مجله بیماریهای کودکان ایران
دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵

مقاله تحقیقی

طراحی و ساخت پلاسمید pBGGT: به‌عنوان یک پلاسمید حامل برای هدف گیری ژنی بیماری بتاتالاسمی

دکتر حسین خان احمد؛ MD، دانشجوی PhD، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
دکتر کیهان آزادمنش ؛MD، PhD فرآورده‌های بیولوژیک، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
دکترمحمدعلی شکرگزار؛ PhD فرآورده های بیولوژیک، بخش بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران
دکتر احمدرضا نیاورانی؛ MD، PhD فرآورده های بیولوژیک ، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
محسن کریمی؛MSc سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
بهاره ربانی؛ MSc سلولی و مولکولی ، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
میترا خلیلی؛ MSc سلولی و مولکولی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
رضوان باقری؛ MSc میکروب شناسی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
دکتر فرشته مریمی؛ MD، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
دکتر سیروس زینلی*؛ PhD ژنتیک انسانی، استادیار بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

خلاصه

هدف: در اکثر تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی نیاز به ساخت سازه ژنی می‌باشد. برای ساخت و تکثیر این سازه‌ها اغلب از پلاسمیدهای تجاری موجود استفاده می‌شود. گاهی اوقات به علت متعدد بودن قطعات ژنی و طولانی بودن این قطعات و محدودیت در استفاده از آنزیم‌ها، استفاده از پلاسمیدهای موجود سبب افزایش هزینه و زمان پروژه می‌شود. در مواردی نیز ساخت سازه ژنی با استفاده از پلاسمیدهای موجود امکان‌پذیر نمی‌باشد. در این تحقیق با استفاده از یک روش ساده و سریع پلاسمید مطلوب برای پروژه ژن درمانی بتا تالاسمی طراحی و ساخته شد.

روش مطالعه: در ابتدا با بررسی قطعات سازه ژنی با نرم افزارGene runner، مولتیپل کلونینگ سایت مطلوب طراحی و سنتز شد. از طرفی سایت متعدد کلونینگ پلاسمید pUC19 با هضم آنزیمی از پلاسمید خارج شد. سپس در طی یک واکنش لایگشن و ترانسفورمیشن، سایت متعدد کلونینگ جدید جایگزین سایت متعدد کلونینگ پلاسمید pUC19 شد و با آنالیز آنزیمی و تعیین توالی صحت کار تایید شد.

یافته‌ها: ارزیابی‌ها، مراحل طراحی و ساخت سایت متعدد کلونینگ را موفقیت آمیز نشان داد. درمرحله ترانس‌فورمیشن نیز کلنی‌های متعدد حاصل شد. اغلب آنها در مرحله هضم آنزیمی تأیید شدند. یکی از کلنی‌های تأیید شده تعیین توالی شد و مورد تأیید نهایی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: روش مورد استفاده در این تحقیق روش ساده، ارزان و سریع جهت ساخت پلاسمیدهای مطلوب از پلاسمیدهای تجاری موجود است. این کار سبب کاهش هزینه و زمان پروژه‌های ساخت سازه ژنی می‌شود. سایت متعدد کلونینگ به گونه‌ای طراحی گردید تا تمام قطعات بصورت جهت‌دار کلون شوند. این امر باعث حذف مراحل تعیین جهت و افزایش کارآمدی مراحل کلونینگ می شود.

*مسئول مقاله، آدرس:
تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
E-mail:
sirouszeinali@yahoo.com

دریافت: ۸۴/۹/۸
بازنگری: ۸۴/۱۲/۲
پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۰

واژه‌های کلیدی: بتاتالاسمی، pBGGT، pUC19، هدف‌گیری ژنی

مقدمه

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایعترین اختلالات ژنتیکی در دنیا می‌باشد. در این بیماری سنتز بتاگلوبین کاهش یافته یا متوقف می‌شود. از علائم این بیماری کم خونی شدید، بزرگی کبد و طحال و تغییر شکل استخوان های صورت و جمجمه می‌باشد[۱]. این بیماران در طی حیات خود نیاز به تزریق

خون در فواصل زمانی کوتاه دارند. بتا تالاسمی یک اختلال تک ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب می‌باشد. تاکنون حدود ۲۰۰ جهش در ژن بتاگلوبین شناسایی شده است[۲].

جهش‌های فوق روی نسخه برداری، پردازش mRNA (mRNA Processing) بیان و پایداری زنجیره بتا پس از ترجمه، تأثیر می‌گذارند و سبب توقف سنتز یا نا پایداری زنجیره ساخته شده میگردند[۱]. پیوند مغز استخوان قطعی‌ترین روش درمانی برای این بیماران است. اما این روش به علت در دسترس نبودن اهدا کنندگان مناسب و داشتن عوارضی مانند واکنش ایمونولوژیک سلول‌های پیوند بر علیه میزبان (Graft Versus host disease) در عمل با مشکلات زیادی روبرو می‌باشد[۳]. اصلاح نقص ژنتیک با روش ژن درمانی، روش ایده‌آل برای درمان این بیماران است. در حال حاضر در اغلب پروژه‌های ژن درمانی از وکتورهای ویروسی استفاده می‌شود. کارآیی این وکتورها برای ارائه ژن به سلول بسیار بالا است[۴] ولی ظرفیت پذیرش ژن آنها کم است و در مواردی‌که نیاز به تجویز مجدد وکتور می‌باشد، احتمال بر انگیخته شدن پاسخ ایمنی میزبان علیه پروتئین های ویروس وجود دارد. در اغلب این وکتورها جایگزین شدن ژن در ژنوم بصورت تصادفی صورت می‌گیرد و این مسئله می‌تواند باعث خاموش یا فعال شدن یکسری ژن‌ها و ایجاد مسائلی مانند بدخیمی می‌شود[۵]. اخیراً بعلت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش‌های هدف‌گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی شده است.

روش ایده‌آل برای ژن درمانی، اصلاح یک ژن جهش یافته به‌صورت مستقیم و بدون ایجاد تغییر درمحل‌های دیگر می‌باشد. این امر با پدیده Homologous Recombination انجام پذیر می‌باشد[۶]. استفاده از این پدیده برای جایگزینی ژن سالم درمحل ژن معیوب، هدف گیری ژنی نامیده می‌شود. میزان بروز Homologous Recombination حدود $۱۰^{-۵}$ تا $۱۰^{-۷}$ می‌باشد[۷]. برای جداسازی و انتخاب سلول‌های اصلاح شده باید از نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی استفاده کرد. برای ژن درمانی با این روش نیاز به ساخت سازه ژنی حاوی ژن بتاگلوبین و بازوهای همسان (همولوگ) و نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی داریم.

معمولاً برای ساخت و تکثیر سازه‌های ژنی از پلاسمیدها استفاده می‌شود. پلاسمیدها مولکول های DNA با سایز ۱kb تا بیش از ۲۰۰kb هستند و بصورت خارج کروموزومی در سلول وجود دارند. اکثر آنها دو رشته‌ای و بصورت حلقوی بسته با پیوند کووالانت (closed covalent circular) می‌باشند. اغلب پلاسمیدهایی که بطور متداول در کلونینگ استفاده می‌شوند حاوی رپلیکون مشتق شده از pMB1 هستند. این پلاسمید ابتدائاً از نمونه‌های بالینی جدا شد[۸]. pSC101 [۹] و $ColE_1$ و pCR1 [۱۰] اولین وکتورهای پلاسمیدی بودند که برای کلونینگ بکار برده شدند اولین فاز تکامل وکتورهای پلاسمیدی با ساخت pBR322 به پایان رسید[۱۱]. اولین نسل پلاسمیدهای دارای تعداد کپی بالا در سلول شامل pXf3 [۱۲] و pAT53 [۱۳] بودند. یک تا دو سال بعد وکتورهای پلاسمیدی pUC ساخته شدند. این پلاسمیدها دارای سایت‌های متعدد و انحصاری در منطقه‌ای با نام سایت متعدد کلونینگ (Multiple Cloning Sites) می‌باشند[۱۴]. درحال حاضر پلاسمیدهای تجاری بسیاری با مقاصد مختلف از قبیل کلونینگ، بیان و غیره ساخته شده است. در اکثر تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، بیوتکنولوژی و ژن درمانی نیاز به طراحی و ساخت سازه‌های ژنی می‌باشد. برای ساخت و تکثیر این سازه‌ها معمولاً از پلاسمیدهای تجاری استفاده می‌شود. در اغلب موارد وقتی سازه ژنی طول کوتاهی داشته باشد یا تعداد قطعات آن کم باشد پلاسمیدهای تجاری جوابگوی نیاز محققین می‌باشد.

در بعضی موارد سازه ژنی طویل است و از کنار هم قرارگرفتن تعداد زیادی قطعه ژنی ساخته می‌شود. در این موارد باید ازچند پلاسمید تجاری استفاده کرد و قطعات را درطی چند مرحله کلونینگ و ساب‌کلونینگ در پلاسمیدهای مختلف کلون و درنهایت به پلاسمید نهایی منتقل کرد. درطی مراحل کلونینگ و ساب‌کلونینگ گاهی استفاده از آنزیم‌های دارای جایگاه برش blunt، اجتناب ناپذیر است. استفاده از این آنزیم‌ها در مرحله کلونینگ سبب کاهش کارآمدی (efficiency) واکنش اتصال (ligation) بین وکتور و Insert می‌شود. از طرفی برای بدست آوردن پلاسمیدی که قطعه مورد نظر درجهت مطلوب در آن قرار داده شده باید آنالیز آنزیمی انجام شود تا کلون حاوی پلاسمید با جهت مطلوب شناسایی و جدا گردد (Directional Selection). در بعضی موارد درطی آنالیز آنزیمی کلون مطلوب بدست نمی‌آید و مرحله کلونینگ و ساب‌کلونینگ باید تکرار شود. گاهی در طراحی مراحل کلونینگ به‌علت محدودیت در سایت‌های آنزیمی نیاز به Blunt کردن انتهای قطعه با آنزیم Klenow و یا دفسفریله کردن قطعه با آنزیم calf intestine alkalin phosphatase یا فسفریله کردن قطعه با آنزیم T4 Polynucleotide Kinase داریم. به‌علاوه بعضی آنزیم‌ها نمی‌توانند سایت‌های برش اختصاصی خود را وقتی متیله می‌شود برش دهند. لذا ضروری است پلاسمید در میزبان Dam^- ترانسفورم گردد و سپس هضم آنزیمی انجام شود. به هر حال تمام مشکلات فوق الذکر باعث افزایش صرف وقت و هزینه پروژه می‌شود.

با این حال گاهی با لحاظ کردن تمام موارد فوق، طراحی سازه ژنی با استفاده از پلاسمیدهای تجاری موجود به نتیجه نمی‌رسد. در این مطالعه ساخت یک سازه ژنی برای استفاده در ژن درمانی بیماری بتا تالاسمی با استفاده از پدیده نوترکیبی همسان (homologous recombination) مد نظر قرار گرفت. در همین ارتباط، در ابتدا سعی شد با استفاده از پلاسمیدهای موجود سازه ساخته شود ولی پلاسمیدهای در دسترس جوابگوی نیاز ما نبود. لذا برآن شدیم تا یک پلاسمید مطلوب که دارای سایت متعدد کلونینگ ایده‌آل جهت طراحی ما باشد را طراحی و بسازیم.

مواد وروش‌ها

این مطالعه که قسمتی از طرح پژوهشی ژن درمانی بیماری بتا تالاسمی شبکه پزشکی مولکولی کشور می‌باشد یک پژوهش مولکولی است و در اواخر سال ۱۳۸۳ در بخش بیوتکنولوژی انسیتو پاستور تهران انجام شد.

طراحی سایت متعدد کلونینگ: در ابتدا توالی قطعات سازه ژنی شامل قطعات A تا G و Back bone پلاسمید pUC19 صرف نظر از سایت متعدد کلونینگ آن از نظر آنزیم‌های Non cutter با نرم‌افزار Gene runner بررسی شد. براساس طراحی انجام شده ترتیب قراردادن جایگاه‌های برش آنزیم در سایت متعدد کلونینگ جدید به صورت زیر تعیین شد:

EcoRI-NheI-KpnI-MluI-BglII-SacI-AflII-XbaI-ClaI-AgeI-XhoI-HindIII

در نهایت سایت متعدد کلونینگ زیر برای جایگزین شدن با M.C.S پلاسمید pUC19 طراحی گردید (شکل۱). بر این اساس نیاز به یک DNA دو رشته‌ای با توالی فوق بود. در یک طرف این زنجیره دو رشته‌ای EcoRI Overhang و در طرف دیگر آن Overhang HindIII قرار دارد.

سنتز پلی نوکلئوتید: زنجیره دو رشته‌ای فوق (سایت متعدد کلونینگ) بصورت دو زنجیره تک رشته‌ای که حدود ۹۰٪ با هم مکمل هستند درنظر گرفته شد. یک رشته پلی‌نوکلئوتید F و رشته مکمل پلی‌نوکلئوتید R نامگذاری شد. این دو پلی‌نوکلئوتید سنتز و با روش HPLC خالص شد (توسط شرکت Primm از کشور ایتالیا).

توالی پلی نوکلئوتیدهای F و R:

F: 5' AA TTCGCTAGCAGGGTACCCAACG CGTAAGATCTGAGCTCCTTAAGTTC TAGAATCGATGACCGGTTCTCGAGA 3'

R: 5' AGCTTCTCGAGAACCGGTC ATCGATTCTAGAACTTAAG GAGCTCAGATCTTACGCGTTG GGTACCCTGCTAGCG 3'

پلی نوکلئوتیدهای F و R با حجم مساوی و غلظت مساوی در تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر اپندورف با هم مخلوط شد (غلظت ۱۰ میلی‌مول و حجم ۵۰ میکرولیتر از هرکدام)، حرارت تیوب به ۹۰ درجه سانتیگراد رسانده شد تا ساختمان‌های ثانویه این پلی‌نوکلئوتیدها باز شود. سپس به دمای محیط برگردانده شد. به علت مکمل بودن این دو پلی‌نوکلئوتید در داخل تیوب اپندورف تعداد زیادی DNA دو رشته‌ای که همان سایت متعدد کلونینگ جدید می‌باشد تشکیل گردید. حاصل این تیوب برای استفاده در واکنش اتصال (ligation) داخل فریزر نگهداری شد.

هضم آنزیمی pUC19: pUC19 در Ecoli Top10 ترانسفورم گردید وpUC19 از باکتری با کیت استخراج پلاسمید (آلمان Nucloespin) تخلیص شد. سپس OD پلاسمید اندازه‌گیری شد. پلاسمید فوق تحت اثر آنزیم HindIII و EcoRI قرار گرفت. این دو آنزیم به‌صورت منفرد در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ پلاسمید جایگاه دارند. هضم آنزیمی فوق سبب جداشدن سایت متعدد کلونینگ از Back Bone پلاسمید می‌شود. حاصل هضم آنزیمی فوق روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد و باند حدود ۲۶۴۰bp از روی ژل بریده شد. با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (آلمان Nucloespin) DNA از ژل جدا شد و OD آن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

واکنش اتصال بین Back Bone pUC19 و سایت متعدد کلونینگ جدید:

با توجه به غلظت Back Bone pUC19 که از روی ژل جدا شد و غلظت سایت متعدد کلونینگ جدید و با رعایت نسبت مولاری و فرمولاسیون زیر واکنش اتصال گذاشته شد.

$$\frac{\text{Insert برحسب مول}}{\text{Vector برحسب مول}} = 5/1$$

Back bone pUC19 + 3□l Buffer 10X + 3□l PEG 4000 + M.C.S + H20 upto 29□l + 1□l T4 DNA ligase

تیوب اپندورف حاوی واکنش اتصال، بمدت یکساعت در دمای محیط (RT) و برای Overnight در یخچال نگهداری شد.

تهیه سلول مستعد (Competent) ، ترانسفورمیشن و استخراج پلاسمید : باکتری'Ecoli Top10 F در 5ml محیط LB Broth حاوی تتراسایکلین رشد داده شد تا OD به ۰/۶ رسید. سپس با روش شیمیایی و با استفاده از M ۰/۱ Cacl2 سلول مستعد (Competent) تهیه شد. سپس حاصل واکنش اتصال در باکتری مستعد (Competent)

EcoRI *NheI* *KpnI* *MluI* *BglII* *SacI* *AflII* *XbaI* *ClaI* *AgeI* *XhoI* *HindIII*

AATTC GCTAGCAGGGTACCCAACGCGTAAGATCTGAGCTCCTTAAGTTCTAGAATCGATGACCGGTTCTCGAGA

G CGATCGTCCCATGGGTTGCGCATTCTAGACTCGAGGAATTCAAGATCTTAGCTACTGGCCAAGAGCTCTTCGA

شکل ۱- سایت متعدد کلونینگ پیشنهادی برای ساخت پلاسمید جدید همراه با محل و توالی آنزیم‌ها و بازهای اضافی که برجسته مشخص شده‌اند.

Overnight ترانسفورم گردید. حاصل ترانسفورمیشن در پلیت‌های LB Agar حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و برای در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. از کلونی-های حاصل ماتریس تهیه شد و از هر خانه ماتریس در لوله با همان شماره حاوی 5ml (Amplicin + LB Broth) کشت داده شده از کلون‌های کشت داده شده پلاسمید استخراج گردید.

هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج شده: پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های NheI-ClaI-AgeI-BglII-MluI-XhoI و AflII که در سایت متعدد کلونینگ یک جایگاه برش دارند هضم شدند.کلون‌های فوق تحت اثر آنزیم SalI و Bam HI نیز قرار گرفتند این دو آنزیم در پلاسمید جدید جایگاه برش ندارند. یکی از کلون‌های تأیید شده با آنالیز آنزیمی با استفاده از پرایمرهای جلوبر و معکوس Reverse M13 و Forward تعیین توالی شد.

یافته‌ها

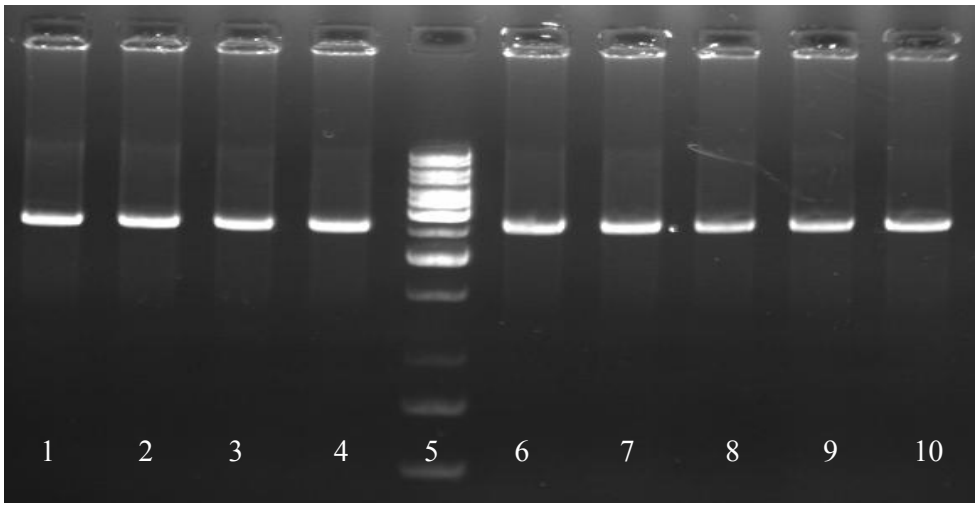
مرحله طراحی: در این مرحله نتایج طراحی اولیه با نرم افزار Gene runner بررسی شد (جدول۱) و هیچگونه مشکل و تداخل عمل آنزیمی در طراحی مشاهده نشد. براساس این طراحی جایگزینی تمام قطعات A تا G درپلاسمید pBGGT بصورت کلونینگ جهت‌دار (Directional Cloning) قابل انجام است. درطراحی پلی نوکلئوتیدهای F و R نیز نتایج مثبت بود و پیش‌بینی‌های لازم برای داشتن Overhang EcoRI و Overhang HindIII شده بود.

مرحله اتصال (Ligation): نتایج در مرحله اتصال نیز خوب بود و کلون‌های متعددی پس از ترانس‌فورمیشن بدست آمد. در مرحله آنالیز آنزیمی تعداد زیادی از کلون‌ها حاوی پلاسمید موردنظر بودند و بوسیله آنزیمهای NheI-ClaI-AgeI-BglII-MluI-XhoI و AflII خطی شدند (شکل ۲). از طرفی این پلاسمیدها بوسیله آنزیم‌های Sal I و BamH I خطی نشدند زیرا جایگاه‌های آنزیمی فوق در پلاسمید جدید وجود ندارد. در کل بررسی نتایج حاصل از هضم آنزیمی تأیید کننده جایگزینی سایت متعدد کلونینگ جدید در پلاسمید pUC19 بود. نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای و Reverse M13 و Forward تأیید کننده نهایی پلاسمید جدید بود. در این تحقیق ما به پلاسمید مطلوب خود برای ساخت سازه ژنی مورد نیاز در ژن درمانی رسیدیم. pBGGT در بانک ژن تحت شناسه DQ384617 به ثبت رسانده شد.

جدول ۱- بررسی قطعات ژنی A تا G از نظر وجود یا فقدان سایت برش آنزیم

Gene Fragments Enzymes	A	B	C	D	E	F	G
NheI	N	N	N	N	N	N	N
XhoI	N	N	N	N	N	N	N
AgeI	N	N	N	N	N	N	N
kpnI	N	N	N	N	N	N	N
MluI	C	N	N	N	N	N	C
BglII	C	C	N	N	N	C	C
SacI	C	N	N	N	N	N	C
AflII	N	N	N	N	N	N	N
XbaI	N	N	N	N	N	C	N
ClaI	N	N	N	N	N	N	N

N=Non cutter C=Cutter



۱.آنزیم Sac I ۲. آنزیم Afl II ۳. آنزیم Bgl II ۴. آنزیم NheI ۵. مارکر 1kb (Fermentas)
۶. آنزیم Xba I ۷. آنزیم Mlu I ۸.آنزیم XhoI 9. آنزیم Age I ۱۰. آنزیم Cla I

شکل ۲- هضم آنزیمی pBGGT با استفاده ازجایگاههای آنزیمی موجود در سایت متعدد کلونینگ

بحث

همانطور که درمقدمه ذکر شد در تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی گاهی پلاسمیدهای تجاری موجود جوابگوی نیاز محققین نمی باشد و استفاده از آنها سبب صرف وقت و هزینه زیاد می شود. در این تحقیق پلاسمید موردنظر در مرحله اول طراحی و سپس ساخته شد. در مرحله طراحی نکاتی رعایت شد که کارآمدی مراحل کلونینگ را افزایش و تعداد مراحل را به حداقل برساند. سایت متعدد کلونینگ پلاسمید متناسب با قطعات A تا G به گونه ای طراحی شد تا تمام قطعات فوق بصورت جهت‌دار کلون شوند. این امر سبب حذف مراحل تعیین جهت و عدم نیاز به استفاده از آنزیم‌های Klenow ، CIP و T4 Polynucleotide Kinase می‌شود. حذف این مراحل سبب صرفه جویی در وقت و هزینه پروژه شد. وجود EcoRI Overhang و HindIII در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ سبب حذف دو مرحله هضم آنزیمی در روند کار شد. استفاده از پلی‌نوکلئوتید F و R برای ساخت سایت متعدد کلونینگ نیاز به کارکردن (Handling) با قطعه DNA با سایز کوچک (74 bp) را مرتفع ساخت. کارکردن با قطعه DNA با سایز حدود 74 bp کار بسیار دشواری است و الکتروفورز کردن و استخراج از ژل (Gel Extraction) و تخلیص آن بسیار دشوار و هزینه‌بر است. در این تحقیق طراحی به گونه‌ای است که سایت متعدد کلونینگ خالص بدون نیاز به مراحل PCR و الکتروفورز و استخراج از ژل ساخته می شود.

درطراحی سایت متعدد کلونینگ برای افزایش کارآمدی آنزیم درعمل برش با توجه به نوع آنزیم و بر اساس جدول صفحه ۱۱۹ کاتالوگ ۲۰۰۳ Fermentas در کنار توالی هر سایت آنزیمی یک یا دو باز اضافی گذاشته شد. استفاده از بازهای اضافی درکنار سایت های برش باعث کارآمدی صد درصد آنزیم‌ها در زمان برش می‌شود و همانطور که درعمل دیده شد پلاسمیدها بطور کامل بوسیله همه آنزیم‌ها خطی شدند و پلاسمید هضم نشده باقی نماند. ضمناً در این مرحله دقت شد تا افزودن این بازها سبب ایجاد سایت آنزیمی جدید نشود. در طراحی سایت متعدد کلونینگ سعی شد از آنزیم-هایی که به متیلاسیون حساسند و نیاز به میزبان Dam^- دارند حتی الامکان استفاده نشود این امر باعث کاهش مراحل ترانس‌فورمیشن می‌شود. اکثر آنزیم‌های سایت متعدد کلونینگ دارای 5´Overhang هستند و تمامی مراحل ساب‌کلونینگ در این پلاسمید به صورت جهت‌دار قابل انجام است و نیاز به مرحله تعیین جهت نمی باشد (Directional Selection). در دو انتهای سایت متعدد کلونینگ آنزیم XhoI و NheI قرار داده شد تا برای تمام قطعات Non cutter باشند. سازه ژنی پس از ساخته شدن توسط آنزیم‌های فوق از پلاسمید جدا می‌شود لذا آنزیم‌های فوق بطور مکرر مورد استفاده قرار می‌گیرند و باید ارزان و در دسترس باشند تا هزینه پروژه به حداقل برسد.

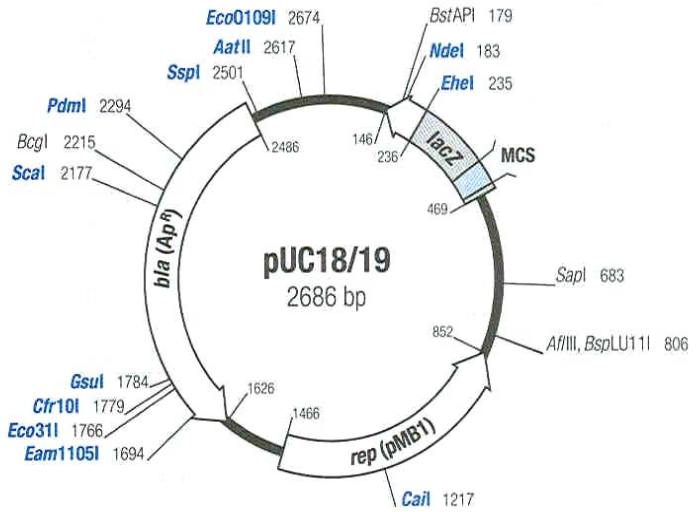
نتیجه‌گیری

درمجموع روش مورد استفاده در این تحقیق روش ساده و سریعی برای دسترسی به یک پلاسمید جدید با استفاده از پلاسمیدهای تجاری موجود است. در نهایت پلاسمید لازم جهت ساخت سازه ژنی مورد نیاز برای ژن درمانی ساخته و pBGGT or plasmid for beta globin gene (targeting) نامیده شد (شکل۳).

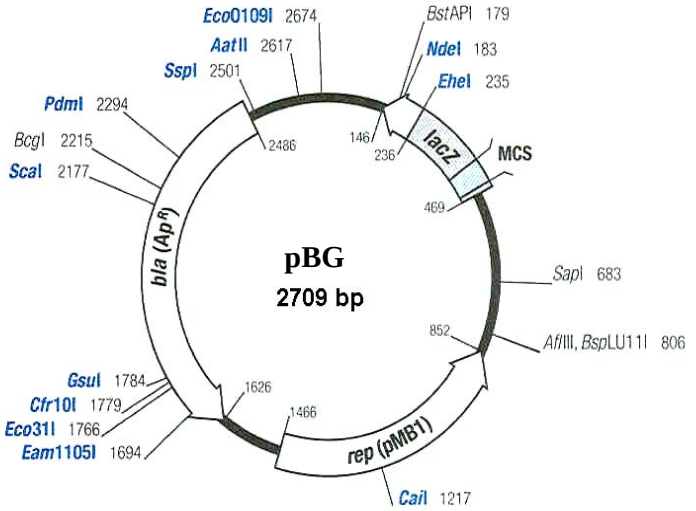
سپاسگزاری

با تشکر از مسؤلین محترم شبکه پزشکی مولکولی کشور که قسمت عمده هزینه این تحقیق را در قالب طرح ژن درمانی بتا تالاسمی پرداخت نمودند.

A



B



شکل ۳- A) نقشه پلاسمید pUC18/19، B) نقشه پلاسمید pBGGT

Design and constructing pBGGT Plasmid: a carrier plasmid for Betathalassaemia gene targeting

H Khanahmad; MD, Ph.D student, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran
K Azadmanesh; Ph.D of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran
MA Shokrgozar; Ph.D of Biotechnology, National Cell Bank of Iran, Pasteur institute of Iran.
AR Niavarani; Ph.D of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur institute of Iran.
M Karimi; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
B Rabbani; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
M Khalili; MSc cell & Mol biology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
R Bagheri; MSc Microbiology, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
F Maryami; MD, Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran
S Zeinali; Ph.D of Human Genetic, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran.

*Correspondence author, Address: Biotechnology research center, Pasteur Institute of Iran.
E-mail: sirouszeinali@yahoo.com

Received: 9/8/05
Revised: 21/2/06
Accepted: 10/3/06

Abstract

Background: Most of molecular biology studies depend on making gene constructs. Although commercial plasmids are widely used for this purpose, sometimes due to the nature of the restriction sites or need of multiple subcloning, usual restriction sites available in original multiple cloning sites (MCS) of the plasmids could not be easily used, if not impossible at all. Here, we report an easy and fast method to construct suitable plasmid with a new MCS for constructing a 16kb gene targeting plasmid.

Methods: Firstly, the suitable MCS was designed by studying the sequence of desired gene fragments in Gene runner software. Two partial complementary 74 base long oligonucleotides were designed and constructed to make this MCS. The original pUC19 MCS was replaced with the new one by enzymatic digestion of the plasmid and removal of the MCS, followed by adding the two complementary oligonucleotides and ligating the construct and transforming it into Ecoli TOP10 F'. The new plasmid was then purified and sequenced by M13 forward and reverse primers.

Findings: Synthesis of two 74 base polynuclotides was successful, and these polynucleotides formed a double stranded fragment which was successfully inserted between HindIII-EcoRI sites of pUC19. Analysis of intermediate step results showed successful progress of cloning reaction. Final analysis of the plasmid by restriction analysis and sequencing the MCS confirmed authenticity of the new plasmid.

Conclusions: The method described here is a fast and easy way to make suitable plasmid out of commercially available plasmids. This process can considerably decrease the time and cost of plasmid construction. Availability of suitable restriction sites in proper order makes it possible to directionally clone the desired gene fragments which is more efficient and excludes screening steps for the right direction of the fragments. The plasmid reported herein is specifically tailored to insert different fragments of a beta-globin gene targeting construct.

Key Word: pUC19, pBGGT, Gene targeting, Beta thalassemia.

REFERNCES

1. Weatherall DJ. Clinical features of the thalassaemia. In: Higgs GOR, Olivieri NF, Wood WG. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Italy, Blackwell science. 2001 Pp: 1a (287-96) 1b (150-64).
2. May C, Rivella S, Chadbum A, et al. Successful treatment of murine ß-thalassaemia intermedia by transfer of the human ß-globin gene. Blood. 2002; 99(6): 1902-8.

3. Debarah R, Rachmilewitz E. New trands in the treatment of ß-thalassaemia. Oncol Hematol. 2000; 33: 112-3.

4. Strachan T, Andrew P. Read Methods, for inserting and expressing a gene in a target cell or tissue. Human Molecular Genetics. 3rd ed. London, garland science. 2004 Pp:619-20.

5. Lu ZH, Books TJ, Kaufman MR, et al. Long targeting arms do not increase the efficiency of homologous recombination in the □- globin locus of murine embryonic stem cells. Blood. 2003; 102(4): 1531-4.

6. Primrose BS, Twyman MR, Old WR. Principles of gene manipulation. 6th ed. London, Blackwell Science Ltd. 2001 Pp:187-201.

7. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. PNAS. 2001; 98(15): 8403-10.

8. Hershfield V, Boyer HW, Yanofsky C, et al. Plasmid colEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. PNAS. 1974; 71(9): 3455-9.

9. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Biotechnol. 1992; 24: 188-92.

10. Covey C, Richardson D, Carbon J. A method for the deletion of restriction sites in bacterial plasmid deoxyribonucleic acid. Mol Gen Genet. 1976; 145(2):155-8.

11. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Biotechnol. 1977; 2(2): 95-113.

12. Hanahan D, Meselson M. Plasmid screening at high colony density. Methods Enzymol. 1983; 100: 333-42.

13. Twigg AJ, Sherratt D. Trans-compelementable copy number mutants of plasmid colEI. Nature. 1980; 283 (5743): 216-8.

14. Vieira J, Messing J. Production of single stranded plasmid DNA. Methods Enzymol.. 1987; 29(5): 484-7.