مقاله پژوهشی

بهینه سازی تکثیر ژن کد کننده پروتئین ناقل لیپید

محمد کریمیان طاهری[۱]، مهران میراولیایی*[۱]، کامران قائدی[۱]، زهره زهرایی[۲]

۱- بخش سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- بخش بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

چکیده

ژن LTP کد کننده پروتئین ناقل لیپید[۱] در گیاهان می باشد. این ژن غنی از بازهای گوانین و سیتوزین می باشد. وجود این بازها باعث می شود تا آغازگر های طراحی شده برای ژن LTP در مرحله اتصال[۲] در چرخه PCR، ساختارهای ثانویه زیادی ایجاد کنند و نهایتا محصول غیر اختصاصی تولید شود. موادی مثل بتائین، دی متیل سولفوکسید[۳] (DMSO) و آمونیوم سولفات[۴] (AMS) می توانند این مانع را رفع کنند. در این تحقیق گرادیانی از هر یک از این مواد در واکنش PCR گذاشته شد و نهایتا غلظت های بهینه برای هر کدام از این مواد به دست آمد. در این میان ۴,۵ میکرولیتر بتائین (5M)، ۲,۲۵ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (۱۰٪) و ۲,۲۵ میکرولیتر بافر آمونیوم سولفات در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر از مخلوط PCR، غلظت های بهینه گزارش شدند.

واژگان کلیدی: Gradient PCR؛ ساختارهای ثانویه؛ بتائین؛ دی متیل سولفوکسید؛ بافرآمونیوم سولفات

مقدمه

پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید (LTPs) پپتیدهای کوچکی هستند که باعث تسهیل انتقال فسفولیپیدها در سلول‌های گیاهی می‌شوند (۱و ۲). ژن LTP غنی از بازهای CG (به میزان ۷۲ درصد) می‌باشد (۳). حضور درصد بالایی از بازهای CG در توالی الگو، باعث می‌شود تا محصول اختصاصی PCR تولید نشود (۴ و ۵). در توالی‌های غنی از بازهای CG، ساختارهای ثانویه تشکیل می‌شود و همین مسئله باعث می‌شود تا خاصیت پرش پلیمراز در طول واکنش PCR افزایش یابد و یا اینکه پلیمراز در این نواحی مکث زیادی داشته باشد (۶). برخی از مواد آلی از قبیل DMSO، بتائین، پلی اتیلن گلایکل، فرمامید و گلیسرول می‌تواند این معضل را حل کند. تاثیر DMSO روی بهینه سازی محصول PCR بیشتر از بقیه مواد بررسی شده است (۷-۹). البته مطالعاتی هم روی تاثیر بتائین در این زمینه انجام شده است (۱۰-۱۲). در شیمی هر ترکیب شیمیایی خنثی همراه با یک گروه عملکردی کاتیونی مانند آمونیوم چهارتایی

* مهران میراولیایی PhD
اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی
صندوق پستی ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱ تلفن: ۰۳۱۱۷۹۳۲۴۷۵ نمابر ۰۳۱۱۷۹۳۲۴۵۶
پست الکترونیک: mmiroliaie@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۴

1. Lipid Transfer Protein
2. Annealing
3. Dimethyl Sulfoxide
4. Ammonium Sulfate

Archive of SID
www.SID.ir

و یک گروه عملکردی آنیونی مثل یک گروه کربوکسیلات، بتائین نامیده می‌شود. دی متیل سولفوکسید هم یک ترکیب آلی بیرنگ با فرمول $(CH_3)_2SO$ می‌باشد. این ماده کاربردهای زیادی در بیولوژی سلولی ملکولی دارد. آمونیوم سولفات یک نمک معدنی با فرمول شیمیایی $(NH_4)_2SO_4$ است که در تکنیک‌های بیوشیمیایی برای رسوب پروتئین استفاده می‌شود. هر سه ماده مذکور با کاهش ساختارهای ثانویه در حین واکنش PCR و در نتیجه کاهش Tm رشته‌های DNA، باعث تولید محصول بیشتر و مناسب تر در پایان واکنش می‌شوند (۱۳و ۱۴). در این مطالعه برای بهینه سازی تکثیر ژن LTP برنج از بتائین، دی متیل سولفوکسید و آمونیوم سولفات در مخلوط PCR، استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ سنتز ژن LTP

ژن LTP برنج، ۲۹۱ نکلئوتید طول دارد و فاقد اینترون می‌باشد. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت عملیات کلونیک، توالی کامل ژن LTP برنج از NCBI بدست آمد (Accession No.CT۸۲۹۹۹۰,۱)و با نرم افزار oligo۶ (۱۵) آنالیز شد. توالی آغازگر رفت: 5́-TAAGGATCCATGAGGAAGTTGGCG GTGTTGGTG-3́ و توالی آغازگر برگشت 5›-TAACTCGA GTCAGTGGCAGGTGGGGAGGGC-3› بود. آغازگرها از شرکت Metabion (آلمان) سفارش داده شد. برای تکثیر ژن LTP، PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۰,۳میکرولیتر Smar Taq polymerase (stock:5u/µl), ۰,۳میکرولیترdNTPs mix (stock: 10 mM)، ۰,۳میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (stock: 100pM)، ۲ میکرولیترMgCl2 (stock: 50mM)، ۴,۵ میکرولیتر بتائین (5M)، ۲,۲۵ میکرولیتر بافر آمونیوم سولفات، ۲,۲۵ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (۱۰٪ V/V) و۲,۵ میکرولیتر از DNA ژنومی) (stock: ۶۰۰ng/µl برنج به عنوان الگوی سنتز انجام شد. (همه مواد PCR از شرکت Fermentas خریداری شد). واکنش PCR توسط دستگاه Astec و با شرایط دمای واسرشت[5] اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه همراه با ۳۰ سیکل تکراری با دمای واسرشت ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال[6] ۶۰°C به مدت ۲ دقیقه و دمای بسط[7] ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصول PCR رسوب داده و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

۲-۲ بهینه سازی تکثیر ژن LTP با استفاده از بتائین، AMS و DMSO

برای بهینه سازی محصول PCR، ابتدا از بتائین، با شیب غلظت ۱,۵ میکرولیتر، ۳میکرولیتر، ۴,۵ میکرولیتر، ۶ میکرولیتر و ۷,۵ میکرولیتر در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر مخلوط PCR استفاده شد. AMSوDMSO (۱۰٪) هم به صورت جداگانه و با شیب غلظت ۱,۲۵ میکرولیتر، ۲,۲۵میکرولیتر، ۳,۲۵میکرولیتر، ۴,۲۵ میکرولیتر و ۵,۲۵ میکرولیتر در واکنش PCR استفاده شدند.

۳- نتایج

۳-۱ بهینه سازی دمای مرحله اتصال PCR

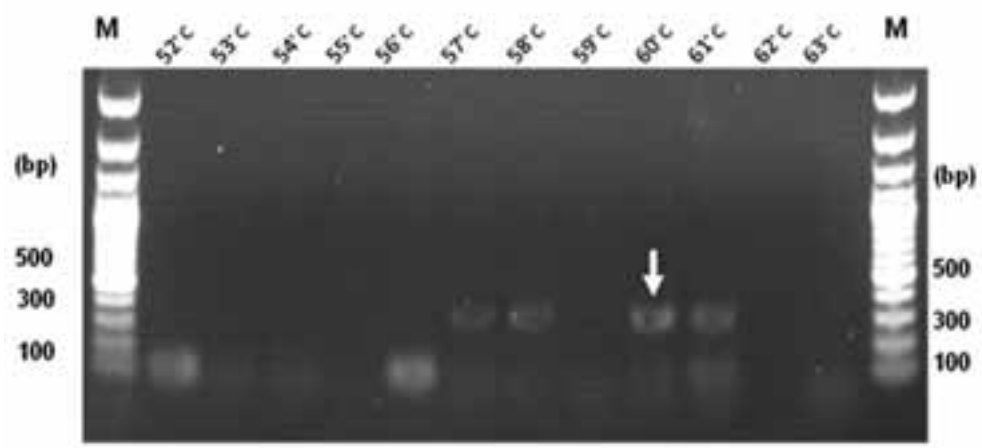
این مرحله از آزمایش به دلیل عدم حضور هیچ یک از افزاینده‌هادر مخلوط PCR، نوعی کنترل منفی به حساب می‌آید. نتایج حاصل از به کارگیری محدوده دمایی ۵۲°C-۶۳ در مرحله اتصال PCR و عدم حضور افزاینده[8]ها در مخلوط واکنش نشان می‌دهد که اتصال بهینه در دمای ۶۰°C صورت می‌گیرد، اما به دلیل عدم حضور افزاینده‌ها محصول تولید شده چندان مناسب نیست (شکل ۱). داده‌ها نشان می‌دهد که در دماهای اتصال پائین تر از ۵۷°C هیچ محصولی تولید نمی شود که این مسئله به خاطر Tm بالای آغازگرها است. همچنین در تمامی مراحل این آزمایش هیچ گونه محصول غیر اختصاصی تولید نشد (شکل ۱ و ۲) که دلیل این مسئله می‌تواند طول زیاد پرایمرها باشد.

۳-۲ بهینه سازی تکثیر ژن LTP با استفاده از افزاینده‌ها:

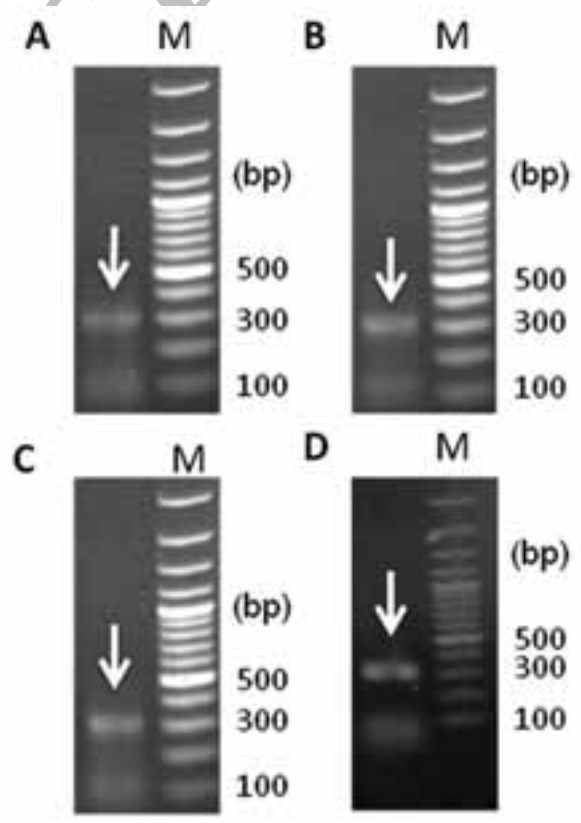
برای بهینه سازی تکثیر ژن LTP افزاینده‌های بتائین، AMS و DMSO انتخاب شدند. گستره ی ۱,۵-۷,۵ میکرولیتر بتائین و ۱,۲۵-۵,۲۵ میکرولیتر AMSو DMSO به صورت جداگانه و در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر مخلوط PCR استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ بارگزاری شد و غلظت محصولات از روی شدت باند و غلظت مارکر قرائت شد. غلظت بهینه برای هر

5. Denaturation
6. Annealing
7. Extension
8. Enhancer

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: بهینه سازی دمای مرحله اتصال PCR. بیشترین محصول در دمای ۶۰°C تولید شده است. M: مارکر .DNA



شکل ۲: بهینه سازی تکثیر ژن LTP با استفاده از افزاینده‌ها. باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز بعد از به کارگیری AMS ۲,۲۵ میکرولیتر (A)، ۲,۲۵ میکرولیتر DMSO(۱۰٪) (B) و ۴. ۵ میکرولیتر بتائین (C) (۵M) در مخلوط واکنش. باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز بعد از به کارگیری هر سه ماده افزاینده به صورت همزمان در واکنش (D).

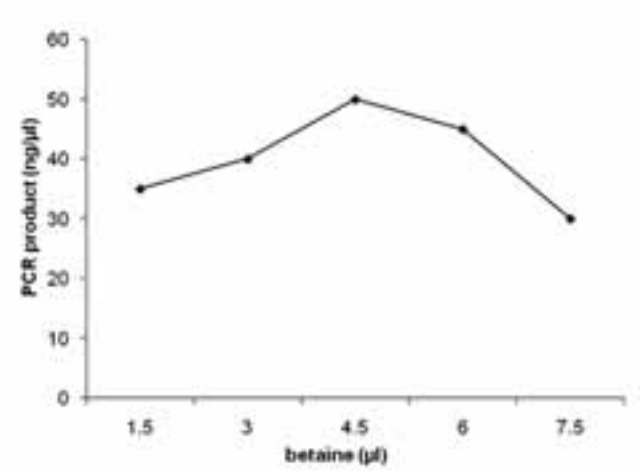
کدام از افزاینده‌ها به دست آمد. داده‌ها نشان داد که غلظت‌های پائین تر و بالاتر از ۴,۵ میکرولیتر بتائین و ۲,۲۵ میکرولیتر AMS و DMSO تاثیر چندان مساعدی روی تکثیر ژن LTP ندارد (نمودار ۱ و۲). همچنین داده‌ها نشان داد گر چه بتائین، AMS و DMSO در حجم‌های بهینه و به صورت جداگانه باعث افزایش محصولات اختصاصی واکنش PCR می‌شود (شکل ۲ A–C) اما افزودن هر سه ماده به صورت همزمان در مخلوط واکنش محصول اختصاصی بیشتری را می‌دهد (شکل ۲D).

۴- بحث

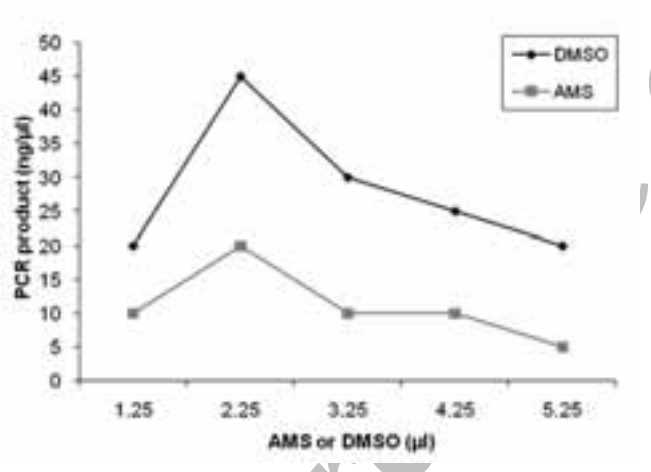
۷۲٪ از بازهای ژن LTP برنج را آدنین و گوانین تشکیل می‌دهد که حضور این بازها با درصد بالا باعث اختلال در تکثیر ابن ژن به وسیله تکنیک PCR می‌شود، لذا برای بهینه سازی تکثیر ژن LTP از بتائین، بافر آمونیوم سولفات و دی متیل سولفوکسید استفاده شد. گفته می‌شود که بتائین به خودی خود باعث کاهش محصولات غیر اختصاصی در واکنش PCR می‌شود (۱۶)، درحالیکه در این مطالعه مشخص شد که بتائین باعث افزایش تولید محصول اختصاصی هم می‌شود. مطالعات قبلی نشان می‌دهد اگر بتائین و DMSO به صورت همزمان درمخلوط PCR استفاده شوند، تاثیر آنها بیشتر خواهد بود (۱۷). این مطالعه نشان داد که حضور بافر آمونیوم سولفات به همراه بتائین و DMSO در مخلوط PCR باعث تولید محصول بیشتری می‌شود. در مطالعات قبلی این مواد با

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌های متفاوتی به کار برده شد که در این مطالعه غلظت بهینه این مواد برای واکنش PCR به دست آمد، مثلا در سال ۲۰۰۵، Jonghoon و همکارانش برای بهینه سازی تکثیر ژن‌های غنی از بازهای GC از DMSO و بتائین استفاده کردند که غلظت این مواد بسیار کمتر از غلظتی است که ما در پروژه حاضر استفاده نمودیم، آنها از بتائین ۱M و DMSO ۵٪ استفاده کردند (۱۸) در حالیکه در آزمایش حاضر از بتائین ۵M و DMSO ۱۰٪ استفاده شد. Henke و همکارانش هم برای بهینه سازی تکثیر نواحی غنی از بازهای GC از بتائین ۲,۵M و DMSO ۱۰٪ استفاده کردند (۱۲) که غلظت بتائین استفاده شده در پروژه حاضر دو برابر غلظت موجود در آزمایش Henke است. در آزمایش دیگری برای بهینه سازی شرایط PCR از بتائین ۱,۳M و DMSO ۱,۳٪ استفاده شد(۱۲) که غلظت DMSO به مراتب پائین تر است. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که به جای DMSO می‌توان از گلیسیرین ۱۰٪ در مخلوط PCR نیز استفاده کرد (۱۲). Alllen و همکارانش برای سهولت واکنش PCR از AMS در مخلوط واکنش استفاده کردند(۱۹) که در پروژه حاضر هم از این ماده استفاده شد. بر طبق دستورالعمل‌های معمول PCR، حجم MgCl2 (50mM) استفاده شده در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر برابر ۰,۷۵ میکرولیتر است در حالیکه در این آزمایش ۲ میکرولیتر از MgCl2 (50mM) استفاده شد. آزمایشات بعدی نشان داد که غلظت‌های به دست آمده در پروژه حاضر را می‌توان برای تکثیر ژن‌های انسانی غنی از آدنین و گوانین هم به کار برد. بنابراین کاربرد این مواد با غلظت‌های ذکر شده راه را برای تکثیر ژن‌ها و نواحی غنی از آدنین و گوانین هموار می‌نماید. معمولا توالی راه انداز[9]های ژنی غنی از آدنین و گوانین است (۲۰) بنابراین برای تکثیر این نواحی هم می‌توان از بتائین، بافر آمونیوم سولفات و دی متیل سولفوکسید استفاده کرد.



نمودار ۱: نمودار مربوط به بهینه سازی تکثیر ژن LTP2 با استفاده از به کارگیری بتائین (5M) در واکنش PCR. داده‌ها نشان می‌دهد که حجم‌های بیشتر و کمتر از ۴,۵ میکرولیتر باعث کاهش راندمان PCR می‌شود.



نمودار ۲: نمودار مربوط به بهینه‌سازی تکثیر ژن LTP2 با استفاده از به کارگیری AMS وDMSO (۱۰٪) در واکنش PCR. داده‌ها نشان می‌دهد که حجم‌های بیشتر و کمتر از ۲,۲۵ میکرولیتر باعث کاهش راندمان PCR می‌شود.

9. Promoter

www.SID.ir

References:

1. Kader, J.C. 1975. Proteins and the intracellular exchange of lipids: stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microssomal fractions by proteins isolated from potato tuber. Biochim Biophys Acta. 380:31-44.
2. Kader, J-C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 47:627-654.
3. Garcèa-Garrido, J., Menossi, M., Puigdomeènech, P., Mart|ènez-Izquierdo, J., Delseny, M. 1998. Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. FEBS Letters. 428:193-199.
4. Varadaraj, K., Skinner, DM. 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene. 140:1-5.
5. McDowell, DG., Burns, NA., Parkes, HC. 1998. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. Nucleic Acids Res. 26:3340- 7.
6. Viswanathan, VK., Krcmarik, K,, Cianciotto, NP. 1999. Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. BioTechniques. 27:508-11.
7. Pomp, D., Medrano, J.F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. BioTechniques. 10: 58- 9.
8. Sun, Y., Hegamyer, G., Colburn, NH. 1993. PCR directed sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to c-jun. BioTechniques. 15:372-4.
9. Sidhu, MK., Liao, MJ., Rashidbaigi, A. 1996. Dimethyl sulfoxide improves RNA amplification. BioTechniques. 21:44- 7.
10. Baskaran, N., Kandpal, RP., Bhargava, AK., Glynn, MW., Bale, A., Weissmann, SM. 1996. Uniform amplification of amixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. Genome Res. 6:633-8.
11. Weissensteiner, T., Lanchbury, JS. 1996. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing reactions. BioTechniques. 21:1102-8.
12. Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, SA. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res. 25:3957-8.
13. Rees, W.A., Yager, TD., Korte, J., von Hippel, PH. 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. Biochemistry. 32:137-144 .
14. Chakrabarti., R., Schutt, CE. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. Gene 274: 293–298.
15. http://www.oligo.net/downloads.html
16. Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R. Ceccherini I. 2006. Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. JMD 8: 544-550
17. Jensen, M. A., Fukushima, M., Davis, R.W. 2010. DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. PLoS One 5: e11024.
18. Jonghoon., K, Myung Soog., L. David., G. 2005. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 64: 147-151.
19. Allen., S, Yang., M. R. H, EsteÂcio., K, Doshi., Y, Eloiza., H. T, Jean-Pierre., J. I. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Research 32: 3-9.
20. Bachmann., HS, Siffert., W, Frey., UH. 2003. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel ‹slowdown PCR› technique. Pharmacogenetics 13:759-66.

Archive of SID

www.SID.ir