

## Construction of the Recombinant Plasmid Expressing AID under the Control of Temperature-sensitive Promoter of Bacteriophage Lambda

Nasim Hafezi<sup>1,2</sup>,  
Abolghasem Ajami<sup>3,4</sup>,  
Reza Valadan<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Professors, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Professors, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 12, 2017 ; Accepted April 8, 2019)

### Abstract

**Background and purpose:** Activation-induced cytidine deaminase (AID) is a B-cell specific enzyme responsible for somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) of antibody genes within the B-cell follicle of peripheral lymphoid organs. Ectopic overexpression of the enzyme leads to mutations in non-B cells and *Escherichia coli* (*E.coli*) genes. However, induction of mutations in *E.coli* by expression of AID requires highly regulated conditions. Therefore, the aim of this study was to construct a plasmid expressing AID under the control of tightly regulated temperature-sensitive promoter of bacteriophage lambda..

**Materials and methods:** The AID gene was isolated from PGEMT recombinant plasmid, containing AID and cloned into PTG19-T vector. Then, AID was ligated to an expression plasmid under the control of left promoter of bacteriophage lambda and mutant thermolabile cI857 repressor. Finally, the resistance marker of the engineered plasmid was replaced by tetracycline resistance gene.

**Results:** The whole open reading frame of AID was ligated into a plasmid containing a cI857-sensitive receptor lambda bacteriophage. The sequence and reading frame accuracy of the cloning was confirmed by electrophoresis of PCR products on agarose gel, restriction enzyme digestion, and nucleotide sequencing methods.

**Conclusion:** In current study, the AID was successfully cloned into an expression plasmid containing thermo-sensitive promoter of bacteriophage lambda. The recombinant plasmid could be used in different strains of *E.coli* to produce mutator strains.

**Keywords:** AID, mutator strain, lambda PL promoter

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (172): 100-109 (Persian).

\* Corresponding Author: Reza Valadan- School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
(E-mail: valadan.reza@hmail.com)

# ساخت پلاسمید نو ترکیب بیان کننده ژن AID تحت کنترل پروموتور حساس به حرارت باکتریوفاژ لامبدا

نسیم حافظی<sup>۲۰۱</sup>  
ابوالقاسم عجمی<sup>۴۰۳</sup>  
رضا ولدان<sup>۶۰۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** آنزیم Activation-induced cytidine deaminase (AID) یک آنزیم اختصاصی لنفوسیت‌های B در هایپر موتاسیون سوماتیک و نو ترکیبی تعویض کلاس ژن‌های آنتی‌بادی در فولیکول‌های لنفوسیت B ارگان‌های لنفاوی محیطی می‌باشد. بیان نا به جای این آنزیم منجر به موتاسیون در سلول‌های غیر از لنفوسیت‌های B و حتی در باکتری *Escherichia coli* شده است. با این وجود، القای موتاسیون در باکتری *Escherichia coli* توسط بیان آنزیم AID، نیازمند بهینه سازی شرایط مطلوب و کنترل شده می‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه تولید یک پلاسمید بیانی AID تحت کنترل پروموتور حساس به حرارت از باکتریوفاژ لامبدا می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در مرحله اول، جداسازی ژن AID از پلاسمید نو ترکیب PGEMT حاوی AID انجام شد. ژن تخلیص شده در پلاسمید PTG19-T در باکتری *E. coli* سوش Top10 کلون شد و سپس در یک پلاسمید بیانی القایی با دما حاوی پروموتور چپ باکتریوفاژ لامبدا و رپرسور حساس به حرارت ci857 منتقل و در باکتری *E. coli* قرار داده شد. در مرحله آخر، ژن مقاومت به تتراسایکلین جایگزین ژن مقاومت این پلاسمید نو ترکیب شد.

**یافته‌ها:** ژن AID در پلاسمید حاوی رپرسور حساس به حرارت ci857 از باکتریوفاژ لامبدا انتقال یافت. صحت توالی و چارچوب خوانش توسط الکتروفورز محصول PCR، استفاده از روش‌های هضم آنزیمی و همچنین تعیین توالی ژن AID، تایید شد.

**استنتاج:** ژن AID به طور موفقیت آمیزی در پلاسمید حاوی پروموتور حساس به حرارت از باکتریوفاژ لامبدا کلون شد. این پلاسمید نو ترکیب می‌تواند در سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* جهت تولید سویه‌های mutator استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** AID، سویه mutator، پروموتور چپ فاژ لامبدا

## مقدمه

آنزیم AID عضوی از خانواده پروتئینی پلی نوکلئوتید سیتوزین دآمینازها می‌باشد. این آنزیم مسئول القا موتاسیون‌های رندوم (تصادفی) در مناطق متغیر ژن‌های

آنتی‌بادی که جایگاه اتصال به آنتی‌ژن را کد می‌نمایند، می‌باشد. مکانسیم این آنزیم هدف قراردادن بازهای سیتوزین، دآمیناسیون بازهای سیتوزین به یوراسیل و

E-mail: valadan.reza@hmail.com

**مؤلف مسئول: رضا ولدان** - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی  
۱. دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
۲. دانشجوی دکتری ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
۳. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
۴. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
۵. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
۶. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱/۱۹

بنابراین تبدیل جفت باز C/G به U/G می‌باشد (۱). این آنزیم در تولید آنتی‌بادی‌هایی با میل اتصال بالا اهمیت قابل توجهی دارد. یک تا دو هفته پس از برخورد اولیه با آنتی ژن، آنتی‌بادی‌هایی با افزایش میل اتصال ساخته می‌شوند. این افزایش به دنبال برخورد لنفوسیت‌های B با آنتی ژن اختصاصی توسط پروسه‌ای به نام هاپر موتاسیون سوماتیک (SHM) رخ می‌دهد. پدیده هاپر موتاسیون سوماتیک با بیان آنزیم AID در لنفوسیت‌های B تحریک شده با آنتی ژن آغاز می‌شود (۲). بعضی از این موتاسیون‌ها موجب افزایش افینیتی (میل اتصال) آنتی‌بادی‌ها شده و در نتیجه پاسخ آنتی‌بادی‌های حاصله را در خنثی‌سازی ویروس‌ها، توکسین‌ها و غیرفعال کردن ارگانیسم‌های بیماری‌زا افزایش می‌دهند (۲).

بیان آنزیم AID و عملکرد آن در سلول‌های مختلف بررسی شده است. آنزیم AID در انواعی از سلول‌ها غیر از لنفوسیت‌های B از جمله فیروپلاست، HEK293T، NIH3T3 و مخمر موجب القاء جهش در ژنوم آن‌ها می‌شود (۳-۵). همچنین در مطالعات متعددی به بررسی چگونگی اثر و عملکرد آنزیم AID در باکتری اشریاکولی (E.coli) پرداخته شده است (۶). برای مثال القای بیان آنزیم AID در E.coli موجب جهش در ژن مقاومت به ریفامپسین و نالیدیکسیک اسید از طریق دامیناسیون باز سیتوزین می‌شود (۷).

باکتری‌های mutator کاربردهای مختلفی در آزمایشگاه دارند. این باکتری‌ها عموماً در یک یا چند ژن مسئول ترمیم DNA نقص دارند. از جمله روش‌های جهش‌زایی تصادفی (Random mutagenesis) استفاده از سویه‌های mutator باکتری E.coli می‌باشد. برای تولید یک کتابخانه جهش یافته در این روش ژن مد نظر در یک پلاسمید کلون شده و به یک سویه mutator منتقل می‌شود (۸). با توجه به اثبات بیان ژن AID و ایجاد موتاسیون توسط آن در باکتری E.coli، به نظر می‌رسد این آنزیم قابلیت تولید یک سویه mutator را دارد.

در این مطالعه کلونینگ ژن AID همراه با پروموتر حساس به حرارت از باکتریوفاژ لامبدا انجام شد. از مزایای این پروموتر عدم نیاز به القاگرهای شیمیایی مانند IPTG می‌باشد. از این سیستم بیانی حساس به حرارت به‌طور موفقیت‌آمیزی در تولید بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب و پپتیدها با اتکا به پروموتر به خوبی تنظیم شده و قدرتمند استفاده شده است. در این سیستم‌ها بیان پروتئین‌ها براساس پروموترهای چپ یا راست (PL یا PR) باکتریوفاژ لامبدا می‌باشد و توسط رپرسور حساس به حرارت، عنوان cI857 تنظیم می‌شوند (۹). به دلیل تولید یک سیستم بیانی متفاوت از سیستم‌های متداول، از جمله IPTG<sup>۱</sup> و با توجه به این که اکثر پلاسمیدهای بیانی حاوی ژن مقاوم به آمپیسیلین هستند، در این مطالعه سازه بیانی ژن AID توسط آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و تحت پروموتر چپ تنظیم شونده با دمای باکتریوفاژ لامبدا (λPL)<sup>۲</sup> طراحی شد.

## مواد و روش‌ها

سویه باکتری، پلاسمیدها، آنزیم‌ها

در این مطالعه تجربی از پلاسمید نو ترکیب PGEMT به عنوان منبع ژن AID، پلاسمید PTG19-T (Vivantis) جهت کلونینگ ژن AID، استفاده شد. جهت انتقال ژن AID به باکتری E.coli سوش TOP10 (Invitrogen, USA)، از پلاسمیدی بیانی حاوی پروموتر PL فاژ لامبدا استفاده شد. تکثیر ژن مقاوم به تتراسایکلین از باکتری F<sup>+</sup> TOP10 (Invitrogen, USA) حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین انجام شد. DNA پلاسمیدی و قطعات DNA حاصل از ژل با استفاده از کیت استخراج پلاسمید و تخلیص از ژل (شرکت یکتا تجهیز) تخلیص شدند و آنزیم‌های محدود کننده از شرکت Fermentas خریداری شدند.

1. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside  
2. lambda left promoter

کار رفته در PCR طبق پروتکل کیت استخراج از ژل شرکت یکتا تجهیز، جدا شد.

کلونینگ ژن AID در پلاسمید PTG19-T و انتقال آن به باکتری *E. coli* سوش Top10 کلونینگ توسط کیت pTG19-T PCR Cloning Vector انجام شد (جدول شماره ۳). جهت انتقال پلاسمید حاوی ژن AID به باکتری *E. coli* سوش TOP10، از روش کلیم کلراید استفاده شد. در نهایت کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی IPTG، X-gal و آمپیسیلین انجام شد. در نهایت کلونینگ ژن AID با تکنیک Colony PCR تایید شد.

جدول شماره ۳: مواد و مقادیر در واکنش انجام کلونینگ

| مقدار | ماده                |
|-------|---------------------|
| ۱     | PCR product         |
| ۲     | Vector              |
| ۱     | Ligation bufferx10  |
| ۰.۵   | T4 DNA Ligase       |
| ۵.۵   | Nuclease free water |
| ۱۰    | Total               |

کلونینگ ژن AID در پلاسمید بیانی حاوی پروموتور  $\lambda$ PL (پلاسمید  $\lambda$ PL)

ژن AID جایگزین قطعه ژنی E Lysis در پروموتور  $\lambda$ PL شد. بدین منظور هر دو پلاسمید نو ترکیب PTG19 حاوی ژن AID و پلاسمید  $\lambda$ PL با آنزیم‌های برشی NdeI و NotI بریده شدند. محصولات برش در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. در ادامه باند مربوط به DNA ژن AID و پلاسمید  $\lambda$ PL از ژل استخراج شد. سپس OD محصولات استخراج شده تعیین شد. در مرحله بعد کلونینگ ژن AID در پلاسمید  $\lambda$ PL بریده شده انجام شد. جهت انجام این کار در یک میکروتیوب ۰.۵ میلی لیتری واکنشی به حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در این مرحله پلاسمید نو ترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID به باکتری TOP10 منتقل شد و در نهایت کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی آمپیسیلین انجام شد.

طراحی پرایمر ژن های AID و تراسایکلین

طراحی پرایمر ژن های AID و تراسایکلین با استفاده از اطلاعات توالی مرجع ثبت شده در NCBI انجام شد. به ابتدای پرایمرهای رفت و برگشت ژن AID به ترتیب جایگاه برش آنزیم محدود کننده NdeI و NotI اضافه شد و به ابتدای پرایمرهای رفت و برگشت ژن تراسایکلین به ترتیب جایگاه برش آنزیم PstI و XhoI اضافه شد (جدول شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱: آغاز گرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن AID به همراه توالی برش آنزیمی

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| 5' CACCCA TATGGACAGCCTCT 3' ↓   | آغاز گر رفت   |
| (NdeI)                          |               |
| TTAGC↓GGCCGCAAGTCCCAAGTACGAAATG | آغاز گر برگشت |
| (NotI)                          |               |

جدول شماره ۲: آغاز گرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن تراسایکلین به همراه توالی برش آنزیمی

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| CACTGCA↓GCCTAATTTTGTGACACTCTATC | آغاز گر رفت   |
| (PstI)                          |               |
| ATCGCT↓CGAGATGCCCTCTTGGGTTATC   | آغاز گر برگشت |
| (XhoI)                          |               |

تخلیص ژن AID با روش PCR از پلاسمید PGEMT برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمر از master PCR mix شرکت Amplicon استفاده شد. واکنش در ۲۶ سیکل طبق برنامه دمایی زیر انجام شد: مرحله ی واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله ی واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله ی اتصال آغاز گرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه، مرحله ی گسترش (Extension) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، مرحله ی گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد.

در نهایت جهت تایید انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ bp الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز و مشاهده ی باند ۵۹۷ bp ژن AID، قطعه تکثیر یافته از بقیه ی مواد به

برای تایید کلونینگ مطابق مرحله قبل Colony PCR انجام شد. برای انجام Colony PCR هر کلنی در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر حل شد و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت تخریب دیواره باکتری و آزاد شدن DNA قرار داده شد. سپس آزمایش PCR طبق پروتکل PCR مربوط به تخلیص ژن AID از پلاسمید PGEMT، انجام شد. کلنی نوترکیب انتخابی در محیط LB آگار مایع کشت داده شد و در نهایت پلاسمید نوترکیب حاوی پروموتور  $\lambda$ PL و ژن AID طبق پروتکل شرکت یکتا تجهیز استخراج شد.

خالص سازی و تکثیر ژن مقاوم به تتراسایکلین با روش PCR تکثیر ژن مقاوم به تتراسایکلین از باکتری TOP10 F' حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از PCR master mix شرکت Amplicon استفاده شد. واکنش در ۳۵ سیکل طبق برنامه دمایی زیر انجام شد: مرحله ی واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله ی واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله ی اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد، مرحله ی گسترش (Extension) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، مرحله ی گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

کلونینگ ژن مقاوم به تتراسایکلین در پلاسمید کلونینگ PTG19-T

کلونینگ ژن AID طبق پروتکل کیت Vivantis انجام شد. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین به باکتری E.coli سوش TOP10 به روش کلسیم کلراید منتقل شد. در نهایت کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی IPTG، X-gal به همراه آنتی بیوتیک تتراسایکلین انجام شد. کلونینگ ژن تتراسایکلین با استفاده از تکنیک Colony PCR تایید شد.

کلونینگ ژن مقاوم به تتراسایکلین در پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID

ژن مقاوم به تتراسایکلین جایگزین ژن مقاوم به آمپیسیلین در پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL شد. برش پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL و پلاسمید نوترکیب PTG19-T حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین توسط آنزیم های برشی PstI و XhoI انجام شد. محصولات حاصل از برش در ژل الکتروفورز ۱ درصد الکتروفورز شدند و باندهای ژن مقاوم به تتراسایکلین و پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL طبق پروتکل شرکت یکتا تجهیز استخراج شدند. در ادامه کلونینگ قطعه 1400bp ژن تتراسایکلین در پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL انجام شد. پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین به باکتری TOP10 منتقل و کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی تتراسایکلین انجام شد. جهت تایید کلونینگ، Colony PCR با پرایمرهای اختصاصی تتراسایکلین انجام شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین از کلنی انتخابی استخراج شد.

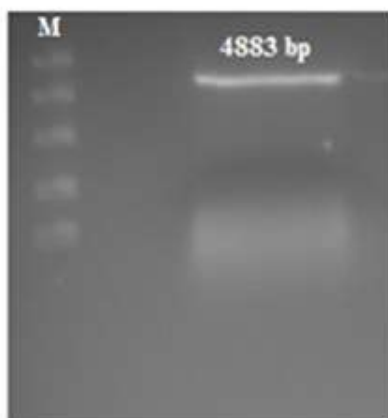
هم چنین تایید نهایی پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID با استفاده از تعیین توالی با پرایمرهای اختصاصی AID انجام شد.

## یافته ها

در مرحله اول استخراج ژن AID از پلاسمید PGEMT با روش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی انجام شد. با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد، باندهای در محدوده ۵۹۷ bp مشاهده شد.

پس از انتقال پلاسمید PTG19-T حاوی ژن AID به داخل باکتری E.coli سویه TOP10 و کشت آن در محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپیسیلین، X-gal و IPTG، کلونی های سفید و آبی تشکیل شد. نتیجه Colony PCR با کلنی های سفید و الکتروفورز محصول واکنش، وجود ژن AID را تایید کرد (تصویر شماره ۱).

در مرحله بعد ژن E Lysis در وکتور  $\lambda$ PL توسط برش وکتور با آنزیم‌های محدودالایر NdeI و NotI جدا شد. در الکتروفورز دو بانده ۲۷۶ نوکلئوتیدی ژن E Lysis و بانده ۴۸۸۳ نوکلئوتیدی وکتور  $\lambda$ PL مشاهده شد (تصویر شماره ۳). تصویر شماره ۵ نقشه ژنی باکتری AID را در وکتور  $\lambda$ PL نشان می‌دهد. ژن AID قرار داده شده در پلاسمید  $\lambda$ PL درون سویه TOP10 اشرشیاکلی منتقل شد و کشت آن در محیط LB آگار حاوی ژن مقاوم به آمپیسیلین انجام شد.



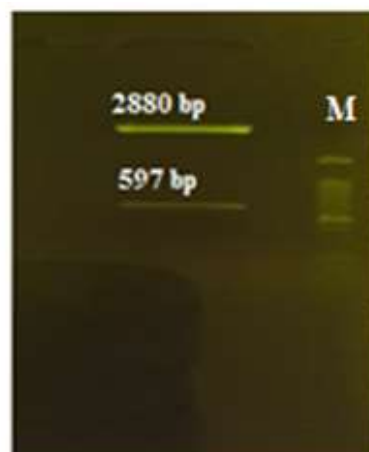
تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول برش آنزیم‌های NdeI و NotI پلاسمید  $\lambda$ PL. بانده ۴۸۸۳ جفت بازی

پس از تخلیص ژن مقاوم به تتراسایکلین از باکتری TOP10F<sup>'</sup>، در الکتروفورز بانده 1400 bp مقاوم به تتراسایکلین مشاهده شد، این ژن توسط پلاسمید PTG19-T به باکتری TOP10 منتقل شد. در مرحله بعد کلنی‌های نوترکیب توسط Colony PCR تایید شد. سپس کلنی موردنظر در محیط مایع LB حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین کشت داده شد و کلنی پلاسمید PTG19-T نوترکیب حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین استخراج شد. پس از برش پلاسمید نوترکیب PTG19-T حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین و پلاسمید نوترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن مقاوم به آمپیسیلین با آنزیم‌های برشی PstI و XhoI، باندهای 1400 bp تتراسایکلین و 2880 bp پلاسمید PTG19-T فاقد ژن تتراسایکلین و

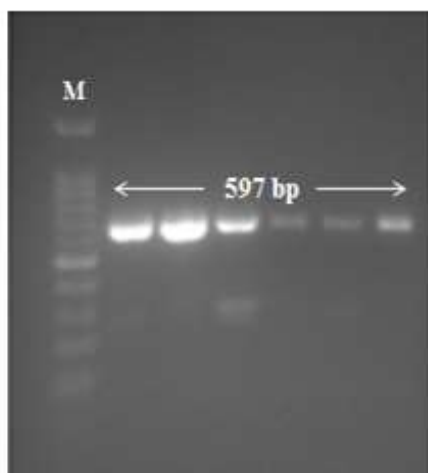
پس از تایید کلنی نوترکیب با PCR، کلنی مورد نظر کشت داده شد و پلاسمید استخراج شد. در الگوی الکتروفورز حاصل از برش پلاسمید برش خورده با آنزیم‌های محدودالایر NdeI و NotI، دو بانده یکی مربوط به پلاسمید PTG19-T و دیگری بانده ۵۹۷ نوکلئوتیدی که نشان دهنده‌ی تایید کلون ژن AID می‌باشد مشاهده شد (تصویر شماره ۲).



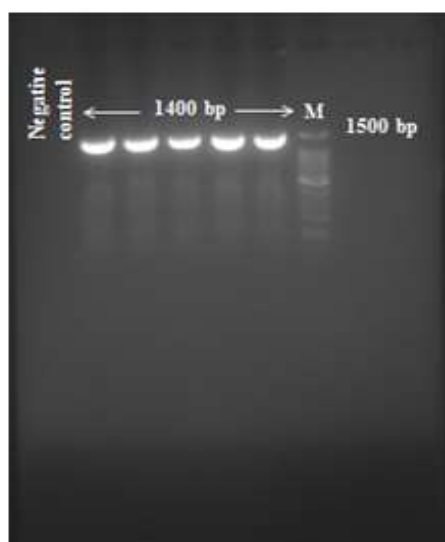
تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR با کلنی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب PTG19-T و ژن AID. باندهای ۵۹۷ جفت بازی ژن AID



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول برش آنزیم‌های NdeI و NotI پلاسمید PTG19-T و ژن AID. باندهای ۵۹۷ جفت بازی ژن AID و ۲۸۸۰ جفت بازی پلاسمید PTG19-T



تصویر شماره ۷: الکتروفورز محصول کلونی PCR با کلونی های پلاسمید نو ترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID. باندهای ۵۹۷bp ژن AID



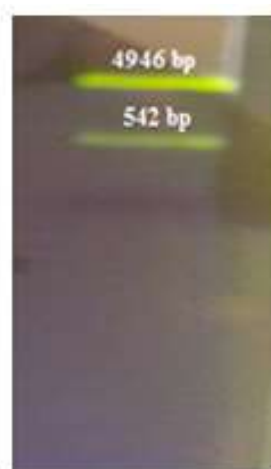
تصویر شماره ۷: الکتروفورز محصول کلونی PCR با کلونی های پلاسمید نو ترکیب  $\lambda$ PL حاوی ژن AID و ژن مقاومت به تتراسایکلین. باندهای ۱۴۰۰ جفت بازی ژن مقاومت به تتراسایکلین

## بحث

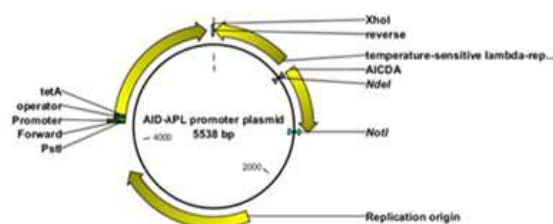
مطالعات اولیه در راستای شناسایی عملکرد آنزیم AID در سلول های غیر از لنفوسیت های B مانند سلول های E.coli و مخمر انجام شده است. القای بیان آنزیم AID در باکتری E.coli دارای اثرات موتاژنیک می باشد. به عنوان مثال بیان آنزیم AID در E.coli موجب جهش در هر دو رشته الگو و غیر الگو در ژن

باندهای 542 bp ژن مقاوم به آمپیسیلین و 4946 bp پلاسمید  $\lambda$ PL فاقد ژن مقاوم به آمپیسیلین مشاهده شد (تصویر شماره ۴).

PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین با کلنی های حاصل از کلونینگ پلاسمید  $\lambda$ PL نو ترکیب حاوی ژن های AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین در باکتری TOP10، باندهای 597 bp ژن AID و باندهای 1400 bp ژن تتراسایکلین را نشان داد (تصویر شماره ۶ و ۷).



تصویر شماره ۴: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید  $\lambda$ PL حاوی ژن AID. توسط آنزیم های XhoI و PstI. باندهای ۵۴۲ جفت بازی ژن مقاومت به آمپیسیلین و ۴۹۴۶ جفت بازی پلاسمید



تصویر شماره ۵: نقشه پلاسمید نو ترکیب طراحی شده حاوی پروموتور  $\lambda$ PL، ژن AID و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین

بر اساس نتیجه PCR، در نهایت کلنی انتخاب شده کشت داده شد و پلاسمید استخراج گردید. در نهایت نتایج تعیین توالی پلاسمید صحت ژن AID را تایید کرد و نشان داد که سازه مد نظر ساخته شده است.

مقاومت به کانامایسین می‌شود (۱۰). در وکتور پلاسمیدی تحت کنترل پروموتور القایی tac در سویه KL16 باکتری E.coli، بیان آنزیم AID موجب القاء جهش در ژن مقاومت به ریفامپسین مشابه با جهش‌های ایجاد شده در ژن‌های ایمنوگلوبولین می‌شود. میزان این جهش‌ها ۴ تا ۸ برابر جهش در گروه کنترل بوده است (۷). القا موتاسیون در سویه‌های فاقد آنزیم UNG که قادر به ترمیم جهش نیستند، افزایش داشته است. آنکوبه کردن آنزیم خالص شده AID با DNA فاز M13mp2 و سپس انتقال به سویه E.coli فاقد آنزیم UNG موجب القاء جهش در داکسی سیتوزین در توالی WRC شده است (۱۱).

در مطالعه دیگر بیان آنزیم AID در مخمر موجب القاء جهش در ژن CAN1 مشابه جهش صورت گرفته در سلول‌های B شده است (۴). در مجموع این مطالعات نشان داد که آنزیم AID یک سیتیدین دآمیناز اختصاصی DNA است که ترجیحاً باز سیتوزین را از DNA تکه رشته حذف می‌نماید و مستقیماً سبب القای موتاسیون می‌شود.

در مطالعات مختلف از سویه‌های mutator باکتری E.coli مانند تولید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای ایجاد موتاسیون در اهداف مختلف استفاده شده است (۱۲). مقایسه سویه باکتری mutator نسبت به wild-type نشان داد که سویه mutator قابلیت انطباق با شرایط محیطی را در مقایسه با wild-type دارد (۱۳). امروزه تولید سویه‌های mutator با هدف جهش‌زایی تصادفی کاربرد دارد. برای مثال، از سویه‌های mutator حاوی ژن‌های معیوب مسیر ترمیم DNA و پلاسمیدهای حساس به حرارت در جهت تولید موتاسیون‌های تصادفی موقت استفاده می‌شود (۱۴). در مطالعه‌ای تولید کتابخانه‌های پلاسمیدی به‌طور تصادفی جهش یافته توسط ژن‌های کلون شده در پلاسمیدها از طریق یک سویه mutator مانند باکتری اشرشیاکولی XL1-red انجام شد. این روش می‌تواند جهت مطالعه عملکرد ژن‌ها استفاده شود (۱۵).

در همین راستا، با توجه به قابلیت آنزیم AID در ایجاد موتاسیون مستقیم در رشته DNA، در این مطالعه سویه باکتری E.coli حاوی وکتور بیانی آنزیم AID ساخته شد و در مطالعات آینده بررسی آن به عنوان سویه‌ای mutator و استفاده در اهداف مختلف انجام خواهد گرفت. سیستم‌های بیانی تنظیم شونده با دما براساس وکتورهای مختلف حاوی leftward promoter (Lp) و یا rightward promoter (Rp) در باکتریوفاژ لامبدا می‌باشند. بیان ژن کلون شده در پایین دست پروموتورهای لامبدا توسط رپرسور cI857 حساس به حرارت باکتریوفاژ لامبدا تنظیم می‌شود. به این صورت که بیان ژن در دمای زیر ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۳۲°C - ۲۸) با اتصال رپرسور cI857 به اپراتور مهار می‌شود در حالی که در دمای بالای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دنبال غیر فعال‌سازی رپرسور، نسخه برداری توسط آنزیم RNA polymerase میزبان آغاز می‌شود (۱۶). سیستم‌های بیانی بر پایه پروموتور lac با بیان نسبتاً ضعیف پروتئین و نشی همراه می‌باشند. به علاوه نشی بیان مشکل مواجه شده در استفاده از پروموتورهای trp, tac و پروموتورهای T7 می‌باشد. از طرفی بیان در این سیستم‌ها با القاگرهای شیمیایی مانند IPTG انجام می‌شود که هزینه بر هستند و برای بسیاری از سویه‌های E.coli سمی می‌باشند (۱۷، ۱۸).

در مجموع به دلیل این که القای بیان توسط پروموتور PL/PR باکتریوفاژ لامبدا با کنترل شدید و بدون نشی و همچنین بدون نیاز به القاگرهای شیمیایی انجام می‌شود، سازه ساخته شده در این مطالعه، حاوی ژن AID تحت پروموتور PL باکتریوفاژ لامبدا می‌تواند سیستم بیانی مناسب جهت تولید آنزیم موتاژنیک AID و ایجاد یک سویه mutator قابل کنترل باشد.

## سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پروژه تحقیقاتی خانم نسیم حافظی دانشجوی دوره دکتری تخصصی رشته ایمنی



تأمین شده است. لذا از تمامی اعضای محترم گروه ایمنی‌شناسی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

شناسی پزشکی می‌باشد که هزینه آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی طرح مصوب شماره ۲۴۵۴

## References

- Gómez-González B, Aguilera A. Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex. *Proc National Acad Sci USA* 2007; 104(20): 8409-8414.
- Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med* 2003; 197(10): 1291-1296.
- Delker RK, Fugmann SD, Papavasiliou FN. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol* 2009; 10(11): 1147-1153.
- Mayorov VI, Rogozin IB, Adkison LR, Frahm C, Kunkel TA, Pavlov YI. Expression of human AID in yeast induces mutations in context similar to the context of somatic hypermutation at GC pairs in immunoglobulin genes. *BMC Immunol* 2005; 6: 10.
- Rogozin IB, Pavlov YI. The cytidine deaminase AID exhibits similar functional properties in yeast and mammals. *Mol Immunol* 2006; 43(9): 1481-1484.
- Carpenter MA, Rajagurubandara E, Wijesinghe P, Bhagwat AS. Determinants of sequence-specificity within human AID and APOBEC3G. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9(5): 579-587.
- Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 2002; 418(6893): 99-104.
- Rubin-Pitel S. Chapter 3-Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* 2007; 49-72.
- Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact* 2010; 9(1): 18.
- Besmer E, Market E, Papavasiliou FN. The transcription elongation complex directs activation-induced cytidine deaminase-mediated DNA deamination. *Mol Cell Biol* 2006; 26(11): 4378-4385.
- Pham P, Bransteitter R, Petruska J, Goodman MF. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 2003; 424(6944): 103-107.
- Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat* 2003; 6(3): 137-145.
- Chao L, Cox EC. Competition between high and low mutating strains of *Escherichia coli*. *Evolution* 1983; 37(1): 125-134.
- Selifonova O, Valle F, Schellenberger V. Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl Environ Microb* 2001; 67(8): 3645-3649.
- Muteeb G, Sen R. Random mutagenesis using a mutator strain. 2010; 634: 411-419.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014; 5: 172.
- Nicastro J, Sheldon K, Slavcev RA.

Bacteriophage lambda display systems: developments and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98(7): 2853-2866.

18. Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012; 39(3): 383-399.