

بهبود کردن کیفی و کمی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن FOXE1 به عنوان ژنی غنی از GC

زهره محمدی زانیانی^۱، مهرداد زینلیان^۲، محمدامین طباطبایی فر^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تقریباً ۳ درصد از ژنوم انسان غنی از GC است. این نواحی اغلب در پروموتور ژن‌ها، به ویژه ژن‌های خانه‌دار و ژن‌های سرکوب‌گر تومور یافت می‌شوند. تکثیر این مناطق غنی از GC می‌تواند چالش برانگیز باشد. زیرا پایداری توالی DNA غنی از GC بیشتر بوده، همچنین ساختارهای ثانویه به آسانی در این مناطق تشکیل می‌شوند. ژن FOXE1 به خانواده بزرگی از فاکتورهای رونویسی تعلق دارد که برای مورفوژن غده تیروئید ضروری می‌باشد و به‌عنوان فاکتور مستعدکننده در سرطان تیروئید غیر مدولاری نوع ۴ معرفی شده است.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی است که به نحوه‌ی تکثیر قسمتی از توالی ژن FOXE1 با درصد بالای GC که با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی قابل انجام نمی‌باشد پرداخته است.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد، استفاده از مواد تقویت‌کننده‌ی تکثیر مناطق غنی از GC، نظیر بتائین ودی متیل سولفوکسید (DMSO) به همراه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از نوع Touchdown در تکثیر توالی این ناحیه از ژن FOXE1 با تخریب ساختارهای ثانویه تشکیل شده در توالی و افزایش محصول واکنش مؤثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این روش می‌تواند برای تکثیر نواحی غنی از GC در ژن‌های دیگر، که درصد مشابهی از GC با ژن FOXE1 دارند به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: توالی غنی از GC: FOXE1؛ بتائین؛ DMSO: Touchdown PCR

ارجاع: محمدی زانیانی زهره، زینلیان مهرداد، طباطبایی فر محمدامین. **بهبود کردن کیفی و کمی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن FOXE1 به**

عنوان ژنی غنی از GC. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۳): ۱۰۱۰-۱۰۰۴

مقدمه

فاکتورهای رونویسی تعلق دارد و در سال‌های گذشته به‌عنوان فاکتور رونویسی تیروئید ۲ (TTF2) شناخته می‌شد (۵). این ژن در موقعیت کروموزومی 9q22.33 قرار دارد (۶). FOXE1 بدون اینترون بوده و پروتئینی متشکل از ۳۷۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ۴۲ دالتون را کد می‌کند (۷). این پروتئین دارای یک دامنه ۱۰۰ آمینواسیدی حفاظت شده متصل به DNA می‌باشد و به‌عنوان یک فاکتور رونویسی تیروئید عمل می‌کند که برای رشد غده تیروئید، مهاجرت سلول‌های تیروئید و تمایز آن‌ها ضروری می‌باشد (۸، ۹). جهش در این ژن با کم کاری تیروئید، Bamforth-lazarus syndrome و سرطان تیروئید غیر مدولاری نوع ۴ مرتبط است (۹، ۱۰).

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی غدد درون‌ریز است (۱). به طوری که در جهان پنجمین رتبه از نظر بروز در میان زنان را به خود اختصاص داده است (۲، ۳). سرطان پاپیلاری تیروئید که از سلول‌های اپی‌تلیال تیروئید منشاء می‌گیرد، رایج‌ترین زیر گروه از نظر بافت‌شناسی در این سرطان بوده و مسئول ۸۰ درصد از سرطان‌های تیروئید می‌باشد که معمولاً به عروق لنفاوی متاستاز می‌دهد (۱، ۴). اثر متقابل عوامل محیطی و ژن‌های با نفوذ کم تا متوسط باعث ایجاد سرطان تیروئید می‌شود. یکی از ژن‌های کاندید مناسب با نفوذ کم تا متوسط در این سرطان FOXE1 می‌باشد که به خانواده بزرگی از

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز کنترل و پیشگیری سرطان ایرانیان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیردار و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤو: مهرداد زینلیان: استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز کنترل و پیشگیری سرطان ایرانیان، اصفهان، ایران

Email: m.zeinalian@med.mui.ac.ir

روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی آزمایشگاهی است که در گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

انتخاب خانواده و جداسازی DNA: بیماران از مرکز کنترل و پیشگیری سرطان ایرانیان (مکسا)، شعبه‌ی اصفهان انتخاب شدند. رضایت‌نامه‌ی آگاهانه به امضای اعضای منتخب از هر خانواده رسید و سپس نمونه خون محیطی افراد مورد نظر جمع‌آوری شد. DNA ژنومی خون آن‌ها با به‌کارگیری روش Salting-out جداسازی و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo ND-ONE) و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر بر روی ژن *FOXEI* یک جفت آغازگر با توالی F:ACCAAGCCGATCATTATTTC;) (R:CTGCTGATAAATGGAACCCAAC با استفاده از سامانه‌ی <http://primer3.ut.ee> Primer 3 طراحی شد. برای اطمینان از موقعیت دقیق اتصال آغازگرها، آن‌ها توسط سامانه‌ی NCBI BLAST (<https://WWW.ncbi.nlm.gov/tools/primer-blast>) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت مستر میکس PCR شرکت Add Bio انجام شد که غلظت یون *Mgcl2* برای نمونه‌های مورد آزمایش در این واکنش ۲mM می‌باشد. بعد از این مرحله، محصول حاصل از واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و نتیجه‌ی آن توسط دستگاه ژل داگ ثبت گردید.

به دلیل تکثیر اندک توالی‌های غنی از GC در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی، از قطعه‌ی مورد نظر در الکتروفورز ژل آگارز باند مشخصی تشکیل نشد. اما چند باند فرعی دیگر بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. برای برطرف کردن مشکل موجود، از بتائین تهیه شده از شرکت SIGMA با غلظت ۰/۸ M و DMSO تهیه شده از شرکت سیناکلون با غلظت ۱۰۰ درصد، با درصدهای مختلف و همچنین Touchdown PCR استفاده شد. در نهایت برای مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پس از به‌کارگیری بتائین، DMSO و Touchdown PCR الکتروفورز ژل آگارز مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله برای بررسی و تعیین اندازه‌ی قطعات حاصل از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از Ladder 100bp آماده به مصرف شرکت سیناژن استفاده نمودیم.

یافته‌ها

در بررسی ژل آگارز مربوط به قطعه تکثیر یافته توسط واکنش زنجیره‌ای

در ژن *FOXEI* واریانتی (c.743C>G, p. NM 004473: c.531-532insCGCGA) شناسایی شده که در سرطان تیروئید غیر مدولاری نوع ۴ مؤثر است، برای تکثیر ناحیه مربوط به واریانت در این ژن که دارای توالی غنی از GC با فراوانی ۷۲/۵ درصد می‌باشد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز که به‌طور رایج برای تکثیر توالی‌های معمولی مورد استفاده قرار می‌گیرد کاربردی نمی‌باشد (۱۱). زیرا این روش رشته‌هایی با درصد بالای GC (بیشتر از ۵۵ درصد) را نمی‌تواند به خوبی تکثیر نماید (۱۲). الگوهای DNA با محتوای GC بالا، به دلیل تمایل به جمع شدن و تشکیل ساختارهای ثانویه پیچیده می‌توانند بر کارایی انواع واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تأثیر بگذارند (۱۳). از طرفی به دلیل بالا بودن تعداد پیوند هیدروژنی بین بازهای گوانین و سیتوزین، نقطه ذوب DNA بالا می‌رود. اما افزایش پایداری توالی DNA غنی از GC، برخلاف تصور رایج، اساساً به دلیل پیوندهای هیدروژنی نمی‌باشد بلکه تثبیت توالی عمدتاً به دلیل فعل و انفعالات انباشته‌ای به نام Base stacking است که بیوشیمی و بیوفیزیک جالبی پشت این دلیل انباشته شدن وجود دارد (۱۴).

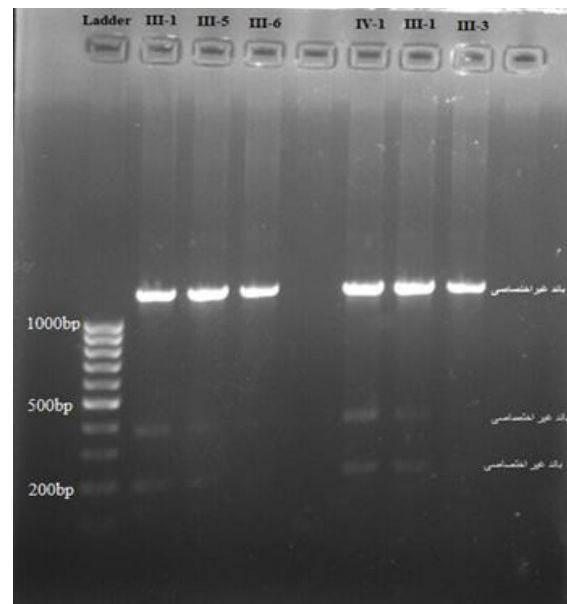
برای غلبه بر مشکلات تکثیر در الگوهای DNA غنی از GC روش‌های متعددی از جمله: استفاده از تقویت‌کننده‌های تکثیر قطعات غنی از GC مانند DMSO، بتائین، فراماید، گلیسرول، پلی‌اتیلن گلایکول، تترامیل آمونیوم کلراید، تغییر در طراحی آغازگرها، استفاده از انواع تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مانند: Hot start، Slowdown، Touchdown پیشنهاد شده است (۱۵، ۱۶).

به‌طور کلی برای تکثیر DNA غنی از GC، دو مشکل اساسی وجود دارد. ۱) ایجاد ساختارهای ثانویه که مانع از اتصال درست آغازگرها به توالی هدف می‌شود. همچنین این ساختارها موجب کاهش پیشرفت یا توقف آنزیم DNA پلیمرز شده که این موارد موجب عدم تکثیر یا تکثیر ناقص DNA الگو می‌گردند. ۲) در صورت وجود جایگاه‌های ثانویه اتصال برای آغازگرها، باندهای غیر اختصاصی افزایش داشته و موجب کاهش محصول اصلی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌شود (۱۷).

در این پژوهش با وجود مشکلات تکثیر توالی‌های غنی از GC، تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ژن *FOXEI* به روش معمول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز میسر نشد، همچنین با روش معمول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نه تنها باند مربوط به قطعه مورد نظر بر روی ژل آگارز دیده نشد بلکه چندین باند فرعی بر روی ژل آگارز مشاهده گردید.

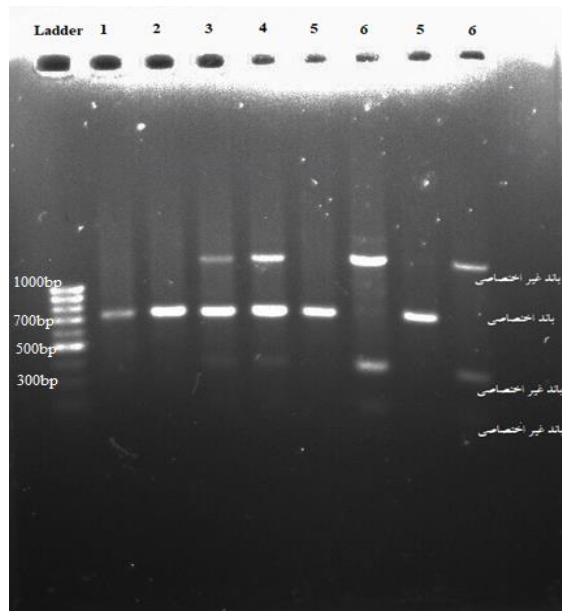
هدف از این مطالعه، معرفی روشی ساده و کاربردی برای تکثیر بخشی از ژن *FOXEI* انسانی با درصد بالای نوکلئوتیدهای GC با به‌کارگیری بتائین، DMSO و Touchdown PCR می‌باشد.

پلیمرز، قطعه‌ی ۷۳۲ نوکلئوتیدی مورد نظر تکثیر نشد، اما چند باند فرعی در ژل الکتروفورز مربوط به آن قابل رؤیت بود (شکل ۱).



شکل ۱. وجود باندهای غیر اختصاصی در ژل الکتروفورز حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. پس از تکثیر قطعه مورد نظر، باند مربوط به آن قطعه (قطعه ۷۳۲ نوکلئوتیدی) بر روی ژل الکتروفورز مشاهده نشد بلکه سه باند غیر اختصاصی با طول‌های متفاوت دیده شد.

مقدار DMSO به کار برده شده در میکروتیوب شماره ۲ نسبت به بقیه مواد به کار برده شده در واکنش ۷/۵ درصد و در میکروتیوب شماره ۵، ۱۰ درصد بوده و مقدار بتائین در میکروتیوب شماره ۲ نسبت به سایر مواد ۱۰ درصد بوده و میکروتیوب شماره ۵ فاقد بتائین می‌باشد.



شکل ۲. نتایج ژل الکتروفورز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به موارد جدول ۱ باند مربوط به به قطعه ۷۳۲ bp در نتایج ژل الکتروفورز همه میکروتیوب‌ها دیده می‌شود به جز نمونه‌ی شماره ۶، که در این میکروتیوب از بتائین و DMSO در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده نشده است. بهترین حالت مربوط به میکروتیوب شماره ۲ و ۵ می‌باشد که با وجود باند قطعه ۷۳۲ bp باندهای فرعی تشکیل نشده‌اند. مقدار DMSO به کار برده شده در میکروتیوب شماره ۲ نسبت به بقیه مواد ۷/۵ درصد و در میکروتیوب شماره ۵، ۱۰ درصد بوده و مقدار بتائین در میکروتیوب شماره ۲ نسبت به سایر مواد ۱۰ درصد بوده و میکروتیوب شماره ۵ فاقد بتائین می‌باشد.

با استفاده از مقادیر متفاوت بتائین و DMSO در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، باند مربوط به قطعه ۷۳۲ نوکلئوتیدی بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود، اما باندهای فرعی همچنان وجود داشتند. (جدول ۱ و شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، باند مربوط به قطعه‌ی ۷۳۲ نوکلئوتیدی تشکیل شده است که نمایان‌گر تکثیر این قطعه می‌باشد. این باند در چاهک ژل الکتروفورز مربوط به میکروتیوب شماره ۶ که فاقد DMSO و بتائین بوده تشکیل نشده و بهترین حالت مربوط به میکروتیوب شماره ۲ و ۵ می‌باشد که

جدول ۱. نوع و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد

شماره میکروتیوب	۱	۲	۳	۴	۵	۶
آب مقطر تزریقی	۲	۲/۵	۳	۴	۴	۶
مستر میکس	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
بتائین	۲	۲	۳	۱	۲	—
DMSO	۲	۱/۵	—	۱	۲	—
آغازگر پیشین	۱	۱	۱	۱	۱	۱
آغازگر پسین	۱	۱	۱	۱	۱	۱
نمونه DNA	۲	۲	۲	۲	۲	۲

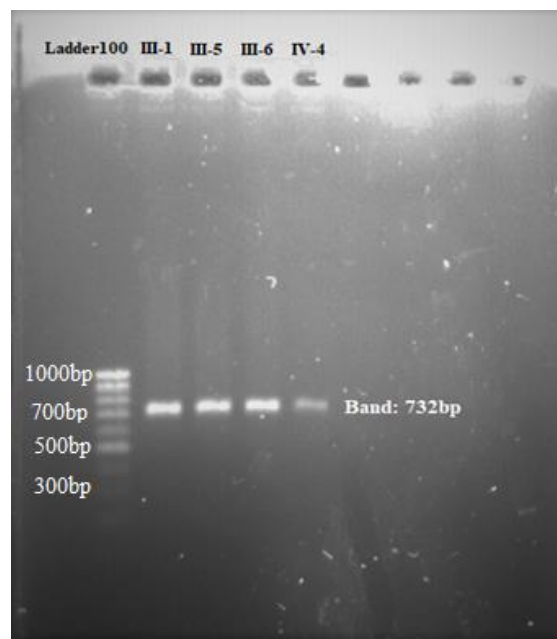
تمام مقادیر مواد به کار برده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس میکرولیتر می‌باشند.

جدول ۲. برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر برای انجام Touchdown PCR

تعداد چرخه	مرحله‌ی واکنش	دما	زمان (دقیقه)
۱	واسرشت اولیه	۹۵	۵
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰	اتصال	۶۴	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۶۳	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۶۲	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۶۱	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۶۰	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱ دقیقه
۳۰ ثانیه	اتصال	۵۹	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۵۸	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۲۳	واسرشت	۹۵	۱
۳۰ ثانیه	اتصال	۵۸	۳۰
۱	گسترش	۷۲	۱
۱	گسترش نهایی	۷۲	۵

تشکیل این ساختارها در شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در عملکرد آنزیم پلیمرز و اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو ایجاد اختلال می‌نماید (۱۵، ۱۹). بنابراین با بهینه‌سازی شرایط واکنش، تکثیر بهتری خواهیم داشت. تکنیک‌های مختلفی از جمله: افزودن تقویت‌کننده‌های تکثیر قطعات غنی از GC، انواع تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نظیر Touchdown PCR، HOT-Start PCR، Slowdown PCR، همچنین به‌کارگیری پلیمرزهای قوی برای غلبه بر این مشکل مطرح شده است. با توجه به اینکه تقویت‌کننده‌های تکثیر تأثیر مشابهی ندارند، برای تکثیر قطعات مختلف تقویت‌کننده‌های متفاوت استفاده می‌شود (۲۰). در برخی موارد حتی با وجود این ترکیبات و راه‌کارها تکثیر توالی غنی از GC با موفقیت انجام نمی‌شود (۱۵). در این مطالعه از DMSO و بتائین در غلظت‌های مختلف استفاده شد و بیشترین میزان تکثیر با افزودن

در مراحل بعدی کار که با انجام دفعات متعدد واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با مقادیر متفاوت و در دماهای دیگر صورت گرفت بهترین حالت باند قطعه مورد نظر در استفاده هم‌زمان بتائین و DMSO به‌صورت ۷/۵ درصد و همچنین در شرایط به‌کارگیری DMSO به تنهایی به مقدار ۱۰ درصد بود. تا این مرحله از آزمایش موفق به تکثیر باند مورد نظر نشده اما برای حذف باندهای اضافی و افزایش اختصاصیت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از روش Touchdown PCR استفاده شد. با به‌کارگیری واکنش زنجیره‌ای Touchdown به جای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی، باند مربوط به قطعه مورد نظر تشکیل و باندهای فرعی دیگر، محو شدند. شکل ۳ برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش Touchdown واکنش را با دمای اتصال ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد شروع کرده و در هر چرخه، دمای اتصال را به اندازه یک درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش داده تا به دمای اتصال آغازگرها که ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد بود، رسیده و سپس در این دمای اتصال ۲۳ چرخه انجام شده و در نهایت گسترش نهایی انجام گردیده است (جدول ۲).



شکل ۳. نتایج ژل الکتروفورز واکنش Touchdown PCR. همانطور که در تصویر قابل مشاهده است در محصول Touchdown PCR تمام باندهای اضافی حذف شده و باند مربوط به قطعه ۷۳۲ bp تشکیل شده است که دلیل بر تکثیر قطعه مورد نظر می‌باشد.

بحث

درصد بالای GC در توالی‌های در حال تکثیر، بر تشکیل ساختارهای ثانویه و اختلال تکثیر، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اثر گذار می‌باشد.

واکنش باند خوبی از محصول اصلی بر روی ژل آگارز دیده شد. برای حذف باندهای فرعی تشکیل شده بر روی ژل آگارز در مطالعه‌ی حاضر، از Touchdown PCR که یکی از روش‌های تکثیر DNA است و سبب کاهش احتمال تکثیر غیر اختصاصی می‌گردد استفاده شد. دماهای بالا، سبب کاهش اتصال آغازگر به توالی مکمل خود شده و حساسیت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز را کاهش داده اما اختصاصیت آن را افزایش می‌دهد و بازده تکثیر DNA را کاهش می‌دهد و دمای پایین‌تر از نقطه‌ی اتصال آغازگر، منجر به تشکیل دایمرهای آغازگر و محصولات غیر اختصاصی می‌شود. در Touchdown-PCR دمای اولیه اتصال آغازگر بالاتر از دمای بهینه اتصال آن‌هاست و به تدریج در طی چرخه‌های بعدی این دما کاهش می‌یابد تا زمانی که به بهترین دمای اتصال آغازگر به رشته الگو برسد و این کاهش تدریجی دما تا دمای اتصال مجاز در طول چرخه‌های PCR تکثیر قطعه‌ی ژنی مورد نظر را بهینه می‌کند (۲۲، ۲۳).

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر تقویت‌کننده‌های تکثیر مناطق غنی از GC در باز کردن این نوع از توالی و شروع واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مشخص شد. همچنین برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Touchdown قادر به تکثیر توالی‌های غنی از GC بوده و موجب افزایش محصول واکنش می‌شود. اما باید این نکته را در نظر داشت که مقدار و نوع مواد به کار برده شده و همچنین زمان‌بندی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به میزان GC توالی مورد نظر بستگی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹۹۶۴۷ با کد اخلاق IR.MUI.REC.1399.696 می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و همچنین مرکز پیشگیری و کنترل سرطان آلاء (MACSA) به انجام رسیده است.

هم‌زمان بتائین و DMSO با نسبت ۷/۵ درصد و DMSO به تنهایی با نسبت ۱۰ درصد حاصل شد. همچنین با به‌کارگیری Touchdown PCR بر اختصاصیت محصول تکثیر شده افزوده شد.

با افزودن DMSO به مستر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، دمای ذوب طی واکنش کاهش می‌یابد. این اتفاق اتصال آغازگر را تسهیل می‌نماید. DMSO به پایه‌ی سیتوزینی رشته الگو متصل می‌شود و در آن تغییرات ساختاری ایجاد می‌نماید. به طوری که سیتوزین نسبت به حرارت حساس‌تر شده و در نهایت دمای ذوب کلی آغازگرها را کاهش می‌دهد. همچنین، DMSO قدرت پیوند هیدروژنی را در شیارهای اصلی و کوچک DNA کاهش داده و ساختار DNA را تغییر می‌دهد، در این مرحله مشکل دمای ذوب بالا در واکنش بر طرف می‌گردد. پس از آن DMSO متصل به DNA از اتصال مجدد DNA دناچوره شده جلوگیری کرده و آغازگرها فضای مناسب برای اتصال دقیق در مکان‌های مکمل خود را پیدا می‌کنند. هرچه آغازگرها در مکان‌های مکمل صحیح خود بیشتر بچسبند، آمپلیکون‌های بیشتری به دست خواهد آمد. در نتیجه DMSO با کاهش دمای ذوب واکنش و جلوگیری از اتصال مجدد دو رشته، به ترتیب ویژگی و بازده واکنش را بالا می‌برد و این عملکرد DMSO در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است. مقدار دقیق DMSO در یک واکنش به محتوای GC و کیفیت DMSO بستگی دارد. اما مصرف بیش از حد و همچنین مقدار کم آن، نتیجه‌ی مطلوب را به دنبال نخواهد داشت. مصرف بیش از حد آن DNA تک رشته‌ای را تثبیت کرده، دمای ذوب را کاهش داده و در نتیجه اتصال آغازگرهای بیشتری را در مکان‌های تصادفی در هدف تسهیل می‌کند و باندهای فرعی در ژل آگارز خواهیم دید. پس غلظت بالای آن، پایه‌های اشتباهی را اضافه می‌کند و باعث جهش‌زایی در ژن مورد نظر می‌شود (۱۲، ۲۱). از طرفی افزودن بتائین یا N-N-N-تری‌متیل گلايسين، از تشکیل ساختارهای ثانویه به ویژه در ناحیه‌ی غنی از GC بالا جلوگیری می‌کند و می‌توان با این کار از میزان مصرفی کاست. به طوری که در مطالعه حاضر با افزودن هم‌زمان بتائین و DMSO به میزان ۷/۵ درصد به محلول

References

1. Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019; 48(1): 23-35.
2. Global Cancer Observatory (gco). [Online]. [cited 2020]; Available from: URL: <https://gco.iarc.fr/>
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209-49.
4. Chrisoulidou A, Boudina M, Tzemailas A, Doumala E, Iliadou PK, Patakiouta F, et al. Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. *Thyroid Res* 2011; 4(1): 1-5.
5. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Schiavi F, Leskelä S, et al. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Gene*. 2009; 5(9): e1000637.
6. Wiese S, Emmerich D, Schröder B, Murphy DB,

- Grzeschik KH, Van Kessel AG, et al. The novel human UNF-3/fork head-like 5 gene: Chromosomal localization and expression pattern. *DNA Cell Biol* 1997; 16(2): 165-71.
7. Venza I, Visalli M, Teti D, Venza M. *FOXE1* (forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*; 2011. p. 182.
 8. Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* 2007; 27(20): 7302-14.
 9. Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Martinez AM, Gomez-Lopez G, Santisteban P. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One* 2013; 8(5): e62849.
 10. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, Sidhu S, et al. Association of *FOXE1* polyalanine repeat region with papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(9): E1814-9.
 11. Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem* 1990; 62(13): 1202-14.
 12. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 1994; 140(1): 1-5.
 13. McDowell DG, Burns NA, Parkes HC. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(14): 3340-7.
 14. Kool ET. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annu Rev Biophys* 2001; 30(1): 1-22.
 15. Sahdev S, Saini S, Tiwari P, Saxena S, Saini KS. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes* 2007; 21(4): 303-7.
 16. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics* 2003; 13(12): 759-66.
 17. Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Gruel Y. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol* 2005; 31: 81-4.
 18. Suguna S, Nandal DH, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014; 6(6): 198-9.
 19. Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48(12): 2013-8.
 20. Zhang Z, Yang X, Meng L, Liu F, Shen C, Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques* 2009; 47(3): 775-9.
 21. Zhou M, Hatahet Z. An improved ligase-free method for directional subcloning of PCR amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(6): 1089-90.
 22. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(14): 4008.
 23. Duckworth AW, Rule SAJ. The use of 'touchdown' polymerase chain reaction increases the sensitivity and specificity of t (11; 14)(q13; q32) detection in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 121(6): 952-3.

Qualitative and Quantitative Optimization of *FOXE1* Gene Polymerase Chain Reaction Product as a GC-Rich Gene

Zohreh Mohammadi Zaniani¹, Mehrdad Zeinalian², Mohammad Amin Tabatabaiefar³

Original Article

Abstract

Background: Approximately 3% of the human genome is rich in GCs. These regions are often found in the promoter of genes, especially housekeeping genes and tumor suppressor genes. Amplification of these GC-rich regions can be challenging. Because the stability of GC-rich DNA sequences is higher, secondary structures are easily formed in these regions. Type 4 non-medullary thyroid carcinoma has been linked to the *FOXE1* gene as a risk factor. *FOXE1* belongs to a large family of transcription factors principal for the development of the thyroid gland's morphology.

Methods: With a high proportion of GC, a portion of the *FOXE1* gene sequence cannot be amplified using the usual polymerase chain reaction. This work is an experimental study that deals with this issue.

Findings: The results of the present study showed that the Touchdown polymerase chain reaction, in combination with CO-amplification materials such as betaine and Dimethyl Sulfoxide (DMSO), is effective in amplifying the sequence of this region of the *FOXE1* gene by destruction of the secondary structures formed in the sequence and increasing the reaction product.

Conclusion: Using this method, GC-rich regions in additional genes with a similar degree of GC as the *FOXE1* gene can be amplified.

Keywords: GC-rich sequence; *FOXE1*; Betaine; DMSO; Touchdown PCR

Citation: Mohammadi Zaniani Z, Zeinalian M, Tabatabaiefar MA. **Qualitative and Quantitative Optimization of *FOXE1* Gene Polymerase Chain Reaction Product as a GC-Rich Gene.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(743): 1004-1010.

1- MSc, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Iranian Cancer Control and Prevention Center, Isfahan, Iran

3- PhD, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mehrdad Zeinalian, Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Iranian Cancer Control and Prevention Center, Isfahan, Iran; Email: m.zeinalian@med.mui.ac.ir