

طراحی و ساخت پلاسمید pBGGT: به عنوان یک پلاسمید حامل برای هدف گیری ژنی بیماری بتا تالاسمی

دکتر حسین خان احمد؛ MD، دانشجوی PhD، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 دکتر کیهان آزادمنش؛ MD، PhD، فرآورده های بیولوژیک، بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
 دکتر محمدعلی شکرگزار؛ PhD، فرآورده های بیولوژیک، بخش بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران
 دکتر احمدرضا نیاورانی؛ MD، PhD، فرآورده های بیولوژیک، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 محسن کریمی؛ MSc، سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 بهاره ربانی؛ MSc، سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 میترا خلیلی؛ MSc، سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 رضوان باقری؛ MSc، میکروپ شناسی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 دکتر فرشته مریمی؛ MD، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
 دکتر سیروس زینلی؛* PhD، ژنتیک انسانی، استادیار بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

خلاصه

هدف: در اکثر تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی نیاز به ساخت سازه ژنی می باشد. برای ساخت و تکثیر این سازه ها اغلب از پلاسمیدهای تجاری موجود استفاده می شود. گاهی اوقات به علت متعدد بودن قطعات ژنی و طولانی بودن این قطعات و محدودیت در استفاده از آرایه ها، استفاده از پلاسمیدهای موجود سبب افزایش هزینه و زمان پروژه می شود. در مواردی نیز ساخت سازه ژنی با استفاده از پلاسمیدهای موجود امکان پذیر نمی باشد. در این تحقیق با استفاده از یک روش ساده و سریع پلاسمید مطلوب برای پروژه ژن درمانی بتا تالاسمی طراحی و ساخته شد.

روش مطالعه: در ابتدا با بررسی قطعات سازه ژنی با نرم افزار Gene runner، مولتیپل کلونینگ سایت مطلوب طراحی و سنتز شد. از طرفی سایت متعدد کلونینگ پلاسمید pUC19 با هضم آنزیمی از پلاسمید خارج شد. سپس در طی یک واکنش لایگشن و ترانسفورمیشن، سایت متعدد کلونینگ جدید جایگزین سایت متعدد کلونینگ پلاسمید pUC19 شد و با آنالیز آنزیمی و تعیین توالی صحت کار تایید شد.

یافته ها: ارزیابی ها، مراحل طراحی و ساخت سایت متعدد کلونینگ را موفقیت آمیز نشان داد. در مرحله ترانسفورمیشن نیز کلنی های متعدد حاصل شد. اغلب آنها در مرحله هضم آنزیمی تأیید شدند. یکی از کلنی های تأیید شده تعیین توالی شد و مورد تأیید نهایی قرار گرفت.

نتیجه گیری: روش مورد استفاده در این تحقیق روش ساده، ارزان و سریع جهت ساخت پلاسمیدهای مطلوب از پلاسمیدهای تجاری موجود است. این کار سبب کاهش هزینه و زمان پروژه های ساخت سازه ژنی می شود. سایت متعدد کلونینگ به گونه ای طراحی گردید تا تمام قطعات بصورت جهت دار کلون شوند. این امر باعث حذف مراحل تعیین جهت و افزایش کارآمدی مراحل کلونینگ می شود.

*مسئول مقاله، آدرس:

تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز
تحقیقات بیوتکنولوژیE-mail:
sirouszeinali@yahoo.com

دریافت: ۸۴/۹/۸

بازنگری: ۸۴/۱۲/۲

پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۰

واژه های کلیدی: بتا تالاسمی، pBGGT، pUC19، هدف گیری ژنی

مقدمه

متوقف می شود. از علائم این بیماری کم خونی شدید، بزرگی کبد و طحال و تغییر شکل استخوان های صورت و جمجمه می باشد [۱]. این بیماران در طی حیات خود نیاز به تزریق

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا می باشد. در این بیماری سنتز بتاگلوبین کاهش یافته یا

هستند. این پلاسمید ابتدائاً از نمونه‌های بالینی جدا شد [۸]. pSC101 [۹] و ColE₁ و pCR1 [۱۰] اولین وکتورهای پلاسمیدی بودند که برای کلونینگ بکار برده شدند اولین فاز تکامل وکتورهای پلاسمیدی با ساخت pBR322 به پایان رسید [۱۱]. اولین نسل پلاسمیدهای دارای تعداد کپی بالا در سلول شامل pXf3 [۱۲] و pAT53 [۱۳] بودند. یک تا دو سال بعد وکتورهای پلاسمیدی pUC ساخته شدند. این پلاسمیدها دارای سایت‌های متعدد و انحصاری در منطقه‌های با نام سایت متعدد کلونینگ (Multiple Cloning Sites) می‌باشند [۱۴]. در حال حاضر پلاسمیدهای تجاری بسیاری با مقاصد مختلف از قبیل کلونینگ، بیان و غیره ساخته شده است. در اکثر تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، بیوتکنولوژی و ژن درمانی نیاز به طراحی و ساخت سازه‌های ژنی می‌باشد. برای ساخت و تکثیر این سازه‌ها معمولاً از پلاسمیدهای تجاری استفاده می‌شود. در اغلب موارد وقتی سازه ژنی طول کوتاهی داشته باشد یا تعداد قطعات آن کم باشد پلاسمیدهای تجاری جوابگوی نیاز محققین می‌باشد.

در بعضی موارد سازه ژنی طویل است و از کنار هم قرار گرفتن تعداد زیادی قطعه ژنی ساخته می‌شود. در این موارد باید از چند پلاسمید تجاری استفاده کرد و قطعات را در طی چند مرحله کلونینگ و ساب کلونینگ در پلاسمیدهای مختلف کلون و در نهایت به پلاسمید نهایی منتقل کرد. در طی مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ گاهی استفاده از آنزیم‌های دارای جایگاه برش blunt، اجتناب ناپذیر است. استفاده از این آنزیم‌ها در مرحله کلونینگ سبب کاهش کارآمدی (efficiency) و اکشن اتصال (ligation) بین وکتور و Insert می‌شود. از طرفی برای بدست آوردن پلاسمیدی که قطعه مورد نظر در جهت مطلوب در آن قرار داده شده باید آنالیز آنزیمی انجام شود تا کلون حاوی پلاسمید با جهت مطلوب شناسایی و جدا گردد (Directional Selection). در بعضی موارد در طی آنالیز آنزیمی کلون مطلوب بدست نمی‌آید و مرحله کلونینگ و ساب کلونینگ باید تکرار شود. گاهی در طراحی مراحل کلونینگ به علت محدودیت در سایت‌های آنزیمی نیاز به blunt کردن انتهای قطعه با آنزیم Klenow و یا دفسفریله کردن قطعه با آنزیم calf intestine alkaline phosphatase کردن قطعه با آنزیم T4 Polynucleotide Kinase داریم. به علاوه بعضی آنزیم‌ها نمی‌توانند سایت‌های برش اختصاصی خود را وقتی متیله می‌شود برش دهند. لذا ضروری است پلاسمید در میزبان Dam⁻ ترانسفورم گردد و سپس هضم آنزیمی انجام شود. به هر حال تمام مشکلات فوق الذکر باعث افزایش صرف وقت و هزینه پروژه می‌شود.

خون در فواصل زمانی کوتاه دارند. بتا تالاسمی یک اختلال تک ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب می‌باشد. تاکنون حدود ۲۰۰ جهش در ژن بتاگلوبین شناسایی شده است [۲].

جهش‌های فوق روی نسخه برداری، پردازش mRNA (mRNA Processing) بیان و پایداری زنجیره بتا پس از ترجمه، تأثیر می‌گذارند و سبب توقف سنتز یا نا پایداری زنجیره ساخته شده می‌گردند [۱]. پیوند مغز استخوان قطعی‌ترین روش درمانی برای این بیماران است. اما این روش به علت در دسترس نبودن اهدا کنندگان مناسب و داشتن عوارضی مانند واکنش ایمنولوژیک سلول‌های پیوند بر علیه میزبان (Graft Versus host disease) در عمل با مشکلات زیادی روبرو می‌باشد [۳]. اصلاح نقص ژنتیک با روش ژن درمانی، روش ایده‌آل برای درمان این بیماران است. در حال حاضر در اغلب پروژه‌های ژن درمانی از وکتورهای ویروسی استفاده می‌شود. کارایی این وکتورها برای ارائه ژن به سلول بسیار بالا است [۴] ولی ظرفیت پذیرش ژن آنها کم است و در مواردی که نیاز به تجویز مجدد وکتور می‌باشد، احتمال بر انگیزته شدن پاسخ ایمنی میزبان علیه پروتئین‌های ویروس وجود دارد. در اغلب این وکتورها جایگزین شدن ژن در ژنوم بصورت تصادفی صورت می‌گیرد و این مسئله می‌تواند باعث خاموش یا فعال شدن یکسری ژن‌ها و ایجاد مسائلی مانند بدخیمی می‌شود [۵]. اخیراً بعلمت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش‌های هدف‌گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی شده است.

روش ایده‌آل برای ژن درمانی، اصلاح یک ژن جهش یافته به صورت مستقیم و بدون ایجاد تغییر در محل‌های دیگر می‌باشد. این امر با پدیده Homologous Recombination انجام پذیر می‌باشد [۶]. استفاده از این پدیده برای جایگزینی ژن سالم در محل ژن معیوب، هدف‌گیری ژنی نامیده می‌شود. میزان بروز Homologous Recombination حدود 10^{-5} تا 10^{-7} می‌باشد [۷]. برای جداسازی و انتخاب سلول‌های اصلاح شده باید از نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی استفاده کرد. برای ژن درمانی با این روش نیاز به ساخت سازه ژنی حاوی ژن بتاگلوبین و بازوهای همسان (همولوگ) و نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی داریم.

معمولاً برای ساخت و تکثیر سازه‌های ژنی از پلاسمیدها استفاده می‌شود. پلاسمیدها مولکول‌های DNA با سایز ۱ kb تا بیش از ۲۰۰ kb هستند و بصورت خارج کروموزومی در سلول وجود دارند. اکثر آنها دو رشته‌ای و بصورت حلقوی بسته با پیوند کووالاننت (closed covalent circular) می‌باشند. اغلب پلاسمیدهایی که بطور متداول در کلونینگ استفاده می‌شوند حاوی رپلیکون مشتق شده از pMB1

پلی نوکلئوتیدهای F و R با حجم مساوی و غلظت مساوی در تیوب ۱/۵ میلی لیتر اپندورف با هم مخلوط شد (غلظت ۱۰ میلی مول و حجم ۵۰ میکرو لیتر از هر کدام)، حرارت تیوب به ۹۰ درجه سانتیگراد رسانده شد تا ساختمان های ثانویه این پلی نوکلئوتیدها باز شود. سپس به دمای محیط برگردانده شد. به علت مکمل بودن این دو پلی نوکلئوتید در داخل تیوب اپندورف تعداد زیادی DNA دو رشته ای که همان سایت متعدد کلونینگ جدید می باشد تشکیل گردید. حاصل این تیوب برای استفاده در واکنش اتصال (ligation) داخل فریزر نگهداری شد.

هضم آنزیمی pUC19 در Ecoli Top10
ترانسفورم گردید و pUC19 از باکتری با کیت استخراج پلاسمید (آلمان Nucloespin) تخلیص شد. سپس OD پلاسمید اندازه گیری شد. پلاسمید فوق تحت اثر آنزیم HindIII و EcoRI قرار گرفت. این دو آنزیم به صورت منفرد در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ پلاسمید جایگاه دارند. هضم آنزیمی فوق سبب جدا شدن سایت متعدد کلونینگ از Back Bone پلاسمید می شود. حاصل هضم آنزیمی فوق روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و باند حدود ۲۶۴۰ bp از روی ژل بریده شد. با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (آلمان Nucloespin) DNA از ژل جدا شد و OD آن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

واکنش اتصال بین pUC19 Back Bone و سایت متعدد کلونینگ جدید:

با توجه به غلظت pUC19 Back Bone که از روی ژل جدا شد و غلظت سایت متعدد کلونینگ جدید و با رعایت نسبت مولاری و فرمولاسیون زیر واکنش اتصال گذاشته شد.

$$\frac{\text{Insert برحسب مول}}{\text{Vector برحسب مول}} = 5/1$$

Back bone pUC19 + 3 μl Buffer 10X + 3 μl PEG 4000 + M.C.S + H2O upto 29 μl + 1 μl T4 DNA ligase

تیوب اپندورف حاوی واکنش اتصال، بمدت یکساعت در دمای محیط (RT) و برای Overnight در یخچال نگهداری شد.

تهیه سلول مستعد (Competent)، ترانسفورمیشن و استخراج پلاسمید: باکتری Ecoli Top10 در 5ml محیط LB Broth حاوی تتراسایکلین رشد داده شد تا OD به ۰/۶ رسید. سپس با روش شیمیایی و با استفاده از M Cacl2 ۰/۱ سلول مستعد (Competent) تهیه شد. سپس حاصل واکنش اتصال در باکتری مستعد (Competent)

با این حال گاهی با لحاظ کردن تمام موارد فوق، طراحی سازه ژنی با استفاده از پلاسمیدهای تجاری موجود به نتیجه نمی رسد. در این مطالعه ساخت یک سازه ژنی برای استفاده در ژن درمانی بیماری بتا تالاسمی با استفاده از پدیده نوترکیبی همسان (homologous recombination) مد نظر قرار گرفت. در همین ارتباط، در ابتدا سعی شد با استفاده از پلاسمیدهای موجود سازه ساخته شود ولی پلاسمیدهای در دسترس جوابگوی نیاز ما نبود. لذا بر آن شدیم تا یک پلاسمید مطلوب که دارای سایت متعدد کلونینگ ایده آل جهت طراحی ما باشد را طراحی و بسازیم.

مواد و روش ها

این مطالعه که قسمتی از طرح پژوهشی ژن درمانی بیماری بتا تالاسمی شبکه پزشکی مولکولی کشور می باشد یک پژوهش مولکولی است و در اواخر سال ۱۳۸۳ در بخش بیوتکنولوژی انسیتو پاستور تهران انجام شد.

طراحی سایت متعدد کلونینگ: در ابتدا توالی قطعات سازه ژنی شامل قطعات A تا G و Back bone پلاسمید pUC19 صرف نظر از سایت متعدد کلونینگ آن از نظر آنزیم های Non cutter با نرم افزار Gene runner بررسی شد. بر اساس طراحی انجام شده ترتیب قراردادن جایگاه های برش آنزیم در سایت متعدد کلونینگ جدید به صورت زیر تعیین شد:

EcoRI-NheI-KpnI-MluI-BglIII-SacI-AflIII-XbaI-ClaI-AgeI-XhoI-HindIII

در نهایت سایت متعدد کلونینگ زیر برای جایگزین شدن با M.C.S پلاسمید pUC19 طراحی گردید (شکل ۱). بر این اساس نیاز به یک DNA دو رشته ای با توالی فوق بود. در یک طرف این زنجیره دو رشته ای EcoRI Overhang و در طرف دیگر آن HindIII Overhang قرار دارد.

سنتز پلی نوکلئوتید: زنجیره دو رشته ای فوق (سایت متعدد کلونینگ) بصورت دو زنجیره تک رشته ای که حدود ۹۰٪ با هم مکمل هستند در نظر گرفته شد. یک رشته پلی نوکلئوتید F و رشته مکمل پلی نوکلئوتید R نامگذاری شد. این دو پلی نوکلئوتید سنتز و با روش HPLC خالص شد (توسط شرکت Primm از کشور ایتالیا).

توالی پلی نوکلئوتیدهای F و R:

F: 5' AA TTCGCTAGCAGGGTACCCAACG
CGTAAGATCTGAGCTCCTTAAGTTC
TAGAATCGATGACCGGTTCTCGAGA 3'
R: 5' AGCTTCTCGAGAACCGGTC
ATCGATTCTAGAACTTAAG
GAGCTCAGATCTTACCGGTTG
GGTACCCTGCTAGCG 3'

EcoRI *NheI* *KpnI* *MluI* *BglII* *SacI* *AflIII* *XbaI* *ClaI* *AgeI* *XhoI* *HindIII*
 AATTC GCTAGCAGGGTACCCAACGCGTAAGATCTGAGCTCCTTAAGTTCTAGAATCGATGACCGGTTCTCGAGA
 CGATCGTCCCATGGGTTGCGCATTCTAGACTCGAGGAATTCAAGATCTTAGCTACTGGCCAAGAGCTCTTCGA

شکل ۱- سایت متعدد کلونینگ پیشنهادی برای ساخت پلاسمید جدید همراه با محل و توالی آنزیم‌ها و بازهای اضافی که برجسته مشخص شده‌اند.

Directional pBGGT بصورت کلونینگ جهت‌دار (Cloning) قابل انجام است. در طراحی پلی نوکلئوتیدهای F و R نیز نتایج مثبت بود و پیش‌بینی‌های لازم برای داشتن Overhang EcoRI و Overhang HindIII شده بود. **مرحله اتصال (Ligation):** نتایج در مرحله اتصال نیز خوب بود و کلون‌های متعددی پس از ترانس‌فورمیشن بدست آمد. در مرحله آنالیز آنزیمی تعداد زیادی از کلون‌ها حاوی پلاسمید موردنظر بودند و بوسیله آنزیم‌های *NheI-ClaI-AgeI-BglII-MluI-XhoI* و *AflIII* خطی شدند (شکل ۲). از طرفی این پلاسمیدها بوسیله آنزیم‌های *BamHI* و *SalI* خطی نشدند زیرا جایگاه‌های آنزیمی فوق در پلاسمید جدید وجود ندارد. در کل بررسی نتایج حاصل از هضم آنزیمی تأیید کننده جایگزینی سایت متعدد کلونینگ جدید در پلاسمید pUC19 بود. نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای *Forward* و *Reverse* M13 تأیید کننده نهایی پلاسمید جدید بود. در این تحقیق ما به پلاسمید مطلوب خود برای ساخت سازه ژنی مورد نیاز در ژن درمانی رسیدیم. pBGGT در بانک ژن تحت شناسه DQ384617 به ثبت رسانده شد.

Overnight ترانسفورم گردید. حاصل ترانسفورمیشن در پلیت‌های LB Agar حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و برای در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. از کلونی‌های حاصل ماتریس تهیه شد و از هر خانه ماتریس در لوله با همان شماره حاوی 5ml (Amplicin + LB Broth) کشت داده شده از کلون‌های کشت داده شده پلاسمید استخراج گردید. **هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج شده:** پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های *NheI-ClaI-AgeI-BglII-MluI-XhoI* که در سایت متعدد کلونینگ یک جایگاه برش دارند هضم شدند. کلون‌های فوق تحت اثر آنزیم *BamHI* و *SalI* نیز قرار گرفتند این دو آنزیم در پلاسمید جدید جایگاه برش ندارند. یکی از کلون‌های تأیید شده با آنالیز آنزیمی با استفاده از پرایمرهای جلوبر و معکوس *Forward* و *Reverse* M13 تعیین توالی شد.

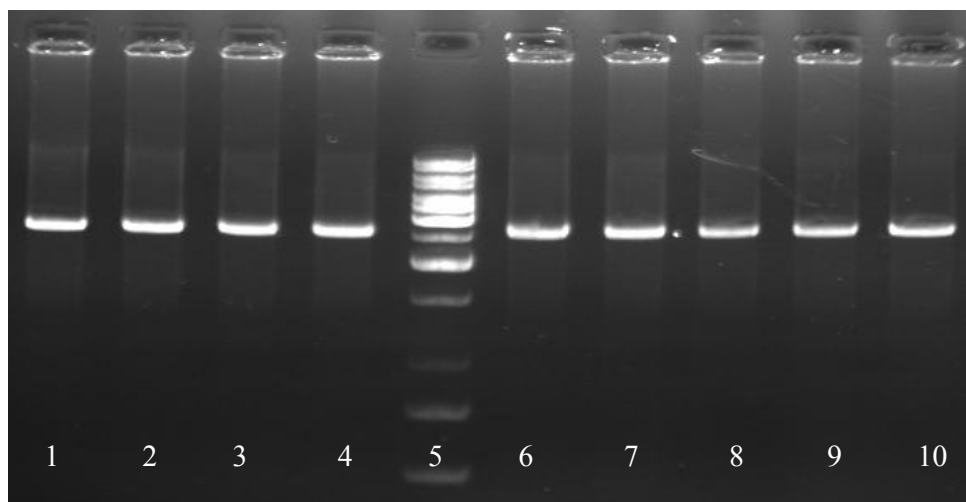
یافته‌ها

مرحله طراحی: در این مرحله نتایج طراحی اولیه با نرم افزار Gene runner بررسی شد (جدول ۱) و هیچگونه مشکل و تداخل عمل آنزیمی در طراحی مشاهده نشد. براساس این طراحی جایگزینی تمام قطعات A تا G در پلاسمید

جدول ۱- بررسی قطعات ژنی A تا G از نظر وجود یا فقدان سایت برش آنزیم

Gene Fragments Enzymes	A	B	C	D	E	F	G
NheI	N	N	N	N	N	N	N
XhoI	N	N	N	N	N	N	N
AgeI	N	N	N	N	N	N	N
kpnI	N	N	N	N	N	N	N
MluI	C	N	N	N	N	N	C
BglII	C	C	N	N	N	C	C
SacI	C	N	N	N	N	N	C
AflIII	N	N	N	N	N	N	N
XbaI	N	N	N	N	N	C	N
ClaI	N	N	N	N	N	N	N

N=Non cutter C=Cutter



۱. آنزیم Sac I، ۲. آنزیم Afl II، ۳. آنزیم Bgl II، ۴. آنزیم NheI، ۵. مارکر (Fermentas) 1kb، ۶. آنزیم Xba I، ۷. آنزیم Mlu I، ۸. آنزیم XhoI، ۹. آنزیم Age I، ۱۰. آنزیم Cla I

شکل ۲- هضم آنزیمی pBGGT با استفاده از جایگاههای آنزیمی موجود در سایت متعدد کلونینگ

بحث

در طراحی سایت متعدد کلونینگ برای افزایش کارآمدی آنزیم در عمل برش با توجه به نوع آنزیم و بر اساس جدول صفحه ۱۱۹ کاتالوگ ۲۰۰۳ Fermentas در کنار توالی هر سایت آنزیمی یک یا دو باز اضافی گذاشته شد. استفاده از بازهای اضافی در کنار سایت های برش باعث کارآمدی صد درصد آنزیمها در زمان برش می شود و همانطور که در عمل دیده شد پلاسمیدها بطور کامل بوسیله همه آنزیمها خطی شدند و پلاسمید هضم نشده باقی نماند. ضمناً در این مرحله دقت شد تا افزودن این بازها سبب ایجاد سایت آنزیمی جدید نشود. در طراحی سایت متعدد کلونینگ سعی شد از آنزیمهایی که به متیلاسیون حساسند و نیاز به میزبان Dam دارند حتی الامکان استفاده نشود این امر باعث کاهش مراحل ترانس فورمیشن می شود. اکثر آنزیمهای سایت متعدد کلونینگ دارای 5' Overhang هستند و تمامی مراحل ساب کلونینگ در این پلاسمید به صورت جهت دار قابل انجام است و نیاز به مرحله تعیین جهت نمی باشد (Directional Selection) در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ آنزیم NheI و XhoI قرار داده شد تا برای تمام قطعات Non cutter باشند. سازه ژنی پس از ساخته شدن توسط آنزیمهای فوق از پلاسمید جدا می شود لذا آنزیمهای فوق بطور مکرر مورد استفاده قرار می گیرند و باید ارزان و در دسترس باشند تا هزینه پروژه به حداقل برسد.

نتیجه گیری

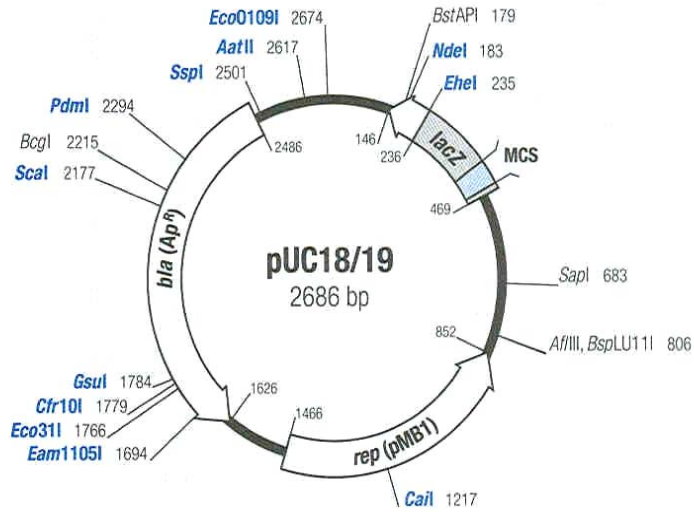
همانطور که در مقدمه ذکر شد در تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی گاهی پلاسمیدهای تجاری موجود جوابگوی نیاز محققین نمی باشد و استفاده از آنها سبب صرف وقت و هزینه زیاد می شود. در این تحقیق پلاسمید مورد نظر در مرحله اول طراحی و سپس ساخته شد. در مرحله طراحی نکاتی رعایت شد که کارآمدی مراحل کلونینگ را افزایش و تعداد مراحل را به حداقل برساند. سایت متعدد کلونینگ پلاسمید متناسب با قطعات A تا G به گونه ای طراحی شد تا تمام قطعات فوق بصورت جهت دار کlon شوند. این امر سبب حذف مراحل تعیین جهت و عدم نیاز به استفاده از آنزیمهای Klenow، CIP و T4 Polynucleotide Kinase می شود. حذف این مراحل سبب صرفه جویی در وقت و هزینه پروژه شد. وجود EcoRI Overhang و HindIII در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ سبب حذف دو مرحله هضم آنزیمی در روند کار شد. استفاده از پلی نوکلئوتید F و R برای ساخت سایت متعدد کلونینگ نیاز به کار کردن (Handling) با قطعه DNA با سایز کوچک (74 bp) را مرتفع ساخت. کار کردن با قطعه DNA با سایز حدود 74 bp کار بسیار دشواری است و الکتروفورز کردن و استخراج از ژل (Gel Extraction) و تخلیص آن بسیار دشوار و هزینه بر است. در این تحقیق طراحی به گونه ای است که سایت متعدد کلونینگ خالص بدون نیاز به مراحل PCR و الکتروفورز و استخراج از ژل ساخته می شود.

سیاسگزاری

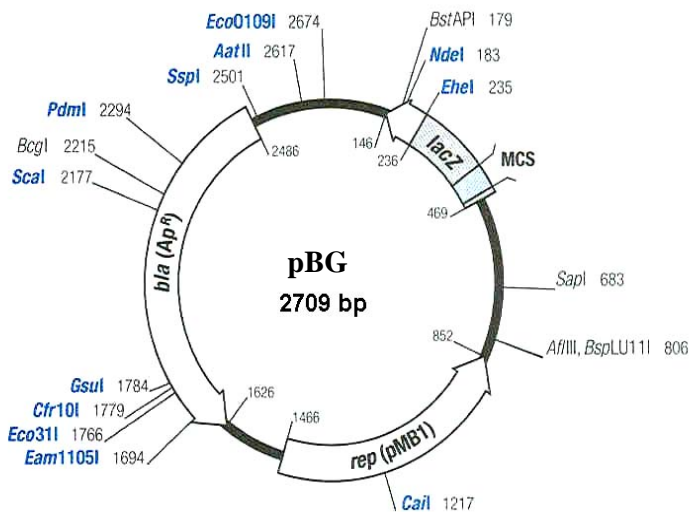
با تشکر از مسئولین محترم شبکه پزشکی مولکولی کشور که قسمت عمده هزینه این تحقیق را در قالب طرح ژن درمانی بتا تالاسمی پرداخت نمودند.

در مجموع روش مورد استفاده در این تحقیق روش ساده و سریعی برای دسترسی به یک پلاسمید جدید با استفاده از پلاسمیدهای تجاری موجود است. در نهایت پلاسمید لازم جهت ساخت سازه ژنی مورد نیاز برای ژن درمانی ساخته و pBGGT or plasmid for beta globin gene (targeting) نامیده شد (شکل ۳).

A



B



شکل ۳- (A) نقشه پلاسمید pUC18/19، (B) نقشه پلاسمید pBGGT

Design and constructing pBGGT Plasmid: a carrier plasmid for Betathalassaemia gene targeting

H Khanahmad; MD, Ph.D student, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran
K Azadmanesh; Ph.D of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran
MA Shokrgozar; Ph.D of Biotechnology, National Cell Bank of Iran, Pasteur institute of Iran.
AR Niavarani; Ph.D of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur institute of Iran.
M Karimi; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
B Rabbani; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
M Khalili; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
R Bagheri; MSc Microbiology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
F Maryami; MD, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
S Zeinali; Ph.D of Human Genetic, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran.

Abstract

Background: Most of molecular biology studies depend on making gene constructs. Although commercial plasmids are widely used for this purpose, sometimes due to the nature of the restriction sites or need of multiple subcloning, usual restriction sites available in original multiple cloning sites (MCS) of the plasmids could not be easily used, if not impossible at all. Here, we report an easy and fast method to construct suitable plasmid with a new MCS for constructing a 16kb gene targeting plasmid.

Methods: Firstly, the suitable MCS was designed by studying the sequence of desired gene fragments in Gene runner software. Two partial complementary 74 base long oligonucleotides were designed and constructed to make this MCS. The original pUC19 MCS was replaced with the new one by enzymatic digestion of the plasmid and removal of the MCS, followed by adding the two complementary oligonucleotides and ligating the construct and transforming it into Ecoli TOP10 F'. The new plasmid was then purified and sequenced by M13 forward and reverse primers.

Findings: Synthesis of two 74 base polynucleotides was successful, and these polynucleotides formed a double stranded fragment which was successfully inserted between HindIII-EcoRI sites of pUC19. Analysis of intermediate step results showed successful progress of cloning reaction. Final analysis of the plasmid by restriction analysis and sequencing the MCS confirmed authenticity of the new plasmid.

Conclusions: The method described here is a fast and easy way to make suitable plasmid out of commercially available plasmids. This process can considerably decrease the time and cost of plasmid construction. Availability of suitable restriction sites in proper order makes it possible to directionally clone the desired gene fragments which is more efficient and excludes screening steps for the right direction of the fragments. The plasmid reported herein is specifically tailored to insert different fragments of a beta-globin gene targeting construct.

Key Word: pUC19, pBGGT, Gene targeting, Beta thalassemia.

REFERENCES

1. Weatherall DJ. Clinical features of the thalassaemia. In: Higgs GOR, Olivieri NF, Wood WG. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Italy, Blackwell science. 2001 Pp: 1a (287-96) 1b (150-64).
2. May C, Rivella S, Chadburn A, et al. Successful treatment of murine β -thalassaemia intermedia by transfer of the human β -globin gene. Blood. 2002; 99(6): 1902-8.

*Correspondence author,
Address: Biotechnology
research center, Pasteur Institute
of Iran.
E-mail:
sirouszeinali@yahoo.com

Received: 9/8/05
Revised: 21/2/06
Accepted: 10/3/06

3. Debarah R, Rachmilewitz E. New trends in the treatment of β -thalassaemia. *Oncol Hematol.* 2000; 33: 112-3.
4. Strachan T, Andrew P. Read Methods, for inserting and expressing a gene in a target cell or tissue. *Human Molecular Genetics.* 3rd ed. London, garland science. 2004 Pp:619-20.
5. Lu ZH, Books TJ, Kaufman MR, et al. Long targeting arms do not increase the efficiency of homologous recombination in the α - globin locus of murine embryonic stem cells. *Blood.* 2003; 102(4): 1531-4.
6. Primrose BS, Twyman MR, Old WR. Principles of gene manipulation. 6th ed. London, Blackwell Science Ltd. 2001 Pp:187-201.
7. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *PNAS.* 2001; 98(15): 8403-10.
8. Hershfield V, Boyer HW, Yanofsky C, et al. Plasmid colEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *PNAS.* 1974; 71(9): 3455-9.
9. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Biotechnol.* 1992; 24: 188-92.
10. Covey C, Richardson D, Carbon J. A method for the deletion of restriction sites in bacterial plasmid deoxyribonucleic acid. *Mol Gen Genet.* 1976; 145(2):155-8.
11. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Biotechnol.* 1977; 2(2): 95-113.
12. Hanahan D, Meselson M. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 1983; 100: 333-42.
13. Twigg AJ, Sherratt D. Trans-complementable copy number mutants of plasmid colEI. *Nature.* 1980; 283 (5743): 216-8.
14. Vieira J, Messing J. Production of single stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987; 29(5): 484-7.

Archive of SID