

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

چکیده/ امروزه، سنتز cDNA ژن‌های مختلف به طور گسترده در حوزه بیوتکنولوژی مطرح بوده و به دلیل کاربردهای زیاد cDNA روش‌های متعددی برای رسیدن به این هدف پیشنهاد شده است. در ارتباط با بسیاری از ژن‌ها، همواره نیاز به یک روش ساده‌تر، سریع‌تر، دقیق‌تر و کم هزینه‌تر در راستای سنتز cDNA آن‌ها مطرح بوده است. در مطالعه حاضر با استفاده از روش مبتنی بر آنزیم‌های نوع *Eco3II* (IIs) آگرون‌های تشکیل دهنده ایزوفرم VEGF-111 از ژن VEGF - از طریق واکنش‌های PCR مجزا تکثیر شده و در نهایت پس از انجام واکنش‌های هضم آنزیمی و cDNA، Ligation ایزوفرم VEGF-111 سنتز گردید. در این روش انجام مطالعات بیوانفورماتیکی و طراحی پرایمرهای ویژه به کمک نرم افزار الیگو^۷ از اهمیت بالایی برخوردار است. ایزوفرم VEGF-111 در بافت‌های نرمال بیانی ندارد و تنها در لاین‌های سلولی خاصی که در معرض نور UV-B و یا گروهی از مواد ژنوتوکسیک قرار گرفته‌اند بیان می‌شود؛ بنابراین سنتز cDNA آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. VEGF-111 با توجه به ویژگی‌های رگ‌زایی قوی و مقاومت در برابر پروتئازهای سلولی به عنوان یک فاکتور درمانی نویدبخش در راستای درمان بیماری‌های ایسکمیک مطرح می‌گردد.

واژگان کلیدی: cDNA نو ترکیب؛ VEGF-111؛ آنزیم‌های محدودالثر نوع IIs؛ ایسکمی قلبی.

بوده که به صورت متداول در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی به کار برده می‌شود (۱). در حقیقت، جهت مطالعه یک ژن ویژه اولین مرحله به طور معمول کلون نمودن و سپس بیان نمودن آن ژن می‌باشد. بیش‌تر ژن‌های یوکاریوتی دارای توالی‌های اینترونی بوده و اغلب ژن‌هایی طویل می‌باشند. دست‌ورزی DNA ژنومی طویل به دلیل ظرفیت محدود وکتورهای کلونینگ از نظر اندازه و وجود آنزیم‌های اندونوکلیئاز محدودالثر چندگانه بسیار پیچیده و مشکل است (۲). برای جلوگیری از این مشکلات، معمولاً cDNA به جای همتای ژنومی طویل خود استفاده می‌گردد، اما کلون نمودن cDNA نیز با مسائل و محدودیت‌های زیادی همراه می‌باشد.

1. Gene cloning.

مقدمه

cDNA. اغلب در کلون نمودن ژن‌ها^۱ به صورت پروب‌های ژنی و یا در ساخت کتابخانه‌های cDNA که از اهمیت ویژه‌ای در مطالعه‌ی ساختار و عملکرد پروتئین‌ها برخوردار است، مورد استفاده قرار می‌گیرد. فرآیند کلون نمودن ژن‌ها یکی از تکنولوژی‌های روز

* زهره حجتی، PhD

گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم،

دانشگاه اصفهان، خیابان هزار جریب، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۲۱۱۷۹۳۴۸۷

پست الکترونیک: z.hojati@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۱. تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۸.

ساخت cDNA سنتز می‌گردد. پرایمرهای مجاور به گونه‌ای طراحی شده که در چندین نوکلئوتید از توآلیشان با یکدیگر مکمل بوده و مناطق همپوشان تشکیل دهند. پس از طراحی پرایمرهای ویژه آگزون‌ها به صورت جداگانه و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی خود در واکنش‌های PCR مجزا تکثیر شده و در نهایت یک PCR در جهت پیرایش آگزون‌ها به صورت مصنوعی انجام می‌شود. در این روش تنها پرایمرهایی با طول کوتاه ساخته شده و نسبت به سایر روش‌ها هزینه کم‌تری مصرف می‌گردد، اما حداقل از دو دور واکنش PCR استفاده شده که وقت‌گیر بوده و میزان خطا را نیز افزایش می‌دهد (۹،۱۰).

در این مطالعه، یک روش ساده، همراه با میزان خطا و هزینه‌های کم‌تر برای سنتز cDNA ژن‌های چند آگزونی مختلف با شرایط ویژه پیشنهاد می‌گردد. این روش بر اساس استفاده از آنزیم‌های محدودالثر نوع II مثل *Eco3II* مطرح می‌گردد. آنزیم‌های نوع II توآلی‌های ویژه ای را مورد شناسایی قرار داده و در حدود چند نوکلئوتید پس از آن را برش می‌دهند. این ویژگی منحصر به فرد در اتصال آگزون‌های یک ژن به صورتی که حتی یک نوکلئوتید هم کم و زیاد نشود کاربرد دارد.

توصیف روش به صورت خلاصه: آگزون‌های یک ژن خاص به صورت جداگانه و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی جایگاه شناسای آنزیم *Eco3II* در طی واکنش‌های PCR مجزا تکثیر می‌شوند. در مرحله بعد تمام قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیم مذکور برش خورده و انتهاهای چسبنده‌ای ایجاد شده که در آن، انتهاهای چسبنده هر آگزون با آگزون مجاور خود کاملاً مکمل می‌باشد. بنابراین بدون کم و زیاد شدن حتی یک نوکلئوتید و به صورت دقیق، آگزون‌های یک ژن به ترتیب در کنار هم قرار گرفته و cDNA ژن مورد نظر تشکیل می‌شود. این روش سریع و کم هزینه بوده و در مقایسه با روش‌های قبلی از صحت بالاتری برخوردار است. یک نکته بسیار مهم در این روش توانایی طراحی پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی و دقیق می‌باشد (۶،۹).

در مطالعه حاضر با استفاده از این روش نوین به ساخت cDNA ایزوفرم VEGF-A111 از ژن VEGF-A خواهیم پرداخت. فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، خانواده‌ای از تنظیم کننده‌های کلیدی در رگ‌زایی فیزیولوژیک و پاتولوژیک می‌باشند. VEGF‌ها متعلق به ابرخانواده‌ی (VEGF/PDGF Platelet-derived growth fac-)

در این روش، به طور خلاصه mRNA کل خالص و سپس توسط یک آنزیم رونوشت‌بردار معکوس به cDNA تبدیل شده که برای انجام این مراحل به کیت‌های استخراج RNA و رونوشت‌برداری معکوس نیاز می‌باشد. در مرحله بعد cDNA حاصل به عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳،۴). تهیه mRNA در برخی موارد سخت و زمان‌بر بوده و برای کلون نمودن یک cDNA مخصوص، به یک بافت ویژه که دارای سطح بیان نسبتاً بالایی از آن ژن بوده در راستای تهیه mRNA و یا RNA کل^۲ نیاز است. برخی از این بافت‌ها کمیاب بوده و یا به سختی در دسترس قرار می‌گیرند، به علاوه برخی از ژن‌ها نیز بیان بسیار پایینی دارند. در حقیقت، دستیابی به cDNA برخی از ژن‌ها شامل ژن‌های دارای رونوشت‌های بسیار کم، ژن‌هایی که RNA الگو مربوط به آن‌ها همیشه به آسانی در دسترس نمی‌باشد (مثل ژن‌هایی که در بافت قلبی انسان بیان می‌گردند) و ژن‌های طویل که RNA مربوط به آن‌ها به راحتی توسط آنزیم‌های رونوشت‌بردار معکوس رایج به cDNA تبدیل نمی‌شود با مشکلاتی همراه می‌باشد. از سوی دیگر آنزیم‌های RNAase در تمام بافت‌ها بیان شده، بسیار پایدار بوده و خارج کردن آن‌ها به طور کامل از محیط مشکل است (۵،۶). برای برطرف نمودن مشکلات توضیح داده شده در بالا که در ارتباط با برخی از ژن‌ها مطرح می‌شود، امروزه روش‌ها و پروتکل‌های متفاوتی مثل سنتز شیمیایی cDNA هدف و یا استفاده از انواع روش‌های PCR در راستای ساخت و تولید توآلی cDNA به کار برده شده که برخی از این روش‌ها عبارتند از:

PCR-based thermodynamically balanced inside-out (TBIO)

two-step total gene synthesis combining dual asymmetrical PCR (D-PCR)

splicing by overlap extension PCR (SOEing PCR)

در ارتباط با روش‌های سنتز شیمیایی، مشکل اصلی شامل هزینه‌های بسیار بالا و خطاهای سنتز شیمیایی می‌باشد. از سوی دیگر، در روش‌های PCR مورد استفاده نیز برای ساخت توآلی‌های طویل حداقل دو مرحله PCR نیاز بوده و این مسئله میزان خطا را افزایش می‌دهد (۷،۸). به عنوان مثال در روش SOEing PCR سنتز cDNA از طریق پیرایش مصنوعی آگزون‌های یک ژن انجام می‌گیرد. در این روش، چندین جفت پرایمر به صورت اختصاصی برای آگزون‌های هدف و بر اساس ترتیب آگزون‌ها در راستای

به عنوان یک امید درمانی نویدبخش مطرح گردیده است، بنابراین سنتز cDNA آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. (۲۱،۲۲،۲۳).

مواد و روش‌ها

در راستای سنتز cDNA ی ایزوفرم VEGF-A111 مربوط به ژن VEGF-A، با توجه به میزان بیان بالای این ژن در بافت توموری پستان قطعه‌ی حاوی آگزون‌های ۲ و ۳ و ۴ با استفاده از cDNA تهیه شده از بافت توموری پستان تکثیر می‌گردد. در واقع این ژن به دلیل نقش کلیدی در افزایش رگ‌زایی و کمک به رشد و پیشرفت تومور، مشکلات خاصی چون بیان پایین و یا عدم دسترسی به بافت در ارتباط با آن وجود ندارد. در مرحله بعد آگزون ۱ به همراه حدود 100 bp از توالی‌های تنظیمی بالادست آن از روی DNA ژنومی استخراج شده از خون محیطی تکثیر می‌شود.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

استخراج RNA کل بافت توموری پستان با استفاده از کیت استخراج RNAeasy Mini (Qiagen, Germany) و بر اساس پروتکل اختصاصی شرکت سازنده انجام گردید (۲۴). مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از نسبت جذب نوری^۶ (OD) در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. نسبت OD نمونه بین ۱/۸ و ۲/۲ بوده و برای سنتز cDNA مناسب می‌باشد. در این مطالعه مقدار ۱ میکروگرم از RNA را با استفاده از پرایمر تصادفی طبق پروتکل شرکت سازنده به cDNA تک رشته‌ای تبدیل گردید (Fermentas Revertid™ First Strand cDNA synthesis Kit).

cDNA سنتز شده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای مصارف بعد و انجام واکنش PCR نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی:

برای استخراج DNA خون کامل از روش استخراج نمکی^۷ استفاده گردید. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردد.

(tor) بوده و اعضای این خانواده عبارتند از: VEGF-A, PIGF, VEGF-AB, VEGF-AC, VEGF-AD, VEGF-AE, VEGF-AF. در میان تمام اعضای این خانواده، VEGF-AA مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین فاکتور رگ‌زایی می‌باشد (۱۱،۱۲،۱۳). VEGF-A، اولین فرم از VEGF‌ها می‌باشد که در سال ۱۹۸۹ توسط Napoleon Ferrara و همکارانش شناسایی و کلون شد Napoleon در سال ۲۰۱۰ به دلیل تحقیقات گسترده در زمینه رگ‌زایی جایزه Lasker-DeBakey را دریافت کرد. VEGF-AA یک گلیکوپروتئین همودیمر با وزن مولکولی ۳۴-۴۵ کیلودالتون می‌باشد (۱۴،۱۵). این فاکتور رگ‌زایی توسط ژنی شامل هشت آگزون تولید می‌شود. زمین‌هایی که بوسیله چهار آگزون اول کد می‌شوند، شامل سیگنال پپتید، زمین متصل شونده به رسپتورهای VEGFR و یک جایگاه گلیکوزیلاسیون می‌باشند. توالی اسیدآمینه‌ای که بوسیله آگزون ۵ کد می‌شود، حاوی یک جایگاه برش برای پلاسمین بوده و ترادف پپتیدی که توسط آگزون‌های ۶ و ۷ کد می‌شود، در اتصال به پروتئوگلیکان‌های سولفات هپارین، نوتروفیل‌های ۱ و ۲ و دیگر رسپتورهای ناشناخته نقش دارد. دو ناحیه 3' UTR و 5' UTR در ژن VEGF-A نسبتاً طویل بوده و فاکتورهای تنظیمی متعددی در این نواحی، بیان ژن را کنترل می‌نمایند (۱۶،۱۷).

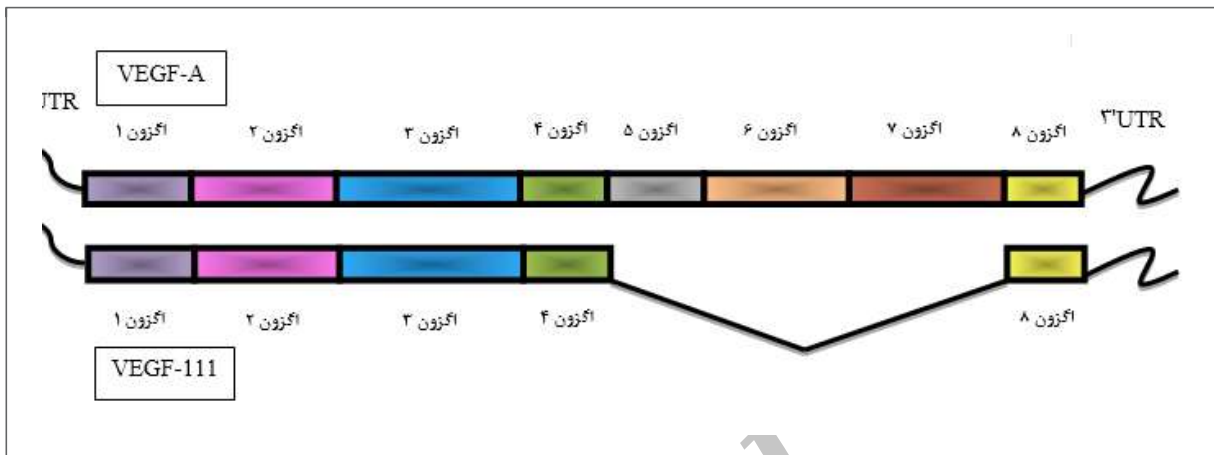
Pre-mRNA ژن VEGF-AA تحت پیرایش‌های متنوع مختلفی قرار گرفته و انواعی از ایزوفرم‌های VEGF-AA را ایجاد می‌نماید. 111VEGF یک ایزوفرم جدید از VEGF-AA بوده که نسبت به پلاسمین مقاوم می‌باشد (۱۸). 111VEGF در سلول‌های HaCt و MCF-7 که مورد تابش نور UV-B قرار گرفته بودند، شناسایی شد. علاوه بر UV-B، برخی از عوامل ژنوتوکسیک مثل عوامل ایجاد کننده شکست‌های دو رشته‌ای در DN شامل کامپوتوسین^۲، میموزین^۴ و میتومایسین^۵ هم می‌توانند بیان 111VEGF را القا نمایند. این ایزوفرم ویژه حاوی توالی مربوط به آگزون‌های ۴-۱ و ۸ بوده و فاقد آگزون‌های ۷-۵ می‌باشد (۱۹،۲۰). 111VEGF می‌تواند تمام فعالیت‌های زیستی VEGF معمولی را همانند سایر ایزوفرم‌ها انجام دهد. در ارتباط با 111VEGF، این واریانت از VEGF-AA در بافت‌های نرمال بیانی ندارد و تنها در لاین‌های سلولی خاصی که در معرض نور UV-B و یا گروهی از مواد ژنوتوکسیک قرار گرفته‌اند بیان می‌شود. در سال‌های اخیر مطالعات وسیعی در راستای استفاده از VEGF‌ها برای درمان بیماری‌های ایسکمیک مطرح شده و VEGF-A111 نیز

2. Total RNA
3. Camptothecin
4. Mimosin
5. Mitomycin C
6. Optical Density
7. Salting out

به طور کلی دو جفت پرایمر F1/R1 و F2/R2 برای سنتز دو قطعه مورد نیاز طراحی شد. در این مطالعه از آنزیم نوع IIs به نام *Eco31I* به منظور اتصال دو قطعه سنتز شده به صورت مجزا

طراحی پرایمرهای ویژه در راستای تکثیر دو قطعه مورد نیاز:

ناحیه کد کننده ایزوفرم VEGF-A111 از ژن VEGF-A شامل اگزون‌های ۱-۴ و ۸ می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: توالی اگزون‌های مربوط به ژن VEGF-A و ایزوفرم ویژه VEGF-111.

در راستای سنتز این ایزوفرم ویژه پرایمرهایی اختصاصی برای سنتز قطعه حاوی اگزون‌های ۲ و ۳ و ۴ از روی cDNA بافت توموری پستان و قطعه حاوی اگزون ۱ به همراه 100bp از توالی‌های تنظیمی همراه آن از روی DNA ژنومی خون محیطی طراحی گردید. (جدول ۱) (نرم افزار الیگو ۷). استفاده شد. این آنزیم توالی زیر را مورد شناسایی قرار داده و ۵ نوکلئوتید پس از آن را برش می‌دهد (N نشان دهنده هر نوکلئوتیدی می‌باشد).

استفاده شد. این آنزیم توالی زیر را مورد شناسایی قرار داده و ۵ نوکلئوتید پس از آن را برش می‌دهد (N نشان دهنده هر نوکلئوتیدی می‌باشد).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر اگزون ۱+۱۰۰bp (PCR۱) و اگزون‌های ۲ و ۳ و ۴ (PCR۲).

اگزون	پرایمرها	توالی پرایمر
۱+۱۰۰bp توالی بالادست	F1 R1	5'-CGGGGCTCTCGCCTCCCGGGGGGGTG-3'
		5'-TTGGTCTCCGTTCTCTCTTTGTTGTGCTGT-3'
۲ و ۳ و ۴	F2 R2	5'-TTGGTCTCCGTTCTGGTGCCGTGTGCTGGGGTTT-3'
		5'-GGTCTCCGCTCGGCTTGTCTCTGCTGGGTGGGGG-3'

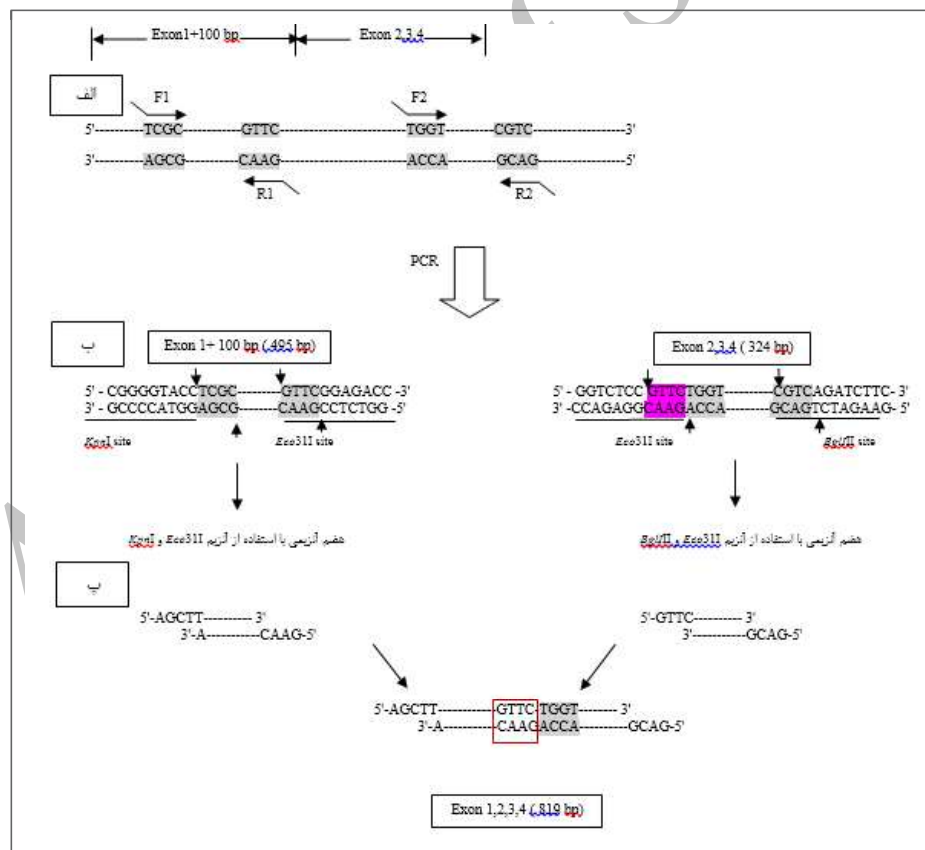
- توالی مورد شناسایی آنزیم *Eco31I* (GGTCTCC)
- توالی چهار نوکلئوتیدی انتهای اگزون ۱ که پس از هضم قطعات با آنزیم *Eco31I* به صورت نواحی مکمل جهت اتصال دو قطعه ایجاد می‌شود (GTTC)
- توالی ۲۱ نوکلئوتیدی مربوط به اگزون ۸ (CGCCTCGGCTTGTCTCTG)

در شکل ۲ توالی‌های ابتدا و انتهای دو قطعه در قسمت الف نشان داده شده و پس از آن در قسمت ب توالی‌های تکثیر شده در ضمن واکنش‌های PCR و ۱ و ۲ آورده شده است. همانطور که در قسمت پ از شکل ۲ نشان داده شده است، پس از هضم آنزیمی دو قطعه تکثیر شده با آنزیم Eco31I نواحی مکمل در بخش‌های انتهایی چسبان از هر دو قطعه ایجاد شده که ضمن انجام واکنش اتصال^۱ و با استفاده از آنزیم لیگاز به یکدیگر متصل شده و یکدیگر را تکمیل می‌نمایند (شکل ۲). نکته کلیدی و مهم، قرار دادن نوکلئوتیدهای اختصاصی در جایگاه‌های نوکلئوتیدی N پس از توالی مورد شناسایی آنزیم Eco31I می‌باشد.

5'...G G T C T C N^...3'

3'...C C G G N N N N N^...5'

در پرایمرهای F1 و R2، توالی مربوط به جایگاه شناسایی آنزیم BglIII و KpnI به منظور کلون نمودن قطعه ساخته شده در مطالعات بعدی قرار داده می‌شود. پرایمرهای F2 و R1 حاوی توالی مورد شناسایی آنزیم Eco31I بوده به طوری که پس از برش دو قطعه ساخته شده در واکنش‌های PCR با آنزیم مذکور cDNA ایزوفرم VEGF-A111 بدون کم و زیاد شدن حتی یک نوکلئوتید و با دقت بسیار بالایی شکل می‌گیرد. توالی اگزون ۸ شامل ۲۱ نوکلئوتید بوده که قبل از توالی شناسایی آنزیم BglIII در پرایمر R2 قرار داده می‌شود.



شکل ۲: دیاگرام شماتیک از نحوه‌ی تشکیل cDNA ایزوفرم VEGF-111.

یافته‌ها

پایه و اساس روش مبتنی بر استفاده از آنزیم *Eco3II* به خوبی در شکل ۲ نشان داده شده است. دو قطعه‌ی حاوی اگزون‌های ایزوفرم VEGF-A111 از طریق دو واکنش PCR جداگانه و با طراحی پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌گردد. در این روش دو پرایمر بیرونی F1 و R2 در راستای کلون نمودن قطعه حاصل در داخل یک وکتور خاص و در طی مطالعات بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما دو پرایمر درونی F2 و R1 امکان اتصال دو قطعه مجزا را فراهم می‌آورند. به علاوه طراحی پرایمر R2 به صورتی انجام گرفته که توالی مربوط به اگزون ۸، شامل ۲۱ نوکلئوتید قبل از جایگاه شناسایی آنزیم BglIII قرار داده شود.

در حقیقت چهار نوکلئوتید انتهایی اگزون ۱ پس از توالی مورد شناسایی آنزیم *Eco3II* در پرایمرهای F2 و R1 قرار گرفته و بعد از هضم آنزیمی نواحی مکمل ایجاد می‌گردد. در ادامه، دو واکنش PCR به صورت جداگانه و در راستای تکثیر دو قطعه مورد نیاز انجام می‌گیرد. واکنش PCR۱ در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳μl از DN ژنومی، ۰,۵μl از هر کدام از پرایمرهای F1 و F2، ۲,۵μl بافر Taq 10x، ۱μl dNTP، ۲μl MgCl2، ۱μl آنزیم Taq DN پلیمرز (سیناژن) و ۱۴,۷μl آب مقطر انجام گرفت. واکنش PCR۲ نیز در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱μl از DN ژنومی، ۰,۷۵μl از هر کدام از پرایمرهای F1 و F2، ۲,۵μl بافر Taq 10x، ۱μl dNTP، ۲μl MgCl2، ۱μl آنزیم Taq DN پلیمرز (سیناژن) و ۱۶,۷μl آب مقطر انجام گرفت. سیکل‌ها و مدت زمان هر سیکل از دو واکنش PCR در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: شرایط واکنش‌های PCR انجام شده برای تکثیر اگزون ۱+ (PCR1) و اگزون‌های ۲ و ۳ (PCR2).

PCR1			PCR2		
مرحله	دمای °C	زمان	مرحله	دمای °C	زمان
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۷ min	دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۷ min
دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ sec	دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ sec
اتصال پرایمرها	۶۰	۳۰ sec	اتصال پرایمرها	۵۵	۳۰ sec
طویل شدن	۷۲	۵۰ sec	طویل شدن	۷۲	۵۰ sec
طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min

به طور کلی می‌توان گفت که اختصاصیت و کارایی روش فوق به طراحی پرایمرهای ویژه بستگی داشته که در این بین طراحی دو پرایمر F2 و R1 (پرایمرهای اسپلایسینگ مصنوعی) از اهمیت خاصی برخوردار است. در این پرایمرها توالی مورد شناسایی آنزیم *Eco3II* به صورت کاملا اختصاصی قرار داده می‌شود. آنزیم *Eco3II* قادر است یک توالی ۶ bp ای غیر پالیندروم (5'...GGTCTC^..3') شناسایی نموده و یک انتهای چسبنده ۴ bp ای به صورت 5' overhang ایجاد نماید. در این مطالعه ۴ نوکلئوتید از انتهای توالی

سپس قطعات تکثیر شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت و با استفاده از آنزیم *Eco3II* مورد برش قرار گرفت. پس از آن، قطعات برش یافته به صورت مجزا با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت فرمنتاز از روی ژل ۱٪ آگارز استخراج شده و در واکنش ligation مورد استفاده قرار می‌گیرند. واکنش اتصال در حجم کلی ۲۰μl شامل ۱۷μl از هر کدام از قطعات برش یافته، ۲μl بافر T4 DN ligase، ۱μl آنزیم T4 DN ligase (فرمنتاز) و ۳μl آب مقطر انجام گرفت.

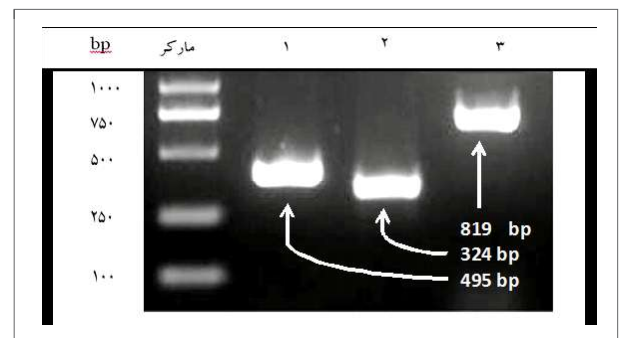
بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه روش توضیح داده شده در مطالعه حاضر برای اتصال دو قطعه‌ی مجزا مورد استفاده قرار گرفته، اما این روش توانایی اتصال بیش از دو قطعه را نیز دارا می‌باشد. بر اساس شواهد موجود پیش بینی می‌گردد که اتصال قطعات بیشتر به صورت کاملاً اختصاصی و با ترتیب ویژه مورد نظر در یک واکنش ligation امکان‌پذیر خواهد بود. تنها نکته مورد توجه در اتصال بیش از دو قطعه این است که باید نواحی طراحی شده برای اتصال هر دو قطعه با دو قطعه دیگر کاملاً متفاوت باشد. به این ترتیب قطعات تکثیر شده بدون هیچ خطایی در کنار یکدیگر قرار گرفته و قالب خوانشی مورد نظر نیز کاملاً حفظ می‌گردد.

یک نگرانی در ارتباط با روش فوق، امکان وجود توالی مورد شناسایی توسط آنزیم Eco31I در دو قطعه تکثیر یافته بوده که منجر به تکه تکه شدن قطعات پس از هضم آنزیمی می‌گردد. این مشکل از طریق انتخاب یک آنزیم دیگر از آنزیم‌های گروه II_s کاملاً قابل حل می‌باشد. در حقیقت قبل از انتخاب نوع آنزیم II_s، باید نقشه آنزیم‌های محدودالثر قطعات مورد نظر برای اتصال از طریق روش آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و سپس یکی از آنزیم‌های II_s که توالی مورد شناسایی آن در هیچ یک از قطعات وجود ندارد مورد استفاده قرار گیرد.

در مجموع، روش ارائه شده در این مطالعه یک ابزار جایگزین برای سنتز cDNA ژن‌های مختلف فراهم نموده و سنتز ژن‌هایی با بیان پایین و یا ژن‌هایی که بیان آن‌ها در بافت‌های غیرقابل دسترس اتفاق می‌افتد، با استفاده از این روش به آسانی امکان‌پذیر خواهد بود. این روش یک ابزار ساده، سریع، کم هزینه و همراه با میزان خطای پایین بوده و در حوزه زیست شناسی مولکولی بسیار کاربردی می‌باشد.

اگزون ۱ (۳' GTTC' ۵') در پرایمر R1 و در جایگاه NNNN قرار داده شده و همین توالی نیز در NNNN از پرایمر F2 قرار می‌گیرد. در حقیقت توالی ابتدای اگزون ۲ بلافاصله بعد از توالی GTTC در پرایمر F2 واقع می‌شود. بنابراین پس از انجام فرآیند هضم آنزیمی دو انتهای مکمل '3'-5'CG و '5'-3'GTTC ایجاد شده که انتهای توالی اگزون ۱ را تشکیل داده و بلافاصله بعد از آن توالی ابتدای اگزون ۲ قرار می‌گیرد. در ابتدا، پرایمرهای اختصاصی مربوط به تکثیر هر قطعه طراحی و کارایی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار oligo7 مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. پس از آن واکنش‌های PCR به طور مجزا صورت گرفته، که در نتیجه استفاده از پرایمرهای F1 و R1 قطعه‌ای به طول 495 bp بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ مشاهده گردید (شکل ۳- قسمت ۱). به علاوه، استفاده از پرایمرهای F2 و R2 منجر به تشکیل باندهی به طول 324 bp بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ گردید



شکل ۳: سنتز cDNA یزوفرم VEGF-111 با استفاده از روش آنزیمی. تکثیر اگزون ۱ + ۱۰۰ bp به طول ۴۹۵ bp (خط ۱) و اگزون‌های ۲ و ۳ و ۴ به طول ۳۲۴ bp (خط ۲) و تشکیل قطعه ۸۱۰ bp پس از هضم آنزیمی و واکنش ligation (خط ۳). در مرحله بعد، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم Eco31I انجام شده و محصول هضم آنزیمی از روی ژل استخراج گردید تا در مرحله ligation مورد استفاده قرار گیرند. در نهایت پس از انجام واکنش اتصال باندهی به طول 819 bp بر روی ژل مشاهده شد (شکل ۳- قسمت ۳).

References / منابع

1. Bertrand, E., Pictet, R., & Grange, T. Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Research*, 1994; 22, 293–300.
2. Xiong AS, Yao QH, Peng HR, et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic acids research* 2004; 32(12): e98-e98.
3. Cui Y, Zhu G, Chen Q, et al. A preferable approach to clone hLIF cDNA from the genomic DNA. *Electronic Journal of Biotechnology* 2011; 14(3): 1-6.
4. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 2004; 15, 155–166.
5. Step EA. Aptamer-dependent full-length cDNA synthesis by overlap extension PCR. *BioTechniques* 2004; 37(1): 124-129.
6. Berlin, YA. DNA splicing by directed ligation (SDL). *Current Issues in Molecular Biology* 1999; 1: 21-30.
7. Gao, X, Yo P, Keith A, Ragan TJ, Harris TK. Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: A novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Research*, 31, 2003; e143.
8. Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Research*, 2004;32, e59.
9. Li XX, Zheng F, Jiao LY, Guo G, Wang LB, Yao Z. An alternative approach to synthesize cDNA bypassing traditional reverse transcription. *Molecular biotechnology* 2008; 39(3): 201-206.
10. Bryksin AV, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* 2010; 48(6): 463.
11. Dariusz KBM, Halina BM, Beata KK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynologia Polska* 2011; 62 (5): 444-455.
12. Hoeben A, Landuyt B. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 2004; 56(4): 549-580.
13. Jiayi Xu, Cong Liu , Maobin Fu , Yan Huang , Shao-hua Gu ,, Yan Zhou YX. The evolution of alternative splicing exons in vascular endothelial growth factor A. *Gene* 2011,487, 143–150.
14. Gilles BMJ, David M, Frédéric MG, Pierre W, Guy DJG. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* 2007; 40, 568–576.
15. Hanna H. The VEGF Family, The Inside Story. *Cell* 2007; 22, 33–54.
16. Amandine ZK, Ste PB, Corinne H, Eric LH. An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Research* 2008; 36, 7, 2334-2445.
17. Rajarshi GK, Karen ES, Arthur M, Joan SH, Ron FU. Transcriptional Regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. *PLoS ONE* 2010; 5,3.
18. Simons MS, Sticky CD. VEGFs Display Their Wares. *Circulation Research* 2007; 100:1402-1404.
19. Giacca M. Non-redundant functions of the protein isoforms arising from alternative splicing of the VEGF-A pre-mRNA. *Transcription* 2010; 1:3, 149-153.
20. Georgia TC, Guntram S, Wolfgang K, Bertram W. Oxidative Stress Regulates Vascular Endothelial Growth Factor-A Gene Transcription through Sp1- and Sp3-dependent Activation of Two Proximal GC-rich Promoter Elements. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.2003;278, 10, 7, pp. 8190–8198.
21. Steven J, Prior JMH, Chad M, Larry WD, Michael DB, Stephen M. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H1848–H1855.
22. Gilles P. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene-a concert of activating factors. *Cardiovascular Research* 65 2005;

23. Daekyu S. Evidence of the formation of G-quadruplex structures in the promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene. *Nucleic Acids Research* -1256 ,4 ,39 ;2010 1265.
24. Kiessling S, Muller-Newen G, Leeb SN, et al. Functional expression of the Interleukin11- receptor α -chain and evidence of antiapoptotic effects in human colonic epithelial cells. *J Bio Chem* ;2004 10315-10304 :(11)279.

Archive of SID