryza sativa). Planta. 235, 4, 687-701.

Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K., & Kasai, Z. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. Plant physiology.70, 4, 1094–1100. https://doi.org/10.1104/pp.70.4.1094.

Yang, P., Shen, S. and Kuang, T. 2006. Comparative Analysis of the Endosperm Proteins Separated by 2-D Electrophoresis for Two Cultivars of Hybrid Rice (Oryza sativa L.). Journal of Integrative Plant Biology. 48, 9,1028-33.

Zada, M., Z.K. Shinwari, N. Zakir and M.A. Rabbani. 2013. Study of total seed storage proteins in Ethiopian mustard (Brassica carinata A. Braun) germplasm. Pakistan Journal of Botany, 45:443-448. https://doi: 10.14419/ijbasv3i2.2336.