

مقاله پژوهشی

بهینه سازی محصول PCR توالی پروموتور غنی از C+G ژن انسانی Astrocyte elevated gene -1

نادر منصور سمائی^۱، ملیحه نادری^۲، حمیده خواجه^۳، نگار مرادی پور^۴، نغمه قلی پور^۵، پرستو ضرغامی مقدم^۶

^۱استادیار ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
^۲کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ۳۶۴-۳۷۱۸۵، ایران.
^۳کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
^۴کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه زابل، ایران، زابل، ایران.
^۵دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، مرکز ژنتیک مولکولی، تهران، ایران.
^۶کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.
^{*}نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، 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 ژن های خانه دار، سرکوبگر تومور، و تقریباً ۴۰٪ ژن های اختصاصی بافت ها حاوی توالی غنی از C+G در نواحی پروموتوری خود می باشند 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 می باشد.

مواد و روش کار: این مطالعه، به بهینه سازی واکنش زنجیرهای پلیمر (PCR) برای تکثیر موفق ۴۹۵ bp از پروموتور ژن *AEG-1* دارای محتوی $G+C > 70\%$ و جایگاه اتصال چندین فاکتور رونویسی در بیماران مبتلا به هیپاتوسلولار کارسینوما پرداخته است.
یافته ها: یافته ها نشان می دهد استفاده از *CO-Amplification*، *DMSO* به همراه برنامه *Touch down PCR* و آنزیم *pfu* در تخریب ساختارهای ثانویه توالی های DNA و افزایش محصول واکنش موثر می باشد.

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

واژه های کلیدی: توالی غنی از C+G- نواحی پروموتوری-PCR- ژن *Astrocyte elevated gene -1*

مقدمه

باشد. 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 سرطان ها، از جمله هیپاتوسلولار کارسینوما گزارش داده اند، مطالعه توالی پروموتوری این ژن که در ارتباط مستقیم با بیان آن می باشد را ضروری می نماید. در ضمن توالی مورد بررسی در این مطالعه همچون دیگر توالی های پروموتوری، دارای ۷۷.۲۳٪ CG می باشد. تکثیر نواحی غنی از GC پروموتوری با استفاده از هر کدام از انواع PCR

AEG-1 یک پروتوآنکوژن است که در ناحیه 8q22 قرار داشته و دارای ۱۲ اگزون و ۱۱ اینترون می باشد. این ژن دارای نقش عملکردی در چندین مرحله از پیشرفت تومور از جمله، ترانسفورماسیون، آپوپتوزیس، متاستاز، مقاومت به شیمی درمانی، رگزایی، پیری سلول و فعال سازی سیگنال های مرتبط با سرطان می باشد [۱،۲،۳،۴]. آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داده که پروموتور AEG-1 (۲۷۱۰-۴۹۰+) دارای جعبه های TATA و CAAT نمی باشد، اما دارای چندین موتیف اتصال Sp1 و CG بالا می-

گذاشته شد. در ادامه از DNA پلیمرزهای pfu و taq به تنهایی و در ترکیب با هم استفاده شد. برای تکثیر قطعه مورد نظر از Touch down PCR استفاده شد (جدول ۳). برای مشاهده تغییرات به وجود آمده در محصول پس از تغییر واکنش‌گرهای و Co-amplification های مختلف ابتدا از ژل آگارز استفاده شد ولی قدرت تفکیک این ژل کافی نبود و این مشکل با استفاده از ژل پلی‌آکرلامید حل شد.

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

یافته‌ها

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 هیدروژنی 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 PCR استفاده 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 غلظت‌های 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 پلیمرز 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 (۵۰٪) میکرولیتر در

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 پلیمرز 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 معمولاً 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-amplification های مختلف از جمله، گلیسرول، بتائین Dimethyl sulfoxide (DMSO) و Tween20 با مقادیر مختلف استفاده شد (جدول ۲).

با توجه به اینکه بهترین باند مربوط به میکروتیوپ حاوی DMSO بود، گرادیانتی با غلظت‌های مختلف این ماده

جدول ۱: توالی پرایمر

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

جدول ۲: مقادیر مختلف Co-amplification

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

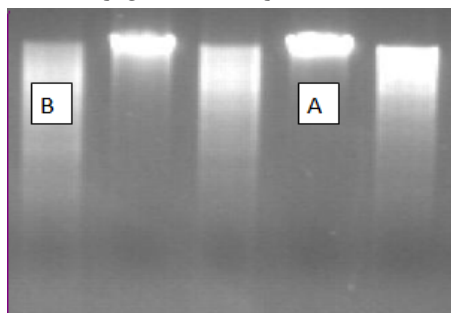
جدول ۳: برنامه Touch down PCR

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

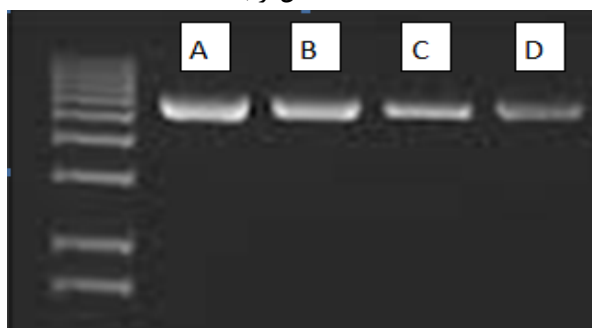
جدول ۴: مواد لازم واکنش PCR پروموتور ژن AEG-1

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	۱۰Ipmo	۰/۵μl
Primer F	۱۰Ipmo	۰/۵μl
DMSO	٪۱۰۰	۱/۴
DNA Sample	-	۲μl
حجم نهایی		۲۵μl

شکل ۱: 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



شکل ۲: تکثیر پروموتور ژن AEG-1 پس از بهینه سازی. (A&B) تکثیر DNA حاصل از خون (D&C) تکثیر DNA حاصل از بافت



در ادامه کار PCR نمونه‌های خونی که برای تایید روش بهینه سازی شده جمع آوری شده بود، با روش و مقادیر کاملاً 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 (شکل ۱). 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.

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 آکرلامید ۶٪ 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).

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 افزودنی‌ها تأثیرات 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 می‌افزود.

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 می‌باشد. علاوه بر آن تأثیر مهم coamplificationها در باز کردن پیوندهای هیدروژنی DNA الگو برای شروع PCR به 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, Krobisch 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

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.

Original Article

Optimization PCR product of GC rich astrocyte elevated gene 1 promoter

samaei NM¹, Naderi M², khajeh H³, moradipour N⁴, gholipour N^{5*}, Zarghami Moghaddam P⁶

¹Department of human Genetics , Faculty of Medicine , Golestan university of Medical sciences , Gorgan, Iran.

²Department 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.

⁶Department 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 -1 gene promoter region that contains >70% G+C content in a sequence of 495 bp and some transcription initiation sites in hepatocellular carcinoma 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