رو ش‌های همسانه سازی ژن بدون آنزیم لیگاز

Gene Cloning Methods Without Ligase Enzyme

اصغر میرزائی اصل[۱*] و محمد رضا عبداللهی[۲]

چکیده

همسانه‌سازی قطعه DNA موردنظر داخل یک ناقل پلاسمیدی، یکی از مراحل تکنولوژی DNA نوترکیب است. در روش‌های معمول برای همسانه‌سازی به آنزیم لیگاز و آنزیم‌های برشی نیاز است که با محدودیت‌هایی مواجه هستند. راه‌کارهای متعددی برای ایجاد و اتصال دو قطعه DNA مستقل بدون استفاده از آنزیم لیگاز توسعه یافته‌اند که از موفق‌ترین آن‌ها فناوری‌های گیت‌وی و یوزرفرندلی هستند. فناوری گیت‌وی روشی سریع و مؤثر برای همسانه‌سازی بر اساس خصوصیت‌های نواحی ویژه نوترکیبی باکتریوفاژ لامبدا است. در این فناوری، اجزای سیستم نوترکیب این ویروس برای ایجاد یک سیستم کارآمدتر تغییر یافته‌اند. نوترکیبی بین نواحی ویژه اتصال رخ می‌دهد که دو طرف قطعه DNA را احاطه می‌کنند. در این فناوری توالی DNA مورد نظر ابتدا در یک ناقل به نام ناقل ورودی همسانه‌سازی می‌شود. پس از ایجاد کلون ورودی، انتقال قطعه DNA به ناقل‌های دیگر با واکنش نوترکیبی یک ساعته و بدون استفاده از آنزیم‌های برشی و آنزیم‌های اتصال دهنده لیگاز به‌راحتی انجام می‌گیرد. در فناوری یوزرفرندلی از آغازگرهایی استفاده می‌شود که دارای توالی ناقل هستند و یک نوکلئوتید داکسی اوریدین دارند و DNA هدف را با پلیمرازی نظیر تک پلیمراز تکثیر می‌کنند. محصول PCR با مخلوط آنزیمی ویژه‌ای تیمار می‌شودکه انتهای ´۳ تک رشته‌ای بر روی قطعات DNA تکثیر شده با PCR ایجاد می‌کند. با این عمل قطعات DNA داری دنباله‌های تک رشته‌ای طویل‌تر از محصولاتی هستند که با آنزیم‌های برشی ایجاد می‌شوند و برای اتصال به ناقل به آنزیم لیگاز نیازی نیست. با تغییر در طراحی آغازگرها در این روش همسانه‌سازی به راحتی دست‌کاری‌های مختلف DNA امکان‌پذیر است. در این مقاله به جنبه‌های کلیدی و مزایای این روش‌ها پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: همسانه‌سازی ژن، فناوری گیت‌وی، فناوری یوزرفرندلی

۱. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا،

۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

مقدمه

همسانه‌سازی یک قطعه DNA داخل یک ناقل پلاسمیدی، یکی از مراحل معمول تکنولوژی DNA نوترکیب است. در روش‌های معمول همسانه‌سازی به آنزیم لیگاز نیاز است که به‌طور کوولانسی انتهای سازگار قطعه DNA و پلاسمید خطی شده را به هم متصل کند و یک مولکول حلقوی تشکیل دهد تا قادر به تکثیر در داخل سلول میزبان شود. چنان‌چه همسانه سازی محصول PCR مورد نظر باشد، می‌توان آغازگرهایی طراحی نمود که سایت‌های برشی آنزیم-های خاصی را داشته باشد و پس از هضم آنزیمی محصول PCR، قطعات با انتهای چسبنده را به ناقل هدف منتقل نمود. همسانه‌سازی با انتهای صاف محصولات PCR نیز ممکن است، اما اغلب کارایی همسانه سازی پایین و حتی کار سخت‌تر است چرا که اغلب یک نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ محصولات PCR وجود دارد (Aslanidis and de Jong, 1990; Clark, 1988). برای حذف نوکلئوتید اضافی از انتهای ´۳ به استفاده از قطعه کلنو DNA پلیمراز نیاز است. همچنین ضروری است که مانع از تولید ناقل‌های غیر نوترکیب با تیمار الکالین فسفاتاز شد (Maniatis *et al.*, 1982). از طرفی فرایند همسانه‌سازی نیاز به استفاده از آنزیم‌های برشی دارد و هضم آنزیمی در همسانه‌سازی با محدودیت مواجه است. از جمله این‌که از هر آنزیم نمی‌توان استفاده کرد چرا که ممکن است داخل ژن را برش دهد. علاوه بر آن کارایی همسانه‌سازی با بزرگ بودن اندازه ژن اغلب پایین می‌آید.

بسیاری از پلیمرازهای DNA نظیر تک پلیمراز در انتهای ´۳ قادر به اضافه کردن یک نوکلئوتید به دنباله ´۳ انتهای صاف قطعات DNA هستند. آنزیم تک پلیمراز (Taq polymerase) به انتهای ´۳ DNA دو رشته ای از طریق فعالیت شبیه ترمینال ترانسفرازی نوکلئوتید آدنوزین اضافه می کند (Clark, 1988 and Hu, 1993). بیشتر محصولات PCR به‌وسیله آنزیم تک پلیمراز تولید می‌شوند، بنابراین دارای دنباله ´۳ باز آدنین خواهند بود. برای همسانه‌سازی مستقیم این محصولات PCR روشی پیشنهاد شد که نیاز به استفاده از ناقل‌های خطی T است. در این روش ناقل‌های PGEMT-T و PGEM-T Easy Vector با آنزیم EcoRV برش داده می‌شوند و به دو انتهای ´۳ آن‌ها تیمیدین اضافه می‌شوند. مکمل بودن دنباله‌های محصول PCR و ناقل، امکان اتصال محصول PCR را به ناقل T فراهم می‌سازد که این راه-کار به همسانه‌سازی TA معروف است (Holton and Graham, 1991; Marchuk *et al.*, 1991; Mead *et al.*, 1991; Zhou and Gomez-Sanchez, 2000). با اندک تغییراتی، این روش به‌طور عمومی قابل استفاده در همسانه-سازی شده است (Zhou *et al.*, 1995). همه قطعات DNA به‌جز آن‌هایی که دارای دنباله ´۳ هستند با تیمار با آنزیم تک-پلیمراز در حضور هر چهار dNTP انتهای با دنباله ´۳ آدنین به‌دست خواهند آورد. قطعات DNA حاصل از هضم آنزیمی که دارای دنباله انتهای ´۳ هستند، ابتدا با آنزیم DNA پلیمراز T4 انتهای آن‌ها صاف می‌شود و سپس با آنزیم تک پلیمراز تیمار می‌شوند.

روش‌های همسانه‌سازی بدون استفاده از آنزیم لیگاز نیز معرفی شده‌اند. در این روش‌ها قطعات با دنباله‌های ´۳ بلند (۱۰ تا ۱۲ نوکلئوتید) بر روی محصولات PCR ایجاد می‌شود که به‌طور اختصاصی به توالی DNA مکمل در ناقل پلاسمیدی متصل می‌شوند. و محصول حاصل به‌طور مستقیم به سلول‌های مستعد وارد می‌شوند. در این روش‌ها به آغازگرهای طولانی و تغییرات آنزیمی نیاز است (*آسلاندیز* و *دی یانگ*، 1990، Hsiao, 1993، Kaluz and Flint, 1994، Li and Elledge, 2012، Oster and Phillips, 2011، Rashtchian, 1995و *زو* و *گمز سانچز*، 2000). دو فناوری گیت‌وی (Walhout *et al.* 2000) و یوزرفرندلی (Bitinaite *et al.*, 2007) از روش‌هایی هستند که با موفقیت تجاری سازی شده‌اند و در تحقیقات متعددی از آن‌ها استفاده شده است که در این مقاله به هر یک از آن‌ها پرداخته می‌شود.

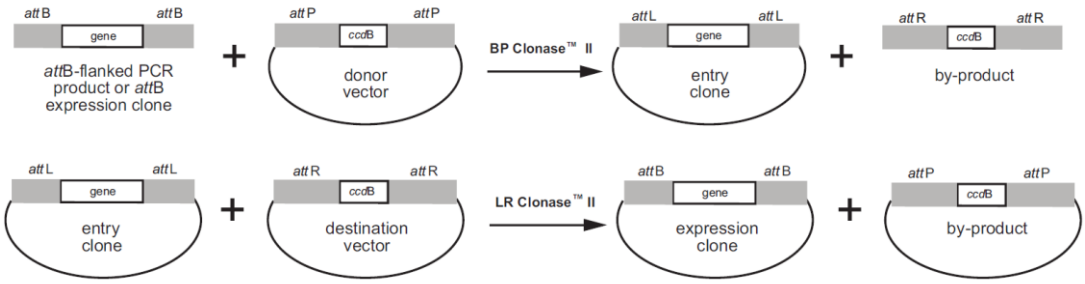
فناوری گیت‌وی

فناوری گیت‌وی (Gateway) که توسط شرکت این-ویتروژن (Invitrogen) ارایه شده است، محدودیت‌ها را در همسانه‌سازی از بین می‌برد. در این سیستم توالی DNA مورد نظر ابتدا در یک ناقل به نام ناقل ورودی همسانه‌سازی می‌شود. پس از ایجاد کلون ورودی (Entry clone) انتقال قطعه DNA به ناقل‌های دیگر با واکنش نوترکیبی یک ساعته و بدون استفاده از آنزیم‌های برشی و آنزیم‌های اتصال دهنده لیگاز به راحتی انجام می‌گیرد. واکنش نوترکیبی در حضور پروتئین‌هایی انجام می‌گیرد که به توالی‌های خاصی(*att*) متصل می‌شوند و آن‌ها را برش داده و اتصال کوولانسی با DNA دارند و موجب نوترکیبی می‌شوند. فناوری گیت‌وی روشی سریع و مؤثر برای همسانه‌سازی بر اساس خصوصی-های نواحی ویژه نوترکیبی باکتریوفاژ لامبدا است (Hartley *et al.*, 2000). در این فناوری، اجزای سیستم نوترکیب این ویروس برای ایجاد یک سیستم کارآمدتر تغییر یافته‌اند. مولکول DNA باکتریوفاژ لامبدا در مسیر لیزوژنیک در اثر

عمل نوترکیبی وارد کروموزوم سلول میزبان می‌شود که در این عمل توالی‌های خاصی از فاژ (*att*P) و کروموزوم باکتری (*att*B) دخالت دارند. این دو توالی دارای ناحیه‌های کوتاه یکسان ۱۵ جفت بازی می‌باشند که به توالی‌های مرکزی معروف هستند. البته توالی‌های اضافی در دو طرف توالی مرکزی نیز برای عمل ورود DNA فاژ به کروموزوم باکتری لازم هستند. برای انجام عمل نوترکیبی بین این توالی‌ها به وجود یکی از محصولات ژن فاژ لامبدا به نام اینتگراز (*int*) و پروتئین‌های دیگر میزبان (Integration Host Factor) نیاز است. آنزیم اینتگراز به‌طور اختصاصی توالی *att*P را شناسایی می‌کند (Thompson *et al.*, 1987) از آن‌جا که توالی‌های *att*P و *att*B از یکدیگر متفاوت هستند (به‌جز توالی ناحیه مرکزی)، در نتیجه نوترکیبی بین آن‌ها دو توالی تولید می‌شود که با هر یک از توالی‌های *att*P و *att*B در دو طرف ناحیه مرکزی متفاوت است. این توالی‌ها به نام‌های *att*L و *att*R شناخته می‌شوند. پروتئین ژن اینتگراز که موجب عمل نوترکیبی اختصاصی جایگاه‌های *att*P و *att*B می‌شود، قادر به انجام نوترکیبی بین *att*L و *att*R نیست، لذا نمی‌تواند سبب برش پروفاژ و جدایی آن از کروموزوم باکتریایی شود. زمانی‌که مسیر لیزوژنیک متوقف شده و فاژ وارد چرخه لیتیک می‌شود، محصول ژن دیگری (Excisionase) با پروتئین هدف *int* واکنش داده و سبب تغییر در اختصاصیت آن می‌گردد. به‌طوری که منجر به نوترکیبی دو توالی *att*L و *att*R می‌شوند که باعث جداسازی DNA فاژ از ژنوم باکتریایی می‌شود (Dale and Park, 2004). این واکنش‌های BP و LR پایه فناوری کلونینگ گیت‌وی هستند. در این فناوری، توالی-های تغییر یافته *att* به گونه‌ای است که توالی *att*B فقط با توالی *att*P واکنش می‌دهد برای مثال *att*B1 فقط با *att*P1 واکنش می‌دهد و یا *att*L1 فقط با *att*R1 واکنش می‌دهد. واکنش BP در حضور پروتئین‌های اینتگراز فاژ لامبدا و پروتئین‌های فاکتور الحاقی میزبان به نام مخلوط آنزیمی BP کلوناز و واکنش LR در حضور اینتگراز فاژ لامبدا، پروتئین-های فاکتور الحاقی میزبان و اکسیژناز (XIS) به نام مخلوط کلوناز LR انجام می‌گیرد. سه نوع ناقل در این روش طراحی شده و در دسترس است. ناقل بخشنده (Donor vector) که دارای توالی *att*P است که برای کلون کردن محصول PCR احاطه شده با توالی‌های *att*B به‌کار می‌رود. ناقل ورودی (Entry vector) که دارای توالی‌های *att*L است که برای کلون کردن قطعات DNA فاقد توالی‌های *att* استفاده می‌گردد. ناقل مقصد (Destination vector) که با ناقل ورودی در یک واکنش LR نوترکیب می‌شود تا ناقل بیانی ایجاد شود (شکل ۱). ناقل‌های مقصد عناصر لازم برای بیان ژن هدف در باکتری‌ها، گیاهان و یا پستانداران را دارند (Anonymus, 2006).

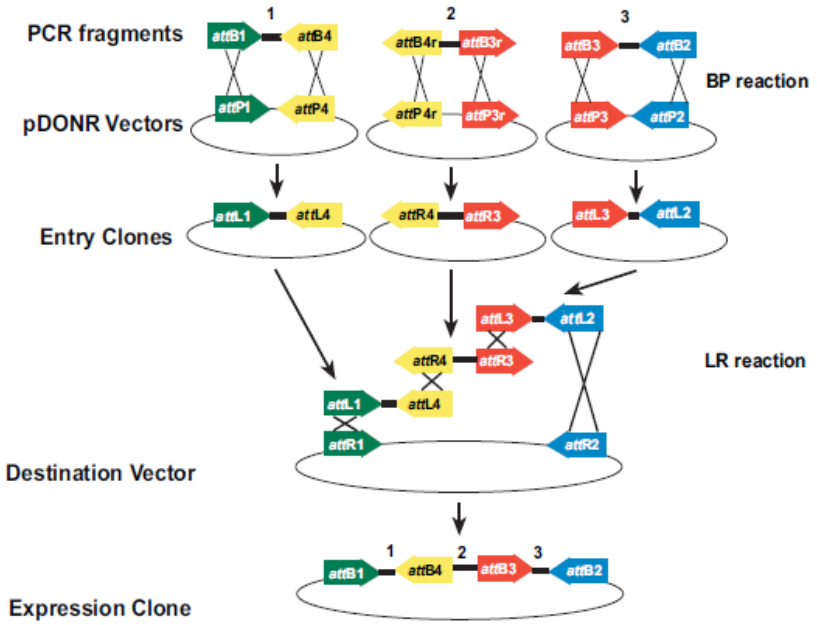
برای ایجاد کلون ورودی دو توالی *att*B1 و *att*B2 باید به آغازگرهای اختصاصی که برای تکثیر ژن مورد نظر استفاده می‌شوند، اضافه شوند. قطعه DNA با یک ناقل بخشنده ترکیب می‌شود که دارای توالی‌های *att*P1 و *att*P2 در دو طرف یک ژن گزینش‌گر ccdB می‌باشد. با اضافه کردن مخلوط آنزیمی کلوناز BP به واکنش، کلون ورودی ایجاد می‌شود. محصولات واکنش عبارتند از ناقل ورودی دارای قطعه مورد نظر که دو طرف آن را توالی‌های L1 و L2 احاطه کرده‌اند و هم‌چنین ژن گزینش‌گر ccdB که توالی‌های R1 و R2 در دو طرف آن، می‌باشند. حضور ژن ccdB امکان انتخاب منفی ناقل‌های بخشنده و مقصد در *E. coli* را بدنبال نوترکیبی و تراریختی فراهم می‌سازد. پروتئین CcdB با آنزیم DNAگیراز باکتری *E. coli* بر همکنش دارد و موجب می-شود تا بسیاری از سویه‌ها نظیر DH5α و TOP10 رشد نکنند. هنگامی‌که نوترکیبی در فناوری گیت‌وی رخ می‌دهد، ژن ccdB با ژن مورد نظر جای‌گزین می‌شود. سلول‌هایی که ناقل‌های غیرنوترکیب را دریافت نموده‌اند و یا مولکول DNA دارای ژن ccdB را حمل می‌کنند، رشد نخواهند کرد و این شرایط امکان کلونینگ با کارایی زیاد را امکان‌پذیر می‌سازد. این انتخاب منفی همراه با انتخاب مثبت برای نشانگر مقاومت به آنتی بیوتیکی است که اجازه رشد به سلول‌هایی می‌دهد که ناقل ورودی یا ناقل بیانی را دریافت کرده باشند.

توالی‌های *att* پالیندرومی نبوده و دارای جهت می باشند. هنگامی‌که جهت توالی *att* به گونه‌ای باشد که به سمت داخل قطعه نشان داده نشود با r مشخص می‌گردد. محصول واکنش‌های زنجیره ای پلیمرازی که برای مثال با *att*Br3 احاطه شده است در کلون ورودی *att*R3 خواهد بود (شکل ۲). پس از ایجاد ناقل ورودی، انتقال قطعه DNA مورد نظر از پلاسمیدی به پلاسمید دیگر و تهیه ناقل‌های بیانی به-طور مؤثر انجام خواهد گرفت (Anonymus, 2006).



شکل ۱: واکنش BP و LR در سیستم گیت‌وی. A) واکنش پایه BP بین ناقل دهنده و محصول PCR یا سایر کلون‌های دارای توالی‌های *att*B رخ می‌دهد. نوترکیبی بین توالی‌های *att*B و *att*P تولید توالی‌های *att*L و *att*R می کند. B) واکنش LR بین کلون ورودی و ناقل مقصد رخ می‌دهد. نوترکیبی بین سایت‌های *att*L و *att*R تولید سایت‌های *att*B و *att*P در پلاسمیدهای حاصل می‌کند. کلون بیانی که دارای محصول PCR است در سیستم بیانی استفاده می‌شود و پلاسمیدی که محصول فرعی است و دارای ژن گزینش‌گر *ccd*B است و مانع از رشد سلول‌های مستعد سویه mach1 می‌شود که آن را در تراریختی دریافت کرده باشند (*بی‌نام*، 2006).

Figure1. BP and LR reactions in Gateway technology. A) The BP reaction is the basis for the reaction between the donor vector (pDONR™) and PCR products or other clones containing *att*B sites. Recombination between *att*B and *att*P sites yields *att*L and *att*R sites. B) The LR reaction is the basis for the entry clone(s) × destination vector reaction.Recombination between *att*L and *att*R sites yields *att*B and *att*P sites on the resulting plasmids. The expression clone containing the PCR product is used in your expression system. The by-product plasmid contains the *ccd*B gene and prevents growth if taken up by Mach1™ T1R competent cells after transformation (Anonymous, 2006).



شکل ۲: سه محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که با توالی‌های *att*B یا *att*Br احاطه شده‌اند و سه ناقل گیت‌وی برای واکنش جداگانه برای ایجاد کلون‌های ورودی به کار رفته‌اند. کلونی‌های ورودی ایجاد شده و یک ناقل هدف در واکنش LR برای ایجاد یک کلون بیانی استفاده شده‌اند (بی‌نام، 2006).

Figure 2. Three PCR products flanked by specific *att*B or *att*Br sites and three MultiSite Gateway Pro Donor vectors are used in separate BP recombination reactions to generate three entry clones. The three entry clones and a destination vector are used together in a MultiSite Gateway® Pro LR recombination reaction to create your expression clone containing three DNA elements (Anonymous, 2006).

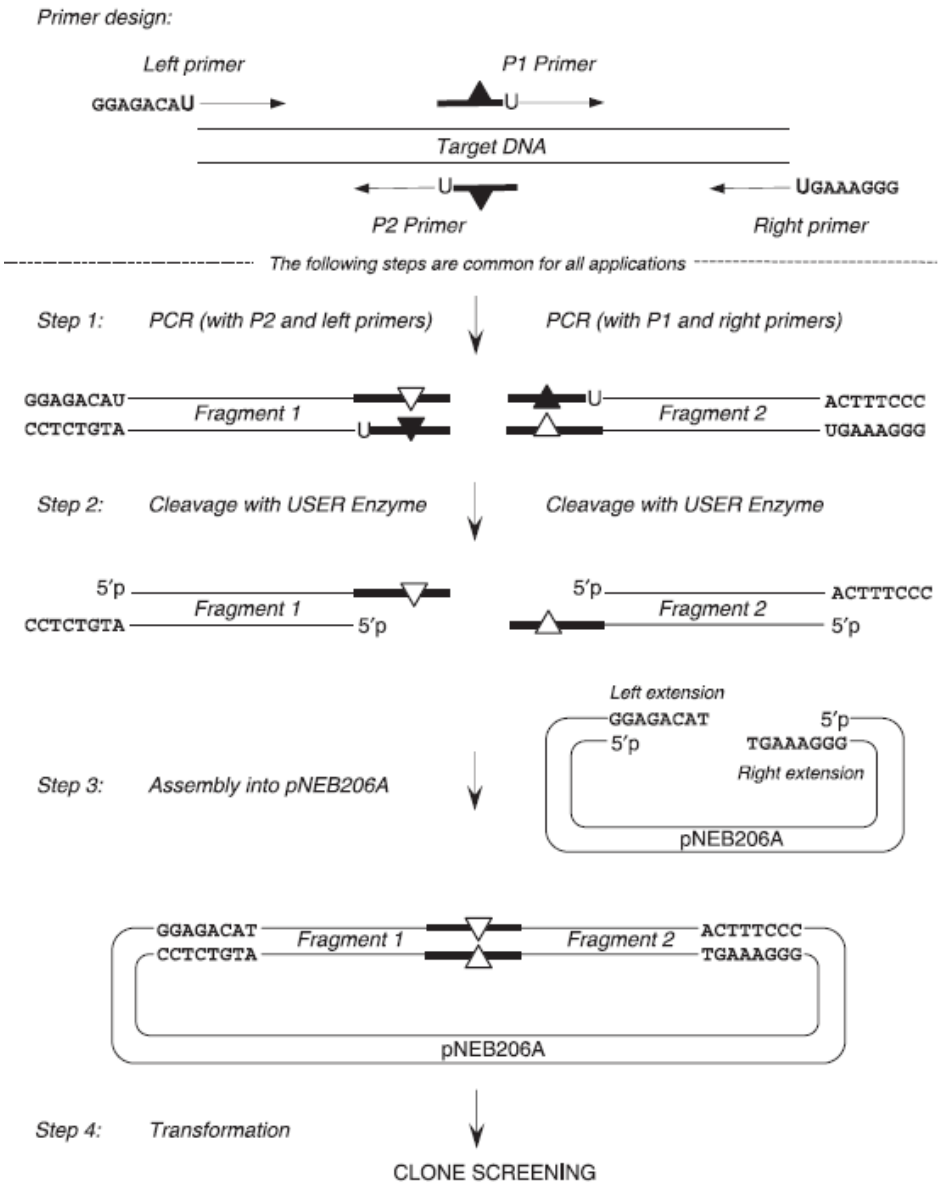
گیت‌وی چندگانه ساخت بسیار مؤثر و سریع یک کلون بیانی از دو، سه یا چهار قطعه DNA مورد نظر را تسهیل می‌کند. فناوری گیت‌وی چندگانه امکان همسانه‌سازی هم‌زمان چند قطعه DNA به‌ترتیب مشخص شده و منظم را فراهم می‌سازد. برای این کار نیاز به ایجاد کلون‌های ورودی به تعداد قطعات DNA مورد نظر است. در شکل ۲ گیت‌وی سه تایی نشان داده شده است. ابتدا سه کلون ورودی ایجاد می‌شود که با ناقل مقصد باهم در یک واکنش نوترکیبی LR شرکت می‌یابند. برای ایجاد هر یک از کلون‌های ورودی از واکنش نوترکیبی BP استفاده می‌شود که برای انجام این کار ابتدا توالی DNA مورد نظر با یکی از انواع توالی‌های *att*B احاطه شده و سپس در یک واکنش BP با ناقل بخشنده دارای توالی‌های *att*P شرکت می‌نمایند. به این‌ترتیب کلون‌های ورودی دارای قطعه اول با توالی‌های احاطه کننده L1-L4 و قطعه دوم با توالی‌های R3r-R4r و قطعه سوم با توالی‌های L4-L2 ایجاد می‌شوند. این سه کلون ورودی در یک واکنش LR با ناقل هدف با توال‌های R1-R2 قرار گرفته و هر سه قطعه در یک واکنش با هم وارد ناقل دوگانه می‌شوند (بی‌نام، 2006).

فناوری یوزر فرندلی

فناوری یوزر فرندلی نیز وابسته به آنزیم‌های برشی نیست و به آنزیم لیگاز برای وارد کردن محصول PCR به داخل ناقل نیاز ندارد. در عوض از آغازگرهایی استفاده می‌شود که توالی ناقل را شامل می‌شوند و یک نوکلئوتید داکسی اوریدین دارند و DNA هدف را با آنزیم تک‌پلیمراز تکثیر می‌کنند. واکنش PCR باید با آنزیم پلیمرازی نظیر تک پلیمراز (USER enzyme) انجام شود که بتواند یک داکسی آدنین در مقابل بازهای اوراسیل قرار دهد. محصول PCR با آنزیم یوزر تیمار می‌شود تا در انتهای ´۳ تک رشته‌ای شوند . این آنزیم نوکلئوتیدهای داکسی اوریدین‌ها را برای ایجاد انتهای ´۳ تک رشته‌ای بر روی قطعات DNA تکثیر شده با PCR حذف می‌کند. آنزیم یوزر مخلوطی از آنزیم اوراسیل DNA گلیکولاز و اندونوکلئاز *VIII* باکتری *E. coli* است (Jiang *et al.*, 1997; Lindahl *et al.*, 1977). این دو آنزیم یک شکاف در الیگونوکلئوتید دو رشته‌ای دارای یک داکسی اوریدین جفت شده با داکسی آدنین ایجاد می‌کنند. با این عمل دنباله‌های تک رشته‌ای ایجاد می‌گردد که طویل‌تر از محصولاتی هستند که با آنزیم‌های برشی ایجاد می‌شوند. تک رشته ایجاد شده مکمل خودش نیست و هم‌چنین تک رشته‌ای‌های دو طرفه قطعه نیز نسبت به همدیگر مکمل نیستند تا شرایط اتصال غیر اختصاصی ناحیه تک رشته‌ای فراهم گردد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است DNA هدف به‌عنوان دو قطعه واسطه هم‌پوشان در دو واکنش جداگانه تکثیر می‌شوند. آغازگر P1 و آغازگر راست برای تکثیر قطعه سمت راست و آغازگر P2 و آغازگر چپ برای تکثیر قطعه سمت چپ نیاز است. آغازگرهای هم‌پوشان P1 و P2 می‌توانند در محلی از توالی DNA انتخاب شوند که ایجاد موتاسیون در آن محل مورد نظر باشد، به‌نحوی که توالی مورد نظر تغییر یابد. دو آغازگر P1 و P2 از رشته‌های مخالف DNA هدف موجب واکنش می‌شوند و در ۶ تا ۱۰ نوکلئوتید انتهای ´۵ همدیگر را می‌پوشانند. هر آغازگر همپوشان دارای یک نوکلئوتید داکسی اوریدین است که توسط ناحیه هم‌پوشان در طرف ´۳ احاطه شده است. برای ایجاد قطعات سازگار با ناقل، آغازگرهای چپ و راست با هشت نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۵ طراحی می‌شوند. این هشت نوکلئوتید مشابه تک رشته‌های ایجاد شده در ناقل‌های سازگار با یوزرفرندلی نظیر ناقل pNEB206A هستند (شکل ۳)، به‌جز این‌که به‌جای نوکلوتید داکسی تیمین انتهای ´۳، در توالی آغازگر نوکلئوتید داکسی اوراسیل جای‌گزین شده است. پایین دست این هشت نوکلئوتید مطابق با توالی اختصاصی DNA هدف است. پلیمرازها یک آدنین به رشته در حال ساخت مخالف باز اوراسیل رشته الگو متصل می‌کنند. قطعات تکثیر یافته در واکنش PCR با آنزیم یوزر در بازهای اوراسیل برش می‌یابند و قطعاتی که در دو انتهای خود ´۳ تک رشته‌ای دارند، به‌دست می‌آید. ناقل خطی شده pNEB206A و قطعات PCR به‌طور مستقیم بهم متصل می‌شوند و مولکول مورد نظر حاصل می‌شود، به‌طوری‌که دنباله‌های ´۳ قطعات PCR از داخل مکمل یکدیگر هستند و از خارج انتهای ´۳ تک رشته‌ای قطعات مکمل تک رشته‌های ناقل خطی هستند. به‌دلیل ۶ تا ۱۰ نوکلئوتیدی بودن محل اتصال نیازی به آنزیم لیگاز نیست و واکنش اتصال و تولید محصول زیاد نوترکیب تضمین شده و با کارایی بالایی انجام می‌شود (*بیتینیت* و همکاران، ۲۰۰۷).

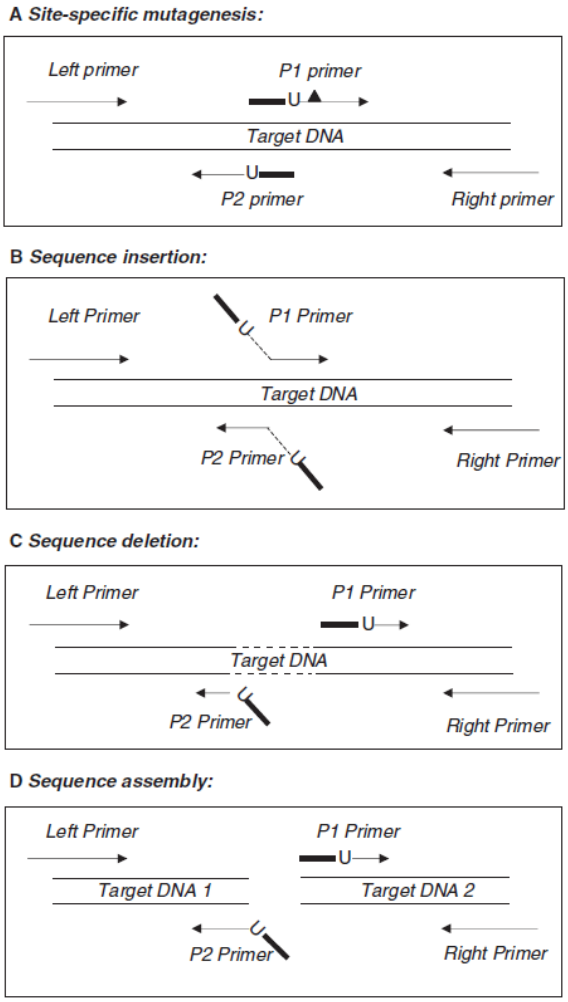
این روش همسانه‌سازی به راحتی قابل تطبیق با دستکاری‌های DNA مختلف است. در این حالت تنها چیزی که تغییر می‌یابد طراحی آغازگرها است و بقیه مراحل برای دستکاری‌های DNA یکسان است. با طراحی آغازگرهای هم‌پوشان P1 وP2 به‌طوری‌که دارای موتاسیون نقطه‌ای مورد نظر باشند (شکل ۴)، می‌توان توالی هدف را با ایجاد

موتاسیون نقطه‌ای بطور هم‌زمان کلون نمود. هم‌چنـین مـی-توان به توالی هدف بخشی را اضافه یا حذف نمود یا این‌که دو قطعه غیر هم‌پوشان را به هم متصل نمود (شکل ۴).



شکل ۳: شکل شماتیک روش مهندسی DNA به‌روش یوزفرندلی، خطوط با نوک پیکان آغازگرها هستند. خطوط ضخیم در آغازگرهای p1 و p2 و محصول PCR توالی‌های هم‌پوشان هستند. مثلث‌های سیاه در آغازگرها به موتاسیون‌های نقطه‌ای اشاره دارند و مثلث‌های سفید نتیجه موتاسیون در محصول PCR هستند. نوکلئوتید داکسی اوریدین با U مشخص شده است. توالی اختصاصی GGAGACAU در آغازگر چپ و توالی GGGAAAGU در آغازگر راست برای سازگاری با توالی ناقل pNEB206A طراحی شده‌اند (بیتینیت و همکاران، ۲۰۰۷).

Figure 3: Schematic description of the USER friendly DNA Engineering method. Lines with the arrowheads symbolize PCR primers. Boldface lines within the P1 and P2 primers and PCR products symbolize complementary overlapping sequences. Black triangles refer to the point mismatches in the primers and white triangles refer to the resulting mutations in the PCR products. dU is indicated by ‘U’. The specific sequences GGAGACAU in the left primer and GGGAAAGU in the right primer are designed for their compatibility with the vector pNEB206A sequence (Bitinaite *et al.*, 2007).



شکل ۴: آغازگرهای PCR برای دستکاری‌های DNA مختلف طراحی شده‌اند (بیتینیت و همکاران، ۲۰۰۷). دستکاری‌های DNA با مراحل ۱ تا ۴ شکل ۳ کامل می‌شود. (A) موتاسیون اختصاصی: توالی مورد نظر تغییر یافته با مثلث سیاه نشان داده شده است که در پایین دست باز اوراسیل در داخل آغازگر P1 یا P2 معرفی می‌شود. نوع دیگر موتاسیون در شکل ۳ نشان داده شده است که در ناحیه هم‌پوشان دو آغازگر قرار دارد. (B) وارد کردن توالی نوکلئوتیدی: توالی مورد نظر به انتهای ´۵ هر دو آغازگر اضافه شده است. (C) حذف توالی نوکلئوتیدی: ناحیه هم‌پوشان دو آغازگر P1 وP2 درست از مجاور ناحیه حذفی (محلی که با نقطه چین مشخص شده است) هستند. انتهای ´۵ آغازگر P1 مکمل آغازگر P2 است (D) سر هم کردن توالی: برای ایجاد هم‌پوشانی، مکمل توالی انتهای ´۵ یک آغازگر (P1) به انتهای ´۵ آغازگر دیگر (P2) اضافه می‌شود که برای اتصال دو قطعه DNA مستقل ضروری است.

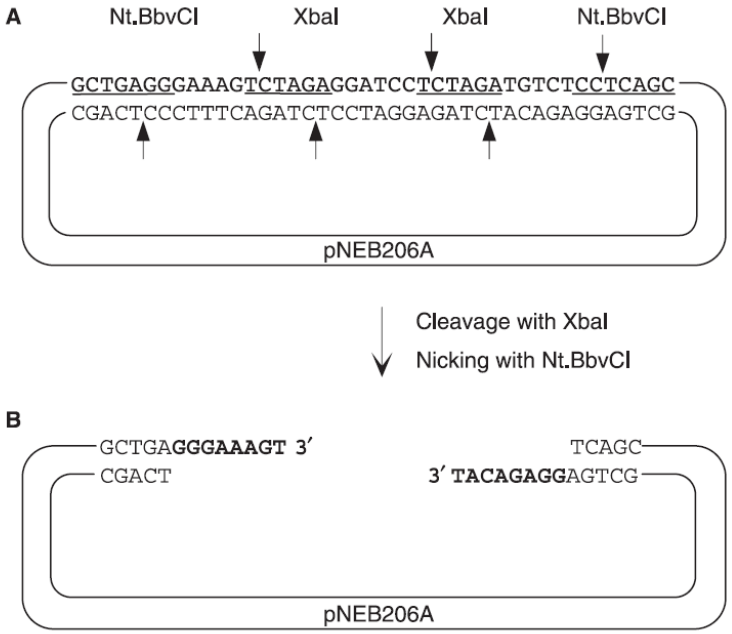
Figure 4: PCR primer design for various DNA manipulations. The indicated DNA manipulations are completed by performing steps 1–4 shown in Figure 3. (A) Site-specific mutagenesis. The desired sequence change, shown as a black triangle, is introduced downstream of dU into either of the overlapping primers P1 or P2. An alternative is shown in Figure 3 where sequence changes are introduced into the overlap sequence of both primers. (B) Nucleotide sequence insertion. The desired non-priming sequences are added to the 5’ ends of both primers (shown as angled lines). The overlapping sequence is created from the 5’ terminal 6–10 nucleotides of the insertion sequences (C) Nucleotide sequence deletion. The overlapping primers P1 and P2 prime distant locations precisely adjacent to the targeted deletion region (shown as a dotted line). To create the overlapping sequence, the 5’ end of one primer (P2) is supplemented by a non-priming sequence complementary to the 5’ end sequence of the other primer (P1). (D) Sequence assembly. A complimentary copy of the 5’ terminal sequence of one primer (P1) is added to the 50 terminus of the other primer (P2) to create the overlapping sequence necessary for joining two independent DNAs (Bitinaite *et al.*, 2007).

هیچ‌یک از پلیمرازهای طبیعی DNA نظیر Vent، Deep- Vent یا Pfu نمی‌توانند از آغازگرهایی که دارای باز اوراسیل هستند، محصول PCR تولید کنند (Greagg *et al.* 1999 and Lasken *et al.* 1996). این پلیمرازها یک ناحیه

اتصال باز اوراسیل دارندکه ادامه پلیمریزاسیون را بعد از یووریدین بلوکه می کند (*گریجو* همکاران، 1999 و Fogg *et al.* 2002). در روش یوزرفرندلی از پلیمراز تصحیح کننده PfuCx استفاده می‌شودکه میزان اشتباه PCR آن بسیار نادر است. آنزیم PfuCx پلیمراز DNA مشتق شده از Pfu است که از طریق دست‌کاری ژنتیکی به‌دست آمده است (*فاگ* و همکاران، 2002). علاوه بر آنزیم PfuCx پلیمراز دیگری که با یوزرفرندلی سازگار است، آنزیم تک پلیمراز است. اگر چه آنزیم تک پلیمراز میزان اشتباه زیادی دارد، اما در آزمایش‌های متعددی از ایجاد موتاسیون نقطه‌ای و اتصال ژن‌ها با روش یوزرفرندلی با موفقیت استفاده شده است.

بیش‌ترین تعداد قطعات PCR که با موفقیت در یک واکنش به هم متصل شده‌اند، هفت قطعه بوده است. کارایی سرهم کردن قطعات PCR تا حد زیادی بستگی به یگانه بودن توالی‌های نوکلئوتیدی در محل اتصال دارد. در برخی موارد انتخاب محل اتصال به دلیل محتوای ناخواسته آدنین/تیمین در DNA هدف محدود است. وقتی‌که بیش از ۵ قطعه PCR در یک واکنش سرهم می‌شوند، احتمال زیادی وجود دارد که محل اتصال‌ها به هم شباهت داشته باشند و قطعات نادرست به هم متصل شوند.

یک سری از ناقل‌های سازگار با یوزرفرندلی معرفی شده است. در این ناقل‌ها از گروه‌های شکاف دهنده اندونوکلئازی استفاده شده است که فقط یک رشته از دو رشته را در محل اختصاصی برش می‌دهند. توالی اختصاصی این آنزیم‌ها برای ایجاد محل ورود قطعه به ناقل استفاده می‌شود. ناقل pNEB206A (شکل ۵) با اتصال یک توالی دو رشته‌ای به سایت‌های *Pac*I و *Pme*I ناقل pNEB193 حاصل شده است در این ناقل توالی اختصاصی آنزیم شکاف دهنده *Nt.BbvCI* قرار دارد که هفت جفت باز CC↓TGAGG می‌باشد این آنزیم فقط یک شکاف در تک رشته دارای توالی شناسایی ایجاد می‌کند. توالی شناسایی این آنزیم در توالی‌های ناقل‌های همسانه‌سازی موجود نیست. هضم آنزیمی در ناقل pNEB206A با دو آنزیم *Nt.BbvC*I و *Xba*I ناقل را خطی نموده و آماده برای واکنش اتصال می‌نماید.



شکل۵: شکل شماتیک ناقل همسانه‌سازی pNEB206A (بنیتیت و همکاران، 2007). A) در ناقل pNEB206A توالی شناسایی XbaI و Nt.BbvCI با خط و محل‌های برش با فلش مشخص شده است. B) برای همسانه‌سازی یوزرفرندلی ناقل با دو آنزیم XbaI و Nt.BbvCI هضم آنزیمی می‌شوند تا ناقل خطی با تک رشته‌های ۳َ در دو طرف ایجاد شود.

Figure 5: Schematic representation of the pNEB206A cloning vector. (A) Within the cassette, XbaI and Nt.BbvCI recognition sequences are underlined;cleavage sites are shown by arrows. (B) For USER friendly cloning, pNEB206A is double-digested with XbaI and Nt.BbvCI to produce linearized vector flanked by 3’ single-stranded extensions on both ends.

بحث

انتقال ژن از طریق اگروباکتریوم تومه‌فاسینس (*Agrobacterium tumefaciens*) روشی موثر در بسیاری از گونه‌های گیاهی و قارچی است. در این روش ژن‌ها بین دو ناحیه راست و چپ T-DNA ناقل‌های دوتایی کلون می‌شوند. این ناقل‌ها معمولاً بزرگ بوده و همسانه‌سازی آن‌ها وقت‌گیر است. تکنیک‌های جدیدی برای رفع این مشکل ایجاد شده و در حال توسعه هستند. فناوری گیت‌وی پتانسیل زیادی برای همسانه سازی راحت‌تر و سریع‌تر فراهم نموده است. کریمی و همکاران (2002) مجموعه‌ای از ناقل‌های دوگانه سازگار با فناوری گیت‌وی تهیه کرده‌اند (کریمی و همکاران، 2002). این ناقل‌ها از پلاسمید اولیه pPZP200 (Hajdukiewicz *et al.* 1994) طراحی شده‌اند که پلاسمید کوچکی است و قادر به تکثیر در *E. coli* و آگروباکتریوم می‌باشد (کریمی و همکاران، 2002). به کارگیری این مجموعه از ناقل‌ها، انتقال ژن به گیاهان را ساده‌تر خواهد نمود و امکان استفاده از گیت‌وی چندگانه را نیز فراهم می‌سازد. کارایی و سادگی کار با این فناوری توسط میرزائی اصل و خدائی (2010) با انتقال سه قطعه پیش‌بر القا شونده با اتانول، ژن گزارش‌گر GUS و خاتمه دهنده OCS به طول تقریبی ۶۷۰۰bp به‌طور هم‌زمان با واکنش گیت‌وی چندتایی به ناقل دوگانه آگروباکتریومی بررسی شده است. در مقایسه با روش‌های مرسوم با استفاده از آنزیم‌های برشی و آنزیم‌های اتصال دهنده لیگاز، بسیار راحت‌تر و سریع‌تر انجام می‌گیرد. ناقل‌های ورودی متعددی با اهداف مختلف ارایه شده است. هم‌چنین ناقل‌های مقصد متنوعی برای آنالیز بیان و عملکرد ژن‌ها در سیستم‌های مختلف معرفی شده است. ناقل‌های مقصد دارای پیش‌بر برای بیان ژن در میزبان هستند. مزیت دیگر این فناوری ایجاد کتابخانه گیت‌وی است. با همسانه‌سازی توالی مورد نظر و ایجاد کلون ورودی می‌توان آن‌را به هر سیستم بیانی با یک واکنش ساده و بدون استفاده از آنزیم‌های برشی و لیگاز منتقل نمود و با نگهداری ناقل‌های تهیه شده، می‌توان امکان استفاده از آن‌ها را در سایر برنامه‌های همسانه‌سازی فراهم ساخت. در حال حاضر در مقاله‌های متعددی استفاده از این فناوری گزارش شده است (اکبری و همکاران، 2009 و Borges *et al.*, 2010). فناوری گیت‌وی گرایش جدیدی در بیولوژی مولکولی است که مشکلات سازگاری، کارایی و مطابقت همسانه‌سازی مرسوم را از بین می‌برد. این روش‌ها امکان انتقال قطعه DNA به ناقل و جابه‌جایی آن از ناقلی به ناقل دیگر را به راحتی فراهم می‌سازد.

مهم‌ترین مزیت فناوری یوزرفرندلی این است‌که هم-زمان با همسانه‌سازی دستکاری‌های مختلف DNA امکان-پذیر است. یکی از راه‌کارهای گسترش هم‌پوشانی به‌کارگیری PCR دو مرحله‌ایست. دو قطعه PCR واسطه با هم‌پوشانی در توالی‌های انتهایی تکثیر می‌شوند و سپس از طریق اتصال توالی‌های هم‌پوشان گسترش می‌یابند و تکثیر می‌شوند. در فناوری یوزرفرندلی برای ایجاد موتاسیون در توالی هدف، تنها چیزی که تغییر می‌یابد طراحی آغازگرها است. با طراحی آغازگرهای هم‌پوشان که دارای موتاسیون نقطه‌ای مورد نظر هستند با این کار می‌توان توالی هدف را با ایجاد موتاسیون نقطه‌ای به‌طور هم‌زمان کلون نمود (شکل ۴). روش‌های همسانه‌سازی گیت‌وی و یوزر فرندلی معرفی شده در این مرور می‌توانند زمینه لازم را برای مطالعه ژنوم موجودات و دستاوردهای بیشتر برای پژوهش‌گران فراهم ساخته تا بتوانند راحت‌تر به بررسی عمل ژن‌ها بپردازند.

Gene Cloning Methods Without Ligase Enzyme

Mirzaie-asl[1*], A. and Abdollahi[2], M. R.

Abstract

The cloning of a DNA fragment into a plasmid vector is a procedure in recombinant DNA technology. The most common methods for cloning require the use of DNA ligase and restriction enzymes which are less efficient. Different Ligation-free cloning methods have been developed in which of them, Gateway and USER friendly technologies have been commercialized. Gateway technology is a rapid and efficient method of cloning base on bacteriophage lambda site-specific recombination system. The components of the lambda recombination system are modified to improve the efficiency of the system. Recombination occurs between site-specific attachments. In this technology, a target fragment is cloned into a entry vector. Transfer of DNA from entry vector to other vectors easily can be done without any restriction enzymes and ligase in one hour recombination reaction. In the USER (**u**racil-**s**pecific **e**xcision **r**eagent) Friendly Cloning, vector-specific PCR primers which contain one uracil per primer are designed and the target DNA is amplified with *Taq* DNA polymerase. The resulting PCR products are treated with the special enzyme to create unique 3´ single-stranded extensions which can then anneal to the supplied linearized vector without ligation enzyme. By varying the design of the PCR primers, the protocol is easily adapted to perform DNA manipulations. In this review key aspects and advantages of these methods are discussed.

Keywords: Gene cloning, Gateway Technology, USER Friendly Technology

References

Akbari, O. S., Oliver, D., Eyer, K. and Pai, C. Y. 2009. An Entry/Gateway cloning system for general expression of genes with molecular tags in Drosophila melanogaster. BMC Cell Biology 10:10-8

Anonymus. 2006. MultiSite Gateway Pro: Using Gateway Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments. User Manual (Invitrogen Corporation.).

Aslanidis, C. and de Jong, P. J. 1990. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). Nucleic Acids Research 18:6069-6074.

Bitinaite, J., Rubino, M., Varma, K. H., Schildkraut, I., Vaisvila, R. and Vaiskunaite, R. 2007. USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. Nucleic Acids Research 35:1992-2002.

Borges, J. P., Culerrier, R., Aldon, D., Barre, A., Benoist, H., Saurel, O., Milon ,A., Didier, A. and Rouge, P. 2010. GATEWAY technology and E. coli recombinant system produce a properly folded and functional recombinant allergen of the lipid transfer protein of apple (Mal d 3). Protein Expression & purification 70:277-282.

Clark, J. M. 1988 .Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucleic Acids Research 16:9677-9686.

Dale, J., and Park, S. 2004. Molecular Genetics of Bacteria, 4 edn: Wiley.

Fogg, M. J., Pearl, L. H. and Connolly, B. A. 2002. Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. Nature Structural Biology 9:922-927.

Greagg, M. A., Fogg, M. J., Panayotou, G., Evans, S. J., Connolly, B. A. and Pearl, L. H. 1999. A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:9045-9050.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Moleular Biology 25:989-994.

Hartley, J. L., Temple, G. F. and Brasch, M. A. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Research 10:1788-1795.

Holton, T. A. and Graham, M. W. 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Res 19: 1156.

Hsiao, K. 1993. Exonuclease III induced ligase-free directional subcloning of PCR products. Nucleic Acids Research 21:5528-5529.

Hu, G. X. 1993. DNA Polymerase-Catalyzed Addition of Nontemplated Extra Nucleotides to the 3' End of a DNA Fragment. DNA Cell Biol 12: 763-770.

1. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali sina University, Hamedan.

2. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali sina University, Hamedan.

*: Corresponding author Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

Jiang, D., Hatahet, Z., Melamede, R. J., Kow, Y. W. and Wallace, S. S. 1997. Characterization of Escherichia coli endonuclease VIII. Journal of Biological Chemistry 272:32230-32239.

Kaluz, S. and Flint, A. P. 1994. Ligation-independent cloning of PCR products with primers containing nonbase residues. Nucleic Acids Research 22:4845.

Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in Plant Science 7:193-195.

Lasken, R. S., Schuster, D. M. and Rashtchian, A. 1996. Archaebacterial DNA polymerases tightly bind uracil-containing DNA. Journal of Biological Chemistry 271: 17692-17696.

Li, M. Z. and Elledge, S. J. 2012. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. Methods in Molecular Biology 852: 51-59.

Lindahl, T., Ljungquist, S., Siegert, W., Nyberg, B. and Sperens, B. 1977. DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry 252:3286-3294.

Maniatis ,T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning:A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor,New York.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. S. 1991. Construction of T-Vectors, a Rapid and General System for Direct Cloning of Unmodified Pcr Products. Nucleic Acids Research 19: 1154-1154.

Mead, D. A., Pey, N. K., Herrnstadt, C., Marcil, R. A. and Smith, L. M. 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. Biotechnology (N Y) 9:657-663.

Mirzaie-asl, A. and Khodaei, L. 2010. Application of multisite Gateway in a binary vector construct In 2nd National Biology Congress on Young Researchers.

Oster, C. J. and Phillips, G. J. 2011. Vectors for ligation-independent construction of lacZ gene fusions and cloning of PCR products using a nicking endonuclease. Plasmid 66(3):180-185

Rashtchian, A. 1995. Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. Current Opinion in Biotechnology 6:30-36.

Thompson, J. F., Moitoso de Vargas, L., Koch ,C., Kahmann, R. and Landy, A. 1987. Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway. Cell 50: 901-908.

Walhout, A. J., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S. and Vidal, M. 2000. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. Methods in Enzymology 328:575-592.

Zhou, M. Y., Clark, S. E. and Gomezsanchez, C .E. 1995. Universal Cloning Method by Ta Strategy. Biotechniques 19:34-35.

Zhou, M. Y. and Gomez-Sanchez, C. E. 2000. Universal TA cloning. Current Issues in Molecular Biology 2:1-7.