ORIGINAL ARTICLE

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

Nasim Hafezi[1,2],
Abolghasem Ajami[3,4],
Reza Valadan[5,6]

[1] PhD Student in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professors, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professors, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره ۱۷۲ اردیبهشت سال ۱۳۹۸ (۱۰۹-۱۰۰)

ساخت پلاسمید نوترکیب بیان کننده ژن AID تحت کنترل پروموتر حساس به حرارت باکتریوفاژ لامبدا

نسیم حافظی[۱و۲]
ابوالقاسم عجمی[۳و۴]
رضا ولدان[۵و۶]

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم Activation-induced cytidine deaminase (AID) یک آنزیم اختصاصی لنفوسیت‌های B در هایپرموتاسیون سوماتیک و نوترکیبی تعویض کلاس ژن‌های آنتی‌بادی در فولیکول های لنفوسیت B ارگان های 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 می باشد. بنابراین هدف این مطالعه تولید یک پلاسمید بیانی AID تحت کنترل پروموتر حساس به حرارت از باکتریوفاژ لامبدا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول، جداسازی ژن AID از پلاسمید نوترکیب 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 پروموتر 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 نوترکیب شد.

یافته‌ها: ژن AID در پلاسمید حاوی رپرسور حساس به حرارت cI857 از باکتریوفاژ لامبدا انتقال یافت. صحت توالی و چارچوب خوانش توسط الکتروفورز محصولPCR، استفاده از روش‌های هضم آنزیمی وهمچنین تعیین توالی ژنAID، تایید شد.

استنتاج: ژن AID به‌طور موفقیت‌آمیزی در پلاسمید حاوی پروموتر حساس به حرارت از باکتریوفاژ لامبدا کلون شد. این پلاسمید نوترکیب می تواند در سویه های مختلف باکتری E.coli جهت تولید سویه های mutator استفاده شود.

واژه های کلیدی: AID، سویه mutator، پروموتر چپ فاژ لامبدا

مقدمه

آنزیم AID عضوی از خانواده پروتئینی پلی‌نوکلئوتید 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

مولف مسئول: رضا ولدان– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: valadan.reza@hmail.com
۱. دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکترای 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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 هایپر موتاسیون سوماتیک (SHM) رخ می‌دهد. پدیده هایپر موتاسیون سوماتیک با بیان آنزیم AID در لنفوسیت‌های B تحریک شده با آنتی‌ژن 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 بیماری زا 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 فیبروبلاست، HEK293T، NIH3T3 و مخمر موجب القاء جهش در ژنوم آن‌ها می‌شود(۵-۳). همچنین در مطالعات متعددی به بررسی چگونگی اثر و عملکرد آنزیم AID در باکتری اشرشیاکولی (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 دآمیناسیون باز سیتوزین می‌شود(۷).

باکتری‌های mutator کاربردهای مختلفی در آزمایشگاه دارند. این باکتری‌ها عموما در یک یا چند ژن مسئول ترمیم DNA نقص دارند. از جمله روش‌های جهش زایی 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 نوترکیب 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[1] 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)[2] طراحی شد.

مواد و روش ها

سویه باکتری، پلاسمیدها، آنزیم ها

در این مطالعه تجربی از پلاسمید نوترکیب 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´ 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 محدودکننده از شرکت Fermentas خریداری شدند.

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

طراحی پرایمر ژن های AID و تتراسایکلین

طراحی پرایمر ژن‌های AID و تتراسایکلین 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 محدودکننده NdeI و NotI اضافه شد و به ابتدای پرایمرهای رفت و برگشت ژن تتراسایکلین به ترتیب جایگاه برش آنزیم PstI و XhoI اضافه شد (جدول شماره۱و۲).

جدول شماره ۱: آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژنAID به همراه توالی برش آنزیمی

آغازگر رفت	5' CACCCA TATGGACAGCCTCT 3' ↓ (NdeI)
آغازگر برگشت	TTAGC↓GGCCGCAAGTCCCAAAGTACGAAATG (NotI)

جدول شماره ۲: آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن تتراسایکلین به همراه توالی برش آنزیمی

آغازگر رفت	CACTGCA↓GCCTAATTTTTGTTGACACTCTATC (PstI)
آغازگر برگشت	ATCGCT↓CGAGATGCCCTCTTGGGTTATC (XhoI)

تخلیص ژن AID با روش PCR از پلاسمید PGEMT

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از master PCR mix شرکت Amplicon استفاده شد. واکنش در ۲۶ سیکل طبق برنامه دمایی زیر انجام شد: مرحله‌ی واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله ی اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه، مرحله‌ی گسترش (Extension) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

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 مشاهده‌ی باند ۵۹۷ bp ژن AID، قطعه تکثیر یافته از بقیه‌ی مواد به 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 کیتpTG19-T PCR Cloning Vector انجام شد (جدول شماره۳). جهت انتقال پلاسمید حاوی ژن AID به باکتری E.coli سوش TOP10، از روش کلسیم 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

ماده	مقدار
PCR product	۱
Vector	۲
Ligation buffer×10	۱
T4 DNA Ligase	۰/۵
Nuclease free water	۵/۵
Total	۱۰

کلونینگ ژن AID در پلاسمید بیانی حاوی پروموتر λPL (پلاسمید λPL)

ژن AID جایگزین قطعه ژنی E Lysis در پروموتر λPL شد. بدین منظور هر دو پلاسمید نوترکیب PTG19 حاوی ژن AID و پلاسمید λPL 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 λPL از ژل استخراج شد. سپس OD محصولات استخراج شده تعیین شد. در مرحله بعد کلونینگ ژن AID در پلاسمید λPL بریده شده انجام شد. جهت انجام این کار در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری واکنشی به حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در این مرحله پلاسمید نوترکیب λPL حاوی ژن AID به باکتری TOP10 منتقل شد و در نهایت کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی آمپیسیلین انجام شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت تخریب دیواره باکتری و آزاد شدن DNA قرار داده شد. سپس آزمایش PCR طبق پروتکلPCR 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 پروموتر λPL و ژن AID طبق پروتکل شرکت یکتا تجهیز استخراج شد.

خالص‌سازی و تکثیر ژن مقاوم به تتراسایکلین با روش PCR

تکثیر ژن مقاوم به تتراسایکلین از باکتری ´F TOP10 حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از PCR master mix شرکت Amplicon استفاده شد. واکنش در ۳۵ سیکل طبق برنامه دمایی زیر انجام شد: مرحله‌ی واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی گسترش (Extension) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله‌ی گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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. درنهایت کشت باکتری در محیط LB آگار حاوی IPTG، X-gal به همراه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین انجام شد. کلونینگ ژن تتراسایکلین با استفاده از تکنینکColony PCR تایید شد.

کلونینگ ژن مقاوم به تتراسایکلین در پلاسمید نوترکیب λPL حاوی ژن AID

ژن مقاوم به تتراسایکلین جایگزین ژن مقاوم به آمپیسیلین در پلاسمید نوترکیب λPL شد. برش پلاسمید نوترکیب λPL و پلاسمید نوترکیب PTG19-T حاوی ژن مقاوم به تتراسایکلین توسط آنزیم‌های 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 λPL طبق پروتکل شرکت یکتا تجهیز استخراج شدند. در ادامه کلونینگ قطعه 1400bp ژن تتراسایکلین در پلاسمید نوترکیب λPL انجام شد. پلاسمید نوترکیب λPL 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 λPL حاوی ژن AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین از کلنی انتخابی استخراج شد.

هم‌چنین تایید نهایی پلاسمید نوترکیب λPL 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 پرایمر های اختصاصی انجام شد. با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد، باندی در محدوده ی bp ۵۹۷ 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 آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین، X-gal و IPTG، کلونی‌های سفید و آبی تشکیل شد. نتیجه Colony PCR با کلنی‌های سفید و الکتروفورز محصول واکنش، وجود ژن AID را تایید کرد (تصویر شماره۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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 محدودالاثر NdeI و NotI، دو باند یکی مربوط به پلاسمید PTG19-T و دیگری باند ۵۹۷ نوکلئوتیدی که نشان دهنده‌ی تایید کلون ژن AID می‌باشد مشاهده شد (تصویر شماره۲).

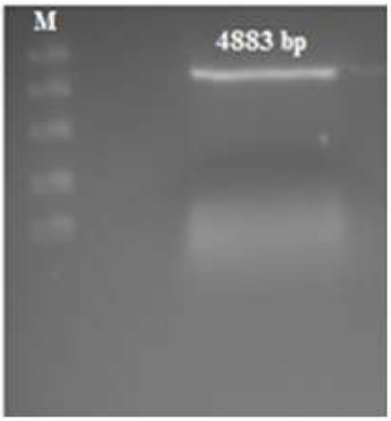


تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR با کلنی های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب PTG19-T و ژن AID. باند های ۵۹۷ جفت بازی ژن AID



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

در مرحله بعد ژن E Lysis در وکتور λPL توسط برش وکتور با آنزیم‌های محدودالاثر NdeI و NotI جدا شد. در الکتروفورز دو باند ۲۷۶ نوکلئوتیدی ژن E Lysis و باند ۴۸۸۳ نوکلئوتیدی وکتور λPL مشاهده شد (تصویر شماره ۳). تصویر شماره ۵ نقشه ژنی باکتری AID را در وکتورλPL نشان می‌دهد. ژن AID قرار داده شده در پلاسمید λPL 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 آنزیم های NdeI و NotI پلاسمید λPL . باند ۴۸۸۳ جفت بازی

پس از تخلیص ژن مقاوم به تتراسایکلین از باکتری TOP10F´، در الکتروفورز باند 1400 bp ژن 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 λPL حاوی ژن مقاوم به آمپیسیلین با آنزیم‌های برشی XhoI و PstI، باندهای 1400 bp ژن تتراسایکلین و 2880 bp پلاسمید PTG19-T فاقد ژن تتراسایکلین و

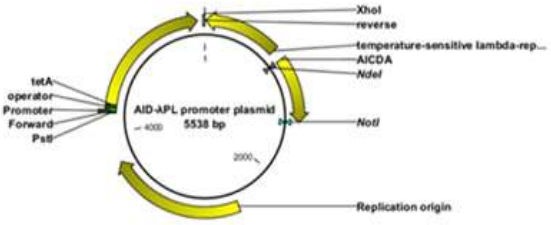
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

باندهای bp 542 ژن مقاوم به آمپیسیلین و bp 4946 پلاسمید λPL فاقد ژن مقاوم به آمپیسیلین مشاهده شد (تصویر شماره ی۴).

PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین با کلنی‌های حاصل از کلونینگ پلاسمید λPL نوترکیب حاوی ژن‌های AID و ژن مقاوم به تتراسایکلین در باکتری TOP10، باندهای bp 597 ژن AID و باندهای bp 1400 ژن تتراسایکلین را نشان داد (تصویر شماره ۶ و ۷).

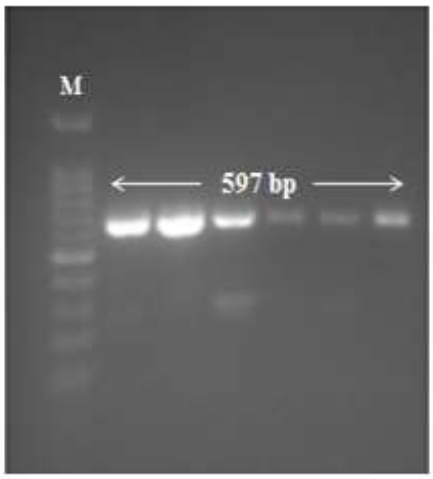


تصویر شماره ۴: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید λPL حاوی ژن AID. توسط آنزیم های XhoI و PstI . باندهای ۵۴۲ جفت بازی ژن مقاومت به آمپیسیلین و ۴۹۴۶ جفت بازی پلاسمید

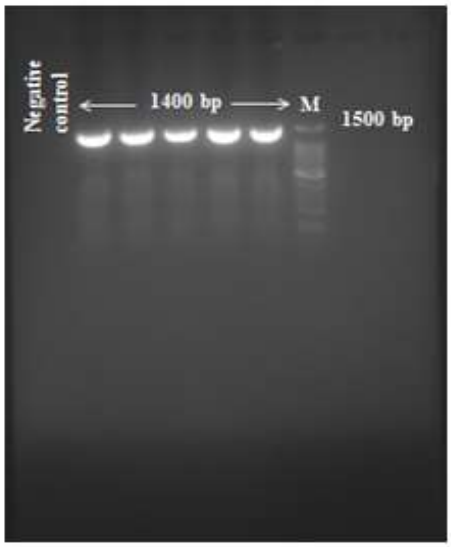


تصویر شماره ۵: نقشه پلاسمید نوترکیب طراحی شده حاوی پروموتر λPL ، ژن AID. و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین

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.



تصویر شماره ۷: الکتروفورز محصول کلونی PCR با کلونی های پلاسمید نوترکیب λPL حاوی ژن AID. باندهای ۵۹۷bp ژن AID



تصویر شماره ۷: الکتروفورز محصول کلونی PCR با کلونی های پلاسمید نوترکیب λPL 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 سلول‌های غیر از لنفوسیت‌های B مانند سلول‌های E.coli و مخمر انجام شده است. القای بیان آنزیم AID در باکتری E.coli دارای اثرات موتاژنیک می‌باشد. به عنوان مثال بیان آنزیم AID در E.coli موجب جهش در هر دو رشته الگو و غیر الگو در ژن

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

مقاومت به کانامایسین می‌شود(۱۰). در وکتور پلاسمیدی تحت کنترل پروموتر 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. آنکوبه‌کردن‌آنزیم خالص شده AID با DNA فاژ M13mp2 و سپس انتقال به سویه E.coli فاقد آنزیم UNG موجب القاء جهش در داکسی‌سیتوزین 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 تک رشته حذف می‌نماید و مستقیماً سبب القای موتاسیون می‌شود.

در مطالعات مختلف از سویه های mutator باکتری E.coli مانند تولید باکتری های 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 جهش زایی 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 خواهدگرفت.

سیستم های 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 پروموترهای 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 رپرسورcI857 به اپراتور مهار می‌شود در حالی که در دمای بالای ۳۷ درجه سانتی گراد به دنبال غیر فعال‌سازی رپرسور، نسخه برداری توسط آنزیم RNA polymerase میزبان آغاز می‌شود(۱۶). سیستم‌های بیانی بر پایه پروموتر lac با بیان نسبتا ضعیف پروتئین و نشتی همراه می‌باشند. به علاوه نشتی بیان مشکل مواجه شده در استفاده از پروموترهای trp, tac و پروموترهای 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(۱۸،۱۷).

در مجموع به دلیل این که القای بیان توسط پروموتر PL/PR باکتریوفاژ لامبدا با کنترل شدید و بدون نشتی و همچنین بدون نیاز به القاگر های شیمیایی انجام می شود، سازه ساخته شده در این مطالعه، حاوی ژن AID تحت پروموتر PL باکتریوفاژ لامبدا می تواند 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

شناسی پزشکی می‌باشد که هزینه آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی طرح مصوب شماره ۲۴۵۴ تأمین شده است. لذا از تمامی اعضای محترم گروه ایمنی‌شناسی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

References

1. 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.
2. Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. J Exp Med 2003; 197(10): 1291-1296.
3. Delker RK, Fugmann SD, Papavasiliou FN. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. Nat Immunol 2009; 10(11): 1147-1153.
4. 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.
5. Rogozin IB, Pavlov YI. The cytidine deaminase AID exhibits similar functional properties in yeast and mammals. Mol Immunol 2006; 43(9): 1481-1484.
6. 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.
7. 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.
8. Rubin-Pitel S. Chapter 3-Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources 2007: 49-72.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Chao L, Cox EC. Competition between high and low mutating strains of Escherichia coli. Evolution 1983; 37(1): 125-134.
14. Selifonova O, Valle F, Schellenberger V. Rapid evolution of novel traits in microorganisms. Appl Environ Microb 2001; 67(8): 3645-3649.
15. Muteeb G, Sen R. Random mutagenesis using a mutator strain. 2010; 634: 411-419.
16. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Front Microbiol. 2014; 5: 172.
17. Nicastro J, Sheldon K, Slavcev RA.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]