



## تکثیر ژن فیلیای گاوی غنی از GC به کمک بهینه سازی طراحی آغازگر

آزاده زحمت‌کش<sup>۱\*</sup>، سعید انصاری مهبیاری<sup>۲</sup>، مرتضی دلیری جوپاری<sup>۳</sup>، حمیدرضا رحمانی<sup>۴</sup>، ابوالفضل شیرازی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

<sup>۲</sup> استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

<sup>۳</sup> استادیار گروه زیست‌فناوری دامی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران.

<sup>۴</sup> استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

<sup>۵</sup> استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن‌سینا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶

### چکیده

فیلیا ژنی با اثرات مادری است و اختلال در کارکرد آن در موش منجر به کاهش باروری، و در انسان باعث سقط جنین می‌گردد. بررسی توالی رونوشت فیلیا در گاو در NCBI نشان می‌دهد که نسبت به اورتولوگ انسان و موش دارای درصد GC بالاتری است. این امر منجر به اختلال در تکثیر ژن در طی سیکل تکثیر PCR می‌گردد. مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی امکان تکثیر بخشی از رونوشت فیلیای گاوی با درصد بالای GC با بهینه سازی در طراحی آغازگر به اجرا درآمد. آغازگرها برای دو قطعه‌ی ۴۴۳ و ۲۳۰ جفت بازی از ژن مذکور طراحی شد به صورتی که فقط برای قطعه‌ی اول، دو شرط دمای ذوب بالا و اختلاف اندک دمای ذوب آغازگرها در نظر گرفته شد. بررسی بیوانفورماتیک از نظر وضعیت GC و ساختارهای ثانویه احتمالی این قطعات صورت گرفت. استخراج RNA از تخمک‌های جدا شده از تخمدان‌های گاوی انجام گرفت. پس از واکنش رونویسی معکوس، واکنش PCR با دماهای اتصال مختلف به صورت دو و سه مرحله‌ای صورت گرفت. نتایج نشان داد که قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی دارای یک جزیره‌ی CpG و درصد GC بیشتر و قابلیت تشکیل ساختارهای ثانویه پیچیده‌تری نسبت به قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی است. با این وجود تنها قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی که دارای آغازگرهای با ویژگی‌های مورد نظر بود، با باند مشخصی تکثیر گردید. نتایج نشان داد اختلاف اندک دمای ذوب آغازگرها، بالا بودن دمای اتصال آن‌ها و دو مرحله‌ای شدن واکنش می‌تواند در تکثیر اختصاصی توالی‌های غنی از GC مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ژن فیلیای گاو؛ درصد GC؛ جزیره‌ی CpG؛ ساختار ثانویه؛ دمای اتصال.

## مقدمه

شکل‌گیری ساختارهای ثانویه مانند ساختارهای سنجاق‌سری یا حلقوی در رشته‌ی الگو، همواره با مشکلات زیادی همراه بوده است ( McDowell *et al.*, 1998). روش‌های متعددی برای غلبه بر این مشکلات پیشنهاد شده است. استفاده از تکنیک‌های Touch-Down PCR، Hot-Start PCR، Slow-Down PCR، و یا بکارگیری هیدروکسید سدیم برای دناتوره کردن رشته‌ی الگو و همچنین بتائین و دی متیل سولفوکساید (DMSO) برای افزایش زمان اتصال آنزیم پلی-مرز به رشته‌ی الگو، از روش‌های پیشنهاد شده می‌باشند (Bachmann Agarwal & Perl, 1993; *et al.*, 2003; Sahdev *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008; Sepahvand *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010). بخش اساسی یک تکثیر موفق در PCR، آغازگرهای واکنش هستند و طراحی دقیق آن‌ها از لحاظ تشکیل ساختارهای سنجاق‌سری و یا تشکیل دوپلکس با خود و یا دایمر با آغازگر دیگر ضروری است (Chavali *et al.*, 2005). در بسیاری از آزمایشات تکثیر قطعات غنی از GC، مشکلاتی همچون دمای ذوب ( $T_m$ ) بسیار پایین، اختلاف بسیار زیاد دمای ذوب آغازگرها ( $\Delta T_m$ ) و در نتیجه اتصالات ناقص آغازگرها به رشته‌ی الگو به چشم می‌خورد که از دلایل اصلی عدم موفقیت تکثیر قطعات غنی از GC است. یکی از راهکارهایی که برای این مشکل پیشنهاد شده، افزایش دمای ذوب آغازگرها به بالای ۸۰ درجه سانتیگراد و کاهش اختلاف دمای ذوب آغازگرها به کمتر از ۱ درجه سانتیگراد می‌باشد (Li *et al.*,

بررسی ژنتیکی در موش منجر به شناسایی چندین ژن با اثرات مادری گردید که از آن‌ها می‌توان به فیلیا اشاره کرد. فیلیا در موش توسط یک ژن تک کپی با سه آگزون در کروموزوم ۹ کد می‌شود. پروتئین آن دارای ده تکرار از یک توالی ۲۳ اسیدآمینوای است که در نزدیکی انتهای کربوکسیل آن قرار دارد (Ohsugi *et al.*, 2008). بیان این ژن منحصراً در تخمک در حال رشد و رویان موش و نیز انسان شناسایی و گزارش شده است. ژن خاموش‌شده‌ی فیلیا در موش منجر به کاهش تعداد فرزندان به نصف حالت طبیعی یا هتروزیگوت می‌گردد. عدم حضور فیلیا باعث تأخیر در روند چرخه‌ی سلولی و اختلال در تکامل پیش از لانه‌گزینی می‌شود. جهش‌هایی در ژن فیلیای انسانی شناسایی شده است که بر سقط جنین‌های مکرر مؤثر است (Zheng & Dean, 2009; Parry *et al.*, 2011). رونوشت فیلیای گاو (XM\_002690018.2) با ارتولوگ آن در موش (NM\_025890.3) ۷۱ درصد و در انسان (NM\_001017361.2) ۷۵ درصد نوکلئوتید مشابه دارد (NCBI-BLASTn). اگرچه امروزه PCR بطور رایج برای تکثیر توالی‌های نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gibbs, 1990)، اما این روش نمی‌تواند رشته‌های دارای درصد‌های بالای GC (>۵۵) را به‌سادگی تکثیر نماید (Varadaraj & Skinner, 1994). به‌عبارت دیگر تکثیر قطعات غنی از GC در PCR به علت

پستانداران Khdc1/Dppa5/Filia/Ooep در پستانداران رحم‌دار<sup>۱</sup> (Pierre et al., 2007)، توالی ژن فیلیای گاو در پایگاه داده‌های NCBI بر روی کروموزوم ۹ آن واقع شده است. آغازگرهای واکنش بر اساس توالی mRNA پیش‌بینی‌شده فیلیا (XM\_002690018.2) با نرم‌افزار Oligo5 طراحی گردید. یک جفت آغازگر برای تکثیر یک قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی (باز +۸۳ تا +۵۲۵) با دو ویژگی  $T_m$  بالاتر از ۸۰ درجه سانتیگراد و  $\Delta T_m$  کمتر از یک درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. یک جفت آغازگر دیگر نیز بدون ویژگی‌های ذکرشده برای تکثیر یک قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی (باز +۱ تا +۲۳۰) طراحی شد. توالی آغازگرها و سایر اطلاعات مربوط به آن‌ها در جدول ۱ آمده است. برای بررسی دقیق‌تر وضعیت GC قطعات مورد تکثیر، دو توالی ۴۴۳ و ۲۳۰ جفت بازی در برنامه‌ی تحت وب CpG Plot (Rice et al., 2000) به فرمت فاستا وارد شد و نتایج مربوط به درصد GC در قسمت‌های مختلف توالی و احتمال وجود جزایر CpG در توالی‌ها به صورت نمودار ترسیم گردید. همچنین به کمک برنامه‌ی تحت وب Mfold (Zuker, 2003)، میزان شکل‌گیری ساختارهای ثانویه‌ی احتمالی در هر دو توالی مورد بررسی قرار گرفت. تخمدان‌ها به صورت تصادفی از گاوهای نژاد هلشتاین از کشتارگاه راک واقع در کرج جمع‌آوری و در مدت یک تا دو ساعت در محلول نرمال سالین با دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه

2011). از آنجا که ژن فیلیا در انسان و موش بر نرخ باروری مؤثر است، بررسی توالی آن در گاو جهت مطالعه‌ی اثر آن بر تولیدمثل گاوهای ماده مفید خواهد بود. میزان GC توالی رونوشت فیلیا در انسان (NM\_001017361.2)، موش (NM\_025890.3) و توالی پیش‌بینی شده‌ی آن در گاو (XM\_002690018.2) به ترتیب برابر ۵۶/۴، ۵۷/۹ و ۷۲ درصد در برنامه‌ی تحت وب GC Calculator محاسبه شده است. بالا بودن درصد GC در ارتولوگ گاوی مشکلاتی را در واکنش PCR به همراه خواهد داشت. تحقیقات نشان داده است که جایگاه‌های موجود روی کروموزوم‌ها مسئول تغییرات در صفات مهم اقتصادی هستند (Kharrati koopaei & Mohammadabadi, 2013) و در سال‌های اخیر زیست‌شناسی ملکولی تحولی شگرف در تحقیقات بوم‌شناسی پدید آورده است. لذا، هدف از این مطالعه تکثیر بخشی از ژن (رونوشت) فیلیای گاوی با درصد بالای GC به کمک بهینه‌سازی نحوه‌ی طراحی آغازگر و مراحل PCR می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در گروه زیست‌فناوری دامی در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست-فناوری تهران انجام گرفت. مواد شیمیایی عموماً از شرکت سیگما (آلمان) تهیه گردید و سایر موارد نیز در متن مشخص شده است. بر اساس توالی کل ژنوم گاو (Zimin et al., 2009) و تکامل گونه‌ای خانواده‌ی ژنی

<sup>1</sup> Eutherian mammals

جدا کردن سلول‌های کومولوس به کمک روش فیزیکی (یک تا دو دقیقه ورتکس) در گروه‌های ۵۰-۴۰ تایی تا زمان استخراج RNA به ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل گردید. استخراج‌ها به کمک کیت Qiagen RNeasy® (Germany) Plus Micro براساس دستور کار شرکت سازنده انجام گرفت.

منتقل شد. سپس فولیکول‌های دو تا هشت میلی-متری آسپیره گردیده و تخمک‌های دارای سیتوپلاسم یکپارچه به کمک پیپت در زیر میکروسکوپ نوری جداسازی شد و به ترتیب در قطره های ۲۰۰ میکرولیتری محیط های TCM (سه قطره) (Invitrogen, USA) و PBS (دو قطره) مورد شستشو قرار گرفت. تخمک‌ها پس از

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن فیلیا و اطلاعات مربوط به آنها.

Table 1- Filia gene primers' sequences and their related information.

درصد GC محصول	اندازه محصول (جفت باز)	حداکثر $\Delta G$ سنجاق سری (کیلوکالری بر مول)	حداکثر $\Delta G$ هتروداایمر (کیلوکالری بر مول)	حداکثر $\Delta G$ دوپلکس (کیلوکالری بر مول)	$T_m$ $\Delta$ (°C)	$T_m$ (°C)	درصد GC محصول	طول (جفت باز)	توالی (۵'-۳')	آغازگرها Primers
63.2	443	0.5	9.3	9.3	0.5	81.8	61.5	26	Ccaagc ggcccta ctggttcc actcc	اول- رفت First- forward
63.2	443	0	9.3	9.8	0.5	81.3	78.9	19	Cccggc ctcctgg actgcg	اول- برگشت First- reverse
59.6	230	0.7	6.2	9.3	1.2	65.6	62.50	16	atggcct ctcccaa gc	دوم- رفت Second- forward
59.6	230	0	6.2	6.2	1.2	66.8	55.56	18	Tgaacg tgaagca gggtc	دوم- برگشت Second- reverse

## RT-PCR

این آغازگرها به صورت معمول سه مرحله‌ای با دمای اتصال ۶۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. آغازگرهای دوم نیز در سه دمای اتصال مختلف در واکنش معمول سه مرحله‌ای برای تکثیر قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر با ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، یک میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی‌مراز پنج واحد در میکرولیتر (همگی خریداری شده از شرکت Fermentas, EU) در دستگاه ترموسایکلر Techne (England) انجام شد. محصولات واکنش در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد و پس از بررسی فرابنفش در دستگاه ژل‌داک، نتایج به صورت عکس ثبت گردید.

### نتایج و بحث

برنامه‌ی CpG Plot احتمال وجود یک جزیره‌ی CpG را در توالی ۴۴۳ جفت بازی نشان داد (باز ۱۳۲+ تا ۴۶۷+). همچنین مشخص گردید که در بخش‌هایی از هر دو توالی ۴۴۳ و ۲۳۰ جفت بازی، میزان GC بالاتر از ۶۰ درصد است و طول این ناحیه برای توالی ۴۴۳ جفت بازی بیشتر است (شکل ۱- الف و ب).

مقدار ۲۰ نانوگرم RNA استخراج شده در واکنش رونویسی معکوس به کمک کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis (Thermo-Scientific, USA) شامل یک میکرولیتر آغازگر رندوم هگزامر ۱۰۰ میکرومولار، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس ۲۰۰ واحد در میکرولیتر، یک میکرولیتر ممانعت‌کننده‌ی فعالیت RNase ۲۰ واحد در میکرولیتر، دو میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و چهار میکرولیتر بافر واکنش ۵X در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد تبدیل به cDNA شد. در واکنش PCR از آغازگرهای ژن خانه‌دار (کنترل) Histone H2a (رفت: 5'-ctggacgtggcaacaagg-3' برگشت: 5'-gcgggatgatacgggtctt-3') برای تکثیر قطعه‌ی ۲۴۰ جفت بازی جهت بررسی صحت واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. شرایط واکنش برای ژن‌های فیلیا و Histone H2a در جدول ۲ آورده شده است. آغازگرهای اول فیلیا که با در نظر گرفتن دوشروط  $T_m$  بالا و  $\Delta T_m$  کم طراحی شده بودند، در واکنشی دو مرحله‌ای برای تکثیر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی مورد استفاده قرار گرفتند، به این صورت که دمای اتصال آغازگرها با دمای بسط یا تکثیر یکسان (۷۲ درجه سانتیگراد) و به صورت کلی به مدت یک دقیقه در نظر گرفته شد. همچنین واکنش دیگری به کمک

جدول ۲- شرایط واکنش برای آغازهای اول و دوم ژن فیلیا و آغازگرهای ژن Histone H2a

Table 2- PCR condition for Filia first and second primers and Histone H2a primers.

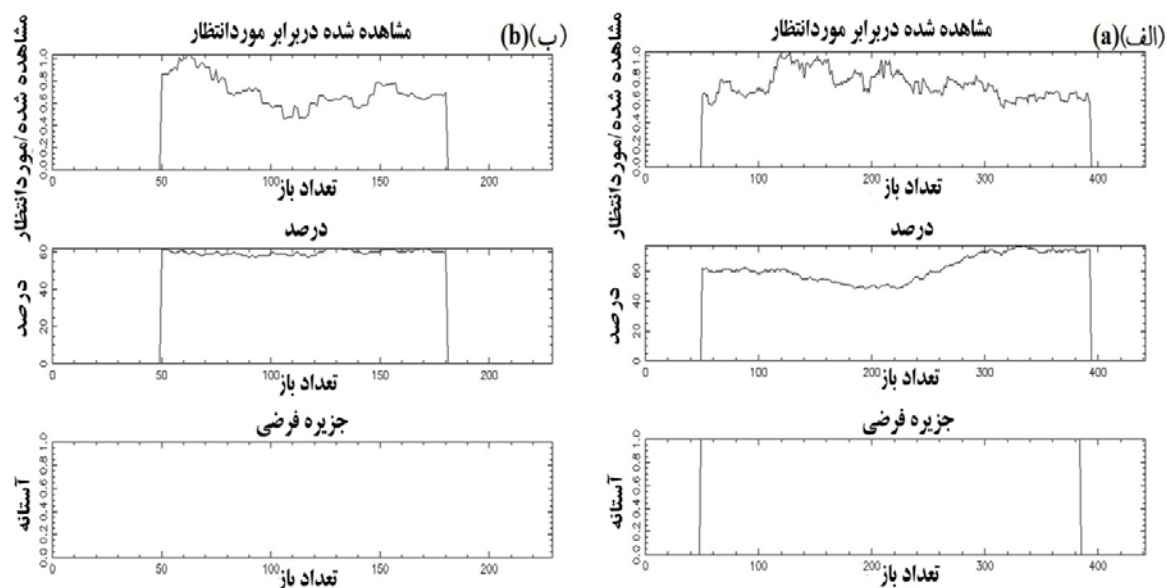
آغازگرهای Histone H2a Histone H2a primers	آغازگرهای دوم فیلیا Filia second primers	آغازگرهای اول فیلیا Filia first primers		چرخه cycle	مرحله Stage
		سه مرحله‌ای Three steps	دو مرحله‌ای Two steps		
94°C, 5 min	94°C, 5 min	96°C, 5 min	96°C, 5 min	1	واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation
94°C, 20 s	94°C, 45 s	96°C, 45 s	96°C, 45 s		واسرشت‌سازی Denaturation
58°C, 20 s	47 °C or 50 °C or 55°C, 40 s	65°C, 45 s	72°C, --	40	اتصال آغازگر Annealing
72°C, 20 s	72°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 1 min		تکثیر Extension
72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	1	تکثیر نهایی Final extension

شرایط واکنش است. واکنش PCR ژن کنترل Histone H2a به تکثیر قطعه‌ی ۲۴۰ جفت بازی انجامید که به صورت یک بانده کاملاً مشخص در ژل قابل مشاهده است (شکل ۳). تکثیر آن نشان-دهنده‌ی این است که واکنش رونویسی معکوس و سنتز cDNA از RNA استخراج شده به درستی صورت گرفته است. واکنش PCR به کمک جفت آغازگر اول ژن فیلیا منجر به تکثیر بانده کاملاً مشخصی از قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی در هر دو واکنش دو و سه مرحله‌ای گردید، ولی در واکنشی که به کمک آغازگرهای دوم صورت گرفت، در هیچ کدام از دماهای اتصال تکثیر مشخصی صورت نگرفت و تنها بانده بسیار ضعیفی در دمای اتصال ۴۷ درجه سانتیگراد

درصد بالای GC احتمال شکل‌گیری ساختارهای ثانویه و ایجاد اختلال در تکثیر در واکنش PCR را افزایش می‌دهد. نتایج برنامه‌ی Mfold نشان داد که احتمال شکل‌گیری ۳۵ ساختار ثانویه برای قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی و ۱۳ ساختار ثانویه برای قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی وجود دارد که مقاوم‌ترین آن‌ها به ترتیب برای قطعه‌های ۴۴۳ و ۲۳۰ جفت بازی دارای انرژی ( $\Delta G$ ) برابر با ۹۳/۶۶- (شکل ۲-الف) و ۴۶/۳۷- (شکل ۲-ب) کیلوکالری بر مول می‌باشند. این ساختارها در صورت شکل‌گیری در شرایط واکنش PCR، در عملکرد آنزیم پلی‌مراز و نیز اتصال آغازگرها به رشته‌ی الگو تداخل ایجاد می‌کنند. بنابراین برای بهبود تکثیر نیاز به بهینه‌سازی

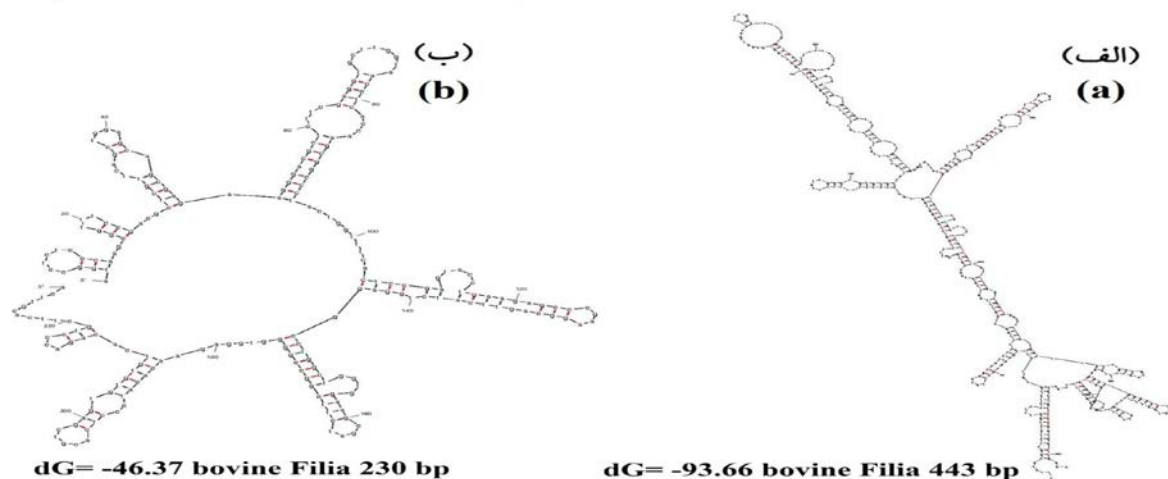
سانتیگراد به ۶۵ درجه سانتیگراد نسبت داد. بنابراین با توجه به واکنش دومرحله‌ای تکثیر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی می‌توان گفت کاهش زمان اتصال آغازگر در مورد توالی‌های غنی از GC در رشته‌ی الگو، تکثیر اختصاصی و بهتر قطعه‌ی موردنظر را با باند اسمیر کمتر تضمین می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی توالی غنی از GC انسانی انجام شده نیز این مطلب اثبات شده است (Mamedov *et al.*, 2008).

حاصل شد (شکل ۳). در واکنش سه‌مرحله‌ای با آغازگرهای اول، کشیدگی بیشتر و نیز یک باند کوچکتر در ناحیه‌ی بین ۳۰۰ و ۴۰۰ جفت باز مشاهده شد. بررسی بلاست آغازگر (-NCBI Primer-BLAST) در ژنوم گاو علاوه بر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی در ژن فیلیا، قطعه‌ی دیگری نیز با طول ۳۷۱ جفت باز در همین ژن نشان می‌دهد. دلیل تکثیر آن در واکنش سه‌مرحله‌ای در مقایسه با واکنش دومرحله‌ای را می‌توان به افزایش زمان اتصال آغازگر و کاهش دمای آن از ۷۲ درجه



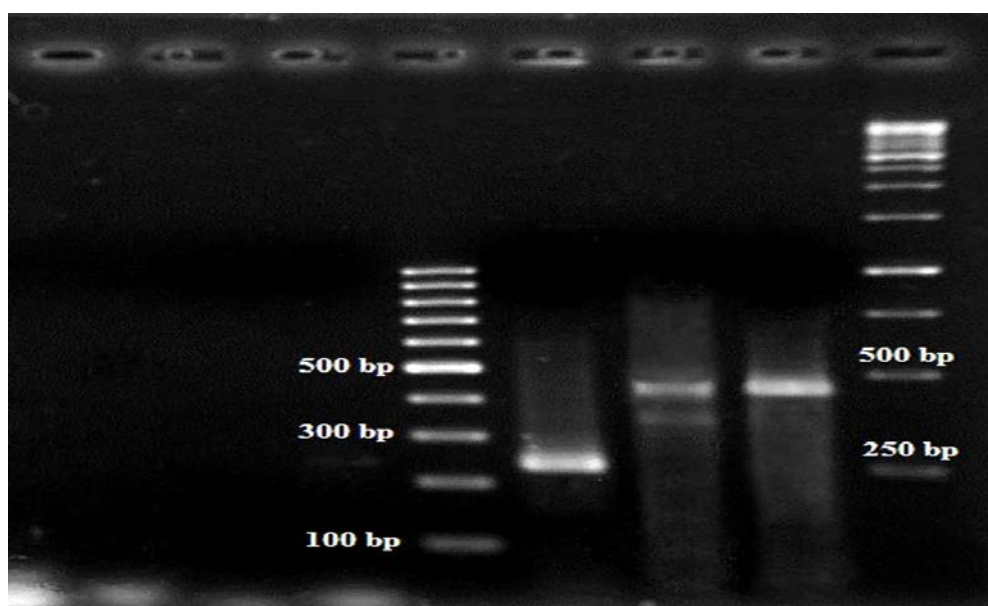
شکل ۱- نتیجه برنامه‌ی CpG Plot برای دو قطعه‌ی ۴۴۳ (الف) و ۲۳۰ (ب) جفت بازی. پیش فرض - های ارزیابی: نسبت مجموع G و C مشاهده‌شده به CpG موردانتظار  $< 0/6$ ، درصد  $G+C < 50$ ، طول جزیره‌ی CpG  $< 200$  جفت باز.

Figure 1- CpG plot results for 443 (a) and 230 (b) bp fragments. Evaluation defaults: Observed/Expected ratio  $> 0.60$ , Percent C + Percent G  $> 50.00$ , Length  $> 200$ .



شکل ۲- نتیجه‌ی برنامه‌ی Mfold. مقاوم‌ترین ساختارهای ثانویه‌ی احتمالی برای دو قطعه‌ی ۴۴۳ (الف) و ۲۳۰ (ب) جفت بازی با  $\Delta G$  به ترتیب برابر با  $-۹۳/۶۶$  و  $-۴۶/۳۷$  کیلوکالری بر مول.

Figure 2- Mfold results. The most stable possible secondary structures for 443 (a) and 230 (b) bp fragments with  $\Delta G$  of -93.66 and 46.37 kcal/mol respectively.



شکل ۳- واکنش PCR ژن‌های فیلیا و Histon H2a. به ترتیب از راست: نشانگر اندازه یک کیلوبازی، قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی فیلیا (واکنش دومرحله‌ای)، قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی فیلیا (واکنش سه‌مرحله‌ای)، قطعه‌ی ۲۴۰ جفت بازی Histon H2a. نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی، قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی فیلیا (دمای اتصال ۴۷ درجه سانتیگراد)، توالی ۲۳۰ جفت بازی فیلیا (دمای اتصال ۵۰ درجه سانتیگراد، عدم تکثیر)، توالی ۲۳۰ جفت بازی فیلیا (دمای اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد، عدم تکثیر).

Figure 3- PCR amplification results for Filia and Histon H2a genes. Right to left: 1 kb DNA ladder, Filia 443 bp fragment (2-stage reaction), Filia 443 bp fragment (3-stage reaction), Filia 230 bp fragment (annealing temperature: 47 °C), Filia 230 bp sequence (annealing temperature: 50 °C, no amplification), Filia 230 bp sequence (annealing temperature: 55 °C, no amplification).



آزمایش بدون نیاز به این ترکیبات و با افزایش  $T_m$  و در نظر گرفتن شرایط مربوط به  $\Delta T_m$  و نحوه‌ی تکثیر، نتیجه‌ی مطلوب حاصل گردید. همچنین پلی‌مرازهای قدرتمندی مانند *Taq*، *Gold*، *LA Taq* و *Hot-Start Taq*، در برخی موارد استفاده شده است (Henke et al., 1997). چنین روش‌هایی که نیاز به افزودن ترکیبات بهبوددهنده‌ی تکثیر دارند هزینه‌بر هستند در صورتی‌که با طراحی دقیق‌تر آغازگرها و تنظیم شرایط واکنش می‌توان بدون صرف هزینه به‌هدف موردنظر دست یافت. در مطالعه‌ی حاضر به‌کمک طراحی ویژه‌ی آغازگر و انجام واکنش PCR به-صورت دو مرحله‌ای و تنها با آنزیم *Taq* پلی‌مراز، تکثیر ناحیه‌ی غنی از GC ژن فیلیا ممکن گردید. در این طراحی، هیچ‌کدام از ویژگی‌های مربوط به طول آغازگرها، درصد GC آن‌ها و ساختارهای ثانویه‌ی آن‌ها (دوپلکس، هترودایمر، سنجاق-سری) در نظر گرفته نشد. با این حال تکثیر قطعه‌ی موردنظر با ضخامت باند مطلوبی صورت گرفت که نشان‌دهنده‌ی مؤثر بودن نحوه‌ی طراحی آغازگر است و افزایش دمای اتصال و دو مرحله‌ای شدن واکنش نیز به بهبود تکثیر کمک کرده است. سه مشکل اصلی در تکثیر توالی‌های دارای درصد بالای GC در پروتکل‌های معمول سه‌مرحله‌ای عبارت است از واسرشت‌سازی ضعیف در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، دسترسی ضعیف آغازگرها به رشته‌ی الگو به دلیل شکل-گیری ساختارهای ثانویه و بسط و تکثیر ضعیف

به‌طور کلی علت تکثیر نامناسب توالی‌های غنی از GC اختلال در واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر و بسط این قطعات است. روش‌های متعددی از جمله افزودن ترکیبات آلی و کاربرد پلی‌مرازهای قوی در واکنش برای چیره شدن بر این مشکل و کاهش ثبات دورشته‌ی DNA الگو طراحی شده است. هرچند عملکرد این ترکیبات غیرقابل پیش‌بینی است و حتی با وجود این ترکیبات، تکثیر توالی‌های غنی از GC در بسیاری از موارد ناموفق است (Sahdev et al., 2007). توالی‌هایی که دارای نوکلئوتیدهای تکراری G هستند، به‌دلیل افزایش پیوندهای هیدروژنی بین گوانین‌های همسایه، ساختارهای ثانویه پیچیده-ی درون رشته‌ای و بین رشته‌ای ایجاد می‌کنند (Gellert et al., 1962). پدیده‌ی مذکور در PCR با حضور باندهای کوتاه‌تر در ژل آگارز مشخص می‌شود. این قطعات تکثیری کوتاه‌شده نتیجه‌ی وجود ساختارهای سنجاق‌سری در رشته‌ی الگو می‌باشد که منجر به توقف کارکرد پلی‌مراز می‌گردد (Sahdev et al., 2007). در بسیاری از مقالات به کاربرد ترکیباتی همچون بتائین، DMSO، اتیلن‌گلیکول و ۲،۱- پروپان‌دیول جهت تسهیل جداسازی دو رشته‌ی DNA از طریق تغییر خواص ذوب ( $T_m$ ) آن اشاره شده است (Zhang et al., Dutton et al., 1993; Spink et al., 2009; Seifi et al., 2012). همه‌ی این ترکیبات از طریق کاهش  $T_m$  عمل می‌کنند (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2009) که در این

با توجه به نتایج بیوانفورماتیک مشخص شد که قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی درصد GC بیشتر و قابلیت تشکیل ساختارهای ثانویه‌ی بیشتر و پیچیده‌تری نسبت به قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی دارد. همچنین احتمال وجود جزیره‌ی CpG تنها در قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی وجود دارد. این نتایج نیز نشان می‌دهد که تکثیر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی نسبت به ۲۳۰ جفت بازی در واکنش PCR مشکل‌تر خواهد بود، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر با بهینه‌سازی طراحی آغازگر به راحتی تکثیر این قطعه صورت گرفت. بیشتر ژن‌های خانه‌دار، ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور و ۴۰ درصد ژن‌های اختصاصی بافتی دارای جزایر CpG در محدوده‌ی شروع رونویسی و یا ناحیه‌ی اگزونی هستند (Larsen et al., 1992) که باعث می‌شود توالی‌های DNA کمتر برای تکثیر در دسترس قرار گیرند. در ژنوم یوکاریوت‌ها ۶۰-۹۰ درصد نوکلئوتیدهای CpG متیله هستند. این متیلاسیون شامل جزایر CpG نمی‌شود. نوکلئوتیدهای CpG درون این جزایر اساساً غیرمتیله هستند و در ژن‌های فعال حضور دارند (Clark & Melki, Singal & Ginder, 1999); CpG جزیره‌ی (2002; Hubé et al., 2003). شناسایی شده، ناحیه‌ی پس از نقطه‌ی آغاز ترجمه و بخش اگزونی ژن فیلپا را در بر می‌گیرد. این امر نشان‌دهنده‌ی اهمیت ژن فیلپا به عنوان یک ژن فعال اختصاصی تخمک در گاو است. همچنین نشان داده شده است جزایر CpG در ژن‌های اختصاصی بافتی که به صورت محدودتری بیان

به دلیل وجود این ساختارها (Dutton et al., 1993). در نظر گرفتن دمای واسرشت‌سازی ۹۶ درجه سانتیگراد در تکثیر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی در هر دو واکنش دو و سه‌مرحله‌ای، با کمک به جدا شدن بهتر دو رشته‌ی الگو و جلوگیری از اتصال مجدد می‌تواند در بهبود تکثیر مؤثر بوده باشد.

جفت آغازگری که برای قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی طراحی شده بود  $T_m$  بسیار کمتر از ۸۰ درجه سانتیگراد داشت و  $\Delta T_m$  آن نیز بیشتر از ۱ درجه سانتیگراد بود. حتی  $\Delta G$  تشکیل دوپلکس و هتروداIMER آن‌ها نیز به طور نسبی از جفت آغازگر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت بازی کمتر بود. با این- وجود قادر به تکثیر مناسب قطعه‌ی موردنظر در هیچ‌کدام از دماهای اتصال نشد. قطعه‌ی ۲۳۰ جفت بازی با درصد GC برابر ۵۹/۶ درصد، با توجه به نتیجه‌ی برنامه‌ی CpG Plot به عنوان یک توالی بسیار غنی از GC (یا جزیره‌ی CpG) در نظر گرفته نمی‌شود. ولی عدم تکثیر آن را در واکنش معمول PCR می‌توان به درصد بالای GC (<6۰) در برخی نواحی آن نسبت داد که شکل-گیری ساختارهای ثانویه را در این مناطق ممکن می‌کند. بنابراین برای بررسی توالی‌ها از نظر میزان GC، علاوه بر تعیین درصد GC قطعه به- صورت کلی، تعیین وضعیت GC و امکان شکل-گیری ساختارهای ثانویه ناشی از پیوندهای هیدروژنی به صورت منطقه‌ای نیز در توالی مورد- نظر بسیار مهم است.

تکثیر بهتر و اختصاصی تر قطعه‌ی غنی از GC و نیز جزیره‌ی CpG شد. امکان تکثیر ژن فیلیپی گاو می‌تواند به عنوان ژنی با تأثیر احتمالی بر نرخ باروری ماده‌گاوها برای مطالعات اصلاحی آینده همانند بررسی چندشکلی، بیان ژن در شرایط مختلف، و تعیین ارتباط با صفات تولیدمثلی مفید واقع شود.

#### سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی اصفهان برای تأمین هزینه‌های پژوهشی این تحقیق، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به دلیل تأمین وسایل و تجهیزات موردنیاز و دکتر مهدی شمس‌آرا و آقای سعید انصاری مجد برای راهنمایی‌های ارزنده‌شان صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

می‌شوند، همانند ژن‌های با بیان گسترده الزاما در ناحیه‌ی شروع رونویسی قرار نگرفته‌اند بلکه ناحیه‌ی اگزونی ژن‌ها را در بر گرفته‌اند (Larsen et al., 1992).

#### نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار تکثیر بخشی از mRNA غنی از GC فیلیپا به‌کمک بهینه‌سازی طراحی آغازگر و واکنش دومرحله‌ای به‌صورت اختصاصی ممکن گردید. آغازگرهای فیلیپا در این مطالعه برای توالی‌هایی طراحی شده بود که باهم همپوشانی داشتند، ولی تنها آغازگرهایی که دو ویژگی  $\Delta T_m$  کمتر از یک درجه سانتیگراد و  $T_m$  بالا و در نتیجه دمای اتصال بالا را داشتند عملکرد مؤثر نشان دادند. دمای بالای اتصال و دومرحله‌ای شدن واکنش باعث

#### منابع

- Agarwal RK, Perl A (1993). PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH. *Nucleic Acids Research* 21: 5283-5284.
- Bachmann HS, Siffert W, Frey UH (2003). Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics and Genomics* 13: 759-766.
- Chavali S, Mahajan A, Tabassum R, Maiti S, Bharadwaj D (2005). Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinformatics* 21: 3918-3925.
- Clark SJ, Melki J (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21: 5380-5387.
- Dutton CM, Paynton C, Sommer SS (1993). General method for amplifying regions of very high G+ C content. *Nucleic Acids Research* 21: 2953-2954.
- Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W (2008). PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nature Protocols* 3: 1312-1317.
- Gellert M, Lipsett MN, Davies DR (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 2013-2018.
- Gibbs RA (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 62: 1202-1214.

- Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 25: 3957-3958.
- Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y (2003). Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biological Chemistry* 384: 1029-1034.
- Jensen MA, Fukushima M, Davis RW (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS ONE* 5: e11024.
- Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR (2013). Model for prediction of fat and milk production traits using of DGAT1 gene polymorphism in Iranian Holstein cattle population. *Agricultural Biotechnology* 5: 17-28 (In Persian).
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13: 1095-1107.
- Li LY, Li Q, Yu YH, Zhong M, Yang L, Wu QH, Qiu YR, Luo SQ (2011). A primer design strategy for PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Clinical Biochemistry* 44: 692-698.
- Mamedov T, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ (2008). A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry* 32: 452-457.
- McDowell DG, Burns NA, Parkes HC (1998). Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* 26: 3340-3347.
- Ohsugi M, Zheng P, Baibakov B, Li L, Dean J (2008). Maternally derived FILIA-MATER complex localizes asymmetrically in cleavage-stage mouse embryos. *Development* 135: 259-269.
- Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, Diggle C, Carr I, Rittore C, Toutou I, Philibert L, Fisher RA, Fallahian M, Huntriss JD, Picton HM, Malik S, Taylor GR, Johnson CA, Bonthron DT, Sheridan EG (2011). Mutations causing Familial Biparental Hydatidiform Mole implicate C6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *American Journal of Human Genetics* 89: 451-458.
- Pierre A, Gautier M, Callebaut I, Bontoux M, Jeanpierre E, Pontarotti P, Monget P (2007). Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyte- and embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family. *Genomics* 90: 583-594.
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000). EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in genetics* 16: 276-277.
- Sahdev S, Saini S, Tiwari P, Saxena S, Singh Saini K (2007). Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Molecular and Cellular Probes* 21: 303-307.
- Seifi T, Ghaedi K, Salamian A, Tanhaei S, Safari F, Hojati Z, Tavassoli M, Baharvand H, Nasresfahani MH (2012). Amplification of GC-rich putative mouse pep promoter using betaine and DMSO in ammonium sulfate polymerase chain reaction buffer. *Avicenna Journal Of Medical Biotechnology* 4: 206-209.
- Sepahvand NA, Heidari F, Totiaei A, Seraj M, Mozafari J (2009). Field and molecular evaluation of resistance of iranian bread wheats to Fusarium head blight. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1 (1): 63-80.
- Singal R, Ginder GD (1999). DNA methylation. *Blood* 93: 4059-4070.
- Spink CH, Garbett N, Chaires JB (2007). Enthalpies of DNA melting in the presence of osmolytes. *Biophysical Chemistry* 126: 176-185.

- Varadaraj K, Skinner DM (1994). Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140: 1-5.
- Zhang Z, Yang X, Meng L, Liu F, Shen C, Yang W (2009). Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques* 47: 775-779.
- Zheng P, Dean J (2009). Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7473-7478.
- Zimin A, Delcher A, Florea L, Kelley D, Schatz M, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassel C, Sonstegard T, Marcais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke J, Salzberg S (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology* 10: R42.
- Zuker M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: 3406-3415.

## Amplification of *Filia*, a Bovine GC Rich Gene, by Optimization of Primer Design

Zahmatkesh A.<sup>\*1</sup>, Ansari Mahyari S.<sup>2</sup>, Daliri Joupari M.<sup>3</sup>, Rahmani H.<sup>4</sup>, Shirazi A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Ph.D Student, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan.

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Animal Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

<sup>4</sup> Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan.

<sup>5</sup> Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Shahid Beheshti University, Velenjak, Tehran.

### Abstract

*Filia* is a maternal effect gene, disorder in which causes decreased fertility in mouse and abortion in human. Bovine *Filia* transcript is predicted in NCBI database. Nucleotide analysis shows that it has a higher GC content in comparison with its mouse or human orthologs, and this can make problems in PCR amplification. This study was performed to investigate the possibility of amplification of bovine *Filia* transcript with high GC content by optimization of primer design. Two pairs of primers were designed to amplify 443 and 230 bp fragments. High  $T_m$  of primers and low  $\Delta T_m$  conditions were considered to design only the first pair of primers. Bioinformatic analysis was performed on the two fragments to analyze the GC contents and possible secondary structures. RNA was extracted from bovine oocytes. After reverse transcription, PCR amplification was performed with different annealing temperatures in two or three steps. Results showed that the 443 bp fragment has a CpG island and a higher GC content and more possibility of secondary structure formation compared with the 230 bp fragment. Nevertheless only the 443 bp fragment with the primers of interest was amplified with a sharp band. In conclusion we showed that low  $\Delta T_m$ , high  $T_m$  of primers and annealing temperatures and also a two-step PCR help specific amplification of GC-rich sequences.

**Keywords:** *Bovine Filia* gene; GC percentage; CpG island; Secondary structure; Annealing temperature.

\* Corresponding Author: Zahmatkesh A.

Tel: 09112148596

Email: a.zahmatkesh@ag.iut.ac.ir