مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲)

تهیه آزمایشگاهی وکتور T/A برای تسهیل همسانه‌سازی قطعات DNA حاصل از PCR

ناهید مسعودی*[۱]، نعمت سخندان بشیر[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز

[۲] دانشیار و عضو هیات علمی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۱

چکیده

امروزه مهندسی ژنتیک جزء اجتناب ناپذیر پژوهش‌های زیست شناسی نوین میباشد و همسانه‌سازی به عنوان یکی از اصلی‌ترین بخش‌های این علم، کاربرد گسترده‌ای دارد. پلاسمیدها یکی از پرکاربردترین حامل‌ها میباشند که امکان تکثیر ژن مورد نظر را به صورت نامحدود در میزبان عمدتا" باکتریایی فراهم میکنند. وکتورهای T/A نوعی از حامل‌های پلاسمیدی میباشند که امکان همسانه‌سازی قطعه دی‌ان‌ای تکثیر شده با آنزیم *Taq* DNA polymerase (در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) را تسهیل می کنند. با توجه به محدودیت امکانات، خرید کیت همسانه‌سازی حاوی این پلاسمید ممکن است به سختی میسر باشد. به همین جهت تهیه این وکتور با کارایی خوب در آزمایشگاه حائز اهمیت است. در این پژوهش، بعد از تهیه سلول های مستعد (رقیب) از باکتری *Escherchia coli*، پلاسمید حلقوی و فاقد قطعه خارجی pTZ57R به این سلول‌ها ترانسفورم گردید. پس از استخراج پلاسمید به روش لیزآلکالینی، با آنزیم *Eco*RV پلاسمید برش داده شده و خطی گردید. سپس آنزیم برشی غیرفعال گردید و نوکلئوتید تیمین به انتهای آزاد این پلاسمید خطی اضافه شد. سپس کارایی حامل تهیه شده طی واکنش اتصال دی‌ان‌ای به پلاسمید و متعاقب آن، ترانسفورماسیون باکتری تأیید گردید. بعلاوه، بخشی از ژنوم پوتی‌ویروس که با جفت آغازگر یونیورسال مورد تکثیر قرار گرفته بود در پلاسمید ساخته شده مورد همسانه سازی وترادف یابی قرار گرفت که در مقایسه با توالی‌های هم‌قطار موجود در پایگاه ژن بانک بعنوان ویروس موزائیک سویا تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: *T/A وکتور، ویروس موزائیک سویا، تهیه حامل همسانه سازی، pTZ57R/T*

* نویسنده مسئول: ناهید مسعودی شماره تماس: ۰۹۱۸۳۴۸۸۹۱۸ Email: nm_masoudi@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه مهندسی ژنتیک و تولید دی‌ان‌ای نوترکیب[1] از بخشهای پرکاربرد و مهم در پژوهش‌های زیستی به حساب می‌آیند که در بخشهای مختلفی همچون پزشکی، صنعت، دامپزشکی و کشاورزی کاربردهای وسیعی دارد. در کشاورزی از فناوری دی‌ان‌ای نوترکیب در مقاوم‌سازی گیاهان به آفات و بیماری‌ها، تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب ویروس‌های گیاهی، اصلاح نباتات و تولید گیاهانی با کارایی بالاتر استفاده میشود. همسانه‌سازی[2] ژن مهمترین مرحله‌ی مهندسی ژنتیک است و هدف از همسانه‌سازی به دست آوردن مقادیر زیاد از ژنهای خاص به صورت خالص میباشد. برای این کار و بررسی خصوصیات یک ژن بهتر است که ژن مورد نظر را به درون یک حامل[3] از قبیل پلاسمید یا باکتریوفاژ منتقل کرد و سپس آنها را به داخل میزبان مناسب وارد نمود. مهمترین حامل‌ها در مهندسی ژنتیک پلاسمیدها، ویروس‌ها و یا قطعات حاصل از پلاسمیدها و ویروس‌ها میباشند (Emtiazi, 2010). پلاسمیدها، قطعات دی‌ان‌ای حلقوی میباشند که در داخل سیتوپلاسم باکتریها و برخی از مخمرها و حتی یوکاریوت‌ها-ی عالی وجود دارند و به صورت مستقل از کروموزوم، تکثیر میگردند. اندازه‌ی کوچک، حلقوی بودن، همانندسازی مستقل و وجود شاخص‌های مفیدی همچون وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک روی پلاسمیدها، آنها را به یکی از موفق‌ترین حامل‌ها تبدیل کرده است (Emtiazi, 2010).

حاملهای T/A یکی از پرکاربردترین حامل‌ها در همسانه سازی قطعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[4] (PCR) میباشند. این وکتورها خطی بوده و در دو انتهای آزاد خود در ناحیه ′۵ حاوی نوکلئوتید تیمین به صورت آزاد (آویزان) میباشند. از طرف دیگر، قطعات تکثیر شده به وسیله آنزیم Taq DNA polymerase نیز در انتهای ′۳ خود دارای نوکلئوتید آزاد آدنین میباشند که امکان اتصال آسان قطعات تکثیر شده بوسیله‌ی این آنزیم را در T/A وکتورها فراهم می‌سازد. پلاسمید pTZ57R/T به عنوان یک T/A وکتور از نوع تجاری میباشد.

ویروس ها از عوامل مهم آلوده کننده‌ی گیاهان می باشند که از لحاظ ایجاد خسارت در مقام دوم پس از قارچ ها قرار دارند (Hall *et al.*, 1998). پوتی‌ویروس[5] به عنوان مهم‌ترین جنس از خانواده پوتی ویریده[6]، بزرگترین جنس ویروسی است که موجب کاهش شدید در عملکرد کشت محصولات گیاهی میشود. بر اساس آخرین گزارش کمیته بین المللی رده‌بندی ویروس (ICTV) در سال ۲۰۱۱، جنس پوتی‌ویروس شامل ۱٤٦ گونه میباشد.

در این تحقیق برآن شدیم که با توجه به کمبود امکانات و وجود مشکلات اقتصادی در

[1] Recombinant DNA
[2] Cloning
[3] Vector
[4] Polymerase Chain Reaction
[5] Potyvirus
[6] Potyviridae

Archive of SID

www.SID.ir

خرید وکتور همسانه‌سازی، این وکتور را در آزمایشگاه با امکانات موجود در حداقل زمان و با روشی ساده تهیه کرده و همچنین بخشی از قطعه ژنومی پوتی‌ویروس‌ها که توسط PCR تکثیر شده بود، بطور نمونه در این وکتور همسانه‌سازی و بعد از ترادف‌یابی گونه‌ی ویروسی تعیین گردید.

مواد و روش ها

تهیه سلول‌های مستعد[7] جهت ترانسفورماسیون

ابتدا جهت تراریخت کردن و تکثیر پلاسمید حلقوی pTZ57R سلول‌های مستعد از باکتری فاقد پلاسمید *E. coli* سویه‌ی DH5α تهیه شد. برای این کار باکتری مورد نظر، در زیر هود لامینار در محیط مایع LB (Luria Bertani) فاقد آمپی سیلین به صورت شبانه کشت داده شد (۱۲-۱۶ ساعت). سپس، به نسبت ۱:۵۰ در محیط مایع LB رقیق شده و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با دور ۱۷۰ rpm کشت داده شد تا به چگالی نوری تقریبی ۰/٦ برسد.

سپس باکتری کشت داده شده به وسیله‌ی سانتریفوژ با ۲۸۰۰ دوردر دقیقه و زمان ٤-۳ دقیقه رسوب داده شد. فاز مایع رویی خالی شده و رسوب ایجاد شده به آرامی در ۱ میلی‌لیتر 1x TSS، سوسپانسیون گردید. این مرحله به علت حساس بودن باکتری‌ها روی یخ صورت پذیرفت (Chang *et al.*, 1989). از سوسپانسیون ایجاد شده ۱۰۰ µl در لوله‌های ۱/۵ ml ریخته شده و جهت نگهداری طولانی مدت از فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد استفاده شد.

انتقال پلاسمید pTZ57R به سلول‌های مستعد

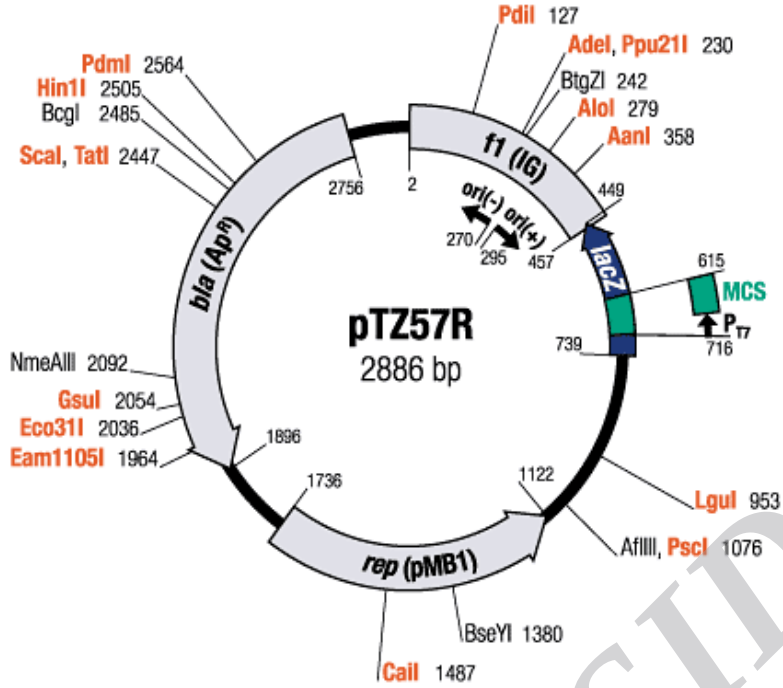
جهت انتقال پلاسمید pTZ57R به سلول-های مستعد تولید شده، به میزان ۱ µl از پلاسمید با غلظت ۱۰۰ ng/µl به ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد اضافه شد. سپس به وسیله شوک حرارتی انتقال پلاسمید به درون باکتری انجام شد (Chang *et al.*, 1989). بدین منظور ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای٤ درجه سانتیگراد (روی یخ) و سپس ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) و متعاقبا" ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۱ ml محیط LB مایع و فاقد آمپی سیلین به لوله اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور ۱۷۰rpm قرار داده شد.

سپس ۱۰۰-۱۵۰ µl از کشت باکتری ترانسفرم شده روی محیط LB جامد حاوی آمپی سیلین (۱۰۰µg/µl) به سطح محیط کشت پخش شده و ظرف پتری به مدت شبانه (۱٤-۱٦ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد.

[7] Compotent cells

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- شکل شماتیک پلاسمید حلقوی pTZ57R.

Figure 1- Schematic presentation of the circular plasmid pTZ57R.

استخراج پلاسمید pTZ57R

تعداد ٦ کلونی از کلونی‌های رشد کرده به کمک لوپ در فالکون های استریل حاوی محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شده و به مدت شبانه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و با لرزش rpm ۱۷۰ قرار داده شد. از کشت‌های شبانه حاوی باکتری ترانسفرم شده، استخراج پلاسمید به روش لیزقلیایی انجام گرفت (Ish-Horowic & Bruk; Birboin & Doli, 1979). برای به دست آوردن غلظت مناسبی از پلاسمید به جای ۱/۵ ml، از ۳ ml کشت حاوی باکتری پلاسمید برای استخراج پلاسمید استفاده شد.

بررسی اندازه و غلظت پلاسمید استخراج شده pTZ57R

جهت بررسی نتیجه‌ی استخراج پلاسمید و اطمینان از صحت پلاسمید مورد نظر، الکتروفرز در ژل آگارز ۱/۲ ٪ به مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۹۰-۹۵ ولت انجام پذیرفت. جهت مشخص شدن اندازه‌ی باندها نیز از ژنوم باکتریوفاژ لامبدا برش داده شده با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII (فرمنتاس) استفاده شد. برای رنگ آمیزی ژل از ۲ µl اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) استفاده گردید. جهت بررسی بهتر و به دست آوردن اندازه واقعی، پلاسمید باید خطی میگردید. بنابراین ٤ µl از پلاسمید استخراج شده توسط ۱ µl از آنزیم برشی *Hin*dIII (فرمنتاس) برش داده شد. بعد از برش پلاسمید و خطی شدن آن،

Archive of SID

www.SID.ir

مجددا" الکتروفرز در ژل آگارز ۱/۲ ٪ صورت پذیرفت.

برش پلاسمید pTZ57R با آنزیم *Eco*RV

بعد از الکتروفرز و اطمینان از وجود پلاسمید pTZ57R ، پلاسمید استخراج شده به کمک آنزیم *Eco*RV برش داده شد. این آنزیم در محل برش به صورت صاف بریده و پلاسمید خطی ایجاد میکند. در این واکنش ۳ µl از پلاسمید استخراج شده بوسیله‌ی ۱ µl از آنزیم برشی مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برش در حجم نهایی ۲۰ µl صورت پذیرفت. بعد از برش، جهت اطمینان از برش و خطی شدن پلاسمید، الکتروفرز پلاسمید قبل و بعد از برش صورت گرفت. بعد از اطمینان از برش، آنزیم برشی باید به وسیله حرارت غیرفعال شد. برای این کار لوله حاوی پلاسمید برش یافته به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ٦٨ قرار داده شد و سپس با استفاده از اتانول ۱۰۰ ٪ دی‌ان‌ای موجود رسوب داده شد، فاز رویی خالی و رسوب در ۱۵ µl آب دیونیزه سوسپانسیون شد. جهت اطلاع از غلظت پلاسمید بعد از غیرفعال سازی آنزیم برشی و خالص سازی آن، مجددا" ۲ µl از محلول موجود روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

اضافه کردن نوکلئوتید تیمین به انتهای آزاد پلاسمید pTZ57R

برای اضافه کردن تیمین به صورت دنباله‌ی آویزان به انتهای آزاد پلاسمید، باید پلاسمید برش یافته و خالص سازی شده با تیمین تیمار میشد. از این‌رو ۱۵ µl از پلاسمید برش یافته و خالص سازی شده به ۲ µl بافر PCR اضافه شد و سپس ۰/۵ µl از $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵mM و ۲ µl ddT با غلظت ۲۰ mM نیز به واکنش اضافه شده و در نهایت ۲/۵ واحد از آنزیم *Taq* DNA polymerase (۰/۵ µl) اضافه گردید و واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد در ترموسایکلر (کوربت، استرالیا) قرار داده شد. بعد از اتمام این مراحل تیوب در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت جلوگیری از کاهش غلظت پلاسمید، از رسوب مجدد و خالص سازی، بعد از تیمار با تیمین خودداری شد.

اتصال قطعه خارجی به حامل تهیه شده

جهت اطمینان از کارکرد T/A وکتور تهیه شده، از یک محصول PCR برای واکنش اتصال[8] استفاده شد (Ghasemzadeh, 2011). این محصول بخشی از قطعه ژنومی یک پوتی ویروس به طول ۳۵۰ جفت باز بود که با استفاده از آغازگرهای یونیورسال[9] منطبق بر ناحیه‌ی ژنومی NIb پوتی‌ویروس‌ها، آغازگر مستقیم NIb2F 5´(GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA)3´ که مطابق با توالی نوکلئوتیدی ۷٦۱۹-۷٦٤۱، و آغازگر معکوس 3´(TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC)5´ NIb3R مطابق با توالی نوکلئوتیدی ۷۹٤۵-

[8] Ligate
[9] Universal primer

Archive of SID

www.SID.ir

۷۹٦۸ ژنوم ویروس وای سیب زمینی طراحی شده بودند (Zheng *et al*., 2008)، مورد تکثیر قرار گرفته بود. علاوه بر این، از یک قطعه کنترل ۱۰۰۰ جفت بازی بعنوان کنترل واکنش اتصال استفاده شد. واکنش اتصال در نسبت های ۱:۱ و ۱:۳ صورت پذیرفت. همچنین اتصال بین یک وکتور خریداری شده بنام pGEM-T Easy vector (Promega، آمریکا) و همان محصول PCR نیز جهت شاهد واکنش اتصال صورت پذیرفت. در واکنش اتصال حامل و قطعه خارجی از ۱ واحد آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاس) و ۱ µl از بافر X ۱۰ آنزیم مذکور و حجم‌های ذکرشده از حامل و قطعه خارجی (۱ و ۳ میکرولیتر) و حجم نهایی ۱۰ µl استفاده شد. سپس ۱/۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد

بعد از پایان واکنش اتصال، ۳ µl از هر واکنش اتصال انجام شده با ۱۰۰ µl سلول مستعد مخلوط شد. جهت تراریخت کردن سلول‌های باکتری از روش مذکور Chang *et al*. (1989) استفاده شد. نهایتا" لوله‌ها در rpm ۸۰۰۰ به مدت ۲-۳ دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌های باکتری برداشت شوند. سپس ٦۰۰ µl از فاز مایع رویی را خالی کرده و رسوب ایجاد شده را در قسمت مایع باقی مانده به صورت سوسپانسیون درآورده، ۱۵۰-۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری را در پتری حاوی محیط جامد LB حاوی آمپی سیلین وتیمار شده با µl ۲۰ محلول X-gal 50 mg/ml و ۱۰۰ µl محلول ۰/۱ مولار IPTG به کمک اسپیریدر پخش کرده و به مدت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. از ترانسفورم پلاسمید حلقوی pTZ57R نیز به عنوان شاهد ترانسفورم استفاده شد.

استخراج پلاسمیدهای نوترکیب و برش آنزیمی جهت آزاد شدن قطعه خارجی

جهت بررسی نتیجه ترانسفورم، بر اساس تعداد کلونی‌های سفید رشد کرده و نسبت آنها به تعداد کلونی‌های آبی ۲ پتری دیش جهت بررسی انتخاب شدند. از هر یک از این ۲ پتری دیش حاوی باکتری ترانسفورم شده، ٦ کلونی سفید رنگ به صورت شبانه در محیط مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد و پلاسمید به روش لیز الکالینی استخراج شد و پلاسمید استخراج شده مورد برش قرار گرفت. جهت برش و آزاد شدن قطعه خارجی از دو آنزیم برشی *Eco*RI و *Hind*III و بافر X ۲ Y^+/TANGO (yellow) (فرمنتاس) استفاده شد. در واکنش برش از ۳ µl پلاسمید استخراج شده، ۱ µl از هر دو آنزیم مذکور و ٤ µl بافر Tango استفاده شد. برش در حجم نهایی ۲۰ µl انجام شده و برای به حجم رساندن نیز از آب دیونیزه استفاده شد. به دنبال آن ۲-۲/۳۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفرز در ژل آگارز ۱/۲ ٪ استفاده شد.

جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه همسانه‌سازی شده، پلاسمید استخراج شده از باکتری توسط شرکت بیونیر کره مورد تخلیص و به روش اتومات مورد توالی‌یابی قرار گرفت. جهت بررسی توالی مورد نظر نیز از نرم افزار GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) استفاده گردید و توالی در پایگاه اطلاعاتی GeneBank مورد BLAST و شناسایی قرار گرفت و سپس در این پایگاه با شماره دسترسی JX683532 ثبت گردید.

نتایج و بحث

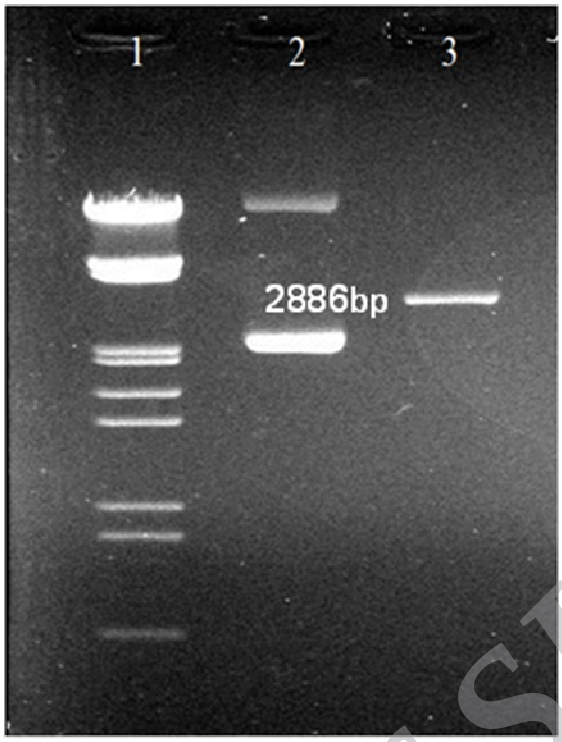
بعد از ترانسفورماسیون پلاسمید حلقوی pTZ57R به سلول‌های مستعد *E. coli* و کشت سلول‌های ترانسفورم شده، تعداد زیادی کلونی سفید رنگ در پتری دیش رشد کرد که حاکی از انتقال خوب پلاسمید به باکتری *E. coli* بود. بعد از استخراج پلاسمید و الکتروفرز پلاسمید استخراج شده، اندازه باندها به طور تقریبی برابر با طول پلاسمید pTZ57R (۲۸۸٦ جفت باز) بود. همچنین، جهت تخمین دقیق‌تر اندازه پلاسمید، بعد از برش با آنزیم *Hin*dIII و خطی شدن آن مجددا" الکتروفورز انجام شد و نتایج این الکتروفرز نیز اندازه پلاسمید pTZ57R را تایید کرد (شکل ۲).

بعد از حصول اطمینان از وجود پلاسمید pTZ57R در یکی از کلونی‌های حاصل و بعد از برش پلاسمید مستخرج از رشد این کلونی، با آنزیم *Eco*RV و ایجاد پلاسمید خطی با انتهای صاف و انجام الکتروفورز، نتایج حاصل خطی شدن پلاسمید را تایید کردند.

همچنین نتیجه‌ی الکتروفرز دیگری که به جهت تخمین غلظت پلاسمید برش یافته‌ی موجود بعد از غیرفعال سازی آنزیم برشی صورت گرفت نیز حاکی از غلظت خوب این پلاسمید جهت ادامه‌ی مراحل بعدی بود (شکل۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- پلاسمیدهای استخراج شده از سلول‌های *E. coli* ترانسفورم شده با pTZ57R و الکتروفورز قطعه حاصل از برش آن با *Hin*dIII در آگارز ۱/۲ ٪. ستون ۱: ژنوم لامبدا برش یافته با *Eco*RI و *Hin*dIII. ستون ۲: پلاسمید pTZ57R استخراج شده. ستون ۳: پلاسمید pTZ57R استخراج شده بعد از برش با آنزیم *Hin*dIII

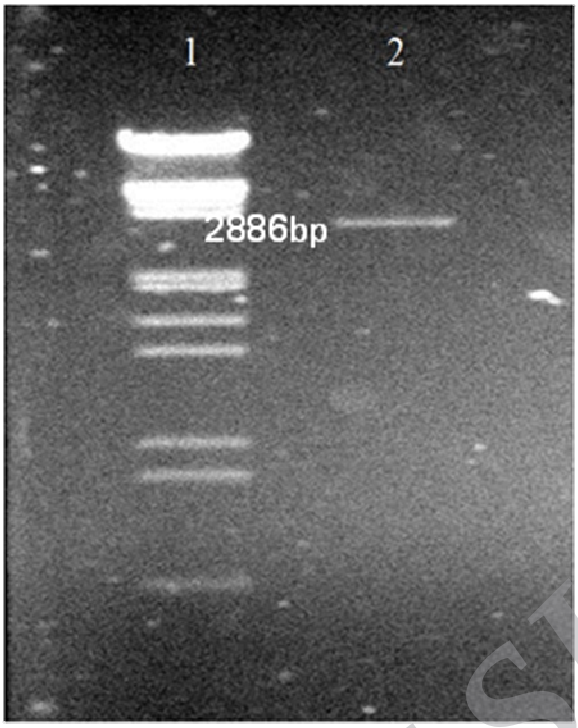
Figure 2- Electrophoresis on 1.2% agarose of *Hin*dIII digest of plasmid extracted from *E. coli* cells transformed with pTZ57R. Lane 1: Lambda DNA cut with *Eco*RI and *Hin*dIII, lane 2: pTZ57R extracted from bacterial cells, lane 3: *Hind*III digest of pTZ57R.

بعد از تیمار پلاسمید خطی شده با نوکلئوتید تیمین و انجام واکنش اتصال بین وکتور و قطعه خارجی در دو نسبت ۱:۱ و ۱:۳ و ترانسفورماسیون، کلونی‌های آبی و سفید در همه پتری‌ها به تعداد ذکر شده در جدول ۱ به دست آمد.

حصول کلونی‌های سفید و آبی رنگ از تمامی تیمارهای ترانسفورماسیون حاکی از انجام موفقیت آمیز ترانسفورماسیون بود. کلونی‌های آبی رنگ کلونی‌های فاقد قطعه بودند اما کلونی‌های سفید رنگ احتمالا" قطعه را داشتند. طبق جدول ۱ تعداد کلونی‌های رشد کرده و همچنین نسبت کلونی‌های سفید به آبی زمانی‌که واکنش اتصال با نسبت ۱:۳ انجام شده بیشتر بود و یعنی هنگامی - که در واکنش اتصال به ازاء ۱ میکرولیتر از قطعه خارجی از ۳ میکرولیتر حامل استفاده شده اتصال و به تبع آن ترانسفورماسیون بهتر صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- الکتروفورز پلاسمید pTZ57R برش یافته با آنزیم *Eco*RV پس از خالص سازی، در آگارز ۱/۲ ٪ (ستون ۲) در کنار مارکر ژنوم لامبدا برش یافته با *Eco*RI و *Hin*dIII (ستون۱).

Figure 3- Electophoresis on 1.2% agarose of *Eco*RV digest of pTZ57R after extraction (Lane 2) alongside with Lambda DNA *Eco*RI and *Hin*dIII run in lane 1.

بعد از استخراج پلاسمید از کشت ٦ کلونی سفید حاصل از ترانسفورماسیون با واکنش حاصل از اتصال وکتور تهیه شده با محصول پی سی آر (۱:۳) و برش پلاسمید با آنزیم‌های برشی جهت آزاد شدن قطعه خارجی و متعاقبا" انجام الکتروفورز نتایج زیر حاصل شد.

شکل ٤ نتیجه‌ی حاصل از برش حامل نوترکیب الحاق شده با قطعه‌ای به طول ۳۵۰ جفت باز را نشان میدهد که پلاسمید استخراج شده از سه کلونی حاصل از پلاسمید نوترکیب، حاوی قطعه ۳۵۰ جفت بازی می‌باشد. بدین ترتیب ۳ کلونی از ٦ کلونی مورد بررسی حاوی قطعه مورد نظر بوده‌اند که حاکی از عملکرد خوب حامل تهیه شده در عمل اتصال میباشد. همچنین جهت اطمینان و تایید این مطلب ٦ کلونی سفید رنگ حاصل از ترانسفورماسیون با واکنش اتصال حامل تهیه شده با قطعه bp ۱۰۰۰ (شاهد) نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این الکتروفرز نیز از کارایی خوب حامل تهیه شده حکایت داشت و ٥ کلونی از ٦ کلونی مورد بررسی قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر کرده بودند (شکل٤).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تعداد کلونی‌های آبی و سفید رشد کرده بعد از همسانه سازی قطعات دی‌ان‌ای خارجی در وکتور تهیه شده.

Table 1- Number of blue and white colonies resulting from cloning a foreign DNA fragment in T/A vector.

واکنش اتصال Ligation reaction	کلونی‌های ترانسفورم شده Transformed colonies	
	تعداد کلونی آبی No. blue colonies	تعداد کلونی سفید No. white colonies
اتصال محصول PCR و حامل تهیه شده (1:1) Ligation of PCR product and vector (1:1)	11	7
اتصال محصول PCR و حامل تهیه شده (3:1) Ligation of PCR product and vector (3:1)	12	10
اتصال قطعه کنترل و حامل تهیه شده (1:1) Ligation of control fragment and vector (1:1)	12	7
اتصال قطعه کنترل و حامل تهیه شده (3:1) Ligation of control fragment and vector (3:1)	14	13
اتصال محصول PCR و pGEM-T Easy vector (1:1) Ligation of PCR product and pGEM-T Easy vector (1:1)	21	15
پلاسمید حلقوی pTZ57R (شاهد ترانسفورماسیون) (فاقد X-gal و IPTG) Circle plasmid pTZ57R (transformation control)	0	100

بعد از اطمینان از وجود قطعه ۳۵۰ جفت بازی در پلاسمید استخراج شده از کلونی شماره ۱ و تعیین توالی قطعه خارجی درج شده در پلاسمید و بررسی آن، توالی مورد نظر به ویروس موزائیک سویا (*Soybean mosaic virus*) نسبت داده شد.

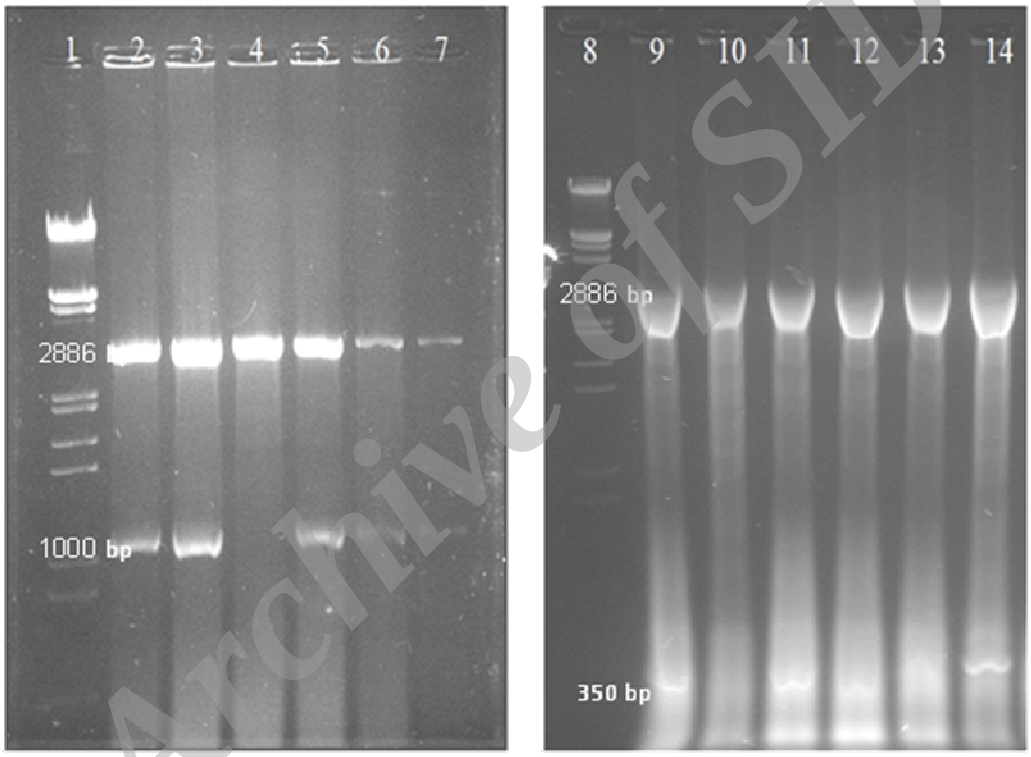
با توجه به کاربرد فراوان PCR و به دنبال آن همسانه‌سازی قطعات تکثیر شده در PCR در تحقیقات نوین در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله پزشکی، داروسازی و کشاورزی تهیه وکتور همسانه سازی به روشی ساده و کارآمد بسیار حائز اهمیت میباشد. تهیه آزمایشگاهی این وکتورها در سال ۱۹۹۰ برای اولین بار طی یک مقاله پیشنهاد و به چاپ رسید (Holton & Graham, 1990). همچنین تولید T/A وکتور توسط *Marchuk et al.* (1991) نیز با اندکی تفاوت صورت پذیرفت. روش انجام شده در این تحقیق، ضمن عدم نیاز به مواد و وسایل ویژه،

Archive of SID

www.SID.ir

بسیار سریع و کارآمد بوده و امکان تهیه وکتور همسانه‌سازی در شرایط معمولی یک آزمایشگاه را فراهم میسازد. در روش‌های قبلی چندین مرحله رسوب ماده ژنتیکی انجام میشد که در نهایت باعث کاهش غلظت پلاسمید تهیه شده و به تبع آن کاهش کارایی واکنش اتصال و ترانسفورماسیون میشد. در این تحقیق حذف این چند مرحله ضمن صرفه جویی در زمان و هزینه، موجب حفظ بهتر غلظت نهایی وکتور شده است.

همچنین در این تحقیق بخشی از ژنوم یکی گونه-های ویروسی خسارت‌زای محصولات مزارع سبزی‌کاری استان آذربایجان شرقی، در این حامل مورد همسانه‌سازی قرار گرفت و بعد از تعیین توالی قطعه مورد نظر، ویروس موزائیک سویا (SMV) بدین وسیله ردیابی شد که این نیز دلیلی بر عملکرد صحیح و قابل اعتماد بودن حامل تهیه شده می‌باشد.



شکل ٤- الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از ترانسفورماسیون *E. coli* با محصول واکنش اتصال‌های مختلف بعد از برش آنها با *Hin*dIII و *Eco*RI در آگارز ۱/۲ ٪. ستون ۱: ژنوم لامبدا برش یافته با *Eco*RI و *Hin*dIII. ستون ۲-۷: برش پلاسمیدهای به‌دست آمده از اتصال قطعه bp ۱۰۰۰ کنترل و پلاسمید تهیه شده. ستون ۸: ژنوم لامبدا برش یافته با *Eco*RI و *Hin*dIII. ستون ۹-۱٤: برش پلاسمیدهای به دست آمده از اتصال قطعه ژنومی پوتی‌ویروس (bp ۳۵۰) در پلاسمید تهیه شده.

Figure 4- *Hin*dIII and *Eco*RI digests of recombinant plasmids resulting from transformation of *E. coli* with ligation mixes. Lane 1: Lambda DNA cut with *Hin*dIII and *Eco*RI, Lanes 2-7: digests of plasmids resulted from ligation of an 1000 bp control fragment into T/A vector, Lane 8: Lambda DNA *Hin*dIII and *Eco*RI, Lanes 9-14: digests of plasmids resulted from ligation a potyvirus fragment (350 bp) into the T/A vector.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Chang B, Miller W, Atkins J, Firth A (1989). An overlapping essential gene in the Potyviridae. Proceedings of the national academy of sciences of the USA 105: 5897-5902.

Emtiazi G (2010). Principles of molecular biology and genetic Engineering. Mani publishers. Iran.

Ghasemzade A (2011). Detection of Potyvirus members in the fields of East- Azarbaijan Province. MSc thesis. University of Tabriz, Iran.

Hall JS, Adams B, Pearson TJ, French R, Lane LC, Jensen SG (1998). Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new potyvirus: *sugarcane streak mosaic virus* and a reevaluation of the classification of the potyviridae. Molecular phylogenetics and evolution 10: 323-332.

Holton TA, Graham MW (1990). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Research 19 (5): 1156.

Ish-Horowic ZD, Burke JF (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Research 9: 2989-2998.

Marchuk D, Drumm M, Saulino A, S.Colins F (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids Research 19: 1154.

Virus Taxonomy (2011). Current taxonomy. Retrieved January 13, 2012, from http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011.

Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC, Gibbs MJ (2008). Acumulating variation at conserved sites in potyvirus genome is driven by species discovery and effects degenerate primer design. PLoS ONE 3, e 1586.

Archive of SID

www.SID.ir

A home-made T/A vector for simplification of cloning DNA fragments obtained from PCR

Masoudi N.[1*] , Sokhandan– Bashir N.[2]

[1] MSc student, Department of Plant protection, Faculty of agriculture of Tabriz.
[2] Assistant Professor, Department of Plant protection, Faculty of agriculture of Tabriz.

Abstract

Today, genetic engineering is an indispensable component of modern biological research and DNA cloning, as one of the most important applications of this technology, has a wide-range application. Plasmids are the most commonly used vectors that provide replication of a desired gene usually in a bacterial host. T/A cloning vectors are one type of plasmids which facilitate cloning of a DNA fragment provided that the DNA is amplified by *Taq* DNA polymerase through polymerase chain reaction (PCR). In cases where the resources are limited, purchasing commercial T/A cloning kits may be hardly possible. So, availability of a home-made T/A vector with a good performance in the laboratory would be important. In this study, after preparation of competent *Echerchia coli* cells, the circular plasmid pTZ57R (without insert) was transformed into the cells. After plasmid extraction by alkaline lysis method, the plasmid was cut with *Eco*RV to make it linear. Then, the enzyme was inactivated and thymine nucleotide was added to the free 5‘ ends of the linear plasmid. The efficiency of the vector was demonstrated during ligation reactions and subsequent transformations. In addition, a segment of potyvirus genome that was amplified by a pair of universal primers was inserted into the T/A vector and subjected to sequencing. Comparison of the sequencing data with that of the counterpart regions available in GenBank has ended in identification of the virus as *Soybean mosaic virus*.

Key words: *T/A vector, soybean mosaic virus, Preparation of vector, pTZ75R/T.*

Archive of SID

* Corresponding Author: Masoudi N. Tel: 09183488918 Email: nm_masoudi@yahoo.com

www.SID.ir