

کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موش و ایجاد موتاسیون در آن

© همایون نادریان Ph.D.، بهرام کاظمی Ph.D.، احمد حسینی Ph.D.، یوسف صادقی Ph.D.***

و آنتوان دو وریس Ph.D.****

* گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

** مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** شبکه پزشکی مولکولی کشور

**** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

***** بخش ژن درمانی دپارتمان بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه لیدن هلند

تاریخ وصول: مهرماه ۸۴، تاریخ پذیرش: آذرماه ۸۴

چکیده

هدف: کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در پلاسمید pUCBM21 و ایجاد یک موتاسیون در داخل قالب ژنی در آن و ترادف یابی آنها **مواد و روشها:** در این پژوهش که یک تحقیق توصیفی است، از طحال موش mRNA استخراج شد و cDNA ژن آنزیم Gba با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سنتز و به روش PCR تکثیر شد. سپس ژن تکثیر شده در پلاسمید pUCBM21 کلون شد. پس از آنالیز آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیمهای محدودگر، با استفاده از آنزیم MscI و حذف سکانسهای از اگزونهای میانی موتاسیون داخل قالب ژنی ایجاد شد، سپس ژن اصلی و ژن موتان یافته ترادف یابی شد. **یافته‌ها:** cDNA ژن با ۱۶۱۶ bp تکثیر شد. با استفاده از پنج آنزیم محدودگر تکثیر ژن، کلونینگ و موتاسیون ایجاد شده در آن تأیید شد. پس از بررسی ترادف اسید آمینه‌ها، موتاسیون ایجاد شده در ژن تأیید شد. **نتیجه‌گیری:** از کلونینگ، ترادف یابی و ایجاد موتاسیون در ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز برای انتقال و بیان آن در مطالعات آینده می‌توان استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: آنزیم گلوکوسربروزیداز، کلونینگ، وکتور pUCBM21، موتاسیون

مقدمه

ژن درمانی یکی از روشهای درمانی برای درمان بیماریهای مختلف ژنتیکی است [۱]. با وجود اینکه بیش از یک دهه از انتقال DNA نو ترکیب به سلولهای یوکاریوتی به منظور دست یابی به اثرهای درمانی آن می‌گذرد، هنوز مشکلات زیادی تا کسب نتایج مطلوب و استفاده وسیع از آن وجود دارد [۲].

بیشترین تحقیقات ژن درمانی و انتقال ژن تاکنون روی بیماریهای ذخیره لیزوزومی، به خصوص بیماری گوشه انجام گرفته است. بیماری گوشه یکی از شایع ترین بیماریهای ذخیره لیزوزومی است که به دلیل نقص ژنتیکی آنزیم گلوکوسربروزیداز (Gba) ایجاد می‌شود. این آنزیم پیوندهای بتا

مواد و روشها

طراحی پرایمر

بر اساس mRNA ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز (NM-008094) [۱۴] سه پرایمر به صورت زیر شامل پرایمر فرورارد از نوکلئوتید ۲۸۴ تا ۳۰۳، پرایمر ریورس از نوکلئوتید ۱۸۸۰ تا ۱۸۹۹ و پرایمر نسخه برداری (RT) از نوکلئوتید ۱۹۰۸ تا ۱۹۲۸ طراحی شد و توسط شرکت اینویترژن سنتز شدند.

mGba-Forward 5' GGG TCT ACG GGC ACT GTC TC 3'
mGba-Reverse 5' CTG CTC AGG TGT CAG TTC CA 3'
mGba-RT 5' CCT TTA ATG TCC ATG CTA AGC 3'

سنتز cDNA و انجام واکنش PCR

پس از بیهوش کردن موش، طحال آن در شرایط استریل و با وسایل عاری از RNase در نیتروژن مایع و هاون سرد کوبیده شد. mRNA به کمک محلول TRIzol (شرکت اینویترژن) استخراج شد. غلظت RNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار ۲ میکروگرم از آن به کمک آنزیم Ss II، نسخه برداری معکوس شد (سنتز cDNA). واکنش PCR با آنزیم Taq DNA p. HF به تعداد ۳۵ سیکل و با شرایط دناتوریشن در ۹۲° سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵/۵° سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و اکستنشن در ۶۸° سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت.

محصول PCR (۱۶۱۶ نوکلئوتید) روی ژل آگارز ۱ درصد در کنار مارکر DNA الکتروفورس شد. برای تایید محصول PCR، آنالیز آنزیمی با HincII و NcoI (شرکت فرمتاز) انجام گرفت.

کلونینگ

پلاسمید pUCBM۲۱ یک وکتور غیر بیان کننده است که دارای ژنوم حلقوی دو رشته ای با ۲۷۲۵ نوکلئوتید است و از نسل پلاسمید pUC۱۹ است. ۵ میکروگرم از پلاسمید فوق با آنزیم HincII هضم شد و با آنزیم آلکالین فسفاتاز دفسفوریل شده (دفسفوریلایسیون پلاسمید هضم شده به منظور افزایش اتصال ژن تکثیر شده با وکتور انجام گرفت) و محصول PCR با آنزیم T4 DNA لیگاز به آن متصل شد. پلاسمید نوترکیب به سلول

گلوکوزیدیک گلوکوسربروزید را قطع و گلوکوز را از سرامید جدا می‌کند. بیوستز گلوکواسفنگولپید که جزء اصلی تمام غشاهای بیولوژیک است به سرامید وابسته است [۳]. سرامید در فعالیتهای مختلف غشای سلول نظیر تمایز، مهاجرت و ارتباطات سلولها با یکدیگر نقش حیاتی دارد [۴]. نقص در عملکرد آنزیم Gba سبب تجمع گلوکوسربروزید در ماکروفاژهای بافتیهای مختلف نظیر طحال، کبد، مغز استخوان و غدد لنفاوی می‌شود و ایجاد بیماری گوشه را ایجاد می‌کند [۵ و ۶].

بیماری گوشه در انسان دارای سه زیر گروه است. نوع I آن خفیف و شایع، نوع II شدید با شیوع کمتر و نوع III با علائم متوسط است که به سبب ایجاد موتاسیون در توالی mRNA آنزیم گلوکوسربروزیداز بروز می‌کند [۷ و ۸]. موتاسیونهای داخل قالب ژنی (in frame mutation) آنزیم گلوکوسربروزیداز از نوع خفیف هستند که اغلب روی اگزونهای میانی آن ایجاد می‌شوند [۹ و ۱۰]. در این نوع موتاسیونها سکانسهای آغازی و پایانی ژن دست نخورده باقی می‌ماند و فقط سکانسهای میانی آن حذف می‌شود.

ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در انسان در روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱ و در موش در روی کروموزوم ۳ در ناحیه E3-F1 قرار دارد و حدوداً دارای ۷/۵kb است، mRNA آن ۱۹۶۴ نوکلئوتید دارد و شامل ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون است. موقعیت ژن Gba، کدون آغازی و پایانی، مرز بین اگزونها و ژنهای دیگر بالاتر و پایین تر آن در انسان، موش و گونه‌های مشابه تقریباً حفظ شده است. ۸۴ درصد نوکلئوتیدهای اگزونیک و ۸۷ درصد اسیدهای آمینه آن در بین انسان و موش مشابه است [۱۱، ۱۲ و ۱۳].

ژن درماتی با انتقال ژن ترمیم یافته به میزبان انجام می‌گیرد اما پیدا کردن حیوان آزمایشگاهی که دارای نقص ژنتیکی مشخصی باشد فعلاً مشکل است. در این مطالعه به منظور آماده نمودن مقدمات انتقال ژن، ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز را در وکتور غیر بیان کننده pUCBM۲۱ کلون نموده و سپس در ساختار پلاسمیدی آن موتاسیون ایجاد نمودیم تا در آینده با انتقال این پلاسمید نوترکیب به حیوان آزمایشگاهی و ردیابی ژن موتان در آن، مقدمات انتقال ژن را فراهم شود.

و با HincII نیز دو باند DNA (۱۳۱۴ و ۳۰۲ جفت نوکلئوتید) روی ژل مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱. cDNA تکثیر شده ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز با ۱۶۱۶ bp به روش PCR

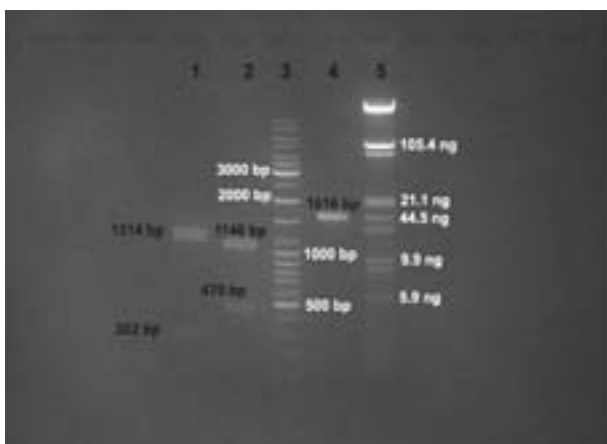
هر ستون ۱/۵ سانتی‌گراد افزایش دما را نشان می‌دهد.

ستون ۱: مارکر DNA

ستون ۲: دمای آنیلینگ ۵۲/۵ سانتی‌گراد

ستون ۳: بهترین دما برای آنیلینگ ۵۵/۵ سانتی‌گراد است.

ستون ۴: دمای آنیلینگ ۶۳ سانتی‌گراد



شکل ۲. آنالیز آنزیمی ژن تکثیر شده گلوکوسربروزیداز با آنزیمهای محدودگر NcoI, HincII

ستون ۱: هضم با آنزیم HincII با دو باند ۱۳۱۴ bp و ۳۰۲ bp

ستون ۲: هضم با آنزیم NcoI با دو باند ۱۱۴۶ bp و ۴۷۰ bp

ستون ۳: مارکر DNA

ستون ۴: ژن تکثیر شده بدون هضم آنزیمی با ۱۶۱۶ bp (کنترل)

ستون ۵: مارکر وزنی DNA

پذیرای genehogs (شرکت اینویترژن) منتقل شد و کشت آنها روی محیط کشت جامد LB آگار حاوی آمپی سیلین انجام گرفت. تعداد ۲۷ کلونی از محیط کشت انتخاب و پلاسمید آنها استخراج شد و با اسپکتروفتومتر تعیین غلظت شد، پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم محدودگر NcoI و الکتروفورز روی ژل آگارز غربالگری شدند.

ایجاد موتاسیون

آنزیم MscI دارای سه جایگاه شناسایی روی پلاسمید نوترکیب در موقعیتهای ۷۵۰، ۱۶۳۹ و ۱۶۸۹ ژن کلون شده (گلوکوسربروزیداز) است. این آنزیم ۹۳۹ جفت نوکلئوتید از بخش میانی ژن را حذف نمود. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورز شد و قطعه DNA بزرگ تر (حاوی ۳۴۰۲ جفت نوکلئوتید) از روی ژل تخلیص شد و دو باره با آنزیم T4 DNA لیگاز دوانتهای آن مجدداً به هم متصل شد، ساختار پلاسمید جدید با عنوان pUCBM۲۱.mG3ba.ΔmscI نامگذاری شد.

ترادف یابی

۴۰۰ نانوگرم از ساختارهای پلاسمیدی ژن اصلی pUCBM۲۱.mGba و ژن موتان (pUCBM۲۱.mG3ba.ΔmscI) به صورت جداگانه با پرایمرهای عمومی ۱۳ m توسط دیپارتمان ملکولار بیولوژی دانشگاه لیدن ترادف یابی شدند و آنالیز با نرم افزارهای Chromas و Multialin انجام گرفت.

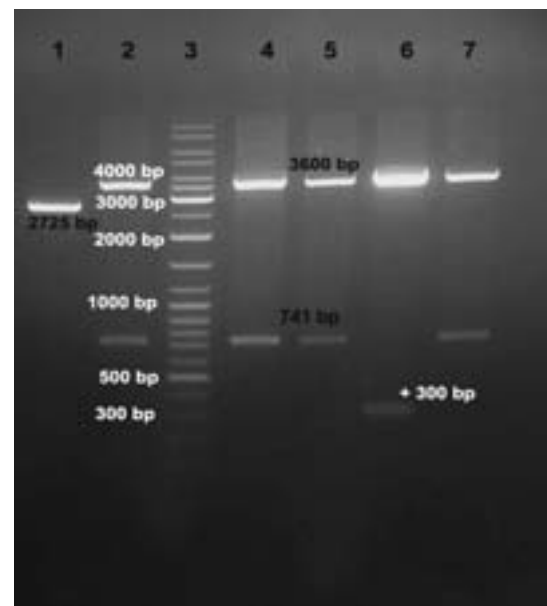
یافته‌ها

سنتز cDNA و تکثیر آن با روش PCR

غلظت RNA استخراج شده ۶/۵۵ میکروگرم در میکرولیتر بود که ۲ میکروگرم آن برای سنتز cDNA ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز استفاده شد و برای تکثیر آن هم روش PCR استفاده شد (شکل ۱). محصول PCR (حاوی جفت ۱۶۱۶ نوکلئوتید) با آنزیمهای NcoI و HincII هضم شد. از هضم آنزیمی با NcoI دو باند DNA (۱۱۴۶ و ۴۷۰ جفت نوکلئوتید)

کلونینگ

از کلونیهای کشت داده شده مقدار ۱/۳۴ میکروگرم در میکرولیتر پلاسمید استخراج شد. آنالیز پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم NcoI نشان داد که از ۲۷ پلاسمید، ۵ پلاسمید نوترکیب بودند. پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم EcoRV آنالیز شدند که در نهایت ۴ پلاسمید (دارای باندهای ۳۶۰۰ و ۷۴۱ جفت نوکلئوتید) انتخاب شدند (شکل ۳). چهار پلاسمید نوترکیب مجدداً با سه آنزیم AatII, EcoRV, PstI آنالیز شدند و صحیح بودن آنها تأیید شد (شکل ۴).



شکل ۳. آنالیز آنزیمی ژن تکثیر شده گلوکوسریبروزیداز با آنزیمهای محدودگر NcoI, HincII

ستون ۱: هضم با آنزیم HincII با دو باند ۱۲۱۴ bp و ۳۰۲ bp
 ستون ۲: هضم با آنزیم NcoI با دو باند ۱۱۴۶ bp و ۴۷۰ bp
 ستون ۳: مارکر DNA
 ستون ۴: ژن تکثیر شده بدون هضم آنزیمی با ۱۶۱۶ bp (کنترل)
 ستون ۵: مارکر وزنی DNA

ایجاد موتاسیون

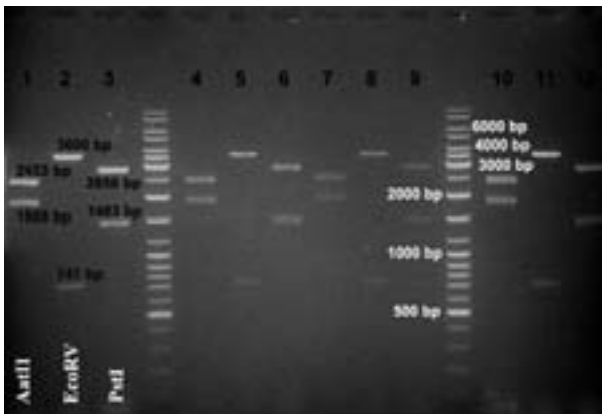
پس از هضم ساختار پلاسمیدی با آنزیم MscI، ۹۳۹ جفت نوکلئوتید از سکانسهای میانی ژن یعنی از نوکلئوتید ۴۲۸ تا نوکلئوتید ۱۳۶۶ (از اسید آمینه ۱۴۳ تا ۴۵۵) حذف شد. باقیمانده پلاسمید دوباره با آنزیم T4DNA ligase به صورت

حلقوی درآمد. این حذف ژنی به صورتی انجام گرفت که پس از نسخه برداری، ترجمه ژن بدون توقف یا تغییر اسیدهای آمینه ادامه می‌یابد.

No.415...CGG GTA CCC ATG GCC AGT TGT GAC ... No. 438
 No.139... Arg. Val. Pro. Met. Ala. Ser. Thr. Asp. ... No. 146
 الف) توالی اسید آمینه‌های بخش ابتدایی ژن قبل از ایجاد موتاسیون

No.1354...GTG GCG TTG GTG GCC AGT GAG AGC...No. 1377
 No.452... Val. Ala. Leu. Val. Ala. Ser. Glu. Ser. ...No. 459
 ب) توالی اسید آمینه‌های بخش پایانی ژن قبل از ایجاد موتاسیون

No.415...CGG GTA CCC ATG GCC AGT GAG AGC... No. 1377
 No.139...Arg. Val. Pro. Met. Ala. Ser. Glu. Ser....No. 459
 ج) توالی اسید آمینه‌ها پس از ایجاد موتاسیون و اتصال بخش ابتدایی به بخش انتهایی



شکل ۴. آنالیز چهار نمونه پلاسمید نوترکیب با سه آنزیم AatII, EcoRV, PstI

ستونهای ۱، ۴، ۷ و ۱۰ هضم شده با آنزیم AatII با دو باند ۲۴۵۳ bp و ۱۸۸۸ bp
 ستونهای ۲، ۵، ۸ و ۱۱ هضم شده با آنزیم EcoRV با دو باند ۳۶۰۰ bp و ۷۴۱ bp
 ستونهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ هضم شده با آنزیم PstI با دو باند ۲۸۵۸ bp و ۱۴۸۳ bp

ترادف یابی

بعد از آنالیز سکانس ژن مشخص شد یک موتاسیون نقطه ای خاموش در نوکلئوتید ۷۶۴ ژن اصلی (اسید آمینه ۲۵۵) وجود

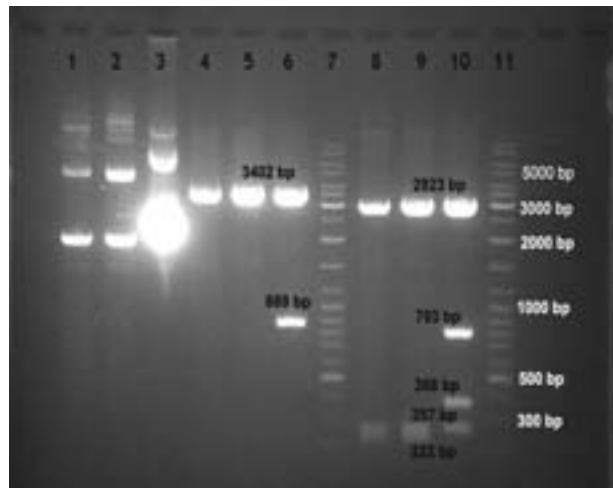
حیوان، این پروژه طوری طراحی شد که با ایجاد موتاسیون در یک ژن و انتقال آن به سلولهای جنینی به سادگی بتوان آن را در حیوان ردیابی نمود. بدین منظور آنزیم گلوکوسربروزیداز انتخاب شد که سلامت آن با سلامت ظاهری حیوان ارتباط مستقیم دارد. بیوستز گلوکواسفنگولپید که جزء اصلی تمام غشاهای بیولوژیک است به سرامید وابسته است. این آنزیم پیوندهای بتا گلوکوزیدیک گلوکوسربروزید را قطع و گلوکوز را از سرامید جدا می کند [۳]. سرامید در فعالیتهای مختلف غشای سلول نظیر تمایز، مهاجرت و ارتباطات سلولها با یکدیگر نقش حیاتی دارد [۴]. نقص در عملکرد آنزیم Gba سبب تجمع گلوکوسربروزید در ماکروفاژهای بافتهای مختلف نظیر طحال، کبد، مغز استخوان و غدد لنفاوی می شود و ایجاد بیماری گوشه می کند [۵ و ۶].

طی این تحقیق ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در آزمایشگاه در داخل وکتور pUCBM21 کلون شد و سپس در آن موتاسیون ایجاد شد. پلاسمید pUCBM21 نسخه کامل تر پلاسمیدهای pUC است که برای انجام کلونینگ کارآیی خوبی دارند [۱۵]. ترادف ژن کلون شده با ترادفی که اُنیل (O'Neill) در سال ۱۹۸۹ از موش ارائه نمود [۱۱] مطابقت دارد. لازم به ذکر است که کارستا (Carstea) نیز در سال ۱۹۹۲ ژن Gba موش را در پلاسمید pUC19 کلون نمود و با مقایسه ای که با ترادف ژن انسان انجام داد موقعیت همه اگزونها ی ژن را در انسان و موش یکسان ذکر نمود [۱۶]. با توجه به وجود تشابه در مشخصه های ژن این آنزیم در انسان و موش، از الگوی کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موش و ایجاد موتاسیون و همچنین انتقال و بیان آن در مطالعات آینده می توان استفاده نمود. موتاسیونی که در ژن ایجاد شده است موجب کوتاهتر شدن طول آن شده و هرگاه ساختار فوق به حیوان آزمایشگاهی منتقل شود با روش PCR به آسانی قابل ردیابی خواهد بود. با توجه به مقدار پلاسمید استخراج شده، می توان اظهار داشت وکتور و سلولهای پذیرای مورد استفاده در این تحقیق مناسب بوده اند.

تقدیر و تشکر

قسمتی از هزینه این تحقیق توسط شبکه پزشکی مولکولی

دارد که در مرحله PCR ایجاد شده است. این موتاسیون سبب تغییر نوکلئوتید ۷۶۴ می شود (نوکلئوتید g به a تغییر می یابد) که کدون ACg به ACa تبدیل می شود که هردو کدون اسید آمینه ترونین هستند و اختلالی در بیان ژن ایجاد نمی شود. آنالیز آنزیمی ساختارهای پلاسمیدی اصلی و موتان با آنزیمهای MscI و KpnI انجام شد و صحت آنها تایید شد (شکل ۵).



شکل ۵. آنالیز آنزیمی و مقایسه پلاسمیدهای نو ترکیب بدون موتاسیون (mGba) و موتان یافته (mGba.ΔMscI) با آنزیم های KpnI و MscI

ستونهای ۱ و ۲ پلاسمیدهای موتان یافته بدون هضم آنزیمی ستون ۳ پلاسمید بدون موتاسیون و بدون هضم آنزیمی ستون ۴ و ۵ پلاسمید موتان یافته و ستون ۶ پلاسمید بدون موتاسیون که همگی با آنزیم MscI هضم شده اند، باند ۸۸۹ bp در ژن موتان یافته دیده نمی شود. ستونهای ۷ و ۸ پلاسمید موتان یافته و ستون ۹ پلاسمید بدون موتاسیون که همگی با آنزیم KpnI هضم شده اند، باندهای ۷۹۳ bp، ۳۶۸ bp در ژن موتان یافته دیده نمی شود.

بحث

با وجود اینکه بیش از یک دهه از انتقال DNA نو ترکیب به سلولهای یوکاریوتی به منظور ژن درمانی می گذرد، تا رسیدن به نتایج مطلوب هنوز مشکلات زیادی احساس می شود [۲]. پیدا کردن حیوانی که نقص آنزیمی داشته باشد و ژن ترمیم یافته را به آن منتقل کنیم مشکل است بنابراین برای فراهم کردن مقدمات ژن درمانی در آزمایشگاه و انتقال ژن ترمیم یافته به

و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است که نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین مراکز فوق اعلام می‌دارند.

کشور تامین شده است و کارهای آزمایشگاهی آن نیز به طور مشترک در بخش ژن درمانی دپارتمان بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه لیدن هلند و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی

References

1. **Romano G, Micheli P, Pacilio C**, Latest developments in gene technology: Achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem cells* 2000; 18: 1. 19-39.
2. **Romano G, Pacilio C, Giordano A**, Gene transfer technology in therapy: Current applications and future goals. *Stem cells* 1999; 17: 4. 191-202.
3. **Schwartzmann G, Sandhoff K**, Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry* 1990; 29: 10865-10871.
4. **Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL**, A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *PNAS* 1999; 96: 16. 9142-9147.
5. **Fost M, Aerts JMF, Hollak CEM**, Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Netherlands* 2003; 61:1. 3-8.
6. **Park Jk, Orvisky E, Tayebi N, Kaneski C, Lamarca ME, Stubblefield BK, Martin BM, Schiffmann R, Sidransky E**, Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup. *Pediatr Res* 2003; 53: 3. 387-395.
7. **Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL**, Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *clin. Invest* 2003; 9: 1215-1221.
8. **Orvisky E, Sidransky E, McKinney CE, Lamarca ME, Samimi R, Krasnewich D, Martin BM, Ginns EI**. Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestation. *Pediatr Res.* 2000; 48: 2. 233-237.
9. **Torralba MA, Alfonso P, Perez-Calvo JI, Cenarrbo A, Pastores GM, Giraldo P, Civerira F., Pocovi M**, High prevalence of the 55-bp deletion (c.1263del155); in exon 9 of the glucocerebrosidase gene cause misdiagnosis (for homozygous N370S (c.1226A>G) mutation) in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 1. 35-40.
10. **Mao R, O'Brien JF, Rao S, Schmitt E, Roa B, Feldman GL, Spence WC, Snow K**, Identification of a 55-bp deletion in the glucocerebrosidase gene in Gaucher disease: phenotypic presentation and implication for mutation detection assays. *Mol Genet Metab* 2001; 72: 3. 248-253.
11. **O'Neill RR, Tokoro T, Kozak CA, Bradley RO**, Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. *PNAS.* 1989; 86: 13. 5049-5053.
12. **Grabowski GA**, Gaucher disease: Gene frequency and genotype/phenotype correlation. *Gene Test.* 1997; 14: 234-256.
13. **Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E**. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *PNAS.* 1985; 82: 21. 7289-7293.
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Nucleotide, search for (glucocerebrosidase NM_008094)
15. **Karlovsy P, Prell HH**, Screening of pUC plasmid clones for inserts based on growth rate (without X-gal). *Nucleic Acid Res.* 1987; 15: 16. 6753.
16. **Carstea ED, Murray GJ, O'Neill RR**, Molecular and functional characterization of the murine glucocerebrosidase gene. *Biochem and Biophys Res Commun.* 1992; 184: 3. 1477-1483.