ساخت cDNA جفت انسان و نشان دادن تجلی M-CSF در آن بافت

رخند آروان ، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه تهران
الهه الهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه تهران

Synthesis of Human Placental cDNA and Demonstration of the Expression of M-CSF in that Tissue

ABSTRACT

Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) has previously been shown to affect the differentiation of cells of the mono-nuclear phagocytic line. More recent sudies indicate that M-CSF may have a role in pregnancy. In the present study , the experession of M-CSF in the human placenta was demonstrated. Placental mRNA was isolated and used as template for synthesis of complementary DNA (cDNA). The presence of M-CSF related sequences in the cDNA was shown by PCR and RT-PCR reactions in which M-CSF specific primers were used. In addition, it was shown that a 2.4 kb cDNA after electrophoresis and transfer to a nylon filter, hybridized with a digoxygenin labelled M-CSF specific probe.

Key Words: Macrophage colony stimulating factor (M-CSF); Messenger RNA (mRNA); complementary DNA (cDNA); polymerase chain reaction (PCR); reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR); digoxygenin

چکیده

عامل ایجاد کلنی‌های ماکروفاژی (Macrophage colony stimulating factor, M-CSF) در تمایز سلول‌های ردهٔ فاگوسیتیک تک‌هسته‌ای نقش ایفا می‌کند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که M-CSF ممکن است در حاملگی نیز نقش داشته باشد. در بررسی حاضر، تجلی M-CSF در بافت جفت انسان نشان داده شده است. RNA پیک جفت جدا شد و به عنوان الگو برای ساختن DNA مکمل (cDNA) مورد استفاده قرار گرفت. وجود توالی‌هایی مربوط به M-CSF در cDNA ساخته شده با استفاده از روش‌های PCR و RT-PCR، و آغازگرهای خاص M-CSF معلوم گردید. علاوه بر این، مشخص شد که یک cDNA مکمل متشکل از ۲۴۰۰ جفت نوکلئوتید، پس از الکتروفورز و انتقال به کاغذ صافی نایلونی، با دستوارهٔ ویژه M-CSF که با داکسی‌ژنین نشاندار شده بود، هیبرید شد.

واژه‌های کلیدی : **M-SCF؛ mRNA؛ cDNA؛ PCR؛ RT-PCR**

مقدمه

از زمانی که عامل محرک کلنی‌های ماکروفاژی (Macrophage colony stimulating factor, M-CSF) به عنوان یک عامل رشد مؤثر در تمایز و حفظ سلول‌های ردهٔ فاگوسیتیک تک‌هسته‌ای شناخته شده است، بیش از ده سال می‌گذرد(۱). شواهد اخیر نشان داده‌اند که احتمالاً M-CSF در فرایند تولیدمثل در پستانداران، بالاخص در مرحلهٔ حاملگی، نیز نقش دارد(۲).

در این بررسی، تجلی M-CSF در سطح رونویسی در جفت انسان در مراحل پایانی حاملگی نشان داده شده است. پژوهشگران دیگر قبلاً وجود RNA پیک مربوط به M-CSF را در جفت و بافت‌های دیگر دستگاه تناسلی جنس ماده نشان داده‌اند (۳،۴،۵،۶). وجود این RNA پیک هم مستقیماً با استفاده از انتقال‌های نور درن و هم به صورت غیرمستقیم طی بررسی DNAهای مکملی (cDNA) که از روی RNAهای این بافت‌ها ساخته شده بودند، نشان داده شد. در جریان آزمایش‌هایی که در این گزارش ارائه می‌شوند، سلامتی RNAهای جدا شده و کیفیت cDNAهای ساخته شده با دقت زیاد معلوم شدند. هرگاه که نشاندار کردن ملکول‌ها لازم بود، داکسی‌یوریدین نوکلئوزید تری‌فسفات متصل به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

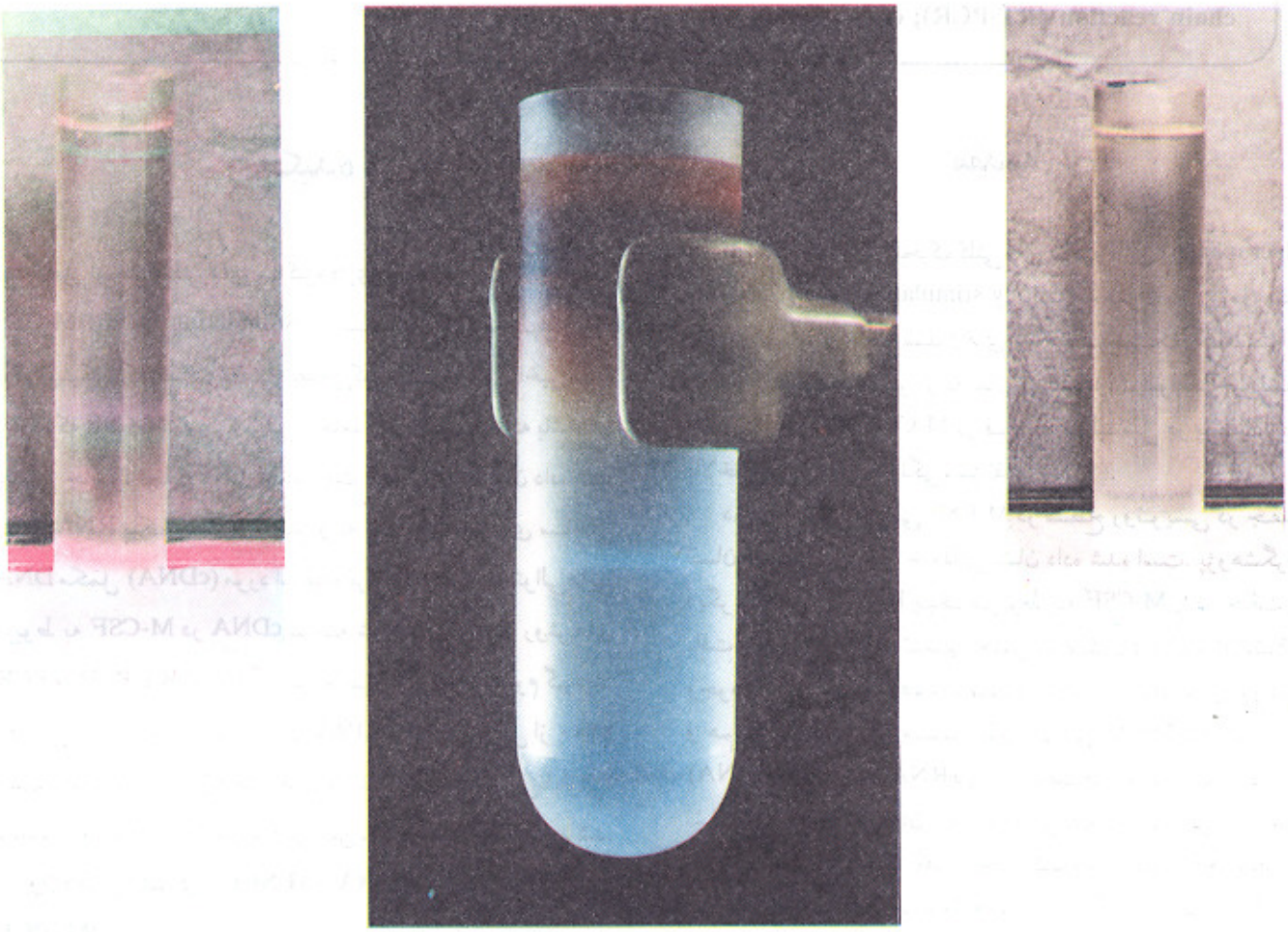
دیژوکسی ژنین (dig-dUTP) به کار گرفته شد. این ماده امکان تشخیص را با استفاده از یک واکنش ایمنولوژی که در آن رنگ تولید می‌شود، امکان‌پذیر می‌سازد. استفادهٔ کارا از این ترکیب، اهمیت ویژه‌ای برای پژوهش زیستی در ایران دارد، زیرا دسترسی به مواد رادیواکتیو در ایران با سهولت مقدور نیست.

روش و مواد

مواد : تمام مواد شیمیایی غیراختصاصی از شرکت "مرک" یا "سیگما" تهیه شدند. الیگو dT سلولز، دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC)، و گوانیدینیوم تیوسیانات نیز از شرکت "سیگما" خریداری شدند. سزیم کلرید از شرکت "مرک" خریده شد. داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها و غشاء نایلونی نوع Hybond-N+ از شرکت "امرشام" تهیه شدند. همچنین آنزیم‌های وارونویس پرندگان، RNase H اشریشیاکلی، DNA پلیمراز یک اشرشیاکلی و DNA پلیمراز ویروس T4 با هم به صورت "کیت" از شرکت "امرشام" خریده شدند. داکسی‌یوریدین تری‌فسفات متصل به دیژوکسی ژنین (dig-dUTP)، پادتن بر علیه dig-dUTP متصل به آنزیم آلکالن فسفاتاز و واکنش دهندهٔ آلکالن فسفاتاز با هم به صورت کیت از شرکت "بورینگرمانهایم" خریده شدند. آغازگرهای P33 (ACGACTGCCTGGGCTCCCT) و P34 (TTCTCCAGCAACTGCAGAGGTG) از کینگز کالج لندن تهیه شدند. پلازمید pc-DB-CSF4 که توالی‌هایی از ژن M-CSF انسان در آن کلون شده است در شرکت "سیتوس" تهیه و از جانب خانم دکتر مهوش توسلی از دانشگاه ساسیکس به ما اهدا شد.

روش‌ها : جفت بلافاصله پس از وضع حمل مادر در اتاق زایمان دریافت، با محلول سردیک میلی‌مولار MgCl شسته و در نیتروژن مایع منجمد شد. پس از حمل به آزمایشگاه، بافت در دمای ۷۰- °C تا زمان استفاده نگهداری شد.

شکل ۱ـ جداسازی RNA از بافت جفت با سانتریفوژ کردن در محلول سزیم کلرید. الف ـ هموژن از ۲ گرم بافت مستقیماً سانتریفوژ شده است. ب ـ هموژن از ۱ گرم بافت ابتدا با فنل و کلروفرم استخراج شده است. ج ـ رسوب RNA از ب در آب حل شده و مجدداً سانتریفوژ شده است. توار درلولهٔ الف و ب از DNA تشکیل شده است. رسوب RNA در ته لوله نمایان نیست.



[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

ضمن استخراج RNA و در تمام روش‌هایی که RNA در آنها کاربرد داشت، حداکثر کوشش برای جلوگیری از تجزیه با RNase به عمل آمد. تنها از ظروف پلاستیکی تازه استفاده شد، ظروف شیشه‌ای قبل از استفاده به مدت ۸ ساعت در دمای $180^{\circ}C$ نگه داشته شدند، و تمام محلول‌ها با آب تیمار شده با DEPC تهیه شدند(۷). بافت جفت در محلول واسرشت کنندهٔ قوی گوانیدینیوم تیوسیانات و با استفاده از دستگاه پلی‌تروم هموژن شد. "RNA کل" یعنی تمام RNA موجود در سلول طی سانتریفوژ کردن در محلول سزیم کلرید، برحسب چگالی از سایر ملکول‌های سلول جدا شد(۸،۷). برای سانتریفوژ کردن هموژن بافت، هموژن در برخی موارد مستقیماً روی محلول سزیم کلرید قرار داده می‌شد. ولی بیشتر اوقات، هموژن بافت ابتدا با فنل و کلروفرم استخراج می‌شد و اسیدهای نوکلئیک-که با الکل از فاز آبی رسوب داده شده بودند در سزیم کلرید سانتریفوژ می‌شدند(۹). از هر دو روش، RNA خوب حاصل شد، اما روش دوم اقتصادی‌تر بود، زیرا مقدار کمتری سزیم کلرید در آن استفاده می‌شد. قبل از جداسازی RNA پلی + A، برای تعیین سلامتی RNA, RNA کل روی ژل فرمالدئید، الکتروفورز شد(۷). mRNA پلی +A از بقیهٔ RNAها که اغلب RNAهای ریبوزومی هستند، با کروماتوگرافی گرایشی روی ستون‌های الیگو dT سلولز جدا شد.

با استفاده از mRNA پلی +A به عنوان الگو، DNA مکمل تک‌رشته‌ای طبق روش‌های منتشر شده ساخته شدند(۱۲،۷).رشتهٔ اول با الیگونوکلئوتیدهای داکسی‌تیمیدین به عنوان آغازگر و آنزیم وارونویس پرندگان ساخته شد. برای ساختن رشتهٔ دوم cDNA, RNAای که برای رشتهٔ اول الگو بود به طور ناکامل با آنزیم RNase H اشریشیاکلی تجزیه شد. رشته دوم با آنزیم DNA پلی‌مراز یک از اشریشیاکلی ساخته شد و انتهاهای صاف با آنزیم DNA پلیمراز باکتری فاز T4 فراهم شدند.

برای اینکه بتوانیم کیفیت رشتهٔ اول و دوم cDNA ساخته شده را تعیین کنیم، واکنش‌های cDNAسازی در حضور ۰/۳۵ میلی‌مولار dig-dUTP انجام گرفتند(۱۳). برای نشاندار کردن رشتهٔ دوم، از رشتهٔ اول بدون نشانه به عنوان الگو استفاده شد. dig-dUTP یک انالوگ dT است که در آن یک هاپتن استروئیدی به نام دیژوکسی ژنین با پیوند استری به C5 یوریدین متصل است. در DNAسازی، هر دو آنزیم وارونویس و DNA پلیمراز یک از این ماده به جای داکسی‌تیمیدین استفاده می‌کنند. پس از نشاندار کردن محصول‌ها، آنها در ژل‌های آگارز الکتروفورز و به غشاءهای نایلونی منتقل شدند(۱۴). غشاءها در محلولی حاوی پادتن ضد dig-dUTP که آنزیم آلکالن فسفاتاز به آن متصل بود، قرار گرفتند و پس از شستشوهای لازم رنگ در حضور واکنش دهندهٔ آنزیم ظاهر شد(۱۳).

DNA مکمل دو رشته‌ای مربوط به M-CSF ابتدا با به کار گرفتن روش پلیمریزه کردن زنجیره‌ای (PCR) تشخیص داده شد(۱۵). آغازگرهای P33 و P34 که برای M-CSF اختصاصی هستند در واکنش PCR استفاده شدند(۱۶). توالی‌های این آغازگرها به ترتیب در اگزون‌های ۱ و ۵ هستند و منطقه‌ای را دربر می‌گیرند که در تمام شکل‌های پیرایش شدهٔ RNA پیک M-CSF که تا بحال شناخته شده‌اند، وجود دارند. این منطقه از ۴۰۷ جفت نوکلئوتید تشکیل شده است(۱۷). واکنش‌های PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفتند و حاوی ۱ تا ۳ میلی‌مولار MgCl2، ۵۰ میکرومولار داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها (dNTPها)، ۲۰ میلی‌مولار تریش (pH ۸/۴)، ۲/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۵۰ نانوگرم از هر یک از آغازگرها و ۰/۰۱ تا ۱ میکروگرم cDNA الگو، بودند. سی چرخه از واکنش انجام گرفت، که هر چرخه شامل یک دقیقه واسرشت شدن دردمای $95^{\circ}C$، یک دقیقه هیبرید شدن در دمای $55^{\circ}C$ و یک دقیقه پلیمریزه شدن در دمای $72^{\circ}C$ بود. واکنش گواه مثبت با ۰/۲ میلی‌گرم DNA پلازمید pc-DB-CSF4 به عنوان الگو و واکنش گواه منفی بدون وجود DNA، در شرایط استاندارد PCR انجام گرفتند.

محصول‌های واکنش‌ها از طریق الکتروفورز روی ژل‌های آگاروز ۱/۵ یا ۲ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند(۷). وجود DNA مکمل مربوط به M-CSF با روش ترکیبی وارونویسی و PCR (RT-PCR) تأیید شد که در آن واکنش، رشتهٔ اول cDNA به عنوان الگو و P33 و P34 آغازگر بودند(۱۷). بخش PCR واکنش ترکیبی به نحوی که قبلاً شرح داده شد، انجام گرفت.

در آخر، برای این که نشان دهیم که محصول PCR برای M-CSF اختصاصی بوده است، cDNA دورشته‌ای الکتروفورز، به غشاءهای نایلونی منتقل و با دستوارهٔ نشاندار ویژهٔ M-CSF هیبرید شد(۱۴). الکتروفورز روی ژل و انتقال به غشاء به نحوی که قبلاً توضیح داده شد انجام گرفت. غشاءها با محصول واکنش PCR که در آن پلازمید pc-DB-CSF4 الگو و P33 و P34 آغازگر بودند و بنابراین برای M-CSF اختصاصی بود، هیبرید شدند. این حصول با dig-dUTP نشاندار شده بود. غلظت دستوارهٔ نشاندار در محلول هیبرید شدن ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود و هیبرید شدن به مدت ۶

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

تا ۱۰ ساعت در دمای $68^{\circ}C$ انجام گرفت.

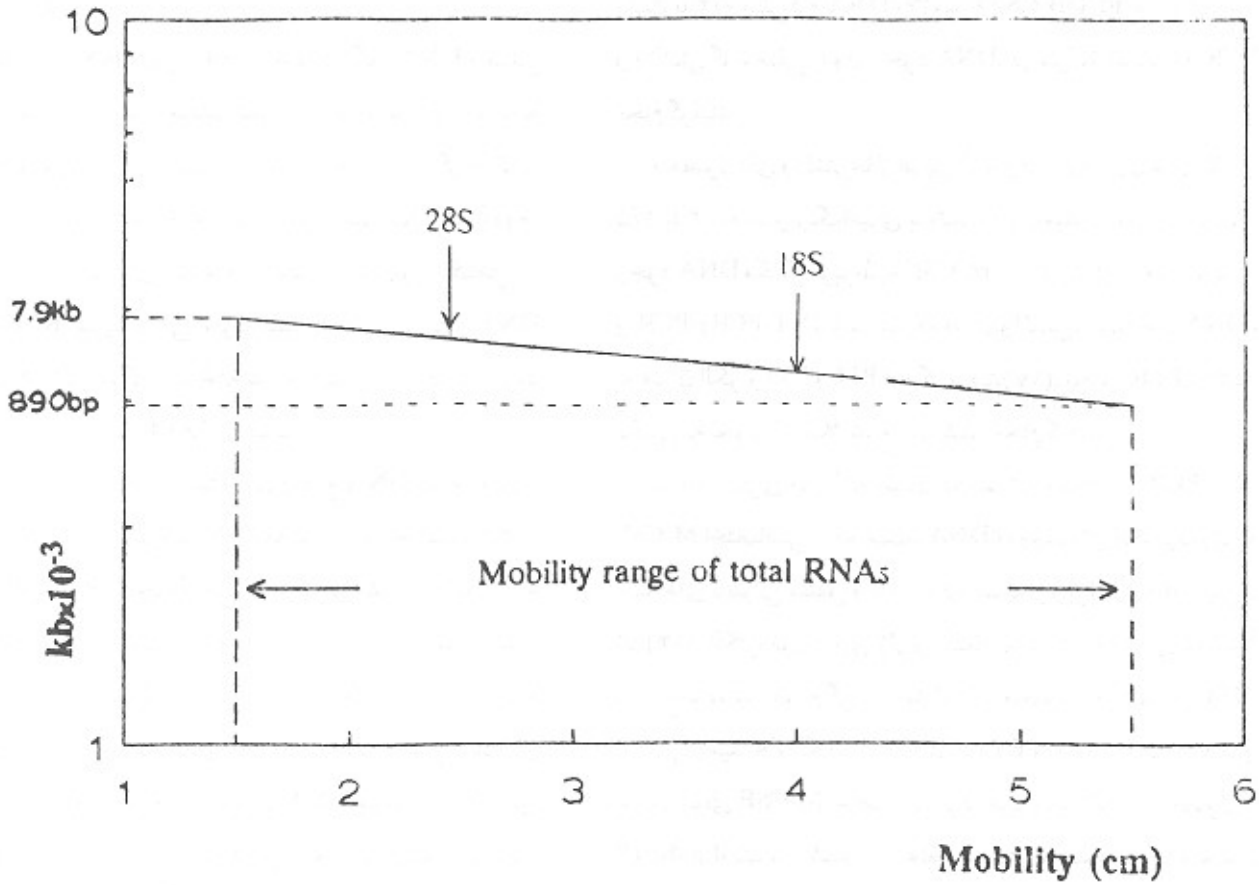
نتایج

۱ـ *استخراج RNA کل سلولی*: شکل ۱ ـ الف نتیجهٔ سانتریفوژ کردن هموژن بافت جفت را روی محلول سزیم کلرید زمانی که هموژن مستقیماً روی محلول قرار داده شد، نشان می‌دهد. طی سانتریفوژ کردن، شیبی از غلظت سزیم کلرید در محلول تهیه می‌شود. پس از سانتریفوژ کردن، بخش‌های غیر اسید نوکلئیکی هموژن در بالای لوله قرار می‌گیرند و DNA به شکل نواری مشخص در جایگاه همچگال خود در شیب سزیم کلرید قرار می‌گیرد. جالب توجه است که DNA بدون رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بromید به شکل نوار قابل مشاهده است. رسوب شفاف زرد رنگ RNA در ته لوله در عکس قابل رؤیت نیست.

در صورتی که پروتئین‌های موجود در هموژن ابتدا با فنل و کلروفرم حذف شوند، تنها نوار DNA و رسوب RNA در لولهٔ

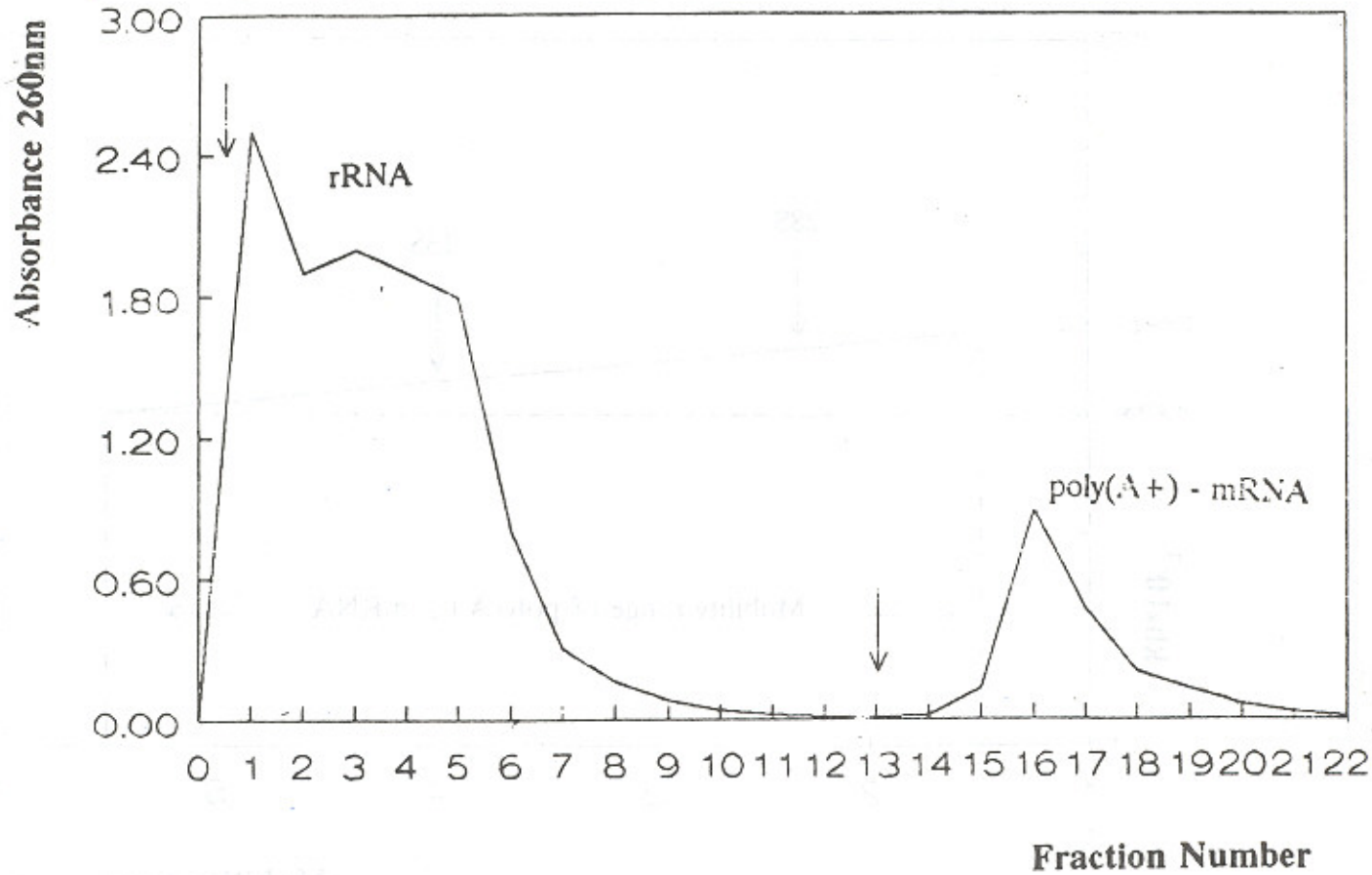
شکل ۲ـ الکتروفورز RNA کل سلولی در ژل‌های فرم‌آلدئید. ستون‌های ۱ و ۲ـ RNAهای حاصل در دو آزمایش از هموژنی که مستقیماً در محلول سزیم کلرید سانتریفوژ شده است. ستون ۳ـ RNA حاصل از سانتریفوژ کردن هموژنی که ابتدا با فنل و کلروفرم استخراج شده است. ۲ میکروگرم RNA در هر یک از ستون‌ها گذاشته شد. نوارهایی که با فلش مشخص شده‌اند، RNAهای ریبوزومی ۲۸ S و ۱۸ S هستند.

شکل ۳ـ تعیین طول RNAهای کل سلولی: نمودار استاندارد برحسب میزان حرکت RNAهای ریبوزومی ۱۸ S و ۲۸ S در ژل‌های آگاروز، رسم شده است طیف حرکت RNAهای کل برحسب منطقهٔ رنگ دار در ژل تعیین شد.

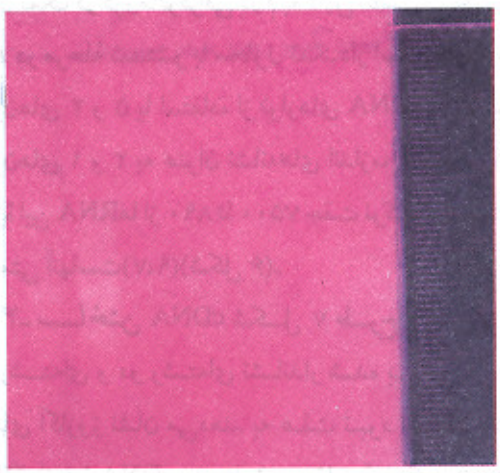


[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

شکل ٤ـ کروماتوگرافی RNA کل سلولی در ستون‌های الیگو dT سلولز. کروماتوگرافی به نحوی که در متن آمده، انجام گرفت. ۰/۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم RNA به ستون‌ها وارد شد. فلش درشکل جایگاه تعویض محلول شستشو را از محلول ۰/۵ مولار KCl به محلولی بدون نمک نشان می‌دهد.



شکل ۵ـ الکتروفورز RNAهای حاصل از کروماتوگرافی در ستون‌های الیگو dT سلولز. ستون ۱ـ RNA کل قبل از کروماتوگرافی. ستون ۲ـ برون‌ده حاصل از شستشو با محلول نمک‌دار. ستون ۳ـ برون ده حاصل از شستشو با محلول بدون نمک. ستون‌های ٤ و ۵ ـ برون‌ده‌های کروماتوگرافی دوم برون‌ده حاصل از شستشو با محلول بدون نمک (یعنی RNAای که در ستون ۳ الکتروفورز شد). ستون‌های ٤ و ۵ به ترتیب برون‌ده حاصل از شستشو با محلول نمک‌دار و محلول بدون نمک در کروماتوگرافی دوم هستند. RNA در ستون ۳ قابل مشاهده نیست زیرا مقدار بسیار کمی از آن الکتروفورز شد. نوارها در ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب RNAهای ریبوزومی ۲۸ S و ۱۸ S هستند.

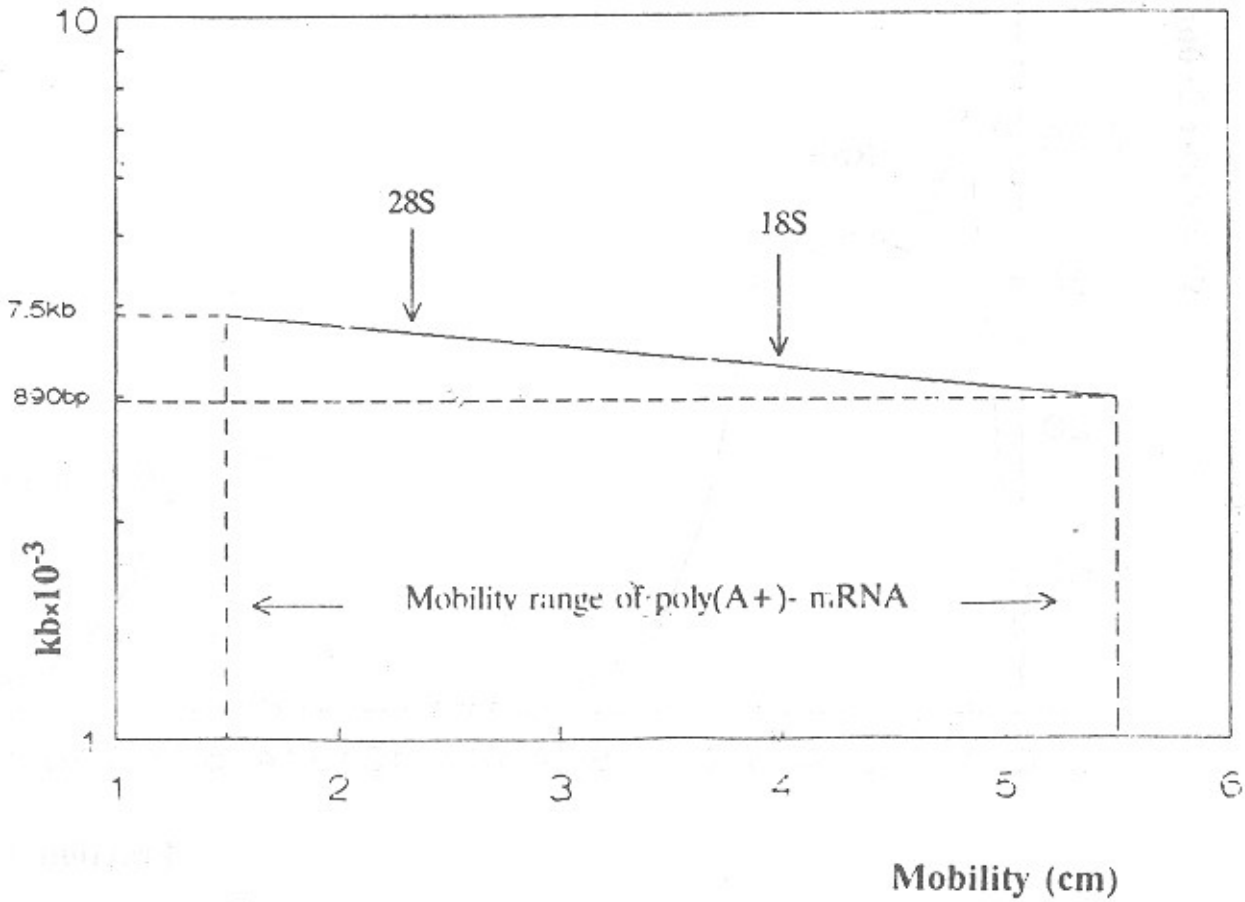


سانتریفوژ ایجاد می‌شوند (شکل ۱ ـ ب). زمانی که رسوب RNA حاصل از هر یک از روش‌های فوق حل و مجدداً روی محلول سزیم کلرید سانتریفوژ شد، نوار DNA تشکیل نشد (شکل ۱ـج). این می‌رساند که RNA با DNA که احتمال دارد در مرحلهٔ cDNAسازی اشکال ایجاد کند، آلوده نبوده است. با بکار گرفتن روش‌های فوق، ۴۷۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم RNA به ازای هر گرم بافت به دست آمد. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طول موج ۲۸۰ نانومتر ($A_{۲۶۰}$ / $A_{۲۸۰}$) همواره مساوی یا بیشتر از ۲ بوده است که نشان می‌دهد که RNA تخلیص شده، آلودگی پروتئینی نداشته است(۷).

۲ـ *الکتروفورز RNA کل* : شکل ۲ طرح الکتروفورز RNA کل را روی ژل‌های فرم‌آلدئید پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بromید نشان می‌دهد. ستون‌های ۱ و ۲، RNA حاصل از سانتریفوژ کردن مستقیم هموژن در محلول سزیم کلرید را نشان می‌دهد و ستون ۳ طرح RNA از هموژنی که ابتدا با فنل و کلروفرم تیمار شده است، می‌باشد. دو نوار مشخص در هر یک از ستون‌ها، RNAهای ریبوزومی ۱۸ S و ۲۸ S هستند. وجود این نوارها خود گواه بر عدم تجزیهٔ شدید RNAهای سلولی طی تخلیص است(۹). علاوه بر این، این RNAها نقش نشانگرهای اندازه را ایفا می‌کنند. با استفاده از آنها، طیف اندازهٔ RNAهای غیر ریبوزومی که بیشتر رنگ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

شکل ٦ـ تعیین طول RNAهای پلی +A. منحنی استاندارد رسم شده است و طیف حرکت RNAهای پلی +A به همان نحوی تعیین شده است که در شکل ۳ توضیح داده شد. میزان حرکت با استفاده از ژل که در شکل ۵ آمده است، اندازه‌گیری شد.



خارج از نوارها مربوط به آنهاست، بین ۸۹۰ و ۷۹۰۰ جفت نوکلئوتید محاسبه می‌شود (شکل ۳). این طیف اندازه برای RNA کل سلولی مورد انتظار است(۹).

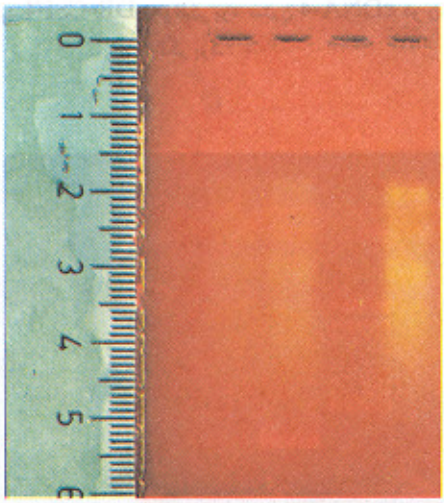
۳ـ *جداسازی mRNA پلی + A با استفاده از کروماتوگرافی گرایشی روی ستون‌های الیگو dT سلولز :*

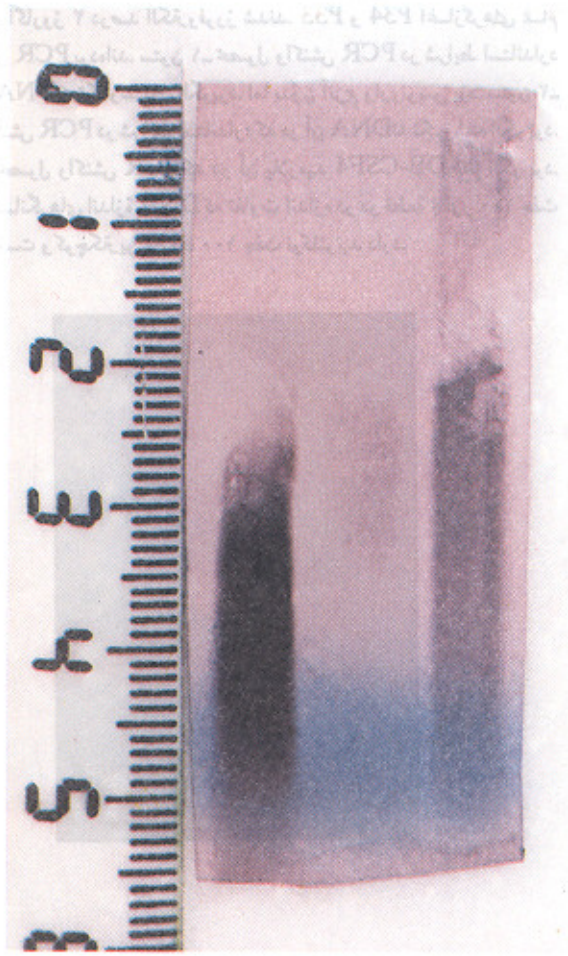
شکل ۴ طرح نمونه‌وار از کروماتوگرافی گرایشی RNA کل را روی ستون‌های الیگو dT سلولز نشان می‌دهد. همواره بین ۹۰ تا ۹۷ درصد از RNA کل وارد شده به ستون، طی شستشو با محلول نمک‌دار ازستون خارج می‌شد. ۳ تا ۱۰ درصد باقیمانده از RNA کل که اغلب RNAهای پیک پلی +A هستند، در شستشو با محلول بدون نمک خارج می‌شد. ایجاد نوارهای ۱۸S و ۲۸ S پس از الکتروفورز در ژل‌های فرم‌آلدئید نشان می‌دهد که RNAهای ریبوزومی حقیقتاً طی شستشو با محلول نمک‌دار از ژل خارج می‌شوند (شکل ۵، ستون ۲). RNA حاصل از شستشو بدون نمک در ستون ۳ الکتروفورز شد، اما به دلیل مقدار کم آن (۰/۱ میکروگرم)، رنگ به سختی مشاهده می‌شود. ستون‌های ۴ و ۵ مقادیر بیشتر از RNA ستون ۳ را پس از کروماتوگرافی دوم روی ستون الیگو dT سلولز نشان می‌دهد. ستون ۴ و ۵ به ترتیب RNA خارج شده در طی شستشو با محلول نمک‌دار و بدون نمک را در کروماتوگرافی دوم نشان می‌دهند. نبودن نوارهای مربوط به RNAهای ریبوزومی در ستون ۴ می‌رساند که برونده بدون نمک از کروماتوگرافی اول، اساساً با RNA ریبوزومی آلوده نبوده است. خارج شدن بخشی از RNA غیرریبوزومی طی شستشو با محلول بدون نمک در کروماتوگرافی دوم به دلیل اتصال ناکامل RNA پلی +A در مرحلهٔ شستشو با محلول نمک‌دار است. اندازهٔ RNAها در ستون‌های ۴ و ۵ با استفاده از نوارهای RNAهای ریبوزومی در ستون‌های ۱ و ۲ به عنوان نشانه‌های اندازه، تعیین شدند. طیف اندازهٔ این RNAها از ۸۹۰ تا ۷۵۰۰ جفت نوکلئوتید است که گواه بر سلامتی آنهاست(۹،۷)(شکل ۶).

۴ـ *ساختن cDNA* شکل ۷ طرح الکتروفورز cDNA تک‌رشته‌ای و دو رشته‌ای نشاندار شده با dig-dUTP را روی ژل‌های آگاروز نشان می‌دهد. به علت نبود نشانگرهای مناسب DNA، اندازهٔ cDNA ها بر اساس مقایسهٔ حرکت آنها نسبت به حرکت رنگ‌های برومونفل بلو و گزیلن سیانول تعیین شد. برمونفل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

شکل ۷ـ الکتروفورز cDNA نشاندار شده با dig-dUTP ستون ۱ـ cDNA تک‌رشته‌ای نشاندار شده. ستون ۲ـ cDNA دورشته‌ای که مواد نشاندار تنها در رشتهٔ دوم وارد شده است. شرایط ساخت cDNA، الکتروفورز، انتقال به غشاءهای نایلونی و ایجاد رنگ در متن توضیح داده شده‌اند. فلش‌های بالا و پایین به ترتیب جایگاه حرکت بروموفنل بلو و گزیلن سیانول را نشان می‌دهند.





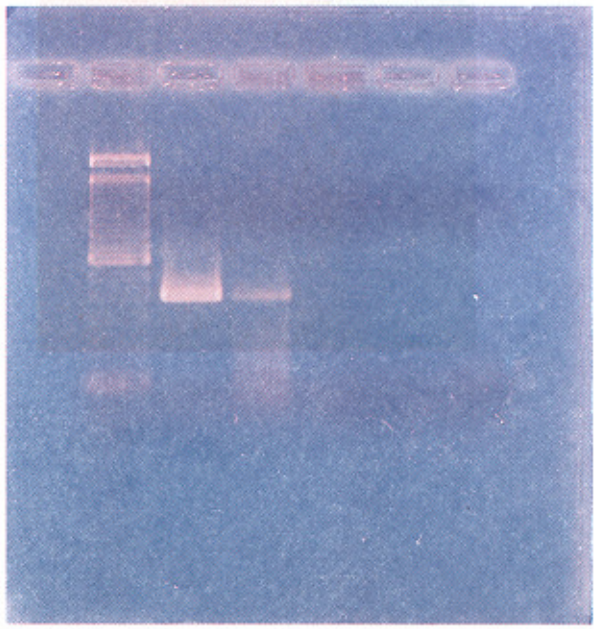
بلو و گزیلن سیانول در این ژل‌ها به ترتیب هم تراز با قطعات DNA به طول ۳۰۰ و ۴۰۰۰ جفت نوکلئوتید حرکت می‌کنند(۷). بر این اساس، طیف اندازهٔ DNAهای مکمل ساخته شده از ۱۴۰ تا ۵۶۰۰ جفت نوکلئوتید بوده است. این طیف اندازه گواه بر cDNA سازی به شکل مطلوب است(۷).

۵ـ شناسایی cDNA مربوط به M-CSF از طریق واکنش PCR : شکل ۸ محصول واکنش‌های PCR را با آغازگرهای ویژهٔ M-CSF یعنی P33 و P34 نشان می‌دهد. DNA در واکنش گواه اضافه نشده بود (ستون ۱) و واکنش‌های دیگر در حضور DNA جفت (ستون ۳) یا DNA پلازمید pc-DB-CSF که توالی‌های M-CSF در آن کلون شده است (ستون ۴)، انجام گرفتند. در واکنشی که DNA جفت در آن الگو بود، نوار مشخصی حاصل شد. این نوار هم تراز با نوار حاصل از DNA پلازمید pc-DB-CSF4 حرکت کرد که پیشنهاد می‌کند برای توالی‌های M-CSF اختصاصی است. همان طور که انتظار می‌رود، نوارها نزدیک به نشانگر ۴۰۰ جفت نوکلئوتیدی حرکت کردند و هیچ محصولی در واکنش گواه منفی که DNA به آن اضافه نشده بود، مشاهده نشد. نوارهای هم تراز با اندازهٔ تقریبی ۴۰۰ جفت نوکلئوتید نیز در واکنش‌های RT-PCR که DNA جفت یا DNA پلازمید pc-DB-CSF4 در آنها الگو بودند، ساخته شدند (شکل ۹).

در آخر، لازم بود این احتمال که نوار به دست آمده با استفاده از cDNA جفت به عنوان الگو به M-CSF مربوط نباشد و به نحو غیراختصاصی با آغازگرهای P33 و P34 ساخته شده باشد، بررسی شود. به این منظور، cDNA جفت با دستوارهٔ نشاندار اختصاصی برای M-CSF هیبرید شد. دستوارهٔ ویژهٔ M-CSF محصول واکنش PCR بود که pc-DB-CSF4 در آن الگو و P34 و P33 در آن آغازگر بودند. این محصول با دیژوکسی ژنین نشاندار شده بود. با توجه به این که توالی‌های M-CSF تنها DNA یوکاریوتی در پلازمید pc-DB-CSF4 است، دستوارهٔ ساخته شده باید برای M-CSF اختصاصی باشد. شکل ۱۰ نشان می‌دهد که این دستواره cDNA جفت انسان هیبرید شد و پس از الکتروفورز نواری را تشکیل داد. با استفاده از بروموفنل بلو و گزیلن سیانول به عنوان نشانگرهای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

شکل ۸ـ شناسایی cDNA مربوط به M-CSF با روش PCR. نمونه‌ها درژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شدند. ستون ۲ـ نشانگرهای اندازهٔ DNA که تفاوت اندازه در دو قطعهٔ مجاور ۱۰۰ جفت نوکلئوتید است و کوچکترین قطعه، ۱۰۰ جفت نوکلئوتید دارد. ستون‌های ۳،۱ و ٤ـ محصول واکنش‌های PCR که از آغازگرهای P33 و P34 در آنها استفاده شد، ستون ۱ـ بدون DNA ستون ۳ـ DNA پلازمید pc-DB-CSF4 الگو بود. ستون cDNA-4 دو رشته‌ای الگو بود.



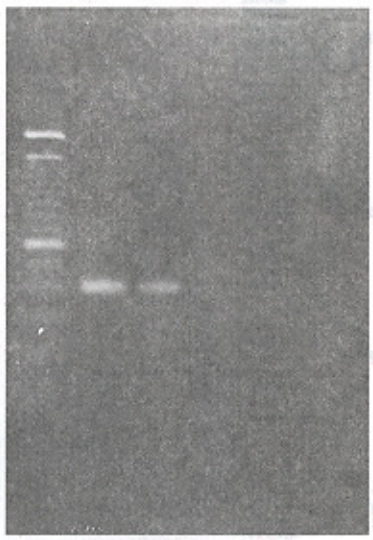
اندازه، طول cDNA در این نوار ۲۴۰۰ جفت نوکلئوتید تخمین زده شد.

بحث

تجلی ژن M-CSF در سطح رونویسی در بافت جفت انسان در انتهای حاملگی برحسب سه ضابطه نشان داده شده است. در واکنش PCR که cDNA جفت انسان در آن الگو بود، محصولی با طول مورد انتظار به دست آمد (شکل ۸). این محصول در ژل الکتروفورز، هم تراز با محصول به دست آمده از الگوی شناخته شدهٔ مربوط به M-CSF، حرکت کرد (شکل ۸). آغازگرها در واکنش با cDNA جفت و الگوی شناخته شدهٔ M-CSF، یکسان بودند. علاوه بر این، یک نوار DNA از واکنش RT-PCR حاصل شد که با نوار حاصل از واکنش PCR یکسان بود (شکل ۹). در آخر، دستوارهٔ نشاندار اختصاصی برای M-CSF با cDNA به طول ۲۴۰۰ جفت نوکلئوتید هیبرید شد (شکل ۱۰). جالب توجه است که طول یکی از شکل‌های دیگر پیرایش RNAهای پیک M-CSF، ۲۴۰۰ جفت نوکلئوتید است. این مطلب می‌رساند که محصول cDNA شناسایی

شده با دستواره، ممکن است کپی کاملی از تمام طول mRNA الگو باشد.

شکل ۹ـ شناسایی cDNA مربوط به M-CSF با روش RT-PCR. نمونه‌ها در ژل‌های آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شدند. P33 و P34 آغازگرهای تمام واکنش‌های PCR بوده‌اند. ستون ۱ـ محصول واکنش PCR در شرایط استاندارد که در آن cDNA تک‌رشته‌ای الگوبود، اما بدون آنزیم وارونویس بود. ستون ۲ـ محصول واکنش PCR در شرایط استاندارد که در آن cDNA تک‌رشته الگو بود. ستون ۳ـ محصول واکنش PCR که در آن پلازمید pc-DB-CSF4 الگو بود. ستون ٤ـ نشانگرهای اندازهٔ DNA که تفاوت اندازه در دو قطعهٔ مجاور ۱۰۰ جفت نوکلئوتید است و کوچکترین قطعه، ۱۰۰ جفت نوکلئوتید دارد.



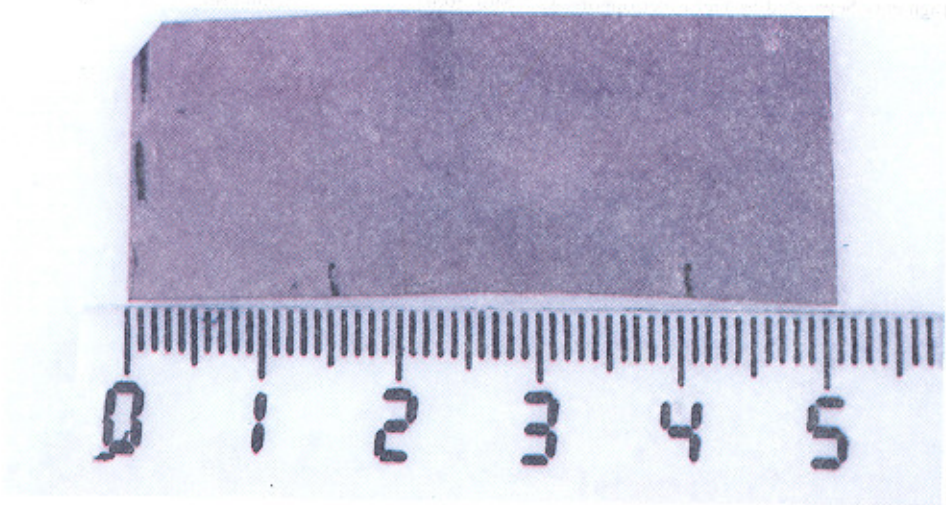
ضمن آزمایش‌ها، به کار گرفتن موفقیت آمیز داکسی‌یوریدین متصل به دیژوکسی ژنین در DNA سازی نشان داده شد (شکل ۷). میزان نشانه در محصول‌های حاصل از این نشانهٔ غیر رادیواکتیو به حدی بود که استفاده از محصول‌ها به عنوان دستواره برای شناسایی ترکیب‌های نشاندار نشده در واکنش هیبرید شدن، مقدور بوده است (شکل ۱۰).

فهرستی از برخی واژه‌ها

آغازگر Primer ـ آنزیم وارونویس Reverse Transctiptase ـ الیگو dT سلولز Oligo dT cellolose ـ انتقال نوردرن Northern blot ـ برونده Eluant ـ دستواره Probe ـ دگر پیرایش Alternatively spliced ـ دی‌اتیل پیروکاربنات Diethyl pyrocarbonate ـ دیژوکسی ژنین Digoxygenin ـ DNA مکمل Complementary DNA ـ RNA پلی A+ Poly A+ -RNA ـ RNA پیک Messenger RNA (mRNA) ـ روش پلیمریزه کردن زنجیره‌ای Polymerase chain reaction ـ روش ترکیبی وارونویسی و RT-PCR PCR ـ سزیم کلرید Cesium chloride ـ شرکت "امرشام" Amersham ـ شرکت "بورینگرمانهایم" Boehringer Mannheim ـ شرکت "سیتوس" Cetus

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

شکل ۱۰ـ شناسایی cDNA مربوط به M-CSF با استفاده از دستوارهٔ نشاندار. cDNA دو رشته‌ای ساخته، الکتروفورز و به غشاء نایلونی منتقل شد. محصول PCR نشاندار شده با dig-dUTP، با استفاده از پلازمید pc-DB-CSF4 و آغازگرهای P33 و P34 نیز تهیه شد. دستوارهٔ نشاندار با DNA در غشاء نایلونی هیبرید و سپس رنگ ظاهر شد. تمام عملیات به نحوی که در متن آمده است، انجام شدند. فلش‌ها جایگاه حرکت بروموفنل بلو و گزیلن سیانول را نشان می‌دهند.



Corporation ـ شرکت "سیگما" Sigma ـ شرکت "مرک" Merck ـ عامل رشد Growth factor ـ کروماتوگرافی گرایشی Affinity chromatography ـ گوانیدینیوم تیوسیانات Guanidinium thiocyanate ـ واکنش‌دهنده Substrate.

منابع

1- Dexter T.M. & Garland J. M., (1990) Colony Stimulating Factors, Molecular and Cellular Biology, Marcel Dekker, Inc.

2- Pollard S.W., et al., (1987) Apparent Role of the Macrophage Growth Factor, CSF-1, in Placental Development, Nature, 330: 484-486.

3- Kawassaki E.S., et al., (1985) Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding Human Macrophage - Sepcific Colony-Stimulating Factor, Science, 230: 291-296.

4- Wong G. G., et al., (1987), Human CSF-1: Molecular Cloning and Expression of 4kb cDNA Encoding the Human Urinary Protein, Science, 235: 1504-1508.

5- Ladner M.B., et al., (1987) Human CSF-1: Gene structure and Alternative Splicing of mRNA Precursors, The EMBO Journal, 6(9): 2993-2698.

6- Cerratti D.P., et al., (1988), Human Macrophage - Colony Stimulating Factor, Alternative RNA and Protein Processing from a Single Gene, Molecular Immunology, 25(8): 761-770.

7- Sambrook J., et al., (1989) Molecular Cloning, 2nd - Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

8- Glisin V., et al., (197) Ribonucleic Acid Isolation by Cesium Chloride Centrifugation, Biochemistry, 13(12): 2633-2634.

9- Chomczynski D. & Sacchi N., (1987) Single - Phenol - Chloroform Extraction by Acid Guanidinuim Thiocyante - Phenol - Chloroform Extraction, Analytical Biochemistry,162: 156-159.

10- Puissant C. & Houdebine L. M., (1990) An Improvement of Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction, Biotheqnique, 8(2): 148-149.

11- Aviv H & Leder D., (1972) Proceedings of National Academy of Science, U.S.A., 69: 1408-14016.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

12- Brawerman G., et al., (1972) A Procedure for the Isolation of Mammalian mRNA, Biochemistry, 11(4): 637-641.

13- Yanisch - Perron C.J., et al., (1985), Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13 mp 18 and PUC19 Vectors, Gene 33: 103.

14- Southern E.M., (1975), Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis, J. Mol. Biol., 98: 503.

15- Erlich H. A., et al.(1989) PCR Protocols, Stoktor Press.

16- Pampfer S., et al., (1992) Regulation of Colony Stimulating Factor Receptor (c-fms proto - oncogene product) in the Human Uterus and Placenta, Biology Reproduction, 46: 48-57.

17- Diater E., et al., 1992 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74: 850-858.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]