

طراحی و ساخت سازه ژنی برای تولید ماهی گورخری تراریخت Tg(*pdx1:GFP*) به عنوان مدلی برای مطالعات دارویی در دیابت

مهسا مویدی^۱، محمد رضایی^۲، عبدالحمید انگجی^۳، یاسر تهمتنی^۴*

DOI: 10.22124/japb.2024.28064.1549

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۳

چکیده

ژن *pdx1* که با نام فاکتور انسولین ۱ هم شناخته می‌شود کلید اصلی رشد و تکوین پانکراس و همچنین بلوغ سلول‌های بتا و بقای آنها است. با هدف قرار دادن این ژن، مدل‌های تراریخت مختلفی در سلول‌های بنیادی و همچنین مدل‌های جانوری تولید شده‌اند که در زمینه پژوهش‌های بیماری دیابت کاربرد دارند. در این پژوهش، هدف ساخت پلاسمید ژنی بر پایه *Tol2* با استفاده از روش کلون‌سازی مرسوم است که برای ایجاد مدل تراریخت ماهی گورخری Tg(*pdx1:GFP*) قابل استفاده است. برای نشاندار کردن این ژن نیاز است بخشی از توالی پروموتور آن در بالادست ژن گزارشگر قرار گیرد. از آنجایی که ناحیه تنظیمی ژن *pdx1* تعریف نشده است، دو جفت آغازگر را برای تقویت توالی ۵' طرفین ۲۵۰۰ و ۶۶۰۰ جفت باز در بالادست کدون شروع ATG در ژن *pdx1* ماهی گورخری طراحی شد که به انتهای ۵' و ۳' هر کدام از این آغازگرها توالی آنزیم‌های محدود کننده انتخاب شده‌ای (*Sph1* و *Sall*) قرار داده شد. بدین منظور بعد از طراحی آغازگرهای مناسب برای دو طول متفاوت از توالی پروموتور ژن *pdx1* بیان شونده در مسیر سلول‌های بتا، این قطعات تکثیر و با استفاده از روش کلون‌سازی مرسوم، بعد از هضم آنزیمی و با استفاده از واکنش اتصال، در پلاسمید *Tol2* حاوی ژن گزارشگر فلورسنت سبز وارد شدند. تایید صحت فرایند کلون‌سازی با استفاده از کلونی PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی انجام شد. نتایج نشان داد که فرایند کلون‌سازی مرسوم علاوه بر هزینه کم برای کلون کردن قطعات با اندازه‌های مختلف دارای کارایی مناسب است.

واژگان کلیدی: کلون‌سازی، هضم آنزیمی، *Tol2*، سلول‌های بتا، ماهی گورخری تراریخت.

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران.
- ۲- دکتری ژنتیک آبیان، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، سازمان جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
- ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران.
- ۴- دانشیار گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، سازمان جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: Angaji@khu.ac.ir، y.tahamtani@royan-rc.ac.ir

مقدمه

یک فرایند ضروری و پایه‌ای در پژوهش‌های زیستی کلون کردن قطعات DNA درون پلاسمیدها است. کلون‌سازی مولکولی گروهی از تکنیک‌های آزمایشگاهی هستند که برای تولید مجموعه‌ای از موجودات حاوی مولکول‌های DNA مشابه استفاده می‌شوند (Liu et al., 2017). این مولکول‌ها در محیط آزمایشگاهی ساخته می‌شوند و با انتقال به یک موجود میزبان می‌توانند همراه با رشد آن، تکثیر شوند. این امر معمولاً به وسیله سویه‌هایی از باکتری *Escherichia coli* آزمایشگاهی، غیربیماری‌زا و با رشد آسان به دست می‌آید. چون باکتری‌ها به سرعت تقسیم می‌شوند، بنابراین می‌توانند به عنوان کارخانه‌هایی برای کپی کردن قطعات DNA در مقادیر زیاد مورد استفاده قرار گیرند (Brown, 2020). این پلاسمیدهای نو ترکیب به دست آمده از کلون‌سازی می‌توانند برای تغییر DNA موجودات برای به دست آوردن ویژگی‌های مطلوب استفاده شوند. این فرایند مهندسی ژنتیک نامیده می‌شود. موجودی که DNA نو ترکیب را دریافت می‌کند موجود اصلاح شده ژنتیکی نامیده می‌شود و اگر DNA خارجی معرفی شده از گونه متفاوتی باشد، موجود میزبان تراریخت نامیده می‌شود.

باکتری‌ها، گیاهان و جانوران مختلفی برای اهداف علمی، پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد اصلاح ژنتیکی قرار گرفته‌اند (Nora et al., 2019) و ماهیان با توجه به مزایای فراوانی که دارند از جمله این جانداران هستند.

تولید ماهیان تراریخت در پژوهش‌ها بر پنج کاربرد کلی تمرکز دارد. این کاربردها شامل بهبود ویژگی‌های گونه‌های مهم تجاری، توسعه ماهیان به عنوان یک راکتور زیستی برای تولید پروتئین‌های مهم در زیست‌پزشکی، بهبود استفاده از ماهیان به عنوان شاخصی در ارزیابی آلودگی‌های محیط زیستی موجود در محیط‌های آبی، تولید مدل‌های جانوری غیراستاندارد برای پژوهش‌ها زیست‌پزشکی و همچنین مطالعات عملکرد ژنومی هستند (Devlin et al., 2001). از بین تمامی گونه‌های ماهیان، ماکا (*Oryzias latipes*) و ماهی گورخری (*Danio rerio*) پرکاربردترین گونه‌ها برای مطالعات زیست‌شناسی ترمیمی، زیست‌شناسی تکوینی و مدل‌سازی بیماری‌های انسانی هستند (Subramanian, 2021).

ماهی گورخری یک ماهی آب‌های آزاد گرمسیری است که به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) تعلق دارد و بومی هند و

بنگلادش است (Choi et al., 2021). پروژه توالی‌یابی ژنومی نشان داد که ژنوم ماهی گورخری حاوی تقریباً ۲۶۰۰۰ ژن است. به علاوه، ۷۰ درصد ژن‌های انسانی دست کم به یک ارتولوگ در ژنوم ماهی گورخری مرتبط هستند. این شباهت‌ها در توالی ژنومی به ماهی گورخری به عنوان یک موجود مدل مزیت خاصی نسبت به بی‌مهرگان می‌بخشد. همچنین شواهد جدید نشان می‌دهند که فرایند اندام‌زایی در ماهی گورخری به صورت قابل توجهی مشابه نمونه‌های انسانی است. این یافته‌ها ثابت می‌کنند که ماهی گورخری یک مدل مهره‌دار عالی و مناسب برای مطالعه کارکرد ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی انسان است (Devlin et al., 2001). با توجه به توانایی بالای ماهی گورخری در مطالعات تکوینی توصیف خوب و کاملی از تکوین پانکراس این موجود وجود دارد و همچنین با توجه به این که درک خوبی از مسیرهای پیام‌رسان درون سلولی و خارج سلولی پانکراس این موجود در دسترس است، آن را تبدیل به یک مدل جایگزین برای مطالعات دیابت و بویژه دیابت نوع یک و بررسی‌های دارویی برای کشف مولکول‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با درمان آن کرده است (Zang et al., 2018).

ژن *Pancreatic and Duodenal pdx1* (Homeobox 1) که با نام فاکتور انسولین ۱ هم شناخته می‌شود کلید اصلی رشد و تکوین پانکراس و همچنین بلوغ سلول‌های بتا و بقای آنها است. این توالی ژنی که در کروموزوم ۲۴ ماهی گورخری قرار دارد یک توالی کد کننده پروتئین است (Zang et al., 2018). در انسان عدم وجود این نشانگر موجب دیابت Maturity-onset Diabetes of) MODY4 (the Young Type 4 که دیابت تک ژنی زودرس در جوانان است، خواهد شد. این فاکتور در ماهی گورخری هم مثل موش در سلول‌های پیش‌ساز پانکراسی بیان می‌شود و بیان آنها تا بلوغ سلول‌های بتا ادامه خواهد داشت (Salehpour et al., 2021). در پژوهش‌ها بیان شده است که ماهی‌های گورخری دارای جهش *pdx1* اندازه بدن کوچک‌تری دارند و سلول‌های بتا و سطح انسولین آنها نیز بسیار پایین است (Kimmel et al., 2015). با توجه به مطالعات صورت گرفته، فاکتور *pdx1* اهمیت بالایی در سلول‌های پیش‌ساز پانکراسی و سلول‌های بتا نابالغ دارد، همچنین در مسیر نئوژنز ترمیم سلول‌های بتا نقشی کلیدی ایفا می‌کند (Kimmel et al., 2011). بنابراین مدل تراریخت این فاکتور می‌تواند مدلی مناسب برای

مهره‌داران به حساب می‌آید. *Tol2* همچنین دارای توالی DNA ای است که توسط ترانسپوزاز شناخته می‌شود. این توالی‌های کوتاه Cis برای انجام فرایند انتقال ضروری هستند. این توالی‌ها شامل ۲۰۰ و ۱۵۰ جفت‌باز توالی‌های تکراری معکوس انتهایی هستند و توالی DNA مورد نظر برای انتقال باید بین این دو قرار گیرد (Kawakami et al., 2004).

این پژوهش با هدف ساخت پلاسمیدها ژنی بر پایه پلاسمید *Tol2* با استفاده از روش کلون‌سازی مرسوم انجام شد که برای ایجاد مدل تراریخت ماهی گورخری *Tg(pdx1:GFP)* (Green Fluorescent Protein) قابل استفاده است.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش و تکثیر مولدین ماهی گورخری
مولدین ماهی گورخری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۵ و دوره روشنایی-تاریکی ۱۴:۱۰ در آب اسمز معکوس در رک‌های اختصاصی نگهداری شدند. روزانه ۲۰ درصد از محیط تعویض می‌شد. مولدین نر و ماده به صورت همزمان در مخزن‌های ۸ لیتری قرار داشتند. تمامی پروتکل‌های نگهداری و

استفاده در پژوهش‌ها مربوط به تیمارهای دارویی موثر در ترمیم سلول‌های بتا باشد (Chawla et al., 2020).

در حال حاضر برای انتقال ژن در ماهی گورخری از یک عنصر ژنتیکی با ماهیت ترانسپوزونی به نام *Tol2* که از ماهی مداکا به دست آمده است استفاده می‌شود. این ترانسپوزون در تمام سلول‌های مهره‌داران از جمله ماهی گورخری، پرندگان، موش و انسان فعال است (Pourghadamyari et al., 2019). توالی DNA ترانسپوزون یکی از فراوان‌ترین بخش‌ها در ژنوم تعداد زیادی از موجودات یوکاریوتی است. این عنصر به دو شکل خودبه‌خودی و غیر خودبه‌خودی موجود است. در شکل خودبه‌خودی، این ترانسپوزون کامل و عملکردی است و خود قادر به تشخیص، خارج کردن و درج مجدد قطعه DNA ای است که بین تکرارهای انتهایی معکوس قرار دارند (Kawakami et al., 2000). توالی DNA عامل *Tol2* مشابه ترانسپوزون خانواده hAT است، بررسی‌ها نشان داده که عامل *Tol2* حاوی یک توالی کامل از ترانسپوزون عملکردی است که در ماهی گورخری نیز فعال است (Scharf et al., 1986). بنابراین این عنصر در واقع اولین عنصر ترانسپوزونی عملکردی شناخته شده در

انجام آزمایش‌ها طبق استاندارد کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان بود.

ارزیابی بیوانفورماتیک پلاسمید

در این پژوهش با توجه به هدف که نشاندار کردن ژن *pdx1* است، پلاسمید *Tol2* که حاوی دو بازو (توالی‌های تکراری معکوس انتهایی) و همچنین ژن گزارشگر فلورسنت سبز است مورد استفاده قرار گرفت. برای نشاندار کردن نیاز است بخشی از توالی تنظیم کننده ژن مورد نظر در ناحیه بین دو بازو و در بالادست ژن گزارشگر قرار گیرد. بدین منظور توالی پلاسمید با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench3 (Qiagen، آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت تا در محل مناسب برای وارد کردن توالی تنظیمی، آنزیم‌های برشگری انتخاب شوند که تنها در همان محل برش ایجاد کنند و محل برش غیراختصاصی نداشته باشند و همچنین در داخل توالی تنظیمی انتخاب شده *pdx1* نیز برشی ایجاد نکنند.

طراحی آغازگرها

با توجه به مشخص نبودن توالی تنظیمی ژن *pdx1*، بررسی توالی ژنی آن و همچنین مطالعات منتشر شده در این زمینه مد نظر قرار

گرفت. از بخش Gene پایگاه داده NCBI برای دستیابی به توالی ژنومی ماهی گورخری استفاده شد و جستجو برای توالی ژنی *pdx1* ماهی گورخری منتج به کد ژنی zgc:100874 شد. توالی مربوط به بخشی از اگزون اول ژن *pdx1* و حدود ۷۰۰۰ جفت باز در بالادست کدون شروع انتخاب شد و با وارد کردن این توالی در نرم‌افزار Oligo Explorer (Gene Link، آمریکا) از آن برای طراحی آغازگرهای با کیفیت مناسب استفاده شد.

استخراج DNA و تکثیر قطعه ژنی

برای تکثیر قطعه مورد نظر نیاز به استفاده از DNA ژنومی لاین ماهی گورخری ثبت شده در پایگاه داده NCBI بود، بدین منظور از گونه وحشی توپینگن موجود در آزمایشگاه ماهی گورخری پژوهشگاه رویان استفاده شد. برای استخراج DNA با توجه به توانایی این ماهی در ترمیم باله، حدود ۲۵ میلی گرم از باله دمی ماهی بالغ طبق پروتکل استاندارد بریده و مورد استفاده قرار گرفت. از دو روش فنول-کلروفرم و همچنین کیت استخراج DNA (Qiagen، آلمان) استفاده شد و کیفیت و کمیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد.

واکنش لازم برای تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از کیت با صحت بالا (Invitrogen، آمریکا) صورت گرفت (جدول ۳). در این کیت از DNA پلیمرازی استفاده می‌شد که میزان خطا را به حداقل می‌رساند و دارای توانایی تصحیح بود، بنابراین دقت محصول به دست آمده بسیار بالا است.

به منظور حذف باندهای غیراختصاصی از روش Touchdown PCR استفاده شد که در این روش پنج درجه بالاتر از دمای اتصال آغازگر (۵۸ درجه سانتی‌گراد)، فرایند اتصال آغازگر و تکثیر قطعه مورد نظر آغاز شد و بعد از گذشتن پنج مرحله برنامه اصلی شروع شد (جدول ۴).

برای به دست آوردن دمای بهینه اتصال آغازگرها در واکنش PCR، از تکنیک گرادیان در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) استفاده شد. ابتدا با استفاده از گزینه Gradient دمای ستون‌های مختلف دستگاه مشخص شد، بدین منظور دمای 60 ± 5 درجه سانتی‌گراد به دستگاه داده شد و ستون‌های دارای دماهای ۵۶، ۵۸ و ۶۱ انتخاب شدند (جدول ۱). واکنش PCR با استفاده از مخلوط آماده تگ‌پلیمراز (Ampliqon، فرانسه) انجام گرفت (جدول ۲). محصولات به دست آمده از واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد جاری شد تا دمای بهینه که منجر به تولید محصول با غلظت بالا و بدون باند اضافی شد، مشخص شود. با به دست آمدن دمای بهینه،

جدول ۱: برنامه گرادیان واکنش PCR

مرحله	مدت زمان (دقیقه)	دما (سانتی‌گراد)	تعداد چرخه
واسرشتگی آغازین	۲	۹۴	۱
واسرشتگی	۰/۵	۹۴	۳۰
		۵۶	
اتصال	۰/۵	۵۸	۳۰
		۶۱	
طویل شدن	۱ دقیقه برای هر ۱۰۰۰bp	۷۲	۳۰
طویل شدن نهایی	۱۵	۷۲	۱
سرد شدن	-	۴	۱

جدول ۲: مخلوط واکنش PCR تگ پلیمراز

مقدار حجمی (میکرولیتر)	اجزای واکنش
۱۰	مخلوط آماده تگ پلیمراز
۲	DNA ژنومی
۱	آغازگرها (هر کدام به غلظت ۱۰μM)
تا حجم ۲۰	آب

جدول ۳: مخلوط واکنش PCR در کیت با صحت بالا

مقدار حجمی (میکرولیتر)	اجزای واکنش
۲/۵	بافر
۱	MgSO ₄
۲	مخلوط dNTP
۰/۵	آغازگرها (غلظت ۱۰μM)
۱	DNA
۰/۱	تگ پلیمراز
تا حجم ۲۵	آب

جدول ۴: مراحل واکنش Touchdown PCR

مرحله	مدت زمان (دقیقه)	دما (سانتی گراد)	تعداد چرخه
واسرشتگی آغازین	۲	۹۴	۱
واسرشتگی	۰/۵	۹۴	۵
اتصال	۰/۵	۵۹-۶۳	۵
طویل شدن	۱ دقیقه برای هر ۱۰۰۰bp	۶۸	۵
واسرشتگی	۰/۵	۹۴	۲۵
اتصال	۰/۵	۵۸	۲۵
طویل شدن	۱ دقیقه برای هر ۱۰۰۰bp	۶۸	۲۵
طویل شدن نهایی	۱۵	۶۸	۱
سرد شدن	-	۴	۱

هضم آنزیمی پلاسمید

برای وارد کردن قطعات تکثیر شده در پلاسمید لازم است هر دو توسط آنزیم‌های محدود کننده مناسب مورد برش قرار گیرند. بدین منظور پلاسمیدها و محصولات PCR حاوی توالی تنظیمی به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفتند (جدول ۵). در ادامه برای حذف بقایای واکنش هضم آنزیم، محصولات اصلی که شامل پلاسمیدهای خطی شده و قطعات تکثیر شده دارای انتهای چسبنده آنزیمی بودند بر روی ژل ۰/۶ درصد آگارز به مدت نیم ساعت ران شدند. برای تعیین محل دقیق قطعات، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و با قرار دادن ژل بر روی دستگاه ترانسلومینیتور باندها برش داده شدند. ژل‌های برش داده شده با استفاده از کیت استخراج از ژل، طبق راهنمای کیت، تخلیص و در آب تزریقی استریل حل شدند.

جدول ۵: مخلوط واکنش هضم آنزیمی

اجزای واکنش	مقدار حجمی (میکرولیتر)
بافر ۱۰x	۵
آنزیم	۱/۵
DNA	۵
آب	تا حجم ۵۰

برای خالص‌سازی محصول نهایی، از کیت تخلیص PCR (Qiagen، آلمان) استفاده شد و محصول به دست آمده در آب سترون حل شد تا برای انجام واکنش کلون‌سازی مناسب باشد. کیفیت و کمیت محصول نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلون‌سازی ژن *pdx1* به داخل پلاسمید *Tol2*

در این مطالعه از پلاسمید حاوی بازوهای *Tol2* استفاده شد و بعد از تعیین جایگاه وارد کردن پروموتور ژن *pdx1* و آنزیم‌های مورد استفاده در این زمینه، قطعه ژنی تکثیر شده باید در این بخش کلون شود.

کشت و استخراج پلاسمید پایه

باکتری *Escherichia coli* حاوی پلاسمید مورد نظر که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع همراه با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. در ادامه پلاسمید با استفاده از کیت استخراج از پلاسمید (Roche، سوئیس) با استفاده از راهنمای کیت استخراج شد.

واکنش اتصال پلاسمید هضم شده و قطعه ژنی تکثیر شده

برای انجام واکنش اتصال با توجه به غلظت قطعات ژنی و پلاسمیدهای خطی شده، نسبت‌های متفاوتی از آنها طبق راهنمای کیت اتصال (Thermo Fisher، آمریکا) همراه با بافر، آنزیم T4 و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر به تیوب ۰/۲ میلی‌لیتر اضافه شدند. این تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۶ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه این محصولات برای واکنش ترانسفورم مورد استفاده قرار گرفتند. انتخاب نسبت‌های قطعات ژنی به پلاسمید با توجه به غلظت آنها انجام گرفت که شامل نسبت‌های ۱ به ۸، ۱ به ۶ و ۱ به ۴ (پلاسمید خطی شده به قطعات ژنی) بودند.

ترانسفورم پلاسمید نو ترکیب داخل باکتری *E. coli* مستعد

برای انجام فرایند ترانسفورم از باکتری‌های *E. coli* مستعد شده که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند، استفاده شد. باکتری‌ها از فریزر خارج و بر روی یخ قرار داده شدند، سپس ۱۰ میکرولیتر از هر واکنش اتصال به یک تیوب حاوی ۲۰۰ میکرولیتر باکتری

مستعد اضافه شد و برای انجام ترانسفورم از شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در انتهای فرایند ترانسفورم به منظور تکثیر باکتری‌های حاوی پلاسمید، محیط LB مایع به ترکیب اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه محصولات نهایی بر روی پلیت LB جامد دارای آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین کشت داده شدند تا تنها کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید امکان رشد داشته باشند. برای حفظ مقاوت آنتی‌بیوتیکی محیط ضروری است که مدت کشت بیشتر از ۱۶ ساعت نباشد. بعد از این زمان کلونی‌ها رشد کردند و از بین آنها کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب مورد نظر غربالگری و انتخاب شدند که بدین منظور از تکنیک کلونی PCR استفاده شد.

کلونی PCR پلاسمیدهای نو ترکیب

با استفاده از تکنیک کلونی PCR، کلونی‌های به دست آمده مورد غربالگری قرار گرفتند. بدین منظور، ابتدا پلیت LB جامد دارای آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین جدول‌بندی و شماره‌گذاری شد. پس از آن، کلونی‌های به دست آمده از فرایند ترانسفورم با استفاده از خلال دندان یا سرسمپلر برداشته شد و ابتدا در

پلیت LB و خانه شماره گذاری شده تماس داده شدند و سپس در تیوب PCR ۲۰۰ میکرولیتری دارای شماره مشابه وارد شدند. بدین ترتیب حدود ۶۰ عدد کلونی از پلیت‌های مختلف انتخاب شدند و پلیت حاوی این کلونی‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تیوب‌های حاوی پلاسمید برای واکنش PCR آماده شدند، در این واکنش یک آغازگر از قطعه ژنی کلون شده در پلاسمید و یک آغازگر از خود پلاسمید پایه انتخاب شد. واکنش PCR طبق جدول ۲ با استفاده از مخلوط آماده تگ‌پلیمرز انجام گرفت، محصول واکنش PCR داخل چاهک‌های ژل ۰/۸ درصد آگارز وارد شد و تعدادی از نمونه‌ها که باند مورد نظر را نشان دادند، انتخاب شدند. طبق شماره نمونه، این کلونی‌ها از پلیت شماره گذاری شده انتخاب و در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند تا برای مرحله تایید با هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گیرند.

تایید تولید پلاسمید نو ترکیب با هضم آنزیمی و توالی‌یابی

برای تایید صحت پلاسمید نو ترکیب از هضم آنزیمی نیز استفاده شد. بدین منظور، پلاسمید کلونی‌های که در مرحله کلونی PCR

انتخاب شده بودند، استخراج شد و با استفاده از نرم‌افزار CLC نقشه پلاسمید نو ترکیب ارزیابی و آنزیم‌های مناسب برای واکنش انتخاب شدند. آنزیم‌هایی انتخاب شدند که هم قطعه وارد شده و هم پلاسمید پایه را برش دهند و محصولی ایجاد کنند که به راحتی قابل مشاهده باشد و همچنین نسبت به گروه شاهد (پلاسمید غیرنو ترکیب) اندازه متفاوتی داشته باشد. واکنش هضم آنزیمی طبق جدول ۴ با آنزیم‌های انتخابی صورت پذیرفت و به عنوان گروه شاهد نیز از پلاسمید اولیه *Tol2* فاقد قطعه وارد شده استفاده شد. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز جاری و پلاسمید نمونه‌هایی که باند مورد نظر را نشان داده بودند، استخراج و برای انجام توالی‌یابی سنگر برای تایید نهایی ارسال شدند.

نتایج

نمونه‌های DNA استخراج شده و ارزیابی پلاسمید برای انتخاب آنزیم‌های هضم کننده

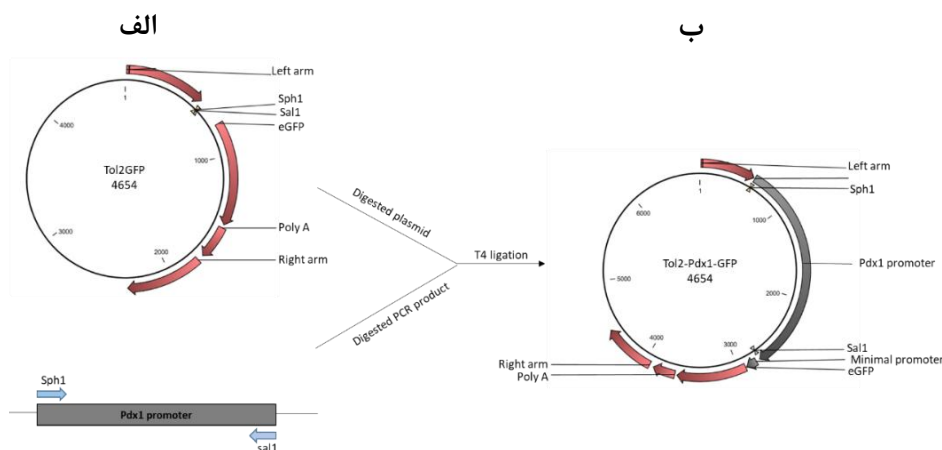
ارزیابی پلاسمید *Tol2* (شکل ۱) نشان داد که آنزیم‌های برشگر *SphI* و *SalI* در بالادست ژن گزارشگر و قبل از بازوی چپ با فاصله ۶ نوکلئوتید از یکدیگر به صورت تک برش قرار داشتند و برش‌های غیراختصاصی نیز ایجاد نکردند، بنابراین این آنزیم‌ها معیارهای لازم برای

با طول حدود ۲۵۰۰ و ۶۶۰۰ جفت باز از ناحیه تنظیمی ژن *pdx1* مد نظر قرار گرفت. همچنین بررسی نواحی برشی آنزیم‌های منتخب نشان داد که آنزیم *SphI* در ۳۵۰۰ جفت باز بالادست اگزون اول ژن *pdx1* برش ایجاد می‌کند، بنابراین در طراحی آغازگرها برای تکثیر قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی از هر دو آنزیم *SalI* و *SphI* ولی در آغازگرهای قطعه ۶۶۰۰ جفت بازی تنها آنزیم *SalI* استفاده شد (جدول ۶).

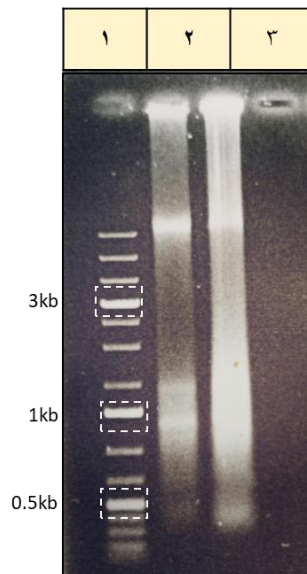
استفاده برای کلون کردن قطعه ژنی را دارا بودند.

محصول به دست آمده از استخراج DNA ژنومی با هر دو تکنیک فنول-کلروفرم و کیت استخراج DNA در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود نمونه استخراج شده با استفاده از کیت شکستگی کمتری را نشان می‌دهد و از کیفیت مناسب‌تری برخوردار است.

با بررسی توالی ژنی و همچنین مطالعات منتشر شده در این زمینه، تکثیر دو قطعه ژنی



شکل ۱: نقشه پلاسمیدهای مورد استفاده. الف) پلاسمید انتخابی *Tol2GFP*. ب) پلاسمید نو ترکیب نهایی بعد از واکنش اتصال



شکل ۲: استخراج ژنوم ماهی. ستون ۱ حاوی Ladder 1kb+ است، ستون ۲، DNA استخراجی توسط کیت و ستون ۳، DNA استخراجی توسط روش فنل-کلروفرم را نشان می‌دهد. همان طور که مشخص است DNA کیت دارای شکستگی و آلودگی کمتری است.

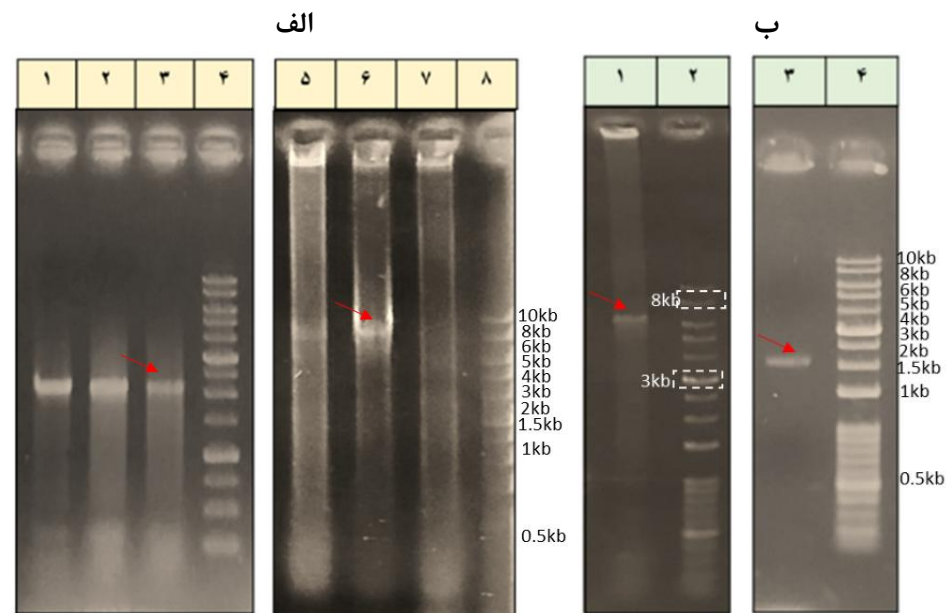
جدول ۶: توالی آغازگرهای طراحی شده

آغازگر پیشرو	آغازگر معکوس	طول محصول (جفت باز)
5'CACT GTCGACGTAACCTTTGGTTTTCGGATG 3'	5'CACT GTCGACTAGTCTTCGTTGGGGTGTCT 3'	۶۶۰۰
5'CAGT GCATGCGTTACGAGGCTTGATTTGCG 3'	5'GTCA GTCGACTACAGGTGGTTAGGCGGATA 3'	۲۵۰۰

توالی آنزیم‌ها به صورت زیرخط‌دار (Underline) و نوکلئوتیدهای اضافی به صورت پررنگ (Bold) مشخص شده‌اند.

تکثیر قطعات ژنی و استخراج پلاسمید
 نتایج تکثیر قطعات ژنی با استفاده از
 تکنیک‌های گرادیان و Touchdown در شکل
 ۳ نشان داده شده است. در تکثیر قطعه ۲۵۰۰
 جفت بازی، DNA استخراج شده با هر دو
 تکنیک منجر به تولید محصول شد. ولی کیفیت
 و کمیت محصول در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد
 در نمونه استخراج شده با کیت بهتر بود و باند

غیراختصاصی کمتری داشت (شکل ۳- الف)، بنابراین دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای تکثیر این محصول با استفاده از Touchdown مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳- ب). نتایج به دست آمده از تکثیر قطعه ۶۶۰۰ جفت بازی نیز مشابه بود و در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد از DNA به دست آمده از کیت، کیفیت باند مشاهده شده



شکل ۳: نتایج واکنش PCR. الف) ستون‌های ۱-۳ نتایج تکثیر قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی و ستون‌های ۴-۵ تکثیر قطعه ۶۶۰۰ جفت بازی را به ترتیب در دماهای ۵۶، ۵۸ و ۶۱ درجه سانتی گراد نشان می‌دهند. ستون‌های ۴ و ۸ حاوی Ladder 1kb+ هستند. ب) ستون‌های ۱ و ۳ به ترتیب نتایج تکثیر قطعات ۶۶۰۰ و ۲۵۰۰ جفت بازی را با استفاده از تکنیک Touchdown نشان می‌دهند. ستون‌های ۲ و ۴ حاوی Ladder 1kb+ هستند.

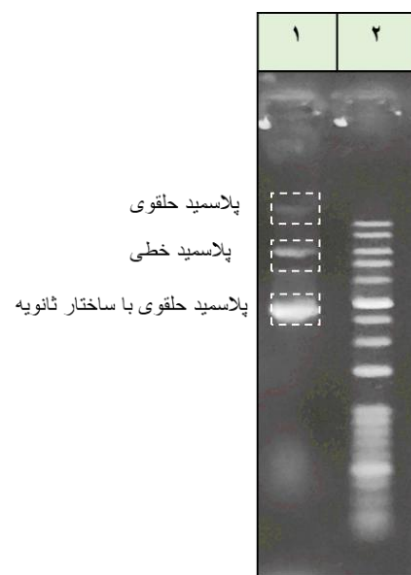
واکنش اتصال پلاسمیدها و قطعات تخلیص شده مورد نظر و ارزیابی‌های تاییدی آن

غلظت پلاسمیدها و قطعات تخلیص شده برای قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی به ترتیب ۱۴۰ و ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر و برای محصول ۶۶۰۰ جفت بازی ۱۴۰ و ۵۳ نانوگرم در میکرولیتر توسط اسپکتروفومتر خوانده شد. با توجه به این غلظت‌ها، ۳ نسبت از پلاسمید خطی شده به قطعات ژنی برای واکنش اتصال تعیین شد که از میان آنها از نسبت ۱ به ۸ بیشترین تعداد کلونی به دست آمد.

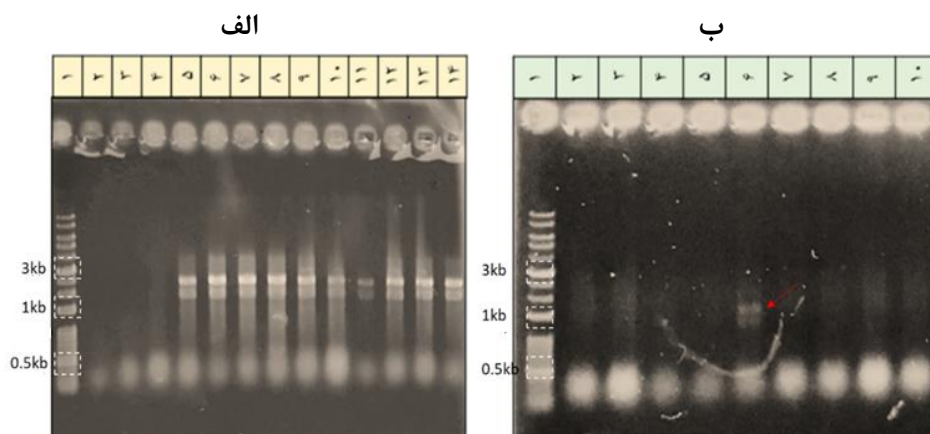
ارزیابی تاییدی واکنش اتصال توسط کلونی PCR

در غربالگری اولیه برای تایید ورود قطعات ژنی به پلاسمید از آغازگر SP6 که در بدنه وکتور قرار داشت و همچنین یک آغازگر طراحی شده که در داخل خود قطعات بود استفاده شد. با توجه به محل قرارگیری آغازگرهای طراحی شده، در کلونی PCR مربوط به قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی محصولی با وزن ۱۹۹۰ جفت باز به دست آمد که ۶۶ درصد از کلونی‌های غربال شده مثبت بودند (شکل ۵- الف) و در قطعه دوم محصول نهایی طول ۱۶۱۹ جفت باز داشت که تنها ۳ درصد از این کلونی‌ها مثبت بودند (شکل ۵- ب).

محصول استخراج پلاسمید از باکتری‌های کشت داده شده در شکل ۴ نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود محصول حاوی سه باند است که به ترتیب از بالا به پایین نشان دهنده باندهای پلاسمید حلقوی، پلاسمید خطی و پلاسمید ابریچ است. غلظت کمتر باند خطی نشان می‌دهد که پلاسمید در هنگام استخراج آسیب ندیده و دارای کیفیت مناسب است.



شکل ۴: محصول استخراج پلاسمید. ستون ۱ حاوی محصول استخراج پلاسمید پایه *Tol2* است که دارای سه باند حلقوی، خطی و ابریچ است. در ستون ۲، Ladder 1kb+ مشاهده می‌شود.



شکل ۵: نتایج واکنش کلونی PCR. الف) محصولات واکنش کلونی PCR برای قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی. ستون ۱ حاوی Ladder 1kb+، ستون ۲ حاوی محصول واکنش در پلاسمید پایه *Tol2* و ستون‌های ۳-۱۴ حاوی محصول واکنش در کلونی‌های به دست آمده از واکنش اتصال است. ب) محصولات واکنش کلونی PCR برای قطعه ۶۶۰۰ جفت بازی. ستون ۱ حاوی Ladder 1kb+، ستون ۲ حاوی محصول واکنش در پلاسمید پایه *Tol2* و ستون‌های ۳-۱۰ حاوی محصول واکنش در کلونی‌های به دست آمده از واکنش اتصال است. در پلاسمید پایه و کلونی‌های فاقد پلاسمید نو ترکیب به دلیل نبود آغازگر معکوس محصولی تشکیل نشد.

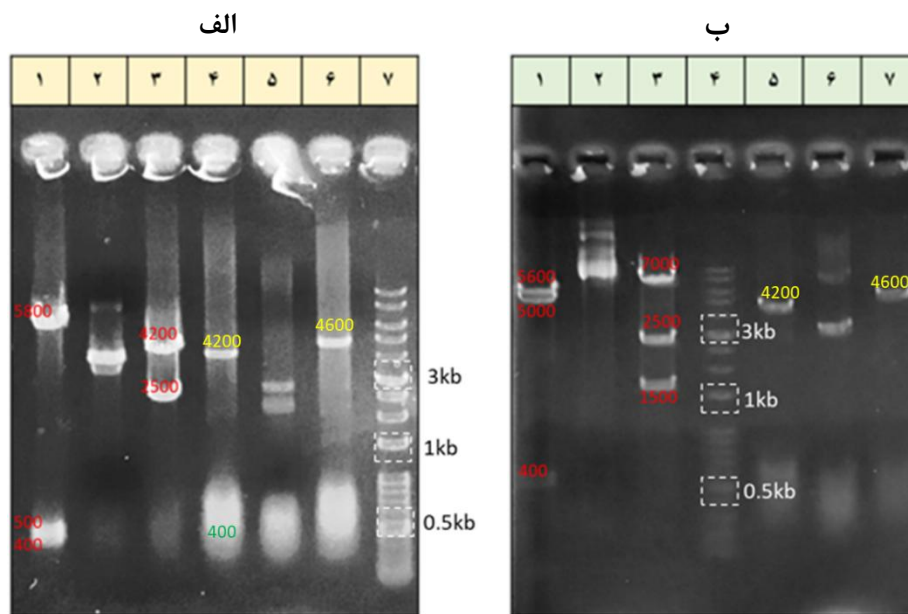
قطعات ۶۶۰۰ و ۲۵۰۰ جفت بازی از نرم‌افزار CLC انتخاب شدند. آنزیم‌های انتخاب شده و محصولات به دست آمده از هضم آنزیمی برای هر دو کلون‌سازی و همچنین گروه شاهد در جدول ۷ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که در پلاسمیدهای انتخاب شده برای هر دو گروه، قطعات به درستی کلون شدند (شکل ۶).

ارزیابی تاییدی انجام فرایند اتصال پلاسمید و قطعه ژنی مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های انتخابی

کلونی‌های تایید شده توسط کلونی PCR نیازمند یک تایید ثانویه با استفاده از هضم آنزیمی هستند. برای این منظور دو برنامه هضم آنزیمی مختلف برای هر کلون‌سازی در نظر گرفته شد که این آنزیم‌ها برای تایید وارد شدن

جدول ۷: نتایج تایید با هضم آنزیمی

گروه	آنزیم‌ها	پلاسمید نو ترکیب (جفت باز)	پلاسمید شاهد (جفت باز)
۲۵۰۰ جفت بازی	<i>BsrGI</i>	۲۵۰۰ و ۴۴۰۰	۴۶۰۰
	<i>XhoI</i>	۵۸۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰	۴۲۰۰ و ۴۰۰
	<i>NdeI</i>	۷۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۵۰۰	۴۶۰۰
۶۶۰۰ جفت بازی	<i>XhoI</i>	۵۶۰۰، ۵۰۰۰ و ۴۰۰	۴۱۰۰ و ۵۰۰



شکل ۶: نتایج هضم آنزیمی. الف) محصولات هضم آنزیمی در قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی. ستون ۱ هضم پلاسمید نو ترکیب با آنزیم *XhoI*، ستون ۲ پلاسمید نو ترکیب هضم نشده، ستون ۳ هضم پلاسمید نو ترکیب با آنزیم *BsrGI*، ستون ۴ هضم پلاسمید پایه با آنزیم *XhoI*، ستون ۵ پلاسمید پایه هضم نشده، ستون ۶ هضم پلاسمید پایه با آنزیم *BsrGI* و ستون ۷ حاوی Ladder 1kb+. ب) محصولات هضم آنزیمی مربوط به قطعه ۶۶۰۰ جفت بازی. ستون ۱ هضم پلاسمید نو ترکیب با آنزیم *XhoI*، ستون ۲ پلاسمید نو ترکیب هضم نشده، ستون ۳ هضم پلاسمید نو ترکیب با آنزیم *NdeI*، ستون ۴ حاوی Ladder 1kb+، ستون ۵ هضم پلاسمید پایه با آنزیم *XhoI*، ستون ۶ پلاسمید پایه هضم نشده و ستون ۷ هضم پلاسمید پایه با آنزیم *NdeI*.

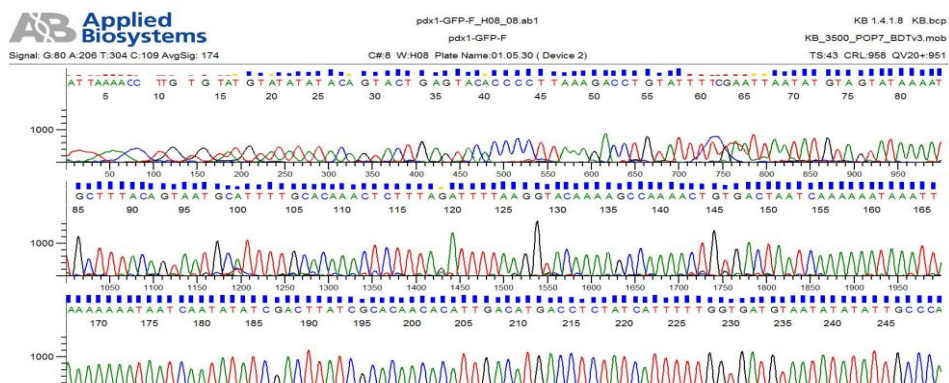
ارزیابی تاییدی توالی یابی وارد کردن ژن مورد نظر داخل پلاسمید با استفاده از روش سنگر نتایج به دست آمده از توالی یابی نشان داد که قطعات کلون شده فاقد جهش بودند (شکل ۷) و در مکان درست کلون شدند. بنابراین امکان استفاده از این پلاسمیدها در تولید مدل تراریخت وجود دارد.

بحث

ماهی گورخری یک مدل جانوری است که با توجه به مزایای فراوانی که دارد و با استفاده از تکنیک های مختلف مولکولی می توان از این ماهی به عنوان مدلی ایده آل برای پژوهش های تکوین و همچنین مطالعه در زمینه بیماری های

مختلف انسانی استفاده کرد (Choi et al., 2021). مدل های دیابت ماهی گورخری از جمله مدل های جانوری پر کاربرد در مطالعات دارویی است (Zang et al., 2018) و در مرکز تحقیقات سلامت متابولیک پژوهشگاه رویان نیز هدف بر توسعه مدل های تراریخت در این زمینه است (Pourghadamyari et al., 2019; Salehpour et al., 2021).

در حال حاضر یکی از پرکاربردترین تکنیک های مورد استفاده در آزمایشگاه های معتبر جهانی در زمینه تولید مدل های تراریخت ماهی گورخری استفاده از Tol2 Transposase است (Kawakami et al., 2000, 2004) که استفاده از این تکنیک نیازمند طراحی پلاسمید



شکل ۷: نتایج توالی یابی. تایید وارد شدن بدون جهش توالی پروموتور ژن *pdx1* داخل پلاسمید با استفاده

از توالی یابی PCs Sanger

دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ در زمینه تکنیک‌های مختلف استخراج DNA انجام شد، نیز نتایج مشابه‌ای دیده شد و از روش فنول-کلروفرم نسبت به کیت‌های تجاری محصولی با خلوص پایین‌تر به دست آمد که دلیل آن را باقی ماندن مقداری فنول در نمونه DNA ذکر کردند (Djurkin Kusec et al., 2015). با این وجود در مطالعه حاضر، DNA به دست آمده از هر دو تکنیک در تکثیر قطعات ژنی با استفاده از مخلوط آماده تگ‌پلیمرز و آنزیم با صحت بالا موفق بودند.

در تکنیک مرسوم کلون‌سازی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت، نیاز به هضم آنزیمی قطعات است که با ایجاد انتهای چسبنده امکان اتصال این قطعات فراهم شد (Green and Sambrook, 2020). در صورت وجود دو آنزیم، اتصال قطعه ژنی با کارایی بالاتری انجام می‌شود، زیرا در صورت استفاده از یک آنزیم امکان اتصال قطعه به صورت برعکس و همچنین احتمال این که انتهاهای خود پلاسمید به هم دگر متصل شوند نیز وجود دارد (Kaufman and Evans, 1990). همان طور که در نتایج دیده شد، در واکنش اتصال قطعه ژنی ۶۶۰۰ جفت بازی که تنها یک آنزیم استفاده شد، میزان کارایی کمتر از قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی بود.

با توجه به مدل هدف است و این پژوهش به طراحی پلاسمیدهای ژنی به منظور تولید مدل تراریخت *Tg(pdxI:GFP)* پرداخته شده است. اولین مرحله در فرایند طراحی این پلاسمیدهای ژنی، استخراج DNA به منظور تکثیر بخشی از توالی تنظیمی ژن *pdxI* است. روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از بافت‌های جانوری وجود دارد، از جمله روش فنول-کلروفرم که به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تکنیک بر پایه اضافه کردن حجم برابری از فنول-کلروفرم به محلول آبی سلول‌های لیز شده، ترکیب کردن فازها و جداسازی آنها از طریق سانتریفیوژ است و در آخر DNA استخراج شده با الکل رسوب داده می‌شود (Ausubel, 1992). اگرچه مراحل آن نسبتاً زیاد است، ولی به دلیل هزینه کمتر به ازای هر نمونه استفاده فراوانی دارد. به علاوه، در سال‌های اخیر تعداد زیادی کیت برای استخراج DNA از منابع مختلف به شکل تجاری در دسترس قرار گرفته است. در این پژوهش همزمان از تکنیک فنول-کلروفرم و کیت برای استخراج DNA از باله ماهی گورخری استفاده شد و نتایج نشان داد با وجود این که در روش فنول-کلروفرم مقدار محصول بیشتر است، ولی کیفیت پایین‌تری نسبت به استخراج با کیت

(Scharf et al., 1986). در این پژوهش نیز درج دقیق قطعه ژنی و عدم وجود جهش در کلونی‌ها با استفاده از این تکنیک مورد تایید قرار گرفت.

با توجه به اهمیت ژن *PDXI* در تکوین پانکراس و تمایز سلول‌های بتا ترشح کننده انسولین، مدل‌های تراریخت مختلفی برای پژوهش در زمینه بیماری دیابت با هدف قرار دادن این ژن تولید شده‌اند، از جمله تولید لاین سلول‌های بنیادی القا شده (Induced Pluripotent Stem Cells: iPSCs) با استفاده از تکنیک کریسپر و همچنین موش تراریخت *Pdx1:EGFP* (Lee et al., 2019) که این مدل‌ها برای بررسی فرایند تمایز و تولید سلول‌های بتای پانکراس مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به مزیت‌های ماهی گورخری در زمینه غربالگری دارویی، مدل تراریخت مشابه‌ای نیز در این ماهی تولید شده است که تاکنون در مطالعات مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است، از جمله غربالگری ۸۰۰۰ ریزمولکول برای یافتن ترکیبی که قادر به القای بیان ژن *pdx1* در این مدل تراریخت شود (Helker et al., 2019). همچنین در بررسی فرایند تکوین و تمایز سلول‌های مختلف

همچنین در نسبت‌های مختلف مورد استفاده در واکنش اتصال، بالاترین کارایی در گروهی دیده شد که غلظت قطعه ژنی بیشتر بود که دلیل این موضوع می‌تواند کاهش احتمال به هم چسبیدن انتهای خود پلاسمید باشد.

بعد از ساخت پلاسمید نو ترکیب نیاز به تایید آن است، زیرا در فرایند کلون‌سازی امکان وقوع خطاهای مختلف وجود دارد، برای این منظور از تکنیک‌های مختلفی استفاده می‌شود (Mohseni et al., 2012). در این پژوهش از سه تکنیک که کارآمدترین روش‌ها هستند استفاده شد. یکی از سریع‌ترین روش‌ها کلونی PCR است که می‌تواند از غربالگری اولیه برای تایید وجود قطعه ژنی درج شده استفاده شود (Wu, 2012). با توجه به این که در این پژوهش برخی واکنش‌های هضم آنزیمی تنها با یک آنزیم انجام شده بود، بنابراین نیاز بود که جهت قطعه وارد شده نیز بررسی شود. بدین منظور، از آغازگرهایی استفاده شد که هم در قطعه ژنی و هم در بدنه وکتور قرار داشتند. استفاده از هضم آنزیمی نیز علاوه بر این که می‌تواند درج قطعه ژنی را با دقت بالا تایید کند، جهت ورود قطعه را نیز با ایجاد باندهایی با اندازه‌های متفاوت نشان می‌دهد. دقیق‌ترین روش برای تایید کلونی نو ترکیب استفاده از تکنیک توالی‌یابی است

استفاده از دو آنزیم با انتهای چسبنده کارایی فرایند کلون‌سازی را افزایش می‌دهد. همچنین با توجه به توانایی ماهی گورخری در ترمیم سلول‌های بتا، پلاسمید طراحی شده برای تولید مدل تراریختی مورد استفاده قرار می‌گیرد که می‌تواند در یافتن مسیرهای پیام‌رسان درگیر در ترمیم سلول‌های بتا در ماهی گورخری به پژوهشگران کمک کند. نتایج این گونه مطالعات می‌تواند منجر به کشف دارو برای فعال‌سازی مسیر مشابه در انسان شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی پژوهشگاه رویان انجام شده است و بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسوولین این مرکز ابراز می‌دارند.

پانکراس (Huang et al., 2001; Lavergne et al., 2020; Mi et al., 2023) و بررسی مسیرهای مختلف ترمیم سلول‌های بتای پانکراسی (Liu et al., 2021; Mi et al., 2023) تا از نتایج آن برای درمان بیماران دیابتی استفاده شود. این مطالعات اهمیت مدل تراریخت ژن *pdx1* را نشان می‌دهند و هدف از طراحی این پلاسمید نیز استفاده از آن برای تولید مدل *pdx1:GFP* در ماهی گورخری برای استفاده در مطالعات تکوین پانکراس و همچنین غربالگری دارویی است.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که روش مرسوم کلون‌سازی علاوه بر هزینه پایین دارای کارایی بالایی نیز است و در این پژوهش کلون قطعات با طول‌های مختلف با موفقیت انجام گرفت. همچنین نتایج نشان داد که

منابع

- Ausubel F.M. 1992.** Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, USA. 804P. doi: 10.1002/abio.370130118
- Brown T.A. 2020.** Gene cloning and DNA analysis: An introduction. John Wiley and Sons, UK. 432P.
- Chawla P., Silva L.F.D. and Ninov N. 2020.** Insights on β -cell regeneration from the zebrafish shoal: From generation of cells to functional integration. *Current Opinion in Physiology*, 14: 27–34. doi: 10.1016/j.cophys.2019.11.009
- Choi T.Y., Choi T.I., Lee Y.R., Choe S.K. and Kim C.H. 2021.** Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(3): 310–317. doi: 10.1038/s12276-021-00571-5
- Devlin R.H., Biagi C.A., Yesaki T.Y., Smailus D.E. and Byatt J.C. 2001.** Growth of domesticated transgenic fish. *Nature*, 409(6822): 781–782. doi: 10.1038/35057314
- Djurkin Kusec I., Radisic Z., Komlenic M. and Kusec G. 2015.** Comparison of commercial DNA kits and traditional DNA extraction procedure in PCR detection of pork in dry/fermented sausages. *Poljoprivreda*, 21(1): 199–202. doi: 10.18047/poljo.21.1.sup.47
- Green M.R. and Sambrook J. 2020.** Cloning in plasmid vectors: Directional cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(11): 485–488. doi: 10.1101/pdb.prot101238
- Helker C.S.M., Mullapudi S.T., Mueller L.M., Preussner J., Tunaru S., Skog O., Kwon H.B., Kreuder F., Lancman J.J., Bonnavion R., Dong P.D.S., Looso M., Offermanns S., Korsgren O., Spagnoli F.M. and Stainier D.Y.R. 2019.** A whole organism small molecule screen identifies novel regulators of pancreatic endocrine development. *Development*, 146(14): 1–12 (dev172569). doi: 10.1242/dev.172569
- Huang H., Vogel S. S., Liu N., Melton D. A. and Lin S. 2001.** Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177(1-2): 117–124. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00408-7
- Karami F., Asgari Abibeiglou B., Pahlavanneshan S., Farrokhi A., Tamadon A., Basiri M., Khalooghi K., Fallahi M. and Tahamtani Y. 2022.** Enhanced characterization of beta cell mass in a Tg (Pdx1-GFP) mouse model. *BioImpacts*: 12(5): 463–470. doi: 10.34172/bi.2022.23840

- Kaufman D. and Evans G. 1990.** Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques*, 9(3): 304–306.
- Kawakami K., Shima A. and Kawakami N. 2000.** Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21): 11403–11408. doi: 10.1073/pnas.97.21.11403
- Kawakami K., Takeda H., Kawakami N., Kobayashi M., Matsuda N. and Mishina M. 2004.** A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell*, 7(1): 133–144. doi: 10.1016/j.devcel.2004.06.005
- Kimmel R.A., Dobler S., Schmitner N., Walsen T., Freudenblum J., and Meyer D. 2015.** Diabetic *pdx1*-mutant zebrafish show conserved responses to nutrient overload and anti-glycemic treatment. *Scientific Reports*, 5(1): 1–14 (14241). doi: 10.1038/srep14241
- Kimmel R.A., Onder L., Wilfinger A., Ellertsdottir E. and Meyer D. 2011.** Requirement for *Pdx1* in specification of latent endocrine progenitors in zebrafish. *BMC Biology*, 9(1): 1–15. doi: 10.1186/1741-7007-9-75
- Lavergne A., Tarifeno-Saldivia E.J., Pirson J., Reuter A.S., Flasse L., Manfroid I., Voz M.L. and Peers B. 2020.** Pancreatic and intestinal endocrine cells in zebrafish share common transcriptomic signatures and regulatory programmes. *BMC Biology*, 18: 1–19. doi: 10.1186/s12915-020-00840-1
- Lee Y., Choi H.Y., Kwon A., Park H., Park M.H., Kim J.W., Kim M.J., Kim Y.O., Kwak S. and Koo S.K. 2019.** Generation of a PDX1-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCBi005-A-3, using the CRISPR/Cas9 system. *Stem Cell Research*, 41: 1–4 (101632). doi: 10.1016/j.scr.2019.101632
- Liu C.J., Jiang H., Wu L., Zhu L.Y., Meng E. and Zhang D.Y. 2017.** OEPR cloning: An efficient and seamless cloning strategy for large- and multi-fragments. *Scientific Reports*, 7(1): 1–7. doi: 10.1038/srep44648
- Liu K.C., Villasenor A., Bertuzzi M., Schmitner N., Radros N., Rautio L., Mattonet K., Matsuoka R.L., Reischauer S., Stainier D.Y. and Andersso O. 2021.** Insulin-producing β -cells regenerate ectopically from a mesodermal origin under the perturbation of hemato-endothelial specification. *eLife*, 10: 1–23 (65758). doi: 10.7554/eLife.65758
- Mi J., Liu K.C. and Andersson O. 2023.** Decoding pancreatic

- endocrine cell differentiation and β cell regeneration in zebrafish. *Science Advances*, 9(33): 1–23 (eadf5142). doi: 10.1126/sciadv.adf5142
- Mohseni A., Majidzadeh K. and Soleimani M. 2012.** A new screening method for selection of desired recombinant plasmids in molecular cloning. *African Journal of Biotechnology*, 11(64): 12777–12780. doi: 10.5897/AJB11.3185
- Nora L.C., Westmann C.A., Martins-Santana L., Alves L.D.F., Monteiro L.M.O., Guazzaroni M.E. and Silva-Rocha R. 2019.** The art of vector engineering: Towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1): 125–147. doi: 10.1111/1751-7915.13318
- Pourghadamyari H., Rezaei M., Basiri M., Tahamtani Y., Asgari B., Hassani S.N., Meshkani R., Golmohammadi T. and Baharvand H. 2019.** Generation of a transgenic zebrafish model for pancreatic beta cell regeneration. *Galen Medical Journal*, 8: 1–8 (e1056). doi: 10.31661/gmj.v8i0.1056
- Salehpour A., Rezaei M., Khoradmehr A., Tahamtani Y. and Tamadon A. 2021.** Which hyperglycemic model of zebrafish (*Danio rerio*) suites my type 2 diabetes mellitus research? A scoring system for available methods. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 1–15 (652061). doi: 10.3389/fcell.2021.652061
- Scharf S.J., Horn G.T., and Erlich H.A. 1986.** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233(4768): 1076–1078. doi: 10.1126/science.3461561
- Subramanian S. 2021.** Zebrafish as a model organism- Can a fish mimic human? *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 34(5): 559–575. doi: 10.1515/jbcpp-2021-0113
- Wu R. 2012.** Recombinant DNA Methodology II. Academic Press, USA. 904P. doi: 10.1016/C2009-0-02410-6
- Zang L., Maddison L.A. and Chen W. 2018.** Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6: 1–31 (91). doi: 10.3389/fcell.2018.00091



Research Paper

Designing and constructing genetic constructs for the production of Tg(*pdx1:GFP*) transgenic zebrafish as a model for drug screening in diabetes

Mahsa Moayedi¹, Mohammad Rezaei², Abdolhamid Angaji^{3*}, Yaser Tahamtani^{4*}

DOI: 10.22124/japb.2024.28064.1549

Received: August 2024

Accepted: December 2024

Abstract

The *pdx1* gene, which is also known as insulin factor 1, is the main key to the growth and development of the pancreas, as well as the maturation of beta cells and their survival. By targeting this gene, various transgenic models have been produced in stem cells as well as animal models that are used in the field of diabetes research. In this research, the aim is to make gene plasmids based on *Tol2* using conventional cloning method, which can be used to create Tg(*pdx1:GFP*) zebrafish transgenic model. In order to label this gene, a part of its promoter sequence needs to be placed upstream of the reporter gene. Since the regulatory region of the *pdx1* gene has not been defined, two pairs of primers were designed to amplify the 5' sequence of 2500 and 6600 base pairs upstream of the ATG start codon in the zebrafish *pdx1* gene, and to the 5' and 3' ends of each of these primers, the sequence of restriction enzymes (*Sall*, *Sph1*) was placed. For this purpose, after designing suitable primers for two different lengths of the promoter sequence of the *pdx1* gene expressed in beta cells, these fragments were amplified and inserted in the *Tol2* plasmid containing the green fluorescent reporter gene using the conventional cloning method including enzymatic digestion and the ligation reaction. Confirmation of the correctness of the cloning process was done using colony PCR, enzymatic digestion and sequencing. The results showed that the conventional cloning process, in addition to the low cost, has good efficiency for cloning of fragments, with different sizes.

Key words: *Cloning, Enzymatic Digestion, Tol2, Beta Cells, Transgenic Zebrafish.*

1- M.Sc. in Genetics, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran.

2- Ph.D. in Fish Biotechnology, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Stem Cell Biology and Technology Institute, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran.

3- Associate Professor in Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran.

4- Associate Professor in Department of Stem Cells and Developmental Biology, Stem Cell Biology and Technology Institute, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran.

*Corresponding Authors: Angaji@khu.ac.ir, y.tahamtani@royan-rc.ac.ir