طراحی و ساخت DNA Ladder صد جفت بازی با روش تلفیقی PCR و هضم آنزیمی

مسعود سعیدی جم،[۱] حسین خان احمد شهرضا،[۲*] زهرا ریخته‌گران تهرانی[۳] سکینه کریمی زارع،[۴] نوشین شباب[۱] مهدی بهدانی[۵]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، همدان، ایران. ۲- انستیتو پاستور ایران، بخش ب ث ژ، تهران، ایران. ۳- بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه پزشکی مولکولی، همدان، ایران. ۴- ژنتیک مولکولی، انستیتو پاستور، بخش ب ث ژ، تهران، ایران. ۵- بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، بخش ژنتیک پرشکی، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، کیلومتر ۲۵ اتوبان تهران- کرج، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش ب ث ژ تلفن: ۰۹۱۳۱۲۱۴۰۳۱
email: hossein_khanahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: مارکرهای DNA به‌عنوان یکی از ابزارهای بسیار ضروری در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی مطرح می‌باشند. از آن‌ها برای تخمین اندازه قطعات DNA مورد آزمایش، به‌واسطه مقایسه میزان حرکت الکتروفورتیک قطعه مجهول و مارکر پس از انجام الکتروفورز استفاده می‌گردد. امروزه روش‌های متنوعی برای تولید تجاری این مارکرها به‌کار گرفته می‌شوند. در این مطالعه روشی کارآمد برای تولید تجاری این محصول ارایه گردیده است. ***روش بررسی:*** در این پژوهش برای دست‌یابی به قطعات با اندازه مورد نظر از تلفیق دو روش هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بهره گرفته شد. در روند مبتنی بر هضم آنزیمی به طراحی و ساخت پلاسمیدهایی پرداخته شد که اندازه DNA تشکیل دهنده بدنه آن‌ها برابر با طول قطعه مورد نظر بوده و با خطی کردن پلاسمید، قطعه مربوطه تولید گردید و در روش PCR در Multiple Cloning Site (MCS) پلاسمید pTZ57R قطعاتی با طول‌های مورد نظر قرار داده شد و از آن‌ها به‌عنوان الگو برای تولید نهایی این قطعات در واکنش PCR استفاده گردید. ***یافته‌ها:*** با استفاده از این استراتژی قطعات ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی به‌واسطه هضم آنزیمی پلاسمیدهایی با همین اندازه تولید شد و قطعات ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت بازی، طی واکنش PCR و تنها با استفاده از یک جفت پرایمر جلوبر و معکوس مکمل بدنه پلاسمید در دو طرف Multiple cloning site پلاسمید pTZ57R حاصل گردید. ***نتیجه‌گیری:*** مزیت این روش استفاده از یک جفت پرایمر برای تولید تمام قطعات با روش PCR و استفاده از آنزیم‌های ارزان قیمت در تهیه قطعات بزرگ می‌باشد.

کلمات کلیدی: T/A کلونینگ، مارکر مولکولی DNA، الکتروفورز ژل آگارز، نشانگر وزن مولکولی.

مقدمه

همزمان با پیشرفت تکنیک‌های ژنتیک مولکولی (Molecular genetic) و دست‌کاری ژنتیک و نیز روش‌های تشخیصی برای بررسی اولیه قطعات حاصل از هضم آنزیمی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بررسی وکتورهای حاوی DNA مورد نظر و سایر روش‌های مورد استفاده در ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی، به DNA مارکرهای استانداردی نیاز می‌باشد تا از طریق مقایسه میزان حرکت قطعات شناخته شده آن طی ژل الکتروفورز بتوان اندازه قطعات مجهول حاصل از آزمایش را برحسب جفت باز تخمین زد. مارکرهای استاندارد می‌توانند حاوی قطعاتی از DNA با اندازه‌هایی متنوع از چند جفت باز تا چند کیلوباز باشند. یکی از ساده‌ترین راه‌های تهیه DNA مارکر استفاده از الگوی هضم آنزیمی انواع فاژ یا پلاسمیدهایی است که نقشه محل‌های برش آن‌ها توسط آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده مشخص می‌باشد. قطعات حاصله توسط این روش به نوع آنزیم‌های اندونوکلئاز، ترکیب بازی ژنوم و شرایط هضم آنزیمی بستگی دارد. انواع مختلفی از فاژها و پلاسمیدها در این راستا به کار گرفته شده‌اند، که از بین آن‌ها می‌توان به ژنوم فاژ λ، φX174، و پلاسمیدهای pBR322 و pUC اشاره نمود.[۱و۲] در این میان استفاده از قطعات حاصل از هضم فاژ λ با Hind III، یکی از متداول‌ترین روش‌های تولید مارکر به‌واسطه هضم آنزیمی است. هم‌چنین استفاده از هضم نسبی آنزیمی ژنوم سلول‌هایی که محتوی توالی‌های پشت سرهم و تکرار شونده بسیار فراوان می‌باشند رویکرد دیگری است که در این راستا به انجام رسیده است.[۳] معمولا به مارکرهای نوکلئیک اسیدی تولید شده با این شیوه، مارکر DNA گفته می‌شود. این روش با

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

وجود سادگی دارای کاستی‌هایی نیز می‌باشد، از قبیل فقدان الگویی منظم برای افزایش طول قطعات، متغیر بودن غلظت هر قطعه به‌خاطر تفاوت در وزن مولکولی نسبی آن‌ها و نیز پیچیده بودن اندازه قطعات به‌دلیل اتفاقی بودن محل‌های برش آنزیمی به‌نحوی که به‌خاطر سپاری طول و در نتیجه استفاده از آن‌ها را با مشکل همراه می‌سازد. بنابراین برای افزایش دقت در تعیین اندازه و سادگی استفاده وجود باندهای فراوان با محدوده اندازه‌هایی منطقی و پرکاربرد که به‌صورت منظم و مساوی افزایش می‌یابند، بسیار سودمند خواهد بود. باندهای استاندارد باید این قابلیت را داشته باشند که با وضوح برابر قابل تشخیص باشند، به این نوع از مارکرهای نوکلئیک اسیدی معمولا DNA Ladder گفته می‌شود،[۴] که طراحی و ساخت آن‌ها توسط شرکت‌های تولیدکننده محصولات بیوتکنولوژی به‌صورت صنعتی انجام می‌گیرد. تولید Ladderهای DNA با این خصوصیات با شیوه‌های مختلفی امکان‌پذیر است، که از انواع آن‌ها می‌توان به استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) اشاره نمود. قطعات حاصل از این راه قابل طراحی در اندازه‌های مطلوب می‌باشند. اما مشکل اصلی این روش پیچیدگی و هزینه بر بودن آن به‌واسطه استفاده از چندین مجموعه پرایمر است که هر یک به نوبه خود نیازمند برنامه‌دهی منحصر به‌فردی به ماشین PCR بوده و از طرفی هزینه ساخت تعداد زیادی پرایمر به‌لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه نمی‌باشد. بنابراین تدابیر مختلفی در جهت کاهش مشکلات مربوط به تولید با روش PCR به‌کار گرفته شده است، که از آن میان می‌توان به استفاده از روش Multiplex PCR[۵،۶] و روش هوشمندانه Microsugar Chang و همکارانش[۷] به‌واسطه طراحی شیوه PCR-Synthesized Marker (PSM) اشاره نمود. رویکرد مناسب دیگری که در این زمینه به‌کار گرفته می‌شود تولید پلاسمیدهای مهندسی شده‌ای است که در آن‌ها سایت‌های شناسایی و برش برای یک یا چند اندونوکلئاز محدودکننده ویژه با فواصل منظم گنجانده شده است. با تکثیر این پلاسمیدها در سیستم‌های باکتریایی و هضم آنزیمی آن‌ها با اندونوکلئازهای مربوطه، قطعات مورد نظر حاصل می‌گردند.[۸-۱۰] در این مطالعه با استفاده از روش تلفیقی تولید مبتنی بر PCR و هضم آنزیمی شیوه‌ای ساده برای تولید DNA Ladder در محدوده‌ای به نسبت وسیع و پرکاربرد که حاوی قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌باشد، ارایه شده است. در این بررسی با توجه به این‌که استفاده از سیستم‌های باکتریایی برای تولید قطعات مورد نظر بسیار کارآمد و به صرفه می‌باشد به طراحی پلاسمیدهایی پرداخته شد که دارای طولی برابر با قطعه مورد نظر بوده و پس از هضم آنزیمی قطعه مطلوب را تولید نمایند و با توجه به آن‌که یک پلاسمید جهت تکثیر نیازمند سکانس‌های مربوط به شروع همانندسازی و جهت غربالگری نیازمند توالی یک ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی است، بنابراین کوچک‌ترین پلاسمید دارای این خصوصیات حاوی ۲۰۰۰ جفت باز می‌باشد. بنابراین از این رویکرد در راستای تولید قطعات ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی استفاده گردید. از طرفی برای تولید قطعات ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز از روش PSM بهره گرفته شد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات کاربردی می‌باشد که در سال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان و انستیتو پاستور ایران به انجام رسیده است. تمامی مواد مورد استفاده در این مطالعه، شامل پلاسمید pTZ57R، آنزیم‌های اندونوکلئاز، لیگاز و DNA پلیمراز و کیت‌های استخراج پلاسمید، استخراج DNA از ژل و T/A کلونینگ از شرکت Fermentas و سوش باکتریایی 'Top10F از شرکت Invitrogen تهیه گردید. دستگاه ترموسایکلر مورد استفاده BioRad مدل 582BRO16466 بود.

فرآیند مبتنی بر هضم آنزیمی: هدف از این مرحله طراحی و ساخت پلاسمیدهایی بود که دارای طول مورد نظر باشند و پس از هضم آنزیمی قطعه مربوطه را به‌وجود آورند. به همین منظور پلاسمیدهایی بر پایه پلاسمید pTZ57R که خود دارای ۲۸۸۶ جفت باز است، ساخته شدند.

طراحی پرایمر: برای ساخت پلاسمید حاوی ۲۰۰۰ جفت باز با منشاء pTZ57R، پرایمرهایی طراحی شدند که قادر به جفت شدن با توالی‌هایی از این پلاسمید بودند که محصول نهایی PCR آن‌ها علاوه بر دارا بودن تعداد جفت باز مورد نظر، حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و مبداء همانندسازی موجود در پلاسمید اولیه باشد. هم‌چنین در دو انتهای پرایمرها توالی مربوط به برش آنزیمی گنجانده شد تا پس از برش با آنزیم مورد نظر بتوان آن‌را به‌صورت حلقوی درآورد. بنابراین یک جفت پرایمر با توالی :2000 F AAAGAATTCGTATCAGCTCACTCAAAGGC به‌عنوان پرایمر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

پیشرو و با توالی R: AAAGAATTCGCGAGAAAGGAAGGGAAG 2000 به عنوان پرایمر معکوس جهت ساخت پلاسمید حاوی ۲۰۰۰ جفت باز طراحی و ساخته شد. در واکنش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و پلاسمید pTZ57R به‌عنوان الگو، یک واکنش PCR ترتیب داده شد و فرآورده حاصله مورد الکتروفورز قرار گرفت و سپس از روی ژل آگارز استخراج گردید. سپس DNA حاصله با آنزیم EcoR I مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و قطعه‌ای با دو انتهای چسبان به‌وجود آمد.

واکنش لیگاسیون: قطعه ۲۰۰۰ جفت بازی حاصل از مرحله پیشین با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase وارد واکنش لیگاسیون شد، به این منظور ۵۰ng از قطعه DNA حاوی انتهای چسبان با ۵µl بافر (×۱۰) لیگاز، ۵µl پلی‌اتیلن گلیکول و پنج واحد آنزیم T4 DNA Ligase مخلوط گردیده و حجم محلول واکنش با آب مقطر دیونیزه به ۵۰µl رسانده شد و محلول حاصله جهت انجام واکنش به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس یک شب در دمای ۴ °C انکوبه گردید. برای تهیه پلاسمید ۳۰۰۰ جفت بازی نیز از پرایمرهایی که قادر به تکثیر یک توالی از DNA با طول ۱۱۲ جفت باز بودند، استفاده شد و قطعه حاصله با استفاده از استراتژی T/A کلونینگ[11] به‌داخل وکتور خطی pTZ57R/T کلون گردید. محصول واکنش لیگاسیون p2000 و p3000 به باکتری Top10F' تلقیح شده و کلون‌های رشد یافته بر روی LB آگار حاوی آمپی‌سیلین با دو روش هضم آنزیمی و PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در تکثیر پلاسمیدها، پلاسمیدهای p2000 و p3000 حاصله در سوش Top10F' باکتری E.coli تکثیر یافته و پس از استخراج با آنزیم‌های مربوطه خطی گردیدند و در شرایط ۲۰- °C جهت فرمولاسیون ذخیره شدند. در فرآیند مبتنی بر PCR قطعاتی از DNA تکثیر شده به داخل وکتور خطی pTZ57R/T کلون گردید تا در نهایت با استفاده از یک جفت پرایمر مشترک که مکمل توالی‌های مربوط به بدنه پلاسمید pTZ57R در دو طرف قطعه کلون شده می‌باشد، تکثیر نهایی هر قطعه صورت گیرد. در طراحی پرایمر قطعاتی از DNA با استفاده از پرایمرهایی که توالی‌های DNA ژنوم انسان را به‌گونه‌ای مورد هدف خود قرار می‌دهند که قطعات تولید شده حاوی میانگین GC بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد، طی واکنش PCR تکثیر یافتند. روند کار به این نحو بود که پرایمرها برای تولید قطعاتی به طول ۱۰۲ جفت باز کمتر از میزان نهایی قطعه مورد نظر طراحی گردیدند. در واکنش PCR و T/A کلونینگ، قطعات حاصل از واکنش PCR با پرایمرهای مربوط به هر قطعه، پس از الکتروفورز از روی ژل استخراج شدند. با توجه به این‌که تکثیر هر قطعه با آنزیم Taq DNA polymerase انجام گردید، بنابراین تمامی قطعات در دو انتها حاوی 3'-A آویزان بوده و در نتیجه برای استفاده در فرایند T/A کلونینگ مناسب بودند. پس از الحاق هر قطعه به‌داخل پلاسمید pTZ57R/T این پلاسمیدها به سوش Top10F' باکتری E.coli ترانسفرم گردید. با این کار پلاسمیدهای p200، p300، p400، p500، p600، p700، p800، p900، p1000، p1200 و p1500 که پلاسمیدهایی ساخته شده بر پایه pTZ57R بوده و به‌ترتیب حاوی قطعات ۹۸، ۱۹۸، ۲۹۸، ۳۹۸، ۴۹۸، ۵۹۸، ۶۹۸، ۷۹۸، ۸۹۸، ۱۰۹۸، ۱۳۹۸ جفت بازی می‌باشند، ساخته شد.

تکثیر نهایی هر قطعه: در نهایت برای تولید قطعات مورد نظر پرایمری مشترک که توالی خاصی را در بدنه پلاسمید pTZ57R مورد هدف خود قرار می‌داد طراحی گردید، که از آن تحت عنوان F-C و R-C "C=Common" یاد می‌شود. این پرایمر در صورتی که پلاسمید فاقد قطعه اتصالی pTZ57R که در این مطالعه با نام p100 در نظر گرفته می‌شود را به‌عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار دهد محصول نهایی، قطعه ۱۰۰ جفت بازی خواهد بود و به همین ترتیب پلاسمیدهای p200 تا p1500 با همین یک جفت پرایمر مشترک قطعات مورد نظر را تولید خواهند کرد (شکل ۱). مراحل PCR برای تولید قطعات مورد نظر برای هر ۵۰µl واکنش با مواد و شرایط زیر صورت پذیرفت. یک واحد Taq DNA polymerase، پرایمرهای مشترک مستقیم و معکوس هر یک ۲۰ پیکومول، بافر PCR (×۱۰) ۵µl (شامل (NH4)2SO4 ۱۶۰ میلی مولار، Tris-HCl (pH:۸/۸) ۶۷۰ میلی‌مولار، tween-20 ۰/۰۱ درصد) $MgCl_2$ سه میلی‌مولار، dNTPs ۲۰۰ میکرومولار، پلاسمید الگو ۰/۱ پیکومول و آب مقطر دیونیزه استریل تا حجم ۵۰µl در میکروتیوب‌های مربوطه مخلوط شده و در ماشین PCR پس از چهار دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ °C، برای ۳۰ سیکل در دمای ۹۴ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه جهت دناتوراسیون، در دمای ۵۶ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمرها به رشته الگو و در دمای ۷۲ °C با احتساب زمان متناسب با طول قطعه و سرعت آنزیم پلی‌مراز معادل ۱۰۰۰ جفت باز بر دقیقه قرار داده شدند. در نهایت هر قطعه روی ژل آگارز مورد الکتروفورز قرار گرفته و از روی ژل استخراج و به‌صورت محلول استوک جهت استفاده در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

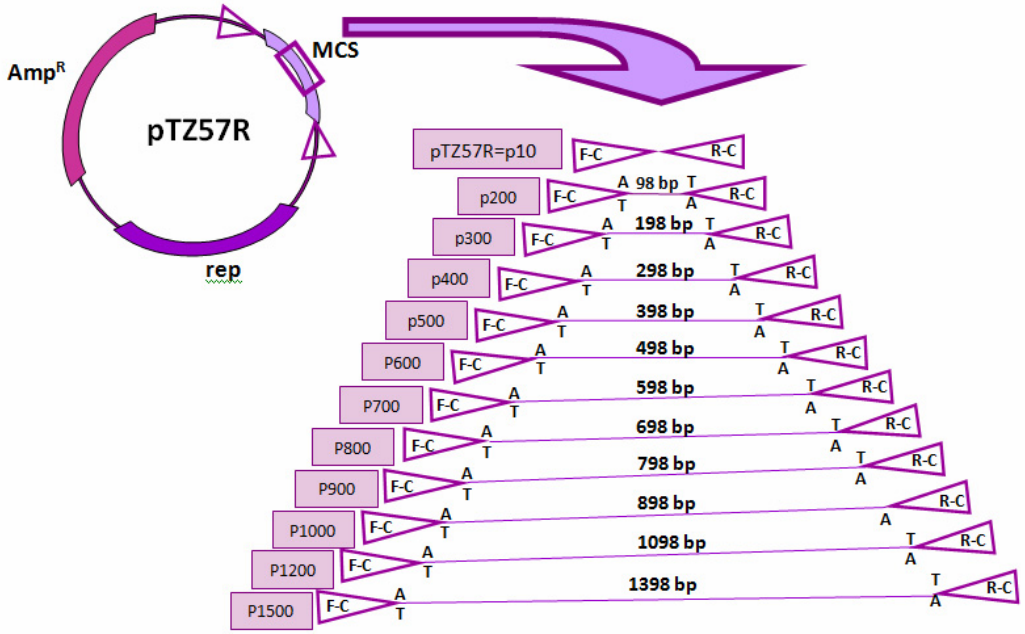
فرمولاسیون نهایی در دمای C° ۲۰- ذخیره شد. در فرمولاسیون تمام قطعات حاصله پس از تعیین غلظت در بافر بارگذاری حاوی ۱۰٪ گلیسرول، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL (pH:۷/۶) و ۰/۰۰۵ گرم درصد برموفنل بلو، با غلظت‌های مشخص مخلوط گردیدند. در این کار DNA Ladder شرکت Fermentas با شماره کاتالوگ SM0321 به‌عنوان الگو در نظر گرفته، ترکیب غلظتی تمام قطعات مشابه همین نمونه تعیین گردید (جدول ۱).

یافته‌ها

در فرآیند مبتنی بر هضم آنزیمی، دو پلاسمید بر مبنای pTZ57R ساخته شد که هر دو قابلیت تکثیر در باکتری E.coli سوش Top10F' را دارا بودند. این پلاسمیدها پس از استخراج و هضم آنزیمی با اندونوکلئاز محدودکننده متناسب با توالی شناسایی گنجانده شده در آن‌ها، قطعات مورد نظر شامل ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت باز را تولید نمودند (شکل ۲). در فرآیند مبتنی بر PCR، پلاسمیدهای p100 تا p1500 ساخته شده با استراتژی T/A کلونینگ در باکتری E.coli سوش Top10F' تکثیر یافته و پس از استخراج به‌عنوان الگو در واکنش PCR به‌کار گرفته شدند و توانستند تمام قطعات مورد نظر را با استفاده از یک جفت پرایمر مشترک (Forward-C و Reverse-C) تولید نمایند (شکل ۲). DNA Ladder تولید شده در مرحله فرمولاسیون بر روی ژل آگارز مورد الکتروفورز قرار گرفت و باندهای مورد نظر را با تفکیک و وضوح مناسب نشان داد (شکل ۳).

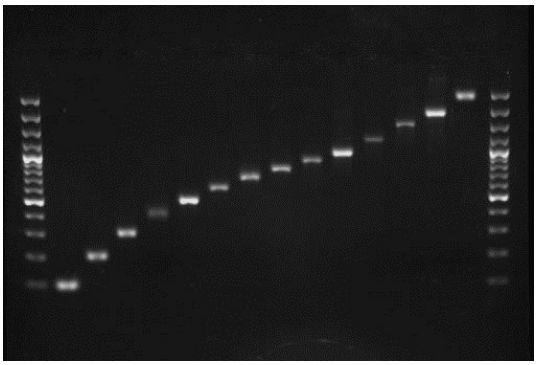
جدول- ۱: غلظت‌های مربوط به قطعات موجود در مارکر DNA، جهت فرمولاسیون نهایی

قطعه (جفت باز)	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	۶۰۰	۷۰۰	۸۰۰	۹۰۰	۱۰۰۰	۱۲۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰
غلظت (ng/µl)	۶	۶	۶	۶	۱۶	۵/۴	۵/۴	۵/۴	۵/۴	۱۶	۵/۶	۵/۶	۵/۶	۵/۶



شکل- ۱: قطعات الحاق شده به داخل پلاسمید pTZ57R و پلاسمید نهایی ساخته شده توسط آن‌ها به‌صورت شماتیک نشان داده شده است، هر پلاسمید در صورتی که الگوی جفت پرایمرهای مشترک F-C و R-C در واکنش PCR باشد، قطعه دلخواه را تولید خواهد نمود.

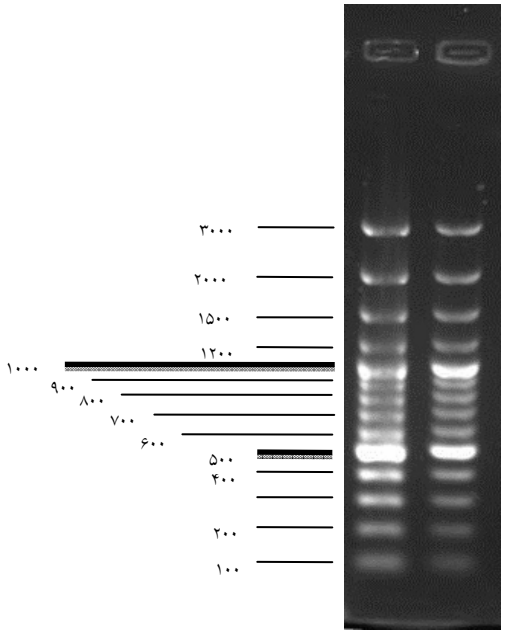
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]



شکل- ۲: الکتروفورز باندهای مربوط به قطعات Ladder تولید شده، از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز در مجاورت Ladder ۱۰۰ جفت‌بازی (شرکت Fermentas SM#0321) **روی ژل آگارز.**

بحث

نشانگرهای وزن ملکولی ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی DNA، یکی از پرکاربردترین انواع DNA Ladder می‌باشند، که در این مقاله به ارایه روشی کارآمد جهت تولید آن پرداخته شده است. روش معمول تولید مارکر، هضم آنزیمی انواع فاژ یا پلاسمید با استفاده از اندونوکلئازهای محدود کننده است.[۱۲و۱۳] اما برای تولید مارکر با اندازه‌های دقیق و مشخص و با فواصل ۱۰۰ جفت بازی فاژها و پلاسمیدهای موجود را نمی‌توان به‌کار گرفت. بنابراین برای این منظور از طراحی و ساخت پلاسمیدهای مهندسی شده‌ای استفاده می‌شود که حاوی سایت‌های برش آنزیمی در مناطق و فواصل مورد نظر باشند[۸و۹] و یا این‌که از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تولید هر قطعه استفاده می‌گردد.[۵و۶] تولید Ladder با استفاده از روش هضم آنزیمی پلاسمیدهای مهندسی شده با وجود مزیت اقتصادی بودن، معمولا دارای ایرادهایی نیز می‌باشد، مثلا مطابق روش پیشنهاد شده توسط Hartley،[۱۴] پلاسمیدهایی ساخته شد که حاوی قطعات تکراری از DNA بودند، در این شیوه تنها بخشی از پلاسمید که دارای توالی‌های گنجانده شده و عموماً تکراری است برای تولید قطعات Ladder مورد استفاده قرار می‌گیرد و بدنه وکتور برای تولید یک قطعه در نظر گرفته نمی‌شود در نتیجه برش‌های آنزیمی صورت گرفته بر روی بدنه پلاسمید به صورت قطعات جانبی و به شکل اسمیر در قسمت‌های بالایی ژل الکتروفورز خود را نشان می‌دهد که رفع آن می‌تواند مشکل‌زا، هزینه بر وقت‌گیر باشد، البته این مشکل با ساخت پلاسمیدهایی که تمام بدنه آن‌ها در تولید قطعات مورد نظر به‌کار گرفته می‌شوند حل شده



شکل- ۳: الکتروفورز مخلوط قطعات مربوط به Ladder ساخته شده (چپ)، **Ladder ۱۰۰ جفت‌بازی** (شرکت Fermentas SM#0321) (راست) **روی ژل آگارز.**

است.[۸و۱۰] از سوی دیگر در تمام این روش‌ها طی هضم آنزیمی چندین قطعه مختلف حاصل می‌گردند که در این شرایط جداسازی قطعات مختلف نیازمند اعمال یک مرحله اضافی در فرآیند تولید می‌باشد. در روش‌هایی که تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از PCR و حتی Multiplex PCR[۵] صورت می‌گیرد، نیاز به تعداد زیادی پرایمر می‌باشد که استفاده از آن‌ها باعث ایجاد پیچیدگی در مراحل تولید می‌گردد. از این‌رو در مطالعه‌ای دیگر به منظور کاهش تعداد پرایمرهای مورد نیاز به ارایه روشی تحت عنوان PCR-Synthesized Marker (PSM)[۷] پرداخته شد تا به واسطه آن استفاده از روش PCR تا حد امکان ساده گردد. شیوه به کار گرفته شده در این مطالعه روش تلفیقی PCR و هضم آنزیمی است که با به کارگیری آن می‌توان از پیچیدگی مراحل تولید کاست.

با استفاده از روش پیشنهادی ارایه شده در این پژوهش، پلاسمیدهایی ساخته شدند که طول DNA تشکیل دهنده هر یک از آن‌ها برابر با یکی از قطعات مورد نظر (۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت باز) می‌باشد، هر پلاسمید تنها با یک هضم آنزیمی قطعه نهایی را تولید نموده و یک فرایند Clean up ساده جهت جداسازی مواد پروتیینی مربوط به واکنش آنزیمی، خالص‌سازی را در حد کفایت به انجام می‌رساند. از

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

طرفی به دلیل آن‌که برای تولید قطعات کوچک‌تر نمی‌توان پلاسمیدی ساخت که حاوی سکانس‌های مربوط به مبدا همانندسازی و یک ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده و هم‌چنین طول آن ۱۵۰۰ جفت باز یا کمتر باشد، از این‌رو بهترین راه برای تولید قطعات کوچک‌تر، استفاده از قابلیت‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است، که در این مطالعه با بهره‌گیری از روش PSM[۷]، با طراحی و تولید کتابخانه پلاسمیدی حاوی قطعات مورد نظر به‌عنوان الگوی واکنش PCR و استفاده از یک جفت پرایمر مشترک برای تولید قطعات ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز، پیچیدگی‌های معمول روش PCR به نحو چشمگیری کاهش یافته است، به‌طوری که در آن تمام مواد مورد استفاده در واکنش PCR به‌جز نمونه DNA الگو یکسان می‌باشد. در نهایت، با وجود این‌که در تمام مراحل تولید، سعی بر عاری بودن شرایط و محیط از وجود عوامل نوکلئاز شده بود، با این‌حال تمام قطعات پس از تولید به‌سرعت در بافر نگهدارنده (pH:۷/۶) (بافر بارگذاری) حاوی EDTA نگهداری شدند تا در صورت وجود مقادیر ناچیز از نوکلئاز در محیط، مهار آنزیمی صورت گیرد.

شایان ذکر است که در این مطالعه به‌منظور خالص‌سازی قطعات قبل از انجام فرمولاسیون، هر قطعه بر روی ژل آگارز برده شد و خالص‌سازی نهایی با استخراج DNA از ژل آگارز انجام گرفت، ولی پیشنهاد می‌شود در روند تولید صنعتی و نیمه صنعتی، استفاده از ستون‌های ژل فیلتراسیون سفادکس جایگزین خالص‌سازی از ژل آگارز گردد. این کار در نهایت منجر به تسهیل فرآیند خالص‌سازی در ضمن افزایش خلوص شده و به‌لحاظ هزینه مورد نیاز بسیار مقرون به صرفه‌تر خواهد بود. در این روش مانند سایر شیوه‌های تولید صنعتی DNA Ladder، قابلیت کنترل ترکیب بازی قطعات وجود دارد، به‌عنوان نمونه در این کار به‌منظور تولید مبتنی بر هضم آنزیمی، پلاسمیدهایی بر مبنای pTZ57R ساخته شدند که این پلاسمید حاوی محتوای GC برابر با ۵۰٪ است و از این نظر گزینه مناسبی برای تولید قطعاتی از DNA با میانگین GC بین ۴۰ تا ۶۰ درصد که مناسب هدف ما است، می‌باشد.

روش تلفیقی استفاده شده در این‌جا می‌تواند برای تولید قطعاتی با اندازه طویل‌تر مثلا در جهت تولید Ladder یک کیلو بازی نیز به‌عنوان شیوه‌ای بسیار مناسب به‌کار گرفته شود. از طرفی در این روش مانند تمامی شیوه‌های تولید صنعتی، با توجه به این‌که هر قطعه اعم از استفاده از PCR یا هضم پلاسمیدی به‌صورت جداگانه تهیه می‌شود و نهایتاً تمام قطعات با غلظت و مولاریته‌ای دلخواه فرموله می‌گردند، به‌راحتی می‌توان کیفیت محصول را از نظر غلظت و وضوح قطعات در هر نوبت تولید ثابت نگاه داشت و از طرفی می‌توان محتوای قطعات موجود در Ladder را متناسب با نیاز و مطابق سفارش فرموله کرد، که به‌واسطه تمامی ویژگی‌های برشمرده شده می‌توان از این استراتژی به‌عنوان یک روش ایده‌آل و بهینه در جهت تولید صنعتی و انبوه DNA Ladder یاد نمود. به‌ویژه آن‌که روند به‌کارگرفته شده متناسب با شرایط خاص تولید این قبیل محصولات در کشورهای در حال توسعه‌ای چون ایران می‌باشد و با توجه به این‌که این کار برای اولین بار است که در ایران انجام می‌گیرد، در صورت استفاده از این شیوه در تولید صنعتی، می‌توان از آن به‌عنوان قدمی هرچند کوچک در راستای خودکفایی یاد نمود.

سپاسگزاری: از مساعدت معاونت پژوهشی انستیتو پاستور ایران و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان، جهت تامین مالی و پشتیبانی اجرای این پروژه نهایت سپاس به‌عمل می‌آید.

References

1. Fermentas Company. DNA Electrophoresis, pBR322 DNA/AluI Marker, 20 [Online]. 2010 [cited 2011 Apr 15]; Available from: URL:http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1062
2. Fermentas Company. DNA Electrophoresis, Lambda – pUC Mix Marker, 4 [Online]. 2010 [cited 2011 Apr 15]; Available from: URL:http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/lambda-dna-markers/sm029-lambda-puc-mix
3. Barvish Z, Davis C, Gitelman I. A wide-range, low-cost 150 bp ladder for sizing DNA fragments between 150 and 4500 bp. *Electrophoresis* 2007;28(6):900-2.
4. Hu A-Li W, Hartley JL, Heather JJ. Nucleic Acid Ladders. US Patent No. 0149640 A1, 2009.
5. Wang TY, Guo L, Zhang JH. Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique. *J Nucleic Acids* 2010;2010. pii: 421803.
6. Dawson EP. Method for the multiplexed preparation of nucleic acid molecular weight markers and resultant products. US Patent No. 5,714,326, 1998.
7. Chang M, Wang JH, Lee HJ. Laboratory production of 100 base pair DNA molecular weight markers. *J Biochem Biophys Methods* 2008;70(6):1199-202. Epub 2007 Aug 24.
8. Hartley JL. Nucleic acid marker ladder for estimating mass. US Patent No. 7,132,520 B2, 2006.
9. Hyman DE. DNA ladders. US Patent No. 5,840,575, 1998.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

10. Dongyi H, Longhai Z, Huazong Z, Ye Ch. Construction of DNA marker plasmids based on Taq Tailing activity and selective recovery of ligation products. *Plant Mol Biol Rep* 2008;26:316-23.
11. Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res* 1991;19(5):1156.
12. Fermentas Company. DNA Ladders, Low Range. SM0223 pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, Cat. No.: SM0221. [Online] 2010 [cited 2011 Apr 15]; Available from: URL:http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1070
13. Fermentas Company. Lambda-pUC Mix Marker, Cat. No.: SM0291. [Online] 2010 [cited 2011 Apr]; Available from: URL:http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1123&language=de&language=en
14. Hartley JL, Tamara GJ. Cloning multiple copies of a DNA segment. *Gene* 1981;13:347-53.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 2, May 2011: 75-82

Designing and constructing an 100 bp DNA Ladder by combining PCR and enzyme digestion methods

Massoud Saidijam PhD.[1]
Hossein Khanahmad Shahreza MD., PhD.[2*]
Zahra Rikhtegaran Tehrani MSc.[3]
Sakineh Karimizare MSc.[4]
Nooshin Shabab BSc.[1]
Mehdi Behdani PhD.[5]

1- Research Center for Molecular Medicine. Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.
2- BCG Ward, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Student of Medical, Biotechnology, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.
4- Department of Molecular Genetics, BCG Ward, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
5- Student of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Corresponding author: BCG Ward of Research and Production Complex of Pasteur Institute of Iran, 25th Kilometer of Tehran-Karaj Highway, Iran.
Tel: +98-913-1214031
email: hossein_khanahmad@yahoo.com

Received: January 21, 2011 Accepted: March 13, 2011

Abstract

***Background*:** Molecular DNA markers are one of the most important tools in molecular biology labs. The size of DNA molecules is determined by comparing them with known bands of markers during gel electrophoresis. There are many different protocols to produce these kinds of molecular markers. In this study we have suggested an efficient strategy to produce molecular weight markers in industrial proportions.

***Methods*:** To achieve the desired sizes of DNA fragments, a combination of two previously known methods, restriction enzyme digestion and polymerase chain reaction (PCR), were used. The enzymatic digestion process was based on designing and constructing plasmids which equaled in size with the desired length of DNA fragments and produced the desired DNA fragment upon linearization. In the PCR method, the desired length of DNA fragments were cloned in multiple cloning sites of pTZ57R plasmid and in a PCR reaction, the new constructed plasmid was used as a template to produce the final fragment.

***Results*:** Upon application of this strategy, 2000 and 3000 bp DNA fragments were produced by enzymatic digestion of plasmids of the same size. Moreover, 100 to 1500 bp fragments were produced during PCR using only a set of forward and reverse primers at the flanking region of pTZ57R multiple cloning site.

Conclusion: The highest advantage of this cost-benefit approach is to produce different types of molecular weight markers by using an effective and short protocol.

Keywords: DNA markers, DNA Ladder, agarose gel electrophoresis, molecular weight.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]