

Setting up the DNA Ladder Production Line in order to Use in Electrophoresis

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh² 

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Current Address: Biology Teacher, Azadegan High School, Maragheh

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Correspondence:

Maghsoud Pazhouhandeh

Email: pazhouhandeh@gmail.com

Received: 25, Nov. 2024

Accepted: 17, Feb. 2025

How to cite:

Sahandi Khalifeh-Kandy, A., & Pazhouhandeh, M. (2025). Setting up the DNA ladder Production line in order to use in electrophoresis. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 19-27.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72897.1991](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72897.1991))

ABSTRACT

DNA markers are the solution of DNA fragments of different lengths. These markers are used to evaluate the results of the polymerase chain reactions (PCR) and the enzymatic digestion reactions, to confirm the vectors containing the desired DNA fragment, to study the genetic variation by molecular markers in different organisms and in other methods used in molecular genetics, biotechnology and in medical diagnostic applications. DNA ladder is an essential tool in agarose or polyacrylamide gel electrophoresis and its price is high due to the high production cost. By comparing the movement of known fragments of a ladder on the electrophoresis gel, the size (base pair) of unknown fragments obtained in a test can be estimated. In this study a new method for producing a high-consumption and low-production-cost DNA size marker was presented. The PCR technique was performed on a plant gene to obtain the desired fragments with different sizes of 100 bp. The interested fragments were cloned separately into pKS plasmid using an enzymatic digestion site at both ends. The recombinant plasmids were amplified in bacteria. Finally, by a simple enzymatic digestion with a common enzyme (*Bam*HI) on plasmids extracted from bacteria, all the necessary fragments were obtained to produce the expected DNA size marker. In this applicable research, the production line of a DNA marker was set up. This produced ladder with a range of 100 to 3000 bp fragments has a wide use in medical research and diagnosis. With its industrial production, the market will be supplied at a much lower cost.

KEY WORDS

Cloning, DNA Ladder, Electrophoresis, PCR.



«مقاله پژوهشی»

راه اندازی خط تولید مارکر اندازه DNA برای استفاده در الکتروفورز

امین سهندی خلیفه کندی^۱، مقصود پژوهنده^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

آدرس جدید: دبیر زیست شناسی، دبیرستان نمونه آزادگان، مراغه

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

نویسنده مسئول:

مقصود پژوهنده

رایانامه: pazhouhandeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹

استناد به این مقاله:

سهندی خلیفه کندی، امین و پژوهنده، مقصود (۱۴۰۴). راه اندازی خط تولید مارکر اندازه DNA برای استفاده در الکتروفورز، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۱۹-۲۷.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72897.1991](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72897.1991))

چکیده

مارکرهای DNA محلول‌هایی از قطعات DNA با طول‌های مختلف هستند. این مارکرها برای بررسی نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، واکنش‌های برش آنزیمی، بررسی وکتورهای حاوی قطعه DNA مورد نظر، بررسی تنوع ژنتیکی در مارکرهای مولکولی موجودات مختلف و سایر روش‌های مورد استفاده در ژنتیک مولکولی، بیوتکنولوژی و تشخیص طبی کاربرد دارند. مارکر اندازه DNA یک ابزار ضروری در انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز و پلی‌آکریل‌آمید می‌باشد که به سبب بالا بودن هزینه تولید، قیمت بالایی دارد. با مقایسه میزان حرکت قطعات شناخته شده مارکر بر روی ژل در الکتروفورز می‌توان اندازه قطعات مجهول حاصل از آزمایش را بر حسب جفت باز تخمین زد. در این پژوهش شیوه‌ای جدید برای تولید یک مارکر اندازه DNA با قابلیت مصرف بالا و هزینه تولید پایین‌تر ارائه گردید. ابتدا جهت دست-یابی به قطعات با اندازه‌های مورد نظر با تفاوت ۱۰۰ جفت باز از PCR روی یک ژن گیاهی استفاده شد. قطعات مورد نظر بطور جداگانه به کمک سایت برشی یک آنزیم در پلاسمید pKS همسانه‌سازی گردید. پلاسمیدهای نو ترکیب با انتقال به باکتری تکثیر یافتند. در نهایت از طریق برش آنزیمی با تنها یک آنزیم رایج (BamHI) روی مخلوط پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، تمام قطعات مورد نیاز برای تولید مارکر اندازه DNA مورد انتظار بدست آمدند. در این پژوهش کاربردی مقدمات و خط تولید یک مارکر DNA راه اندازی شد. مارکر تولیدی با طیفی از قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌تواند قابلیت استفاده وسیعی در تحقیقات مولکولی و تشخیص طبی داشته باشد. با تولید صنعتی آن نیاز بازار کشور از لحاظ تامین این ماده وارداتی با هزینه‌ای بسیار پایین‌تر برطرف می‌شود.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز، مارکر DNA، همسانه‌سازی، PCR.

مقدمه

با پیشرفت تکنیک های ژنتیک مولکولی و دستکاری ژنتیکی، مارکرهای اندازه DNA استاندارد مورد نیاز می باشد تا از طریق مقایسه میزان حرکت قطعات شناخته شده آن بر روی ژل در تکنیک الکتروفورز بتوان اندازه قطعات مجهول حاصل از آزمایشات مختلف را بر حسب جفت باز تخمین زد. مارکرهای DNA همچنین در بررسی اولیه قطعات حاصل از برش آنزیمی، بررسی نتایج واکنش های زنجیره ای پلیمرز، بررسی وکتورهای حاوی قطعه DNA موردنظر و در سایر روش های مولکولی کار با DNA مورد استفاده قرار می گیرند (Saidijam et al., 2011). مارکرهای DNA محلول هایی از قطعات DNA با طول های متفاوت هستند (Lan et al., 2012). در واقع DNA مارکرها از ابزارهای ضروری در فرایند الکتروفورز بر روی ژل آگارز و پلی آکریل آمید می باشند (Ye et al., 2012). همچنین از DNA مارکرها به منظور تعیین وزن مولکولی قطعات مورد مطالعه و بررسی کمی قطعات DNA هدف استفاده می شود (Zhang et al., 2012). بطور معمول DNA مارکرها از طریق برش آنزیمی DNA های طبیعی بطور مثال، DNA ژنومی فاژ لامبدا یا سوسک *Tenibrio molitor* تهیه می شوند. همچنین DNA مارکرها از طریق برش وکتورهای مصنوعی ایجاد می شوند. از روش های دیگر در تهیه DNA مارکرها استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز و ساخت قطعات کوچک DNA به صورت شیمیایی است (Ye et al., 2012).

پیشینه پژوهش

ساده ترین راه تهیه DNA مارکر استفاده از الگوی برش آنزیمی انواع فاژها یا پلاسمیدهایی است که نقشه محل برش آنها توسط آنزیم های اندونوکلاز محدود الایثر مشخص می باشد. قطعات حاصل از این روش به نوع آنزیم های اندونوکلاز، ترکیب بازی ژنوم و شرایط برش آنزیمی بستگی دارد. انواع مختلفی از فاژها و پلاسمیدها در این راستا به کار گرفته شده اند (Cooney, 1994; Chen et al., 2009; Wang et al., 2010). این روش

با وجود سادگی دارای کاستی هایی از قبیل فقدان الگوی منظم برای افزایش طول قطعات، متغیر بودن غلظت هر قطعه به خاطر تفاوت در وزن مولکولی نسبی آنها و نیز اتفاقی بودن محل های برش آنزیمی است و در نتیجه استفاده از آنها را با مشکل همراه می سازد. بنابراین برای افزایش دقت در تعیین اندازه و سادگی استفاده، وجود باندهای فراوان با محدوده اندازه هایی منطقی و پرکاربرد که به صورت منظم و مساوی افزایش می یابند بسیار سودمند خواهد بود (Saidijam et al., 2011). در روش واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعات تولید شده قابل طراحی در اندازه های مطلوب می باشند. اما مشکل اصلی این روش پیچیدگی و هزینه بر بودن آن به واسطه استفاده از چندین مجموعه آغازگر است که هر یک به نوبه خود نیازمند برنامه دهی منحصر به فرد PCR به ماشین بوده و از طرفی هزینه ساخت تعداد زیادی آغازگر به لحاظ اقتصادی برای هر بار تولید مارکر مقرون به صرفه نمی باشد (Wang et al., 2010). در روش دیگری با به کارگیری تکنیک های کلونینگ، PCR و برش جزئی توسط آنزیم های اندونوکلاز قطعات DNA ۱۰۰ جفت بازی حاوی یک سایت برشی در دو انتها را از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز سنتز و بعد از برش با آنزیم برشی آنها را طی فرایند خود اتصالی به یکدیگر متصل و ساختاری تکراری از این قطعات را تولید کردند. ساختارهای تکراری حاصل را با استفاده از آنزیم اندونوکلاز مناسب به صورت جزئی برش داده و DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی را تهیه نمودند (Lan et al., 2012). در روشی دیگر به منظور تهیه DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی از تکنیک PCR چندگانه (Multiplex) استفاده شد. در این روش، قطعات DNA ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده براساس ناحیه ۶۶۳۱ تا ۷۶۳۰ DNA فاژ لامبدا تکثیر یافتند. قطعات DNA هدف با استفاده از تلفیق Touchdown PCR و Hot start PCR تکثیر، سپس بوسیله فنل کلروفرم خالص سازی و بعد از رسوب توسط اتانول در نهایت بطور کامل مخلوط شدند. در این روش، تمام قطعات DNA بطور موفقیت آمیز در یک واکنش PCR سنتز و تمام باندهای حاصل از این قطعات

روش شناسی پژوهش

به منظور سنتز و حصول قطعات با اندازه های مختلف جهت استفاده در مارکر ابتدا با PCR، آغازگرهای مناسب با الگو قراردادن ژن CLF گیاه مدل آراییدوپسیس تالیانا و از طریق نرم افزار A plasmid Editor (ApE) طراحی شدند. ژن CLF یک ژن در مسیر اپی ژنتیک گلدهی در این گیاه هست که در آزمایشگاه به تازگی همسانه سازی و توالی یابی شده بود و در دسترس بود و دلیل اصلی استفاده از این ژن بزرگ بودن آن بود که امکان تکثیر تا ۲۷۰۰ جفت باز را برای ما فراهم می ساخت. در طراحی آغازگرها یک آغازگر مستقیم برای ابتدای ژن و ۱۵ آغازگر معکوس به ترتیب به نواحی ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۲۷۰۰ جفت بازی با فاصله از ابتدای این ژن طراحی گردید (جدول ۱). به منظور همسانه سازی قطعات فوق در ابتدای آغازگرها سایت برشی آنزیم BamHI یعنی GGATCC قرارداده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده به منظور سنتز به شرکت تکاپوزیست فرستاده شدند.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 1. The sequence of used Primer in this study

Primer	Sequence
F	aaGGATCCATGGCGTCAGAAGCTTCGCGC
R1	aaGGATCCTGATACTTCCTTAGAAGCTG
R2	aaGGATCCGAGTAATAGCAAACAAATTC
R3	aaGGATCCCCGCTTTTCATACCTGGCGA
R4	aaGGATCCAGGACGTAAGGAAATTTTGA
R5	aaGGATCCTTCGACCCACTACAGACTGG
R6	aaGGATCCTCCAAAAATCTCTTTTTC
R7	aaGGATCCTTCACTAGTACTTCTAGACA
R8	aaGGATCCCTCCTTCCATATCTTTGTTG
R9	aaGGATCCGTTTCTCAGCCGGAATAAT
R10	aaGGATCCAATGGTGCCATATCCCGGAA
R12	aaGGATCCGGCGATGATGAAACTTTATC
R15	aaGGATCCTCATTGACTGGCAAACAGG
R20	aaGGATCCAAGGACATTCTTCCACAA
R25	aaGGATCCAGGTTTCAGGAGAATGGTTGG
R27	aaGGATCCCTAAGCAAGCTTCTTGGGTC

قطعات مورد نظر از طریق واکنش زنجیره ای پلی مرز و با آغازگرهای اختصاصی (آغازگر مستقیم برای تمام قطعات یکسان و آغازگرهای معکوس اختصاصی می باشند) در حجم ۵۰ میکرولیتر (۱۰ میلی مولار، آغازگر

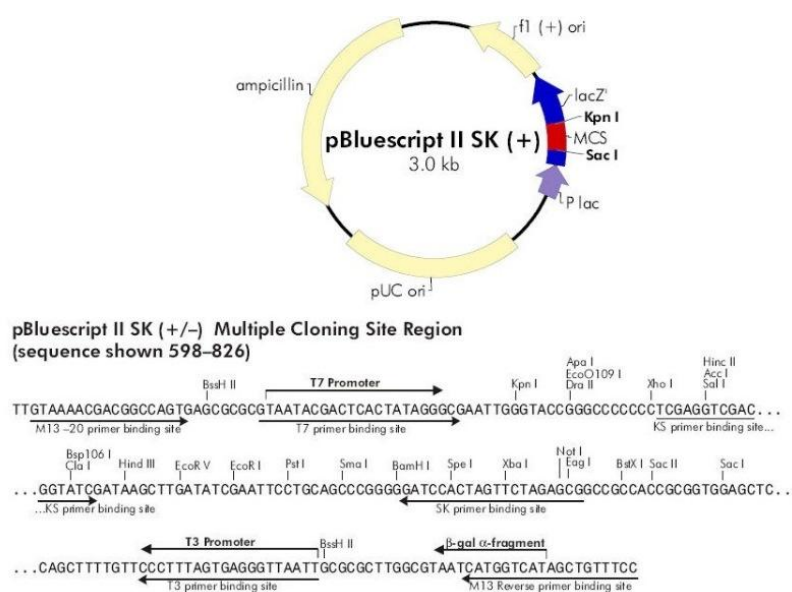
بطور واضح روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید (Wang *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعات ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ جفت بازی را از روی ژنوم فاژ لامبدا سنتز و همچنین با ساخت وکتورهای مصنوعی و سپس برش آنها با آنزیم های برشی اندونوکلاز نیز موفق به تولید قطعات بزرگ تر (۵۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ جفت بازی) شدند. در نهایت محصول حاصل از برش آنزیمی را بعد از خالص سازی با محصول PCR مخلوط و DNA مارکر با وزن مولکولی بالا را تولید کردند (Zhang *et al.*, 2012). یک پژوهش دیگر از تکنیک PCR چندگانه (Multiplex) روی فاژ لامبدا برای تهیه مارکر با تعدادی قطعات مختلف استفاده کرد (Gopalakrishnan *et al.*, 2010). در آزمایشگاه دیگری قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی را با PCR از روی DNA پلاسمید pUC تکثیر و به عنوان مارکر مورد استفاده قرار دادند (Abbasian *et al.*, 2015). در یک تحقیق دیگری با استفاده از PCR قطعات مختلف ایجاد و در دو پلاسمید قرار دادند که قابل تکثیر در باکتری بوده و با استفاده از دو آنزیم برشی روی این پلاسمیدها قطعات با اندازه های مختلف را برای مارکر الکتروفورز تهیه کردند (Henrici *et al.*, 2017). در یک آزمایش دیگری با الگو قرار دادن DNA باکتری باسیلوس به روش تنها PCR تعداد ۱۰ قطعه تکثیر و یک مارکر الکتروفورز تولید کردند (Sekhavi *et al.*, 2015). همچنین از DNA سوسک آرد (*Tenebrio molitor*) نیز برای ساخت مارکر الکتروفورز با استفاده از PCR و کلونینگ استفاده شده است (Barvish *et al.*, 2007).

با توجه به کاربرد فراوان مارکرهای DNA در زمینه های مختلف بیولوژی مولکولی و قیمت بالای این مارکرها به سبب بالا بودن هزینه تولید، این مارکرها همواره جزء ابزارهای مولکولی با ارزش و پرمصرف در آزمایشگاه های بیولوژی مولکولی می باشند. در این پژوهش سعی شد خط تولید صنعتی یکی از مارکرهای اندازه DNA با قابلیت مصرف بالا و با صرف هزینه پایین تر با کاربرد روش های تلفیقی راه اندازی گردد.

pKS+900bp, pKS+800bp, pKS+700, pKS+1500bp, pKS+1200bp, pKS+1000, pKS+2000, pKS+2500bp و pKS+2700bp تشکیل شوند. واکنش لیگاسیون در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم پلاسمید برش یافته، به نسبت ۱ (پلاسمید) به ۳ (قطعه) از محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر X10 لیگاسیون، ۱ واحد آنزیم T4 DNA Ligase و اضافه کردن آب مقطر دیونیزه تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. سپس فرایند خالص سازی روی محصول لیگاسیون انجام و محصول نهایی لیگاسیون با الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* سویه Top10 انتقال یافت. باکتری های ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند. بعد از رشد کلنی های باکتری در محیط فوق به منظور تایید کلنی های حاوی پلاسمید نو ترکیب از واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده شد. به منظور استخراج DNA پلاسمیدی از کلنی های مثبت ابتدا کشت مایع آنها در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین صورت گرفت. سپس پلاسمیدهای آنها به روش mini prep استخراج گردید و برای تایید پلاسمیدهای نو ترکیب واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی هر قطعه انجام گرفت و با مشاهده قطعه مورد نظر روی ژل آگارز در الکتروفورز، پلاسمیدهای استخراج شده تایید گردید. در مرحله بعد جهت تایید نهایی پلاسمیدهای استخراج شده پلاسمیدهای حاصل طی فرایند برش آنزیمی با آنزیم BamHI تیمار و محصول آن از طریق الکتروفورز تایید شد. با تایید و شناسایی دقیق کلنی های باکتری حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب از کلنی های مثبت محلول ذخیره گلیسرول به منظور نگهداری طولانی مدت تهیه و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای تولید مارکر DNA کشت مایع مخلوط همه باکتری های مورد نظر انجام و پس از استخراج پلاسمید از آنها روی پلاسمیدهای استخراج شده توسط آنزیم برشی BamHI برش صورت گرفت. در نهایت با رقیق سازی محصول در بافر بارگذاری مارکر DNA، مارکر مورد نظر فرموله شده و مورد استفاده قرار گرفت.

مستقیم ۱۰ میکرو مولار، آغازگر معکوس ۱۰ میکرو مولار، DNA الگو یک میکروگرم بر میکرولیتر، هر کدام یک میکرولیتر و آنزیم Mag Taq DNA polymerase (سینا ژن تبریز) با غلظت ۵ واحد بر میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه تا ۵۰ میکرولیتر به تیوب ها اضافه شد و شرایط دمایی شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، تکثیر در طول ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگرها به DNA الگو به مدت ۳۵ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی گراد و بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای سنتز قطعات ۱۰۰۰ و کوچکتر از ۱۰۰۰ جفت باز و همچنین با شرایط دمایی فوق و بسط یک دقیقه و ۱۵ ثانیه برای سنتز قطعات بزرگتر از ۱۰۰۰ جفت باز استفاده گردید. به منظور تایید قطعات حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز محصول واکنش PCR قطعات ۵۰۰ و کوچکتر از ۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و قطعات بزرگتر از ۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و بعد از تایید آنها از طریق سانتریفیوژ با استفاده از فنل کلروفرم خالص سازی شدند. جهت همسانه سازی قطعات، ابتدا طی واکنش برش آنزیمی قطعات خالص شده و پلاسمید pKS یا pBlueScript II (شکل ۱) که دارای یک عدد سایت برشی BamHI و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین می باشد توسط آنزیم BamHI خریداری شده از شرکت Fermentas طبق دستورالعمل توصیه شده (۰/۵ میکروگرم DNA، ۴ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم، ۱ میکرولیتر (۱۰ واحد) آنزیم و بقیه آب مقطر دیونیزه) برش یافتند. قطعات و پلاسمید برش یافته روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین (LMP) بارگذاری شد و بعد از تایید برش یافتن قطعات و پلاسمید مورد نظر جداسازی و خالص سازی شدند. به منظور همسانه سازی، طی فرایند لیگاسیون قطعات برش یافته بطور مستقل و جداگانه هر کدام به داخل پلاسمید برش یافته انتقال یافت تا پلاسمیدهای نو ترکیب (pKS+100bp, pKS+200bp, pKS+300bp, pKS+400, pKS+500bp, pKS+600bp)



شکل ۱. تصویر نقشه پلاسمید pKS یا pBluescript II مورد استفاده در این تحقیق
Figure 1. The Map of pBluescript II plasmid used in this study.

منظمی برای افزایش طول قطعات و متغیر بودن غلظت هر قطعه به خاطر تفاوت در وزن مولکولی نسبی آنها و نبود قطعات DNA در اندازه و طولهای مناسب و مورد نیاز از بازار پسندی بسیار پایینی برخوردار است (Wang et al., 2010). روش دیگر تهیه DNA مارکر استفاده از PCR برای ساخت قطعات مورد نیاز برای تهیه آن است (Ye et al., 2012)، این روش و حتی استفاده از Multiplex PCR با وجود قابلیت طراحی قطعات در اندازه‌های مطلوب، به سبب هزینه بر بودن به واسطه استفاده از چندین مجموعه آغازگر، نیاز به استفاده از دستگاه ترموسایکلر و برنامه‌دهی منحصر به فرد برای ساخت هریک از قطعات در نتیجه پیچیدگی بالای این روش لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد (Wang et al., 2010). ساخت قطعات کوچک DNA با اندازه‌های مشخص به صورت کاملاً شیمیایی نیز روش دیگر برای تهیه DNA مارکرها می‌باشد که این روش نیز با توجه به هزینه بالای سنتز مصنوعی تمام قطعات از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. با توجه به هزینه بر بودن، پیچیده بودن و یا نداشتن الگوی منظمی در افزایش طول قطعات DNA مارکرها تولیدی به روش‌های فوق، در پژوهش حاضر تولید قطعات مختلف DNA به منظور

با توجه به متفاوت بودن غلظت هر یک از باندها، روی ژل آگارز و هزینه بر بودن خالص‌سازی هر یک از باندها از روی ژل به طور جداگانه و اندازه‌گیری غلظت دقیق باندها، به منظور تعیین غلظت باندهای موجود در مارکر DNA تولیدی از نرم‌افزار Image J و با استفاده از مقایسه باندهای DNA Ladder شرکت Fermentas با DNA مارکر تولیدی استفاده و غلظت هر یک از باندها تعیین شد. در ضمن به منظور سهولت تشخیص باندهای مربوط به مارکر DNA تولید شده سه مورد از باندهای مربوط به قطعات ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی با افزایش غلظت این باندها به صوت شارپ و تیبیک در آمدند.

یافته‌های پژوهش

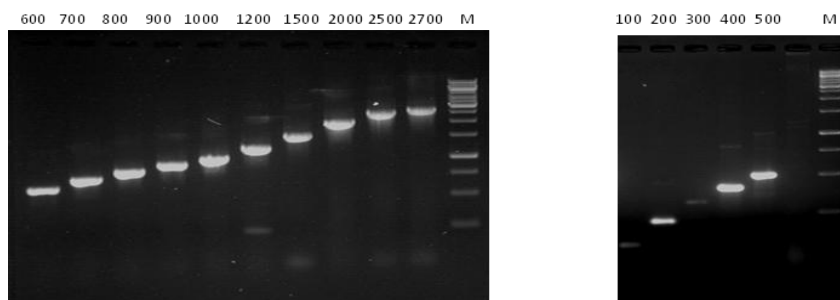
باتوجه به کاربرد وسیع مارکرها در اندازه DNA آزمایشگاه‌های علوم زیستی همواره بین شرکت‌های سازنده ابزارهای مولکولی به منظور تهیه مارکرها با صرف هزینه کمتر رقابت وجود دارد. تکنیک‌های مختلفی برای تولید تجاری انواع این مارکرها مولکولی وجود دارد، از جمله برش آنزیمی DNAهای طبیعی مثل DNA ژنومی فاژ لامبدا و سوسک *Tenibrio molitor* (Ye et al., 2012) این روش با وجود سادگی با توجه به فقدان الگوی

در یک تحقیق مشابه با استفاده از PCR روی DNA فاز لامبدا قطعات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر و با فنل کلروفرم خالص سازی و مارکر الکتروفورز ساختند (Wang *et al.*, 2011). در این تحقیق و همچنین تحقیقات مشابه (Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010;) (Gopalakrishnan *et al.*, 2010) DNA لامبدا به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت که یک مورد معمول در دسترس همه آزمایشگاه‌ها نیست. در حالیکه در بیشتر آزمایشگاه‌های گیاهی، آراییدوپسیس به عنوان گیاه مدل به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد و در تحقیق حاضر از یکی از ژنهای این گیاه استفاده شده است. در صورت بروز آلودگی به DNA الگو، مشکلی برای سایر تحقیقات بوجود نمی‌آورد اما فاز لامبدا می‌تواند برای باکتریهای میزبان خود در آزمایشگاه مشکل ساز باشد. میزبان فاز لامبدا باکتری اشرشیاکولی هست که در تمام آزمایشگاه‌ها به وفور برای کلونینگ‌ها استفاده می‌شود. از طرف دیگر، در صورت ورود و آلودگی مارکر الکتروفورز ساخته شده از لامبدا با باکتری، امکان تجزیه آن بخاطر وجود DNA لامبدا که دشمن باکتریها به شمار می‌رود وجود دارد. بنابراین در آزمایشگاه‌های مختلف مولکولی یک الگوی جایگزین و سالم برای سایر تحقیقات و همچنین قابل دسترس، ساخت مارکر و استفاده از آن را ساده می‌کند. در تحقیقات صورت گرفته (از جمله Wang *et al.*, 2011) مارکر ساخته شده فقط ۱۰ باند تا ۱۰۰۰ جفت باز را شامل می‌شود و بوسیله آن نمی‌توان باندهای DNA بزرگتر را روی ژل بررسی و تعیین اندازه کرد در صورتیکه با استفاده از مارکر تولیدشده در تحقیق حاضر قطعات و باندها از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز قابل بررسی و تعیین اندازه هستند.

تهیه مارکر DNA با صرف هزینه پایین و داشتن الگوی منظم افزایش طول قطعات DNA اساس کار قرار گرفت. به منظور تولید این قطعات آغازگرهای مناسب که در ابتدای آنها سایت برشی *Bam*HI جهت همسانه سازی قطعات قرار گرفته بود طراحی و سنتز قطعات مورد نیاز توسط واکنش PCR انجام گرفت (شکل ۲).

قطعات سنتز شده و پلاسمید pKS که حاوی سایت برشی *Bam*HI می باشد توسط آنزیم برشی *Bam*HI برش یافته و بعد از لیگاسیون به باکتری *E. coli* انتقال یافت. کلنی‌های حاوی پلاسمید انتخاب شده و وجود قطعه مورد نظر در آنها با PCR و برش آنزیمی تایید گردید. شماره کلنی‌ها مستقلاً حفظ شد و کشت توام آنها صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید بروش ماکسی پرپ و برش آنزیمی آنها با *Bam*HI مارکر DNA مورد نظر تولید شد. بهینه سازی‌هایی در مرحله کشت باکتری و مراحل بعدی صورت پذیرفت تا باندها با غلظت مشابه تولید گردند.

برای تایید قطعات DNA تولید شده در این تحقیق قطعات مورد نظر با قطعات موجود در مارکر DNA شرکت Fermentas (SM0311) مقایسه و مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳). در ادامه پژوهش با استفاده از نرم افزار J غلظت هر یک از باندها در مارکر DNA تولید شده با مقایسه میزان شارپ بودن باندهای مربوط به DNA مارکر شرکت Fermentase استفاده شده در این تحقیق و غلظت باندهای آنها تعیین شد (شکل ۳). همچنین با افزایش غلظت باندهای مربوط به قطعات ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی سه باند شارپ و تیپیک در مارکر DNA تولیدی تعبیه شد.



شکل ۲. تصویر الکتروفورز محصول PCR مربوط به سنتز قطعات ۱۰۰ تا ۲۷۰۰ جفت بازی

Figure 2. Electrophoresis profile of PCR Products for synthesis of 100-2700 bp fragments

پلاسمید با امکان کلونینگ T/A وارد شدند و چون پرایمرهای مورد استفاده دارای سایت برشی *EcoRI* بود بنابراین قابلیت تولید مارکر با یک برش آنزیمی فراهم شد (Mostaan *et al.*, 2015). تفاوت این تحقیق با تحقیق حاضر در روش کلونینگ، نوع پلاسمید و نوع آنزیم برشی و تنوع قطعات تولید شده می باشد. در سالهای اخیر با استفاده از نانو مولکولهای کربن و اعمال زمانهای متفاوت سونیفیکاسیون یک شاخص اندازه برای تعیین اندازه سایر مولکولها ساخته شده است و مارکر نانومولکول کربن نامگذاری شده است (Borzooeian *et al.*, 2018).

نتیجه گیری و پیشنهادها

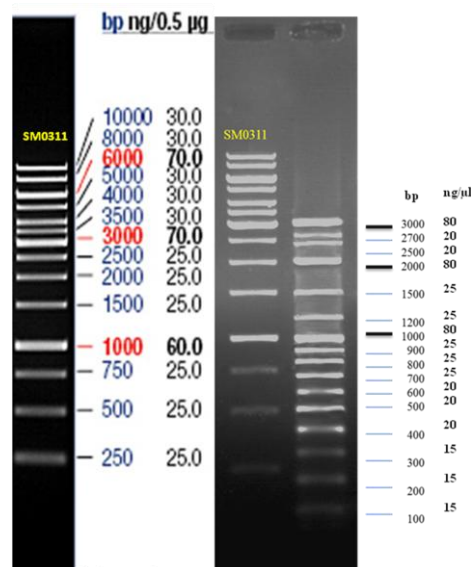
در نهایت خط تولید مارکر اندازه DNA با قطعات ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی با صرف هزینه پایین از طریق تلفیق تکنیک PCR و برش آنزیمی با موفقیت راه اندازی شد. با توجه به اینکه اغلب مطالعات به اندازه های زیر ۳۰۰۰ جهت مقایسه قطعات خود نیاز دارند این مارکر تولیدی با طیفی از قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز (با فاصله ۱۰۰ جفت باز در این دامنه) و قطعات ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی قابلیت استفاده وسیعی در تحقیقات ژنتیکی و مولکولی انسانی و جانوری و گیاهی و تشخیصی می تواند داشته باشد. با تولید صنعتی این محصول دانش بنیان نیاز بازار کشور به این ماده وارداتی، با هزینه ای بسیار پایین تر برطرف خواهد شد. در ادامه کار با افزودن قطعات بزرگتر از ۳۰۰۰ جفت باز مارکر اندازه با طیف وسیع تری نیز تولید خواهد شد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بابت تامین هزینه های این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۲۱۸/د/۱۷۱۱۵، تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.



شکل ۳. سمت راست مخلوط قطعات DNA حاصل از برش آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده از کلنی های مثبت، سمت چپ DNA Ladder SM0311 شرکت فرمنتاس.

Figure 3. Right: Mix of DNA fragments resulted from enzymatic digestion of recombinant plasmids extracted from positive colonies. Left: DNA Ladder SM0311 (Fermentas)

در تحقیق دیگری که قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی را با PCR از روی DNA پلاسمید pUC تکثیر و به عنوان مارکر معرفی کردند (Abbasian *et al.*, 2015) برای هر بار تولید مارکر مجبورند تمام قطعات را PCR کنند و هزینه آنزیم پلیمرز برای انجام PCR باعث افزایش هزینه تولید مارکر می شود در صورتیکه در تحقیق حاضر تنها یک بار و فقط یک آنزیم برشی سهل الوصول و رایج برای تولید همه قطعات بطور همزمان استفاده می شود. نقطه قوت تحقیق حاضر نسبت به پژوهش مشابه (Henrici *et al.*, 2017) که در آن نیز پلاسمید برای تولید مارکر ساخته شده بود، این است که ما فقط با یک آنزیم رایج *BamHI* قطعات مختلف را تولید می کنیم اما آنها با استفاده از دو آنزیم برشی *PstI* و *EcoRV* قطعات را ایجاد می کردند و استفاده از هر کدام از آنزیمهای برشی روی پلاسمیدها باعث ایجاد مارکرهای مختلف ۱۰۰ باز برای بررسی قطعات کوچک و یک کیلو باز برای بررسی قطعات بزرگ می شد. در یک تحقیق مشابه دیگری قطعات با طولهای مختلف با PCR تکثیر یافته و در یک

References

- Abbasian, M., Seyedi, H. A., Boroujeni, Z. K., & Mofid, M. R. (2015). Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory. *Advanced Biomedical Research*, 4:70. doi: 10.4103/2277-9175.153894.
- Barvish, Z., Davis, C., & Gitelman, I. (2007). A wide-range, low-cost 150 bp ladder for sizing DNA fragments between 150 and 4500 bp. *Electrophoresis*, 28(6), 900-2. Doi: 10.1002/elps.200600438.
- Borzooeian, Z., Taslim, M.E., Rezvani, S., & Borzooeian, G. (2018). A high precision length-based carbon nanotube ladder. *Royal Society of Chemistry (RSC) Advances*, 8(63), 36049-36055. doi: 10.1039/c8ra05482g.
- Chen, Z., Wu, J., Li, X., Ye, C., & Wenxing, H. (2009). Novel strategies to construct complex synthetic vectors to produce DNA molecular weight standards. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 128-133. doi: 10.1007/s12033-009-9145-0.
- Cooney, C.A. (1994). Techniques and high resolution DNA size markers for pulsed field gel electrophoresis. *Molecular Biotechnology*, 2, 119-27. Doi: 10.1007/BF02824804.
- Gopalakrishnan, R., Joseph, S., & Sellappa, S. (2010). Constructing a DNA ladder Range for Lambda Phage by multiplex PCR. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(4):210-2.
- Henrici, R. C., Pecen, T. J., Johnston, J. L., & Tan, S. (2017). The pPSU Plasmids for Generating DNA Molecular Weight Markers. *Scientific Reports*, 7(1), 2438. doi: 10.1038/s41598-017-02693-1.
- Lan, V.T., Loan, P.T., Duong, P.A., Thanhle, T., Ha, N.T., & Thuan, T.B. (2012). Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 254630, doi: 10.1155/2012/254630.
- Mostaan, S., Ajorloo, M., Khanahmad, H., Cohan, R.A., Tehrani, Z.R., Rezaei, M., Fazeli, F., Behdani, M., Zare, S.K., Karimi, Z., Mozhgani, S.H., & Moukhah, R. (2015). A novel combined method for cost-benefit production of DNA ladders. *Advanced Biomedical Research*, 4, 15. doi: 10.4103/2277-9175.148298.
- Saidijam, M., Khanahmad Shahreza, H., Rikhtegaran Tehrani, Z., Karimizare, S., Shabab, N., & Behdani, M. (2011). Designing and constructing an 100 bp DNA Ladder by combining PCR and enzyme digestion methods. *Tehran University Medical Journal*, 69(2), 75-82.
- Sekhavi, M., Tadayon, K., Ghaderi, R., Banihashemi, R., Jabbari, A.R., Shokri, G., & Karimnasab, N. (2015). "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal *Bacillus anthracis* strain. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(1), 45-9.
- Wang, T.Y., Guo, L., & Zhang, J.H. (2010). Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 421803, doi: 10.4061/2010/421803.
- Wang, T.Y., Wang, L., & Wang, F. (2011). Methodology: simplified preparation of a DNA ladder using PCR. *Genetics and Molecular Research*, 10(3):1631-5. doi: 10.4238/vol10-3gmr1177.
- Ye, C.H., Gu, J., Chen, S., Deng, A., Zhong, Y., & Li, D. (2012). Unit cloning and amplification as novel and universal strategies for complex vector construction and small DNA fragment preparation. *Electrophoresis*, 31, 2929-2935. doi: 10.1002/elps.201000222.
- Zhang, J.H., Yang, R., Wang, T.Y., Dong, W.H., Wang, F., & Wang, L. (2012). A simple and practical method that prepares high molecular weight DNA ladders. *Molecular Medicine Reports*, 6, 1211-1213. doi: 10.3892/mmr.2012.1061.