

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج - کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان:

بررسی امکان تهیه مارکر ژنتیکی (Luciferase gene)

جهت نشان دار کردن ورد یابی

بچه ماهیان سفید (*frissi kutum Rutiluc*) یا

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بعنوان شاخص زیستی

مجری:

فرامرز لالوئی

شماره ثبت

۴۸۲۷۵

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : بررسی امکان تهیه مارکر ژنتیکی (Luciferase gene) جهت نشان دار کردن و رد یابی بچه ماهیان سفید (*frissi kutum Rutiluc*) یا کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بعنوان شاخص زیستی
شماره مصوب پروژه : ۲-۷۶-۱۲-۸۹۰۵۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان :
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژهها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : فرامرز لالوئی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : رضا پورغلام، مژگان بنده پور، جواد تقوی، محمود قانع، محجوبه نیرانی ، مهدی یوسفیان
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : بهرام کاظمی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : احمد غرقی
محل اجرا : پژوهشکده اکولوژی دریای خزر
تاریخ شروع : ۹۱/۶/۱ الی ۹۲/۸/۲۸
مدت اجرا : ۳ سال ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»

پروژه : بررسی امکان تهیه مار کر ژنتیکی (Luciferase gene) جهت نشان دار کردن و رد یابی بچه ماهیان سفید (*frissi kutum Rutiluc*) یا

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بعنوان شاخص زیستی

کد مصوب : ۲-۷۶-۱۲-۸۹۰۵۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۲۷۵ تاریخ : ۹۴/۹/۱۴

با مسئولیت اجرایی جناب آقای فرامرز لالویی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته بیولوژی دریا می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری

آبزیان در تاریخ ۹۴/۶/۷ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید

گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	۱	۱
۱- مقدمه	۲	۲
۱-۱- ژن های گزارشگر	۳	۳
۱-۲- لوسی فراز	۳	۳
۱-۳- خصوصیات لوسی فرازهای باکتریایی	۴	۴
۱-۴- بیان ژن های لوکس در یوکاریوتها	۵	۵
۱-۵- تاریخچه مطالعات	۵	۵
۲- مواد و روشها	۷	۷
۲-۱- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده	۷	۷
۲-۲- مواد مورد استفاده	۸	۸
۲-۳- کشت اختصاصی باکتری و بیرو فیشری	۹	۹
۲-۴- استخراج DNA ژنومی باکتری	۱۰	۱۰
۲-۵- واکنش PCR	۱۱	۱۱
۲-۶- کلون سازی محصولات PCR در وکتور pTZ57R	۱۱	۱۱
۲-۷- غربالگری کلون های نو ترکیب	۱۲	۱۲
۲-۸- ساب کلونینگ قطعه luxA در وکتور pcDNA3.1+ / hyg	۱۳	۱۳
۲-۹- تائید ساب کلون ژن luxA در وکتور PcDNA3.1+ / hyg	۱۳	۱۳
۲-۱۰- ساب کلونینگ قطعه luxB در وکتور pcDNA3.1+ / neo	۱۴	۱۴
۲-۱۱- تائید ساب کلون ژن luxB در وکتور pcDNA3.1+ / neo	۱۵	۱۵
۲-۱۲- انتقال سازه های نو ترکیب به سلول های یوکاریوتی (Transfection)	۱۵	۱۵
۲-۱۳- مراحل استخراج پلاسمید توسط کیت	۱۵	۱۵
۲-۱۴- مراحل ترانسفکت	۱۷	۱۷
۲-۱۵- استخراج RNA	۱۷	۱۷
۲-۱۶- آماده سازی سلول ها جهت بررسی نور افکنی زیستی	۱۹	۱۹
۲-۱۷- انجام مراحل SDS-PAGE و وسترن بلات در سلولهای ترانسفکت شده	۲۰	۲۰

عنوان	صفحه
۲-۱۸- تکنیک وسترن بلاتینگ	۲۰
۳- نتایج	۲۲
۳-۱- کشت اختصاصی باکتری ویبریو فیشری	۲۲
۳-۲- واکنش PCR ژن luxAB	۲۲
۳-۳- غربالگری پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxAB	۲۳
۳-۴- PCR پلاسمید نو ترکیب	۲۴
۳-۵- برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxAB	۲۵
۳-۶- ساب کلون	۲۶
۳-۷- وسترن بلات (Western Blotting)	۲۸
۳-۸- تکثیر ژن های luxA و luxB با PCR	۲۹
۳-۹- تعیین توالی ژن های luxA و luxB	۳۰
۳-۱۰- کلون سازی محصولات PCR در وکتور pTZ57R و تائید آن	۳۳
۳-۱۱- ساب کلون ژن luxA در وکتور بیانی PcDNA3.1+ / hyg	۳۵
۳-۱۲- ساب کلون ژن luxB در وکتور بیانی PcDNA3.1+ / neo	۳۷
۳-۱۳- ترانسفکت سازه های نو ترکیب به سلول های یوکاریوتی	۳۸
۳-۱۴- بررسی خصوصیات نورزایی در سلولهای ترانسفکت شده	۳۹
۳-۱۵- بررسی بقاء سلولهای ترانسفکت شده در محیط انتخابی	۴۰
۳-۱۶- SDS-PAGE و وسترن بلات در سلولهای ترانسفکت شده	۴۱
۴- بحث و نتیجه گیری	۴۳
منابع	۴۹
چکیده انگلیسی	۵۱

چکیده

برای اجرای این پروژه جهت دستیابی به ژن لوسیفراز از باکتری ویبریوفیشری استفاده گردید. برای این منظور باکتری مورد نظر از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت در محیط اختصاصی، DNA ژنومی باکتری به روش فنل - کلروفرم استخراج شد. جهت تکثیر ژن های LuxA و LuxB از پرایمرهای اختصاصی که جایگاه های هضم آنزیمی *BamHI* و *KpnI* در سمت ۵' آن تعبیه شده بوده، استفاده گردید. محصول PCR پس از خالص سازی در پلاسמיד PT257R کلون گردید و سپس به سلولهای *Ecoli* منتقل شد. تائید کلون های نو ترکیب به روش PCR بارایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی انجام گرفت. پس از تائید، قطعات LuxA و LuxB بترتیب در وکتور بیانی PcDNA3.1\hug و PcDNA3.1\neo کلون و جهت تائید آن از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی و همچنین واکنش هضم آنزیمی استفاده شد. در نهایت پس از تائید، پلاسمیدهای نو ترکیب PcDNA3.1\hug و PcDNA3.1\neo با استفاده از کیت اختصاصی به سلولهای یوکاریوتی NIH3T3 منتقل شدند. جهت بررسی توانایی نوززائی سازه های ژنتیکی تهیه شده، از کشت سلولهای NIH3T3 در حضور دکانال (بعنوان سوبسترا) و غلظت های مختلف آنتی بیوتیک نئومايسين و هیگروميسين استفاده شد. نتایج نشان داد که پس از گذشت ۲ ساعت از اضافه شدن سوبسترا، واکنش نوززائی آغاز می شود و بتدریج با رسیدن به زمان ۶ ساعت، میزان نوززائی افزایش قابل ملاحظه ای می یابد. علاوه بر موارد فوق جهت تائید بیان و تولید پروتئین لوسی فراز، از روش SDS-PAGE و سترن بلات استفاده شد که ایجاد باند پروتئین ۷۶ کیلو دالتونی، موید صحت آزمایشات می باشد.

کلمات کلیدی: لوسیفراز، فیبریوفیشری، انتقال ژن

۱- مقدمه

نشاندار کردن اسیدهای نوکلئیک تحول بزرگی در بیولوژی مولکولی ایجاد نموده است. این تکنیک برای تأیید تحقیقات مولکولی و همچنین غربالگری کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب کاربرد وسیعی دارد. امروزه نشاندار کردن موجودات زنده با مارکرهای ژنتیکی در زمینه‌های مختلف علوم زیستی کاربردهای فراوانی دارد. با این تکنیک میتوان با نشاندار کردن بچه ماهیان مطالعاتی از قبیل ردیابی و تعیین مسیرهای مهاجرت آنها، تعیین ضریب بازگشت ماهیان، مطالعات بیولوژیکی و زیست محیطی، تشخیص بیماریها، کشف داروهای جدید و را انجام داد. ضمن اینکه این صفت پس از کلون کردن در تخم ماهی و بروز اثر آن در بچه ماهیان، در صورتیکه ماهی به مرحله مولد رسیده و تخم‌ریزی نماید قابل انتقال میباشد (Niwa et al., 2000).

تولید نورد موجودات از جمله صفاتی میباشد که در مطالعات بیولوژیکی کاربرد وسیعی دارد. با استخراج ژن عامل پروتئین تولید کننده نور و کلون نمودن آن در تخم ماهی میتوان این صفت را به ماهی منتقل و با تولید نورسبز رنگ ایجاد شده، آنها را شناسایی و ردیابی نمود (Niwa et al., 2000). فناوری لومینسانس یکی از ابزارهای دقیق، ارزان و حساسی است که در مسایل مختلف بیوفناوری همچون علوم پزشکی، کشاورزی، محیط زیست و صنایع دفاع استفاده دارد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیوفناوری مولکولی چندین ابزار از بیوفناوری جدید را در اختیار محققان قرار داده است که دارای مزیت‌هایی نسبت به دیگر ابزارها هستند. از آن جمله می‌توان قابلیت بسیار بالای سنجش و سرعت را در سیستم‌های کمی لومینسانس و بیولومینسانس نام برد. بیولومینسانس یا نشر نور به وسیله موجودات زنده، یکی از جالب‌ترین مباحث زیست‌شناسی است. با توسعه تحقیقات مشخص شده است که بعضی از این سیستم‌ها کاربرد تجزیه‌ای دارند. در واقع مطالعات داخل و خارج سلولی (in vitro in vivo) در زمینه فرآیندهای بیولوژیک (مانند بیان ژن، میانکشی پروتئین و پیشرفت بیماری) کاربردهای کلینیکی فراوان و کشف داروهای جدید را میسر کرده است. از طرفی، ادغام آنزیم‌های لومینسانس و فوتوپروتئین‌ها با اجزای ویژه زیستی در زمینه ژنتیک به توسعه ابزارهای تشخیص زیستی بسیار حساس منجر شده است. مزیت بسیار بالای کمی لومینسانس و بیولومینسانس قابلیت بسیار بالای اندازه‌گیری سیگنال است که در این قابلیت با استفاده از روشهای گوناگون فوتون‌های بسیار اندک اندازه‌گیری می‌شوند. اولین تحقیق در مورد ماهیان ترانسژنیک GFP در سال ۱۹۹۵ انجام گرفته و سرعت در بسیاری از مناطق جهان مورد استفاده قرار گرفت. در یک تحقیق که توسط Lee و همکاران (۲۰۰۰) انجام گرفت، موفق شدند ژن عامل پروتئین رنگ فلورسنت سبز را در ماهی کلون نمایند. این کلون تغییر یافته از مولدین به تخمهای لقاح یافته منتقل و سپس به نسلهای بعدی نیز منتقل شد. اهداف مهم اجرا این پروژه:

- کلون سازی ژن‌های رمز کننده آنزیم لوسی فراز در سلولهای یوکاریوتی
- ایجاد سازه‌های ژنتیکی بیانی مناسب جهت بیان ژنهای luxA و luxB بصورت همزمان در سلول‌های یوکاریوتی

- توالی یابی و آنالیز توالی مورد مطالعه و مقایسه آن با توالی ژن های مربوطه بانک ژن
- بررسی امکان کلون کردن ژن لوسیفراز در تخم ماهی سفید و کپور

۱-۱- ژن های گزارشگر^۱

بسیاری از پدیده های فیزیولوژیک از جمله ارتباطات سلولی ، توسعه سلولی ، تنظیم رشد ، تکثیر و اونکوژنز به تنظیم ژنی متفاوتی نیازمند است که اساسا در پاسخ به برنامه های توسعه داخلی و سیگنال های خارجی تنظیم می گردد. جهت دستیابی به اطلاعات اصلی درباره ارتباطات بین فعال کننده ها / مهار کننده های مسیرهای مختلف و تاثیر آنها در بیان ژن ، عناصر پاسخ دهنده خاصی با ژن های رمز کننده پروتئین های گزارشگر ادغام می شوند. این ژن های گزارشگر می توانند بعنوان شاخص هایی جهت نشان دادن فعالیت رونویسی در سلولها استفاده گردند. بصورت طبیعی ژن های گزارشگر به توالی پروموتور در یک وکتور بیانی متصل شده ، به داخل سلول انتقال می یابد و سپس سلول ها جهت حضور گزارشگر از طریق بررسی mRNA ، پروتئین یا فعالیت آنزیمی آن مورد آزمایش قرار می گیرند. ژن های گزارشگر نه تنها مزیت کاستن فعالیت زمینه ای را در سلول ها دارا هستند ، بلکه سیگنال را هم از سطح تکثیر نموده و پاسخی سریع ، حساس ، قابل تولید و به سهولت قابل تشخیص را ایجاد می نمایند. در حال حاضر ژن های گزارشگر بصورت وسیعی جهت کاربرد های *in vitro* و *in vivo* مورد استفاده قرار می گیرند . در عمل سیستم های گزارشگر جهت مطالعه توالی های پروموتور ، افزایش دهنده ها^۲ ، حدواسط های *trans acting* رونویسی ، پروسس mRNA و ترجمه کاربرد دارند. همچنین از آنها می توان جهت نشان دادن عفونت ، وقایع نوترکیبی و کتابخانه های عظیم غربالگری ژنومی جهت شناسایی عناصر ژنتیکی جدید استفاده نمود که نشان دهنده اهمیت آنها در زمینه های بیولوژی و بیوتکنولوژی می باشد. انتخاب گزارشگرها به رده سلولی مورد استفاده (فعالیت اندوژنی) ، طبیعت آزمایش و بعنوان مثال دینامیک بیان ژن در مقابل کارایی انتقال و سازگاری آزمایش جهت تشخیص مناسب (مثلا تصویر برداری یک سلول منفرد در مقابل غربالگری بیولوژیک) بستگی دارد (Jiang et al., 2008 ; Louise, 1999). مهمترین این گزارشگرها عبارتند از: کلرامفیکل استیل ترانسفراز (CAT) ، β گالاکتوزیداز (β -gal) ، آلکالین فسفاتاز (AP) ، پروتئین فلورسانت سبز (GFP) ، β -گلوکوروניداز (GUS) ، β -لاکتاماز و لوسی فراز.

۱-۲- لوسی فراز

آنزیم های لوسیفراز شامل خانواده ای از آنزیم ها با وزن مولکولی تقریبا ۶۰ کیلو دالتون و طول آمینواسیدی ۵۴۵ تا ۵۵۰ می باشند. از انواع شایع لوسی فرازها می توان به انواع خاکزی و دریایی باکتریایی ، لوسی فرازهای یوکاریوتی شب تاب و لوسی فراز بنفشه دریایی (*Renilla*) اشاره کرد. لوسی فرازهای شب تاب بهترین عضو

^۱ Reporter Genes

^۲ Enhancer

شناخته شده خانواده لوسی فرازا هستند با وزن مولکولی ۶۲ kDa که اکسیداسیون یک سوبسترای اختصاصی بنام D-لوسی فرین را در حضور اکسیژن و منبع انرژی ATP کاتالیز می کند. در طی واکنش انرژی شیمیایی بصورت نور مرئی (آبی-سبز) با طول موج ۵۳۰-۶۴۰ nm و با میانگین ۵۶۰nm ساطع می گردد. لوسی فراز Renilla (Rluc) عضو دیگر خانواده لوسی فرازا می باشد که از بنفشه دریایی (*Renilla reniformis*) جداسازی شده است و تحت تحریک مکانیکی، نور آبی-سبز را ساطع می نماید. همچنین Rluc بصورت وسیعی در بین مرجانها، ماهی ها، اسکوئیداها و خرچنگها گسترش یافته است. در مقایسه با لوسی فراز های شب تاب نیازی به ATP نداشته و از یک سوبسترای متفاوتی بنام coelenterazine استفاده می کند که با اکسیداسیون این سوبسترا نوری آبی با طول موج ۴۸۰ nm را ساطع می نماید (Jiang et al., 2008).

بکار بردن ترکیبات مشابه ولی دستکاری شده لوسفرین و یا تغییر شرایط واکنش نظیر اسیدیته محیط، نشان داده شده است که ایجاد تغییر در ساختمان سوم و یا ایجاد جهش در زنجیره پلی پپتیدی بخصوص در جایگاه فعال لوسفرین می توان شدت و طول موج (رنگ) فوتون ساطع شده را تغییر داد. از کاربردهای این آنزیم می توان به استفاده از آن در سنجش مقدار ای تی پی، بررسی مایعات بیولوژیک و تصویربرداری از سلول های زنده اشاره کرد. مکانیسم تولید نور در سلولهای زیر جلدی و فتوزن نتیجه اکسیده شدن ماده چربی بنام لوسفرین تحت تاثیر دیاستاز مخصوص بنام لوسفرین می باشد. در سوسکهای Pyrophorus تولید نور نتیجه اکسیده شدن ترکیب سبز رنگی بنام پیروفرین است که در خون این سوسک وجود داشته و تحت تاثیر اشعه ماوراء بنفش نورانی میشود. همچنین جانوران و گیاهان نورزای دیگر، واکنشهایی که منجر به تولید نور میشوند هنگامی آغاز می شوند که نوعی آنزیم بنام لوسی فراز به شکل یک کمپلکس با آدنوزین تری فسفات با ماده ای بنام لوسی-فرین ترکیب شده و کمپلکس دیگری را تشکیل می دهد که خودش بوسیله اکسیژن مولکولی اکسید شده و در این حالت نور تولید می کند. محصول اکسید شده خیلی پایدار است اما لوسفرین از طریق پیروفسفات میتواند از آن آزاد شود و بدین طریق ماده ای ایجاد مینماید که این چرخه را دوباره شروع نماید.

۳-۱- خصوصیات لوسی فرازهای باکتریایی

باکتری های نورزا بعنوان فراوان ترین و گسترده ترین اورگانیزم های نورزا می باشند که در محیط های آبی تازه، دریایی و خشکی یافت می شوند. شایع ترین جایگاه آنها بعنوان گونه های آزادزی اقیانوسها، ساپروفیت در اجزاء ماکروسکوپی حیوانات، باکتری های روده ای و انگلی در جانوران متنوع، پارازیت با سخت پوستان و حشرات و بصورت همزیست در اورگان های نوری ماهی ها و اسکوئیداها می باشند. این باکتری ها غالباً گرم منفی، میله ای شکل و هوازی های اختیاری هستند. تمامی باکتری های نورزا در سه جنس *Xenorhabdus*, *Photobacterium*, *Vibrio* قرار داشته و غالباً گونه هایی دریازی هستند. گونه های نورزایی که با جزئیات بررسی شده اند و آنزیم مربوطه در آن ها جداسازی و مورد مطالعه گردیده است عبارتند از:

Xenorhabdus) و *photobacterium leiognathi* ، *Photobacterium phosphoreum* ، *Vibrio harveyi* ، *Vibrio fischeri* باشد (*photorhabdus (luminescens)* ، که چهار گونه اول در محیطهای آبی یافت می شوند و گونه آخر خشکی زی می باشد (Meighen, 1994; Wilson, 1998). از آنجائیکه گونه های مختلف هر کدام از منابع متفاوتی جداسازی شده اند در بین سیستم های لوکس آنها نیز حتی در همان گونه تفاوت های قابل ملاحظه ای مشاهده می گردد. از آنجائیکه اکثر سویه های جنس *Photobacterium* بعنوان همزیست هایی در ارگان های نوری ماهی ها می باشند، به نظر می رسد که این جایگاه زیستی طبیعی آنها باشد. *P.phosphorium* باکتری نورزا بصورت همزیست با ماهیهای آبهای عمیق بوده ، در حالیکه *V.fischeri* و *P.leiognathi* باکتری های همزیست نورزا با ماهی های آبهای کم عمق و معتدل می باشند. در مقابل *V. harveyi* تا بحال بصورت همزیست در اورگان های نوری یافت نشده بلکه در سایر زیستگاههای دریایی می باشد. گزارش شده است که طیف های ساطع شده واکنش نورزایی برای آنزیمهای گونه های مختلف باکتری متفاوت می باشد و این تغییر طیفی بعلت تفاوت در توالیهای پروتئینی است. رنج بالاتر در حضور پروتئین های کمکی مشاهده شده است. در باکتری ویبریو فیشری سویه Y-1 یک پروتئین فلورسانت زرد (Yellow Fluorescent Protein) به لوسی فراز متصل می شود و منجر به ساطع شدن نور در طول موج بالاتری می گردد که منتهی به نورزایی λ_{max} در حدود 520 nm می شود. مطالعات بعدی اشاره بر این دارند که YEP بصورت مستقیم به آنزیم متصل نمی شود بلکه با یکی از انواع حدواسط ها پیش از تشکیل حالات حدواسط تحریک شده کنش می کند (Lee et al., 1985; Daunert et al., 1987).

۴-۱- بیان ژن های لوکس در یوکاریوتها

ادغام *luxA* و *luxB* بر خلاف بیان در سیستم های باکتریایی ، بیان در اکثر سیستم های یوکاریوتی نیازمند وجود پروموتورهای مجزا برای هر ژن است ، زیرا بیان کارآمد ژن های *luxA* و *luxB* رمز کننده هتروداایمر لوسی فراز نیازمند وجود دو پروموتور می باشد که لوسی فراز منو سیسترونیک تولید شده از طریق ادغام ژن های *luxA* و *luxB* باکتریایی بتواند در سیستم های یوکاریوتی بیان شود . این کار در باکتری ویبریو هارویی از طریق اضافه کردن یک نوکلئوتید و جایگزینی نوکلئوتید دوم در جایگاه ۲۹ در ناحیه بین ژنی *luxA* و *luxB* انجام شده است (Boyan et al., 1989). در نتیجه رمز پایان زیر واحد *luxA* حذف شده و توسط یک دکاپتید در چهارچوب قرار می گیرد . تاکنون تعداد متنوعی از لوسی فراز های منوسیسترونیک در ویبریو هارویی با روش های مشابهی با رابط های ۱ الی ۲۲ اسید آمینه ای تولید شده اند.

۵-۱- تاریخچه مطالعات

اولین تحقیق در مورد ماهیان ترانسژنیک GFP در سال ۱۹۹۵ انجام گرفته و سرعت در بسیاری از مناطق جهان مورد استفاده قرار گرفت. در یک تحقیق که توسط Lee و همکاران (۲۰۰۰) انجام گرفت، موفق شدند ژن عامل

پروتئین رنگ فلورسنت سبز را در ماهی کلون نمایند. Gong و Wang (۲۰۰۱) با انتقال ژن عامل مولد نور سبز رنگ، ماهیان ترانس ژنیک را بوجود آوردند. آنان توانستند پس از انتقال ژن GFP به تخم ماهیان، ماهیان تزئینی بوجود آورند. همچنین تلاشهایی در آزمایشگاه جهت ایجاد ماهیان ترانس ژنیک بمنظور موجودات کنترل کننده و نظارت بر آلودگی های محیطی صورت گرفته است. Niwa و همکاران (۲۰۰۰) تحقیقاتی بر روی آمیزش ماهیان حامل ژن تولید نور با ماهیان طبیعی و معمولی را انجام دادند. آنان موفق شدند بدین ترتیب ماهیان ترانس ژنیک را تولید نمایند.

Molina و همکاران (۲۰۰۲) ژن گزارشگر لوسیفراز را به ماهی تیلاپیا منتقل نمودند و توانستند میزان فعالیت آنزیمی لوسیفراز را بوسیله لومینومتر اندازه گیری نمایند. در مطالعات دیگری Tonheim و همکاران (۲۰۰۷) نیز موفق شدند ژن لوسیفراز را به ماهی آزاد اقیانوسی (*Salmo Salar L.*) منتقل و اثر آن را مشاهده نمایند. همچنین Dijkstra و همکاران (۲۰۰۰) پس از انتقال ژن لوسیفراز به *Catfish* (*Ptopterus biarrbus*) موفق به بیان آن در این گونه شدند. Niwa و همکاران (۲۰۰۰) در یک بررسی نشان دادند که ژن GFP میتواند بعنوان یک مارکر زیستی در ماهیان بکار رود. آنان موفق شدند ژن GFP را از طریق سلولهای تخم به *Medaka* (*Oryzias Latipes*) منتقل نمایند و بیان ژن را مشاهده نمایند.

Romqrem و همکاران (۲۰۰۴) ژن لوسیفراز را به ژنوم ماهی قزل آلا منتقل نموده و اثرات نورزایی آن را مشاهده نمودند (کلیه، جگر و ماهیچه).

۲- مواد و روشها

۲-۱- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده

- دستگاه PCR ترموسایکلر (CORBET & Primus)
- انکوباتور ۳۷ درجه Shaker (ساخت شرکت DAIKI)
- انکوباتور ۳۷ درجه معمولی (ساخت شرکت SHIMAZ ایران)
- سانتریفوژ یخچال دار (Hetich مدل Universal ۳۲ R آلمان)
- میکروفیوژ (Hettich مدل Micro 20 آلمان)
- دستگاه UV transilluminator پرتابل (ساخت Uvitec)
- تانک الکتروفورز افقی به همراه قالب (Caste) و شانه مناسب (ساخت شرکت اختریان ایران)
- فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد (SAIWAN)
- تانک الکتروفورز عمودی (ساخت شرکت پویا پژوهش)
- دستگاه Power supply (ساخت شرکت اختریان ایران)
- بن ماری (ساخت شرکت Behdad)
- ترازوی دیجیتال (Sartorius)
- سمپلر (ساخت شرکت سوکور کس سوئیس)
- لوله های شیشه ای در پیچ دار ۲۰ سانتی متری
- دستگاه سونیکاسیون (dr.hielscher GmbH)
- دستگاه بیوفوتومتر (ساخت شرکت اپندورف)
- تانک بلاتینگ
- قالب (Cast) مخصوص بلاتینگ (ساخت پویا پژوهش)
- دستگاه Cross linker ساخت کمپانی Uvitec
- کاغذ pvdf (Porablot آلمان)
- دستگاه اتو کلاو
- دستگاه Vortex
- سر سمپلر (Greiner آلمان)
- میکروتیوپ ۰/۲ و ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتری (ساخت شرکت اپندورف)
- آنس جهت برداشت و کشت باکتری
- فالکون استریل ۱۵cc و ۵۰cc
- پلیت ۷ سانتی متری کشت باکتری

- کاغذ واتمن
- ظروف شیشه ای از قبیل ارلن و بشر
- میکروسکپ invert فلورسانت (JULITM smart flurscent cell alalyzer, Cat no. JULI-B004)

۲-۲- مواد مورد استفاده

- پودر آگارز (شرکت فرمتناز لیتوانی)
- bp100 DNA Ladder marker (شرکت فرمتناز)
- پودر کلرید کلسیم
- آب مقطر دیونیزه استریل
- اتانول مطلق و ۷۰ درجه
- آنزیم های برش دهنده BamHI و EcoRI و KpnI بافرهای مربوطه (شرکت فرمتناز و Takara)
- آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰mg/ml (لازم به ذکر است که مصرف آمپی سیلین ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است اما غلظت استوک آن که در آزمایشگاه نگهداری می شود ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر است.)
- آنتی بیوتیک نئومایسین با غلظت ۱۰۰ mg/ml و هیگرومایسین با غلظت ۱۰۰ mg/ml
- آنزیم T4 DNA ligase و بافر مربوطه (فرمتناز)
- dNTP Mixture با غلظت (۱۰۰mM) (شرکت سیناژن)
- MgCl₂ (50 mM) (شرکت سیناژن)
- PCR buffer (10×) (شرکت سیناژن)
- آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۵ واحد/میکرولیتر (شرکت سیناژن)
- باکتری *E.coli* سویه TOP ۱۰ (سیناژن)
- باکتری *E. Coli* سویه BL ۲۱ و Nova Blue و JM109 (سیناژن)
- پلاسمید pTZ5۷R (فرمتناز)
- پلاسمید pcDNA3.1+/neo (انستیتو پاستور ایران)
- پلاسمید pcDNA3.1+ / hyg (انستیتو پاستور ایران)
- پلاسمید pet DUET (شرکت Nova gene)
- رده سلولی NIH 3T3
- رده سلولی HELA
- اسید کلریدریک غلیظ (سیگما)

- پودر محیط کشت LB (Luria Bertani)
- استات سدیم
- استات پتاسیم
- کلرید منیزیم
- NaOH
- آکریل آمید (MERCK)
- بیس آکریل آمید (N,N'-methylene bis acrylamid) (سیناژن)
- Tris-base (سیناژن)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- TEMED (N,N,N,N-tetramethylen-ethylen diamine)
- آگار آگار
- گلیسرول
- گلایسین
- بروموفنل بلو
- EDTA
- آمونیوم پرسولفات
- رنگ کوماسی بلو G۲۵۰ (فرمتاز)
- اسید استیک گلاسیال
- Triton X-۱۰۰ (سیگما)
- آنتی بادی منوکلونال لوسی فراز ab6721 (شرکت abcam)
- دکانال (۹۵٪، SAFC)

۳-۲- کشت اختصاصی باکتری ویبریو فیشری

باکتری ویبریو فیشری سویه (ATCC7744) از سازمان پژوهشی های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و در محیط اختصاصی (DSMZ246) و در دمای ۲۵-۲۰°C کشت داده شد. محیط کشت مذکور به صورت زیر تهیه گردید:

عصاره مخمر	۱۰۰ gr
پپتون	۱۰۰ gr
آگار	۲۰۰ gr
آب شیر	۲۵۰ ml
آب دریا	۷۵۰ ml

در ابتدا عصاره مخمر و پیتون از طریق حرارت دادن بصورت محلول در آمده و به pH ۷/۸ رسانده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشیده تا به pH=۷/۳ برسد. در مرحله بعدی آگار اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای C ۱۲۱^o اتوکلاو گردید. سپس آب دریا بصورت استریل شده با دمای C ۵۵^o به محیط اضافه شد. محیط مایع بدون آگار زمانی که سرد شد و به دمای محیط رسید باید مخلوط گردد.

۴-۲- استخراج DNA ژنومی باکتری

- استخراج DNA ژنومی به روش فنل - کلروفرم مطابق مراحل زیر انجام پذیرفت (Sambrook and Russel 2001):
- ۱- در شرایط استریل توسط آنس از باکتری های کشت داده شده در محیط کشت اختصاصی برداشت شده و به آن میزان ۵۰۰µl از بافر لیز اضافه و به مدت ۲ ساعت در بن ماری C ۳۷^o قرار داده شد. در بافر لیز تریس نقش بافر، EDTA بعنوان مهار کننده آنزیم های DNase و SDS بعنوان حل کننده چربی های موجود در غشاء سلولی عمل می نماید.
 - ۲- هم حجم مایع مورد نظر (۵۰۰µl) فنل به لوله اپندورف اضافه نموده، سپس به شدت آن را تکان داده و نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط و با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. فنل باعث حذف مواد آلی می گردد (دنا تورا سیون پروتئین های سلولی).
 - ۳- مایع شفاف رویی را به لوله اپندورف جدید منتقل و هم حجم آن کلروفرم اضافه شده و به شدت تکان داده شد. سپس مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط و با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ انجام گردید. کلروفرم منجر به حذف بقایای فنل از محلول واکنش می گردد، زیرا فنل یک بازدارنده مهم در واکنش PCR است.
 - ۴- مایع شفاف رویی را به اپندورف جدید منتقل نموده و ۱:۱ حجم آن NaAC (3M) و دو برابر حجم آن الکل مطلق سرد اضافه و مدت نیم الی دو ساعت در فریزر C ۲۰^o- قرار داده شد (سرما به رسوب DNA کمک می نماید).
 - ۵- نمونه به مدت ۲ دقیقه در دمای C ۴^o و با دور rpm ۱۲۰۰۰ و سانتریفوژ گردید.
 - ۶- الکل را خالی نموده و به رسوب ۱۰۰µl الکل ۷۰٪ اضافه می گردد. چند بار به اپندورف ضربه زده سپس در دمای C ۴^o و با دور rpm ۱۲۰۰۰ و به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. الکل ۷۰٪ باعث شست و شوی الکل مطلق شده و از تخریب DNA توسط الکل ممانعت می نماید.
 - ۷- مایع رویی را خالی نموده و اپندورف حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شد تا خشک گردد.
 - ۸- به اپندورف حاوی DNA به مقدار لازم آب مقطر استریل اضافه گردیده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای C ۳۷^o قرار گرفت تا DNA حل شود.

۵-۲-واکنش PCR

جهت تکثیر ژن های luxA و luxB بصورت جداگانه و انجام واکنش زنجیره ای پلی مریزاسیون از پلاسمید pTZ57R/luxAB استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های luxA و luxB توسط نرم افزار Gene Runner طراحی شد و جهت تسهیل در مراحل کلون سازی، در سمت ۵' پرایمر های Forward و Reverse ژن luxA به ترتیب جایگاه های هضم آنزیمی *BamHI* و *KpnI* و در سمت ۵' پرایمر های Forward و Reverse ژن luxB به ترتیب جایگاه های هضم آنزیمی *BamHI* و *EcoRI* تعبیه گردیدند. شرایط انجام PCR جهت تکثیر ژن luxA بصورت زیر می باشد :

PCR Buffer (10X)	3µl (1X)
dNTP (10mM)	1/5 µl
Mgcl2 (50 mM)	2/0 µl
Primer R/F	2 µl
pTZ57R/luxAB	1 µl
Taq DNA polymerase	0/25 µl (1U)
D.W.	20/5

.....
Total volume 30 µl

شرایط انجام PCR جهت تکثیر ژن luxB بصورت زیر می باشد :

PCR Buffer (10X)	3µl (1X)
dNTP (10mM)	1/5 µl
Mgcl2 (50 mM)	1/5 µl
Primer R/F	2 µl
PTZ57R/luxAB	1 µl
Taq DNA polymerase	0/25 µl (1U)
D.W.	20/5

.....
Total volume 30 µl

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته کردن ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، الحاق ۴۹ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه و بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

۶-۲-کلون سازی محصولات PCR در وکتور pTZ57R

پس از خاتمه PCR محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. پس از بررسی باندهای مشاهده شده و مقایسه آنها با مارکر وزن مولکولی، قطعه مورد نظر بوسیله کیت تخلیص ژل شرکت Bioneer (Gel Purification Kit Cat No.K3035-1) خالص سازی گردیده و قطعات خالص شده از طریق روش سنگر^۳ تعیین توالی گردید.

³ Sanger

بخشی از قطعات خالص شده از ژل به عنوان Insert جهت واکنش اتصال با پلاسمید pTZ57R به عنوان T-Vector استفاده گردید و واکنش های ligation به صورت زیر آماده شدند:

Insert (luxA)	3 μ l	Insert (luxB)	3 μ l
Vector (pTZ57R)	1 μ l	Vector (pTZ57R)	1 μ l
DNA ligase buffer (10X)	1 μ l	DNA ligase buffer (10X)	1 μ l
T4ligase	1 μ l	T4 ligase	1 μ l
D.W.	4 μ l	D.W.	4 μ l
.....		
Total volume	10 μ l	Total volume	10 μ l

واکنش اتصال بمدت یک شبانه روز و در دمای محیط انجام پذیرفت و در روز بعد محصول واکنش اتصال پس از آماده سازی سلول های مستعد پذیرش پلاسمید و در طی ترانسفورماسیون به سلول های *E.coli* سویه TOP10 انتقال یافتند.

۷-۲- غربالگری کلون های نو ترکیب

غربالگری در محیط واجد x-gal و IPTG و آنتی بیوتیک آمپی سیلین بر اساس شکل گیری کلنی های آبی و سفیدی می باشد که پس از گذشت ۲۴ ساعت بر روی پلیت ظاهر می شود. جهت بررسی صحت حضور ژن های luxA و luxB تعدادی از کلنی های سفید موجود روی پلیت در محیط LB مایع واجد آمپی سیلین به صورت خطی و به مدت ۱۲-۱۶ ساعت کشت داده شد.

پس از خالص سازی کلنی های نو ترکیب، جهت تأیید قطعه کلون شده در T- vector از واکنش زنجیره ای پلی مریزاسیون توسط پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای یونیورسال خاص pTZ57R و همچنین واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم های برشی محدودالثر تعبیه شده در انتهای ۵' پرایمرها انجام پذیرفت.

شرایط انجام واکنش هضم آنزیمی توسط جایگاه شناسایی های *BamHI* و *KpnI* به ترتیب در سمت ۵' پرایمرهای Forward و Reverse ژن luxA و جایگاه شناسایی آنزیمهای *BamHI* و *EcoRI* به ترتیب در سمت ۵' پرایمرهای Forward و Reverse ژن luxB بصورت زیر انجام پذیرفته و در نتیجه قطعات DNA خارجی luxA و luxB از پلاسمیدهای نو ترکیب خارج گردیدند.

pTZ57R/luxA	5 μ l	pTZ57R/luxB	5 μ l
K buffer (Takara Bio) (0/5 X)	2/5 μ l	buffer Tango (2X)	10 μ l
BamHI (Takara Bio)	1 μ l	BamHI (fermentas)	1 μ l
KpnI (Takara Bio)	1 μ l	EcoRI (fermentas)	1 μ l
D.W	40/5 μ l	D.W.	33 μ l

۸-۲- ساب کلونینگ قطعه luxA در وکتور pcDNA3.1+ / hyg

جهت ساب کلون کردن قطعه insert (luxA) در وکتور بیانی pcDNA3.1+ / hyg واکنشهای هضم آنزیمی توسط آنزیم های *KpnI* / *BamHI* برای وکتور و قطعه بصورت همزمان انجام گرفت. این واکنش جهت تهیه insert توسط پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxA بصورت زیر انجام پذیرفته و قطعه luxA خارج گردید.

pTZ57R/luxA	5 µl
k buffer (Taraka)	5 µl
BamH1 (Takara)	1 µl
Kpn1 (Takara)	1 µl
D.W	39 µl

.....
Total volume 50 µl

هضم آنزیمی وکتور نیز بهتر است بصورت جداگانه انجام گرفته تا صحت برش آنزیمی را در جایگاه ورود قطعه luxA برای تاثیر هر دو آنزیم تأیید نماید. در هر واکنش پس از غیر فعال سازی آنزیم اول، آنزیم دوم اضافه گردید. سپس نتایج حاصل از واکنش هضم آنزیمی قطعه و وکتور به ترتیب روی ژل آگارز ۱/۵ و ۰/۸ درصد الکتروفورز شده و پس از برش از ژل، توسط کیت تخلیص ژل شرکت (Gel Purification Kit Cat No.K3035-1) از سایر اجزاء واکنش هضم آنزیمی، جدا گردیده است.

پس از آماده سازی سلول های مستعد پلاسمید، محصول واکنش اتصال به سلول های مستعد شده منتقل گردیده و روی پلیت های آگار حاوی آمپی سیلین پخش و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. در روز بعد تک کلونی های مشاهده شده در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام گرفت. پس از استخراج پلاسمید، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه های استخراجی به همراه وکتور pcDNA3.1+ / hyg بدون قطعه خارجی (به عنوان کنترل)، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید.

۹-۲- تأیید ساب کلون ژن luxA در وکتور PcDNA3.1+ / hyg

تأیید ساب کلونینگ قطعه luxA در وکتور pcDNA3.1+ / hyg به سه طریق انجام گرفت:

۱- واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی

۲- واکنش PCR توسط پرایمرهای یونیورسال خاص وکتور pcDNA3.1+

شرایط واکنش PCR توسط پرایمرهای یونیورسال وکتور به شرح زیر می باشد.

PCR Buffer (10X)	3µl (1X)
dNTp (10mM)	1 µl
Mgcl2 (50 mM)	1 µl
Primer R/F	1 µl
pTZ57R/luxAB	1 µl
Taq DNA polymerase	0/25 µl (1U)
D.W.	23 µl

.....
Total volume 30 µl

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب واسرشته سازی ، ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۴۰ ثانیه ، اتصال پرایمر ، ۵۷ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه و برای بسط واکنش ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

۳- واکنش هضم آنزیمی و خارج سازی قطعه luxA از پلاسمید توسط دو آنزیم *BamHI* و *KpnI* در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در طی ۳ ساعت کامل گردید.

pcDNA3.1+ / hyg / luxA	5 µl
K buffer (Takara Bio) (1X)	5µl
BamHI (Takara Bio)	1 µl
KpnI	1 µl
D.W.	38µl

۱۰-۲- ساب کلونینگ قطعه luxB در وکتور pcDNA3.1+ / neo

خصوصیات این وکتور مشابه وکتور pcDNA3.1+ / hyg است با این تفاوت که وکتور pcDNA3.1+ / neo واجد ژن مقاوم به آنتی بیوتیک نئومایسین می باشد ولی وکتور pcDNA3.1+ / hyg واجد ژن مقاوم به آنتی بیوتیک هیگرومایسین است. چنین شرایطی امکان انتخاب سلول هایی که واجد هر دو پلاسمید می باشند را پس از انجام مراحل ترانسفکت به سلول های یوکاریوتی فراهم می سازد .

جهت ساب کلون کردن قطعه insert (luxB) در وکتور بیانی pcDNA3.1+ / neo واکنشهای هضم آنزیمی توسط آنزیم های *EcoRI* , *BamHI* برای وکتور و قطعه بصورت همزمان انجام گرفت. این واکنش جهت تهیه insert توسط پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB انجام پذیرفت و قطعه luxB از وکتور pTZ57R خارج گردید .

PTZ57R/luxB	5 µl
K buffer	5 µl
BamHI	1 µl
KpnI	1 µl
D.W.	39 µl

.....
Total volume 50 µl

هضم آنزیمی وکتور نیز بهتر است بصورت جداگانه انجام گیرد تا صحت برش آنزیمی را در جایگاه ورود قطعه luxB برای تاثیر هر دو آنزیم تأیید نماید. در هر واکنش پس از غیر فعال سازی آنزیم اول ، آنزیم دوم اضافه گردید. پس از آماده سازی سلول های مستعد پلاسمید، محصولات واکنش اتصال به سلول های مستعد شده ترانس فورم و به پلیت های آگار حاوی آمپی سیلین وارد گردید. سپس بمدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در روز بعد تک کلونی های مشاهده شده در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شده و سپس استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام گرفت. پس از استخراج پلاسمید، میزان ۵

میکرولیتر از نمونه‌های استخراجی به همراه وکتور pcDNA3.1+/neo بدون قطعه خارجی (به عنوان کنترل)، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید.

۱۱-۲- تأیید ساب کلون ژن luxB در وکتور pcDNA3.1+/neo

ساب کلونینگ قطعه luxB در وکتور pcDNA3.1+/neo توسط واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی و وکتور توسط پرایمرهای یونیورسال و همچنین توسط واکنش هضم آنزیمی و خارج سازی قطعه luxB از پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1+/neo/luxB توسط دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* تأیید گردید .
واکنش هضم آنزیمی طی مدت ۳ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بشرح ذیل انجام گرفت :

pcDNA3.1 ⁺ / neo / luxB	۵ µl
Buffer Tango (fermentas) (2X)	10µl
BamHI (fermentas)	1 µl
EcoRI (fermentas)	1 µl
D.W.	33µl

۱۲-۲- انتقال سازه های نو ترکیب به سلول های یوکاریوتی (Transfection)

پس از تأیید پلاسمید های نو ترکیب pcDNA3.1+/hyg/luxA و pcDNA3.1+/neo/luxB و قبل از ترانسفکت این سازه های نو ترکیب به سلول های یوکاریوتی به ترتیب زیر عمل می شود:

۱- پلاسمیدها بصورت شبانه در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید .

۲- محیط کشت شبانه را به یک ارلن حاوی ۵۰ سی سی محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین انتقال داده و کشت مجدد بصورت شبانه در دمای ۳۷ درجه انکوباتور شیکر قرار داده شد .

۳- در روز بعد پلاسمید ها بصورت Midi Prep (کیت شرکت Bioneer) تخلیص گردید .

۴- جهت انجام مراحل ترانسفکشن غلظت هریک از پلاسمید های نمونه و کنترل تعیین گردیدند .

۱۳-۲- مراحل استخراج پلاسمید توسط کیت

۱- مقدار ۵۰ ml محیط کشت شبانه واجد پلاسمید بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتیفریژ گرفته و محیط بصورت کامل خارج گردید .

۲- مقدار ۳ ml از بافر ۱ را به سلول ها اضافه و از بوسیله ورتکس و پیپت کاملاً بصورت سوسپانسیون در می آمد

۳- مقدار ۳ ml از بافر ۲ را اضافه نموده و به آرامی لوله معکوس شده ، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می گردد. در این مرحله نباید ورتکس انجام گیرد زیرا سبب مخلوط شدن با DNA ژنومی می شود.

۴- مقدار ۳ ml از بافر ۳ را اضافه نموده و فوراً ۷-۵ بار لوله به آرامی معکوس شده و سپس به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در این مرحله DNA ژنومی و سایر اجزاء سلولی بصورت یک توده سفید رنگ قابل مشاهده هستند. باید دقت شود که DNA ژنومی با سایر اجزاء مخلوط نگردد.

۵- تیوپ به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ تجمع سفید پروتئینی ظاهر می شود.

۶- لیزات به فیلتر سرنگ انتقال داده و دهانه در بالای سرنگ قرار گرفت.

۷- محتویات درون سرنگ به تیوپ فیلتر اتصالی به DNA^۴ تزریق شد.

۸- تیوپ فیلتر اتصالی به DNA به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق و با دور ۳۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید.

۹- مایع زیرین دور ریخته و مجدداً تیوپ فیلتر اتصالی به DNA روی تیوپ آزمایش^۵ ۵۰ml قرار داده شد.

۱۰- مقدار ۱۰ ml از بافر ۴ تیوپ فیلتر اتصالی به DNA اضافه نموده و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق و با دور ۳۵۰۰rpm سانتریفوژ شد.

۱۱- مایع زیرین را دور ریخته و مجدداً تیوپ فیلتر اتصالی به DNA روی تیوپ آزمایش ۵۰ml قرار گرفت. در این مرحله نمک ها و اجزای محلول جدا می شوند.

۱۲- مراحل ۱۰ و ۱۱ را تکرار گردد.

۱۳- تیوپ فیلتر اتصالی به DNA با سانتریفوژ مضاعف ۳۵۰۰rpm برای مدت ۵ دقیقه جهت برداشت اضافه اتانول خشک گردید.

۱۴- تیوپ فیلتر اتصالی به DNA به تیوپ آزمایش ۵۰ml دیگر انتقال داده شد.

۱۵- مقدار ۱ ml از بافر ۵ را به مرکز فیلتر اتصالی به DNA اضافه نموده و مدت ۵ دقیقه برای خالص سازی^۶ زمان داده شد. اگر پلاسمید غلیظ تری مورد نیاز باشد مقدار کمتری بافر خالص سازی اضافه می گردد. همچنین اگر پلاسمید تعداد کمی داشته باشد و یا بزرگتر از ۱۰ kb باشد، محصول پلاسمید کافی نخواهد بود. بنابراین محصول خالص سازی در دمای ۶۰ درجه گرم می شود تا کارایی تخلیص افزایش یابد.

۱۶- پلاسمید با دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفوژ شد. برای بدست آوردن کیفیت بالاتری از پلاسمید نمونه دو بار خالص سازی و سپس تغلیظ می گردد.

⁴ DNA binding filter

⁵ Test Tube

⁶ Elution

۲-۱۴- مراحل ترانسفکت ۲

جهت انجام مراحل ترانسفکت از کیت اختصاصی (Cat. No.631313 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit) استفاده گردید.

- سلول ها باید یک روز قبل از ترانسفکت، در فلاسک کشت و در پلیت های مربوطه قرار گیرند و در روز ترانسفکت ۸۰-۵۰٪ باشند. معمولاً ۴×۱۰^۵ سلول باید در پلیت ۳۵ mm موجود باشد.
- بین نیم الی سه ساعت قبل از ترانسفکت، محیط کشت در پلیت های ترانس فکت با ۲ میلی لیتر محیط کشت تازه در هر پلیت ۳۵ mm قرار گرفت.
- برای هر ترانسفکت محلول های A و B بصورت جداگانه در میکروتیوپ های استریل آماده گردیدند.

Solution A

2-4 µgr plasmid
12/4 Ca⁺⁺ solution (2M)
Total volume 100 µl

Solution B

HBS[^] (2X) 100µl

- با دقت و آرامی محلول B را ورتکس نموده، در حالیکه محلول A بصورت قطره قطره اضافه می گردد.
- محلول ترانسفکت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.
- به آرامی محلول ترانس فکت را ورتکس نموده و محلول به صورت قطره قطره به پلیت اضافه شد (مقدار ۱۱۱۰۰۰ از محلول ترانسفکت به هر پلیت ۳۵ mm اضافه می گردد).
- به آرامی پلیت ها به جلو و عقب حرکت داده تا محلول ترانسفکت بصورت مساوی توزیع گردد.
- پلیت ها به مدت ۲ الی ۱۲ ساعت در دمای ۳۷° در انکوباتور CO₂ قرار می گیرد.
- محیط حاوی کلسیم - فسفات را خارج نموده و سلول ها با PBS(1X)^۹ شستشو داده شد.
- پلیت ها با ۲ سی سی محیط رشد کامل واجد سرم تازه تغذیه شده و در دمای ۳۷ درجه تا زمان لازم نگهداری می گردد.
- بیان موقت ژن یا آغاز انتخاب ترانس فکت های پایدار، پس از گذشت ۲۴ الی ۷۲ ساعت انکوباسیون بررسی گردید.

۲-۱۵- استخراج RNA

پس از طی مراحل ترانسفکت و انتقال پلاسمید های pcDNA3.1+ / neo / luxB و pcDNA3.1+ / hyg / luxA به سلول های NIH 3T3، سلول ها در محیط کشت RPMI و ۱۰٪ FCS رشد داده شدند. پس از اینکه کیفیت رشد سلول هائی که در محیط کشت به صورت تک لایه ای رشد کرده بودند توسط

⁷ Transfection

⁸ HEPES Buffered Saline

⁹ Phosphate Buffered Saline

میکروسکوپ Invert تائید گردید، RNA سلول های NIH 3T3 استخراج و با واکنش RT¹⁰ توسط پرایمرهای اختصاصی از mRNA مورد نظر DNA مکمل (cDNA) ساخته شد. متعاقباً از cDNA سنتز شده در واکنش زنجیره ای پلی مرازی جهت تکثیر قطعات مورد نظر استفاده گردید.

استخراج RNA مطابق پروتوکل زیر و با استفاده از کیت استخراج RNA، QIAGEN RNeasy Mini Kit انجام گرفت:

- توسط cell scraper، سلول ها از سطح فلاسک کنده شده و بعد با سانتریفوژ 3000 rpm به مدت ۵ دقیقه سلول ها رسوب داده شده و مایع رویی که محتویات محیط کشت بودند دور ریخته شد.
- به رسوب سلولی بر اساس مقدار تقریبی سلول های رشد کرده، 600µl از بافر RLT اضافه گردید تا سلول ها هضم شوند. سلول ها ورتکس شده و با انجام پیپتاژ مخلوط شدند تا به صورت هموژن در آیند.
- هم حجم سلول لیز شده حاصل، اتانول ۷۰٪ به آن اضافه گردید و بخوبی با پیپتاژ مخلوط گردید.
- مخلوط بدست آمده به ستون RNeasy انتقال داده شد و با دور 10000 rpm و به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفوژ گردید.
- مایع زیرین¹¹ دور ریخته شده و بافر RPE به ستون اضافه شده و با دور 10000 rpm و به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفوژ گردید.
- مجدداً مایع زیرین دور ریخته شده و برای دومین بار بافر RPE به ستون اضافه شد و سپس با دور 10000 rpm و به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید.
- ستون را بر روی یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل قرار داده و از آب فاقد RNase به ستون اضافه شده و با دور 10000rpm و به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید از این طریق RNA سلول ها استخراج گردید.
- RNA استخراج شده از سلول های NIH 3T3، در واکنش RT برای نسخه برداری معکوس و تهیه DNA مکمل مورد استفاده قرار گرفت. مقدار محلولهای مورد استفاده در واکنش به صورت زیر است:

ترکیب	مقدار
RNA	10µl
dNTP (100Mm)	1 µl
SuperScript III reverse transcriptase Reverse Transcriptase	0/5 µl (100 unit)
Primers (specific)	1 µl
RT Buffer 5x	4 µl
D.W.	3/5 µl
Total volume	20 µl

¹⁰ Reverse Transcriptase

¹¹ Flow throught

انجام واکنش PCR : cDNA بدست آمده در واکنش ترانس کریپتاز معکوس برای تکثیر قطعات مورد نظر به عنوان DNA الگو جهت تکثیر در واکنش زنجیره ای پلی مرز مورد استفاده قرار گرفت.

PCR Buffer (10X)	3 μl (1X)
dNTP (10mM)	1 μl
Mgcl2 (50 mM)	1 μl
Primer R/F	2 μl
cDNA	5 μl
Taq DNA polymerase	0/25 μl (1U)
dH2o	18 μl

.....
Total volume PCR 30 μl

۱۶-۲-آماده سازی سلول ها جهت بررسی نور افکنی زیستی

جهت بررسی سازه های ژنتیکی تهیه شده از نظر خصوصیت کارکردی یعنی توانایی انجام نورافکنی زیستی در حضور سوبسترای مربوطه (دکانال) و شرایط متفاوت ترانسفکت به سلول های NIH3T3، همچنین استفاده از غلظت های مختلف آنتی بیوتیکهای نئومایسین و هیگرومایسین آزمایش مختلف انجام گرفت. برای این منظور سه عدد میکروپلیت کشت با شرایط زیر آماده گردید:

۱- در یک میکروپلیت پلاسمیدهای pcDNA3.1+ / neo /luxB و pcDNA3.1+ / hyg / luxA بصورت همزمان ترانسفکت شدند. پس از ۲۴ ساعت آنتی بیوتیکهای نئومایسین و هیگرومایسین بصورت همزمان ولی با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به هر میکروپلیت اضافه گردید. در روز بعد به سلولهایی که در محیط حاوی هر دو آنتی بیوتیک زنده ماندند، ۲۵ میکرولیتر سوبسترای دکانال ۱٪ اضافه شد و خصوصیات نورزایی در زمانهای ۲، ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و سلول های نورزا با نمونه کنترل مقایسه گردید.

۲- در میکروپلیت دوم، پلاسمید pcDNA3.1+ / hyg / luxA ترانسفکت شده و پس از ۲۴ ساعت آنتی بیوتیک هیگرومایسین با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ μg/ml به هر میکروپلیت اضافه گردید. سپس پلاسمید pcDNA3.1+ / neo /luxB به سلولهایی که در این محیط زنده ماندند، ترانسفکت شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت آنتی بیوتیک نئومایسین با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ μg/ml به هر میکروپلیت اضافه شد. در روز بعد سوبسترای دکانال ۱٪ و به میزان ۲۵ میکرولیتر اضافه شد و خصوصیات نورزایی در زمانهای ۲، ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و سلول های نورزا با نمونه کنترل مقایسه گردید.

۳- در میکروپلیت سوم، پلاسمید pcDNA3.1+ / neo /luxB ترانسفکت شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت آنتی بیوتیک نئومایسین با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ μg/ml به هر میکروپلیت اضافه گردید. پس از انتخاب سلولهایی که در این محیط زنده ماندند پلاسمید pcDNA3.1+ / hyg / luxA به سلول های زنده ترانسفکت شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت آنتی بیوتیک هیگرومایسین با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ و

۳۰۰ µg/ml به هر میکروپلیت اضافه گردید. در روز بعد سوبسترای دکانال ۱٪ و به میزان ۲۵ میکرولیتر اضافه شد و خصوصیات نورزایی در زمانهای ۲، ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و سلول های نورزا با نمونه کنترل مقایسه گردید.

۱۷-۲- انجام مراحل SDS-PAGE و وسترن بلات در سلولهای ترانسفکت شده

همزمان با بررسی شرایط نورزایی در هر یک از میکروپلیت های ترانسفکت شده، یک خانه از هر میکروپلیت نیز جهت آزمایشات SDS-PAGE و وسترن بلات در نظر گرفته شد که مراحل آماده سازی سلول ها جهت انجام این آزمایشات به قرار زیر می باشد:

- ابتدا سلول ها توسط اسکریپر^{۱۲} از کف فلاسک تراشید شده و به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری استریل انتقال یافتند.

سپس سلول ها در شرایط 8000 rpm و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفوژ شدند.

- مایع رویی بصورت کامل خارج گشته و به رسوب حاصل مقدار ۵۰ µl از بافر لیز مخصوص پروتئین اضافه شد (SDS 1% , Tris 5mM).

- از طریق انجام پیپتینگ نمونه بصورت یک سوسپانسیون یکنواخت در آمد.

- جهت کامل شدن مراحل لیز سلولی نمونه به مدت ۲۰ بار سونیکه شد.

- مقدار ۱۰ µl از بافر لودینگ به نمونه اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰-۷۰ درجه در یک بشر آب حرارت داده شد.

مراحل انتقال به کاغذ PVDF و تشخیص بوسیله آنتی بادی اختصاصی لوسی فراز نیز بشرح ذیل انجام گردید:

۱۸-۲- تکنیک وسترن بلائینگ^{۱۳}

به طور کلی در ژنتیک مولکولی به عمل انتقال مولکول های تفکیک شده در الکتروفورز از ژل به روی یک غشا ویژه بلات کردن یا بلائینگ گفته می شود. چنانچه هدف انتقال پروتئین های تفکیک شده از روی ژل به غشا باشد به تکنیک وسترن بلائینگ اطلاق می گردد (Shewry and Fido, 1998).

۱- بعد از لود کردن نمونه ها در ژل پلی آکریل آمید و خاتمه الکتروفورز، ژل از دستگاه بیرون آورده شده و قسمت های اضافی ژل بریده می شود. سپس شش کاغذ صافی و یک کاغذ PVDF در ابعاد ژل بریده و در بافر ترانسفر (Towbin buffer ۱X) قرار داده شد.

۲- سه کاغذ صافی آغشته به بافر در کف دستگاه سمی درای که از بافر پر شده است قرار داده شد و سپس روی آن کاغذ PVDF آغشته به بافر گذاشته شد. سپس ژل بریده شده روی کاغذ مربوطه قرار گرفت (در این مرحله

¹² Cell Scraper

¹³ Western Blotting

باید دقت شود که هیچ حبابی بین کاغذ و ژل وجود نداشته باشد). در نهایت سه کاغذ صافی آغشته به بافر باقی مانده روی ژل قرار گرفت .

۳- جریان ۱۰ ولت و ۲۰۰ میلی آمپر برقرار شد (در دستگاه مورد استفاده قطب منفی در بالا و قطب مثبت در پایین قرار دارد و از آنجائیکه پروتئین ها دارای بار منفی هستند به سمت قطب مثبت که در پایین قرار دارد حرکت می کنند و به این ترتیب انتقال به کاغذ PVDF صورت می گیرد).

۴- بعد از گذشت ۲ ساعت کاغذ PVDF از ژل و کاغذ صافی جدا شده و به دستگاه UV cross liker انتقال داده شد تا باندهای انتقال یافته تثبیت گردند .

۵- کاغذ مذکور با محلول TBST1X به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر با دور ۲۰۰ rpm شستشو شد ، TBST از ظرف خارج شد و کاغذ مورد نظر یک بار دیگر با TBST1X به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شد، عمل شستشو با TBS1X به مدت ۱۰ دقیقه پیگیری شد.

۶- کاغذ به ظرف حاوی محلول Blocking منتقل شد و به مدت ۱ ساعت در شیکر با دور ۸۰ rpm نگهداری شد.

۷- مراحل شستشو طبق مراحل ذکر شده در مرحله ۵ تکرار گردید.

۸- آنتی بادی پلی کلونال علیه لوسی فراز باکتری ویبریو فیشری (کانجوگه با HRP) با رقت ۱/۱۰۰۰ (رقت مناسب مورد استفاده آنتی بادی توسط روش Dot Blotting تعیین گردید .) در ۲۰ cc TBS1X و ۶۰۰ µl محلول Blocking تهیه گردید و به ظرفی که کاغذ PVDF در آن قرار داشت افزوده گشته و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکر دار ، قرار داده شد.

۹ - کاغذ PVDF ۵ مرتبه با محلول TBST1X به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر با دور ۲۰۰ rpm شستشو داده شد.

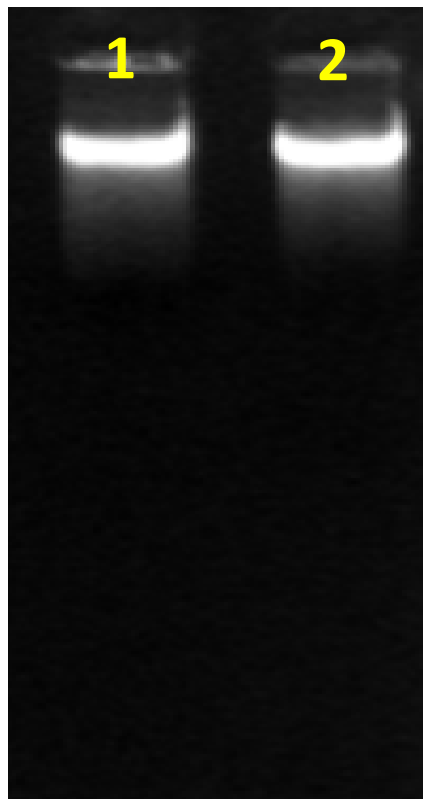
۱۰- مقدار ۵۰۰ µl تریس ۱ مولار با pH=7.6 با ۲۰ سی سی آب مقطر آماده گردید و کاغذ در آن قرار داده شد ، سپس پراکسید هیدروژن و DAB بطور همزمان به آن اضافه گردید ، پس از بستن درب ظرف دور از تابش نور و به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه Shake شدند .

۱- پس از شستشوی کاغذ با آب دیونیزه باند قهوه رنگ ظاهر شده بر روی کاغذ PVDF مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

۳-نتایج

۳-۱- کشت اختصاصی باکتری ویبریو فیشری

باکتری ویبریو فیشری (ATCC7744) در محیط کشت اختصاصی و در دمای $20-25^{\circ}\text{C}$ بمدت ۲۴ ساعت کشت داده شد بطوریکه بر روی پلیت، کلنی های نورزا ظاهر گشتند. استخراج DNA ژنومی باکتری با روش فنول - کلرفرم انجام و DNA حاصل در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید(شکل ۱). کیفیت و کمیت DNA استخراجی توسط دستگاه بیوفوتومتر اندازه گیری و سپس در دمای ۴ درجه ذخیره گردید. غلظت DNA استخراج شده بین ۴۰ تا ۷۰ نانوگرم بود.

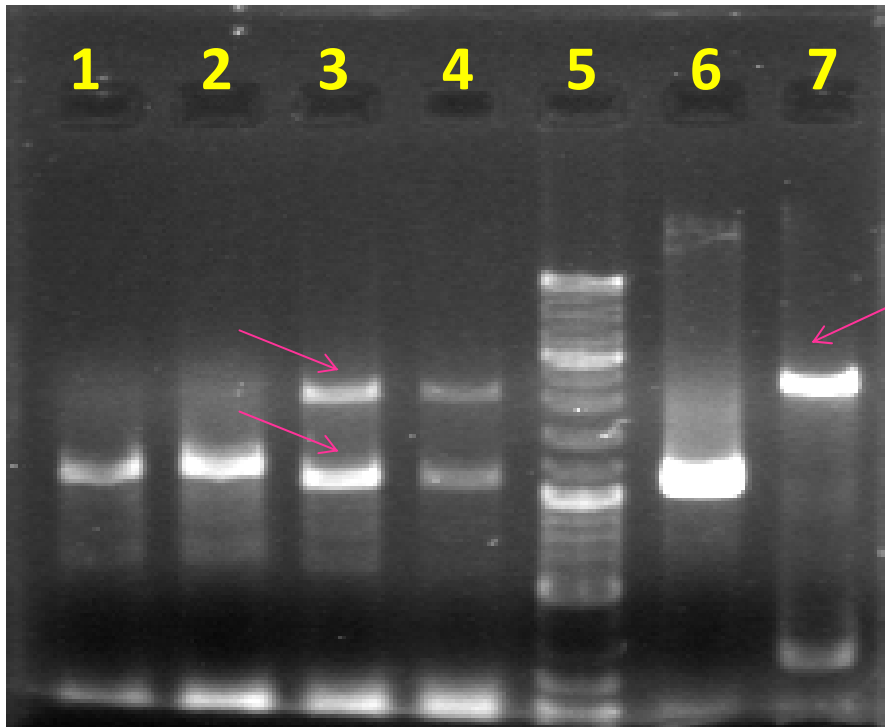


شکل ۱: DNA ژنومی باکتری ویبریو فیشری بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

۳-۲- واکنش PCR ژن luxAB

DNA ژنومی باکتری ویبریو فیشری جهت تکثیر ژن luxAB با پرایمرهای اختصاصی FuxIA و RluxB، PCR شد و محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام نمونه ها ۲۰۰۰ جفت باز بود. با توجه با اینکه ژن های luxA و luxB در اثر مضاعف شدگی ژنی ایجاد گردیده اند و تقریباً از نظر توالی ۳۰٪ همولوژی بین آنها وجود دارد، نواحی ابتدایی این دو ژن نیز شباهت بسیاری به یکدیگر داشته و

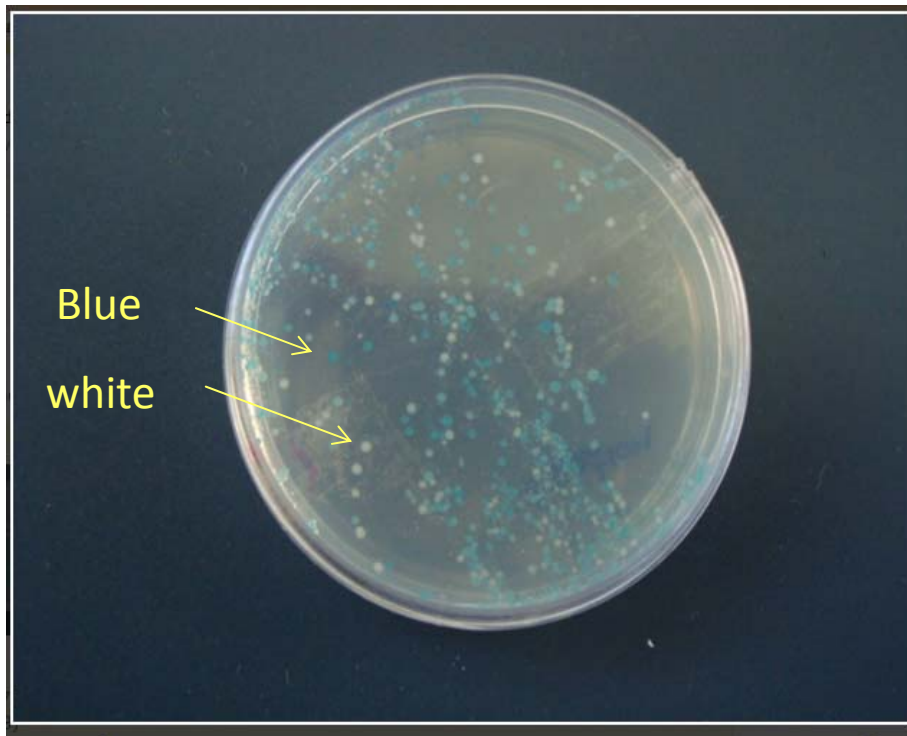
در نتیجه در برخی از واکنش ها، پرایمر FluxA می تواند به ابتدای ژن luxB متصل گردیده و علاوه بر قطعه luxAB، قطعه luxB نیز تکثیر گردد که در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: الکتروفورز ژن luxA، luxB و luxAB بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱: ژن luxA با اندازه bp ۲۰۴۰. ستون ۲: ژن luxB با اندازه bp ۹۸۰. ستون ۳: ژن luxAB با اندازه bp ۹۸۰. ستون ۴: ژن luxAB با اندازه bp ۲۰۴۰. ستون ۵: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰. ستون ۶: ژن luxB به تنهایی با اندازه bp ۹۸۰. ستون ۷: ژن luxAB به تنهایی با اندازه bp ۲۰۴۰.

۳-۳- غربالگری پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxAB

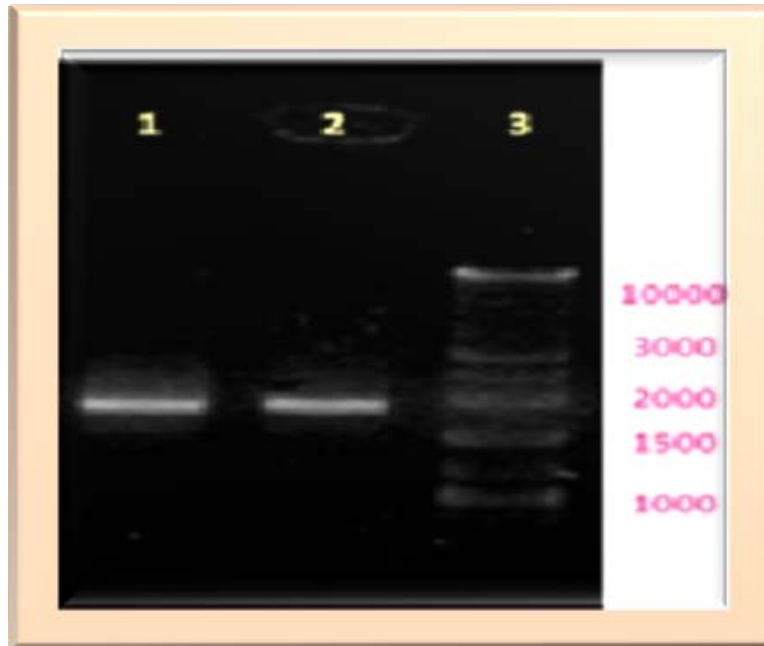
پس از خالص سازی ژن luxAB، واکنش اتصال با T-vector انجام گردید و محصول واکنش لیگاسیون pTZ57R/luxAB روی پلیت آگار حاوی X-gal و IPTG و آمپی سیلین پخش گردید. در روز بعد کلنی های سفید (نو ترکیب) و آبی (غیر نو ترکیب) مطابق شکل ۳ بر روی پلیت نمایان گشتند. کلنی های سفید حاوی پلاسمیدهایی هستند که در آنها به علت قرار گرفتن ژن luxAB در محل ژن β -گالاکتوزیداز این ژن غیر فعال شده و در حضور القاء کننده IPTG نمی تواند X-gal را متابولیزه نماید. اما در کلنی های آبی رنگ ژن β -گالاکتوزیداز دست نخورده بوده و در حضور القاء کننده IPTG می تواند X-gal را متابولیزه نماید.



شکل ۳: کلون های نوترکیب (سفید) و غیر نوترکیب (آبی) در پلیت آگار واجد X-gal و IPTG و آمپی سیلین

۴-۳- PCR پلاسمید نوترکیب

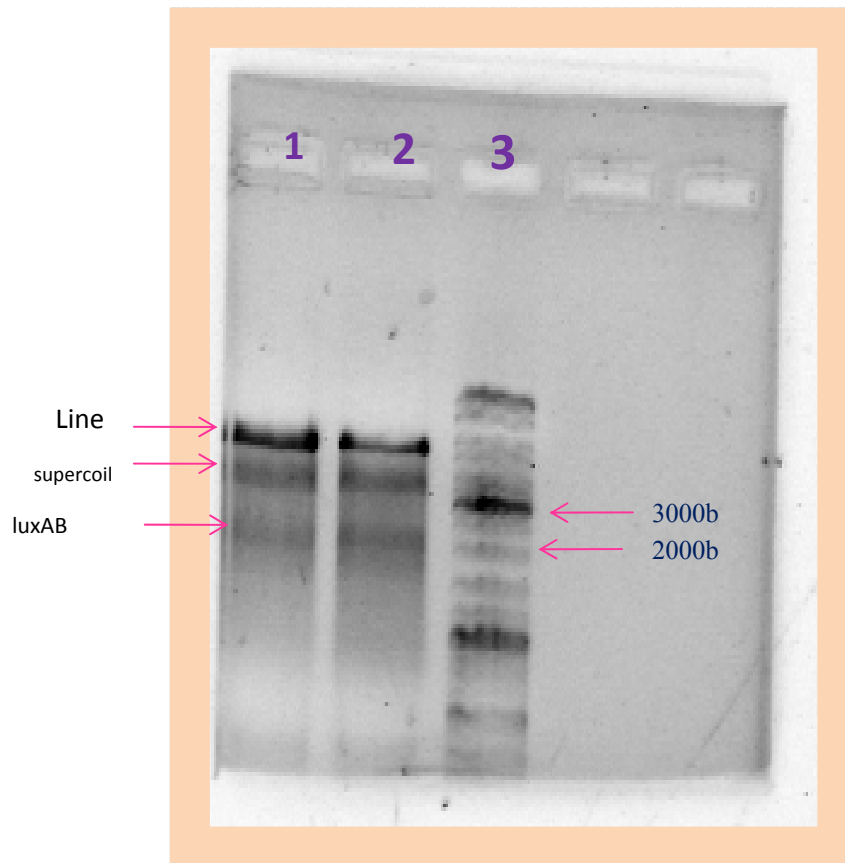
در مرحله بعد، استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی از کلنی های سفید مشکوک به داشتن پلاسمید نوترکیب انجام گرفت. پس از بررسی کیفیت پلاسمید های حاصل در ژل آگارز ۰/۸ درصد و تعیین رقت مربوطه، واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی FluxA و RluxB انجام گرفت و محصولات حاصل از واکنش مطابق شکل ۴ در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. سپس باند ۲۰۴۰ bp مربوط به قطعه luxAB در مقایسه با مارکر وزن مولکولی تأیید گردید.



شکل ۴: تائید کلونینگ پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB با روش PCR و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱: پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB. ستون ۲: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp.

۵-۳- روش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB

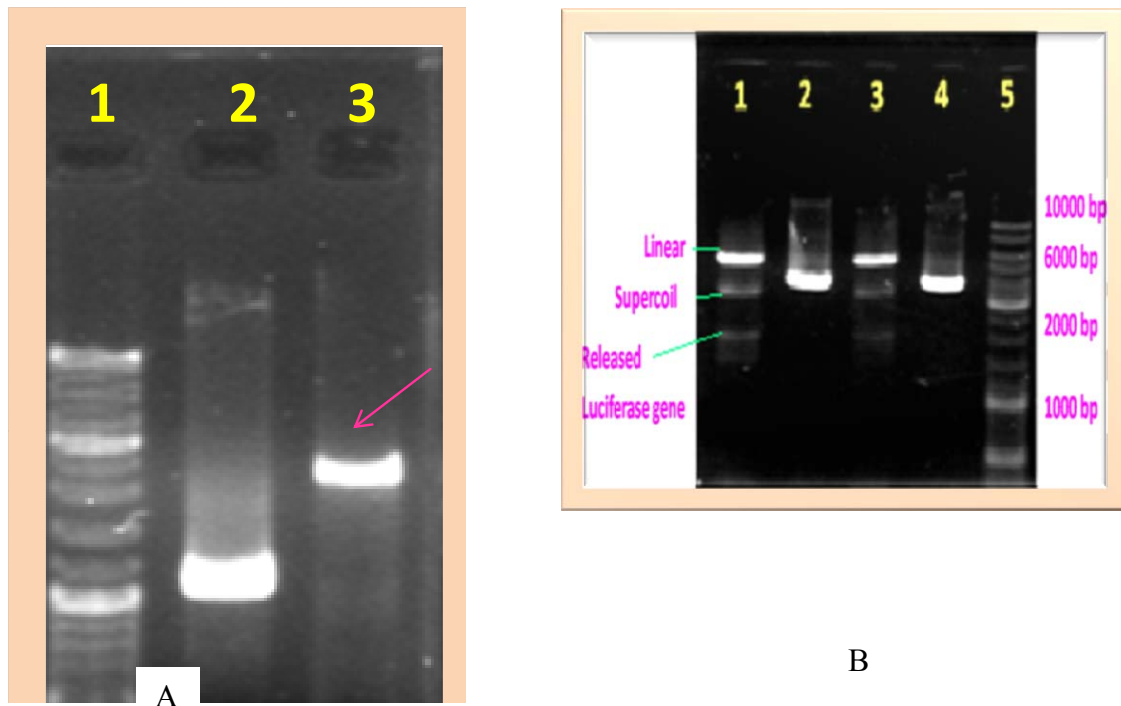
پس از تائید کلنی های سفید نوترکیب توسط PCR واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم های محدود الاثر تعبیه گشته در دو سر قطعه *BamHI* و *KpnI* برای پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB انجام گرفته و قطعه luxAB با طول ۲۰۴۰ bp از آن خارج گردید. قطعه ۲۰۴۰ bp luxAB می تواند پس از تخلیص از ژل بعنوان insert در واکنش اتصال با وکتور مورد استفاده قرار گیرد. در شکل ۵ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب و همچنین قطعه خارج شده از آن (luxAB) نشان داده شده است.



شکل ۴-۶- تائید کلونینگ پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxAB توسط روش هضم آنزیمی. ستون ۱: هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیم های BamH1, Kpn1. ستون ۳: مارکر وزن مولکولی 100bp.

۳-۶- ساب کلون

جهت ساب کلون قطعه insert (luxAB) در وکتور بیانی (pET Duet-1)، واکنش هضم آنزیمی بصورت همزمان روی پلاسمید pTZ57R/luxAB و وکتور توسط آنزیم های BamHI و KpnI انجام و قطعه خارج شده luxAB همراه با وکتور خطی از ژل بریده شدند. پس از تخلیص از ژل، واکنش اتصال بین آنها انجام گرفت. در روز بعد تک کلنی های موجود روی پلیت در محیط LB مایع واجد آمپی سیلین کشت داده شد. صحت وجود قطعه luxAB ساب کلون شده و پلاسمید های نو ترکیب توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی و همچنین از طریق واکنشهای هضم آنزیمی مطابق شکل ۶ تائید گردید.

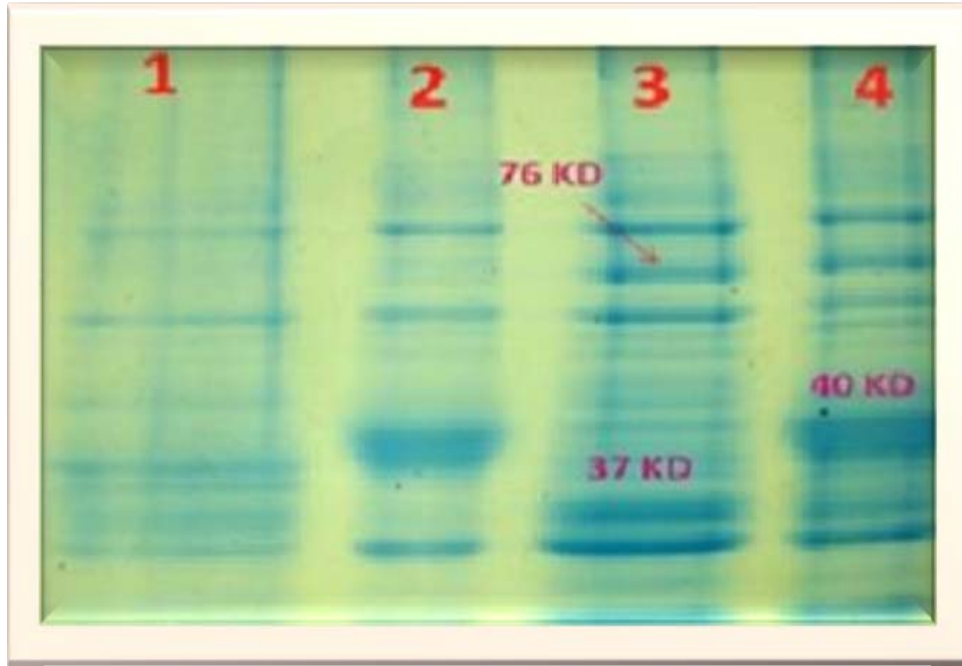


شکل ۶: تائید ساب کلون قطعه luxAB در پلاسمید pET Duet-1.

(A) ستون ۱: مارکر وزن مولکولی 100bp. ستون ۲: پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB که باند ۱۰۶۰bp را نشان می دهد. ستون ۳: پلاسمید نوترکیب pTZ57R/luxAB که باند ۲۰۴۰bp را نشان می دهد. (B) هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET Duet-1/luxAB. ستون ۱ و ۲: قطعه luxAB. ستون ۳ و ۴: پلاسمید نوترکیب بدون تاثیر آنزیم. ستون ۵: مارکر وزن مولکولی 100bp.

- بیان ژن

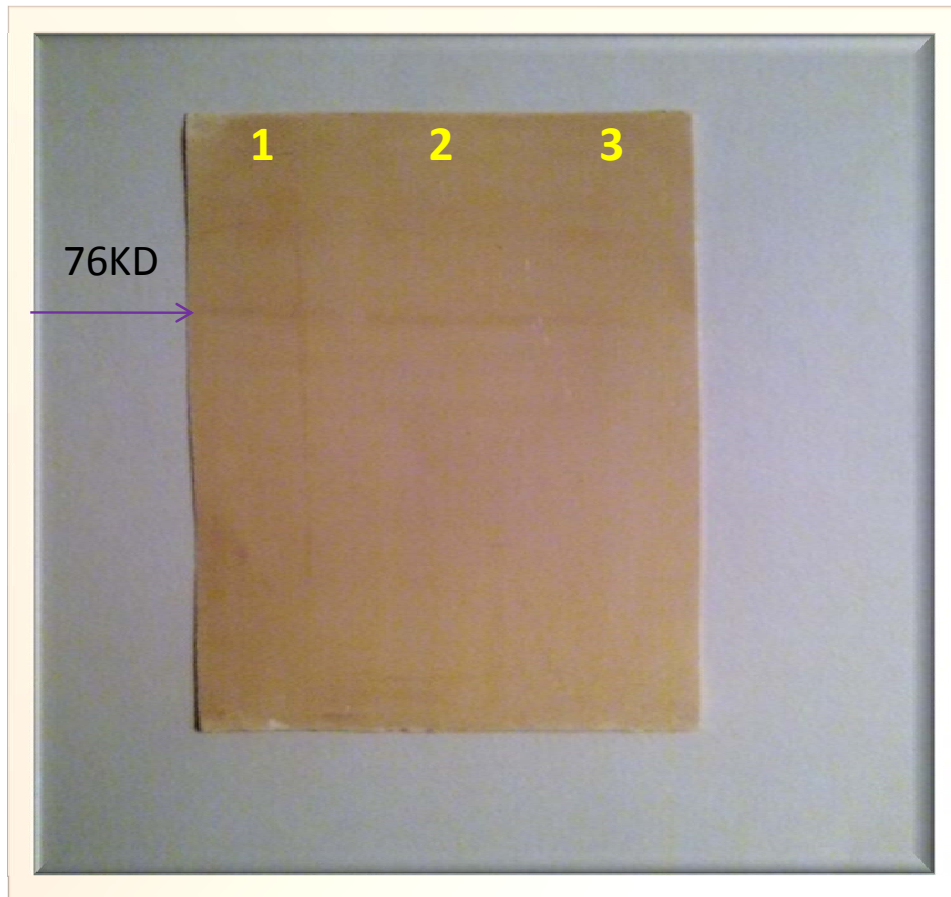
پلاسمیدهای نوترکیب pETDuet-1/luxAB که توسط واکنش PCR و هضم آنزیمی تائید شده اند به سلول های بیانی مختلف (JM109 و Nova Blue ، BL21) ترانس فورم شدند. پس از القاء این سلول ها توسط IPTG (۱mM) ، نمونه برداری در زمان های مختلف (۳ و ۵ ساعت) برای پلاسمید نوترکیب و همچنین پلاسمید فاقد قطعه بعنوان کنترل انجام گرفته و نمونه های پروتئینی در ژل SDD-PAGE ۱۲٪ الکتروفرورز گردیدند. پس از اتمام الکتروفرورز و رنگ آمیزی ژل توسط رنگ کوماسی بلو، ۳ باند پروتئینی ۳۶ ، ۴۰ و ۷۶ کیلو دالتونی ظاهر گردید که به ترتیب بیان پروتئینی ژن های luxB و luxA و luxAB را تائید کردند. بر اساس شکل ۷ پروتئین luxAB قبل از القاء با IPTG بیان محدودی داشت و به تدریج ۳ و ۵ ساعت پس از القاء با IPTG، میزان بیان افزایش یافت. بعلاوه نتایج نشان داد که پروتئین luxA در زمانهای صفر و ۵ ساعت و پروتئین luxB سه ساعت و تا حدودی ۵ ساعت پس از القاء با IPTG افزایش بیان داشتند. همچنین بهترین میزان بیان پروتئینی را ترانس فورم پلاسمید pETDuet-1/luxAB به سلول های Nova Blue در مقایسه با دو رده سلولی دیگر نشان دادند.



شکل ۷: الکتروفورز پروتئین لوسی فراز در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ستون ۱: لیزسلول باکتریایی فاقد پلاسمید نوترکیب (بعنوان کنترل). ستون ۲: لیزسلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pET Duet-1/luxAB قبل از القاء با IPTG (زمان صفر). ستون ۳: لیزسلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pET Duet-1/luxAB سه ساعت بعد از القاء با IPTG. ستون ۴: لیزسلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pET Duet-1/luxAB پنج ساعت بعد از القاء با IPTG.

۷-۳- وسترن بلات (Western Blotting)

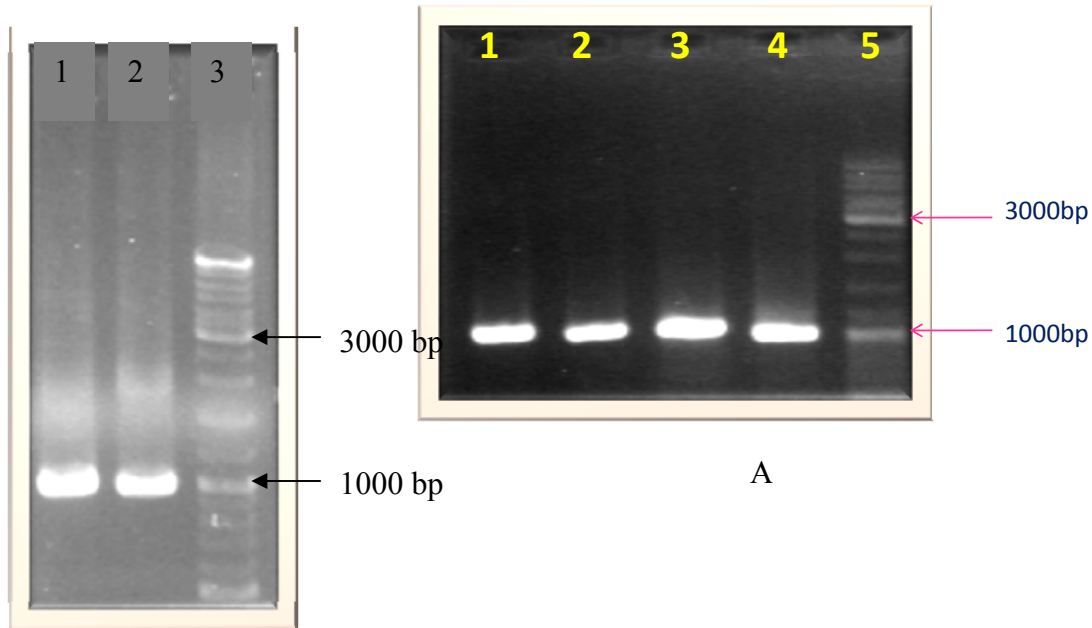
جهت انجام تست وسترن بلات و تائید پروتئین لوسی فراز، ابتدا توسط آزمایش دات بلات رقت های مختلف (۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰ و ۱:۴۰۰۰) آنتی بادی مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه رقت ۱:۱۰۰۰ بعنوان رقت مناسب تائید گردید. سپس طی مراحل آشکار سازی با استفاده از همین رقت (یک آنتی بادی لوسی فراز پلی کلونال کانجوگه شده با IgG HRP) واکنش بین آنتی بادی و آنتی ژن انجام گرفت و به صورت یک باند قهوه ای رنگ ۷۶ کیلو دالتونی مربوط به پروتئین luxAB در نمونه های القاء شده با IPTG پس از گذشت ۳ و ۵ ساعت از زمان القاء ظاهر گردید که نمونه کنترل فاقد آن بود (شکل ۸).



شکل ۸: وسترن بلائینگ. ستون ۱: محیط کشت حاوی باکتری های Nova Blue واجد پلاسمید نوترکیب پس از القاء ۳ ساعته توسط IPTG. ستون ۲: محیط کشت حاوی باکتری های Nova Blue واجد پلاسمید نوترکیب پس از القاء ۵ ساعته توسط IPTG. ستون ۳: محیط کشت حاوی باکتری های Nova Blue فاقد پلاسمید نوترکیب (کنترل).

۸-۳- تکثیر ژن های luxA و luxB با PCR

پس از استخراج DNA ژنومی باکتری ویبریو فیشری هر یک از ژنهای luxA و luxB توسط پرایمرهای اختصاصی با واکنش PCR تکثیر گردید که نتیجه آن ژن luxA با ۱۰۶۰ bp و ژن luxB با ۹۵۰bp بود (شکل ۹).



B

A

شکل ۹: الکتروفورز ژن luxA (A) با اندازه ۱۰۶۰ جفت باز و ژن luxB (B) با اندازه ۹۸۰ جفت باز.

۳-۹- تعیین توالی ژن های luxA و luxB

پس از انجام واکنش PCR و بررسی محصول حاصل از تکثیر ژن های luxA و luxB در ژل آگارز، قطعات مورد نظر از ژل بریده و پس از تخلیص، تعیین توالی گردید. نتایج این توالی یابی به ترتیب برای ژن های luxA و luxB ۹۵ و ۸۹ درصد یکسانی را با توالی مربوط به ژن های luxA (NC_006841.1) و luxB (NC_006841.2) موجود در بانک ژن pubmed نشان داد (شکل ۱۰ و ۱۱).

Query	29	TCATAAGC-AGTAATGGATCGCTTTGTTTCGACTTGCTATCGGCTCATAGGAAGTAGGCTT	87
Sbjct	1159302	TCATAAGCAAGTAATGGATCGCTTTGTTTCGGCTTGCTATCGGCTCAGAAAGGTTAGGCTT	1159243
Query	88	TGATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGGTCTCACGGGAAATTTATT	147
Sbjct	1159242	TGATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGGTCTTACGGGAAATTTATT	1159183
Query	148	TGTTGCTGGGCAATCTGTTAGGAAGAAGCTAAAACATTAAATGTTGGTACTATGGGGCT	207
Sbjct	1159182	TGTTGCTGGGCTAACCTGTTAGGAAGAAGCTAAAACATTAAATGTTGGCACTATGGGGCT	1159123
Query	208	TGTTATTCCACAGCTCATCTGTTTCGACAAATTAGAAAGCGTTTTATTATTAGATCAAAT	267
Sbjct	1159122	TGTTATTCCGACAGCACACCCAGTTTCGACAGTTAGAAAGCGTTTTATTATTAGATCAAAT	1159063
Query	268	GTGGAAAGGGCGTTTTAAATTTTGGAAACCGTTTCGAGGGCTATACCATAAAGATTTTCGAGT	327
Sbjct	1159062	GTGGAAAGGCTCGTTTTAAATTTTGGAAACCGTTTCGAGGGCTATACCATAAAGATTTTCGAGT	1159003
Query	328	ATTTGGTGTGATATGGAAGAGTCTCGAGCGATTACTCAAATTTCTACCAGATGATAAT	387
Sbjct	1159002	ATTTGGTGTGATATGGAAGAGTCTCGAGCAATTACTCAAATTTCTACCAGATGATAAT	1158943
Query	388	GGAAAGCTTACAAACAGGAR-CAGTTAGTTCGATAGTGATTATATCCAGTTCOCCTAATG	446
Sbjct	1158942	GGAAAGCTTACAGACAGGARCCA-TTAGCTCTGATAGTGATTACATTCAATTTCTCAAGG	1158884
Query	447	TAGATGTGTATCCTAAAGTATATTTCTAAAAATGTTCCAACTGTATGACTGCTGAGTCCG	506
Sbjct	1158883	TTGATGTATATCCCAAAGTGTACTCAAATAATGTACCAACTGTATGACTGCTGAGTCCG	1158824
Query	507	CAAGTACGACAGAAATGGCTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTATTG	566
Sbjct	1158823	CAAGTACGACAGAAATGGCTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTATTG	1158764
Query	567	GTAATAATG=====GCACAGATGGAACTCTATAATGAAATTCGACAGAAATATGGCC	626
Sbjct	1158763	GTAATAATGAAAAAAGCACAGATGGAACTCTATAATGAAATTCGACAGAAATATGGTC	1158704
Query	627	ATGACATATCTAAAAATAGATCATTGTATGACTTATATTTGGCTCTGTTGATGATGATGCAC	686
Sbjct	1158703	ATGATATATCTAAAAATAGATCATTGTATGACTTATATTTGTTCTGTTGATGATGATGCAC	1158644
Query	687	AAAAGGGCCAGATGTTTTGTCGGGAGTTTCTGAAAAATTCGATATCATATGTAATG	746
Sbjct	1158643	AAAAGGGCCAGATGTTTTGTCGGGAGTTTCTGAAAAATTCGATATGACTCATATGTAATG	1158584
Query	747	CGACCAATATCTTTAATGATAGCAATCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGCCAAT	806
Sbjct	1158583	CGACCAATATCTTTAATGATAGCAATCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGGCAAT	1158524
Query	807	GGCGTGATTTTGTTTTACAAGGACATACAACACTATTTCGACGCTGTTGATTATAGCAATG	866
Sbjct	1158523	GGCGTGATTTTGTTTTACAAGGACATACAACACTATTTCGACGCTGTTGATTATAGCAATG	1158464
Query	867	GTATTA-CCCTGTAGGCACCTCCTGAGCAGTGGTATTGAAATAATTCCANN-TGATTATTGG	924
Sbjct	1158463	GTATTAACCCCTGTAGGCACCTCCTGAGCAGTGGTATTGAAATAATTCCANN-TGATTATTGG	1158407
Query	925	ATGCGACGGGATTATCAAAACATTACA 950	
Sbjct	1158406	ATGCGACGGGATTATCAAAACATTACA 1158381	

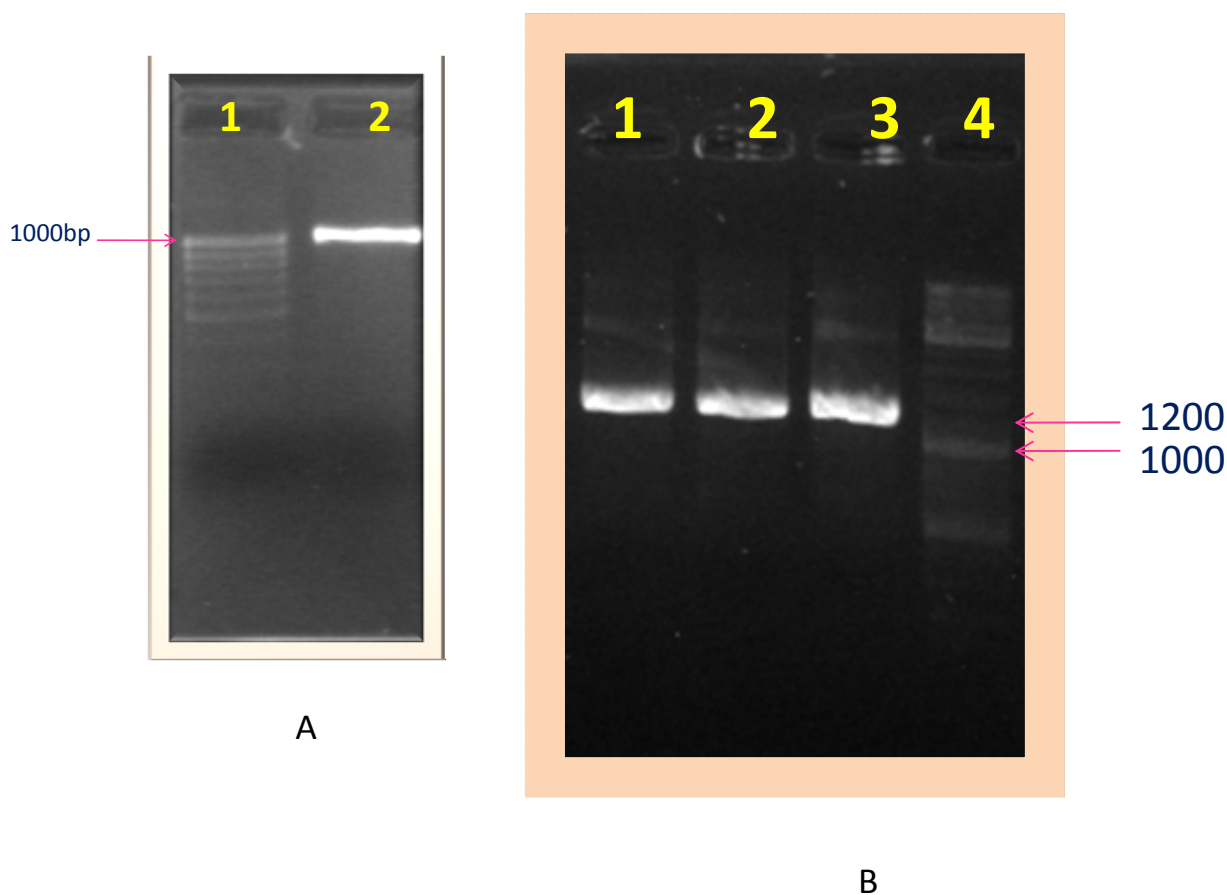
شکل ۱۰: نتایج حاصل از تعیین توالی ژن luxA و مقایسه آن با توالی مربوطه در بانک ژن pubmed

Query	68	TTTAGACCCTGTTTTTCCACCCG-CGCTTTGTTAGA-GAATAATTTTCATCAAGAGAGC	125
Sbjct	1157362	TTTTAGACCCTGTTTTTCCACTGCTAATTTTG-TCGATTCATAATAGTCATCATGAGACC	1157420
Query	126	CTTCGGCGTACCCTTCATTACT--A-TTGCRAATTTTATCATCCCTGTCCCTTTGAGGGTA	182
Sbjct	1157421	CAACTGCATTCTCTTCAATAATGCAGTT--AATTTTTTCATCTCTGTCCATTGAGGGTA	1157478
Query	183	AGTTTCGGTGATATAGTCCCTTAAGTATCCCTCCCCTTCTTCGTGAGCCGAACTTATAAC	242
Sbjct	1157479	AGTTTCAGTGATATAGTCTTTAAGTATTCTCTCACCTTCTCTTGAGCCGTACTTCTATC	1157538
Query	243	A-CAATTTAATTTCACAAATTACAGTTAAGTGATGATCAACCTCCGAAATATCGACAGCAT	301
Sbjct	1157539	AGC-ATTTAAGTTCCCAATTACAGTTAATTGATGATCAACATCCGAAATATCAATACCAT	1157597
Query	302	ATTGGTGTGCTGTTTTATTATATAGRAATTGCATAACGCTCTTTGGTTTCTAAATTATCCT	361
Sbjct	1157598	ATTGGTGTGCTGTTTTATTATATAGRAATTGCATAGCGTCTTTGGTTTCTAAATTATCCT	1157657
Query	362	CCCCTTAAATGTTAAAGGCAGTGCCCTTTTTCGCTGCCACATGACGACCTCTTTTGATG	421
Sbjct	1157658	CCCCTTAAATGTTAAAGGCAGTGCCCTTTTTCGCTGCCACATGACGACTTCTTTTGATG	1157717
Query	422	TTGCGGATACTTATTGCTTAGGCCATTATCACTGTGACAGTGTGGATTAATTGAAACCT	481
Sbjct	1157718	TAGCGGATACATATTGCTTAGGTCCTTCTCACTGTAACAGTGTGGATTAATTGAAACCT	1157777
Query	482	TTGGAAATCATAAAAATCATTTTGGGGATGACTGTGACCTGTAGATAATGCGCCGTTAT	541
Sbjct	1157778	TTGGAAATCATAAAAAGTCGTTTTGGGGATGACAATAACCTGTAGTTAATGCGTCATTAA	1157837
Query	542	TTATTTTCATAGCGTCTGCTAATTTGAGGATGCCATGATG-GAATGTGACGTTAAAAAAC	600
Sbjct	1157838	TTATTTTCATAGCATGCTTCAAATTTGTTGTTGCCCTTGATGAGA-TATGACGTTAAAAAAT	1157896
Query	601	TCCATTTTCGAAATCACTTTCCGACACTAAAAAC-ATGAGAAATCATCCGCCCTC-GTAC	658
Sbjct	1157897	TCCATTTTCGAAATCACTTTCCGACGTCATAAACCA--AGAAATGAAGCGTCCCTCTG-AC	1157953
Query	659	ATTTGATCTAATAAACTGACTTCTTCTCCGATACGTACAAAGTGATAGATGGCAATTACT	718
Sbjct	1157954	ATTTGATCTAATAAACTGGCTTCTTCTGCTACACGTACAGGGTGTGGCTGGTAATTACT	1158013
Query	719	TGTTTTT-TGAACCCTTTCTAATTTATGTACTGACACGAAAAAAAAA-TAAT-CCTGCGGG	776
Sbjct	1158014	TGATTTAATGAACCAATATGTAATTTATTTGTTAACCCCTAATAAAA-AACCAGCTGCGGT	1158072
Query	777	AAGAGGAGTTCACACGCT-CTCATTTTTTGAAATA-TGAAGCTCATTAACTAAGCGAGGA	834
Sbjct	1158073	AATAGGCTGCTCCATAATAC-CATTTTTTGAAA-AGTGATGTTTATTAAACAAAGCCAGTA	1158130
Query	835	TAAAAA-GATATTTAAGATGATTTA-TTATCGTGTNGACTCTTTGGCAGATTATCCAGCG	892
Sbjct	1158131	TTAAAAATGATATTTA-GTTGAATCAATTAACGTGAC-AGTCTTTACCATATTATCCAAACG	1158188
Query	893	TTACTANAGATTATTAGATC-ATGCTTTACTCGAAAGTTTAGAAAAGATA	941
Sbjct	1158189	TTTCTTCAGATG-TTAT-TCCAT-CTTT-CT-GAAAGTTTAGAAAAATA	1158233

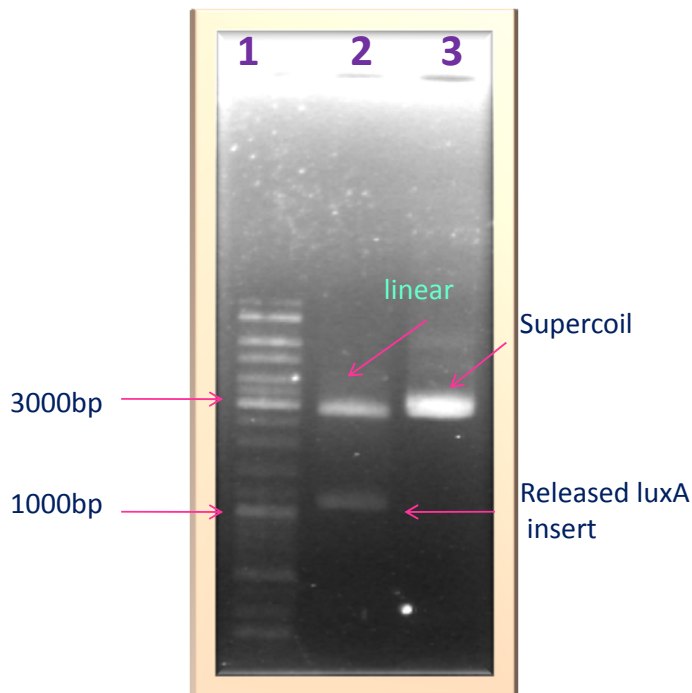
شکل ۱: نتایج حاصل از تعیین توالی ژن luxB و مقایسه آن با توالی مربوطه در بانک ژن pubmed

۱۰-۳- کلون سازی محصولات PCR در وکتور pTZ57R و تأیید آن

پس از خالص سازی محصول PCR حاصل از تکثیر ژنهای luxA و luxB و بررسی صحت تعیین توالی قطعات تکثیر یافته، insert بدست آمده جهت واکنش اتصال با T-vector استفاده شد و متعاقباً محصول واکنش اتصال pTZ57R/luxA و pTZ57R/luxB روی پلیت های آگار حاوی X-gal و IPTG و آمپی سیلین پخش گردید. در روز بعد کلنی های سفید (نو ترکیب) و آبی (غیر نو ترکیب) روی پلیت نمایان گشتند. کلنی های سفید در محیط LB مایع واجد آنتی بیوتیک کشت داده شد و در روز بعد از طریق روش لیز قلیایی پلاسمیدها استخراج گردیدند. تأیید کلنی های نو ترکیب pTZ57R/luxA از طریق PCR توسط پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای یونیورسال و همچنین هضم آنزیمی توسط آنزیم های *BamHI* و *KpnI* در انتهای ۵' قطعه luxA مطابق شکل ۱۲ و ۱۳ صورت پذیرفت.

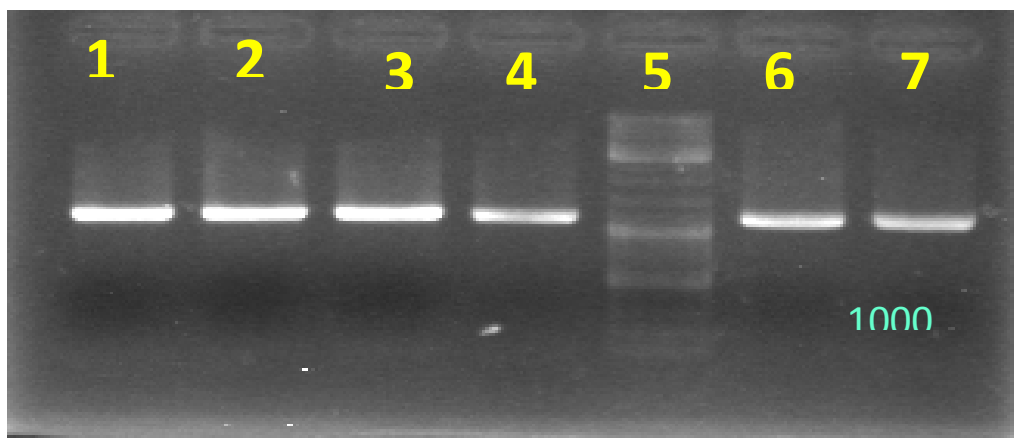


شکل ۱۲: تأیید کلونینگ پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxA با روش PCR. (A) ستون ۱: مارکر وزن مولکولی: ستون ۲ پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxA با پرایمرهای اختصاصی در ژل ۱/۵٪ که قطعه ای با اندازه bp ۱۰۶۰ را تکثیر نموده است. (B) ستون ۱، ۲ و ۳: پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxA با اندازه bp ۱۲۰۰ توسط پرایمرهای یونیورسال ستون در ژل آگارز ۱/۵٪ تکثیر گردید، ستون ۴: مارکر وزن مولکولی bp ۱۰۰.

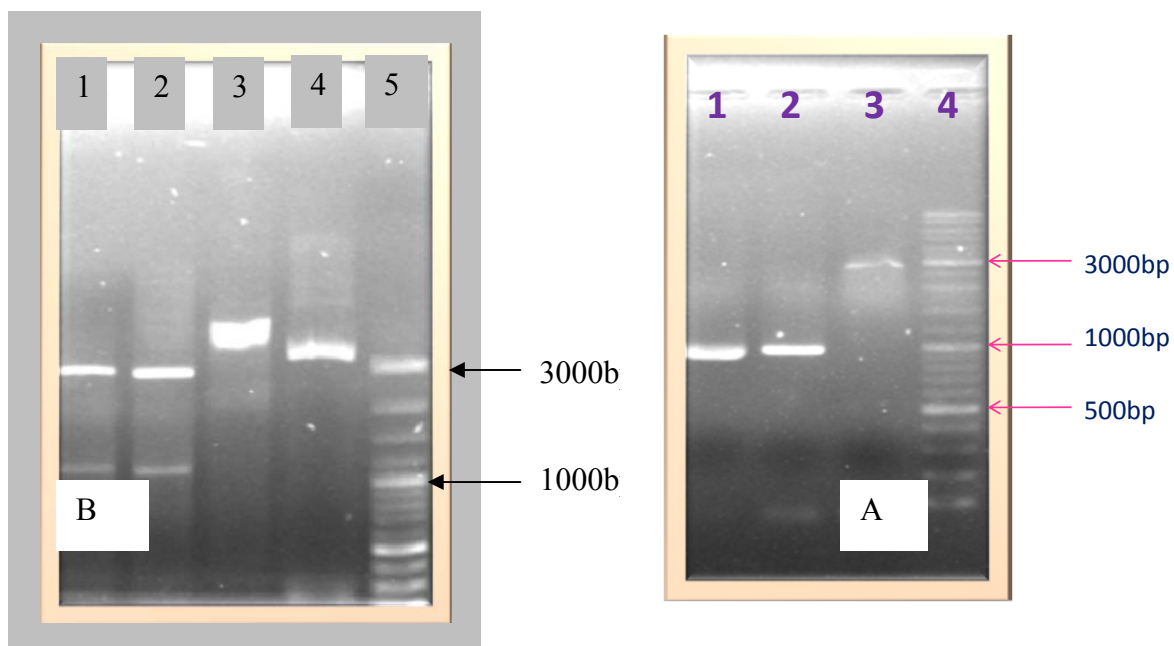


شکل ۱۳: تأیید کلون قطعه luxA در پلاسمید pTZ57R توسط روش هضم آنزیمی. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp. ستون ۲: قطعه خارج گردیده luxA با اندازه ۱۰۶۰bp و همچنین فرم خطی پلاسمید با اندازه ۲۸۸۶ bp. ستون ۳: پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxA را قبل از هضم آنزیمی.

تأیید کلنی های نو ترکیب pTZ57R/luxB از طریق PCR با پرایمرهای اختصاصی و یونیورسال و همچنین هضم آنزیمی با آنزیم های *EcoRI* و *BamHI* مطابق با شکل ۱۴ و ۱۵ صورت پذیرفت:



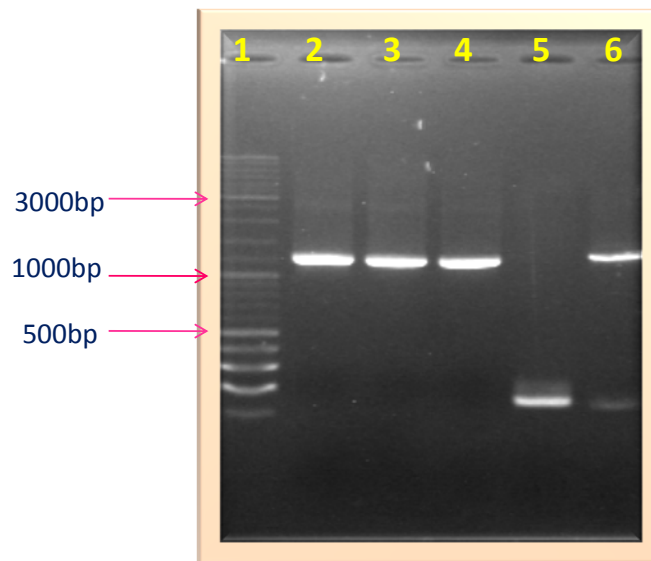
شکل ۱۴: تأیید کلونینگ در پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB از طریق PCR با پرایمرهای یونیورسال و الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۵٪. ستون های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷: محصول PCR تکثیر شده luxB با اندازه ۱۲۰۰ bp. ستون ۵: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp.



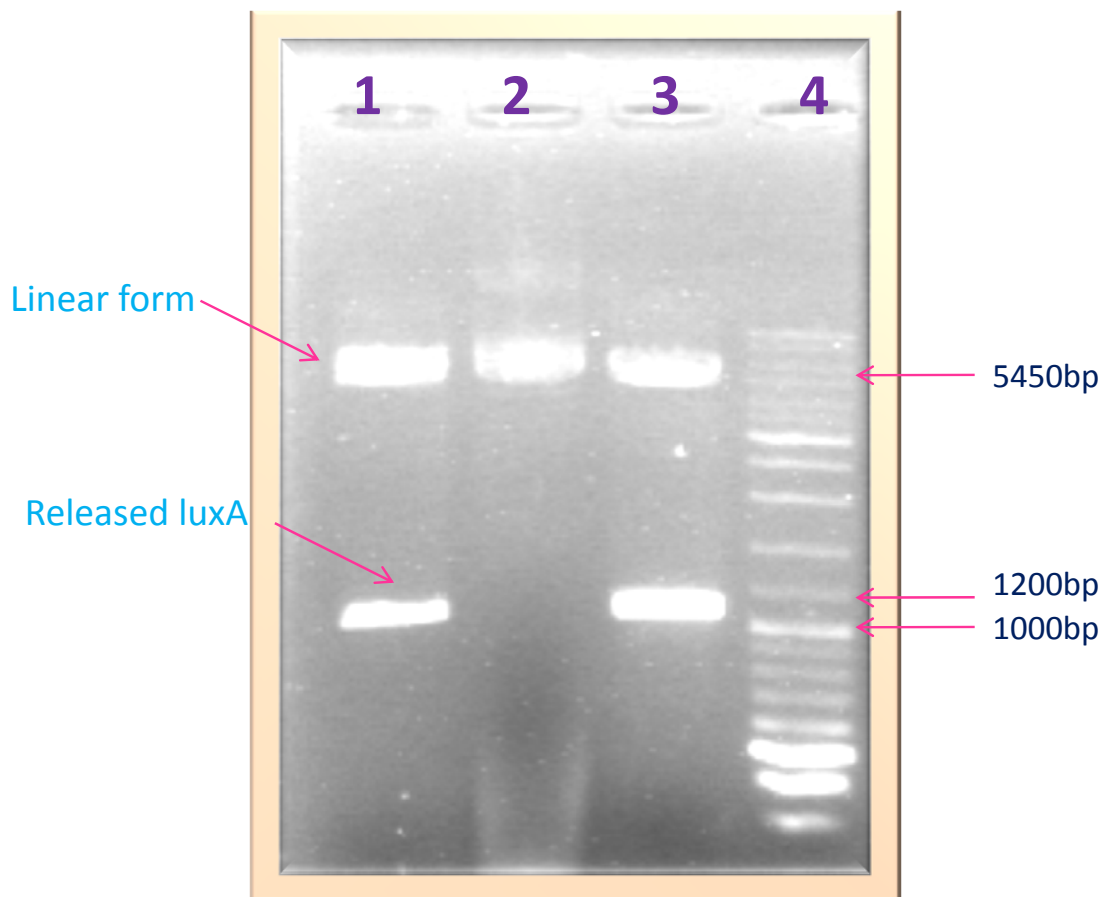
شکل ۱۵: تأیید کلونینگ قطعه luxB در پلاسمید pTZ57R توسط PCR و هضم آنزیمی
 (A) الکتروفورز پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB در ژل ۱/۵٪. ستون ۱: ژن luxB بعنوان کنترل مثبت. ستون ۲: پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB با اندازه ۹۸۰ bp با پرایمرهای اختصاصی. ستون ۳: کنترل منفی. ستون ۴: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp.
 (B) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB. ستون ۱ و ۲: ژن luxB با اندازه ۹۸۰ bp و فرم سوپر کویل پلاسمید با اندازه ۲۸۸۶ bp. ستون ۳: شکل خطی پلاسمید پس از تاثیر آنزیم محدودر الاثر BamH1 یا EcoR1. ستون ۴: پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB بدون تاثیر آنزیم. ستون ۵: مارکر وزن مولکولی.

۱۱-۳- ساب کلون ژن luxA در وکتور بیانی pcDNA3.1+/hyg

واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم های *KpnI* و *BamHI* بصورت همزمان برای وکتور و قطعه انجام گرفت که نتیجه این واکنش ها بر روی وکتور نو ترکیب pTZ57R/luxA منجر به خارج گردیدن قطعه luxA شد. پس از تخلیص DNA وکتور و قطعه و انجام واکنش اتصال بین آنها، تعدادی کلنی سفید در روز بعد بر روی پلیت های حاوی آمپی سیلین ظاهر گشت. پس از تخلیص این پلاسمید ها تأیید ساب کلونینگ قطعه luxA در وکتور pcDNA3.1+/hyg مطابق شکل ۱۶ و ۱۷ با روشهای مختلفی از قبیل هضم آنزیمی، PCR توسط پرایمرهای اختصاصی و PCR توسط پرایمرهای یونیورسال وکتور صورت پذیرفت.



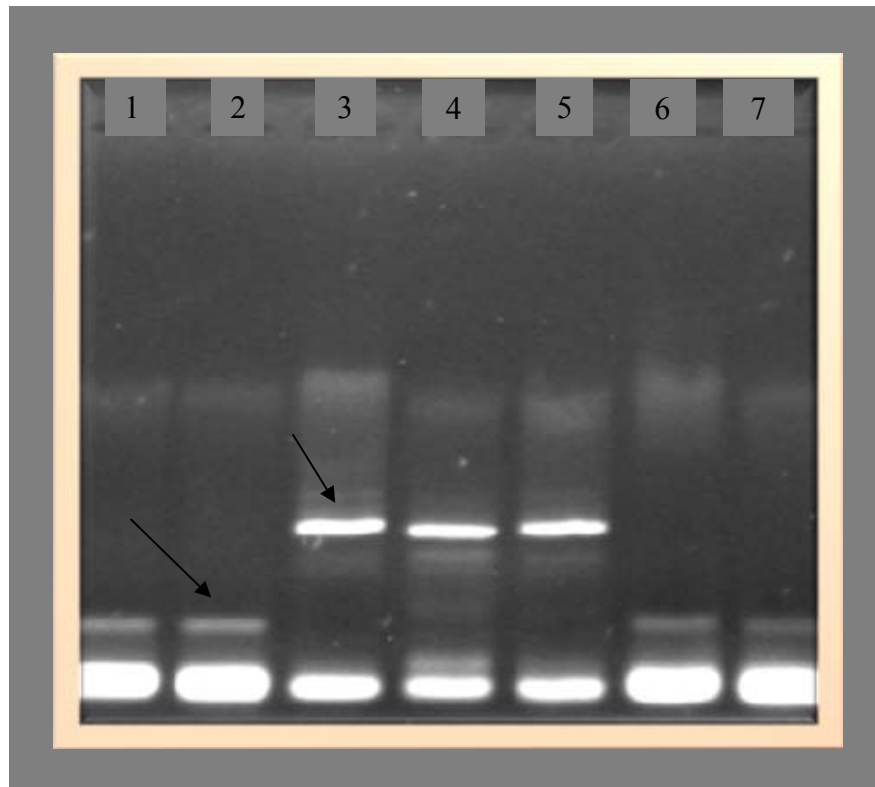
شکل ۱۶: تائید ساب کلونینگ پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+ / hyg/luxA توسط PCR. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی. ستون ۲، ۳ و ۴: تکثیر قطعه ۱۲۰۰ bp در سه کلونی نوترکیب مختلف بدست آمده از واکنش B ستون ۵: کنترل منفی شامل تکثیر یک قطعه ۱۵۰ bp مربوط به ناحیه MCS و کتور pcDNA3.1+. ستون ۶: کنترل مثبت. PCR



شکل ۱۷: تأیید ساب کلونینگ پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1+ / hyg/luxA* توسط هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1+ / hyg/luxA*. ستون ۱ و ۳: قطعه خارج گردیده *luxA* با اندازه ۱۰۶۰ bp همچنین فرم خطی پلاسمید با اندازه ۵۴۵۰ bp. ستون ۲: پلاسمید نو ترکیب بدون تاثیر آنزیم. ستون ۴: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp.

۱۲-۳- ساب کلون ژن *luxB* در وکتور بیانی *PcDNA3.1+ / neo*

واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI* بصورت همزمان برای وکتور بر روی پلاسمید *PcDNA3.1+ / neo* و برای قطعه بر روی پلاسمید *pTZ57R/luxB* انجام گرفت. پس از تخلیص DNA وکتور و قطعه و انجام واکنش اتصال بین آنها، در روز بعد تعدادی کلنی سفید بر روی پلیت های حاوی آمپی سیلین ظاهر گشت که پس از تخلیص این پلاسمید ها تأیید ساب کلونینگ قطعه *luxB* در وکتور *pcDNA3.1+ / neo* از طرق متفاوتی همچون PCR توسط پرایمرهای اختصاصی و PCR توسط پرایمرهای یونیورسال وکتور صورت پذیرفت (شکل ۱۸).

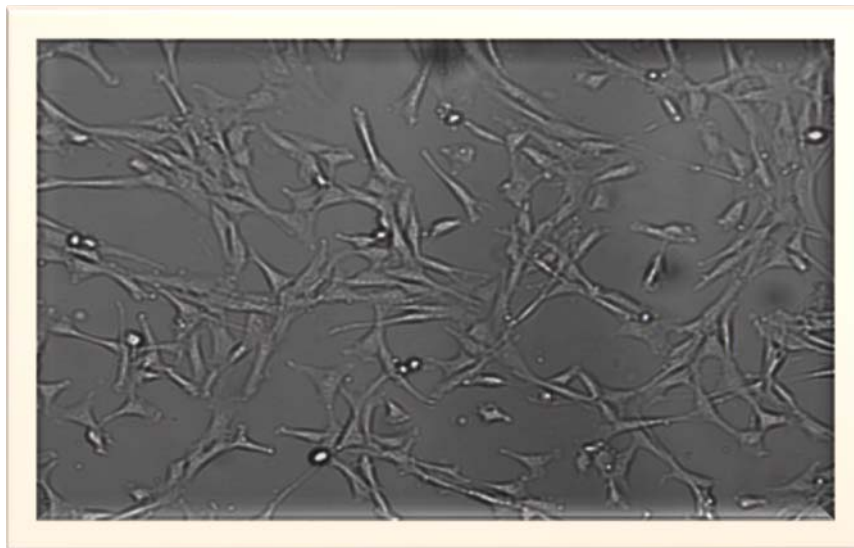


شکل ۱۸: تأیید ساب کلونینگ پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1+ / neo/luxB توسط PCR. ستون ۴، ۵ و ۳: تکثیر قطعه ۱۲۰۰ bp luxB در سه کلونی مختلف حاصل از واکنش اتصال. ستون ۶، ۲، ۱ و ۷: پلاسمید های غیر نو ترکیب بعنوان کنترل منفی.

۳-۱۳- ترانسفکت سازه های نو ترکیب به سلول های یوکاریوتی

پس از تأیید پلاسمید های نو ترکیب pcDNA3.1+ / hyg / luxA و pcDNA3.1+ / neo / luxB، این سازه های ژنتیکی ابتدا بصورت شبانه کشت داده شد و سپس توسط کیت تخلیص midi prep استخراج گردیده و در نهایت غلظت مناسب هر یک جهت ترانسفکت تعیین گردید. در این مطالعه سلول های NIH3T3 (رده سلولی فیروبلاستی) مطابق شکل ۱۹ در انکوباتور Co2 کشت داده شد و از آن برای ترانسفکت استفاده گردید. سپس RNA سلولی استخراج و پس از انجام RT-PCR در پلیت های حاوی پلاسمید pcDNA3.1+ / hyg / luxA و pcDNA3.1+ / neo / luxB، و همچنین پلاسمید pcDNA3.1+ فاقد قطعه بعنوان نمونه کنترل بصورت همزمان توسط پرایمر های اختصاصی هر یک از ژن های luxA و luxB واکنش PCR انجام گرفت.

همچنین نتایج حاصل از ترانسفکت در سلول های NIH3T3 نشان دادند که اولاً زمان قرار گیری پلید ها در انکوباتور پس از اضافه گردیدن محلول ترانسفکت باید ۴-۵ ساعت باشد و ثانياً بهترین زمان بیان و انتخاب ترانس فکت ها پس از گذشت ۲۴ بعد از انجام ترانسفکت می باشد.

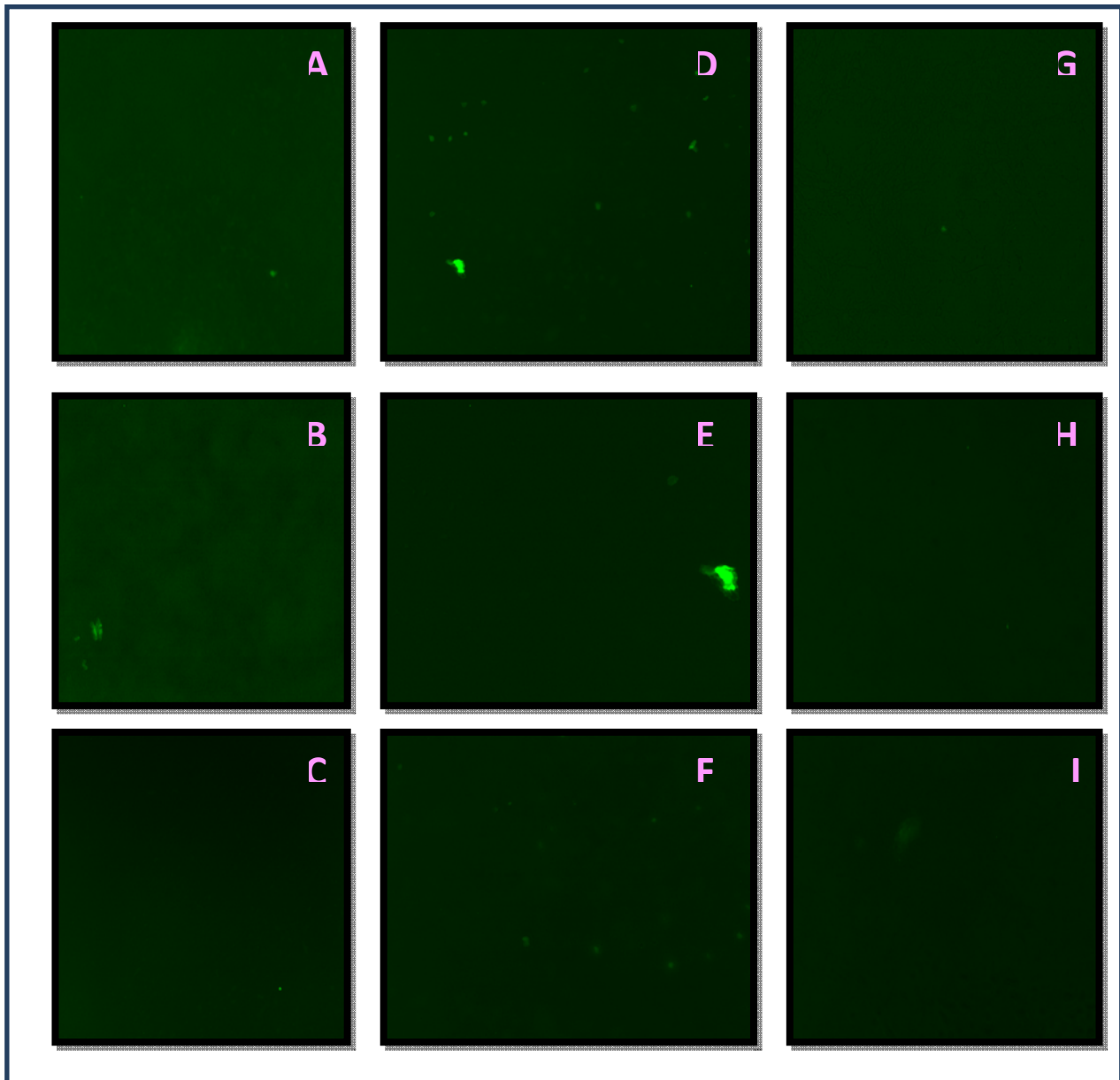


شکل ۱۹: سلول های NIH3T3

۱۴-۳- بررسی خصوصیات نورزایی در سلولهای ترانسفکت شده

جهت بررسی خصوصیات کارکردی سازه های ژنتیکی تهیه شده از نظر فعالیت نورزایی، این پلاسمیدها بصورت همزمان به سلولهای فیروبلاستی NIH 3T3 منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انجام انتقال آنتی بیوتیک های هیگرومایسین و نتومایسین با غلظت های متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به خانه های مجزایی از میکروپلیدت واجد هر دو پلاسمید اضافه گشتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و انتخاب سلولهای واجد هر دو پلاسمید، میزان ۲۵ میکرولیتر دکانال ۱ درصد بعنوان سوسترای مورد نیاز جهت واکنش نورافکنی زیستی به سلول ها به اضافه شد و شرایط نورزایی در زمان های ۶، ۲ و ۱۸ ساعت پس از اضافه سازی سوسترای توسط میکروسکپ فلورسانت invert مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان دادند که مطابق شکل ۲۰ پس از گذشت ۲ ساعت از اضافه سازی سوسترای واکنش نورزایی آغاز شده و قابل مشاهده می باشد. به تدریج با رسیدن به زمان ۶ ساعت میزان نورزایی افزایش قابل ملاحظه ای را نشان داده و به اوج خود می رسید.



شکل ۲۰: خصوصیات نورافکنی زیستی در سلولهای NIH3T3 پس از اضافه سازی سوبسترای دکانال :
 اشکال A,B,C بعد از گذشت ۲ ساعت از اضافه سازی دکانال ۱٪ به سلولها. اشکال D,E,F بعد از گذشت ۶ ساعت. اشکال G,H,I بعد از گذشت ۱۸ ساعت.

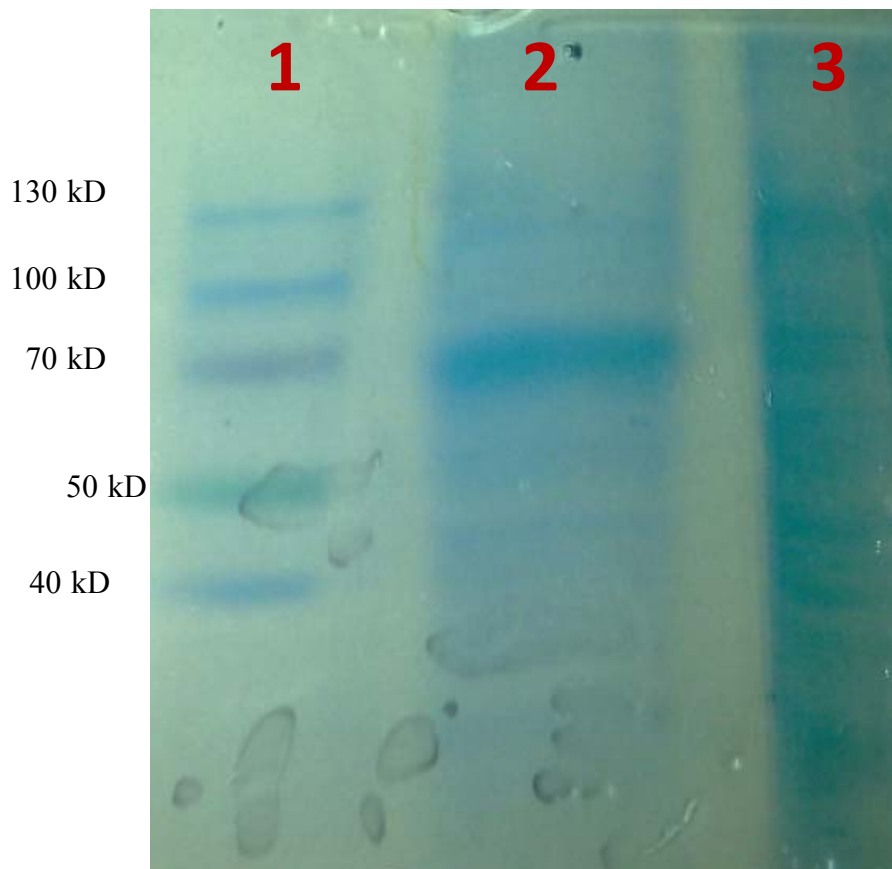
۱۵-۳- بررسی بقاء سلولهای ترانسفکت شده در محیط انتخابی

جهت بررسی مدت زمان پایداری پلاسمیدهای نوترکیب بیان کننده زیر واحد α (pcDNA3.1+ / hyg / luxA) و زیر واحد β (pcDNA3.1+ / neo / luxB) آنزیم لوسی فراز، این سازه ها به سلولهای فیروبللاستی NIH 3T3 ترانسفکت شده و پس از گذشت ۵ ساعت با محیط کشت RPMI غنی شده با سرم تغذیه گشتند. در روز بعد متعاقبا سلول ها توسط غلظت های متفاوت آنتی بیوتیک های هیگرومایسین و نئومایسین انتخاب شدند.

نتایج نشان داد با وجود اینکه پس از گذشت ۲۴ ساعت از اضافه کردن آنتی بیوتیکها، تعداد سلولهای هر پلیت کاهش یافته بود اما تفاوت قابل ملاحظه در اضافه سازی غلظت های متفاوت آنتی بیوتیکی ($\mu\text{g/ml}$) ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ در سلولهای متفاوت ترانسفکت شده هر پلیت وجود نداشت. اما در بین ۳ پلیت ذکر شده که با سه شرایط متفاوت ترانسفکت شده بودند تفاوتی در بین سلولهای زنده مشاهده گردید. بدین ترتیب که در میکروپلیت هایی که پس از یک بار ترانسفکت همزمان دو پلاسمیدهای pcDNA3.1+ / hyg / luxA و luxB / neo pcDNA3.1+ / neo انتخاب آنتی بیوتیکی انجام پذیرفته بود، در مقایسه با موارد دو بار ترانسفکت پلاسمیدهای pcDNA3.1+ / hyg / luxA و pcDNA3.1+ / neo / luxB یا pcDNA3.1+ / neo / luxB و pcDNA3.1+ / hyg / luxA و پس هر بار انتخاب مجزا با آنتی بیوتیک تعداد سلول های زنده بیشتری مشاهده گردیدند، که علت این مساله می تواند اضافه سازی دو بار فسفات کلسیم ۲ مولار به سلول ها باشد که پس از مدتی رسوب نموده و منجر به مرگ سلول ها می گردد.

۱۶-۳- SDS-PAGE و وسترن بلات در سلولهای ترانسفکت شده

جهت تائید بیان و تولید پروتئین لوسی فراز، از نمونه تهیه شده مقدار $60 \mu\text{l}$ بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز و بوسیله رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید. پس از گذشت ۲ ساعت، یک باند پروتئینی ۷۶ کیلو دالتونی مطابق ۲۱ گردید که نمونه کنترل فاقد آن بود. همچنین بخشی از نمونه نیز به کاغذ PVDF انتقال گردید و در طی مراحل وسترن بلات و توسط آنتی بادی اختصاصی لوسی فراز باند پروتئینی ۷۶ کیلو دالتونی مطابق شکل ۲۵B-۴ شناسایی گردید که در نمونه کنترل مشاهده نگردید.



شکل ۲۱: SDS-PAGE سلولهای NIH3T3 کوترانسفکت شده با پلاسمیدهای نو ترکیب. : ستون ۱: مارکر وزن مولکولی. ستون ۲: پروتئین ۷۶ KDa لوسی فراز در سلولهای NIH3T3. ستون ۳: سلولهای ترانسفکت شده با پلاسمیدهای فاقد قطعه pcDNA3.1+ / hyg و pcDNA3.1+ / neo بعنوان نمونه کنترل.

۴- بحث و نتیجه گیری

ژنهای گزارشگر ژن هایی با فنوتیپ قابل اندازه گیری هستند که می توانند در بستری از پروتئین های داخلی به سهولت شناسایی گردند. این گزارشگرهای زیستی نه تنها مزیت کاستن فعالیت زمینه ای را در سلول ها دارا هستند ، بلکه سیگنال را از سطح سلول تکثیر نموده و پاسخی سریع ، حساس ، قابل تکثیر و به سهولت قابل تشخیص را ایجاد می نمایند. در حال حاضر ژن های گزارشگر زیستی بطور گسترده جهت کاربرد های *in vivo* و *in vitro* مورد استفاده قرار می گیرند. این ژن ها بعنوان شاخصی جهت نشان دادن فعالیت رونویسی در سلولها، ارتباطات سلولی، توسعه سلولی، تنظیم رشد، تکثیر و بعنوان یک روش غربالگری ژنی می باشند . امروزه انواع متنوعی از این ژن ها در دسترس می باشند که مهمترین آنها عبارتند از: β گالاکتوزیداز (lacZ) ، کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) ، لوسی فراز حشرات (luc) ، لوسی فراز باکتریایی (lux) ، β - لاکتاماز (bla) ، پروتئین فلورسانت سبز (GFP) ، آلکالین فسفاتاز (phoA) و β گلوکوزونیداز (gusA , gurA) Uida A (Naylor, 1994 ; Jiang ; et al., 2008 ; Kohler et al., 2000).

در بین تمامی ژن های لوسی فرازی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته اند، لوسی فرازهای باکتریایی بعنوان فراوان ترین و شناخته شده ترین انواع از نظر فعالیت نورافکنی زیستی می باشند. این آنزیم یک هتروداایمر شکل گرفته از ژن های luxA و luxB می باشد که به ترتیب زیر واحدهای α و β را رمز می نمایند. فلاوین منواکسیژناز در تمامی لوسی فراز های باکتریایی همولوگوس بوده و اکسیداسیون یک آلدئید زنجیره بلند را در حضور فلاوین کاتالیز می نماید. بر خلاف سیستم های نورافکنی شب تاب و رنیل ، سیستم لوکس باکتریایی قادر به سنتز تمامی سوبستراهای مورد نیاز خود (FMNH₂ و O₂ و آلدئید آلیفاتیک زنجیره بلند) جهت نورزایی می باشد. ژنهای luxCDE مسئول سنتز سوبسترای آلدئیدی هستند و FMNH₂ و O₂ نیز جزء محصولات طبیعی خود سلول می باشند.

در طی سالهای اخیر تحقیقات گسترده ای در زمینه استفاده از ژن های گزارشگر بعنوان سیستمهای موثر در نورافکنی زیستی انجام گرفته که نتایج این تحقیقات نشان داده که لوسی فراز های باکتریایی می توانند بعنوان گزارشگرهای ایدآل و منحصر به فرد و واجد مزایای متعدد در سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی مورد استفاده قرار گیرند. مهمترین این مزایا عبارتند از :

۱- حساسیت بالا ، وابستگی خطی شدت نورزایی به میزان لوسی فراز و زمان آزمایش کوتاه در حد ثانیه و یا دقیقه.

۲- فقدان فعالیت اندوژنوس لوسی فراز در اورگانیسم های غیرنورزا امکان استفاده وسیع از ژن های لوسی فراز را بعنوان گزارشگرهای بیان ژنی برای انواع سلول ها فراهم ساخته است.

۳- محدودیت کمی در زمینه تشخیص زمینه فنوتیپ یا حساسیت فیلم وجود دارد که امروزه شناساگرها به تجهیزات تزریق سریع جهت مخلوط سازی با FMN₂ و FMN اکسیدو ردوکتاز مجهز هستند که امکان ساطع سازی پیوسته نور را فراهم می سازد.

۴- قیمت سوبستراهای مورد استفاده (FMN و آلدئید) جهت آزمایشات نورافکنی زیستی بسیار ارزان بوده و سوبستراها به سهولت در دسترس می باشند.

۵- امکان اندازه گیری مستقیم عملکرد *in vivo* بدون نیاز به تخریب غشاء سلولی و از دست دادن قدرت حیات سلولی وجود دارد. اهمیت این مساله در این است که امکان آنالیز سریع بیان موقت ژنی را تامین می نماید.

در حال حاضر ژن های رمز کننده لوسی فرازها از باکتری های مختلفی همچون *Vibrio (photobacterium)* ، *photobacterium leiognathi* ، *Photobacterium phosphoreum* ، *Vibrio(benekea) harveyi* ، *fischeri* ، *photorhabdus Xenorhabdus) luminescens* جداسازی و کلون گردیده و خصوصیات آنزیمی مربوط به آنها با جزئیات مورد مطالعه قرار گرفته است (Wilson, 1998). همچنین نتایج حاصل از تحقیقات پیشین حاکی از آن است که گروه های متعددی در جهت بیان اجزای سیستم لوکس luxAB باکتریایی بصورت پروتئین های فیوژن شده دو زیر واحد با یکدیگر مثل پلاسمید pCK218 در باکتری و بیبریو فیشری یا پلاسمید های متعدد همانند PB, pGMC12, pFIT001, Plx, pRS1105, pCVG در ویبریو هارویی اقدام نموده اند (Geer and Szalay, 2002).

در مقایسه سازه ژنتیکی طراحی گشته در تحقیق حاضر بصورت pETDuet-1/luxAB نه تنها استفاده از سیستم لوکس را بعنوان یک آنزیم گزارشگر در سلول های پروکاریوتی سهولت بخشیده است بلکه شرایطی را فراهم ساخته که در آن هر دوژن لوکس بتوانند بصورت همزمان از یک پروموتور (T7) بیان گردند. همچنین امروزه می دانیم که بیان بالای ژن های لوکس نیازمند یک پروموتور قوی و جایگاه اتصال ریوزوم در روی وکتور بیانی هستند تا میزان محصول افزایش یابد که وکتور pTEDuet-1 واجد هر دو مورد می باشند.

در این مطالعه سیستم پلی سیستمونیک لوکس از طریق کلون کردن ژن های luxA و luxB و توالی بینابینی آنها بصورت یک قطعه ۲۰۴۶bp در وکتور کلونینگ TA (pTZ57R) و به دنبال آن ساب کلون کردن قطعه در وکتور بیانی pTEDuet-1 تهیه شد. سپس بیان پروتئین های رمز کننده زیر واحد α و β لوسی فراز در سلول های بیانی Nova Blue تائید گشت که تابحال گزارش نشده است. بعلاوه پروتئین ۷۶ کیلودالتونی luxAB همراه پروتئین های مربوط به زیرواحدهای آزاد α و β لوسی فراز با اندازه های به ترتیب ۴۰ و ۳۷ کیلودالتونی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که میزان زیرواحدهای آزاد α و β لوسی فراز نیز علاوه بر پروتئین ۷۶ کیلودالتونی $\alpha\beta$ پس از القاء با IPTG افزایش می یابد که تائید کننده این مساله است که این زیرواحدها نیز از رونوشت لوکس و از همان پروموتور (T7) و وکتور pTEDuet-1 در سلوهای بیانی Nova Blue ترجمه می گردند.

بصورت طبیعی ژن های گزارشگر به توالی پرموتور در یک وکتور بیانی متصل شده، به داخل سلول انتقال می یابد و سپس سلول ها جهت حضور گزارشگر از طریق بررسی mRNA ، پروتئین یا فعالیت آنزیمی آن مورد آزمایش قرار می گیرند. در این جا می توان از سازه ژنتیکی تهیه شده جهت بررسی عملکرد یک پرموتور خاص استفاده نمود. چنانچه پرموتور وکتور مورد نظر (T7) از طریق روش های هضم آنزیمی در جایگاه های مربوط به آنزیم های محدود الاثر با توجه به نقشه ژنتیکی وکتور مربوطه خارج گردد و توالی پرموتور مورد مطالعه در این جایگاه جایگزین گردد، در این صورت می توان از طریق بررسی کارکرد نورزایی ژن هال لوکس پس از اضافه نمودن سوبسترای مورد استفاده آنزیم (دکانال) عملکرد پرموتور را مورد ارزیابی قرار داد. بعلاوه سنجش میزان نورزایی توسط دستگاه لومینومتر و مقایسه آن با نمونه های شاهد نیز می تواند معیاری کمی در جهت مقایسه در اختیار ما قرار دهد .

از طرف دیگر در تحقیق حاضر بر خلاف بسیاری از مطالعات قبلی که از نواحی آنزیمی موجود در طرفین مجموعه ژنی luxAB جهت مراحل کلونینگ استفاده می گردید، پرایمر های اختصاصی طراحی شده ژن های luxA بعنوان پرایمر forward و luxB بعنوان پرایمر reverse جهت تکثیر قطعه luxAB استفاده گردید که دقیقا در نواحی ابتدایی و انتهایی قطعه luxAB قرار گرفته اند. بنابراین قطعه تکثیر یافته به اندازه ۲۰۶۴ bp بوده و به غیر از حدود ۴۰ نوکلئوتید در فاصله بین ژنی در انتهای ژن luxA و ابتدای ژن luxB واجد هیچ توالی اضافی نبوده که این شرایط علاوه بر تسهیل مراحل کلونینگ ، امکان جهش زایی یک قطعه ژنی بزرگ را نیز کاهش می دهد.

در یک تحقیق که توسط Bladwin و همکارانش انجام گرفت DNA رمز کننده زیر واحد های α و β لوسی فراز باکتری ویبریو هارویی توسط یک قطعه 4kb جدا گردید و در پلاسمید pBR322 کلون شد و پلاسمیدهای نو ترکیب به *E.coli* سویه RR1 منتقل گردیدند. سپس ترکیب دکانال اضافه شده و ۱۲ کلنی نورزا بدست آمد. در یکی از کلنی ها که جزئیات نورزایی مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان دادند که میزان نورزایی در حد نوع اصلی خود ویبریو هارویی نمی باشد و البته این پلاسمید در هیچ باکتری دیگری غیر از *E.coli* نیز قادر به همانند سازی نمی باشد (Bahdwin, 1984). مساله جالب توجه در مورد باکتری ویبریو فیشری این است که پرموتورهای لوکس این باکتری می توانند در *E.coli* کارکرد داشته باشند. دلیل این مساله توانایی RNA پلی مرز در تشخیص جایگاه های شروع رونویسی در lux DNA ی ژن ها یا مولکول های تنظیمی در *E.coli* است که سایر باکتری های نورزا فاقد آن هستند .

با توجه به مطالب ذکر شده سازه ژنتیکی تهیه شده در تحقیق حاضر pETDuet-1/luxAB می تواند بعنوان یک کاست گزارشگر در سیستم های پروکاریوتی مورد استفاده گردیده و پس از اضافه گشتن آلدئید چرب (دکانال) به سلولها فنوتیپ نورزا را ایجاد نماید. بیان ژن های لوکس در سویه های باکتریایی متفاوت یک سیستم حساس و ساده را جهت نمایان سازی رشد و همچنین توزیع باکتری ها در محیط زیست آنها فراهم می سازد. بعلاوه با استفاده از ژن های لوکس بعنوان گزارشگرهای بیان ژنی قدرت و تنظیم رونویسی پرموتورهای

مختلف به سرعت قابل اندازه گیری بوده و نور ساطع گردیده نیز به سهولت قابل تشخیص و اندازه گیری می باشد. با توجه به این نتایج کاست گزارشگر موجود می تواند بعنوان یک مارکر یا بر چسب در دستکاری ها و کنترل بیان ژنی در زمینه های مختلف تحقیقاتی، تولید، کنترل میکرواورگانیسم ها و سایر زمینه های بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گیرد.

در حال حاضر هنوز سیستم لوکس باکتریایی سیستم انتخابی جهت بیان در سلول های پروکاریوتی و لوسی فراز شب تاب غالباً در سلولهای یوکاریوتی بیان می گردد. بررسی مطالعات پیشین نشان می دهند که تحقیقات گسترده ای در جهت استفاده از سیستم لوکس باکتریایی بعنوان یک گزارشگر بیان ژنی در رده های متنوعی از سلولهای یوکاریوتی و مخصوصاً سلول های پستانداران انجام گرفته است (Costa et al., 1991; Imashanu et al., 1990; Harmache et al., 2006).

از مطالعات اولیه که در این زمینه انجام گرفت در سال ۱۹۸۸ بود که توسط Boylan و همکارانش یک نوع فیوژ شده از لوسی فراز تهیه شد که قادر به نورزایی در سلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی بود. این تحقیق توسط روش های جهش زایی در جایگاه لوسی فراز فیوژ شده توسط یک دکاپتید تحت پروموتورهای Gal4 (مخمر)، T4 (*E. coli*) و SP6 (فاژ) انجام گرفت و در طی آن توالی ATG با CAG جایگزین گشت که امکان تخلیص لوسی فراز فیوژ شده فعال در فقدان زیر واحد β آزاد فراهم شده و بعلاوه از آغاز ترجمه داخلی ژن *luxB* نیز ممانعت می نمود (Boylan et al., 1989).

در یک تحقیق دیگر Patterson و همکارانش در سال ۲۰۰۵ یک سیستم بهینه شده رمزهای لوسی فراز باکتری *photorhabdus luminescens* جهت بیان در سلول های پستانداران تهیه شد و به سلولهای HEK293 انتقال داده شد، نتایج نشان دادند که با وجود اینکه سطح mRNA تقریباً ثابت مانده است اما نورزایی قابل ملاحظه ای در سلول های مخمر قابل تشخیص است (Patterson et al., 2005).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Dan M close و همکارانش انجام گرفت، یک کاست کامل بیانی پلی سیستمونی لوکس تهیه شد که در آن رمزهای ژنتیکی بهبود یافته بودند. این کاست به سلول های یوکاریوتی انتقال یافته و امکان تصویربرداری *real time* نورافکنی را در حیوانات و کشت سلولی بدون اضافه سازی سوبسترا خارجی با تخریب سلول فراهم ساخت (Close et al., 2010).

Molina و همکاران (۲۰۰۲) ژن گزارشگر لوسیفراز را به ماهی تیلاپیا منتقل نمودند و توانستند میزان فعالیت آنزیمی لوسیفراز را بوسیله لومینومتر اندازه گیری نمایند. پس از آزمایشات متعدد دریافتند که شدت نور فلورسانس در برابر فلزات سنگین روی، کبالت، جیوه و مس بشدت افزایش و در مقابل سرب کاهش می یابد. همچنین فعالیت ژن گزارشگر لوسیفراز در مقابل ترکیبات استیل کلراید، تتراکلروفلن، کلرواستامید و آرسنات فعال میشود. بطور کلی این بررسی نشان داد که ژن گزارشگر لوسیفراز نشانگر زیستی مناسبی برای نشان دادن آلاینده های زیست محیطی می باشد.

در این تحقیق ژن های رمز کننده زیر واحدهای α و β آنزیم لوسی فراز از طریق PCR توسط پرایمر های اختصاصی تکثیر گردید و پس از تأیید توالی محصول PCR بصورت جداگانه در وکتور pTZ57R کلون شده و سپس قطعات luxA و luxB توسط واکنش های هضم آنزیمی از T وکتور خارج و به ترتیب در وکتور های بیانی pcDNA3.1⁺/hyg و pcDNA3.1⁺/neo ساب کلون گردید. سازه های نو ترکیب pcDNA3.1⁺/hyg/luxA و pcDNA3.1⁺/neo/luxB بصورت همزمان به یک رده فیرو بلاستی از سلولهای یوکاریوتی (NIH3T3) انتقال یافتند. در وکتورهای بیانی pcDNA3.1⁺ وجود پروموتور سایتومگالوویروس (CMV) امکان سطح بالای بیان ژنهای مورد نظر را در رنج وسیعی از سلول های پستانداران و آبزبان فراهم می سازد. اخیراً در مطالعات متعددی استفاده همزمان از دو وکتور بیانی pcDNA3.1⁺ (neo) و pcDNA3.1⁺ (hyg) در ژن هایی که از نظر کارکردی به یکدیگر مرتبط بوده جهت بیان در سلول های یوکاریوتی متعدد و از جمله سلول های پستانداران گزارش گردیده است (wang et al., 2007; Alur et al., 2009). اما کلونینگ جداگانه زیر واحدهای α و β آنزیم لوسی فراز باکتری و ویرو فیشری در وکتورهای بیانی مذکور برای نخستین بار در این تحقیق گزارش گردیده است .

در مرحله بعدی تحقیق سازه های نو ترکیب pcDNA3.1⁺/hyg/luxA و pcDNA3.1⁺/neo/luxB همزمان به سلول های یوکاریوتی ترانسفکت گشتند. در اینجا وجود ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک هیگرومیسین (هیگرومیسین B فسفوترانس فراز) در وکتور بیانی pcDNA3.1⁺/hyg و وجود ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک نئومایسین در وکتور بیانی pcDNA3.1⁺/neo امکان انتخاب ترانسفکت های پایدار در سلولی های یوکاریوتی واجد هر دو سازه ژنتیکی نو ترکیب حامل ژن های رمز کننده آنزیم لوسی فراز بصورت همزمان را فراهم می سازند . زیرا تنها سلول های واجد هر دو پلاسمید نو ترکیب بصورت همزمان می توانند در محیط حاوی نئومایسین و هیگرومیسین زنده مانده و تکثیر نمایند.

در این تحقیق برای نخستین بار از یک رده سلولی فیرو بلاستی NIH3T3 جهت کو ترانسفکت و بیان همزمان ژن های luxA و luxB استفاده گردید که با توجه به بررسی بیان این ژن ها پس از استخراج RNA و انجام RT-PCR ، نتایج نشان داد که بهترین زمان برای بیان و انتخاب ترانس فکت ها پس از گذشت ۲۴ ساعت می باشد. مقایسه بین گذشت ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از انجام ترانسفکت جهت انتخاب ترانس فکت ها بیان بالاتری را در زمان های اولیه یعنی (۲۴ ساعت) را تأیید می نماید.

سیستم ژنی ادغام شده luxA-luxB که تحت یک پروموتور بعنوان گزارشگر بیان ژنی در سلول های یوکاریوتی استفاده می گردد، از نظر عملکردی شدیداً تحت تاثیر شرایط دمایی محیط قرار دارد. بطوریکه این لوسی فرازهای فیوژ شده در دماهای بالاتر (۳۰-۲۸ °C) تاخوردگی نامناسبی یافته ولی در دماهای پائین تر همان پایداری حرارتی آنزیم دست نخورده را دارا هستند. بنابراین جهت دستیابی به سطوح بالای بیان ژن در سلول های ماهیان، توسعه سازه های جدید luxA-luxB رمز کننده لوسی فراز باکتریایی با کارایی بالای تاخوردگی در دماهای ۳۷ °C می تواند از اهداف تحقیقات در این زمینه باشد. در تحقیق حاضر کشت سلولهای NIH3T3 و بیان

ژنهای لوکس باکتری ویبریو فیشری در دمای ۳۷° انجام پذیرفت و پس از اضافه سازی سوبسترال دکانال خصوصیت عملکردی آنزیم از لحاظ نورزایی مورد تأیید قرار گرفت که در مقایسه با ناپایداری و کاهش عملکردی مشاهده شده در مورد لوسی فرازهای باکتریایی فیوژ شده در تحقیقات پیشین، بعنوان یک مزیت محسوب می گردد. در نهایت می توان نتیجه گرفت که این سازه های ژنتیکی قابل انتقال به ماهیان بوده و می توان از آن بعنوان یک ماکر ژنتیکی برای ردیابی و مطالعات بیولوژیکی استفاده نمود.

1. Alur, M., M.M. Nguyen, E. Eggener, F. Jiang, and S.S. Dadras. 2009. Suppressive Roles of Calreticulin in Prostate Cancer Growth and Metastasis. *The American Journal of Pathology*, 175(2): 882-890.
2. Baldwin, T. 1984. Cloning of the Luciferase Structural Genes from *Vibrio harveyi* and Expression of Bioluminescence in *Escherichia coli* appearing in *Biochemistry*, 23: 3663-3667.
3. Boylan, M., J. Pelletier, S. Dhephagnon, S. Trudel, N. Sonenberg, and E. Meighen. 1989. Construction of a fused LuxAB gene by site-directed mutagenesis. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 4: 310-316.
4. Close, D.M., S.S. Patterson, S. Ripp, S.J. Baek, J. Sanseverino, and G.S. Saylor. 2010. Autonomous Bioluminescent Expression of the Bacterial Luciferase Gene Cassette (lux) in a Mammalian Cell Line. *PLoS ONE*, 5(8): 1-12.
5. Costa, S., E. Douville, J. Bell, and E. Meighen. 1991. Expression of fused bacterial luciferase in mammalian cells. *Biolum Chemilum*: 31-34.
6. Escher, A., D.J. Kane, J. Lee, and A. Szalay. 1989. Bacterial luciferase ab fusion protein is fully active as a monomer and highly sensitive in vivo to elevated temperature. *Proceeding of National Academy of Sciences of the U S A*, 86: 6528-6532.
7. Daunert, S., A.C. Simmonds and D. Watmore. 1987. Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1 : purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 84: 8912-8916.
8. Dijkstra, J. M., H. Okamoto, M. Ootake, and T. Nakanishi. 2001. Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 199-202.
9. Greer, L.F. and A.A. Szalay. 2002. imaging of light emission from the expression of luciferase in living cells and organisms : a review. *Luminescence*, 17: 43-74.
10. Gong, Z. and J. Wan. 2001. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetics*, 111: 213-225.
11. Harmache, A., M. Leberre, S. Droineau, M. Giovannini and M. Bremon. 2006. Bioluminescence Imaging of live infected Salmonids Reveals that the fin Bases Are the Major Portal of entry for Novirhabdovirus. *Journal of virology*, 3655-3659.
12. Imashanu, S., B. Musafia, R. Hader, M. Suissa, and J. Kuhn. 1990. Fusion of luxA and luxB and its expression in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *Biolum Chemilum*, 5: 89-98.
13. Jiang, T., B. Xing, and J. Rao. 2008. Recent Developments of Biological Reporter Technology for Detecting Gene Expression. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25: 41-76.
14. Niwa, K., S. Kani, M. Kinoshita, K. Ozato, and Y. Wakamatsu. 2000. Expression of GFP in nuclear transplants generated by transplantation of embryonic cell nuclei from GFP-transgenic fish into nonenucleated eggs of medaka, *Oryzias latipes*. *Proceeding of National Academy of Sciences of the U S A*, 2(1):23-34.
15. Lee J-Y., I. Hirono and T. Aoki. 2000. Stable expression of a foreign gene, delivered by gene gun, in the muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Marine Biotechnology*, 2:254-258.
16. Louise, H.N. 1999. Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright. *Biochemical Pharmacology*: 749-757.
17. Meighen, E.A. 1994. Genetics of bacterial Bioluminescence. *Annual Review of Genetics*, 28: 117-139.
18. Molina, A., R. Carpeaux, J.A. Martial, and M. Muller. 2002. A transformed fish cell line expressing a green fluorescent protein-luciferase fusion gene responding to cellular stress. *Toxicology in Vitro*, 16: 201-207.
19. Naylor, L.H. 1999. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology*, 58: 749-757.
20. Kohler, S., S. Belkin, and R.D. Schmid. 2000. Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366: 769-779.
21. Romøren, K., B.J. Thu, and Q. Evensen. 2004. Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 251-264.
22. Sambrook, J. and D. Russell, 2001. *Molecular Cloning , A laboratory manual in Molecular Biomethods Handbook*. Humana press,
23. Shewry, P. and R. Fido. 1998. Protein blotting. principle and applications, 435-444.

24. Tonheim, T.C., J. Leirvik, M. Løvoll, A.I. Myhr, J. Bøgwald and R.A. Dalmo. 2007. Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535 days after injection. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 867-876.
25. Patterson, S.S., H.M. Dionisi, R.K. Gupta and G.S. Saylor. 2005. Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: J Ind Microbiol Biotechnol.
26. Wang, Y., A. Thakur and Y. Sun. 2007. Synergistic Effect of Cyclin D1 and c-Myc Leads to More Aggressive and Invasive Mammary Tumors in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Cancer Res*, 67: 3698-3707.
27. Wilson, T.a.J.W.H. 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev Cell. Developmental Biology*, 14: 197-230.

Abstract

In this study luciferase gene extracted from *Vibrio fischeri*. *V. fischeri* strain was kindly provided by Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). Genomic DNA extraction was carried out by Phenol-chloroform. A DNA fragment encoding the luxA and LuxB was amplified by PCR using sense and antisense primers, specific restriction sites for BamH1 and Kpn1 were introduced into 5' end of forward and reverse primer, respectively. The PCR product was purified from agarose gel and ligated into cleaved PT257R cloning vector. Following the confirmation of the cloned Luciferase transformed into *E. coli*. Recombinant clones were confirmed by specific PCR and restriction enzyme digestion analysis. The luxA and LuxB fragment was released subcloned in to the pCDNA3.1/hyg and pCDNA3.1/neo expression vectors, respectively. recombinant plasmid was confirmed through restriction digestion using BamH1 and Kpn1 enzymes and subsequently, transformation procedure continued into NIH3T3 eukaryote cells by specific kit. Luminescence ability of recombinant clones was tested by NIH3T3 cells and dechalanal (substrate) and Neomycin and hygromycin. The results showed that luminescence start after 2 hours and then increase after 6 hours. In addition, the protein identity was verified by western blot analysis, the protein bands 76 kD were detected. , which indicates protein expression of luxB, luxA.

Key words: Luciferase, *Vibrio fischeri*, Transfer gene

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Caspian Sea Ecology Research Center**

**Project Title : Investihation of genetic marker (Lusiferase gene) production for
detection and stigmatize Cyprins carpio or Rutilus frisii kutum**

Apprpved Number: 2-76-12-89052

Author: Faramarz Laloei

Project Researcher : Faramarz Laloei

**Collaborator(s): Pourgholam, R., bandehpour, M., Taghavi, M.J., Ghanei, M.,
Nayerani, M, Yosefian.M**

Advisor(s): Kazemi, B

Supervisor: Ghoroghi, A

Location of execution : Mazandaran province

Date of Beginning :2010

Period of execution : 3 years & 6 Months

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2016

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted
without indicating the Original Reference**

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute –Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

**Investigation of genetic marker (Lusiferase gene)
production for detection and stigmatize *Cyprins carpio* or
*Rutilus frisii kutum***

Project Researcher :

Faramarz Laloei

Register NO.

48275