بررسی عوامل مؤثر در تکثیر ژن با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

رحیم گل‌محمدی[1]، ابراهیم شیرزاده[2]

[1] استادیار علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

[2] دانشیار چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دکتر رحیم گل‌محمدی

E-mail: Rahimgolmohammadi@yahoo.com

وصول:۸۷/۷/۲۸، اصلاح:۸۷/۹/۲۱، پذیرش:۸۷/۱۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: پیشرفت تکنولوژی موجب اهمیت بخشیدن به روش‌های نوین تشخیصی و پژوهشی در آزمایشگاه‌ها شده است و استفاده از روش‌های جدید تشخیصی در کنار روش‌های معمول آزمایشگاهی می‌تواند دقت تشخیص را افزایش دهد که از جنبه‌های بالینی و روند پی‌گیری بیماری‌های ژنتیکی حائز اهمیت است، لذا هدف از این مطالعه بررسی عوامل مؤثر در تکثیر ژن با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در جهت ارتقاء دقت تشخیص می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است که بر روی ٦١ نمونه آدنوکارسینومای کولون در بخش سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار و اصفهان انجام گرفت. DNA نمونه‌ها با کیت استاندارد استخراج شد؛ سپس تکثیر قطعه از ژن AURKA و P53 با استفاده از دو زوج پرایمر مخصوص برای هر ژن با غلظت‌های متفاوت منیزیوم برای واکنش زنجیره‌ای پولی‌مراز انجام شد. محصول PCR در ژل آگاروزالکتروفورز گردید.

یافته‌ها: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پولی‌مراز در غلظت ۳ و ۵ میلی مولار منیزیوم بهتر از ۱/۵ میلی مولار بود. پرایمر با غلظت یک میکرومولار بهتر از ۵ و۱۰ میکرومولار بود. از دو زوج پرایمر استفاده شده برای تکثیر اگزون ٤ ژن AURKA با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک زوج آن در نمونه مورد مطالعه بهتر از دیگری بود و از دو زوج پرایمری که برای تکثیر اگزون ۵ ژن P53 استفاده شد، یک زوج آن در نمونه‌های مورد مطالعه بهتر از دیگری بود.

نتیجه‌گیری: نوع پرایمر و غلظت منیزیوم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای Amplify کردن ژن مهم می‌باشند. ***(مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۵/شماره۴/ صص۲۳۰-۲۲۶).***

واژه‌های کلیدی: *واکنش زنجیره‌ای پولی مراز؛ پرایمر؛ غلظت منیزیوم.*

مقدمه

پیشرفت تکنولوژی روش‌های نوین تشخیصی را در زمینه سلولی و مولکولی فراهم آورده است. تکثیر یک ژن در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) با استفاده از مقادیر کم DNA با دستگاه PCR یا Polymerase Chain Reaction انجام می‌گیرد (۱,۲). واکنش زنجیره‌ای پولی مراز ابتدا توسط مولی و سایر دانشمندان ژنتیک انسانی معرفی شد و سپس به خاطر مزایای آن به سرعت در

بیولوژی مولکولی گسترش پیدا کرده است (۳,٤). امروز با توجه به کارآیی بالای PCR در زمینه‌های مختلف پزشکی و هویت‌شناسی (Finger Print) استفاده می‌شود و می‌تواند در کنار روش‌های معمول آزمایشگاهی جهت تشخیص دقیق‌تر به خدمت گرفته شود (٥,٦). برای تکثیر موفق یک ژن، عوامل مختلفی نقش دارند که از جمله آن-ها می‌توان به کمیت و کیفیت DNA، غلظت کلرید منیزیوم، آنزیم Taq DNA Polymerase و پرایمر اشاره کرد. پرایمر یکی از عوامل اصلی در Amplify کردن ژن محسوب می‌شود که با محدود کردن توالی قطعات sense و nonsense روی DNA تکثیر آن را ممکن می‌سازد (۷,۸). برای اتصال پرایمر به ژنوم باید پیوندهای بین دو رشته DNA شکسته (Denaturation) شود و اتصال پرایمر به DNA معمولاً ٥ درجه پایین‌تر از درجه ذوب پرایمر انجام می‌شود که عموماً با فرمول زیر TM=2(A+T)+4(C+G) محاسبه می‌شود و یا از گرادیانت درجه حرارتی برای اتصال پرایمر به DNA محاسبه می‌گردد (۹). در بعضی مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف از پرایمرهای مختلفی جهت Amplify کردن ژن‌ها از جمله ژن P53 و AURKA گزارش شده است (۱۰,۱۱). بنابراین می‌توان تصور کرد وجود تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی توأم باشد که در هر ناحیه امکان Amplify کردن یک ژن را با یک پرایمر ممکن در حالی‌که با پرایمر دیگر غیر ممکن سازد و از طرف بسیاری از کارهای مولکولی دیگر مثل transcription-mediated (amplification) TMA، NASBA (nucleic acid sequence - based amplification) (SDA) strand displacement amplification و genotyping SNP بعد از یک PCR موفق انجام‌پذیر است (۱۵-۱۲). بنابراین بررسی پرایمرهایی که بتواند با شرایط آزمایشگاهی ما بازدهی بهتر داشته باشد، مفید خواهد بود. لذا این مطالعه در راستای این هدف طراحی شد تا بررسی عوامل مؤثر در تکثیر یک ژن باواکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد ارزیابی قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی بوده و به - صورت مقطعی بر روی ٦١ نمونه آدنو کارسینوما کولورکتال در طول سال ١٣٨٦ در بخش سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار و اصفهان انجام گرفت. از بلوک‌های پارافینی ۳ قطعه ۱۰ میکرونی با میکروتوم (Litze) آلمان تهیه شد. بلافاصله پس از مقطع-گیری برای هر نمونه، دستگاه میکروتوم برای جلوگیری از آلودگی با الکل تمیز می‌شد و با استفاده از کیت استاندارد (شرکت فزاپژو) DNA استخراج شد و با اسپکتروفتومتری غلظت آن اندازه‌گیری شد و تا زمان استفاده DNA در فریزر ۲۰۰C- نگه‌داری می‌شد (۱۰,۱۱).

الف)واکنش زنجیرهای پلی‌مراز PCR: ۳ تا ٥ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۲/٥ میکرولیتر از buffer × ۱۰ با حجم متفاوت ۲ تا ٥ میکرولیتری از غلظت‌های $MgCl_2$ ۲٥ میلی مولار با ۱/٥ میکرولیتر dNTP ٥ میلی مولارمیکرو یک میکرولیتر پرایمرهای Forward و Reverse ژن P53 و AURKA با غلظت‌های ٥،۱ و۱۰ میلی مولار با توالی زیر استفاده شد:

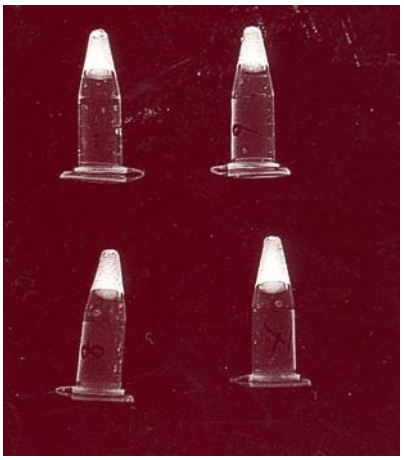
F-*5′*- TGCTGTGACTGCTTGTAGA- *3′*
R-*5′*- CTCAACTTTCAGTCCCGT- *3′*
F-5′ –TGTTCACTTGTGCCCTGACT- 3′
R-5′- AGCAATCAGTGAGGAATCAG- 3′
F-*5′*- *CTTTCATGAATGCCAGAAGT-3′*
R-*5′*- *CACAGGAAGTTAAGGGTG--′3*
F-*5′*- *CTTTCATGAATGCCAGAAGT-3′*
R-5′-CCAAGTCTTCACTTCGTCT-*3′*

(۱۰,۱۱). (پرایمرها از شرکت HPSF Biotech آلمان سفارش فرآیند دانش بوده است). یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به میکروتیوب استریل افزوده شد و با آب مقطر حجم نهایی به ۲٥ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Eppendurf آلمان و Techena انگلستان، قطعه از ژن AURKA و ژن P53

متعاقب بهینه‌سازی کردن شرایط مطلوب بر ای PCR از نظر گرادیانت درجهٔ حرارتی، غلظت DNA، پر ایمر و کلریدمنیزیم، تکثیر گردید. ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر از Loading dye مخلوط گردید و سپس در چاهک‌های ژل ۲ درصد آگارز قرار داده شد و برای رنگ‌آمیزی DNA از Ethydium bromide استفاده گردید، و بعد از الکتروفورز با Gel Document از ژل عکس گرفته شد. ضمناً Amplify کردن ژن‌های فوق به جز موارد ذکر شده در مطالعه فوق برای تمام نمونه‌ها با شرایط یکسان اجرا شد.

یافته‌ها

از ٦١ نمونه مورد مطالعه ٤٥ نفر (٧٣ درصد) مرد و ١٦ (٢٧ درصد) نفر زن بود که DNA با کیفیت مناسب جهت PCR داشتند (شکل ١). در روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز که برای تکثیر دو اگزون از دو ژن AURKA و P53 در این مطالعه استفاده شد، در صورتی که نمونه فاقد باند بود PCR چندین بار تکرار می‌شد و فاکتورهای مؤثر به طور مجزا جهت حصول نتیجه پی‌گیری می‌شد که از جمله آن‌ها غلظت و درجه اتصال پرایمر به ژن و غلظت منیزیوم و سپس الکتروفورز بوده است. دو زوج پرایمر اختصاصی که برای تکثیر اگزون ٤ ژن AURKA استفاده شد، پرایمرهای با توالی زیر پس از بررسی عوامل



شکل١ : DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه با کیت استاندارد

مؤثر در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و انجام چندین PCR در نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

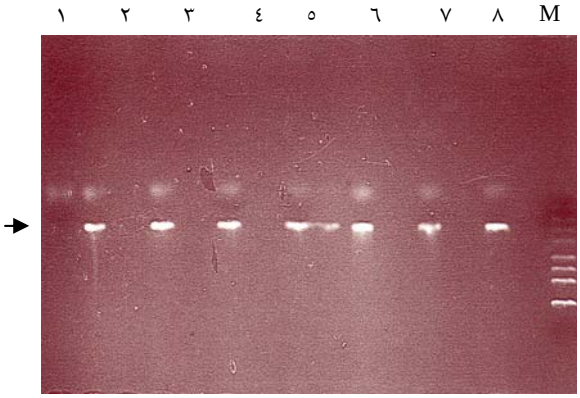
F-*5'*- TGCTGTGACTGCTTGTAGA- *3'* R-*5'*- CTCAACTTTCAGTCCCGT- *3_*
CTTTCATGAATGCCAGAAGT-3' R-*5'*- *CACAGGAAGTTAAGGGTG--'3 F-5*

و همچنین از پرایمرهای با توالی زیر:

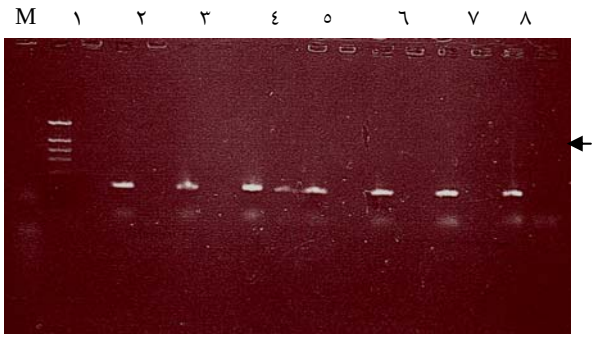
F-*5'*- *CTTTCATGAATGCCAGAAGT-3*
R 5'-CCAAGTCTTCACTTCGTCT-*3'*

که در تکثیر اگزون ٤ ژن AURKA استفاده شد، نتیجه مطلوب حاصل شد. از دو زوج پرایمر اختصاصی که برای تکثیر اگزون ٥ ژن P53 استفاده شد، پرایمرهای با توالی زیر دارای محصول PCR بودند:

شکل ٢: محصول PCR در ژل آگاروز ٢ درصد. (M (marker و شماره‌های ١ تا ٨ نمونه‌های مورد مطالعه در غلضت ١/٥ میلی مولار منیزیوم هستند. پیکان محل باند مورد نظر را نشان می‌دهد



شکل ٣: محصول PCR در ژل آگاروز ٢ درصد (M (marker و شماره‌های ١ تا ٨ نمونه‌های مورد مطالعه در غلظت ٣ میلی مولار منیزیوم هستند. پیکان محل باند مورد نظر را نشان می‌دهد



شکل٤: محصول PCR در ژل آگاروز ۲ درصد (marker) M و شماره‌های ۱ تا ۸ نمونه‌های مورد مطالعه در غلظت ٥ میلی مولار منیزیوم هستند. پیکان محل باند مورد نظر را نشان می‌دهد

F-5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT- 3'
'R-5'- AGCAATCAGTGAGGAATCAG- 3

الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پولی مراز در غلظت ۳ و٥ میلی مولار منیزیوم بهتر از ۱/٥ میلی مولار بود (شکل ۲ تا ٤). پرایمر با غلظت یک میکرومولار بهتر از ٥ و ۱۰ میکرومولار در واکنش زنجیره‌ای پولی مراز بود.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نوع پرایمر و غلظت منیزیوم در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نقش دارند و از دو زوج پرایمری که در این مطالعه برای تکثیر ژن AURKA استفاده شد، یک زوج مؤثرتر از دیگری بود در مورد ژن P53، یک زوج از پرایمرها محصولی مناسبی در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تولید نشد، در حالی‌که تغییر نوع پرایمر منجر به محصول PCR مناسب شد. غلظت ۳ و٥ میلی مولار منیزیوم در مخلوط PCR (Master mix) باندهای روشن‌تری ایجاد شد. در این مطالعه، از دو زوج پرایمری که در کشورهای سوئد و ایرلند برای تکثیر ژن در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز استفاده شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰,۱۱) و نکته جالب توجه در مطالعه حاضر این بود که پرایمرهایی که در کشور سوئد برای Amplify کردن اگزون ٥ ژن P53 استفاده شده بود، در نمونه‌های ما محصول PCR مناسبی تولید نکرد (۱۱). اما برعکس، پرایمرهایی که در کشور ایرلند برای تکثیر این اگزون استفاده شده بود، محصول مناسب در نمونه‌های مورد مطالعه با واکنش زنجیره‌ای پولی مراز حاصل شد (۱۰). مطالعه‌ای که در کشور شیلی برای Amplify ژن انجام شد، نشان می‌دهد که واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در نمونه‌های تازه بهتر از نمونه قدیمی است (١٦). بنابراین احتمال داده می‌شود که DNA نمونه قدیمی ممکن است به قطعاتی شکسته شوند و در نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز را با مشکل روبرو کند (۱۷,۱۸).

مؤثر بودن یک زوج از پرایمر در نمونه مورد مطالعه و عدم موفقیت پرایمر دیگر در مطالعه حاضر در تکثیر کردن ژن AURKA و ژن P53 در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌تواند مرتبط با پلی مورفیسم ژنی باشد (۱۹,۲۰) که احتمالاً در جمعیت یک ناحیه جغرافیایی با نواحی دیگر تفاوت داشته باشد و وجود پلی مورفیسم ژنی متنوع در نواحی مختلف جهان می‌تواند یکی از دلایل استفاده از پرایمرهای مختلف برای تکثیر ژن در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز باشد، چون وجود پلی مورفیسم ژنی ممکن است اتصال پرایمر را به DNA غیر ممکن ساخته و در نتیجه محصولی تولید نشود و یا ممکن است پرایمر به کانون غیر مورد نظر بر روی DNA متصل شود و محصول غیر طبیعی یا باندهای کاذب را در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تولید نماید که مد نظر پژوهشگران نمی‌باشند.

به طور کلی، علاوه بر فاکتورهای مؤثر در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز که در بردارنده بهینه کردن درجه اتصال پرایمر بهDNA و همچنین غلظت و درجه خلوص آن می‌باشد، نوع پرایمر نیز به عنوان یک عامل اصلی در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مؤثر می‌باشد، به طوری که بعضی پرایمرها در یک ناحیه برای تکثیر ژن در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز کارآمدتر، مطلوب‌تر و راحت‌تر عمل می‌کنند که باید مد نظر پژوهشگران جوان باشد. برای کارشناسان آزمایشگاه در حالتی که Amplify کردن DNA با مشکل همراه است، پرایمرهای جدید را برای تکثیر ژن

مورد نظر مدنظر داشته باشند و یا بر اساس ژنوم ناحیه جغرافیایی، پرایمری جدید طراحی کنند.

از مسؤولین آزمایشگاه بخش سلولی و مولکولی دانشگاه‌های علوم پزشکی سبزوار و اصفهان که در اجرای طرح همکاری نمودند، تشکر می‌گردد.

تشکر و قدردانی

References

1. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press; 2001.
2. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262(4): 56-61.
3. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann Biol Clin. 1990; 48(8): 579-82.
4. Rolfs A, Schulder I, Finck U. PCR; Clinical diagnostics research. Berlin: Spring Verlag. 1992.
5. Becker JM, Caldwell GA, Zachgo EA. Biotechnology: a laboratory course. USA: Academic Press; 1990.
6. Ralph R. The nucleic acid protocols handbook. Totowa: Humana Press; 2000.
7. Linacero R, Rueda J, Vasquez AM. Quantification cation of DNA for screening biodiversity plants and animals. London: Chapman and Hall; 1998.
8. Schander C, Kenneth HM. DNA, PCR and formalinized animal tissue- a short review and protocols. Organisms Diversity and Evolution. 2003; 3: 195–205.
9. Coyne VE, James MD, Reid SJ, Rybicki EP. Molecular Biology Techniques Manual. Third Edition, 2001[cited 2009 april 11]; Available from: URL: http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm
10. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. J Pathol. 1996; 180(4): 364-70.
11. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. Int J Cancer. 2001; 92(3): 338-41.
12. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. Rev Iberoam Micol. 2007; 24(2): 89-94.
13. Wishart TM, Macdonald SH, Chen PE, Shipston MJ, Coleman MP, Gillingwater TH, et al. Design of a novel quantitative PCR (QPCR)-based protocol for genotyping mice carrying the neuroprotective Wallerian degeneration slow (Wlds) gene. Mol Neurodegener. 2007; 2: 21.
14. Carrington M. Preparation of DNA and RNA from Trypanosoma brucei. Methods Mol Biol. 1993; 21: 101-11.
15. Podder M, Ruan J, Tripp WB, Chu ZE, Tebbutt JS. Robust SNP genotyping by multiplex PCR and arrayed primer extension. BMC Med Genomics. 2008; 1: 5.
16. Roa JC, Roa I, Melo A, Araya JC, Villaseca MA, Flores M, et al. p53 gene mutation in cancer of the colon and rectum. Rev Med Chil. 2000; 128(9): 996-1004.
17. Colomer A, Erill N, Verdu M, Roman R, Vidal A, Cordon-Cardo C, et al. Lack of p53 nuclear immunostaining is not indicative of absence of TP53 gene mutations in colorectal adenocarcinomas.Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2003; 11(2): 130-7.
18. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. Am J Pathol. 1999; 155(4): 1467-71.
19. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res. 1999; 27(16): e12.
20. Vidarsdottir L, Bodvarsdottir SK, Hilmarsdottir H, Tryggvadottir L, Eyfjord JE. Breast cancer risk associated with AURKA 91T -->A polymorphism in relation to BRCA mutations. Cancer Lett. 2007; 250(2):206-12.