بهبود روش تکثیر ژنوم کامل در سطح تک سلول

حمید گله‌داری، علی‌محمد فروغمند و بهناز اندشتی

گروه زیست‌شناسی- دانشگاه شهید چمران اهواز

پست الکترونیکی: galehdari187@yahoo.com

چکیده

بررسی ژنتیکی مقادیر محدود DNA ژنومی نقش مهّمی را در تحقیقات بیولوژی مولکولی ایفا می‌کند. لازمهٔ آنالیزهای مولکولی بر روی یک یا چند سلول روشی مطمئن و تکرارپذیر در آماده‌سازی و تکثیر DNA است که جهت بررسی‌های بعدی PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) به کار می‌رود. در این تحقیق روش PCR با واسطهٔ پرایمرهای دژنِره شده(DOP–PCR) به منظور تولید الگویی برای روش‌های LOH (حذف هتروزیگوتی) و تشخیص جهش‌ها به کار گرفته شد. در روش DOP–PCR از پرایمرهای دژنره برای تکثیر الگوهای یکسان غیر تخصصی از DNA استفاده می‌شود. این روش در تعیین ژنوتیپ به کمک ریزماهواره‌ها به کار رفته است. در تأیید نتایج، ژنوم تکثیر یافته توسط روش DOP–PCR با DNA شاهد مقایسه گردید. نتایج آزمایش بر اساس بازدهی تکثیر، تکرارپذیری، دقّت و میزان پیش روندگی آنزیم بررسی شدند. کیفیت محصولات DOP به عوامل متعددی از جمله انتخاب DNA پلیمراز مناسب و تیمار سلولی بستگی دارد. جمع‌بندی: DOP–PCR برای تکثیر DNA ژنوم یک سلول و به منظور تعیین ژنوتیپ و غربال‌گری جهش‌ها با موفقیّت انجام شد.

واژه های کلیدی : *تکثیر ژنوم کامل، PEP-PCR، DOP-PCR.*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه تعیین ژنوتیپ به کمک ریزماهواره‌ها[1] در پزشکی قانونی و سرطان‌شناسی مولکولی کاربرد وسیعی پیدا کرده است. از طرفی مقدار DNA ژنومی جهت انجام آزمایشات مورد نیاز غالباً محدود به یک یا چند سلول می‌باشد [۱ و۲]. بدین منظور تکنیک‌هایی جهت افزایش مقادیر کم DNA طراحی شده‌اند. به وسیلهٔ روش WGA[2] الگوی اولیه به طور تصادفی تکثیر شده و محصول به دست آمده می‌تواند در PCR[3]های تخصصی بعدی به کار رود [۳ و ۴]. تکثیر ژنوم کامل می‌تواند به وسیلهٔ پرایمرهای دژنره یا غیر دژنره انجام شود. در روش PEP[4] تکثیر با استفاده از پرایمرهای ۱۵ نوکلئوتیدی دژنره صورت می‌گیرد. این روش به وسیلهٔ زانگ و همکارانش[5][۴] برای اولین بار ارائه و سپس توسط دیتمایرو و همکارانش[6] [۴] برای آنالیزهای تعیین ژنوتیپ اصلاح گردید.

در روش دیگری اولیگونوکلئوتید دژنره‌ای به طول ۲۲ باز (DOP–PCR)[7] و دارای توالی‌های معین در دو انتهای ´۵ و ´۳ استفاده می‌شود. بین این دو ناحیه یک توالی هگزامر تصادفی وجود دارد. این توالی‌ها با تکثیر نیمهٔ تخصصی کل ژنوم، واکنش تخصصی PCR را تشدید می‌کنند[۵]. DOP–PCR غالباً به عنوان اولین مرحله در روش‌های هیبریدیزاسیون در بافت[8] و هیبریداسیون ژنوم تطبیقی[9] استفاده می‌گردد [۶، ۷ و ۸]. با این حال عدم رضایت از بازدهی در شرایط محدودیت کمی DNA از نکات ضعف این سیستم‌ها به شمار می‌رود. به عنوان مثال DOP–PCR با نمونه‌ای حدود یک نانوگرم DNA که معادل حدود صد سلول دیپلوئید انسانی است، از بازدهی خوبی برخوردار نیست [۴].

در این تحقیق با تغییر و اصلاح پارامترهای متعددی از دستورالعمل‌های اصلی که قبلاً توسط تلینوس و همکارانش[10] [۵] پیشنهاد شده بود روش DOP–PCR بر روی تک سلول بهبود یافت و در این راستا از DNA پلیمراز مقاوم به گرما با فعالیّت بازخوانی و تصحیح خطا[11] استفاده شد تا میزان خطای تکثیر به حداقل ممکن کاهش یابد [۲]. علاوه بر آن مراحل استخراج و تکثیر ژنوم اصلاح گردید. پروتکل ارائه شده یک روش قابل اعتماد جهت انجام آنالیزهای ژنی است.

مواد و روش‌ها

تکثیر ژنوم توسط DOP – PCR

جهت انجام DOP–PCR از رده سلولی هلا[12] استفاده گردید. ابتدا سلول‌ها در محیط DMEM و در مجاورت ۵٪ گاز CO2 در یک ظرف کشت به قطر ۱۰ سانتی‌متر رشد داده شدند. پس از یک دورهٔ رشد ۲۴ ساعته، سلول‌ها به ظرفی با گنجایش ۱۵ میلی‌لیتر منتقل و به مدّت یک دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محیط کشت را

1- Microsatellite mediated genotyping
2- Whole genome amplification
3- Polymerase Chain Reaction
4- Primer Extention Preamplification
5- Zang et al.
6- Dietmaier et al.
7- Degenerate Oligonucleotide Primed- PCR
8- In situ hybridization
9- Comparative genome hybridization
10- Telenius et al
11- Proofreading
12- HeLa cell line

Archive of SID

www.SID.ir

دور ریخته و سلول‌ها در بافر[1] PBS حل شدند. تعداد سلول‌ها در دستگاه شمارشگر سلول تعیین و سپس محلولی با رقت یک سلول در ۱۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K، ۱۰ میلی‌مولار تریس و یک درصد Tween 20 تهیّه گردید. محلول ابتدا به مدّت ۱۵ ساعت در دمای ۴۸ درجه و سپس به مدّت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. بدینوسیله آماده‌سازی ژنوم برای تکثیر بدون استفاده از روش‌های رایج استخراج DNA انجام گردید. محلول فوق با 20 mM Tris-Hcl pH: 8.8، 10 mM Kcl، $10\,mM(NH_4)_2So_4$، 2 mM $MgSo_4$، 1 % Triton X –100، 1 mg/ml BSA، 200 mM dNTP، ۳ میکرومولار پرایمر با توالی ۳- CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG -۵ و ۳/۷۵ واحد آنزیم pfu turbo DNA polymerase در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر ترکیب و تکثیر ژنوم در دستگاه ترموسایکلر مدل MJ Research Biozgme صورت گرفت. پروفیل حرارتی واکنش در جدول ۱ آورده شده است. کنترل منفی با شرایط مشابه با DOP–PCR و بدون سلول انجام شد.

جدول ۱- پروفیل حرارتی واکنش DOP-PCR

مرحلهٔ دوم در ۴۰ سیکل		مرحلهٔ اوّل در ۸ سیکل	
۹۴ درجه	۱ دقیقه	۹۴ درجه	۱ دقیقه
۶۲ درجه	۲ دقیقه	۳۰ درجه	۲ دقیقه
۷۲ درجه	۲ دقیقه	۷۲ درجه	۲ دقیقه
مرحلهٔ سوّم در یک سیکل: ۷۲ درجه به مدّت ۱۰ دقیقه			

1- Phosphate buffer saline

تکثیر جایگاه‌های ژنی مختلف از ژنوم انسان

حجم مطلوب هر PCR محتوی ۲ واحد آنزیم تک پلیمراز، ۲۰۰ میکرومولار از چهار نوکلئوتید، ۱/۵ میلی‌مولار نمک کلرید منیزیم و ۳۵ پیکومول از هر پرایمر در حجم ۲۵ میکرولیتر به دست آمد. توالی پرایمرها در جدول ۲ آمده است. در واکنش دیگری تشخیص جهش نقطه‌ای در ژن K– ras با استفاده از روش RFLP بررسی شد.

نتایج

در تأیید تکثیر مطلوب ژنوم، واکنش‌های متعددی جهت تکثیر قطعات مختلف بر روی کروموزوم‌های ۲، ۹، ۱۲، ۱۷ و ۱۸ انجام شد. مقدار ۲ میکرولیتر از واکنش به دست آمده به منظور تکثیر تخصصی در واکنش‌های بعدی استفاده گردید. در این موارد قطعاتی از ژن Smad 4 بر روی کروموزوم ۱۸ (اگزون ۱۱ به طول ۵۵۰ نوکلئوتید) و ژن P53 بر روی کروموزوم ۱۷(به طول ۳۳۰ نوکلئوتید) به دست آمد (شکل ۱).

جهت نشان دادن تکثیر یکسان ژنوم منطقهٔ D9S319 بر روی کروموزوم ۹ (به طول ۱۶۵ نوکلئوتید) و همچنین بخشی از کروموزوم ۲ به طول ۱۳۵ نوکلئوتید در منطقهٔ مارکر D2S123 به کمک پرایمرهای تخصصی و با استفاده از روش PCR تولید شدند (شکل ۲). سلول هلا در دو منطقهٔ مذکور هتروزیگوت بوده که به همین دلیل در شکل ۲، دو محصول (دو آلل) با طول‌های متفاوت دیده می‌شود.

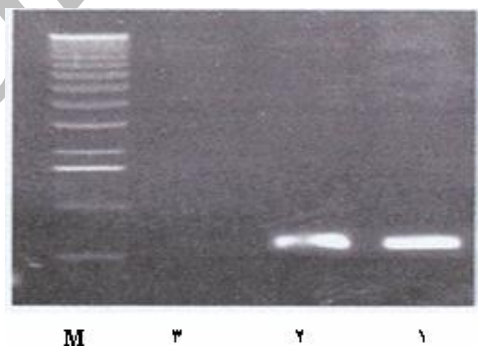
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فهرست پرایمرهای به کار برده شده در واکنش‌های مختلفPCR

Name & locus	Primer sequences	Product length/ bp
Smad 4/exon 11 (chromosome 18)	5‘-CCA AAA GTG TGC AGC TTG TTG-3‘ 5‘-CAG TTT CTG TCT GCT AGG AG-3‘	550
TP53 chromosome 17)	5‘-GAC AGG TAG ACC TGA T-3‘ 5‘- TCT GAG GCA TAA CTG C-3‘	330
K-ras (chromosome 12)	5‘BstNI : 5‘-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT 3‘WT :5‘- TCA AAG AAT GGT CCT GCA CC-3‘ 3‘BstNI:5‘- TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC-3‘	157
MSM[1] D2S123 (chromosome 2)	5‘- AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3‘ 5‘-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3‘	159
MSM D9S319 (chromosome 9)	5‘-GCC AGT GTTCTC CAG AGA AA-3‘ 5‘-TGG GAT ATG TCA GCC AAA AT-3‘	173

در روش RFLP–PCR جهت تکثیر ژن k-ras از پرایمرهای wt و BstNI استفاده شد.

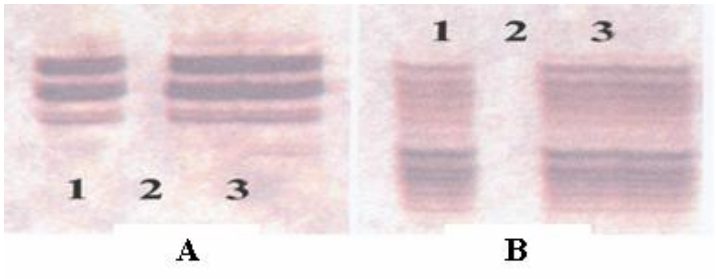


شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز از محصولات PCR با طول ۵۵۰ جفت باز از ژن Smad 4 بر روی کروموزوم ۱۸ انسان: ۱) محصول DOP–PCR تک سلول به عنوان DNA الگو. ۲) کنترل مثبت با DNA ۱۰ ng استخراج شده از سلول‌های هلا. ۳) کنترل منفی. M: مارکر.

1- Microsatellite Marker

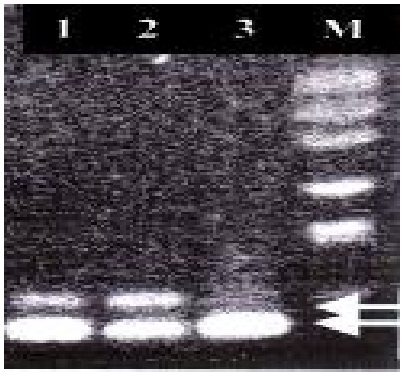
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- محصولات PCR از مارکرهای ریزماهواره‌ای تکثیر یافته پس از الکتروفورز ژل ۶ درصدی پلی اکریلامید با رنگ‌آمیزی نیترات نقره : D9S319(A بر روی کروموزوم ۹. D2S123(B بر روی کروموزوم ۲. ۱) – محصول DOP– PCR. ۲) کنترل منفی. ۳) محصول PCR شاهد.

با توجّه به این که سلول‌ها حامل یک موتاسیون نقطه‌ای در اگزون یک ژن k-ras است، جهت نشان دادن صحت عمل روش اصلاحی در غربالگری جهش‌ها، از تکنیک RFLP استفاده شد. در شکل ۳ جهش مورد انتظار قبل و پس از تکثیر ژنوم دیده می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳- RFLP جهت تشخیص جهش نقطه‌ای در ژن K–ras (کروموزوم ۱۲) به دست آمده از: ۱) محصول DOP–PCR . ۲) کنترل مثبت با ۱۰ng DNA استخراج شده. ۳) محصول PCR از ژن K– ras فاقد جهش. M) DNA مارکر.

بحث

مقادیر کم DNA ژنومی یک فاکتور محدود کننده در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، تشخیص هویت و مطالعات متنوع ژنتیکی می‌باشد [۱ و ۲]. تکثیر ژنوم کامل تکنیکی است که DNA محدود را در یک توالی غیروابسته به الگو افزایش می‌دهد. روش‌های مختلفی برای تکثیر ژنوم کامل ارائه شده است [۵]. برای مثال دو روش عمده و شناخته شده PEP [۹] و DOP [۵] طراحی شده‌اند. اخیراً نیز یک روش PEP اصلاح شده برای تکثیر DNA ژنومی از تعداد کمی سلول پیشنهاد شده که بازدهی آن برای DOP–PCR از یک سلول، ۳٪ گزارش شده است [۴].

نکتهٔ مهّم در تکثیر ژنوم کامل، انتخاب آنزیم DNA پلیمراز با قدرت پیش روندگی بالا و میزان خطای پایین است. PCR معمولی اغلب برای تکثیر قطعات کوتاه DNA به کار می‌رود که در آن از آنزیم مقاوم به حرارت تک پلیمراز استفاده می‌شود [۲]. با این حال به منظور تولید قطعات طویل همانند تکثیر ژنوم کامل، توانایی آنزیم تک پلیمراز بسیار

Archive of SID

www.SID.ir

محدود است. در این تحقیق برای افزایش دقت و بهبود روش DOP–PCR با کارآرایی بالا و در سطح تک سلول، بررسی مقایسه‌ای با پنج DNA پلیمراز مقاوم به حرارت و متفاوت از نظر پیش‌روندگی انجام شد و بهترین نتیجه با آنزیم– pfu Turbo پلیمراز به دست آمد. از ویژگی‌های این آنزیم سنتز سریع قطعات طویل و درصد خطای بسیار کم می‌باشد [۹ و ۱۰]. علاوه بر آن، آنزیم pfu–Turbo پلیمراز برای عملکرد مطلوب خود به مقادیر کمی از DNA نیاز دارد. آنزیم‌های دیگر در شرایط مشابه بازدهی بسیار کمی دارند [۱۰].

پروتکل DOP ارائه شده دارای قابلیت تکثیر کمی و کیفی هر منطقه از ژنوم با فقط ۰/۰۱ نانوگرم الگوی اوّلیه (مقدار تقریبی ژنوم یک سلول انسانی) است. تکثیر موفق ژن‌ها با جایگاه‌های متفاوت کروموزومی در این تحقیق گویای این مدعا می‌باشد. در مقایسه، روش‌های قبلی در حضور حداقل یک نانوگرم DNA محصولات نسبتاً مطلوبی را تولید می‌کنند [۸]. نکتهٔ مهّم دیگر حذف مرحلهٔ استخراج DNA از سلول بدون اثر منفی بر واکنش تکثیر ژنوم می‌باشد. این قابلیت با به کارگیری بافرهای مناسب به دست آمد (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه شود). در بررسی‌های مشابه، DNA سلول ابتدا با روش‌های رایج استخراج می‌شود که در این حین از دست دادن بخشی از DNA اجتناب ناپذیر می‌باشد. از طرفی در صورت ناخالصی DNA برخی اجزاء سلولی سبب مهار فعالیّت آنزیم DNA پلیمراز می‌شوند که این امر منجر به عدم تکثیر و یا حداقل تکثیر نامطلوب DNA خواهد شد [۱۰].

با توجّه به این که عدم تبعیض در تکثیر آلل‌ها از نکات بسیار مهّم در بررسی‌های LOH[1] می‌باشد [۱۰] و نظر به این که سلول‌ها در مناطقی از کروموزوم‌های ۲ و ۹ هتروزیگوت می‌باشد، و یا به عبارتی دارای آلل‌هایی با طول متفاوت است، این مناطق توسط دو مارکر D2S123 و D9S319 و با استفاده از ژنوم تکثیر یافته از سلول مذکور نسخه برداری شدند. نتایج در روش اصلاح شده به خوبی نشان می‌دهند که در هر دو مورد آلل‌ها به طور یکسان تکثیر یافته‌اند (شکل ۲). به عبارت دیگر، روش اصلاح شده در این تحقیق می‌تواند در بررسی‌های تعیین ژنوتیپ مورد استفاده قرار گیرد.

در خاتمه برای نشان دادن میزان خطا در حین تکثیر ژنوم، از محصول به دست آمده در تشخیص جهش‌های نقطه‌ای استفاده شد. یکی از ویژگی‌های سلول هلا وجود یک جهش نقطه‌ای در اگزون یک ژن k-ras بر روی کروموزوم ۱۲ است. با استفاده از تکنیک RFLP نشان داده شد که جهش مورد انتظار پس از تکثیر ژنوم نیز قابل تشخیص می‌باشد (شکل ۳). این امر تأییدی بر دقت عمل بالای پروتکل اصلاحی است.

در مجموع می‌توان گفت که روش بهبود یافته نه تنها توانایی تکثیر مقادیر بسیار کم DNA را داشته، بلکه روشی مطمئن در غربالگری جهش‌ها و LOH در سطح یک سلول می‌باشد.

1- Loss of Heterozygosity

Archive of SID

www.SID.ir

مراجع

[1] Huang, Q., Schantz, SP., Rao, P.H., Mo, J., McCormick, S.A. and Chaganti, R.S., Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors, Genes Chromosomes Cancer. 28, 4 (2000) 395-403.

[2] Sanchez-Cespedes, M., Cairns, P., Jen, J., Sidransky, D., Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR): evaluation of its reliability for screening of genetic alterations in neoplasia, Biotechniques. 25, 6 (1998) 1036-1038.

[3] Buchanan, A.V., Risch, G.M., Robichaux, M., Sherry, S.T., Batzer, M.A. and Weiss, K.M., Long DOP-PCR of rare archival anthropological samples, Hum Biol. 72, 6 (2000) 911-925.

[4] Dietmaier, W., Hartmann, A., Wallinger, S., Heinmoller, E., Kerner, T., Endl E, Jauch, K.W., Hofstadter, F., Ruschoff, J,. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. Am. J. Pathol. 154, 1 (1999) 83-95.

[5] Telenius, H., Carter, N.P. and Bebb, C.E., degenerate oligonucleotide primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer, Genomics. 13, 3 (1992) 718-725.

[6] Ottesen, A.M., Skakkebaek, N.E., Lundsteen, C., Leffers, H., Larsen, J., Rajpert-De Meyts. High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development, Genes Chromosomes Cancer. 38, 2 (2003) 117-125.

[7] Schantz, S.P., Rao, P.H., Mo, J. and McCormick, S.A., DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. Genes Chromosomes Cancer. 36, 4 (2003) 361-374.

[8] Kim, S.H., Kim, M.S. and Jensen, R.H., Genetic alterations in microdissected prostate cancer cells by comparative genomic hybridization, Prostate Cancer Prostatic Dis. 3, 2 (2000) 110-114.

[9] Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert. R. and Navidi, W., Whole genome amplification from a single cell:

Archive of SID

www.SID.ir

[10]Cline, J., Braman, J. and Kretz, K., Influence of allelic discrimination in LOH analysis. Nucleic acid research; 24 (1996) 3546-3551.

implications for genetic analysis, Proc Natl. Acad. Sci. USA. 89 (1992) 5847-5851.

Archive of SID

www.SID.ir