

Optimization of PCR reaction conditions to obtain a successful amplicon for the angiotensinogen gene that can later be used to detect the M235T polymorphism

Dr. Faisal Radwan*
Dr. Haitham yazagi**
Dr. Eyas Alkhayer***
Mais yousif****

(Received 14 / 4 / 2024. Accepted 2 / 6 / 2024)

□ ABSTRACT □

Background: Polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive and expensive procedure, and its success requires many attempts. This study aims to develop optimization strategies to amplify a specific sequence in the AGT gene, to detect the M235T polymorphism associated hypertension.

Materials and methods: Genomic DNA was extracted by column method, and the PCR reaction was carried out using special primers, applying different conditions, and PCR products were detected using agarose gel electrophoresis.

Results: The optimized thermal cyclers conditions for performing the PCR reaction were: initial denaturation (temperature 94 °C, duration 2 min), denaturation (94 °C, 30 sec, 30 cycles), annealing (60 °C, 30 sec, 30 cycles), extension. (72°C, 30 seconds, 30 cycles), final lengthening (72°C, 5 minutes). The optimized concentrations and volumes of reagents were as follows: master mix (10 µl), forward and reverse primer (at a concentration of 21 pmol each), DNA template (at a concentration of 50 ng/µl).

Conclusion: Adjusting the annealing temperature, primer concentration, and thermal cyclers conditions had the greatest role in adjusting the PCR conditions, and there was no need to make adjustments to the concentrations of other reagents, nor to use additional amounts of magnesium chloride or other additives to enhance the reaction.

Keywords: Angiotensinogen gene - hypertension - PCR - optimized conditions- M235T polymorphism.



Copyright :Tishreen University journal-Syria. The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Associate Professor -Faculty of Human Medicine -Tishreen University-Lattakia -Syria
** Professor -Faculty of Human Medicine -Tishreen University -Lattakia -Syria
*** Assistant Professor- Faculty of Human Medicine -Tishreen University-Lattakia -Syria
**** PhD student, -Faculty of Human Medicine -Tishreen University -Lattakia -Syria

وضع الشروط المثلى لتفاعل PCR للحصول على أمبليكون ناجح لـ جين الأنجيوتنسينوجين يمكن أن يستخدم لاحقاً في الكشف عن التعدد الشكلي M235T

د. فيصل رضوان*

د. هيثم يازجي**

د. إياس الخير***

ميس يوسف****

(تاريخ الإيداع 14 / 4 / 2024. قبل للنشر في 2 / 6 / 2024)

□ ملخص □

الخلفية: إن تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إجراء حساس ذو تكلفة مادية عالية، ويتطلب نجاحه القيام بالعديد من المحاولات، تهدف هذه الدراسة إلى وضع استراتيجيات التحسين المثلى لتضخيم تسلسل محدد في جين AGT، للكشف عن التعدد الشكلي M235T المرتبط بارتفاع التوتر الشرياني.

المواد والطرق: تم استخلاص الحمض النووي الجينومي بطريقة الأعمدة، وأجري تفاعل PCR باستخدام مشارع نوعية خاصة، وبتطبيق شروط مختلفة، وجرى الكشف عن منتجات PCR باستخدام هلام الأغاروز الكهربائي.

النتائج: كانت شروط الدوار الحراري المثالية لإجراء تفاعل PCR كالتالي: التسخن الأولي (الحرارة 94 °C، المدة 2 دقيقة)، التسخن (94 °C، 30 ثانية، دورة)، التلدين (60 °C، 30 ثانية، دورة)، الاطالة (72 °C، 30 ثانية، دورة)، الاطالة النهائية (72 °C، 5 دقائق). أما التراكيز والحجوم المثالية للكواشف فكانت كالتالي: المزيج الرئيسي (10 ميكروليتر)، المشرع الامامي والعكسي (بتركيز 21 بيكومول لكل منهما)، قالب DNA (بتركيز 50 نانوغرام/ميكروليتر).

الخلاصة: كان لتعديل درجة حرارة التلدين وتركيز البودائ وشروط الدوار الحراري الدور الأكبر في ضبط شروط PCR، ولم يكن هناك حاجة لإجراء تعديل على تراكيز الكواشف الأخرى، ولا لاستخدام كميات إضافية من كلور المغنيزيوم أو الإضافات الأخرى لتعزيز التفاعل.

الكلمات المفتاحية: جين الأنجيوتنسينوجين - ارتفاع التوتر الشرياني - التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR - الشروط المثلى - التعدد الشكلي M235T.

مجلة جامعة تشرين - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04



* أستاذ مساعد - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
** أستاذ - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
*** مدرس - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
**** طالبة دكتوراه - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

مقدمة:

يعتبر التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) Polymerase chain reaction الإجراء الحاسم في أبحاث البيولوجيا الجزيئية، ويتطلب إنجازه بالشكل الفعال وجود معرفة كافية بكل مكون من مكونات التفاعل والخطوات المتبعة خطوة بخطوة لتحقيق النتائج الأمثل Optimized results، فعلى الرغم من أن هذه التقنية ليست معقدة فإنه من الصعب إجراء التجربة بشكل ناجح من المحاولة الأولى حيث تتطلب عدة محاولات و إجراء تعديلات عديدة لتحسين ظروف العمل، حيث تختلف الشروط المتبعة وفقاً لتسلسل الحمض النووي المستهدف، و تتأثر بالعديد من العوامل التي قد تؤثر على سير التفاعل [1]، كما في حال القوالب الصعبة difficult templates التي تحتوي على تراكيز عالية من GC، والتي ينجم عنها تشكل بنى ثانوية مستقرة ومعقدة تتداخل مع قالب DNA، وتعيق عمل بوليميراز الدنا مما يؤدي إلى فشل التفاعل (تضخيم غير فعال) [2]، كما تؤثر الظروف التقنية المستخدمة بشكل كبير على دقة وفعالية النتائج بما في ذلك (تركيز قالب الدنا، تركيز أيونات المغنيزيوم، شروط الدوار الحراري thermocycler، وتركيز المواد الأخرى المضافة أثناء تفاعل PCR) [3، 4].

قد يحدث أثناء تفاعل PCR تضخيم لمنتجات غير محددة بسبب التهجين الحاصل في الحمض النووي الجينومي مما قد يقلل من إنتاج الأمبليكون amplicon المطلوب. كما يؤدي استخدام درجات انصهار مختلفة melting temperature (TM) لزوجي البوادي إلى حدوث إجهاد (التواء) Strain أثناء تليدين البوادي مع قالب الدنا [5].

ركزت العديد من الأبحاث في الآونة الأخيرة على دراسة المنشأ الوراثي للأمراض، وكان ارتفاع التوتر الشرياني Hypertension (HTN) أحد أبرز هذه الأمراض، حيث يعتبر العامل الجيني مسؤولاً عن 30-50% من التنوع الحاصل في HTN و يشارك ما يزيد عن 150 جيناً في تطوير هذا المرض من خلال آليات مختلفة [6]، من بين هذه الجينات حظيت تلك التي تشفر مكونات نظام الرينين أنجيوتنسين ألدوستيرون Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) على اهتمام كبير، وهذا يعود إلى حقيقة أن مكوناته تلعب دوراً أساسياً في تنظيم توازن الأوعية الدموية، بالإضافة إلى الدور الذي تلعبه مثبطات الإنزيم المحول للأنجيوتنسين وحاصرات مستقبلات الأنجيوتنسين في الإدارة العلاجية لارتفاع ضغط الدم [7].

ينجم (HTN) عن الطفرات الوراثية التي قد تحدث في الجينات المنظمة لضغط الدم [8]، من بين الأسباب الوراثية، كان لتعدد أشكال النكليوتيدات المفردة Single nucleotide polymorphisms (SNPs) الحاصلة في جينات RAAS الأهمية الأكبر، والتي تتجم عن استبدال نكليوتيد طبيعي بآخر طافر، ويعتمد حدوثها على عوامل متعددة من أبرزها العرق. [6].

يشفر جين الأنجيوتنسينوجين (مولد الأنجيوتنسين) Angiotensinogen (AGT) gene مركب الأنجيوتنسينوجين Angiotensinogen (AGT) والذي هو عبارة عن بروتين سكري بلازمي غير متجانس يتم تصنيعه بشكل رئيسي في خلايا الكبد وذلك من خلال الانقسامات المتسلسلة إما عن طريق السبيل الإنزيمي الكلاسيكي أو المسارات البديلة. يعتبر AGT الطليعة الفريدة لـ RAAS، فهو يؤدي إلى إعطاء جميع ببتيدات الأنجيوتنسين، ولذا فهو يعكس حالة RAAS بأكمله [9].

تساهم التعددات الشكلية الحاصلة في جين AGT في التسبب بارتفاع ضغط الدم عبر عدة آليات [8]، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن الطفرات المغلوبة missense mutations التي تحدث في منطقة الاكسون 2 هي الأكثر أهمية فيزيولوجية، وأكثرها شيوعاً هما النمطان M235T و T174M [10].

ينجم التعدد الشكلي M235T الذي يرمز له أيضاً T704C أو rs699 عن استبدال النكليوتيد T في الموضع 704 من الاكسون الثاني بواسطة النكليوتيد C، يؤدي هذا بدوره إلى استبدال الحمض الأميني الميثيونين M في الموضع 235 بالحمض البديل له وهو الثريونين T [11]، يرتبط وجود الأليل T مع خطر الإصابة بأمراض الشرايين الكليلية بسبب تأثيرات مشتقات الأنجيوتنسين التي تسبب تصلب الشرايين [12]، كما يرتبط مع خطر الإصابة بارتفاع ضغط الدم بسبب زيادة المستويات البلازمية لـ AGT وتفعيل RAAS [13، 14].

يتم تحديد SNPs باستخدام العديد من التقنيات وأكثرها شيوعاً تقانة تفاعل سلسلة بوليميراز الدنا متعدد أشكال طول شدة الإقْطاع polymerase Reaction chain–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP)، وتقانات السلسلة Sequencing Techniques [15].

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

تستخدم تقنية PCR للكشف عن الطفرات المسببة للأمراض الوراثية، وهي طريقة مكلفة وحساسة للغاية وتتأثر بالعديد من العوامل التي قد تؤثر على سير التفاعل، حيث يتطلب نجاحها العديد من المحاولات التي قد تكون فاشلة مما يترتب عليه تكلفة مادية كبيرة.

يعتبر ارتفاع التوتر الشرياني أحد أبرز الأمراض الوراثية التي تتسبب بعدد كبير من الوفيات على مستوى العالم، وإن عدد الحالات المستجيبة على العلاج منخفض جداً، قد يعود ذلك إلى التعددات الشكلية التي قد تحدث في الجينات المنظمة لضغط الدم، والتي يتطلب الكشف عنها بداية إجراء تفاعل PCR لتضخيم المنطقة المطلوبة من الجين ضمن الشروط المثالية للحصول على منتج جيني وحيد واضح، تجرى عليه الاختبارات اللاحقة التي تحدد وجود أو عدم وجود الطفرة.

أهداف البحث:

يهدف هذا البحث إلى وضع الاستراتيجيات المثالية التي يتوجب اتباعها للحصول على أمبليكون ناجح لـ جين الأنجيوتنسينوجين، بغية تجنب المحاولات المحبطة والمكررة والمكلفة لتضخيم التسلسل المعني، وبهدف استخدامه لاحقاً في الكشف عن التعدد الشكلي M235T المرتبط بارتفاع ضغط الدم.

طرائق البحث ومواده

الاعتيان: تم انتقاء أحد الأفراد المصابين بارتفاع التوتر الشرياني، وذلك من المرضى المراجعين للعيادة القلبية في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، حيث استخدمت المحاقن المعقمة للحصول على 1.5-3 مل من الدم الوريدي للمريض بعد أخذ الموافقة المستنيرة المكتوبة من قبله، وتم وضع الدم في أنبوب حاو على EDTA كمادة مانعة للتخثر، جرى بعد ذلك نقل العينة إلى مشفى الأسد الجامعي في دمشق في نفس يوم جمعها، ليتم إجراء استخلاص

الحمض النووي وإجراء تفاعل PCR وجميع مراحل العمل اللاحقة في وحدة البيولوجيا الجزيئية ضمن المخبر المركزي لمشفى الأسد الجامعي.

عزل DNA الجينومي: تم استخلاص DNA من الدم الكامل بطريقة الأعمدة باستخدام العتيدة GF-1, Blood DNA Extraction kit, Vivantis, Malaysia، وأجريت كافة الخطوات في درجة حرارة الغرفة وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. تم تخزين الكواشف والوقاء المستخدم في درجة حرارة الغرفة، وتبريد البروتيناز K بالدرجة -4 إلى حين الاستخدام، بعد استخلاص عينات الحمض النووي تم نقل قالب الدنا Template DNA الناتج إلى أنابيب إيبندورف سعة 1.5 مل والاحتفاظ بها بالدرجة -20 إلى حين الاستخدام.

القياس الكمي لعينة الحمض النووي المستخلص: قمنا بقياس الكثافة الضوئية لنواتج الاستخلاص عند الأطوال الموجية 260 و280 نانومتر، وذلك للحصول على تركيز ونقاوة الدنا باستخدام مقياس الطيف الضوئي Nanodrop ND-1000 spectrophotometer، بلغ تركيز الحمض النووي للعينة 25 نانوغرام / ميكرو لتر، وكانت النقاوة 1.9.

تصميم البادئات (المشارع): جرى استخدام المشاريع التالية حسب دراسة Cheng, Jing-Lin et al 2011 [16]، وذلك بعد التحقق من نوعيتها وخواصها باستخدام برامج NCBI Primer-Blast و Primer3.

المشروع الأمامي (Forward primer): 5'-AGA ACT GGA TGT TGC TGC TG-3'.

المشروع العكسي (Reverse Primer): 5'-TGC TGT CCA CAC TGG CTC GC-3'.

تم تصميم المشاريع من قبل ماكروجين Macrogen (كوريا الجنوبية)، دون أن يتم إجراء تعديل عليها.

تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR): أجري التفاعل باستخدام جهاز الدوار الحراري Eppendorf Nexus GSX1 thermocycler، وعتيدة 2X ViRed Taq Master Mix, Vivantis, Malaysia والتي تحتوي على جميع مكونات التفاعل باستثناء المشاريع و قالب الدنا.

اعتمدنا في دراستنا على Gradient PCR حيث قمنا بتعديل ظروف الدوار الحراري بالتدريج وضبط قدرة البودئ على التلدين من خلال تجربة درجات حرارة وأزمنة مختلفة، وقد تم استخدام التسلسل السابق ذاته من البودئ في كل مرة، أما 2X ViRed Taq Master Mix الحاوي على (0.4 ميكرومولار من dNTPs، 3 ميكرومولار من كلور المغنسيوم، 0.4 من انزيم Taq DNA Polymerase، صباغ أحمر) فقد استخدم بحجم وتركيز ثابت منذ بداية التفاعل وهو (10 ميكرو لتر) دون تعديل لاحق، وبالنسبة للبودئ وقالب الحمض النووي فقد جرى استخدامها بحجوم مختلفة وفقاً للتركيز المطلوب، ويتم إكمال الحجم في كل مرة باستخدام كميات متفاوتة من PCR water وذلك للوصول إلى حجم ثابت لمزيج التفاعل النهائي وهو 20 ميكرو لتر، كما قمنا باستخدام بعض الإضافات لتعزيز التفاعل مثل كلور المغنسيوم.

تم توضيح الشروط المتبعة في التجارب المجرىة ضمن الجداول (1) و (2) و (3) و (4) و (5) و (6) التالية:

الجدول رقم (1): الشروط المتبعة في التجربة (1)

تركيز الكواشف Reagent concentrations		شروط برنامج PCR cycling conditions for PCR			
		Step	Temperature	Time	Cycle. N
Mgcl2	-	Initial Denaturation	94 °C	2 min	1
		Denaturation	94 °C	30 sec	45
Forward primer	(24 pmol)	Annealing	55 °C	30 sec	45
Reverse Primer	(24 pmol)	Elongation	72 °C	30 sec	45
Template DNA	(100 ng/ ul)	Final Elongation	72 °C	7 min	1

الجدول رقم (2): الشروط المتبعة في التجربة (2)

تركيز الكواشف Reagent concentrations		شروط برنامج PCR cycling conditions for PCR			
		Step	Temperature	Time	Cycle .N
Mgcl2	(4 mM)	Initial Denaturation	94 °C	5 min	1
		Denaturation	94 °C	40 sec	45
Forward primer	(12 pmol)	Annealing	57 °C	1 min	45
Reverse Primer	(12 pmol µL)	Elongation	72 °C	2 min	45
Template DNA	(50 ng/ ul)	Final. Elong	72 °C	7 min	1

الجدول رقم (3): الشروط المتبعة في التجربة (3)

تركيز الكواشف Reagent concentrations		شروط برنامج PCR cycling conditions for PCR			
		Step	Temperature	Time	Cycle N
Mgcl2	(4 mM)	Initial Denaturation	94 °C	5 min	1
		Denaturation	94 °C	40 sec	45
Forward primer	(18 pmol)	Annealing	58 °C	1 min	45
Reverse Primer	(18 pmol)	Elongation	72 °C	2 min	45
Template DNA	(50 ng/ ul)	Final. Elong	72 °C	7 min	1

الجدول رقم (4): الشروط المتبعة في التجربة (4)

تركيز الكواشف Reagent concentrations		شروط برنامج PCR cycling conditions for PCR			
		Step	Temperature	Time	Cycle N
Mgcl2	(4 mM)	Initial Denaturation	94 °C	2 min	1
		Denaturation	94 °C	30 sec	30
Forward primer	(21 pmol)	Annealing	59 °C	30 sec	30
Reverse Primer	(21 pmol)	Elongation	72 °C	30 sec	30
Template DNA	(50 ng/ ul)	Final. Elong	72 °C	5 min	1

في التجربة الخامسة تم ضبط شروط جهاز الدوار الحراري كالتالي:

- Initial Denaturation: 94 °C - 2 minutes
- Denaturation: 94 °C- 30 seconds – 30 cycle
- Annealing: 60 °C- 30 seconds – 30 cycle
- Elongation: : 72 °C- 30 seconds – 30 cycle
- Final. Elong: : 72 °C- 5 minutes

واستخدمت تراكيز مختلفة من الكواشف على 4 عينات، كما يوضح الجدول التالي:

الجدول رقم (5): الشروط المتبعة في التجربة (5)

	تركيز الكواشف Reagent concentrations			
	1	2	3	4
Mgcl2	-	2.76 mM	-	2.76 mM
Forward primer	(18 pmol)	(18 pmol)	(21 pmol)	(21 pmol)
Reverse Primer	(18 pmol)	(18 pmol)	(21 pmol)	(21 pmol)
Template DNA	(50 ng/ ul)	(100 ng/ ul)	(50 ng/ ul)	(50 ng/ ul)

الجدول رقم (6): الشروط المتبعة في التجربة (6)

تركيز الكواشف Reagent concentrations		شروط برنامج PCR cycling conditions for PCR			
Mgcl2	-	Step	Temperature	Time	Cycle N
		Initial Denaturation	94 °C	2 min	1
Forward primer	(21 pmol)	Denaturation	94 °C	30 sec	30
Reverse Primer	(21 pmol)	Annealing	60 °C	30 sec	30
Template DNA	(50 ng/ ul)	Elongation	72 °C	30 sec	30
		Final. Elong	72 °C	5 min	1

لإظهار منتج تضخيم PCR (ذو الطول 98 bp) قمنا بالترحيل على هلامة الأغاروز 1.5% باستخدام جهاز رحلان كهربائي على الهلام (AGE) Agarose Gel Electrophoresis، بوجود (الدارئة 0.5 X TBE، سلم قياس الدنا 100 bp DNA ladder، بروميد الايثيديوم وصبغ تحميل الحمض النووي).

جرى حقن سلم قياس الدنا في البئر الأول، وحقنت العينات في الآبار التالية بترتيب معلوم، حيث استخدم 5 ميكروليتر من ناتج تفاعل PCR وأضيف له 2 ميكروليتر من صباغ التحميل، ومزجت بشكل جيد ثم حقنت في الآبار، وتم إجراء الترحيل الكهربائي على الهلام باستخدام نظام AGE الأفقي وذلك باستطاعة 120 فولط ولمدة 35 دقيقة، أجري بعد ذلك تصوير الهلام عبر وضعها في حجرة الأشعة فوق البنفسجية لإظهار العصابات.

النتائج والمناقشة

النتائج:

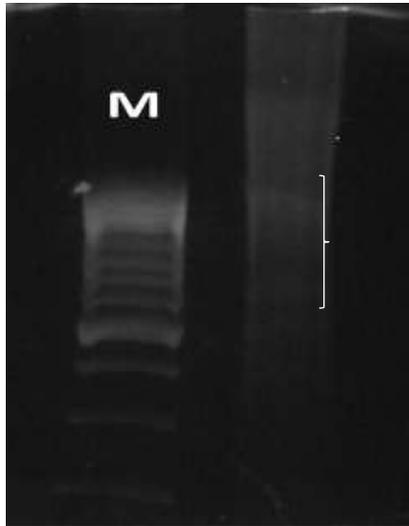
في التجريبتين الأولى والثانية وبعد الترحيل على (AGE)، لوحظ ظهور عصابات لطاخية Smear bands ومنتجات غير محددة كما يتضح من الشكل (1) و (2)، وبدأ ظهور التسلسل المحدد المستهدف في التجربة الثالثة ولكن مع استمرار ظهور عصابات إضافية الشكل (3)، وعند تعديل الشروط في التجربة الرابعة حصلنا على أمبليكون وحيد وباهت بالطول المطلوب كما يظهر الشكل (4). في التجربة الخامسة جرى الاستقرار على ظروف الدوار الحراري وإجراء تعديلات على التراكيز التي قمنا باستخدامها في التجربة (4) لنحصل على منتج وحيد بالطول المطلوب 98 bp وذو كثافة جيدة في العينة رقم (3) كما يتضح من الشكل (5).

تم الحصول على النتيجة النهائية المثالية Optimized result في التجربة السادسة، حيث كانت شروط الدوار الحراري المستخدمة كالتالي: التسخن الأولي initial denaturation (الحرارة 94 °C، المدة 2 دقيقة)، التسخن denaturation (الحرارة 94 °C، المدة 30 ثانية، عدد الدورات 30)، التلدين annealing (الحرارة 60 °C، المدة 30 ثانية، عدد الدورات 30)، الاطالة elongation (الحرارة 72 °C، المدة 30 ثانية، عدد الدورات 30)، الاطالة النهائية final elongation (الحرارة 72 °C، المدة 5 دقائق).

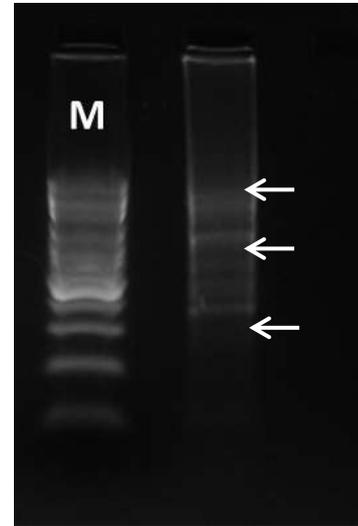
أما التراكيز المثالية للكواشف فكانت كالتالي: المزيج الرئيسي master mix (10 ميكروليتر من المزيج تحتوي على التراكيز التالية: 0.4 Mm من dNTPs و 3 Mm من المغنيزيوم و 0.4 وحدة من انزيم Taq DNA polymerase)، المشرع الامامي forward primer (بتركيز 21 بيكومول)، المشرع العكسي reverse primer (بتركيز 21 بيكومول)، قالب الحمض النووي Template DNA (بتركيز 50 نانوغرام/ميكروليتر)، وكان حجم مزيج

التفاعل النهائي final reaction volume (20 ميكروليتر)، ولم يكن هناك حاجة لاستخدام كميات إضافية من كلور المغنيزيوم لتعزيز التفاعل.

يوضح الشكل (6) الأம்பليكون المثالي المطلوب بطول bp 98 وهو ذو كثافة جيدة.



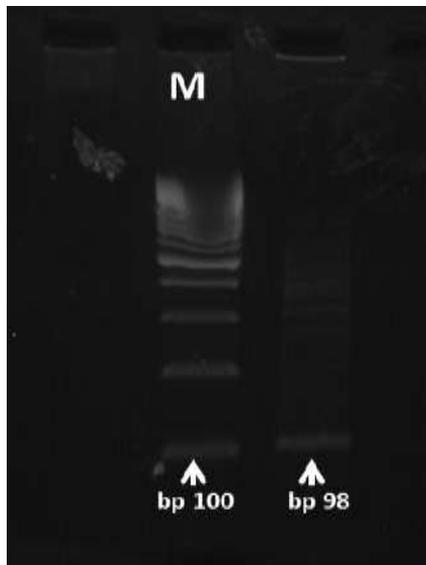
الشكل (2): نتيجة الرحلان الكهربائي في التجربة (2) يشير القوس الى العصابات اللطاخية الباهتة، يشير الرمز M الى سلم الدنا.



الشكل (1): نتيجة الرحلان الكهربائي على هلام الإغاروز

(AGE) في التجربة (1)

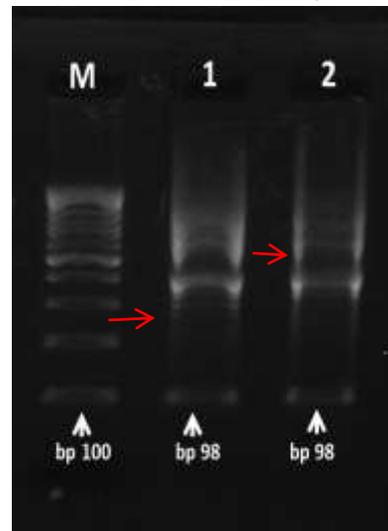
يشير الرمز M الى سلم الدنا DNA ladder، وتشير الأسهم البيضاء إلى الأشرطة اللطاخية.



الشكل (4): نتيجة الرحلان الكهربائي على (AGE) في التجربة رقم

(4)

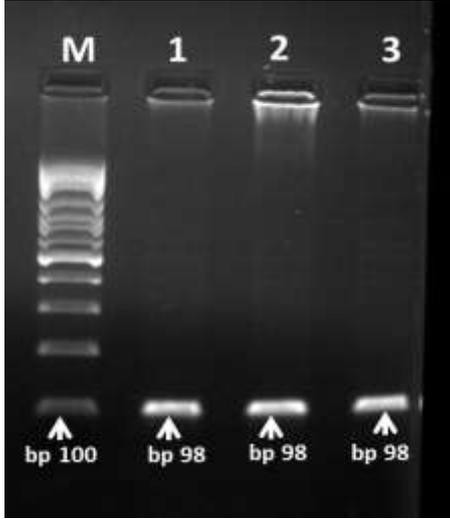
يوضح ظهور منتج PCR بشكل عصابة وحيدة بحجم bp 98 يشار اليها بالسهم الأبيض، وتظهر بشكل مواز للعصابة ذات الطول 100 bp في سلم الدنا (M)



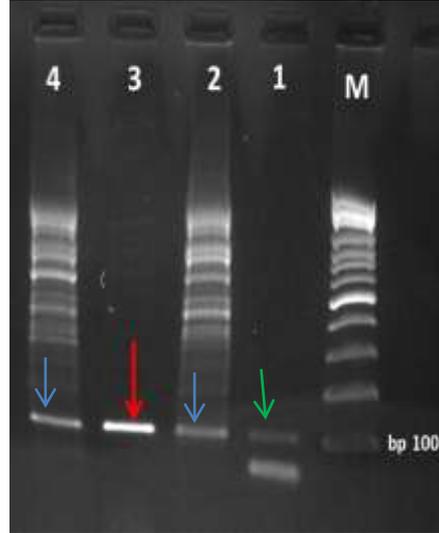
الشكل (3): نتيجة الرحلان الكهربائي على (AGE) في

التجربة رقم (3)

تشير الأرقام (1) و(2) إلى مكان ارتحال العينة الأولى والثانية، يشار الى منتج PCR ذو الحجم bp 98 بالاسهم البيضاء، تشير الأسهم الحمراء الى الخطوط اللطاخية غير النوعية ذات الكثافة العالية



الشكل (6): نتيجة الرحلان الكهربائي على (AGE) في التجربة (6) تظهر النتيجة المحسنة المثالية لتفاعل PCR بشكل عصابة وحيدة واضحة ذات كثافة عالية بالحجم المطلوب bp 98 لدى المرضى الثالث.



الشكل (5): نتيجة الرحلان الكهربائي على (AGE) في التجربة (5)

في المريض (1): يشير السهم الاخضر الى منتج PCR الاصلي مع ظهور عصابة اضافية بالاسفل، في المرضى (2 و 4): يشار الى منتج pcr بأسهم بلون أزرق مع وجود العديد من الأشرطة اللطاخية، في المريض رقم (3): يشير السهم الأحمر إلى منتج PCR وحيد ناجح وواضح بحجم bp 98.

المناقشة:

يعتبر PCR أداة لا غنى عنها للباحثين في جميع أنحاء العالم، وعلى الرغم من استخدامه على نطاق واسع في العديد من المشاريع البحثية لأكثر من ثلاثة عقود، إلا أن إنجازه بشكل ناجح يتطلب الكثير من الصبر وإجراء العديد من المحاولات التي قد تكون فاشلة، كما أن الكواشف المطلوبة لإجرائه باهظة الثمن و الأدوات المطلوبة لتقنية PCR ليست اقتصادية وغير متوفرة في جميع المختبرات [3]، وفي هذا البحث تمت مناقشة الاستراتيجيات المثالية التي يتوجب اتباعها للحصول على أمبليكون ناجح ل جين الأنجيوتنسينوجين.

قمنا في هذه الدراسة باتخاذ التدابير الكافية لتجنب التلوث من أي حمض نووي في بيئة المختبر، وذلك بالعمل ضمن حجرة التدفق الصفحي laminar flow cabinet المجهزة بمصباح أشعة فوق بنفسجية، وتطهير الطاولة والمعدات بواسطة محلول إيثانول 70%، واتخاذ إجراءات التشغيل القياسية والتي تتضمن استخدام الممصات المجهزة برؤوس مفلترتة Fillter tips، وارتداء قفازات مخبرية جديدة [3]

كانت المشرعات المصممة للدراسة بطول مناسب 20 bp، وذات محتوى مقبول من GC (50% الى 65%)، بالإضافة إلى وجود GC-Clamp في النهاية 3 لكلا المشرعين الذي يعزز ربط المشرع إلى قالب الدنا ويمنع الاقتران الخاطئ [17].

تم حساب درجة حرارة التلدين (Ta) Annealing Temperature اعتباراً من درجة انصهار البودائ Melting Temperature (TM) [3]، حيث تم البدء بدرجة (Ta) تعادل 55 °C، وبتطبيق عدد دورات كبير وتركيز عال من الحمض النووي القالب، لم نحصل على التسلسل المستهدف ولوحظ وجود عصابات لطاخية

Smear bands ومنتجات غير محددة قد يعود ذلك إلى ارتباط البوداي بشكل غير مكتمل أو انخفاض حرارة التلدين التي تؤدي إلى ارتباط غير نوعي للبوداي أو بسبب زيادة عدد الدورات أو زيادة تركيز قالب الدنا، للتغلب على ذلك قمنا في التجربة الثانية بزيادة أزمنة التمسح والاطالة والتلدين، وانقاص تراكيز كل من قالب الدنا المضاف والبوداي، وزيادة درجة حرارة التلدين إلى 57 درجة مئوية، وكذلك إضافة كميات إضافية من كلور المغنيزيوم لتعزيز التفاعل، لوحظ بعد الترحيل وجود الخطوط اللطاخية ولكن بكثافة أقل من التجربة الأولى، أيضاً لم نحصل على منتج واضح في المنطقة المطلوبة، لذا كان لابد من المزيد من التعديلات. في التجربة الثالثة قمنا بتحضير قسامة جديدة من البوداي تلافياً لاحتمال وجود تلوث، بالإضافة إلى زيادة تركيز البوداي المستخدمة، ورفع حرارة التلدين إلى 58 درجة مئوية، لوحظ بدء ظهور منتج PCR بشكل عصابة باهتة بطول 98 bp، مع استمرار ظهور أشرطة لطاخية بكثافات متفاوتة، وتسلسلات غير مستهدفة قد ينجم ذلك عن عدد الدورات الكبير وزيادة زمن التمسح الذي قد يؤدي تمسخ بوليميراز الحمض النووي وانخفاض إنتاج الأمبليكون، لذا قمنا في التجربة الرابعة بتخفيض عدد الدورات، وانقاص زمن التمسح، وزيادة حرارة التلدين، لوحظ ظهور منتج PCR وحيد باهت بحجم 98 bp، واعتباراً من هذه التجربة قمنا بتثبيت شروط الدوار الحراري وإجراء التعديلات على قيم التراكيز وحرارة التلدين فقط لزيادة كثافة ووضوح الأمبليكون، حيث قمنا في التجربة الخامسة بزيادة درجة حرارة التلدين إلى 60 درجة مئوية، واستخدام تراكيز مختلفة من البوداي وقالب الدنا وكلور المغنيزيوم على 4 مرضى، وحصلنا على النتيجة المحسنة المثالية، بشكل منتج وحيد واضح وبالحجم المطلوب 98 bp، بدون ظهور عصابات اضافية. في التجربة السادسة تم تطبيق الشروط ذاتها لدى المريض رقم 3 في التجربة السابقة، ولكن مع الاستغناء عن كلور المغنيزيوم، وحصلنا على تجربة ناجحة مماثلة حيث اتضح أنه لا داع للمواد المضافة في هذه التجربة. قام العديد من الباحثين بالكشف عن التسلسل السابق المستهدف ضمن جين AGT وذلك باستخدام تسلسلات مختلفة من البوداي وشروط وتراكيز مختلفة، إلا أن هذه الدراسات لم تعني بتحديد الشروط المثلى لتفاعل PCR المستخدم، ولم تكن مرفقة بصور توضح مدى نجاح الأمبليكون الناتج، ففي دراسة أجراها Vana Kolovou وزملاؤه عام 2015 تم استخدام التسلسل التالي للبوداي: المشرع الأمامي 3'-CCGTTTGTGCAGGGCCT GGCTCTC-5' و المشرع العكسي 3'-CAGGGTGTCCACTGGCTCG-5' وكانت شروط الدوار الحراري التمسح الأولي (الحرارة 95 °C، المدة 5 دقيقة)، التمسح (الحرارة 95 °C، المدة 30 ثانية)، التلدين (الحرارة 55 °C، المدة 30 ثانية، 30 دورة)، الاطالة (الحرارة 72 °C، المدة 30 ثانية)، الاطالة النهائية (الحرارة 72 °C، المدة 7 دقائق)، حيث اختلفت درجة حرارة التلدين والشروط المستخدمة بسبب اختلاف تسلسل البوداي المستخدمة [13]، وفي دراسة أجريت في الصين من قبل JING-LIN CHENG وآخرون فقد تم استخدام التسلسل ذاته من البوداي في تجربتنا مع اختلاف في الشروط المستخدمة حيث تم تطبيق 35 دورة لكل من التمسح (الحرارة 92 °C، المدة 44 ثانية)، التلدين (الحرارة 55 °C، المدة 40 ثانية)، الاطالة (الحرارة 72 °C، المدة 90 ثانية)، الاطالة النهائية (الحرارة 72 °C، المدة 10 دقائق) مع حجم مزيج تفاعل نهائي 50 ميكروليتر دون أن يتم ارفاق صور توضح نجاح تفاعل PCR، أو اجراء تحسين للشروط، وكانت الشروط المتبعة في التجربة مختلفة عن تلك المستخدمة في دراستنا [16]، كما تفاوتت شروط تفاعل PCR للكشف عن AGT في العديد من الدراسات الأخرى كذلك التي أجريت في اثيوبيا ولبنان ومصر والأردن [18-21].

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

وفقاً لهذه الدراسة كانت العوامل الأهم لتحديد الظروف المثلى لتفاعل PCR المجري لتضخيم التسلسل المستهدف في AGT، هي تحديد درجة حرارة التلدين المثلى اللازمة لارتباط البوادي بقالب الدنا والتي بلغت 60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، بالإضافة إلى زيادة تركيز البوادي المستخدمة حيث لم تتجح التجربة بالتركيز الأقل من 21 بيكومول، بالإضافة إلى ضبط شروط الدوار الحراري الأخرى، ولم يكن هناك حاجة لإجراء تعديل على تراكيز الكواشف الأخرى أو لاستخدام كميات إضافية من كلور المغنيزيوم حيث كانت كميته الموجودة ضمن Master Mix كافية لإنجاز التفاعل بالشكل الأمثل.

التوصيات:

- 1- نوصي باستخدام ViRed Taq Master Mix الحاوي على عدة كواشف بتركيز محددة في محلول واحد والتي تضم (dNTPs، كلور المغنيزيوم، انزيم Taq Polymerase)، حيث كانت التركيزات المستخدمة ضمنه كافية لتضخيم التسلسل المطلوب، مما ساهم في سهولة العمل وتوفير الجهد مقارنة فيما إذا استخدمت هذه الكواشف في عدة محاليل منفصلة كل على حدة.
- 2- لا داع لاستخدام معززات التفاعل الأخرى مثل ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) أو ألبومين المصل البقري (BSA) أو غيرها.
- 3- إجراء أبحاث مستقبلية أخرى تعني بدراسة طرق التحسين المثلى لتفاعل PCR المستخدم للكشف عن مختلف الجينات المرتبطة بارتفاع ضغط الدم، ليتم استخدامها لاحقاً بدراسة التعدادات الشكلية الأكثر شيوعاً في المجتمع السوري.

References

- 1.Saiki, R.K., *The design and optimization of the PCR*. PCR technology, 1989: p. 7-16.
- 2.Obradovic, J., et al., *Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence*. Journal of clinical laboratory analysis, 2013. **27**(6): p. 4493-87
- 3.Bartlett, J.M. and D. Stirling, *PCR protocols*. Vol. 226. 2003: Springer.
- 4.Roux, K.H., *Optimization and troubleshooting in PCR*. Cold Spring Harbor Protocols, 2009. **2009**(4): p. pdb. ip66.
- 5.Asif, S., et al., *PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide*. Research in Molecular Medicine, 2021. **9**(2): p. 81-102.
- 6.Škarić-Jurić, T., *Path analysis of familial resemblance in blood pressure in Middle Dalmatia, Croatia*. Collegium antropologicum, 2003. **27**(1): p. 229-237.
- 7.Tchelougou, D., et al. *Renin-angiotensin system genes polymorphisms and essential hypertension in Burkina Faso, West Africa*. International journal of hypertension, 2015. **2015**.
- 8.Dhalla, N.S., S.K. Bhullar, and A.K. Shah, *The Renin Angiotensin System in Cardiovascular Disease*. Vol. 24. 2023: Springer Nature.
- 9.Wu, C., et al., *Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review*. N Am J Med Sci (Boston), 2011. **4**(4): p. 183-190.

- .10Jeunemaitre, X., et al., *Angiotensinogen variants and human hypertension*. Current Hypertension Reports, 1999. **1**: p. 31-41.
- .11Zhao, H., et al., *Gene polymorphism associated with angiotensinogen (M235T), endothelial lipase (584C/T) and susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis*. Bioscience Reports, 2020. **40**(7): p. BSR20201414.
- .12Lanz, J.R., et al., *Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with coronary artery disease severity*. Clinica chimica acta, 2005. **362**(1-2): p. 176-181.
- .13Kolovou, V., et al., *Angiotensinogen (AGT) M235T, AGT T174M and angiotensin-1-converting enzyme (ACE) I/D gene polymorphisms in essential hypertension: effects on ramipril efficacy*. The open cardiovascular medicine journal, 2015. **9**: p. 118.
- .14Shahid, M., et al., *Genetic polymorphism in angiotensinogen and its association with cardiometabolic diseases*. Metabolites, 2022. **12**(12): p. 1291.
- .15Lawrie, R.D. and S.E. Massey, *Agri-genomic Diversity Unleashed: Current Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Methods for the Agricultural Sciences*. Applied Biosciences, 2023. **2**(4): p. 565-585.
- .16Cheng, J.-L., A.-L. Wang, and J. Wan, *Association between the M235T polymorphism of the AGT gene and cytokines in patients with hypertension*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2012. **3**(3): p. 509-512.
- .17Kalendar, R., D. Lee, and A.H. Schulman, *Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis*. Genomics, 2011. **98**(2): p. 137-144.
- .18Melake, A., et al., *Association between angiotensinogen M235T gene polymorphism and risk of hypertension: A case control study among Ethiopian patients*. Ethiopian Medical Journal, 2023. **61**(2): p. 2.
- .19Saab, Y., P. Gard, and A. Overall, *The association of hypertension with renin-angiotensin system gene polymorphisms in the Lebanese population*. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 2011. **12**(4): p. 588-594.
- .20Shamaa, M.M., et al., *Association between the Angiotensinogen (AGT) gene (M235T) polymorphism and Essential Hypertension in Egyptian patients*. The Egyptian Heart Journal, 2015. **67**(1): p. 1-5.
- .21Alhawari, H., et al., *The Association of M235T Genetic Polymorphism in Angiotensinogen Gene and Other Non-Genetic Factors with Essential Hypertension among Jordanian Patients*. Journal of Personalized Medicine, 2024. **14**(3): p. 273.