نشانگرهای مولکولی:

این نشانگرها معمولا بر اساس خصوصیات مولکولی پروتئینها-آنزیم یا DNA استوار می باشند.

این نشانگرها دو دسته اند:

- ✓ **نشانگرهای پروتئینی (آنزیم)**
- ✓ **نشانگرهای DNA**

Protein (biochemical) markers

Protein markers are usually named 'biochemical markers' but, more and more, they are mistakenly considered as a common class under the so-called 'molecular markers'.

- Based on the migrational properties of proteins, which allow separation by electrophoresis

- Detected by specific histochemical assays

-Advantages:

- •Require relatively simple equipment
- •A robust complement to the morphological assessment of variation

- Disadvantages:

- •Subject to environmental influences
- • Limited in number

Protein markers (seed storage proteins and isozymes) are generated through electrophoresis.

Protein markers are also limited by being influenced by the environment and changes in different developmental stages.

Plant genetic diversity can be measured through genetic markers—morphological, biochemical and molecular.

Proteins have many different functions, both structural and functional.

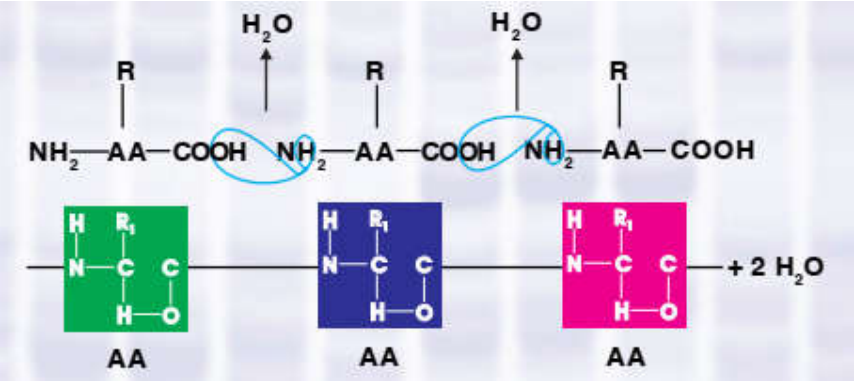
Amino acids are bi-functional organic compounds that contain a basic amino group -)NH2) and an acidic carboxyl group (-COOH).

In proteins, 20 different amino acids are commonly found, varying in function and property according to the nature of the R-group. For instance, in alanine, the R-group is (-CH3), whereas, in cysteine, it is (-CH2-SH).

Protein structures: primary

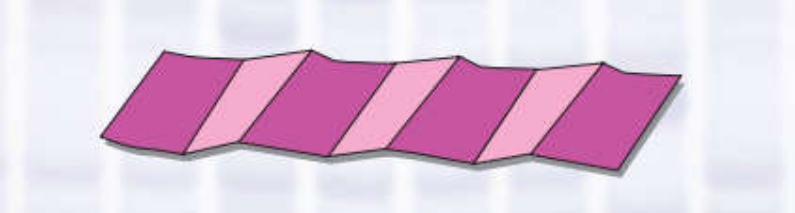
The primary structure of a protein is the order of amino acids on the polypeptide chain.

AA = Amino acid



Protein structures: secondary

The secondary structure is the result of local hydrogen bonds being created along the polypeptide backbone. This gives the protein strength and flexibility.

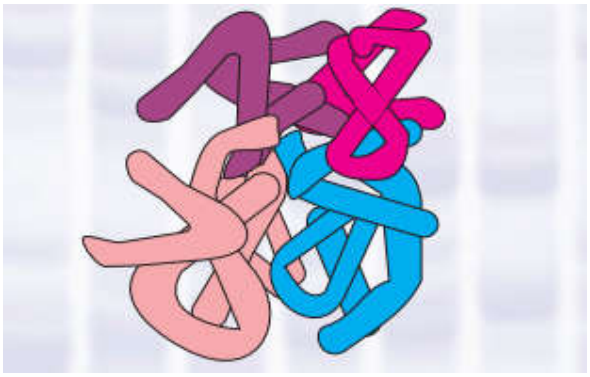


Protein structures: tertiary

The tertiary structure results from interactions between the R-groups in a polypeptide: the non-covalent and covalent bonds (hydrogen bonds, ionic bonds, hydrophobic interactions (and weak, covalent bonds (disulphide bonds between cysteine residues).

Protein structures: quaternary

The quaternary structure results from interactions between two or more polypeptide chains to form dimers, trimers, tetramers, etc. They are held together by hydrogen bonds, ionic bonds and, less commonly, hydrophobic interfaces and inter-chain disulphide bonds.



Proteins functions

- The three-dimensional structure of proteins is a direct result of interactions with their internal environment
- Diversity of protein function is a result of the complexity of protein structure

The diversity of protein function, as facilitated by the complexities of protein structure, include (with examples):

- Structural (collagen, muscle fibres)
- **Storage** (wheat gliadins, barley hordeins)
- **Enzymes** (hydrolases, transferases, isomerases, polymerases, ligases)
- Transport (oxygen transfer with haemoglobin)

• Messengers (insulin and certain other hormones)

• Antibodies (proteins that bind to specific foreign particles)

• Regulation (proteins involved in regulating DNA synthes)

Why seed storage proteins?

- Seeds are a rich source of stable and abundant proteins
- Seeds represent a well-defined developmental stage
- Seeds are easily stored and transported
- Each protein band in an electrophoretic profile usually represents a direct gene product

Enzymes:

Enzymes are a particular type of protein that act as catalysts.

Enzymes: allozymes and isozymes

The multiple forms that enzymes take fall into two main classes according to how they are coded:

• Allozymes—enzymes coded by different alleles at one gene locus

• Isozymes—enzymes coded by alleles at more than one gene locus

Usually, the term 'isozymes' refers to both classes

Polymorphisms are generated by changes in the amino acids that may result in changes in the primary structure of the enzyme.

Detecting isozymes: methodology

- Pre-treating plant material
- Starch or acrylamide gel electrophoresis
- Histochemical staining
- Analysing banding patterns

Variation in banding patterns between individuals can be interpreted genetically, as would be done with any other phenotypic marker.

Gel electrophoresis

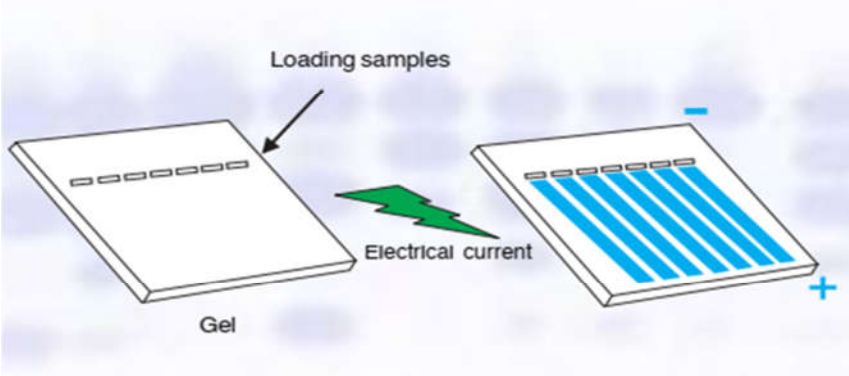
Electrophoresis is a chromatographic technique for separating mixtures of ionic compounds. It has been adapted as a common tool for biochemical analysis.

This process combines the separation of molecules by charge with that by size by applying an electric current.

The current makes the molecules move through pores in a layer of gel.

The substance that makes up the gel is selected so its pores are of the right size to separate a specific range of molecule sizes and shapes.

Enzyme electrophoresis can directly reveal genetic polymorphism through demonstrating the multiple forms of a specific enzyme.



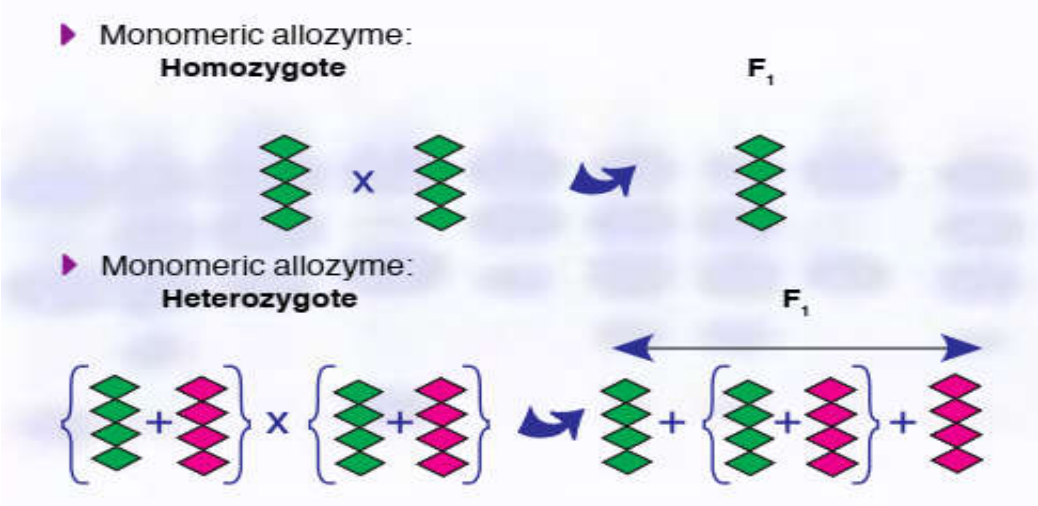
Interpreting banding patterns

- Whether the plant is homozygous orheterozygous at each gene locus
- The number of gene loci (isozymes)
- The number of alleles per locus
- How the genes are inherited

Allozymes are controlled by codominant alleles, which means that homozygotes (all alleles at a locus are similar) can be distinguished from heterozygotes (parents of the individual have contributed different alleles to that locus)

For monomeric enzymes (i.e. consisting of a single polypeptide), plants that are homozygous or a given locus will produce one band, whereas heterozygous individuals will produce two.

Forming homomers

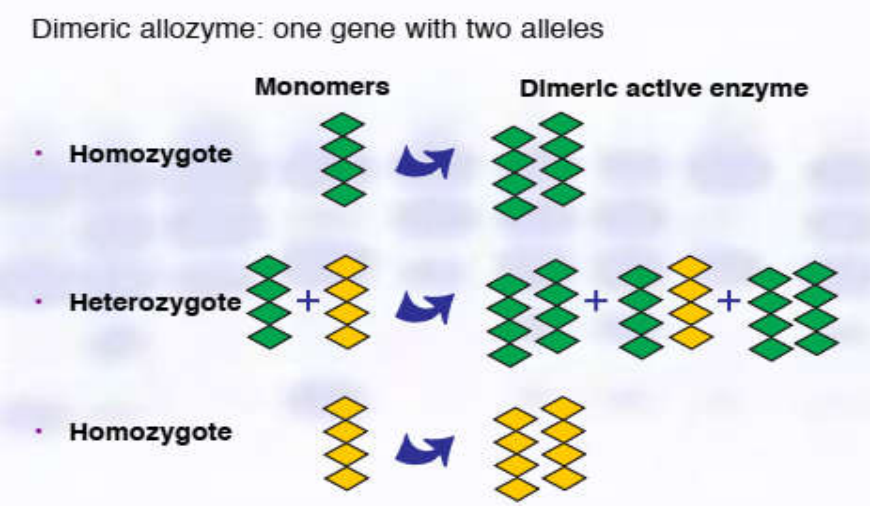


This example shows the behavior of monomeric enzymes in crosses.

Parents are homozygous for the same allele at the same locus or heterozygotes.

In the first case, all F1 progeny will be homozygous and, as a consequence, a single band will result. If parents are heterozygous, three possible F1 phenotypes will result.

Forming heteromers



In crosses, dimeric enzymes may behave in three possible ways.

If both parents are homozygous for different alleles at the same locus, all progeny are heterozygous, but because of random association of the polypeptides, three combinations are possible and therefore three bands will be resolved on gel electrophoresis and staining.

Advantages and disadvantages

Advantages

- Robust and highly reproducible
- Codominant, i.e. suitable for estimating a wide range of population genetics parameters and for genetic mapping

Disadvantages

- Relatively few biochemical assays available to detect enzymes
- Phenotype-based analysis

Applications

- Gene flow and/or introgression
- Genetics of populations
- Strategies for ex situ conservation

- Crop evolution
- Germplasm evaluation and characterization
- Genetic erosion
- Genetic stability of conserved material

ویژگی های نشانگرهای آنزیمی

۱) اینها پروتئینهایی هستند که نتیجه بیان ژن می‌باشند.

۲) از طریق الکتروفورز و رنگ آمیزی قابل جداسازی و تشخیص می‌باشند.

۳) اکثر چند شکلی‌های آیزوزایمی اثرات فیزیولوژیکی معنی‌داری بر گیاه ندارند و در حالت هموزیگوتی نیز اثرات زیان بخش بر روی فنوتیپ آن ندارد.

٤) اکثر تغییرات آیزوزایمی مبنای ژنتیکی ساده دارند.

۵) تظاهر فراوردهای اللی غالبا به صورت هم غالبیت است.

٦) در بین مکان های مختلف آیزوزایمی غالبا اثرات متقابل ژنی و پلیوتروپی وجود ندارد.

۷) با استفاده از آیزوزایم‌ها می توان گیاهان را در مرحله‌ی گیاهچه ای مطالعه کرد و از این طریق در زمان، مکان و امکانات صرفه‌جویی کرد.

۸) نیازی به داشتن اطلاعات از ژنتیک صفت نیست.

معایب آیزوزایم‌ها

۱) تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می گیرند.

۲) تظاهر کمی بعضی از آنزیم ها و پروتئین ها تحت تاثیر مرحله رشد گیاه قرار می گیرند.

۳) تحت تاثیر عوامل محیطی و بافت نمونه گیری است.

٤) چند شکلی و تنوع قابل ثبت در آنها کم است. (بدلیل محدود بودن روشهای رنگ آمیزی)

۵) پیچیدگی فنوتیپ های الکتروفورزی

٦) تنوع ژنتیکی در آنها چندان زیاد نیست.

پروتئومیکس:

پروتئومیکس: شناسایی و آنالیز پروتئین‌های بیان شده در سلول

پروتئوم: این واژه به پروتئین های بیان شده توسط یک ژنوم اشاره دارد.

پروتئوم (Proteome): مجموعه کامل پروتئین‌های بیان شده و تغییریافته در سراسر طول زندگی یک سلول.

البته در یک حالت محدودتر پروتئوم گروه پروتئین‌های بیان شده در یک سلول را در یک زمان فرضی نیز توضیح میدهد.

پروتئومیکس: مطالعه پروتئوم با استفاده از تکنولوژیهای آنالیز ملکولی تا اسپکترومتری توده‌ای (Mass spectrometry).

به غیر از روشهای استفاده از الکتروفورز، روشهای دیگر مثل اسپکترومتری جرمی، کریستالوگرافی اشعه ایکس و دیگر تکنیکها می تواند اطلاعات با ارزشی در مورد ساختار پروتئین را اضافه کند.

هدف پروتئومیکس

- تهیه هر پروتئینی که در ژنوم کد میشود
- زمان بیان آن
- اطلاعات درباره عملکرد و ساختمان آن
- تغییرات بعد از ترجمه
- محل آن در سلول
- تنوعات و ارتباطات (تاریخچه تکاملی) با دیگر پروتئین‌ها

تکنیک پایه در پروتئومیکس، جداسازی و تشخیص پروتئین‌های جدا شده از سلول است. یکی از روشهای انجام این کار استفاده از الکتروفورز ژل دوبعدی (two-dimensional) است.

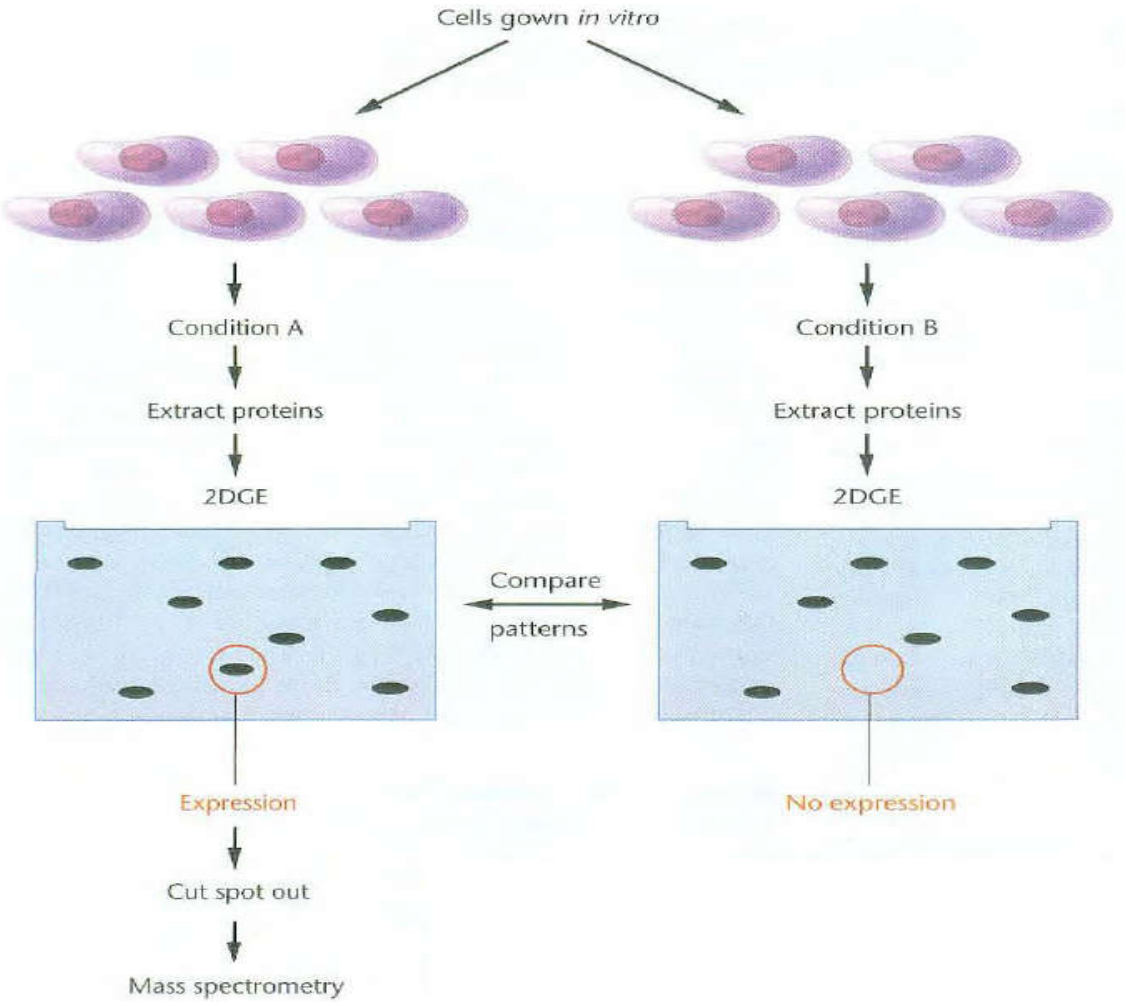
برخی نشانه های پیچیدگی پروتئوم در یک سلول با استفاده از تکنیکهای پایه ای، مثل الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (PAGE) می تواند کسب شود.

الکتروفورز دو بعدی (2D PAGE) تجزیه بسیار وسیعتری می دهد. در این روش، پروتئین ها ابتدا در یک جهت و سپس در جهت دوم جدا می شوند.

بعد از اتمام الکتروفورز بین ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نقطه بر روی ژل دیده میشود. برای تشخیص تک تک این نقاط:

- ✓ آنها را از ژل جدا کرده
- ✓ با آنزیمهایی مثل trypsin هضم کرده
- ✓ سپس قطعات حاصله را توسط اسپکترومتری توده‌ای آنالیز می‌کنند.
- ✓ توالی بدست آمده را با توالی‌های موجود در پایگاه داده پروتئین‌ها مقایسه میکنند.

آنالیز تیپیکال پروتئومیکس



ژل دوبعدی (two-dimensional) پروتئین، پروتئین‌های جدا شده بصورت نقطه نشان داده شده است.