



طراحی روشی جدید مبتنی بر ARMS PCR برای تشخیص ژنوتیپ پلی مورفیسم C/T -1562 در پروموتور ژن MMP-9

مرتضی صادقی^{۱*} (M.Sc.)، علیرضا صیوری^۲ (Ph.D.)

۱- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک، دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی. ۲- اداره پزشکی قانونی اصفهان- آزمایشگاه DNA- دکترای علوم آزمایشگاهی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۴

چکیده

مقدمه: کلاژن نوع-۴ (MMP-9) یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که به علت هضم کلاژن می‌تواند در جدایی سلول‌ها از بافت پایه و بدخیمی آنها نقش داشته باشد و به همین علت به عنوان یک تومور مارکر برای چندین سرطان مهم معرفی شده است. وجود پلی مورفیسم تک‌نکلئوتیدی C/T در ناحیه ۱۵۶۲- پروموتوری این ژن، باعث افزایش بیان این ژن در سطح رونویسی از طریق کاهش اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی در افراد واجد آلل T می‌گردد. با توجه به اهمیت این پلی مورفیسم، هدف تحقیق حاضر طراحی روشی برای تعیین ژنوتیپ افراد در این پلی مورفیسم، بدون استفاده از PCR-RFLP است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از سایت اطلاعات ژنی EPD توالی دو طرف منطقه مورد نظر دریافت و نرم‌افزار PRIMER1 جهت طراحی چهار جفت پرایمر اختصاصی آلل برای دو طرف منطقه مورد نظر استفاده شد. با انجام PCRهای مختلف، دو جفت پرایمر بهتر انتخاب و ARMS PCR برای آنها بهینه‌سازی شد. برای تأیید نتایج PCR از تعیین توالی (Sequencing) استفاده شد.

نتایج: با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، محصول PCR دارای طول ۲۰۵ نوکلئوتید، نشانگر وجود آلل C و محصول دارای طول ۲۵۳ نوکلئوتید، نشانگر وجود آلل T بود. نتیجه‌گیری: با استفاده از این تکنیک بدون نیاز به هضم آنزیمی RFLP و با سرعت و دقت بالا می‌توان ژنوتیپ افراد را با یک PCR اختصاصی ARMS مشخص کرد.

واژه‌های کلیدی: MMP-9، پلی مورفیسم، ARMS PCR.

Original Article

Knowledge & Health 2013;7(4):141-145

Design of a New Method of ARMS PCR for Detection of MMP-9 Promoter -1562 C/T Polymorphism

Morteza Sadeghi^{1*}, Alireza Sabouri²

1- Genetic Section, Biology Dept., Faculty of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran. 2- Ph.D. in Laboratory Sciences, Dept. of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Abstract:

Introduction: Type IV collagens is one of the most important genes which due to its function in collagen digestion can be affective in separation of the cells from the basal lamina and the metastasis of them so this gene is known as a tumor marker of several cancers. Existence of a single nucleotide polymorphism -1562 C/T at this gene's promoter case leads to over expression of this gene in transcription level by decreasing inhibitor protein bonding on T alleles. The aim of the present study was to investigate a new method for the person's genotype on this polymorphism without the use of PCR_RFLP.

Methods: Using EPD genome database, the sequences of the intended region were received and by using PRIMER1 software 4 primers were designed for the area. With multiple PCR reaction, two pairs of the best primers were selected and the ARMS PCR was optimized for them. The PCR genotyping results were approved by direct Sequencing.

Results: With the use of the newly designed primers, the ARMS PCR product with 205 nucleotide size showed C allele and the PCR products with 253 nucleotide sizes showed the T allele.

Conclusions: With the use of this technique, we can determine the person's genotype with an ARMS PCR without the use of RFLP and with a higher speed and accuracy.

Keywords: MMP-9 polymorphism, ARMS PCR.

Conflict of Interest: No

Received: 28 November 2011

Accepted: 4 November 2012

*Corresponding author: M. Sadeghi, Email: ms.sadeghi@yahoo.com

مقدمه

خانواده بزرگ ماتریکس متالو پروتئینازها، آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه اتصالات بین غشای پایه سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می‌کنند (۱). تقسیم‌بندی آنها براساس تشابهات ساختاری و نوع سوبسترای تخصصی هریک صورت می‌گیرد (۲). این آنزیم‌ها در حالت عادی در سلول‌های نرمال بیان می‌شوند و در فرایندهایی مانند تغییر فرم بافت‌ها، ترمیم زخم‌ها و رگ‌زائی یا آنژیوژنز شرکت می‌کنند (۳). مشاهده افزایش بیان انواع مختلف این آنزیم‌ها در رده‌های سلولی سرطانی در مراحل مختلف روند سرطانی شدن، گویای تأثیر آنزیم‌های مذکور در مراحل گوناگون تومورزایی می‌باشد و مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های بدخیم در مقایسه با سلول‌های خوش‌خیم، آنزیم بیشتری ترشح می‌کنند (۴). ژلاتیناز B یا کلاژناز نوع IV یکی از مهم‌ترین اعضای این خانواده می‌باشد (MMP-9) که بر اتصالات بین سلولی شامل انواع مختلف کلاژن‌ها، الاستین و پروتئوگلیکاسین‌ها اثر می‌گذارد (۴ و ۵). این پروتئین به دلیل دارا بودن فعالیت کلاژنازی در حالت افزایش بیان، باعث ازهم‌گسیختگی غشای پایه می‌گردد و به همین دلیل نقشی اساسی در متاستاز سرطان ایفا می‌کند (۶). میزان بیان این آنزیم و در نتیجه مقدار مشارکت آن در هضم اتصالات بین‌سلولی و پیشروی سرطان می‌تواند تحت تأثیر توالی‌های تنظیمی در پروموتور ژن باشد. تنظیم بیان این ژن در سطح رونویسی در دو منطقه با جذب عوامل مختلف الگوبرداری صورت می‌گیرد. در منطقه بالادست (UP Stream) از طریق سایت‌های SP1 EtS, NFkB و در منطقه پایین‌دست (Down Stream) از طریق سایت AP-1 انجام می‌گیرد (۷ و ۸). وجود یک پلی‌مورفیسم تک‌نکلئوتیدی از نوع جابه‌جایی باز C→T در ناحیه ۱۵۶۲- می‌تواند یک عامل تنظیمی مهم باشد. مطالعات نشان می‌دهند که این ناحیه به‌عنوان سایتی برای اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی عمل می‌کند، به طوری که جابه‌جایی C→T در جایگاه پلی‌مورفیسم، مانع برهم‌کنش این پروتئین‌ها با DNA واجد آلل T می‌گردد. در نتیجه باعث افزایش بیان ژن در آلل‌های واجد T می‌شود که می‌تواند منجر به متاستاز سلول‌های سرطانی و بدخیمی آنها گردد (۹ و ۱۰).

ما در مطالعات قبلی خود بر روی این ژن طی دو مطالعه به وجود ارتباط بین حالت افزایش بیان این ژن و وجود آلل T در پروموتور و همچنین ارتباط وجود آلل T با پیشرفت سرطان پستان در جمعیت ایران، گزارش کردیم (۱۱ و ۱۲). با توجه به اهمیت این پلی‌مورفیسم و نیاز وجود یک تکنیک دقیق و کم‌هزینه بر پایه (ARMS, Amplification Refractory Mutation System) برای تعیین

ژنوتیپ افراد در این مطالعه به ایجاد یک تکنیک جدید برای بررسی ایمن پلی‌مورفیسم پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

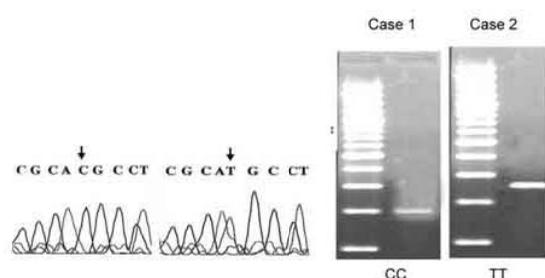
DNA ژنومی از خون محیطی سیاهرگی و به‌روش نمکی میلر (بافرهای کافی A و B) استخراج شد (۱۳). برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم C/T- ۱۵۶۲ به‌روش ARMS ابتدا از طریق سایت اطلاعات پروموتوری یوکاریوتی EPD توالی منطقه دو طرف پروموتور موردنظر از ۱۰۰۰- تا ۲۰۰۰- دریافت شد. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی ARMS از نسخه اصلی نرم‌افزار PRIMER1 موجود در سایت بیوانفورماتیک http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1 استفاده شد. تنظیمات نرم‌افزار به گونه‌ای انجام شد که دمای بهینه برای تکثیر ۷۷ درجه و درصد GC برابر ۵۰٪ در نظر گرفته شد. در نهایت برای حالت داده‌شده دو سری پرایمر (هر سری متشکل از ۴ پرایمر) دریافت شد (جدول ۱).

طراحی این پرایمرها به گونه‌ای است که در واکنش ARMS PCR پرایمر OF با پرایمر IR باعث تکثیر آلل C (محصول دارای طول ۲۰۵ نوکلئوتیدی) و پرایمر IF با OR باعث تکثیر آلل T می‌شود (محصول دارای طول ۲۵۳ نوکلئوتیدی). پرایمرهای داخلی در منطقه ۳ خود دارای یک نوکلئوتید ناجور (Mismatch) هستند که برای بررسی C/T پرایمر داخلی IF در ۳ خود دارای نوکلئوتید T است (قابلیت تکثیر آلل دارای نوکلئوتید T) و پرایمر داخلی IR در انتهای ۳ خود دارای نوکلئوتید G است (قابلیت تکثیر آلل دارای نوکلئوتید C) (شکل ۱).

برای بهینه‌سازی شرایط PCR غلظت‌های مختلف $MgCl_2$ از ۱/۵ میلی‌مولار تا ۴ میلی‌مولار آزمایش شد و همچنین دمای اتصال پرایمرها نیز از ۷۷ تا ۷۹، روی نمونه‌های مختلف آزمایش شد و همچنین غلظت‌های مختلف پرایمرهای داخلی و خارجی برای به‌دست‌آوردن یک حالت بهینه PCR که امکان استفاده هم‌زمان از یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی در آن وجود داشته‌باشد، آزمایش شد که بهترین حالت غلظت ۱ به ۱۰ از جفت پرایمر خارجی- داخلی بود. نهایتاً PCR بهینه‌شده به‌صورت بافر PCR (50 mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 8, dimethylsulfoxide 250 μ M از هر ۲۰۰ نانوگرم از DNA الگو و ۱ واحد از آنزیم Taq polymerase در حجم ۲۵ میکرولیتر و دمای ۷۸ درجه تنظیم شد. برای مشاهده محصولات PCR از الکتروفورز ژل ۱/۵٪ اگرز استفاده شد (شکل ۲). برای تأیید نتایج ژنوتایپینگ حاصل از PCR، ۱۰ نمونه به‌صورت تصادفی انتخاب گردید و ژنوتیپ آنها با تعیین توالی مستقیم تعیین و با نتایج حاصل از PCR مقایسه شد (شکل ۳).

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار، به همراه دمای اتصال و طول محصول

دمای اتصال TM	طول محصول	توالی پرایمر	سری اول
۷۹	۴۳۹	Forward inner primer (T allele): 414 CAGGCGTGGTGGCGCACGCCTATCAT	
۷۷	۴۳۹	Reverse inner primer (C allele): 467 TCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGTTG	
۷۸	۲۹۰	Forward outer primer (5' - 3'): 263 ATACAGCTTATTGGCCGGGCGCCATGG	
۷	۶۳۹	Reverse outer primer (5' - 3'): 666 GCCAGCCGGCATCGGGCAGGGTCTATAT	
سری دوم			
۷۹	۴۳۹	Forward inner primer (T allele): 414 CAGGCGTGGTGGCGCACGCCTATCAT	
۷۷	۴۳۹	Reverse inner primer (C allele): 467 TCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGTTG	
۷۸	۳۰۸	Forward outer primer (5' - 3'): 281 GGCGCCATGGCTCATGCCCGTAATCCTA	
۷۸	۶۳۹	Reverse outer primer (5' - 3'): 666 GCCAGCCGGCATCGGGCAGGGTCTATAT	



شکل ۳- تأیید محصول PCR با تعیین توالی مستقیم. سمت راست الکتروفورز دو فرد با ژنوتیپهای CC و TT. سمت چپ، تعیین توالی همان نمونه‌ها

پرایمر رفت داخلی، IF) موفق به اتمام تکثیر غیراختصاصی باندهای مرتبط با آلل T شدید و با افزایش مقدار پرایمر اختصاصی آلل C (پرایمر برگشت داخلی، IR) کیفیت باندهای مربوطه تشخیص آلل C بسیار بهتر شد. در نهایت از دو سری پرایمر طراحی شده، جفت پرایمر اول پرایمرهای بسیار مناسب‌تری برای انجام ARMS PCR بودند و باندهای بسیار واضح‌تری ایجاد می‌کردند. محصولات PCR ایجاد شده توسط آنها برای آلل C دارای طول ۲۰۵ نوکلئوتید و برای آلل T دارای طول ۲۵۳ نوکلئوتید بودند (شکل ۲).

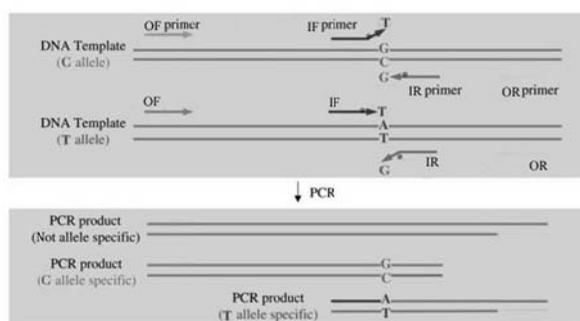
ARMS PCR نهایی در دمای ۷۸ درجه سانتیگراد و غلظت MgCl₂ برابر ۲ میلی مولار بهینه‌سازی شد. در مقایسه نتایج ژنوتایپینگ حاصل از ARMS PCR ۱۰ نمونه با نتایج حاصل از تعیین توالی همان نمونه‌ها هیچ‌گونه مغایرتی مشاهده نشد و نتایج ARMS PCR پرایمرهای طراحی در هر ۱۰ نمونه، دقیقاً با نتایج تعیین توالی همخوانی داشت.

بحث

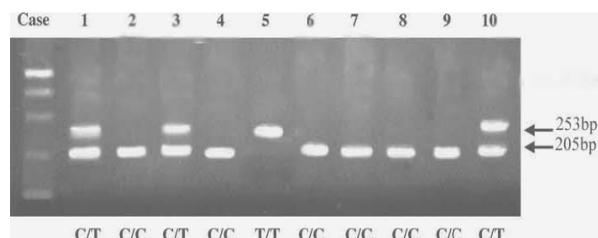
پلی مورفیسم‌های موجود در پروموتور ژن‌ها می‌توانند بر روی تنظیم بیان ژن تأثیر بگذارند و از این طریق پتانسیل ابتلای افراد به بیماری‌ها را تغییر دهند. این تأثیر می‌تواند در نتیجه عملکرد یک پلی مورفیسم تنها یا بر اثر عملکرد چندین پلی مورفیسم به همراه یکدیگر مشاهده شود

نتایج

هر دو سری پرایمر ارائه شده با نرم‌افزار (جدول ۱) قادر به ایجاد محصول PCR برای پروموتور ژن MMP-9 بودند، ولی در محصول هر دو پرایمر، به همراه محصول اصلی، باندهای غیراختصاصی و دارای طول بلندتر از محصول اختصاصی نیز مشاهده می‌شد که باید این مشکل برای تشخیص اختصاصی ژنوتیپ افراد، برطرف می‌شد. با تغییر میزان MgCl₂ و میزان دمای اتصال پرایمرها، تعدادی از این باندها حذف شدند، ولی نهایتاً ما با کم کردن غلظت پرایمر اختصاصی آلل T



شکل ۱- پرایمرهای طراحی شده و نحوه تکثیر آلل‌های C و T توسط آنها



شکل ۲- نمونه PCR ۱۰ فرد که به طور تصادفی انتخاب شده‌اند، در بالای شکل شماره افراد و در پایین آن ژنوتیپ آنها نوشته شده است، آلل C و T به ترتیب دارای طول ۲۰۵ و ۲۵۳ نوکلئوتید.

3. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
4. Przybylowska K, Kluuczna A, Zadrozny M. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinase genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006;9:65-72.
5. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.
6. Ozalp HM, Tanir OT, Yalcin S. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003;24:417-420.
7. Simon C, Simon M, Vucelic G. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Experimental Cell Research* 2001;271:344-355.
8. Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan LN. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-B- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem* 2006;281(22):15099-15109.
9. Ogawa K, Chen H, Kuang C. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochem J* 2004;381(2):413-422.
10. Zhang B, Ye S, Hermann SM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-794.
11. Hemati S, Sadeghi M, Motovali Bashi M, Sahebi A, Malekshahi ZV. Higher plasma MMP-9 level in breast cancer patients with MMP-9 promoter T ALLELE. *Journal of Biological Reseach* 2010;13:113-118. [Persian].
12. Sadeghi M, Motovali Bashi M, Hojati Z. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population. *International Journal of Integrative Biology* 2009;6(1):33-37. [Persian].
13. Miller SA, Dybes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
14. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa V, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-68.
15. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998;43:791-797.
16. Hujanen ES, Vaisanen A, Zheng A, Tryggvason K, Turpeenniemi-Hujanen T. Modulation of M(r) 72,000 and M(r) 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. *Int J Cancer* 1994;58:582-586.
17. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999;189:161-168.
18. Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Sawaya R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 1993;53:2208-2211.
19. Sehgal I, Baley PA, Thompson TC. Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer r-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* 1996;56:3359-3365.
20. Kallakury BV, Karikhehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3113-3119.

(۱۲). از عملکردهای مهم آنزیم MMP-9 رگ‌زایی و علاوهر آن هضم اتصالات خارج سلولی شامل کلاژن‌ها و الاستین می‌باشد (۱۴). از این لحاظ افزایش بیان این ژن با سرطان‌های بسیاری در ارتباط است. ارتباط وجود آلل T در پروموتور این ژن تاکنون با سرطان‌های زیادی از جمله: سرطان معده، ملانوما و لیمفوما، سرطان سینه، سرطان‌های بافت مغز، سرطان پروستات و سرطان کلیه مشخص شده‌است (۱۵-۲۰). باتوجه به ارتباط اساسی وجود آلل T و انواع سرطان‌ها، وجود یک تکنیک سریع و دقیق برای مشخص کردن ژنوتیپ افراد برای منطقه ژنی موردنظر احساس می‌شود؛ از این رو در این مطالعه به بررسی ابداع روشی جدید مبتنی بر ARMS برای تعیین ژنوتیپ افراد پرداختیم. در تمامی مطالعات قبلی این پلی‌مورفیسم توسط هضم آنزیم محدودکننده RFLP با آنزیم‌های SphI یا BbuI بررسی می‌شد (۱۵-۲۰) که این روش با مشکلاتی از جمله وقت‌گیر بودن و امکان خطای آنزیم هنگام برش جایگاه‌های غیراختصاصی مواجه بود و همچنین مقدار زیادی از هزینه‌ها صرف خرید آنزیم محدودگر می‌شد. ما در این مطالعه روشی تک‌مرحله‌ای و بدون استفاده از آنزیم‌های محدودگر برای تعیین ژنوتیپ افراد در پلی‌مورفیسم 1562- پروموتور ژن MMP-9 ابداع کردیم که مشکلات روش RFLP را برطرف می‌کند. در واقع روش ارائه‌شده در این مقاله یک نوع ARMS چهار پرایمری است که با تغییر مواد و دمای PCR واکنش PCR طوری بهینه‌سازی شده است که هر چهار پرایمر در یک واکنش PCR شرکت می‌کنند و باتوجه به نوع آلل موجود در DNA که C یا T باشد، یک جفت از پرایمرها واکنش تکثیر را انجام می‌دهند و از آنجایی که طول محصول هر جفت پرایمر متفاوت است، به راحتی از روی طول محصول می‌توان نوع ژنوتیپ فرد را تشخیص داد. روش ARMS در مطالعات دیگری چون مطالعه بی و اوکایاما، به عنوان روشی مناسب برای تعیین پلی‌مورفیسم‌ها معرفی شد، ولی در گزارش آنان برای هر جفت پرایمر یک PCR جداگانه لازم بود و امکان استفاده از چهار پرایمر در یک واکنش PCR وجود نداشت (۱۶ و ۱۷). طبق دانسته‌های ما این اولین مطالعه‌ای است که در آن روشی غیر از RFLP برای تشخیص پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-9 ارائه می‌شود و طبق نتایج ما، این روش می‌تواند به عنوان جایگزینی بسیار مناسب برای RFLP در تشخیص‌های ژنوتیپ پلی‌مورفیسم 1562- در پروموتور ژن MMP-9 استفاده شود.

References

1. Forget MA, Desrosiers RR, Beliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases; implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:465-480.
2. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;89:1260-1270.

21. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E88.
22. Okayama N, Fujimura K, Nakamura J, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y. Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:13-6.

Archive of SID