مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۱: از ۲۹-۳۶
بهار ۱۳۸۶

طراحی و ساخت انواع نشانگرهای DNA با استفاده از DNAهای پلاسمیدی و فاژ لامبدا

مهری خاتمی[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲*]، حوریه صادری[۳]، سارا غروی[۴]، محمدمهدی حیدری[۱]، بیژن رنجبر[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۵- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۱۱ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۱۰

چکیده

هدف: امروزه نشانگرهای DNA یکی از مهمترین شاخص‌ها در زمینه تخمین اندازه مولکولی نمونه‌های DNA هستند که در تمام آزمایشگاه‌های پزشکی و تحقیقاتی از آن استفاده می‌شود. اما متأسفانه در کشور ما، تاکنون این ماده ساخته نشده است و تمام نمونه‌های نشانگر استفاده شده در کشور، از شرکت‌های خارجی تهیه می‌گردد. هدف از انجام این تحقیق، ایجاد فناوری مناسب برای ساخت این ماده ارزشمند در سطح آزمایشگاه بود.

مواد و روش‌ها: در این راستا، برای تهیه نشانگرهای DNA لامبدا از دو گونه مختلف لامبدا به نام‌های EMBL3A و CI857sam7 که هر دو جز فاژهای لیتیک بودند و از پلاسمیدهای pBR332 و pUC18 و پلاسمیدهای نوترکیب VZV، به‌عنوان منبع DNA استفاده گردید.

نتایج: در نهایت هفت نشانگر DNA ساخته شد که چهار عدد از آنها (Sam1، Sam2، λ/HindIII/BamH1، λ/HindIII/EcoR1) در نوع خود تازه بودند و به عنوان الگوهای جدید معرفی می‌شوند، ولی سه تای دیگر (pBR332/MspI λ/Pst I λ/Hind III) مشابه خارجی هم دارند، و تولید آنها برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود.

نتیجه‌گیری: بعد از طراحی و ساخت این نشانگرها، تلاش برای یافتن بهترین شرایط نگهداری و پایدارسازی نشانگرها به صورت موفقیت‌آمیزی انجام گرفت.

کلید واژگان: نشانگر DNA، آنزیم محدودگر، فاژ لامبدا، pBR332، pUC18، پلاسمیدهای نوترکیب VZV.

۱- مقدمه

از نشانگرهای DNA برای تخمین اندازه وزن مولکولی نمونه‌های DNA، بر روی ژل الکتروفورز و در آزمایش‌های مختلفی، نظیر PCR (به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA تکثیر یافته) و یا در هر آزمایش ژنتیکی و مولکولی دیگری، که با DNA سر و کار داشته باشد، استفاده می‌شود. در ساخت این نشانگرها از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود: می‌توان DNA مورد نظر برای استفاده را با یک آنزیم هضم کرد یا از هضم‌های دوتایی و چندتایی استفاده نمود و یا اینکه

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵ E-mail: sadeghma@modares.ac.ir

محصولات واکنش‌های هضمی مختلف را با همدیگر مخلوط کرده و حالت نردبانی ایجاد کرد. در این تحقیق برای طراحی و ساخت نشانگر از DNAهای استخراج شده از فاژ لامبدا (λ phage)، DNAهای پلاسمیدی pBR322 و pUC18 و پلاسمیدهای نوترکیب VZV حاوی ژن‌های همانندسازی، استفاده شد [۸]. لازم به ذکر است که برای تهیه DNA لامبدا، از گونه‌هایی استفاده می‌شود که در ژن cI (کد کننده پروتئین مهارکننده) دارای جهش‌اند (Mutation)، بنابراین، به حالت لیزوژنی (Lysogeny) در نمی‌آیند و همیشه مرحله لیتیک (Lytic phase) را دنبال می‌کنند [۳،۲]. باکتریوفاژ لامبدا (λ Bacteriophage) دارای یک ساختار سر شش ضلعی است که DNA دو رشته‌ای و خطی را در بر می‌گیرد و یک دم دراز دارد که در اتصال ویروس به اشرشیاکلی نقش مهمی را ایفا می‌کند [۱]. ضمناً مشخص شده است که فاژ لامبدا، تنها به سطح سلول آن اشرشیاکلی متصل می‌شود که دارای جایگاهی برای انتقال مالتوز (Maltose) به داخل سلول می‌باشد [٤]. بنابراین، برای عفونی کردن باکتری‌ها به فاژ لامبدا، باید محیط کشت، حاوی مالتوز باشد [۷،٦]. هنگامی که DNA فاژ وارد سلول می‌شود، دو سر آن، به دلیل وجود انتهای چسبنده bp۱۲ در هر انتها که مکمل هم هستند، تشکیل یک مولکول DNA حلقوی را می‌دهد [۲] در حدود ٤٥ دقیقه بعد از عفونت، باکتری لیز (Lysis) می‌شود و تقریباً ۱۰۰ مرحله جدید آزاد می‌شود [٦،۳]. در مرحله لیتیک، عفونت به سلول‌های نزدیک هم کشیده می‌شود و این دور تکرار می‌گردد. اگر عفونت با سلول‌های آن اشرشیاکلی انجام شود که روی سطح آگار گسترده شده باشد، نواحی عفونی شده به صورت نقطه‌های روشن (پلاک)، اطراف سلول‌های زنده دیده خواهند شد که با شمارش تعدادی از این پلاک‌ها و ضرب کردن در فاکتور رقت، می‌توان تیتر فاژ را تعیین کرد [۱۰]. برای تعیین این تیتر، باید مجموعه‌ای از رقت‌ها را برای باکتریوفاژ فراهم کرد. این رقت‌های فاژی را با محیط کشت آگار، مخلوط کرده و روی ظرف گسترش می‌دهند. فاژها در این چمن باکتریایی، تشکیل پلاک‌های شفاف را می‌دهند. بهترین میزان ذرات فاژ لامبدا به‌دست آمده در یک آزمایش $۱۰^{۹}$–$۱۰^{۱۰}$ pfu (Plague Forming Unit) می‌باشد که این مقدار فاژ می‌تواند یک DNA در حد ۵۰۰ ng به ازای هر ۱ml محیط کشت LB (Luria Bertani) باکتری آغشته به فاژ تولید کند [٦،٤]. لازم به ذکر است که اگر فاژها، قبل از اینکه سلول‌ها در بیشترین میزان تقسیم شدن باشند، اضافه شود، همهٔ سلول‌ها سریعاً لیز شده و تیتر پایینی از فاژ ایجاد می‌گردد. در صورتی هم که هنگام اضافه کردن فاژ، چگالی سلولی بسیار بالا باشد، سلول‌ها به طور کامل لیز نمی‌شوند و باز هم تیتر فاژ پایین خواهد بود. حالت ایده‌ال زمانی است که مدت عمر باکتری‌ها در محیط کشت و مقدار فاژهای عفونی متعادل باشند؛ به گونه‌ای که سلول‌های باکتری همچنان به رشد خود ادامه دهند، اما سرانجام همه آنها عفونی و لیز می‌شوند [٥–۷]. در این تحقیق علاوه بر فاژ لامبدا، از DNAهای پلاسمیدهای pBR322 (٤٣٦١ bp) و pUC18 (٢٦٨٦ bp) استفاده شد که دلیل استفاده از آنها، اندازه کوچک این پلاسمیدها برای تأمین قطعات پایین در نشانگرهای DNA، مشخص بودن نقشه ژنتیکی و در دسترس بودن آنها بود. علاوه بر این پلاسمیدها، برای تأمین قطعات دیگری در نشانگر، از پلاسمیدهای نوترکیب VZV حاوی ژن‌های همانندسازی استفاده گردید. این پلاسمیدها حاوی ناقل pG310 می‌باشند که قطعه‌ای از ژنوم ویروس VZV را در بر دارد [۱۲،۹].

۲– مواد و روش‌ها

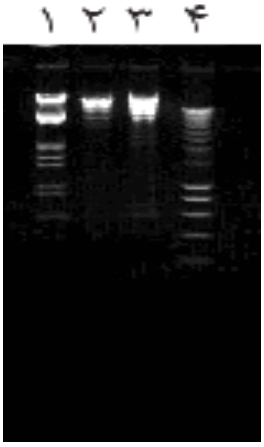
به منظور دستیابی به میزان بالایی از پلاسمیدهای مورد نیاز، باکتری‌های اشرشیاکلی گونه DH5α در محیط LB مایع کشت داده شدند. طی انتقال دادن، این باکتریها در مجاورت DNA پلاسمیدی قرار گرفتند (۲۰ng از DNA پلاسمیدهای Pbr322 و Puc18). محلول باکتری یاد شده با کمک یک پیپت پاستور خم شده و روی ظرف حاوی LB جامد با آنتی‌بیوتیک پخش شد. برای تخلیص پلاسمیدها نیز از روش‌های آماده‌سازی کوچک (Miniprep) و آماده‌سازی بزرگ (Maxiprep) استفاده شد. در ساخت پلاسمیدهای نوترکیب VZV، از ٤ پلاسمید زیر استفاده شد: ۱) پلاسمید

pMS6 که حاوی قطعه‌ای از ژنوم VZV است و پس از هضم با آنزیم EcoR I که فقط یک محل برش در ناقل داشت، تولید باند ۸۰۰۰ bp در نشانگر Sam2 می‌کند. ۲) پلاسمید pMS62، که حاوی ناحیه‌ای از ژنومVZV است و برای تأمین قطعه مورد نظر در طراحی نشانگر Sam2، با آنزیم BamHI هضم گردید و طی آن قطعه bp۱۰۰۰۰ تولید شد. ۳) پلاسمید pMS55 که بخشی از ژنوم ویروس VZV را شامل می‌شود و با داشتن یک محل برش برای آنزیم BamHI در داخل ژن و یک محل دیگر هم در ناقل، تولید دو قطعه bp۵۳۰۰ و bp۲۹۰۰ در نشانگر طراحی شده می‌کند و ٤) پلاسمید pNsiI، که حاوی دو ژن ویروس VZV و یک محل برش BamHI است که با هضم آن، قطعه بزرگی با طول bp۱۳۵۰۰ تولید شد و به منظور طراحی نشانگرهای DNA در این تحقیق، از آن استفاده گردید [۱۲،۹]. در این آزمایش برای کشت باکتریوفاژ لامبدا، از دو گونه مختلف لامبدا استفاده شد: گونه cI857sam7 و EMBL3A که نقشه ژنتیکی آنها نشان داد که بیشتر به عنوان ناقل‌های کلونینگ (Cloning) از آنها استفاده می‌شود. از این رو در بعضی از محل‌های مهم آنزیمی، دچار دستکاری‌هایی شده‌اند؛ مانند محل‌های آنزیمی EcoR I، Sal I و BamHI که طراحی‌های انجام شده برای نشانگر را هم دستخوش تغییر می‌کرد. بعد از کشت باکتریوفاژ لامبدا، تیتری در حدود 10^{10} pfu/ml به‌دست آمد و مراحل استخراج DNA فاژ نیز انجام شد [٦].

۲-۱- ساخت نشانگر λ/Hind III با استفاده از هر دو گونه فاژ لامبدا

هر دو DNA فاژ لامبدا، که با آنزیم Hind III برش داده شدند روی ژل آگارز ۱٪ برده شد، اما چون فاژ EMBL3A دچار تغییراتی در محل‌های آنزیمی خود شده بود (به عنوان ناقل کلونینگ) و مخصوصاً باندهایی پایینی آن (شامل: ۲۳۲۲ و ۲۰۲۷ و ٥٦٤ bp) حذف شده بودند، بنابراین، توجه بیشتر روی گونه CI857sam7 گردید (شکل ۱).

ساخت نشانگر λ /Pst I با استفاده از گونه CI857sam7 DNA فاژ تحت تأثیر آنزیم Pst I قرار گرفت و نتیجه هضم روی ژل ۱٪ آگارز با بافر TAE (Tris-Acetate-EDTA) برده شد.



شکل ۱ هضم دو گونه لامبدا با آنزیم Hind III. ۱) نشانگر DNA (Roche)، ۲) گونه EMBL3A، ۳) گونه CI857sam7، ٤) نشانگر Smart ladder (از ۲۰۰-۱۰۰۰۰ bp)

۲-۲- طراحی دو نشانگر λ/Hind III/BamHI و λ/Hind III/EcoR I با استفاده از هضم‌های دوتایی DNA فاژ لامبدا

DNA فاژ لامبدا تحت تأثیر هضم‌های دوگانه با آنزیم‌های Hind III/BamHI و همچنین با Hind III/EcoR I قرار گرفت.

۲-۳- طراحی و ساخت نشانگر pBR322/Msp I

برای طراحی و ساخت نشانگر pBR322/Msp I واکنش هضم آنزیمی DNA pBR322، با آنزیم Msp I انجام و نتیجه آزمایش روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ برده شد.

۲-٤- طراحی نشانگرهایی ساخته شده از مخلوط چندین هضم آنزیمی بر روی DNAهای پلاسمیدهای VZV، pUC18 و pBR322

به منظور طراحی نشانگرهایی که از طریق مخلوط کردن چندین هضم مختلف بر روی DNAهای پلاسمیدهای pBR322، pUC18 و پلاسمیدهای نوترکیب ویروس به‌دست آمده VZV بود، DNAهای این پلاسمیدها تحت شرایط هضم با آنزیم‌هایی قرار گرفتند که طبق نقشه ژنومی

آنها و با توجه به محل‌های آنزیمی آنها، می‌توانستند قطعات مناسبی را در نشانگر ایجاد کنند. هضم‌های آنزیمی که درطی این طراحی‌ها انجام شد، عبارتند از:

برای پلاسمیدهای pUC18، pBR322: pBR322/ CfrI (قطعات تولید شده ۱۰۴، ۱۳۲، ۴۱۰، ۵۰۵، ۹۰۲ و ۲۳۱۰ bp)، pBR322/Dra I (۱۹، ۶۹۲ و ۳۶۵۰ bp)، pUC18/Pvu I (۸۹۶ و ۱۷۹۰ bp)، pUC18/Pvu II (۳۲۲ و ۲۳۶۴ bp)، pUC18/Dra I (۱۹، ۶۹۲ و ۱۹۷۵ bp) و pUC18/Cfr I (۲۵۷، ۹۸۷ و ۱۴۴۲bp).

همچنین هضم‌هایی که برای پلاسمیدهای نوترکیب VZV طراحی و انجام شد، عبارت بودند از: pUC18-Nsi I/BamHI (۱۳۰۰۰bp)، PMS62/BamHI (۱۰۰۰۰bp)، PMS6/EcoRI (۸۰۰۰ bp) و PMS55/BamHI (۵۳۰۰ و ۲۹۰۰ bp).

۲-۵- طراحی و ساخت نشانگری با نام سم مارکر۱(Sam Marker 1)

بعد از آنالیزهای آنزیمی که روی نقشه ژنتیکی پلاسمیدها انجام گرفت، محصولات هضمی طبق طراحی خاص، برای ساخت نشانگر جدید سم مارکر۱ با هم مخلوط شدند و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TAE برده شد. ضمناً قبل از مخلوط کردن نتایج هضمی، ابتدا آنزیم‌های هر واکنش به‌صورت غیرفعال درآمد.

۲-۶- طراحی و ساخت نشانگری با نام سم مارکر۲(Sam Marker 2)

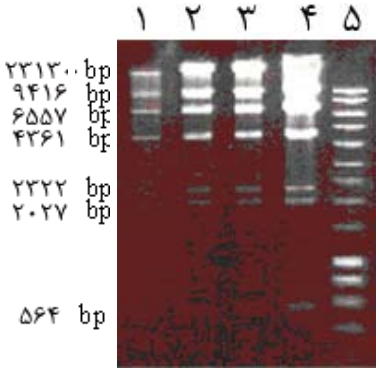
بعد از آنالیزهایی آنزیمی و واکنش‌های هضمی، محصولات هضم طبق طراحی خاصی، برای ساخت نشانگر جدید (سم مارکر۲) با هم مخلوط شدند و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TAE برده شد.

۳- نتایج

بعد از تهیه رقت‌های مختلف از فاژ لامبدا بر روی باکتری اشرشیاکلی پلاک‌ها روی چمن باکتریایی ظاهر شدند که در رقت‌های مختلف، تعداد این پلاک‌ها و تراکم آنها متفاوت بود و با شمارش تعداد پلاک‌ها در سطح ظرف و تقسیم کردن عدد حاصل بر میزان رقت فاژ، میزان pfu (واحد تشکیل پلاک) برای نمونه‌های فاژ لامبدا محاسبه گردید که معادل 10^{12} برای فاژ CI857sam7 و 10^{13} برای فاژ EMBL3A بود. در این تحقیق با استفاده از رقت 10^{13} به حد استاندارد تخلیص رسیده و تقریباً در حدود ۵ میکروگرم بر میکرولیتر، DNA استخراج شد که یکی از بزرگترین دستاوردهای این پژوهش بشمار می‌رود.

۳-۱- نشانگر λ/Hind III

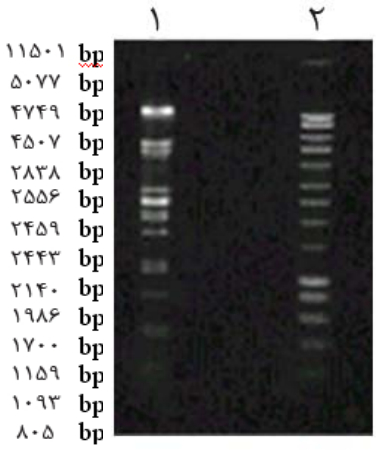
از گونه CI857sam7 برای تهیه این نشانگر استفاده شد. لازم به ذکر می‌باشد که باز نشدن باندهای بالایی در این نشانگر به خاطر الکتروفورز کردن آنها در بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) به جای TAE می‌باشد. در پی بهینه کردن نشانگر λ/Hind III ساخته شده، تلاش محققین برای یافتن بهترین غلظت برای استفاده از این نشانگر بود؛ به همین علت در چهار غلظت متفاوت، هضم آنزیمی انجام و نتایج روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TAE برده شد. با این آزمایش مشخص شد که بهترین غلظت‌هایی که در آنها هم باندهای ضعیف پایینی مشخص شوند و هم کیفیت و حساسیت باندها مناسب باشند، غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکروگرم از DNA فاژی است (شکل ۲).



شکل ۲ غلظت‌های مختلف DNA فاژی برای هضم با آنزیم Hind III ۱)۵، ۲)۱۰، ۳)۱۵، ۴)۲۰ میکروگرم و ردیف ۵) نشانگر Smart ladder

۳-۲- نشانگر λ/Pst I

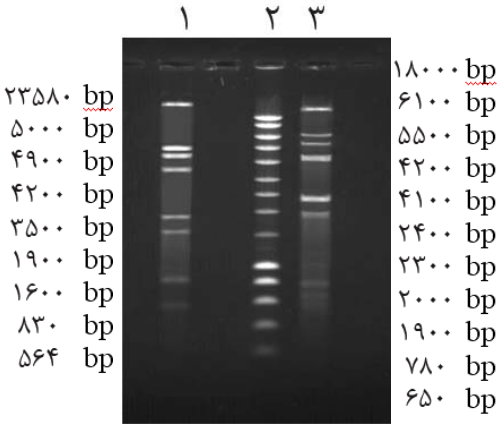
نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با نوع خارجی این نشانگر، از شرکت Fermentas، نشانگر ساخته شده در این تحقیق الگوی کاملاً یکسانی داشته و حتی از نظر کیفیت باندها، از درجه بهتری برخوردار است (شکل ۳).



شکل ۳ هضم λ/Pst I ۱) نشانگر λ/Pst I ساخته شده در این تحقیق، ۲) نشانگر Smart ladder

۳-۳- نشانگرهای λ/Hind III/BamHI و λ/Hind III/ EcoR I

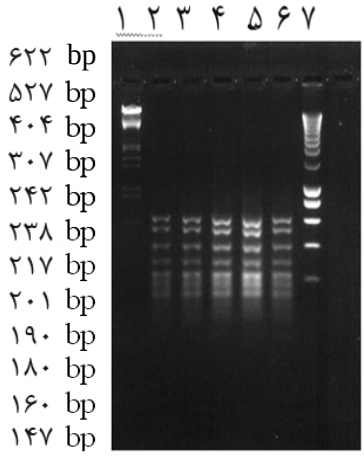
با اینکه الگوی این هضم‌های دوتایی، با آنچه که به صورت تجارتی به وسیله شرکت‌های مختلف خارجی عرضه شده متفاوت بود، ولی می‌تواند به عنوان یک الگوی نشانگری جدید معرفی گردد (شکل ٤).



شکل ٤ هضم‌های دوتایی DNA لامبدا (Over night) ۱) نشانگر ساخته شده λ/Hind III/EcoR I، ۲) نشانگر Smart ladder و۳) نشانگر ساخته شده λ/Hind III/BamHI

۳-٤- نشانگر pBR322/Msp I

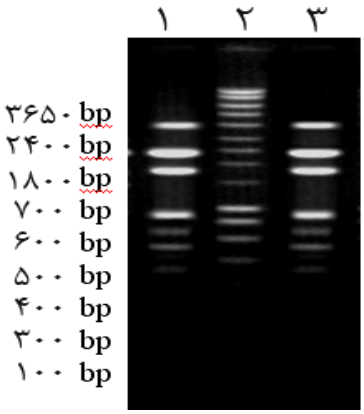
هدف از این آزمایش، علاوه بر مشاهده باندهای نشانگری، که می‌تواند به عنوان یک Ladder زیر bp٦٠٠ معرفی شود، پیدا کردن بهترین غلظت DNA در واکنش‌های هضمی، برای تولید نشانگر پلاسمیدی بود. نتیجه نشان می‌دهد که حتی در غلظت‌های پایین این نشانگر هم، تمام باندها مشخص و واضح هستند (شکل۵).



شکل ۵ نشانگر PBR322/Msp I. ۱) نشانگر DNA ساخت شرکت Roche، غلظت‌های ۲)۵، ۳)۱۰، ٤)۱۵، ۵)۲۰، ٦)۱۲ میکروگرم و ۷) نشانگر Smart ladder (از ۲۰۰-۱۰۰۰۰ bp)

۳-۵- نشانگر جدیدی با نام سم مارکر ۱

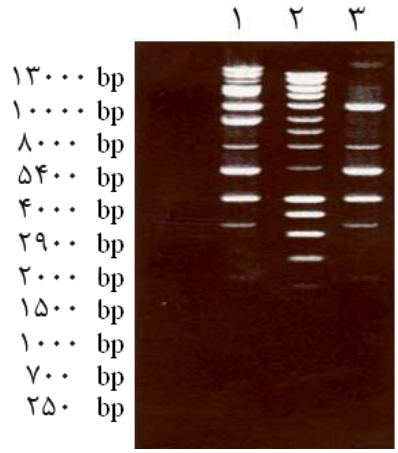
محدوده وزن مولکولی این نشانگر از: ۱۰۰ تا ۳٦٥٠ bp است (شکل٦).



شکل ٦ نشانگر Sam 1. ۱) نشانگر ساخته شده Sam 1 (از ۱۰۰-۳٦٥٠ bp)، ۲) Smart ladder (از ۲۰۰- bp۱۰۰۰۰) و ۳) نشانگر ساخته شده Sam 1 (از ۱۰۰-۳٦٥٠ bp) تکرار آزمایش

۳-٦- نشانگر جدید دیگری با نام سم مارکر۲

محدوده وزن مولکولی این نشانگر از ۲۵۰ تا ۱۳۰۰۰ bp می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷ نشانگر Sam 2. ۱) نشانگر ساخته شده Sam 2 (از ۲۵۰ تا ۱۳۰۰۰bp)، ۲) نشانگر Smart ladder (از ۲۰۰-۱۰۰۰۰ bp) و ۳) نشانگر ساخته شده Sam 2 بدون مخلوط کردن نتایج هضمی پلاسمیدهای VZV

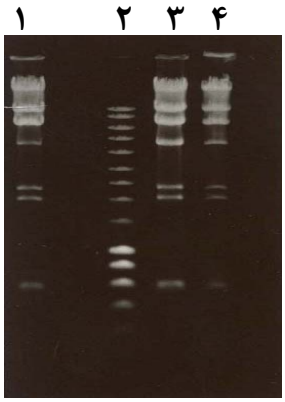
۳-۷- بررسی نشانگر λ/Hind III ساخته شده در دو شرایط حرارت داده شده و بدون حرارت

ژنوم فاژ لامبدا دارای دو انتهای چسبنده COS به اندازه ۱۲ نوکلئوتید می‌باشد که در حالت عادی ممکن است این انتهاها به هم بچسبند و قطعاتی بزرگ و دور از انتظار را تولید کنند، که می‌توان با گرم کردن نمونه‌ها قبل از انتقال آنها روی ژل، این احتمال را از بین برد. ضمناً اگر نمونه λ/Hind III قبل. از الکتروفورز حرارت داده نشود، باند ٤٣٦١ bp به باند ۲۳۱۳۰ bp متصل شده وتشکیل باند سنگین‌تر را در ۲۷٤۹۱ bp می‌دهد که باعث تغییر الگوی نشانگری می‌شود (شکل ۸)

۳-۸- بررسی نشانگر λ/Hind III ساخته شده در شرایط لیوفیلیزاسیون (Lyophilization)

در ادامه بررسی‌های انجام شده روی نشانگر λ/Hind III، ایده لیوفلیزه کردن نشانگرهای DNA مطرح گردید که در پی آن، نشانگرλ/Hind III برای نشان دادن میزان پایداری، تحت شرایط لیوفلیزاسیون قرار گرفت. سپس نمونه برای مدت چند هفته در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا اثر زمان روی نمونه لیوفلیزه شده، بررسی گردد. بعد از گذشت این زمان، نمونه لیوفیلیزه شده در کنار نمونه‌ای که به حالت محلول (غیر لیوفیلیزه شده) بود، الکتروفورز گردید (شکل ۹). نتایج نشان داد گرچه الگوی نشانگری در هر دو یکسان است، ولی از شدت باندها مخصوصاً باند ٥٦٤ و ٤٣٦١ bp کاسته شده است.

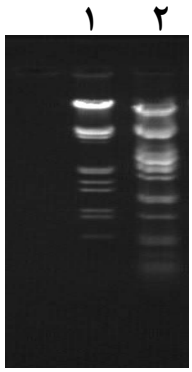
شکل ۸ نشانگر λ/Hind III در دو شرایط حرارت داده شده و حرارت داده نشده.۱) نشانگر حرارت داده نشده، غلظت DNA فاژ ۱۰ μ gr، ۲) نشانگر Smart ladder (از ۲۰۰-۱۰۰۰۰ bp)، ۳) نشانگر حرارت داده شده، غلظت DNA فاژ ۱۰ μ gr و ٤) نشانگر حرارت داده شده. غلظت DNA فاژ ٥ μ gr



شکل ۹ اثر لیوفیلیزاسیون بر روی نشانگر λ/Hind III ساخته شده. ۱) نشانگر لیوفیلیزه شده، ۲) نشانگر Smart ladder، ۳ و ٤) نشانگر لیوفیلیزه نشده

۳-۹- بررسی نشانگر λ/Pst I ساخته شده در دو بافر الکتروفورزی TAE و TBE

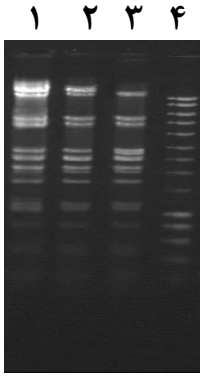
آزمایش نشان داد که در این نشانگر، بافر TBE، به لحاظ قدرت تفکیک باندهای با وزن بالا، موفق نبوده و بهتر است که به جای آن از بافر TAE استفاده گردد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰ الکتروفورز نشانگر λ/Pst I در بافر TBE. ۱) نشانگر ساخت شرکت Roche و ۲) نشانگر λ/Pst I ساخته شده

۳-۱۰- بررسی نشانگر λ/Pst I ساخته شده در دو شرایط حرارت داده شده و بدون حرارت

این نشانگر نیز مانند نشانگر λ/Hind III، بعد از هضم تحت حرارت قرار گرفت و با نمونه‌ای که حرارت داده نشده بود، مقایسه و مشخص شد که اگر نمونه نشانگر λ/Pst I، قبل از الکتروفورز به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرار نگیرد، ممکن است باندهای ۲۵۵٦ و ۱۱۵۰۱ bp به هم متصل شده و یک باند اضافی را در ۱٤۰۵۷ bp تشکیل دهد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱ نشانگر λ/Pst I ۱ و۲) حرارت داده نشده، ۳) حرارت داده شده، ٤) نشانگر Smart ladder

٤- بحث

اساس کار ساخت نشانگرهای DNA، بعد از استخراج و تخلیص DNA مناسب، آنالیز آنزیم‌های برش‌گر محدود کننده‌ای است که در پی طراحی‌های هضم آنزیمی می‌توان به قطعات دلخواه و مناسب نشانگرها دست یافت. بدیهی است که اولین مرحله، یعنی استخراج DNA مناسب و تخلیص آن، نیاز به روش‌های خاص دارد؛ مخصوصاً برای تهیه نشانگرهای فاژ لامبدا، به‌دست آوردن تیتر مناسب برای استخراج DNA، کار دقیق و مشکلی است. تلاش محققین در جهت یافتن تیتر ایده‌ال، منجر به تولید بالاترین میزان فاژ، حتی بالاتر از میزان معمولی و استاندارد ($۱۰^{۹}$) بود. تیتری که در این آزمایش به‌دست آمد $۱۰^{۱۲}$ تا $۱۰^{۱۳}$ برای هر دو گونه فاژ لامبدا بود. در این آزمایش، غلظتی که از DNAهای فاژی حاصل شد، برای هر دو فاژ، بسیار بالا و در حد ٤/٥ تا ٥ میکروگرم بر میکرولیتر بود.

بعد از اتمام مراحل استخراج DNA، برای تولید نشانگرهای لامبدا، مورد هضم با آنزیم‌های مختلف قرار گرفت. دلیل استفاده از این آنزیم‌ها، موجود بودن نشانگرهای حاصل از هضم آنها در شرکت‌های مختلف خارجی بود که باعث ترغیب در تولید این نشانگرها گردید. همچنین آنها از نوع نشانگرهایی بودند که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما الگوی هضم λ/EcoR I و λ/BamH I با الگوی نشانگرهای تجارتی یکسان نبود که علت آن متفاوت بودن ژنوم گونه‌های لامبدا کار شده با گونه لامبدا شرکت‌های تجارتی بود. ولی با انجام هضم‌های دوتایی λ/Hind III/EcoR I و λ/Hind III/BamH I که روی گونه CI857sam7 صورت گرفت، قطعاتی روی نشانگر به‌دست آمد که گرچه با نوع تجارتی آن متفاوت بود، ولی خود به عنوان یک نشانگر منحصر به فرد می‌توانست معرفی و استفاده شود. در نظر گرفتن نوع بافر الکتروفورز نیز بسیار مهم بود؛ چون که با استفاده ازبافر TBE، مشخص شد که باندها، مخصوصاً باندهای بالای bp٤۰۰۰ به خوبی از هم جدا نشده و به صورت تقریباً به هم چسبیده در بالای ژل می‌مانند. بنابراین، در صورت استفاده از بافر TAE، این باندها به خوبی از هم جدا شده و قدرت تفکیک مناسبی ایجاد می‌کنند.

نکته دیگری که قبل از الکتروفورز کردن نشانگرهای لامبدا مورد توجه قرار گرفت، شرایط حرارت دادن این نشانگرها بود. چون ژنوم فاژ لامبدا دارای دو انتهای آزاد چسبنده با اندازه bp۱۲ است، در شرایط عادی امکان چسبیدن این انتهاها به هم و ایجاد قطعه بزرگتر وجود دارد. برای جلوگیری از این احتمال، بهتر است نشانگرهای لامبدا قبل از الکتروفورز تحت شرایط گرمایی قرار گیرند [۱۱]. در این تحقیق، همچنین شرایط لیوفیلیزاسیون برای هضم λ/Hind III انجام گرفت که هدف از این کار نشان دادن پایداری DNA بعد از لیوفیلیزه کردن آن بود.

نمونه لیوفیلیزه شده به مدت چند هفته در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری و سپس الکتروفورز گردید. لازم به توضیح است با اینکه در روی ژل، الگوی نشانگری تغییر نکرده بود، ولی در این حالت از شدت باندها کاسته شده بود که این امر نشان دهنده مزیت استفاده از بافرهای محلول را ثابت می‌کند. علت استفاده از پلاسمیدهای pUC18 و pBR322 در مورد نشانگرهای پلاسمیدی طراحی شده در این تحقیق در دسترس بودن آنها در آزمایشگاه، مشخص بودن نقشه ژنتیکی و محل‌های آنزیمی‌شان، همچنین کوچک بودن اندازه آنها برای تأمین قطعات کوچک در نشانگرهای طراحی شده بود. ضمناً دلیل استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب VZV، نیز علاوه بر دلایل یاد شده، تأمین قطعات بزرگ در نشانگرهای طراحی شده بود. در این تحقیق ۷ نشانگر ساخته شد که سه عدد از آنها مشابه خارجی دارند ولی چهارتای دیگر برای اولین بار تولید شد که از نظر کاربرد، طیف وسیعی را شامل می‌شوند.

۵- منابع

[1] Mattews R. Classification and Nomenculture of Viruses. Intervirology 1982; 17: 1-200.

[2] Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG. Biology of the Prokaryotes. 1st ed., Germany, Blackwell science Ltd, 1999; p: 355-6.

[3] Ptashne M. Lambda phage and higher organisms. 2nd ed. 1992.

[4] Ausubel FM, Brent R. Short protocols in molecular biology. 3nd ed., New York, Johon Wiley & Sons, 1995.

[5] Cann AJ(ed.). Principles of molcular virology. 2nd ed., Chapter 2. Academic Press, 1997.

[6] Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T (ed.) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., New York, Cold Spring Hharboratory Press, 1989.

[7] Bruce A, Lewis JA, Roberts RM, Walter P. (ed.). Molecular Biology of the cell, 4th ed., Garland Science, 2002.

[8] Davison AJ, Scott JE. Molcular cloning of theVaricella Zoster Virus genome and derivation of six restriction endonucleasemaps. J GenViro 1983; l (64): 1811-4.

[9] Perera LP, Mosca JD, Sadeghi-Zadeh M, Ruyechan WT, Hay J. The Varicella-zoster Virus immediate early protein, IE62, compositively regulate its cognate promoter. J Virol 1992; 191: 346-54.

[10] Snyder L, Champness W. Molecular genetics of bacteria. Washington, D.C ASM Press, 1997; P: 105-20.

[11] Dale JW. Molecular Genetics of Bacteria, 2nd ed., Chichester, NY, Brisbone, Toronto, Singapore, 1994; P: 133-61.

[12] Sabella C, Lowry PW, Abbruzzi GM, Koropchak CM, Kinchington M, Sadighi-Zadeh M, Hay J, Ruyechan WT, Arvin AM. Immunization with the immediate-early tegument protein (open reading frame 62) of varicella-zoster virus protects Guinea Pigs against virus challenge. J Virol 1993; 67(12): 7673-6.