

معرفی یک دستگاه کاربردی برای تخلیص ژن از ژل آگارز: خالص سازی و همسانه سازی ژن *HMGR* از جنسینگ آمریکایی

Introduction of an applied device for DNA purification from Agarose gel: purification and cloning of *HMGR* gene from American ginseng plant

کزوان ساعد موچشی^۱، علی ایزدی دربندی^{۱*}، نامجو ساعد موچشی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- دانشجوی کارشناسی، اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

Saaed Mocheshi KS¹, Izadi Darbandi A^{*1}, Saaed Mocheshi N²

1- Master of Biotechnology, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences of University of Tehran - Abureyhan Campus

2- Bachelor of Plant breeding Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences of University of Kurdistan- Faculty of Agriculture

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aizady@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

به منظور همسانه سازی ژن، ابتدا باید ژن مورد نظر از سایر آلودگی ها (پروتئین، باندهای غیر تخصصی و پرایمردایمرها و ...) جدا شود. خالص سازی ژن مورد نظر از سایر آلودگی های با روش های شیمیایی و فیزیکی مختلفی قابل انجام است. در این پژوهش برای اولین بار، ژن هدف موجود در بافر TAE.1X با استفاده از یک روش فیزیکی با کمک میدان الکتریکی جداسازی شد. ژن *PqHMGR* (FJ755158.1) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از توالی های cDNA گیاه جنسینگ (*Panax quinquefolius*) توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز تکثیر شد. الحاق ژن خالص سازی شده به پلاسمید حامل PTG-19 و همسانه سازی آن در باکتری *E.coli* سویه DH5α با موفقیت انجام شد. در نهایت ژن *PqHMGR* توسط دستگاه و روش معرفی شده به خوبی خالص سازی و همسانه سازی شد و پلاسمید نو ترکیب، به منظور تأیید موفق بودن همسانه سازی توالی یابی شد.

واژه های کلیدی

ژل آگارز
خالص سازی ژن از ژل
PqHMGR

به منظور اتصال ژن به پلاسمید در فرایند همسانه سازی، ابتدا باید باند تخصصی تکثیرشده مورد نظر (قطعه ای از DNA و یا RNA که توسط روش واکنش چرخه ای پلی مرایی و یا واکنش رونویسی معکوس زنجیره ای پلی مرایی تکثیر شده است) از سایر ژن های غیر هدف، پرایمر دایمرها و آلودگی های دیگر جدا شود تا اینکه کمیت و کیفیت مطلوب را به دست آورد. همیشه خالص سازی باند تکثیرشده از ژل آگارز وقت گیر و پر زحمت بوده است و به طور معمول با کاهش میزان کمیت DNA همراه است (Boom et al. 1990). علاوه بر این بعضی از مشکل های مربوط به جداسازی قطعه های DNA از ژل آگارز (کاهش عملکرد، تغییرهای DNA و ...) به طور رضایت بخشی حل نشده است (Robert et al. 1976). به منظور خالص سازی باندهای DNA از ژل آگارز و سایر آلودگی ها، از عواملی مانند نمک های NaI، NaClO₄، سیلیکا، قطعه ها و دانه های ریز شیشه ای استفاده می شود (Marko et al. 1982; Voglestein et al. 1979; yang et al. 1979). انواع مختلف از روش های استخراج ژن از ژل آگارز وجود دارد که بعضی از آنها شامل ۱- تخلیص DNA با استفاده از روش شیمیایی فنول/کلروفرم (Sambrook et al. 1989)، ۲- استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یون^۱ با استفاده از رزین دارای بار مثبت دی اتیل آمینو اتیل- سلولز^۲ (Sambrook et al. 1989; Yang et al. 1979)، ۳- استفاده از دی اتیل آمینو اتیل- سفاسل^۳ (Sambrook et al. 1989)، ۴- استفاده از مهره های شیشه ای (Ausubel et al. 1995)، ۵- روش freeze-squeeze (Thuring et al. 1975)، ۶- روش حل کردن ژل با پتاسیم یدید (Blin et al. 1975)، ۷- روش electroelution (Wienand et al. 1978)، ۸- روش β -Agarase (Chong et al. 1994)، ۹- روش رسوب توسط اتانول^۴ (Sambrook et al. 1989) و ... است؛ که هر کدام از این روش های استخراج ژن از ژل دارای مزیت ها و معایب خاصی هستند. کاهش مقدار DNA در طی خالص سازی، در مورد انواع کیت های تجاری نیز مشاهده شده است (Sulaiman et al. 2005;)

(Feng et al. 2007). در این پژوهش به منظور استخراج ژن از ژل آگارز از ژن *PqHMGR* استفاده شده است. به منظور استخراج ژن از ژل آگارز از یک دستگاه شبه الکتروفورز و استفاده از میدان الکتریکی درون مایع TAE.1X استفاده شده است (Wu et al. 2010). در نهایت همسانه سازی ژن استخراج شده درون TAE.1X حل شده؛ توسط باکتری *E.Coli* انجام شد.

استخراج RNA از برگ های گیاه جنسینگ (مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱ گرم) سه- ساله رشد یافته در گلخانه پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، توسط ۱ mL از عامل ترایزول (Trizol reagent Invitrogen USA) انجام شد. تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتر (PerkinElmer Lamda 25 Spectrophotometer) و اندازه گیری جذب در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و انجام الکتروفورز توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر تریس بورات انجام شد. در نهایت آشکار سازی RNA استخراجی توسط رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید و مشاهده در زیر دستگاه ژل داگ انجام شد. طراحی آغازگر رفت 5'TCCCATAGTTGCCAACCTCC3' (TM= ۵۹/۳۸°C) و آغازگر معکوس 3' ACCACACCACCATCTATCCTC 5' (TM = ۵۸/۸۸°C) بر روی توالی ژن *PqHMGR* (با شماره سریال FJ755158.1) با استفاده از نرم افزار Primer 3 انجام شد. به منظور سنتز cDNA از ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش و بر طبق دستورالعمل واکنش رونویسی معکوس زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR) کیت شرکت سیناکلون در یک دستگاه ترموسایکلر^۵ (شرکت BIO RAD مدل My Cycler) و تحت شرایط دمایی ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس قرار گرفتن در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۰ دقیقه انجام شد. برنامه پی سی آر برای تولید رشته دوم در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل کیت مخلوط پی سی آر و تحت شرایط زیر انجام شد: واسرشته سازی اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، واسرشته سازی ثانویه ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، بسط اولیه ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، بسط ثانویه ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد. تصویر cDNA سنتز شده به صورت

¹ Ion Exchange Chromatography

² Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose)

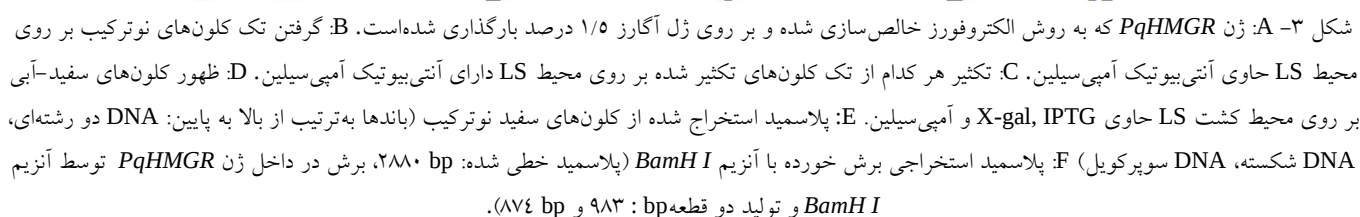
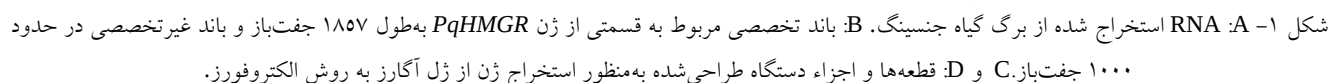
³ Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-sephacel)

⁴ Ethanol Precipitation

⁵ Thermo cycler

عادی و همراه با تکثیر توسط آغازگرهای رفت 5'gggtgcacaactggattgtattg3' و برگشت 5'ctcagcagagggtggaaca3' اکتین تأیید شد و سپس بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال داده شد. اجزای دستگاه استخراج ژن از ژل در قسمت‌های C و D شکل ۱ نشان داده شده‌است. توجه شود که در این آزمایش و جهت آزمون دستگاه موردنظر، از استخراج ژن *PqHMGR* استفاده شد. مراحل کار با این دستگاه به این شرح است: ۱- ابتدا حدود ۶۰-۵۰ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر درون ژل آگارز ۱ درصد تحت جریان الکتروفورز قرار گرفت. ۲- سپس از یک استوانه سرنگ (با دهانه برش‌خورده) به‌منظور برش محل قرارگیری ژن موردنظر درون ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. ۳- در مرحله بعد ژل برش‌خورده درون ظرف حاوی مایع TAE.1X قرار گرفت تا اینکه قطعه ژلی توسط بافر TAE.1X اشباع شود. ۴- با استفاده از کشیدن پیستون سرنگ، استوانه اصلی سرنگ از مایع TAE.1X اشباع شد. ۵- ژل برش‌خورده درون استوانه اصلی سرنگ قرار داده شد و سپس توسط پیستون سرنگ، ژل به قسمت ابتدایی استوانه اصلی سرنگ انتقال یافت. (توجه شود که در حین انجام این کار باید مایع TAE.1X از نک سوزن سرنگ خارج شود؛ تا زمانی که ۲۰۰ میکرولیتر از TAE.1X درون استوانه اصلی سرنگ باقی بماند). ۶- سپس با فشار دادن ژل توسط پیستون فشاری، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از مایع TAE.1X درون استوانه اصلی از طریق سوزن سرنگ به داخل محفظه ۱۰۰ میکرولیتری سرسنگ (جایی که امتداد سیم پلاتینی قطب مثبت درون این محفظه قرار دارد) انتقال یافت. ۷- با حفظ ژل در جایگاه خود، پیستون فشاری از استوانه سرنگ خارج شده و بعد از اینکه استوانه سرنگ در حالت افقی درون تانک دستگاه قرار گرفت؛ مایع TAE.1X به داخل تانک دستگاه (تا زمانی که داخل استوانه اصلی و تا بالای سطح استوانه از این مایع اشباع شود) اضافه شد. ۸- سپس الکترودهای مربوط به سیم‌های قطب منفی و مثبت به منبع ولتاژ وصل شد و ژن داخل قطعه ژلی با ولتاژ ۷۵ ولت و شدت جریان ۴۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۷ دقیقه تحت جریان الکتروفورز قرار گرفت؛ تا اینکه که ژن درون قطعه ژلی به درون مایع TAE.1X درون محفظه ۱۰۰ میکرولیتری سرسنگ انتقال یابد. به‌منظور افزایش غلظت ژن

استخراج‌شده، بعد از استخراج ژن (استخراج ژن از ژل و انتقال به ۱۰۰ میکرولیتر مایع TAE.1X سرسنگ)، از قطعه‌های ژلی دیگر حاوی همان ژن به‌منظور استخراج و افزایش غلظت ژن موردنظر درون همان بافر TAE.1X حاوی ژن استخراجی قبلی می‌توان استفاده کرد. ۹- در نهایت توسط سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری ژن خالص‌سازی‌شده درون TAE.1X به داخل تیوب ۰/۵ میکرولیتر انتقال یافت. مراحل کار با دستگاه استخراج ژن از ژل آگارز به روش الکتروفورز در شکل ۲ نشان داده شده‌است. سه میکرولیتر از محصول PCR شسته شده از ژل با استفاده از کیت شرکت فرمتاز به پلاسمید حامل PTG-19 (شرکت SinaClone) متصل شده و سپس به سلول‌های مستعد از باکتری اشرشیاکلی (*E.coli*) سویه DH5 α (توسط CaCl₂ تیمار شده‌است) انتقال داده شد. نو ترکیب‌ها از طریق غربالگری کلنی‌های سفید از میان کلنی‌های آبی توسط روش انتخاب کلنی سفید و آبی انتخاب شدند. حضور قطعه درج شده در تک کلنی‌های سفید با روش هضم آنزیمی توسط آنزیم *BamH I* تایید شد و از توالی آغازگر M13 رفت‌وبرگشت خود توالی DNA پلاسمید به‌منظور توالی‌یابی در شرکت Bioneer استفاده شد. RNA استخراجی از برگ گیاه جنسینگ آمریکایی دارای غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر (قسمت A شکل ۱) و کیفیت آن: در مورد نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ به‌ترتیب برابر با ۱/۹ و ۲ بود. باند ژن *PqHMGR* تکثیرشده از گیاه جنسینگ آمریکایی به‌طول ۱۸۵۷ bp و با غلظت ۷۸/۰۳ ngr/ μ Lit همراه با باند غیرتخصصی در حدود ۱۰۰۰ bp بود. در نهایت ژن *PqHMGR* تکثیرشده به روش الکتروفورز از ژل آگارز ۱ درصد استخراج شد (قسمت A شکل ۳) و به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت آن به ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال یافت و همچنین غلظت آن توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد که برابر با ۷۰/۲۳ ngr/ μ Lit بود. قسمت B و C شکل ۳ ظهور تک کلون‌های ژن استخراجی *PqHMGR* بر روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین و تکثیر هر کدام از این تک کلون‌ها را بر روی همین محیط نشان می‌دهد. قسمت D شکل ۳ تکثیر هر کدام از این تک کلون‌های تکثیر شده بر روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، X-gal، IPTG را نشان می‌دهد.



بعد از گزینش کلون‌های سفید نو ترکیب از سایر کلون‌های آبی، به‌منظور شناسایی کلون‌های سفید دارای قطعه مورد نظر، استخراج پلاسمید از این کلون‌های سفید انجام گرفت. باندهای پلاسمید استخراجی دارای سه باند DNA سوپرکویل، خطی و دو رشته‌ای است (قسمت E شکل ۳). قسمت F شکل ۳ باندهای حاصل از برش پلاسمید با آنزیم *BamH I* را نشان می‌دهد که شامل یک پلاسمید خطی و دو قطعه برش خورده *PqHMGR* (برش *BamH*

از ۲۰ درصدی (در قطعه‌های بزرگ) در مدت‌زمان حدود ۱۲۰-۲۴۰ و یا ۶۰-۱۸۰ (به‌منظور حل کردن درون مایع DEAE) به‌دست آمده است؛ این روش دارای مزیت‌های ۱- غیرسمی بودن. ۲- عملکرد بالا برای خالص‌سازی است و معایب آن شامل ۱- امکان روئیت سخت باند خالص‌سازی شده. ۲- مورد استفاده بودن تنها برای قطعه‌های ۲۰-۰/۰۵ Kbp است. در روش استخراج ژن توسط جریان الکتریکی، حدود ۹۰ درصد ژن از ژل آگارز را بدون ایجاد شکستگی در مورد قطعه‌های ژنی با اندازه‌های مختلف می‌توان بازیافت کرد. همچنین این روش قابلیت افزایش میزان کمیت باند خالص‌سازی شده با استفاده مکرر از چند قطعه ژل آگارز حاوی یک نوع باند ژنی (مورد استفاده در تعدادی زیادی نمونه در زمان کوتاه) را امکان‌پذیر ساخته است. با توجه به اینکه در این روش به‌جای آب دو بار تقطیر (مایع فاقد غلظت نمکی) از مایع TAE.1X برای حل کردن ژن خالص‌سازی شده از ژل استفاده شد؛ بنابراین لازم بود که مراحل بعد از خالص‌سازی ژن یعنی اتصال ژن به پلاسمید باکتریایی به‌منظور انجام همسانه‌سازی آزمایش می‌شد که با آزمایش انجام‌گرفته مشخص شد که استفاده از TAE.1X به‌جای آب مقطر مشکلی را در ایجاد اتصال ژن به پلاسمید باکتریایی لازم برای همسانه‌سازی ایجاد نمی‌کند.

عیب آن شامل امکان شکستگی قطعه‌های نوکلئیک‌اسید (در اندازه‌های بالاتر از ۵ Kbp) است (Ausubel et al. 1998). ۲- روش Filter cartridges in combination with freezing or without freezing) در این روش میزان عملکرد استخراج بالای ۹۵ درصدی در مدت‌زمان حدود ۲-۵ دقیقه به‌دست آمده است. این روش دارای مزیت سرعت عمل بالا و افزایش غلظت خود نمونه به‌همراه دفع نمک‌های آلوده است و تنها عیب آن عدم حذف آلودگی‌های بزرگ مانند پروتئین‌هاست (Leonard et al. 1998). ۳- روش ethanol or isopropanol precipitation) در این روش میزان عملکرد استخراج بالای ۹۵ درصدی در مدت زمان حدود ۲۰ دقیقه تا یک شبانه‌روز (بستگی به غلظت نمونه استخراجی) به‌دست آمده است. این روش دارای مزیت‌های ۱- قابل روئیت بودن پلیت خالص‌سازی شده. ۲- عملکرد بالا ۳- تنوع استفاده با سایر نمک‌های استخراجی است و معایب آن شامل ۱- زمان‌گیر و مشکل بودن برای استفاده هم‌زمان چند نمونه با همدیگر. ۲- امکان از دست رفتن پلیت و در نهایت عدم امکان حذف آلودگی‌هاست (Ausubel et al. 1998; Sambrook Fritsch). ۴- روش Electroelution) در این روش میزان عملکرد استخراج بالای ۹۵ درصدی (در قطعه‌های کمتر از ۱ Kbp) و ۶۰-۵۰ درصدی (در قطعه‌های خیلی کوچک) و کمتر

منابع

- Ausubel FM (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Red Book, Wiley and Son. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith, JA, and Struhl, K. (1998). Current Protocols in Molecular Biology. Wiley and Sons. New York.
- Blin, N, Gabain, AV, Bujard, H (1975) Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes. FEBS letters 53:84-86.
- Boom RCJA, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen, PM, Van der Noordaa JPME (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology 28:495-503.
- Chong SHA O R O N G, Garcia GA (1994). An oligonucleotide-directed, in vitro mutagenesis method using ssDNA and preferential DNA amplification of the mutated strand. BioTechniques 17:719-20.
- Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Xiao L (2007) Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Veterinary Parasitology 144:1-9.

- Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ, Barbagallo CB (1998) Preparation of PCR products for DNA sequencing. Biotechniques 24:314-317.
- Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC (1982) A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. Analytical biochemistry 121:382-387.
- Roberts RJ, Murray K (1976) Restriction endonuclease. CRC Critical Reviews in Biochemistry 4:123-164.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Xiao L (2005) Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. Journal of Clinical microbiology 43:2805-2809.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences 76:615-619.

Thuring RWJ, Sanders JPM, Borst P (1975) A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Analytical Biochemistry* 66:213-220.

Wienand U, Schwarz Z, Feix G (1979) Electrophoretic elution of nucleic acids from gels adapted for subsequent biological tests. *FEBS Letters* 98:319-323.

Wu Q, Song J, Sun Y, Suo F, Li C, Luo H, Li X (2010) Transcript profiles of *Panax quinquefolius* from flower, leaf and root bring new insights into genes related to ginsenosides biosynthesis and transcriptional regulation. *Physiologia Plantarum* 138:134-149.

Yang RCA, Lis J, Wu R (1979) Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis. In *Methods in enzymology* (Vol. 68, pp. 176-182). Academic Press.