

طراحی و ساخت انواع نشانگرهای DNA با استفاده از های پلاسمیدی و فاژ لامبда

مهری خاتمی^۱، مجید صادقیزاده^{۲*}، حوریه صادری^۳، سارا غروی^۴، محمد Mehdi Hidari^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 میکروب شناسی، 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

پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۱۰ دریافت 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 لامبда از دو گونه مختلف لامبда به نامهای EMBL3A و CI857sam7 که هر دو جز فاژهای لیتیک بودند و از پلاسمیدهای pBR332 و pUC18 و پلاسمیدهای نوترکیب VZV به عنوان منبع DNA استفاده گردید.

نتایج: در نهایت هفت نشانگر DNA ساخته شد که چهار عدد از آنها (λ HindIII/EcoRI, λ HindIII/BamHI, Sam2, Sam1) 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، p، پلاسمیدهای نوترکیب VZV.

۱ - مقدمه

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

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،

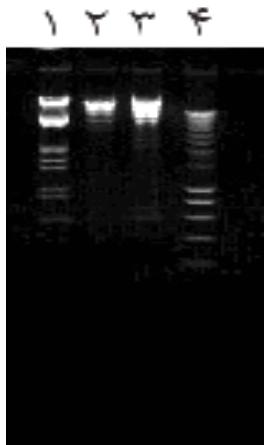
آزمایش 10^9 - 10^{10} pfu (Plague Forming Unit) می‌باشد که این مقدار فاژ می‌تواند یک DNA در حد ۵۰۰ ng به ازای هر ml محیط کشت LB (Luria Bertani) باکتری آگشته به فاژ تولید کند [۶،۴]. لازم به ذکر است که اگر فاژها، قبل از اینکه سلول‌ها در بیشترین میزان تقسیم شدن باشند، اضافه شود، همه سلول‌ها سریعاً لیز شده 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 ایده‌آل 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 دهنند، اما سرانجام همه آنها عفونی و لیز می‌شوند [۵-۷]. در این تحقیق علاوه بر فاژ لامبда، از pUC18 DNA‌های پلاسمیدهای pBR322 (bp ۴۳۶۱) و pBR322 (bp ۲۶۸۶) استفاده شد که دلیل استفاده از آنها، اندازه کوچک این پلاسمیدها برای تأمین قطعات پایین در نشانگرهای DNA، مشخص بودن نقشهٔ 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 pلاسمیدی قرار گرفتند (۰۲۰ ng) از DNA پلاسمیدهای Puc18 و Pbr322 (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 ۴ پلاسمید زیر استفاده شد: ۱) پلاسمید

محصولات واکنش‌های هضمی مختلف را با هم‌دیگر مخلوط کرده و حالت نرdbانی 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 pUC18 (λ Bacteriophage) دارای چهار مرحله لیتیک (Lytic phase) را دنبال می‌کنند [۲،۳]. باکتریوفاژ لامبدا 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 [۴]. بنابراین، برای عفونی کردن باکتری‌ها به فاژ لامبدا، باید محیط کشت، حاوی مالتوز باشد [۶،۷]. هنگامی که DNA فاژ وارد سلول می‌شود، دو سر آن، به دلیل وجود انتهای چسبنده bp ۱۲ در هر انتهای که مکمل هم هستند، تشکیل یک مولکول DNA حلقوی را می‌دهد [۲] در حدود ۴۵ دقیقه بعد از عفونت، باکتری لیز (Lysis) می‌شود و تقریباً ۱۰۰ مرحله جدید آزاد می‌شود [۶،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 گستردگی 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 به دست آمده در یک

روی ژل ۱٪ آگارز با بافر (Tris-Acetate-EDTA) TAE برده شد.



شکل ۱ هضم دو گونه لامدا با آنزیم Hind III (Roche) DNA نشانگر (۱) نشانگر EMBL3A (از bp ۱۰۰۰۰-۲۰۰ گونه ۳) CI857sam7 (۴) نشانگر Smart ladder (از ۱۰۰۰-۲۰۰ bp).

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

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

۳-۲- طراحی و ساخت نشانگر pBR322/Msp I

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

۴- طراحی نشانگرهایی ساخته شده از مخلوط چندین هضم آنزیمی بر روی DNA های pBR322 و pUC18

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

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 ژنوم VZV است و برای تأمین قطعه مورد نظر در طراحی نشانگر Sam2، با آنزیم BamHI هضم گردید و طی آن قطعه ۱۰۰۰۰ bp 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 ۲۹۰۰ bp و ۵۳۰۰ bp در نشانگر طراحی شده می‌کند و (۴) پلاسمید pNSI2، که حاوی دو ژن ویروس VZV و یک محل برش BamHI است که با هضم آن، قطعه بزرگی با طول ۱۳۵۰۰ bp تولید شد و به منظور طراحی نشانگرهای DNA در این تحقیق، از آن استفاده گردید [۱۲، ۹]. در این آزمایش برای کشت باکتریوفاژ لامدا، از دو گونه مختلف لامدا 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 Sal I، EcoR I و BamHI که طراحی‌های انجام شده برای نشانگر را هم دستخوش تغییر می‌کرد. بعد از کشت باکتریوفاژ لامدا، تیتری در حدود 10^{10} pfu/ml به دست آمد و مراحل استخراج DNA فاژ نیز انجام شد [۶].

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

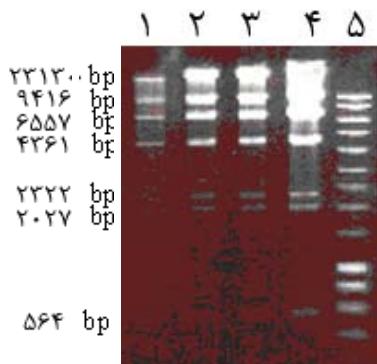
هر دو DNA فاژ لامدا، که با آنزیم Hind III برش داده شدند روی ژل آگارز ۱٪ برده شد، اما چون فاژ EMBL3A دچار تغییراتی در محل‌های آنزیمی خود شده بود (به عنوان ناقل کلونینگ) و مخصوصاً باندهایی پایینی آن (شامل: ۲۲۲۲ و ۲۰۲۷ و bp ۵۶۴) حذف شده بودند، بنابراین، توجه بیشتر روی گونه CI857sam7 گردید (شکل ۱).

ساخت نشانگر Pst I/λ با استفاده از گونه CI857sam7 DNA فاژ تحت تأثیر آنزیم Pst I قرار گرفت و نتیجه هضم

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 فاز، میزان pfu (واحد تشکیل پلاک) برای نمونه‌های فاز لامبدا محاسبه گردید که معادل 10^{12} برای فاز 7 CI857sam₇ و 10^{13} برای فاز EMBL3A بود. در این تحقیق با استفاده از رقت 10^{13} به حد استاندارد تخلیص رسیده و تقریباً در حدود 5 میکروگرم بر میکرولیتر، DNA استخراج شد که یکی از بزرگترین دستاوردهای این پژوهش بشمار می‌رود.

۱-۳- نشانگر 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 الکتروفوروز کردن آنها در بافر TAE (Tris-Borate-EDTA) می‌باشد. در پی بهینه کردن نشانگر 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 1٪ 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 فازی است (شکل ۲).



شکل ۲ غلظت‌های مختلف DNA فازی برای هضم با آنزیم Hind III (۱) ۵، (۲) ۱۰، (۳) ۱۵، (۴) ۲۰ (۵) میکروگرم و ردیف (۶) نشانگر Smart ladder

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

pBR322/ CfrI pBR322/ pUC18 (قطعات تولید شده ۱۰۴، ۱۳۲، ۴۱۰، ۹۰۲، ۵۰۵ و ۲۳۱۰ bp)، pUC18/Pvu I (bp ۳۶۵۰ و ۶۹۲)، pBR322/Dra I (bp ۱۷۹۰ و ۳۲۲)، pUC18/Pvu II (bp ۲۳۶۴)، pUC18/Cfr I (bp ۹۷۵ و ۶۹۲)، pUC18/BamHI (bp ۱۴۴۲ و ۹۸۷)، pUC18/EcoRI (bp ۱۰۰۰)، pMS62/BamHI (bp ۱۳۰۰)، pMS65/BamHI (bp ۸۰۰ و ۵۳۰۰)، pMS55/BamHI (bp ۲۹۰۰) و pUC18/Nsi I/BamHI (bp ۱۰۰۰).

۲-۵- طراحی و ساخت نشانگری با نام سم مارکر ۱ (Sam Marker 1)

بعد از آنالیزهای آنزیمی که روی نقشه ژنتیکی پلاسمیدها انجام گرفت، محصولات هضمی طبق طراحی خاص، برای ساخت نشانگر جدید سم مارکر ۱ 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 به صورت غیرفعال درآمد.

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

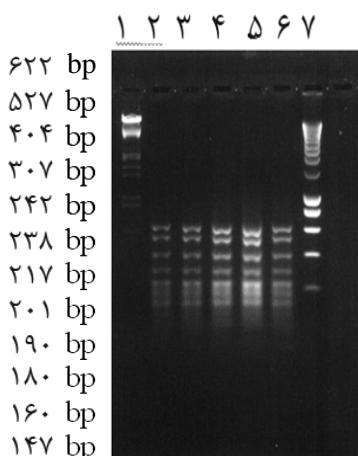
بعد از آنالیزهای آنزیمی و واکنش‌های هضمی، محصولات هضم طبق طراحی خاصی، برای ساخت نشانگر جدید (سم مارکر ۲) با هم مخلوط شدند و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TAE برده شد.

۳- نتایج

بعد از تهیه رقت‌های مختلف از فاز لامبда بر روی باکتری

۴-۴- نشانگر pBR322/Msp I

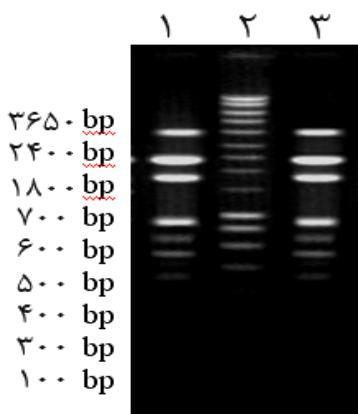
هدف از این آزمایش، علاوه بر مشاهده باندهای نشانگری، که می‌تواند به عنوان یک Ladder زیر ۶۰۰ bp معرفی شود، پیدا کردن بهترین غلظت DNA در واکنش‌های هضمی، برای تولید نشانگر پلاسمیدی بود. نتیجه نشان می‌دهد که حتی در غلظت‌های پایین این نشانگر هم، تمام باندها مشخص و واضح هستند (شکل ۵).



شکل ۵ نشانگر I pBR322/Msp I. ۱) نشانگر DNA ساخت شرکت Roche. غلظت‌های (۲) ۰۵، (۳) ۰۳، (۴) ۱۵، (۵) ۲۰، (۶) ۲۰۰، (۷) ۱۲۰ میکروگرم و (۸) نشانگر (bp ۱۰۰۰-۲۰۰ Smart ladder)

۴-۵- نشانگر جدیدی با نام سم مارکر ۱

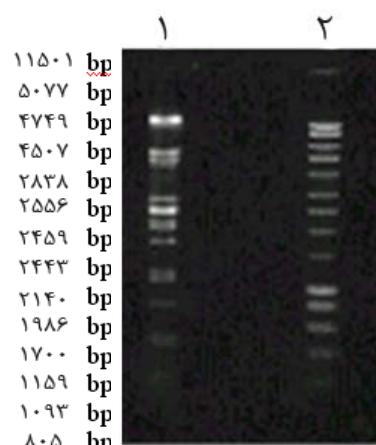
محدوده وزن مولکولی این نشانگر از: ۱۰۰ تا ۳۶۵۰ bp است (شکل ۶).



شکل ۶ نشانگر ۱ Sam. ۱) نشانگر ساخته شده ۱ Sam (از ۱۰۰-۳۶۵۰ bp) (از ۳۶۵۰-۱۰۰ bp) تکرار آزمایش (۲) نشانگر ساخته شده ۱ Sam (Smart ladder) (۳) نشانگر ساخته شده ۱ Sam (bp ۱۰۰۰-۲۰۰ Smart ladder)

۲-۳- نشانگر λ /Pst I

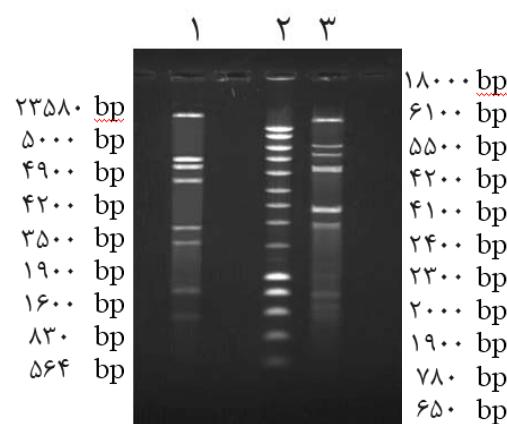
نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با نوع خارجی این نشانگر، از شرکت Fermentas ساخته شده در این تحقیق الگوی کاملاً یکسانی داشته و حتی از نظر کیفیت باندها، از درجه بهتری برخوردار است (شکل ۳).



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

۳-۳- نشانگرهای λ Hind III/EcoRI و λ Hind III/BamHI

با اینکه الگوی این هضم‌های دوتایی، با آنچه که به صورت تجاری به وسیله شرکت‌های مختلف خارجی عرضه شده متفاوت بود، ولی می‌تواند به عنوان یک الگوی نشانگری جدید معرفی گردد (شکل ۴).

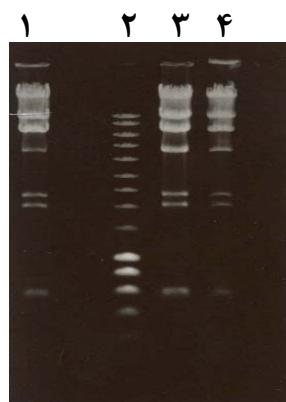


شکل ۴ هضم‌های دوتایی DNA لامبدا (Over night) ۱) نشانگر ساخته شده ۲) λ/Hind III/EcoR I نشانگر ساخته شده ۳) λ/Hind III/BamHI نشانگر ساخته شده

نمونه لیوفلیزه شده، بررسی گردد. بعد از گذشت این زمان، نمونه لیوفلیزه شده در کنار نمونه‌ای که به حالت محلول (غیر لیوفلیزه شده) بود، الکتروفورز گردید (شکل ۹). نتایج نشان داد گرچه الگوی نشانگری در هر دو یکسان است، ولی از شدت باندها مخصوصاً باند ۵۶۴ و ۴۳۶۱ 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 فائز μ gr ۱۰ (۲) نشانگر (از ۱۰۰۰۰–۲۰۰ bp)، (۳) نشانگر حرارت داده شده، غلظت DNA فائز μ gr ۱۰ (۴) نشانگر حرارت داده شده. غلظت DNA فائز μ gr ۵

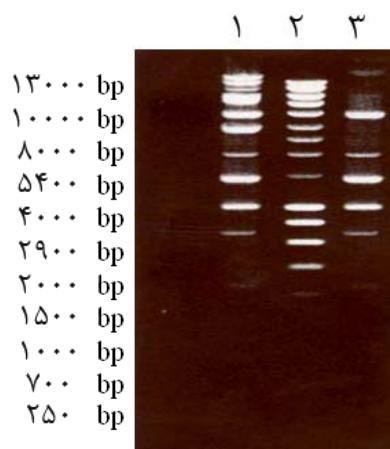


شکل ۹ اثر لیوفلیزاسیون بر روی نشانگر λ/Hind III ساخته شده. (۱) نشانگر لیوفلیزه شده، (۲) نشانگر Smart ladder (۳ و ۴) نشانگر لیوفلیزه شده

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

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).

۶-۳- نشانگر جدید دیگری با نام سم مارکر ۲
محدوده وزن مولکولی این نشانگر از ۲۵۰ تا ۱۳۰۰۰ bp می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷ نشانگر ۲ Sam. (۱) نشانگر ساخته شده ۲ Sam (از ۲۵۰ تا ۱۳۰۰۰ bp) (۲) نشانگر Smart ladder (از ۱۰۰۰–۲۰۰ bp) و (۳) نشانگر ساخته شده ۲ Sam VZV بدون مخلوط کردن نتایج هضمی پلاسمیدهای

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

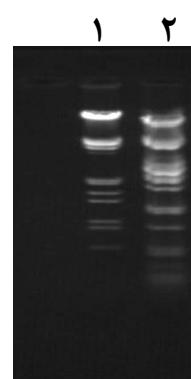
رنوم فائز لامبда دارای دو انتهای چسبنده COS به اندازه ۱۲ نوکلئوتید می‌باشد که در حالت عادی ممکن است این انتهایا به هم بچسبند و قطعاتی بزرگ و دور از انتظار را تولید کنند، که می‌توان با گرم کردن نمونه‌ها قبل از انتقال آنها روی ژل، این احتمال را از بین برد. ضمناً اگر نمونه λ/Hind III قبل از الکتروفورز حرارت داده نشود، باند ۴۳۶۱ bp به باند ۲۷۴۹۱ bp متصل شده و تشکیل باند سنتگین‌تر را در ۲۲۱۳۰ bp می‌دهد که باعث تغییر الگوی نشانگری می‌شود (شکل ۸)

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

در ادامه بررسی‌های انجام شده روی نشانگر λ/Hind III ایده لیوفلیزه کردن نشانگرهای DNA مطرح گردید که در پی آن، نشانگر λ/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

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 فائز لامبدا، به دست آوردن تیتر مناسب برای استخراج DNA، کار دقیق و مشکلی است. تلاش محققین در جهت یافتن تیتر ایده‌آل، منجر به تولید بالاترین میزان فائز، حتی بالاتر از میزان معمولی و استاندارد (10^9) بود. تیتری که در این آزمایش به دست آمد 10^{12} تا 10^{13} برای هر دو گونه فائز لامبدا بود. در این آزمایش، غلظتی که از DNA‌های فائزی حاصل شد، برای هر دو فائز، بسیار بالا و در حد $4/5$ تا 5 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 $\lambda/\text{EcoR I}$ و $\lambda/\text{BamH I}$ با الگوی نشانگرهای تجاری یکسان نبود که علت آن متفاوت بودن ژنوم گونه‌های لامبدا کار شده با گونه لامبدا شرکت‌های تجاری بود. ولی با انجام هضم‌های دو تایی $\lambda/\text{Hind III/BamH I}$ و $\lambda/\text{Hind III/EcoR I}$ صورت گرفت، قطعاتی روی نشانگر به دست آمد که گرچه با نوع تجاری 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 از بافر TBE، مشخص شد که باندها، مخصوصاً باندهای بالای 4000 bp 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.

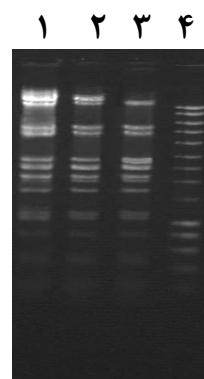


شکل ۱۰ الکتروفورز نشانگر $\lambda/\text{Pst I}$ در بافر TBE. ۱) نشانگر ساخت شرکت Roche و ۲) نشانگر $\lambda/\text{Pst I}$ ساخته شده

۱۰-۳- بررسی نشانگر $\lambda/\text{Pst I}$ ساخته شده در

دو شرایط حرارت داده شده و بدون حرارت

این نشانگر نیز مانند نشانگر $\lambda/\text{Hind III}$ بعد از هضم تحت حرارت قرار گرفت و با نمونه‌ای که حرارت داده نشده بود، مقایسه و مشخص شد که اگر نمونه نشانگر $\lambda/\text{Pst I}$ قبل از الکتروفورز به مدت ۵ دقیقه در دمای 65 درجه سانتیگراد قرار نگیرد، ممکن است باندهای 2556 و 14057 bp به هم متصل شده و یک باند اضافی را در 11501 bp تشکیل دهد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱ نشانگر $\lambda/\text{Pst I}$ و ۲) حرارت داده نشده، ۳) حرارت داده شده، ۴) نشانگر Smart ladder

۴- بحث

اساس کار ساخت نشانگرهای DNA، بعد از استخراج و تخلیص DNA مناسب، آنالیز آنزیم‌های برش‌گر محدود

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 چهارتایی دیگر برای اولین بار تولید شد که از نظر کاربرد، طیف وسیعی را شامل می‌شوند.

نکته دیگری که قبل از الکتروفورز کردن نشانگرهای لامبда مورد توجه قرار گرفت، شرایط حرارت دادن این نشانگرهای بود. چون ژنوم فاز لامبда دارای دو انتهای آزاد چسبینده با اندازه bp¹² است، در شرایط عادی امکان چسبیدن این انتهایها 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 [11]. 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

۵- منابع

- [1] Matthews R. Classification and Nomenclature 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. 3rd ed., New York, John Wiley & Sons, 1995.
- [5] Cann AJ(ed.). Principles of molecular 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 Harboratory 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. Molecular cloning of the Varicella Zoster Virus genome and derivation of six restriction endonuclease maps. *J Gen Virol* 1983; 1 (64): 1811-4.
- [9] Perera LP, Mosca JD, Sadeghi-Zadeh M, Ruyechan WT, Hay J. The Varicella-zoster Virus immediate early protein, IE62, compositionally regulates 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.