زمینه:

فعال‌کننده یوروکینازی پلاسمینوژن (UPA) و گیرنده سلولی آن (uPAR) به همراه پروتئاز متصل شونده به آن، سطح بیان بالایی در سلول‌های سرطانی دارا می‌باشند که بیان بالای آن نشانه‌ای مبتنی بر وجود تومورهای مختلف سرطانی در بدن انسان می‌باشد و به ندرت در سلول‌های طبیعی بدن بیان می‌شوند (۱ و ۲). uPA سرین پروتئاز موجود در سلول‌های یوکاریوتیک، کد کننده uPAR، اثر گذار بر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و نقش جابجایی در این سلول‌ها را دارا می‌باشد. uPA بصورت تک‌رشته‌ای (Pro-uPA) ترشح می‌شود (که فعالیت کمی دارد) و سپس توسط پلاسمین تبدیل به فرم دو رشته‌ای و فعال می‌گردد. این پروتئین‌ها فاقد دومین سیتوپلاسمی و گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (عامل اتصال آن به غشای سیتوپلاسمی) می‌باشند (۳ و ۴). آنتراکس پروتئینی با خاصیت سمی است که توسط باسیلوس آنتراسیس ترشح می‌شود. این توکسین متشکل از سه قسمت آنتی ژن محافظت کننده (*PA*)، عامل کشنده (*LF*) و عامل خیز بافتی (*EF*) می‌باشد (۵ و ۶). *PA* پروتئینی با وزن مولکولی kDa ۸۳ و متشکل از ۴ ناحیه (Domain) و از طریق انتهای کربوکسیل خود به گیرنده های سطح سلول متصل شده و باعث اتصال و ورود *LF* و *EF* به درون سلول می‌گردد (۷). در صورتیکه بتوان بر روی ژن کد کننده PA به نحوی جهش ایجاد کرد که پروتئین تغییر یافته بیان شده فقط به گیرنده های سطح سلولهای سرطانی مانند گیرنده uPA متصل گردد می تواند کاندیدی جهت درمان سرطان باشد. ایجاد جهش مستقیم (SDM) یک ابزار مهم در مهندسی ژنتیک بشمار می‌رود که می تواند با استفاده از واکنش PCR انجام شود. (۸ و ۹) پروتوکل‌های زیادی بدین منظور بیان شده است ولی در این بین یکی از روش‌هایی که توسعه زیادی پیدا کرده است، روش (SOE) Single Overlap Extension

PCR می‌باشد. (۱۰) هدف از این تحقیق ایجاد جهش در ژن *PA* و کلون کردن آن در *E_coli* به منظور بررسی اثر آن بر روی سلولهای سرطانی می باشد.

مواد و روش‌ها:

پلاسمیدها و سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد: سویه‌های باکتریایی عبارتنداز: *E.coli* سویه Top10 (انستیتو پاستور ایران) و *باسیلوس‌سوبتیلیس* دارای پلاسمید pMN1 حامل ژن *PA* (۱۱). تمام سویه‌ها بر روی محیط کشت LB Agar و LB Broth (SRL, India) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (100µg/ml) و کانامایسین (10µg/ml) (Sigma, USA) کشت داده شدند. پلاسمید PTZ57R (Fermentas, Lithuania) به عنوان T.vector مورد استفاده قرار گرفت.

خالص‌سازی پلاسمید و PCR :

استخراج و خالص سازی پلاسمید pMN1 از *باسیلوس سوبتیلیس* با استفاده از کیت (Intron,korea) انجام گرفت. جهت تکثیر ژن *PA* از پرایمر Fn با ترادف بازی 5' GTAGGATCCTAA AAAGGAGAACGTATATGA 3' و پرایمر Rn با ترادف بازی 5' TAGTCGACTGTTTAAAACATACTCTCCTTG 3' استفاده شد. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با ۵۰ نانو گرم پلاسمید ، ۱ واحد آنزیم EX Taq DNA polymerase (Takara, Japon) ، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها (Macrogene,Korea) ، ۰/۲ میلی مولار dNTP mix (Fermentas, Litunia) و ۱/۵ میلی مولار MgCl2 تهیه گردید. شرایط PCR شامل دناتوراسیون اولیه پلاسمید به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه و بعد از آن ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه ، ۶۸ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه در ۳۰ چرخه تکرار گردید. به منظور ایجاد جهش مورد نظر در قطعه بدست آمده از پرایمرهای فسفریله R1 با ترادف بازی

5´pTGGTGAGTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCTGG3´ وپرایمر H2 با ترادف بازی
5' pGGAAGTGGAAGATCAGCAAGTACAAGTGCTGGACCTACGGTTCCAG 3'
استفاده شد. PCR در حجم و برنامه مشابه قبل انجام شد فقط از دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمرها استفاده شد. با انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای Rn و F انتظار می رود قطعه حد واسط اول (با طول تقریبی 600bp) و با پرایمرهای Rn و H2 قطعه حد واسط دوم (با طول تقریبی 1800bp) بدست آید. با توجه به هم پوشانی مکمل ۲ قطعه (به طول 17bp) که ناشی از طول پرایمرها است، با یک واکنش PCR دیگر، با به کارگیری روش Overlapping extention PCR قطعه نهایی که ژن *PA* جهش یافته است، سنتز می گردد.

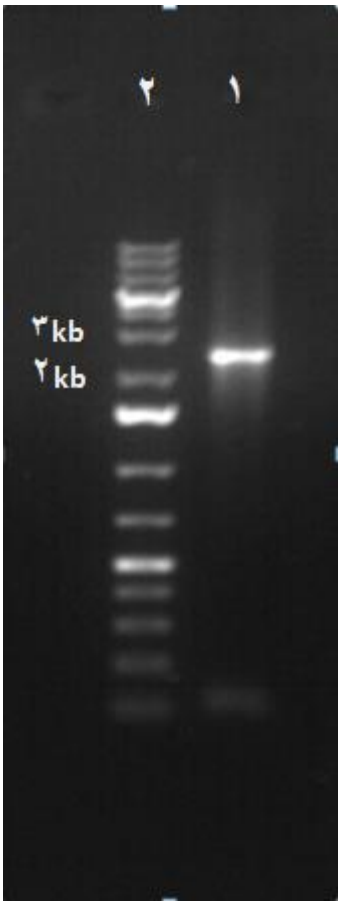
کلون کردن ژن *PA* در *E.Coli* :

جهت تهیه *E.coli* حاوی ژن *PA*، واکنش اتصال (Ligation) بین 500ng محصول PCR نهایی و T.Vector 200ng گذاشته شد و سپس با روش استاندارد استفاده از CaCl2 (۱۲) به *E.coli* انتقال داده شد. 100µl مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی آمپی‌سیلین (100µg/ml)، X_gal (30µg/ml) و IPTG (2mM) کشت داده شد. کلونی-های سفید رنگ، جداگانه کشت داده شد. سپس توسط واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی، کلونی‌های حاوی پلاسمید حامل ژن *PA* جداسازی و توسط شرکت Bio science تعیین ترادف بازی گردیدند. در آخر کلونی حامل ژن جهش یافته *PA* مشخص و جداسازی گردید.

یافته ها:

تکثیر و خالص سازی ژن *PA* با استفاده از روش PCR و بکارگیری شرایط بهینه صورت گرفت (شکل ۱). از PCR با

پرایمرهای جهش زا ، قطعات حدواسط با طول حدود 600bp و 1800bp بدست آمد(شکل۲ و ۳). دو قطعه بدست آمده با توجه به ترادف بازی پرایمرهای R1 وH2 مکمل یکدیگر بوده و دارای منطقه هم‌پوشان به طول 17bp هستند. قطعات هم‌پوشان بدست آمده با نسبت‌های مساوی از نظر مولاریته وارد واکنش PCR جدید گردیدند در این صورت احتمال اتصال قطعات به چند حالت وجود دارد: اول اینکه پس از دناتوره شدن دو رشته 600bp و 1800bp و هنگام دمای اتصال، ممکن است هر رشته با رشته مکمل خود بصورت مکمل درآید در این حالت هیچ تکثیری روی نخواهد داد. احتمال دیگر این است که دو رشته متفاوت در محل‌های هم‌پوشان با یکدیگر بصورت مکمل در آمده و با هم پیوند بخورند در این حالت تنها اتصالاتی توسط آنزیم پلی‌مراز قابل تکثیر خواهد شد که مکمل شدن دو رشته منجر به تولید دو انتهای آزاد 3´OH گردد. با اتصال این دو قطعه و انجام یک PCR دیگر، دو قطعه جهش‌دار بر اساس توسعه محل هم‌پوشان به یکدیگر متصل شده و ژن *PA* (۲۴۰۰bp) جهش یافته ایجاد می‌گردد. نتیجه اتصال و تکثیر این ژن بر روی ژل آگارز ۱% نشان داده شده است(شکل۴). از انتقال واکنش اتصال بین محصول PCR و T.Vector و کشت روی LB آگار حاوی X_gal _IPTG و آمپی‌سیلین، تعدادی کلونی آبی و سفید رنگ رشد کردند. پس از تهیه ماتریکس پلیت از کلنی‌های سفید و انجام کلونی PCR وجود ژن تأیید و در پی آن استخراج پلاسمید انجام پذیرفت. پس از تعیین سکانس و با توجه به بررسی آن تغییر اسید آمینه r به اسید آمینه p در موقعیت اسید آمینه ۱۹۳ تایید گردید.



شکل۱. ژل الکتروفورز *PA* تکثیر شده

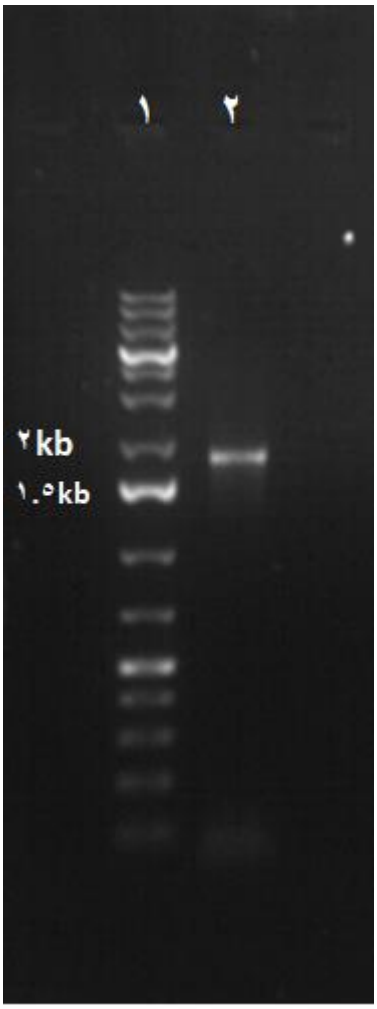
ستون ۱: مارکر 1kb (1kb O'Gene Ruler,Thermo Scientific)

ستون۲: محصول PCR انجام شده برروی پلاسمید pWB980 حاصل جفت پرایمر F-n و R-n

شکل۲. تصویر قطعه حد واسط 600bp

ستون ۱: : مارکر 1kb (1kb O'Gene Ruler,Thermo Scientific)

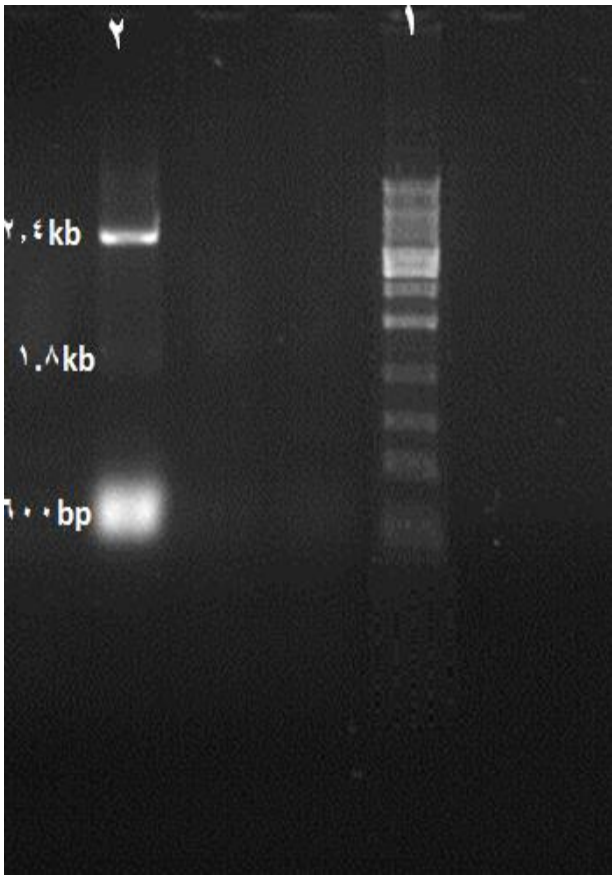
ستون2: الکتروفورز محصول PCR حاصل از جفت پرایمر F-n و R1



شکل۳. تصویر قطعه حد واسط 1800bp

ستون 1: مارکر 1kb (1kb O'Gene Ruler,Thermo Scientific)

ستون 2: الکتروفورز محصول PCR حاصل از جفت پرایمر R-n و H2



شکل۴. تصویر ژل الکتروفورز اتصال ۲ قطعه حدواسط 600bp و 1800bp

ستون 1: مارکر 1kb (1kb O'Gene Ruler,Thermo Scientific)

ستون ۲: محصول PCR اتصال ۲ ژن 600bp و 1800bp

بحث:

سولیوان (Sulivan) و همکاران در سال۱۹۸۴ روش جداسازی پلاسمید از باسیلوس را بر پایه استفاده از شیب غلظتی سزیوم‌کلراید- اتیدیوم‌بروماید (CsCl-EtBr) و روش جداسازی دیگری را با استفاده از جوشاندن ارائه نمودند. در این تحقیق جداسازی پلاسمید از باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از کیت انجام گرفت که نسبت به روش CsCl-EtBr ساده‌تر و کم هزینه‌تر می‌باشد. (۱۳). در سال ۲۰۰۳ هو و همکاران با ایجاد جهش در توکسین آنتراکس به بررسی اثر ضد توموری این توکسین جهش یافته پرداختند. آن‌ها از پرایمرهای ابتدایی و انتهایی با توالی

5´GTA GGT ACC TAA AAA GGA GAA CGT ATA TGA3´ و

5´ TAG TCG ACT GTT TAA AAC ATA CTC TCC TTG3´

بمنظور تکثیر و از پرایمرهای فسفریله با توالی

5´pTGGTGAGTTCGAAGATTTTTGTTTTAATTCTGG3´

و5´pGGAAGTGGAAGATCAGCAAGTACAAGTGCTGGACCTACGGTTCCAG3´

بمنظور جهش‌زایی استقاده نموده و با بهره‌گیری از روش PCR بسط هم‌پوشان در ژن PA جهش ایجاد کردند.

در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای ابتدایی و انتهایی طراحی شده و بهره‌گیری از پرایمرهای فسفریله میانی جهش‌زای ذکر شده در مقاله هو و همکاران و استفاده از روش PCR هم‌پوشان، توانستیم در ژن PA جهش ایجاد نماییم.

سولیوان و همکاران در سال ۱۹۸۴ از روش داویس و همکاران که در سال ۱۹۸۰ ارائه کردند برای ترانسفورماسیون *E. coli* استفاده کردند.(۱۳) آن‌ها همچنین از محیط مایع برای

انتخاب ترانسفورم شده‌ها استفاده کردند. اما در این مطالعه، از محیط جامد برای انتخاب ترانسفورم شده‌ها و به روش شوک $CaCl_2$ استفاده شد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین‌بار در ایران صورت پذیرفت. در این مطالعه توانستیم با موفقیت در ژن PA با استفاده از روش PCR هم‌پوشان (SOE PCR) جهش هدفمند ایجاد نماییم. با کلون و بیان این ژن می توان از پروتئین نوترکیب بدست آمده به عنوان یک کاندید جهت درمان سرطان استفاده کرد.

منابع:

1 Abi-Habib RJ, Singh R, Liu S, Bugge TH, Leppla SH, Frankel AE. A urokinase-activated recombinant anthrax toxin is selectively cytotoxic to many human tumor cell types. Molecular cancer therapeutics 2006;5:2556-62.

2. Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse W. The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. Blood 1994;84:1151-6.

3. Liu S, Aaronson H, Mitola DJ, Leppla SH, Bugge TH. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003;100:657-62.

4. Zhang J, Sud S, Mizutani K, Gyetko MR, Pienta KJ. Activation of urokinase plasminogen activator and its receptor axis is essential for macrophage infiltration in a prostate cancer mouse model. Neoplasia 2011;13:23-30.

5. Liu S, Bugge TH, Frankel AE, Leppla SH. Dissecting the urokinase activation pathway using urokinase-activated anthrax toxin. Proteases and Cancer: Springer; 2009:175-90.

6. Turnbull P. Introduction: anthrax history, disease and ecology. Anthrax: Springer; 2002:1-19.

7. Joshi A, Kate S, Poon V, et al. Structure-based design of a heptavalent anthrax toxin inhibitor. Biomacromolecules 2011;12:791-6.

8. An Y, Ji J, Wu W, Lv A, Huang R, Wei Y. A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR. Applied microbiology and biotechnology 2005;68:774-8.

9. Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nature protocols 2007;2:924-32.

10. Patel DH, Wi SG, Bae HJ. Modification of overlap extension PCR: A mutagenic approach. Indian Journal of Biotechnology 2009;8:183-6.

11. Moghbeli M, Malekzadeh F, Zeinali S, Parivar K, Mazaheri Assadi M. Cloning of protective antigen gene from Bacillus anthracis into Bacillus subtilis. koomesh. 2005; 6 (3) :201-206

12. Sambrok J, Russell D, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th ed.New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

13. Sullivan MA, Yasbin RE, Young FE. New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. Gene 1984;29:21-6.