Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Winter2013;5(4): 831-836

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
زمستان ۱۳۹۲؛۵(۴): ۸۳۶-۸۳۱

مقاله پژوهشی

بهینه سازی محصول PCRتوالی پروموترغنی ازC+G ژن انسانی Astrocyte elevated gene -1

نادر منصور سمائی[۱]، ملیحه نادری[۲]، حمیده خواجه[۳]، نگار مرادی‌پور[۴]، نغمه قلی‌پور[۵]، پرستو ضرغامی مقدم[۶]*

[۱]استادیار ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
[۲]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ۳۶۴- ۳۷۱۸۵، ایران.
[۳]کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
[۴]کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه زابل، ایران، زابل، ایران.
[۵]دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، مرکز ژنتیک مولکولی، تهران، ایران.
[۶]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.
***نویسنده مسئول**: دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران.
پست الکترونیک : ngholipour@nigeb.ac.ir

وصول:۹۲/۷/۲۷ اصلاح: ۹۲/۱۰/۲۸ پذیرش:۹۲/۱۱/۶

چکیده

زمینه و هدف: *اکثر ژن‌های خانه‌دار، سرکوبگر تومور، و تقریبا ۴۰٪ ژن‌های اختصاصی بافت‌ها حاوی توالی غنی از C+G در نواحی پروموتری خود می‌باشند که تکثیر آن با مشکلات زیادی همراه است. ژن Astrocyte elevated gene -1(AEG-1) دارای نقش عملکردی در چندین مرحله از پیشرفت تومور از جمله، ترانسفورماسیون، آپوپتوزیس، متاستاز، مقاومت به شیمی درمانی، رگزایی و پیری سلول می‌باشد.*

مواد و روش کار: *این مطالعه، به بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR) برای تکثیر موفق ۴۹۵ bp از پروموتر ژن AEG-1، دارای محتوی >۷۰٪G+C و جایگاه اتصال چندین فاکتور رونویسی در بیماران مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما پرداخته است.*

یافته ها: *یافته‌ها نشان می‌دهد استفاده از CO-Amplification، DMSO به همراه برنامه Touch down PCR و آنزیم pfu در تخریب ساختارهای ثانویه توالی‌های DNA و افزایش محصول واکنش موثر می‌باشد.*

نتیجه گیری: *این روش می تواند برای تکثیر دیگر نواحی غنی از G+C نیز مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی: *توالی غنی ازG+C- نواحی پروموتری-PCR - ژن Astrocyte elevated gene -1*

مقدمه

AEG-1 یک پروتوآنکوژن است که در ناحیه 8q22 قرار داشته و دارای ۱۲ اگزون و ۱۱ اینترون می‌باشد. این ژن دارای نقش عملکردی در چندین مرحله از پیشرفت تومور از جمله، ترانسفورماسیون، آپوپتوزیس، متاستاز، مقاومت به شیمی درمانی، رگزایی، پیری سلول و فعالسازی سیگنال‌های مرتبط با سرطان می‌باشد [۱،۲،۳،۴]. آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داده که پروموتور AEG-1 (۲۷۱۰-/۴۹+) دارای جعبه‌های TATA و CAAT نمی‌باشد، اما دارای چندین موتیف اتصال Sp1 و CG بالا می‌باشد. حضور چندین جایگاه شروع رونویسی، چندین جایگاه اتصال به SP1 و محتوی بالای CG در چندین پروموتور دیگر فاقد TATA مشاهده شده است [۵]. از آنجائی که مطالعات مختلف افزایش بیان آن را در بسیاری از سرطان‌ها، از جمله هپاتوسلولار کارسینوما گزارش داده اند، مطالعه توالی پروموتوری این ژن که در ارتباط مستقیم با بیان آن می‌باشد را ضروری می‌نماید. در ضمن توالی مورد بررسی در این مطالعه همچون دیگر توالی‌های پروموتوری، دارای ۷۷.۲۳٪ CG می‌باشد. تکثیر نواحی غنی از GC پروموتوری با استفاده از هر کدام از انواع PCR

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

معمولا کار دشواری است و با وجود توسعه روش‌ها و متدهای اصلاح شده، این نوع از تکثیر هنوز ناشناخته باقی مانده است. یکی از مشکلات مشاهده شده با تکثیر DNA غنی از GC، محدودیت تکثیر الگو به علت ایجاد ساختارهای ثانویه پایدار است که موجب متوقف شدن یا کاهش پیشرفت DNA پلیمراز می‌شود. ممانعت ایجاد شده توسط ساختارهای ثانویه در اتصال درست پرایمر به توالی هدف می‌باشد مشکل دوم است که موجب کاهش محصول PCR می‌شود و در صورت حضور جایگاه‌های ثانویه اتصال پرایمر؛ افزایش باندهای غیر اختصاصی مشاهده می‌شود [۶]. با توجه به موارد اشاره شده در بالا با استفاده از روش‌های معمول PCR و به کار بردن ژل آگارز برای تایید محصول معمولا باندی مشاهده نمی‌شود و یا به علت کمرنگ بودن قابل مشاهده نمی‌باشد.

روش کار

بافت‌های پارافینه موجود در آرشیو بخش‌های آسیب شناسی منبع بسیار غنی از نمونه‌های انسانی برای مطالعه مولکولی برای بیماری‌هایی همچون سرطان می‌باشد. در این مطالعه نیز به دلیل در دسترس نبودن بافت تازه از ۵۰ نمونه پارافینه بافت تومور مربوط به بیماران مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما استفاده شد. برای حذف پارافین نمونه‌ها سه مرحله با زایلن ۱۰۰٪ شستشو شدند.

و برای حذف باقیمانده زایلن نمونه‌ها ۵ بار به دنبال هم با درصدهای مختلف الکل شسته شدند. در مرحله بعد بافت لیز شده و استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم صورت پذیرفت [۷] .

پرایمرها با استفاده از نرم افزار primer 3 طراحی شد (جدول ۱).

به طور کلی DNA تکثیر شده از توالی‌های غنی از GC از طریق PCR بسیار ناچیز است. بنابراین وقتی PCR به روش معمول انجام شد باند مشخصی دیده نشد. برای رفع این مشکل ابتدا از Co-amplificationهای مختلف از جمله، گلیسرول، بتائین Dimethyl sulfoxide (DMSO) و Tween20 با مقادیر مختلف استفاده شد (جدول۲).

با توجه به اینکه بهترین باند مربوط به میکروتیوپ حاوی DMSO بود، گرادیانتی با غلظت‌های مختلف این ماده گذاشته شد. درادامه از DNA پلیمرازهای pfu و taq به تنهایی و در ترکیب با هم استفاده شد. برای تکثیر قطعه مورد نظر ازTouch down PCR استفاده شد (جدول۳).

برای مشاهده تغییرات به وجود آمده در محصول پس از تغییر واکنش‌گرهای و Co-amplificationهای مختلف ابتدا از ژل آگارز استفاده شد ولی قدرت تفکیک این ژل کافی نبود و این مشکل با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید حل شد.

در ادامه برای تایید بیشتر نتایج حاصل شده از نمونه‌های بافتی، آزمایشی با مقادیر و مراحل مشابه بر روی نمونه-های خون انجام شد.

یافته ها

در طرح ریزی برنامه PCR برای قطعات غنی از GC باید از زمان دناتوراسیون طولانی تری استفاده کرد که به علت بالا بودن درصد GC و استحکام پیوندهای هیدرژنی دناتوراسیون در زمان کوتاه امکان پذیر نمی‌باشد. زمان دناتوراسیون اولیه برای قطعات دارای GC ۵۰٪ یا پائین‌تر برابر ۳ دقیقه می‌باشد، درحالیکه این زمان برای پروموتور ژن AEG-1 به دلیل استحکام بالای پیوندهای هیدروژنی ۷ دقیقه بالاتر از زمان معمول و برابر ۱۰ دقیقه است که در زمان پائین‌تر به دلیل باز نشدن دو رشته از یکدیگر محصولی حاصل نمی‌شود. در این مطالعه از Touch down PCRاستفاده شد که در آن دمای آنلینگ از دمای بالاتر شروع شده، به تدریج کاهش یافته که موجب کاهش محصولات کاذب و پرایمر دایمر شده است. بهترین Co-amplification برای تکثیر قطعه مورد نظر DMSO بوده است، برای دستیابی به بهترین غلظت گرادیانتی از غلظت های مختلف این ماده در تیوب‌های PCR گذاشته شد که بهترین تکثیر در غلظت ۵٪ در ۲۵ میکرولیتر واکنش گر PCR محاسبه گردیده است. در این مطالعه از خاصیت تصحیح بالای pfu در ترکیب با سرعت زیاد taq استفاده شد، نسبت یک به سه pfu و taq بهترین باند را نشان داد. به دلیل مصرف زیاد نوکلئوتیدهای G و C توسط DNA پلیمراز در هر میکروتیوپ، dNTP مصرفی برای این توالی ۱ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واکنش گر PCR بوده که دو برابر میزان مصرف برای تکثیر یک قطعه با میزان GC نرمال (۰/۵ میکرولیتر در

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

جدول۱: توالی پرایمر

توالی پرایمر	درصد GC	Tm	تعداد نوکلئوتید	
GAAGGCGTCCACCAATTAAC	۵۰	۵۹/۴۳	۲۰	ForwardPrimer
CGGAGACGCAGTGGAATAGT	۵۵	۶۰/۲۸	۲۰	ReversePrimer

جدول۲: مقادیر مختلف Co-amplification

Co-amplification	DMSO	Tween20	گلیسرول	بتائین
درصد مصرف در کل محلول واکنشگر PCR	٪۷	٪۷	٪۱۰	٪۱۶

جدول۳: برنامه Touch down PCR

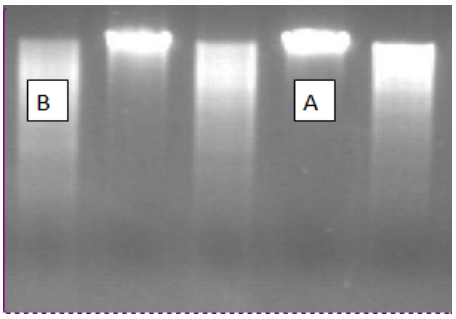
سیکل	دما	زمان
۱	۹۶ درجه	۷ دقیقه
۲	۹۴ درجه	۱ دقیقه
۳	از ۶۰ تا ۵۲ درجه، یک درجه یک درجه کاهش دما (هر درجه ۲ بار تکرار)	۴۵ ثانیه
۴	۷۲ درجه	۱ دقیقه
۵	۱۵ بار تکرار در دمای آنیلینگ ۵۲ درجه	
۶	دمای ۷۲ درجه برای تکثیر پایانی	۵ دقیقه

جدول ۴: مواد لازم واکنش PCR پروموتر ژن AEG-1

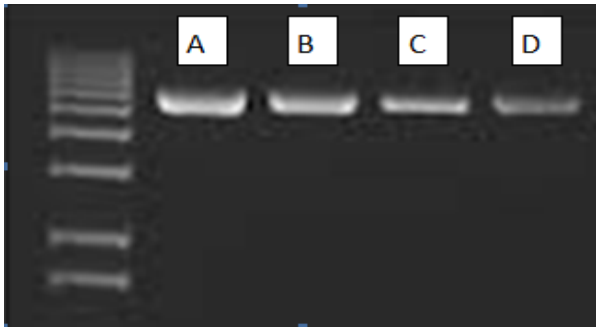
ترکیبات واکنش	غلظت	مقدار
PCR buffer	۱۰x	۰/۵µl
Mgcl2	۲۵mM	۱/۵µl
dNTP	۱۰mM	۱µl
Taq DNA polymerase	۴/۵Unit	۰/۴۵µl
Pfu DNA polymerase	۱/۵Unit	۰/۱۵µl
Primer R	۱۰lpmo	۰/۵µl
Primer F	۱۰lPmo	۰/۵µl
DMSO	٪۱۰۰	۱/۴
DNA Sample	-	۲µl
حجم نهایی		۲۵µl

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

شکل۱: مقایسه DNA استخراج شده از خون و بافت به صورت یک در میان (A) DNA حاصل از خون (B) DNA تخریب شده حاصل از بافت



شکل۲: تکثیر پروموتر ژن AEG-1 پس از بهینه سازی. (A&B) تکثیرDNA حاصل از خون (D&C) تکثیر DNAحاصل از بافت



حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واکنش گر) است، علت این امر را می‌توان به در صد بالای CG این گونه توالی‌ها مرتبط دانست. کلیه موارد انجام شده در بالا موجب افزایش میزان محصول شده ولی این افزایش محصول روی ژل آگارز محسوس نبوده، بنابراین در کلیه موارد بهینه سازی از ژل پلی آکریلامید۶٪ استفاده شد چون دارای حساسیت بالاتری نسبت به آگارز می‌باشد. در انتهای آزمایش با در نظر گرفتن همه موارد ذکر شده، باند حاصل از قطعه مورد نظر به اندازه کافی افزایش یافت و روی ژل آگارز قابل مشاهده گردید (شکل ۲).

در ادامه کار PCR نمونه‌های خونی که برای تایید روش بهینه سازی شده جمع آوری شده بود، با روش و مقادیر کاملا مشابه تکثیر گردید. تکثیر نمونه‌های خون به مراتب بهتر از بافت صورت پذیرفت، این امر را می‌توان با آسیب و شکستن DNA در مراحل مختلف تثبیت در بافت پارافینه مرتبط دانست (شکل۱). همانطور که در شکل مشاهده شد DNA حاصل از بافت به دلیل شکسته بودن در چاهک باقی نمی‌ماند و به سمت پایین حرکت می‌کند ولی DNA حاصل از خون به دلیل اندازه بزرگ نمی‌تواند از چاهک خارج شود.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

بحث

تکثیر نواحی غنی از GC نیاز به صرف وقت و تلاش زیاد برای بهینه سازی دارد. Co-activatorهای مختلف مانند DMSO [۸]، فرمآمید [۹] گلیسرول [۱۰] و بتائین [۱۱] برای تکثیر نواحی غنی از GC و حذف باندهای اضافی و دستیابی به تکثیر اختصاصی لازم است. اما این افزودنی ها تاثیرات مشابهی ندارند، به همین دلیل برای تکثیر قطعات مختلف از مواد مختلفی استفاده می‌شود [۱۲]. در این مطالعه از افزودنی‌های مختلف نظیر tween-20، گلیسرول، بتائین و DMSO در غلظت‌های مختلف استفاده شده و بیشترین میزان تکثیر با افزودن ٪۷ DMSO حاصل شد. در این مطالعه همچنین از ترکیب دو آنزیم taq و pfu استفاده شده که taq سرعت تکثیر را بالا برده و pfu خطاهای تکثیر را پائین می‌آورد، درضمن روش towch down PCR بر اختصاصیت محصول می‌افزوید.

نتیجه‌گیری

از آزمایشات انجام شده روی نمونه‌های خون و بافتی این نتیجه حاصل گردید، که کار با نمونه‌های خون تازه به مراتب بهتر و آسانتر از نمونه‌های پارافینه آرشیوی می-باشد. علاوه بر آن تاثیر مهم coamplificationها در باز کردن پیوندهای هیدروژنی DNA الگو برای شروع PCRبه خوبی آشکار گردید. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که بهترین برنامه PCR برای تکثیر توالیهای غنی از GC، Touch down PCR می‌باشد که به خوبی از عهده تکثیر اینگونه توالی‌ها برآمده است و تا حد زیادی موجب افزایش محصول گردیده است. از دیگر موارد که باید مدنظر قرار داد، استفاده از میزان بهینه واکنش گرهای PCR از جمله dNTPها، DNA پلیمراز taq و pfu و $Mgcl_2$ می‌باشد. بنابراین در شروع تکثیر توالی‌های DNA از طریق PCR بهتر است در ابتدا درصد GC آنها مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه دوستانی که در این طرح همکاری داشتند و همچنین دانشگاه علوم پزشکی گلستان و خانواده‌های بیماران نهایت تشکر را دارند. نیمی از اعتبار این طرح تحقیقاتی(شماره طرح: ۹۲۱۰۱۷۱۶۲) از دانشگاه علوم پزشکی گلستان تامین گردیده است.

References

1. Yoo B. K., Emdad L., Lee S. G., Su Z. Z., Santhekadur P., Chen D., “et al”, 2011, Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology, Pharmacol Ther, 130(1), 1-8.
2. Hu, G., Wei, Y. and Kang Y, 2009, The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression, Clin Cancer Res, 15(18): 5615-5620.
3. Emdad L., Sarkar D., Su Z. Z., Lee S. G., Kang D. C., Bruce J. N., “et al”, 2007, Astrocyte elevated gene-1: recent insights into a novel gene involved in tumor progression, metastasis and neurodegeneration, Pharmacol Ther, 114(2):155-170.
4. Brown D. M., and Ruoslahti E, 2004, Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis, Cancer Cell, 5(4): 365-374.
5. Lee S. G., Su Z. Z., Emdad L., Sarkar D., and Fisher P. B, 2006, Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is a target gene of oncogenic Ha-ras requiring phosphatidylinositol 3-kinase and c-Myc. Proc Natl Acad Sci USA, 103(46):17390-17395.
6. F. Hubé P. Reverdiau S. Iochmann and Y, Gruel,Improved PCR Method for Amplification of GC-Rich DNA Sequences(2005),Molecular Biotechnology Volume 31:81-84.
7. Pikor L. A., Enfield K. S. S., Cameron H. & Lam W. L, 2011, DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses, J Vis Exp(49), e2763.
8. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I, Betaine, dimethyl sulfoxide and 7-Deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences, J Mol Diagn 2006;8(5):544-550.
9. Ralser M, Querfurth R, Warnatz HJ, Lehrach H, Yaspo ML, Krobitsch S, An efficient and economic enhancer mix for PCR, Biochem Biophys Res Commun 2006;347(3):747-751.
10. Wei M, Deng J, Feng K, Yu B, Chen Y, Universal method facilitating the amplification

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA, Anal Chem 2010;82(14):6303-6307.

11. Sahdev S, Saini S, Tiwari P, Sexena S, Saini KS, Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions, Mol Cell Probs 2007;21(4):303-307.

12. Zhang Z, Yang X, Meng l, Liu F, Shen C, Yang W, Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents, Biotechniques 2009;47(3):775-779.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]

Original Article

Optimization PCR product of GC rich astrocyted elevated gene 1 promoter

samaei NM[1], Naderi M[2] ,khajeh H[3], moradipour N[4], gholipour N [5],Zarghami Moghaddam P[6]*

[1]Department of human Genetics , Faculty of Medicine , Golestan university of Medical sciences , Gorgan, Iran.
[2]Department of Microbiology,Qom branch,Islamic Azad University,Qom 37185-364,Iran .
[3] department of biology, Institute of Biotechnology Research, University of Zabol, Zabol, Iran.
[4]University of Zabol, faculty of sciences, department of biology, zabol, Iran.
[5] PHD student of molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, department of molecular genetic, Tehran, Iran.
[6]Department of Microbiology,North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.

***Corresponding Author**: PHD student of molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, tehran, Iran.
Email: ngholipour@nigeb.ac.ir

Abstract

Background and Objectives: *Most housekeeping genes, tumor-suppressor genes, and approx 40% of tissue specific genes contain G+C sequences in their promoter region that are very difficult to amplify. AEG-1 plays a significant role in invasion, metastasis, angiogenesis and chemoresistance, apoptosis, angiogenesis and aging*

Material and Methods:*In this study, we proposed an improved polymerase chain reaction (PCR) method to be used for successful amplification of the Astrocyte elevated gene -1gene promoter region that contains >70% G+C content in a sequence of 495 bp and some transcription initiation sites in hepatocellularcarcinoma patient.*

Results: *The results showed that using of DMSO co-amplification; touchdown PCR and pfu enzyme can inhibit the formation of secondary structure in DNA Sequences and increase the PCR product.*

Conclusion: *Therefore, this method can be recommended to amplify other GC-rich genomic templates.*

Key words*: GC-rich sequences; PCR; promoter region; Astrocyte elevated gene -1.*

Submitted:19 Oct 2013
Revised:18 Jan 2014
Accepted: 26 Jan 2014

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-08-01]