ارزیابی کارآیی پلاسمیدهای pIRES2-EGFP و pcDNA3-hBDNF-v5 در ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE با استفاده از الکتروپوریشن

فردین فتحی Ph.D.[1]*، تقی طریحی Ph.D.[2]، سید جواد مولی Ph.D.[3]، منصوره موحدین Ph.D.[2]

۱. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۳. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

* آدرس مکاتبه: سنندج، صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶، دانشگاه علوم پزشکی کردستان ، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email: Farfath@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۸/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۱۱/۳۰

* **هدف:** ارزیابی کارآیی پلاسمیدهای pIRES2-EGFP و pcDNA3-hBDNF-v5 در ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE با استفاده از روش الکتروپوریشن

* **مواد و روش‌ها:** ابتدا حامل‌های پلاسمیدی مذکور به داخل باکتری‌های مستعد DH5α ترانسفورم و پس از تکثیر و خالص‌سازی آنها به روش ماکسی‌پرپ، با روش الکتروپوریشن به داخل سلول‌های بنیادی رویانی ترانسفکت شدند. برای تایید بیان ژن پروتیین فلورسنت سبز از میکروسکوپ معکوس فلورسنت و برای تایید بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز از واکنش رونویسی معکوس استفاده شد.

* **یافته‌ها:** بیان ژن پروتیین فلورسنت سبز از طریق مشاهده سلول‌های ترانسفکت شده با میکروسکوپ فلورسنت تایید شد و به منظور تایید بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، RNAی کل از سلول‌های ترانسفکت شده استخراج شد و به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز، به ترتیب تحت ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت. با انجام واکنش رونویسی معکوس، mRNAی به دست آمده به cDNA ترجمه و محصول به دست آمده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. هر دو تکنیک، انجام موفقیت‌آمیز ترانسفکشن سلول‌ها را با هر دو حامل پلاسمیدی تایید کرد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از بررسی‌های سلولی و مولکولی در این پژوهش نشان داد که پروموتور سیتومگالوویروس در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز یافته فعال بود و سلول‌های بنیادی رویانی سلول‌های مناسبی جهت انتقال ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز هستند.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی رویانی، الکتروپوریشن، پروتیین فلورسنت سبز، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۳۰-۲۳

مقدمه

سلول‌های بنیادی رویانی

سلول‌های بنیادی رویانی(ES: Embryonic Stem Cells) برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ جداسازی شدند (۱، ۲). این سلول‌ها به صورت ابزار قدرتمندی در فرآیندهایی نظیر تولید موش‌های ترانس‌ژنیک، مهندسی بافت، بیولوژی تکاملی، مطالعات مربوط به تمایز سلولی و نیز به صورت یک منبع سلولی جذاب جهت سلول درمانی و ژن درمانی در نظر گرفته می‌شوند (۳). همچنین از طریق فرآیند هدف‌گیری ژنی(Gene targeting) جهت ایجاد مدل‌های آزمایشگاهی بیماری‌های انسانی و به تبع آن تکامل استراتژی‌های درمانی به کار می‌روند (۴، ۵، ۶). فاکتورهای رونویسی متعددی شناسایی شده‌اند که این فاکتورها روند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی، سلول‌های مترشحه جزایر پانکراس، هپاتوسیت‌ها و نورون‌ها را تنظیم می‌کنند (۷، ۸، ۹). بیان اکتوپیک این فاکتورها منجر به تحریک سلول‌های بنیادی و تمایز آنها به سلول‌های مختلف می‌شود (۱۰، ۱۱). در این راستا الکتروپوریشن و لیپوفکشن روش‌های کاملا شناخته شده‌ای هستند که از آنها جهت ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی رویانی موش استفاده می‌شود (۶). لیپوفکشن کارآیی کمی در ترانسفکشن بعضی از رده‌های سلولی از جمله بعضی از رده‌های سلول‌های بنیادی رویانی دارد. این مساله ناشی از وجود موانع و سدهای داخل سلولی نظیر اندوسیتوز ضعیف، لوکالیزاسیون هسته‌ای ضعیف DNA ترانسفکت شده است (۳، ۱۲، ۱۳). سلول‌های بنیادی رویانی به سختی لیپوفکت شده و اکثر لیپیدهای تجاری در دسترس یا کارآیی ترانسفکشن پایینی دارند و یا

اینکه منجر به مسمومیت بالای سلولی می‌شوند (۱۳). الکتروپوریشن همواره به عنوان یک روش آلترناتیو مطرح بوده و مشخص شده است این روش در مقایسه با روش‌های مبتنی بر به کار گیری لیپوزوم‌ها کارآیی ترانسفکشن بیشتری دارد (۶، ۱۴). الکتروپوریشن قادر به ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی رویانی است؛ اگرچه میزان زنده ماندن سلول‌ها بعد از الکتروپوریشن حدود ۱۰درصد گزارش شده است (۱۵). به طور کلی روش‌های ترانسفکشن با کارآیی‌های مختلف در بیان ترانس ژن‌ها در سلول‌های بنیادی رویانی موثرند. گزارش‌هایی در زمینه ترانسفکشن سلول‌ها با پروتیین فلورسنت سبز (Green Flourescent Protein: GFP) وجود دارد که نتایج آنها احتمالا به خاطر به کارگیری پلاسمیدهای مختلف، رده‌های سلولی بنیادی مختلف و یا سیستم‌های ترانسفکشن غیرمشابه، یکسان نبوده است (۶، ۱۶، ۱۷).

چانگ و همکاران در گزارش خود اظهار کرده‌اند که پروموتور (Cytomegalovirus: CMV) در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز نیافته غیر فعال است (۱۶). در حالی که نتایج وارد و استرن نشان داد که پلاسمید حاوی پروموتور CMV در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز نیافته فعال و قادر به گرفتن بیان ترانس‌ژن است (۱۷). ناهم‌خوانی نتایج گزارش شده ممکن است ناشی از پلاسمیدهای مختلف استفاده شده یا روش ترانسفکشن باشد. در این پژوهش پلاسمیدهای pIRES2-EGFP و pcDNA3-hBDNF-v5 برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE به کار گرفته شدند.

هر دو پلاسمید دارای پروموتور یکسان CMV بود و از روش یکسان الکتروپوریشن برای ترانسفکشن آنها استفاده شد. پلاسمید pIRES2-EGFP به سبب داشتن بخش ires، مشابه پلاسمید مورد استفاده در مطالعه چانگ و همکاران بود. به عبارت دیگر هدف از این پژوهش ارزیابی کارآیی پلاسمیدهای pIRES2-EGFP و pcDNA3-hBDNF در ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE با استفاده از روش الکتروپوریشن بود.

نظر به اینکه نتایج مطالعات قبلی (۱۶، ۱۷) در مورد به کارگیری پلاسمیدهای حامل ژن GFP و دارای پروموتور CMV در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز نیافته متناقض بود، نتایج این مطالعه به رفع تناقض موجود تا حدودی کمک می کند.

همچنین استفاده از ژن پروتیین فلورسنت سبز جهت نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی و استفاده از این سلول‌ها برای درمان یا تمایز سلولی یکی از راههایی است که به شدت مورد توجه محققان بوده است. لذا انجام پژوهش بیشتر جهت رفع مشکلات موجود بر سر راه ترانسفکشن سلول‌های بنیادی از طریق به کار گیری پلاسمیدها و رده‌های سلولی موجود اهمیت زیادی دارد.

از طرف دیگر دریافت بیان ژن فاکتور رشد مشتق از مغز، از سلول‌های بنیادی، به لحاظ تاثیری که این ژن در بهبود بعضی از بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون دارد، از نقطه نظر دستورزی سلول‌های بنیادی و به‌کارگیری آنها در ژن درمانی اهمیت دارد (۱۸).

مواد و روش‌ها

تکثیر و تخلیص پلاسمیدها

به منظور تکثیر و تخلیص پلاسمیدها (تهیه شده از مرکز IRCM کانادا) به ترتیب مراحل ترانسفورمیشن، مینی‌پرپ و ماکسی‌پرپ انجام شد. در مرحله ترانسفورمیشن، باکتری مستعد DH5-α (Competent) توسط روش شوک حرارتی (مطابق بروشور همراه باکتری (Subcloning Efficiency DH5-α Competent Cells: GibcoBRL) ترانسفرم و در مرحله بعد باکتری‌های ترانسفرم شده در مقیاس پایین تکثیر شدند. به این منظور ابتدا باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی محیط کشت جامد انتخابی (Luria–Bertani medium: LB) که حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب بود کشت داده شد. سپس یک کلونی از باکتری ترانسفرم شده به مدت ۱۶ ساعت در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع تکثیر و پس از روش جوشاندن برای استخراج پلاسمیداز یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری استفاده شد (۱۹). محصول استخراج شده از طریق هضم آنزیمی (مطابق نقشه پلاسمید) و انتقال محصول هضم بر روی ژل آگارز بررسی شد. پس از اطمینان یافتن از ترانسفرم شدن باکتری به وسیله پلاسمید مورد نظر، بقایای محیط کشت مینی‌پرپ شده در مقیاس بالا تکثیر شد. آنگاه با استفاده از کیت کیاژن (Endotoxin free) پلاسمید تکثیر شده استخراج و این محصول مجددا از طریق هضم آنزیمی و انتقال محصول هضم بر روی ژل آگارز بررسی شد. پلاسمیدهای تکثیر شده در آب مقطر محلول و برای الکتروپوریشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE استفاده شدند. برای کسب اطمینان از صحت پلاسمیدهای مورد استفاده، از آنزیم‌های محدودکننده مناسب برای برش آنها استفاده شد. با توجه به نقشه آنزیمی پلاسمیدها، انتخاب آنزیم‌ها به گونه‌ای صورت گرفت که نهایتاً پس از برش، پلاسمیدها به دو قطعه مختلف تبدیل شوند. برای هر دو پلاسمید واکنش هضم در حجم ۲۰میکرولیتر و روی ۱میکروگرم از محلول DNA و با استفاده از ۱ یونیت آنزیم انجام شد. برای پلاسمید PIRES2-EGFP آنزیم‌های BamHI و HpaI و برای پلاسمید pcDNA3-hBDNF v5 از آنزیم‌های BamHI و EcoNI استفاده شد. آنزیم EcoNI ژن فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF: Brain derived neurothrophic factor) را بر روی پلاسمید برش می‌دهد. واکنش هضم به مدت۱ الی ۲ ساعت در دمای مناسب برای عمل آنزیم انکوبه شد و محصول هضم با انجام الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (۱۹).

خطی کردن پلاسمیدها

معمولاً در فرآیند الکتروپوریشن سلول‌ها، به منظور گرفتن بیان دایم ژن از پلاسمید خطی (Linear Plasmid) استفاده می‌شود. پلاسمید pcDNA3-hBDNF v5 با استفاده از آنزیم Bg1II که فقط دارای یک محل برش بر روی پلاسمید بود به شکل خطی در آمد. به روش مشابهی، پلاسمید PIRES2-EGFP نیز با استفاده از آنزیم Bsa1

برش داده شد. محصول هضم برروی ژل آگارز برده شد و پس از اطمینان یافتن از خطی شدن پلاسمید، DNA پلاسمیدی از محصول هضم استخراج شد. جهت انجام این مرحله، از فنل، کلروفرم، اتانول ۱۰۰درصد و اتانول ۷۰درصد به ترتیب برای حذف پروتیین، فنل، رسوب DNA و حذف املاح از محصول نهایی استخراج شده، استفاده شد. به روش اسپکتروفتومتری محصول به دست آمده اندازه‌گیری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- نگهداری شد. معمولاً پس از پایان آزمایش مقداری از DNA اولیه از دست می‌رود.

کشت سلول‌های بنیادی رویانی

در این پژوهش پاساژ بیستم دودمان سلولی CCE (به صورت هدیه از دانشگاه شفیلد تهیه شد) مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت این سلول‌ها از محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی FBS به میزان ۱۵درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد میکرولیتر، استرپتومایسین ۵۰ واحد بر میکرولیتر، ۲ مرکاپتواتانول 5×10^{-5} مولار و LIF باغلظت ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. سلول‌ها در دیش‌های ۶۰ میلی‌متری که کف آنها به وسیله ژلاتین ۰/۱درصد حل شده در بافر فسفات پوشانده شده بود کشت داده شدند (۲۰، ۲۱، ۲۲).

ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی رویانی و گرفتن لاین پایدار

از دستگاه مولتی پوراتور (Eppendorf) برای انتقال پلاسمید به داخل سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها بعد از ۴ الی ۶ بار پاساژ در محیط کشت، هنگامی که در فاز تکثیری خود (۹۰- ۸۰ درصد از مساحت کف ظرف به وسیله سلول‌های تکثیر شده پر شده باشد) قرار داشتند با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵درصد و ۰/۰۲درصد EDTA از کف فلاکس‌ها جدا و برای انجام فرآیند الکتروپوریشن آماده شدند. سلول‌ها به بافر هیپواسمولار منتقل شدند. الکتروپوریشن با استفاده از کیووت (Quvette) ۸۰۰ میکرولیتری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سایر شرایط الکتروپوریشن شامل ۲۵ میکروگرم DNA (pIRES2-EGFP)، زمان پالس ۳۰ میکرو ثانیه، ولتاژ ۱۰۰۰وات و تعداد پالس ۱ بود. پس از الکتروپوریشن بافر حاوی سلول‌ها سریعا به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت سرم دار با دمای ۳۷ درجه اضافه شد و بدون هیچ‌گونه دست‌کاری دیش حاوی سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط کشت سلول‌ها تعویض و بعد از گذشت۲۴ الی ۷۲ ساعت بیان موقت GFP به وسیله میکروسکوپ معکوس فلورسنت بررسی شد. پس از یافتن شرایط مناسب الکتروپوریشن برای پلاسمیدPIRES2-EGFP، پلاسمید مذکور به شکل خطی نیز الکتروپوریت و بعد از ۲۴ ساعت از آنتی‌بیوتیک G418 جهت گرفتن بیان دایم ژن GFP استفاده شد. در مورد الکتروپوریشن سلول‌ها با وکتورپلاسمیدی PcDNA3- hBDNF، از آنجایی که این پلاسمید تقریباً هم اندازه با پلاسمید pIRES-EGFP بود، الکتروپوریشن سلول‌ها با همان شرایطی که در مورد پلاسمید حامل GFP توضیح داده شد انجام گرفت. اما از آنجایی که هدف نهایی از انتقال ژن BDNF به داخل سلول‌ها، گرفتن بیان دایم ژن BDNF از سلول‌ها بود، ابتدا حامل از حالت حلقوی به حالت خطی درآمد و پس از آن به داخل سلول‌ها منتقل شد.

الکتروپوریشن پلاسمید خطی pcDNA3-hBDNF v5 با همان روشی که در مورد پلاسمید pIRES2-EGFP اشاره شد انجام گرفت. در مورد هر دو پلاسمید بعد از گذشت حدود یک هفته فقط سلول‌هایی در محیط کشت رشد کردند که با پلاسمید خطی ترانسفکت شده بودند.

هر ۴۸ ساعت یک‌بار محیط کشت سلول‌ها برای حذف سلول‌های مرده به آرامی تعویض شد و محیط حاوی آنتی‌بیوتیک جدید به سلول‌ها اضافه شد. حدودا بعد از ۱۰ روز کلونی‌های سلولی که در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک G418 قادر به تکثیر بودند رشد و دیش کشت را پرکردند. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، از آنتی‌بیوتیک G418 با غلظت ۴۰۰میکرولیتر بر میلی‌لیتر برای جداسازی سلول‌های ترانسفکت شده استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت سلول‌های مرده ظاهر شد که بعد از گذشت حدود یک هفته کلونی‌های سلولی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط کشت رشد کردند. فقط در مورد سلول‌های ترانسفکت شده با ژن BDNF کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک تکثیر شد و در روز دهم تعداد کافی از سلول‌ها به منظور تایید بیان ژن BDNF برای واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفتند.

تشخیص بیان GFP و BDNF در سلول‌های ترانسفکت شده

تشخیص بیان پروتیین فلورسنت سبز با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon مدل TE-100) صورت گرفت. به این منظور ۴۸ الی ۷۲ ساعت بعد از الکتروپوریشن ظرف حاوی سلول‌ها را به کمک همان میکروسکوپ بررسی کرده و از سلول‌های حاوی GFP با استفاده از فیلترهای FITC و Phase contrast عکس‌برداری شد.

به منظور اطمینان یافتن از صحت انجام روش ترانسفکشن از گروه کنترل هم استفاده شد. در این گروه سلول‌ها با حفظ تمام شرایط ذکر شده الکتروپوریت شدند. به جز اینکه به بافر الکتروپوریشن DNA پلاسمیدی اضافه نشد، نهایتا این سلول‌ها همراه با سلول‌های گروه تجربی تحت بررسی قرار گرفتند.

از روش RT-PCR جهت تایید بیان ژنBDNF استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا با استفاده از محلول RNX (Plus) [سیناژن] RNAی کل را از کلونی‌های سلول‌های ترانسفکت شده‌ای که در حضور آنتی‌بیوتیک G418 تکثیر شده بودند، استخراج و پس از اطمینان یافتن ازکیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری ،جهت تبدیل mRNA مورد نظر به cDNA از پرایمر oligodT (MWG-Biotech AG, .5µg/µl) وآنزیم (Gibco BRL,1000ul) (M-MLV) Reverse Transcriptase استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت.

در تهیه حجم مذکور از بافر تکثیر 5X (Gibco BRL)، مخلوط dNTP (Gibco BRL, .2/mM)، $MgCl_2$ 1.5mM سیناژن) ، ممانعت‌کننده آنزیم RNase Fermentas RNasin 1-2 nM) و آب مقطر استریل استفاده شد. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از بافر تکثیر 10x (Promega) ، مخلوط dNTP (Gibco BRL, .2/mM)، آنزیم DNA پلی‌مراز، Taq polymerase (Promega, 0.025u/µl) $Mgcl_2$, (Promega, 1.5mM) آب مقطر استریل و پرایمر بالا دست (Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات

F: 5′-GAA AGT CCC GGT ATC CAA AG-3′

R: 5′-CCA GCC AAT TCT CTT TTT GC-3′

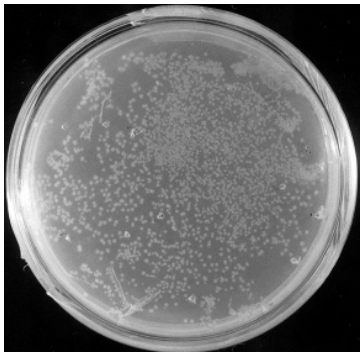
استفاده شد (۲۳). پس از آماده سازی حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط Denaturation ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶/۵ درجه سانتی‌گراد و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد سیکل ۳۵ بار و یک سیکل extention نهایی به صورت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. برای انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ترمال سایکلر (Techne) استفاده شد.

بعد از اتمام واکنش ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

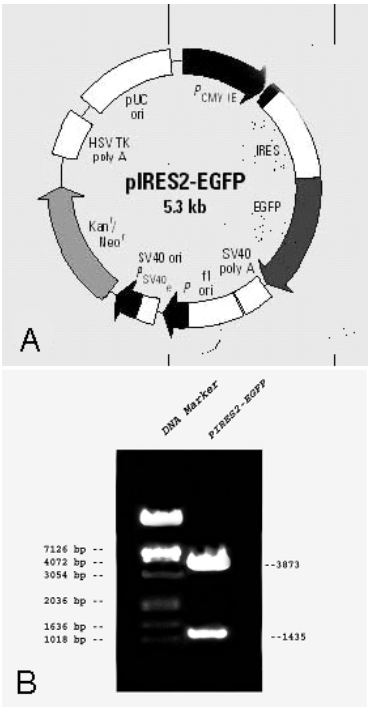
یافته‌ها

بررسی کیفی پلاسمیدهای تکثیر شده با استفاده از هضم آنزیمی و انجام الکتروفورز با ژل آگارز

به منظور تکثیر حامل‌های پلاسمیدی، پلاسمیدها به درون باکتری مستعد ترانسفرم شدند و پس از گرفتن کلونی از باکتری ترانسفرم شده (شکل ۱)، ابتدا به روش مینی پرپ و سپس به روش ماکسی پرپ حامل‌های پلاسمیدی تکثیر و خالص شدند. کمیت و کیفیت حامل‌های پلاسمیدی با استفاده از روش uv اسکپتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. همچنین برای حصول اطمینان از صحت حامل‌های پلاسمیدی الگوی مهاجرت قطعات حاصل از هضم پلاسمید pIRES2-EGFP به وسیله آنزیم‌های BamHI و HpaI تعیین شد. مطابق نقشه پلاسمید هرکدام از آنزیم‌های مذکور دارای یک محل برش بر روی پلاسمید pIRES2-EGFP بوده وانتظار می‌رفت که دو قطعه با اندازه‌های ۱۴۳۵ جفت باز و ۳۸۷۳ جفت باز در اثر برش آنزیمی ایجاد شود. الگوی باندها روی ژل آگارز، مربوط به قطعات حاصل از برش به وسیله آنزیم با الگوی مورد انتظار مطابقت داشت و در بررسی ژل دو باند مربوط به قطعات ۱۴۳۵ جفت باز و ۳۸۷۳ جفت باز مشخص شد (شکل ۲) که این نشان دهنده صحت حامل پلاسمیدی pIRES2-EGFP بود.



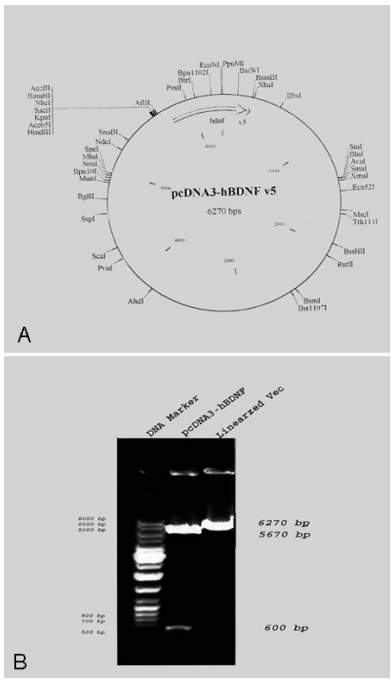
شکل ۱: تصویر مربوط به کلونی‌های باکتری DH5α با پلاسمید pcDNA3-hBDNF ترانسفرم شده‌اند، این کلونی‌ها ۱۸ ساعت پس از انتقال باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی محیط LB جامد و انتخابی که حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین بود تشکیل شدند. یکی از کلونی‌ها برای انجام مینی‌پرپ و پس از آن ماکسی پرپ مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲: A: نمای شماتیک نقشه پلاسمید pIRES2-EGFP که به دلیل دارا بودن ژن پروتیین فلورسنت سبز (به عنوان ژن گزارش‌گر) در این پژوهش جهت بهینه‌سازی روش ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفت. B: الکتروفورز قطعات حاصل از هضم پلاسمید pIRES2-EGFP با آنزیم‌های BamHI و HpaI بر روی ژل آگارز، در اثر برش پلاسمید با آنزیم‌های منکور مطابق نقشه پلاسمید بایستی دو قطعه ۱۴۳۵ جفت باز و ۳۸۷۳ جفت باز ایجاد شود که با انجام الکتروفورز تایید شد (هر کدام از آنزیم‌ها دارای یک محل برش بر روی پلاسمید بودند).

در مورد پلاسمید pcDNA3-hBDNF v5 از آنزیم‌های BamHI و EcoNI برای هضم محصول استخراج استفاده شد. مطابق نقشه پلاسمید هرکدام از آنزیم‌های مذکور دارای یک محل برش بر روی پلاسمید pcDNA3-hBDNF v5 بود و انتظار می‌رفت که دو قطعه با طول‌های ۶۰۰ جفت باز و ۵۶۷۰ جفت باز در اثر برش آنزیمی

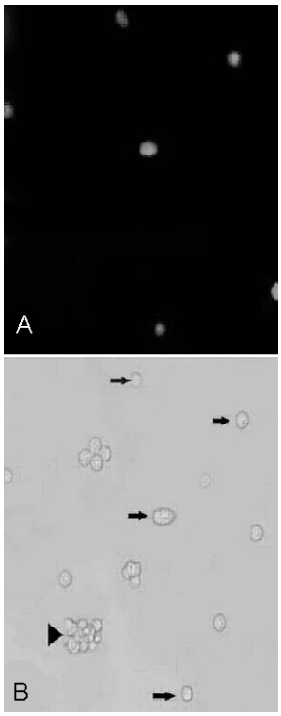
ایجاد شود. نتایج بررسی قطعات با ژل آگارز با الگوی مهاجرت قطعات بر روی ژل همان الگوی مورد انتظار بود. محل برش آنزیم دوم ژنBDNF بود (شکل۳). همچنین صحت فرآیند خطی کردن پلاسمیدها پس از انتقال محصول هضم بر روی ژل آگارز تایید شد.



شکل ۳: A: نمای شماتیک نقشه پلاسمید pcDNA3-hBDNF-v5 که به دلیل دارا بودن ژن BDNF، از آن جهت ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی CCE و تهیه سلول‌های حامل ژن پایدار استفاده شد. B: pcDNA3-hBDNF-v5: الکتروفورز قطعات حاصل از هضم پلاسمید pcDNA3-hBDNF با آنزیم‌های BamHI و EcoNI بر روی ژل آگارز، در اثر برش پلاسمید با آنزیم‌های منکور مطابق نقشه پلاسمید بایستی دو قطعه ۶۰۰۵ جفت باز و ۵۶۷۰ جفت باز ایجاد می‌شد که با انجام الکتروفورز این موضوع تایید شد (هر کدام از آنزیم‌ها دارای یک محل برش بر روی پلاسمید بودند). Linearzed vector: بعد از برش دادن پلاسمید pcDNA-hBDNF با آنزیم Bg1II، پلاسمید از حالت حلقوی به شکل خطی در آمد و طول قطعه ایجاد شده مساوی طول کل پلاسمید بود (۶۲۷۰ جفت باز).

تایید بیان ژن GFP

۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، دیش حاوی سلول‌های ترانسفکت شده به پژوهشکده ابن‌سینا واقع در دانشگاه شهید بهشتی تهران انتقال داده شد و به کمک میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon مدل TE-100) مورد مطالعه قرار گرفت. GFP پروتیینی فلورسنت است که با تابش نور آبی (محدوده طول موج ۴۵۰ تا ۴۹۰ نانومتر با پیک تحریک در ۴۸۸ نانومتر) به آن، تحریک می‌شود و از خود نور سبز ساطع می‌کند. بنابراین سلول‌هایی که ترانسفکت شده باشند با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت قابل مشاهده‌اند (شکل A۴). بیان GFP در درصد خیلی کمی (حدود ۰/۵ درصد) از سلول‌ها قابل رویت بود. تصویر، سلول‌های با فیلتر فاز کنتراست و همان میدان سلولی را با فیلتر فلورسانس نشان می‌دهد (شکل B۴). سلول‌هایی که ترانسفکت نشده‌اند در تصویر فازکنتر است دیده می‌شوند اما در تصاویر فلورسنت میکروسکوپی قابل رویت نیستند (شکل A۴ و B).

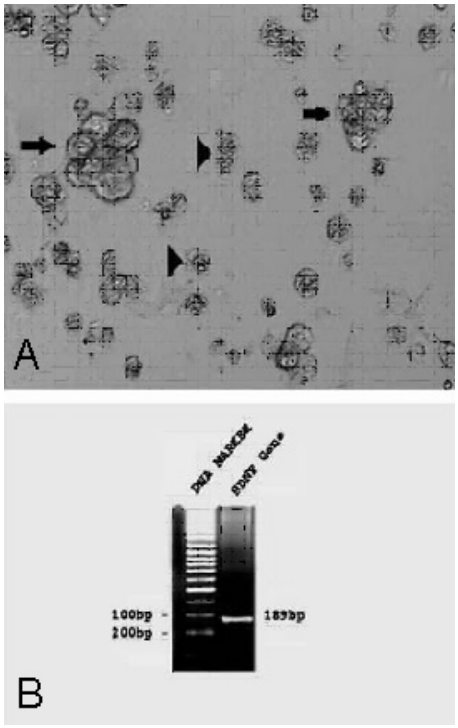


شکل ۴: تصویر سلول‌های بنیادی رویانی CCE با میکروسکوپ معکوس فلورسنت و فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی ×۲۰۰)، A: سلول‌های فلورسنت با تابش نور آبی به رنگ سبز دیده می‌شدند. B: همان میدان که با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شده است. پیکان به سلول‌های ترانسفکت شده با GFP و نوک پیکان به سلول‌هایی اشاره می‌کند که ترانسفکت نشده‌اند و لذا هنگام مشاهده با میکروسکوپ معکوس فلورسنت دیده نمی‌شوند.

سلول‌های ترانسفکت شده به سرعت طی روزهای بعد بیان GFP را از دست می‌دهند. همچنین درصد زیادی از سلول‌های ترانسفکت شده‌ای که بیان ژن GFP در آنها مشاهده شد سلول‌های شبه عصبی بودند که به صورت خودبه‌خودی (Spontaneous differentiation) متمایز شده بودند.در گروه کنترل که سلول‌ها بدون پلاسمید الکتروپوریت شده بودند سیگنال فلورسنت در هیچ‌کدام از آنها مشاهده نشد.

گرفتن لاین پایدار وتایید بیان ژن BDNF

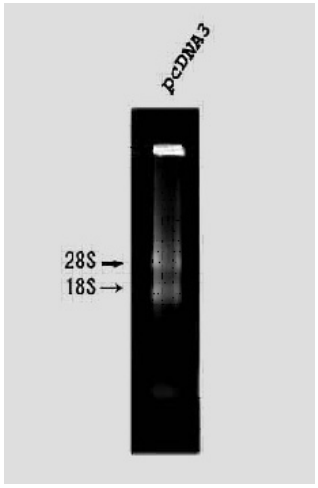
در مورد سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3-hBDNFv5 پس از ترانسفکشن، جهت جداسازی آنها از سایر سلول‌ها از آنتی‌بیوتیک G418 استفاده شد. از آنجایی که این آنتی‌بیوتیک روند پروتیین‌سازی را در سلول‌ها مختل می‌کند پس از اضافه کردن آن به محیط کشت سلول‌ها، فقط سلول‌هایی قادر به رشد و تکثیر هستند که با پلاسمید مذکور حاوی ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک G418 ترانسفکت شده باشند (شکل A۵).



شکل ۵: ترانسفکشن پایدار سلول‌های بنیادی رویانی CCE با ژن BDNF. A: بعد از الکتروپوریشن سلول های بنیادی رویانی CCE، اضافه کردن آنتی‌بیوتیک G418 به محیط کشت سلول‌ها باعث مرگ سلول‌های ترانسفکت نشده (نوک پیکان) شد، سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3-hBDNF (پیکان) زنده مانده و تکثیر شدند. B: انجام واکنش رونویسی معکوس بر روی RNAی استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و تکثیر یافته در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک G418، بیان ژن BDNF را تایید کرد.

به تدریج فقط سلول‌هایی در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک G418 رشد کردند که ژن ترانسفکت شده وارد ساختمان کروموزومی آنها شده بود. سایر سلول‌ها قادر به رشد نبودند و مردند. محیط کشت سلول‌ها که مرتبا با لاشه سلول‌های مرده پر می‌شد (شکل A۵) هر دو روز یک‌بار تعویض شد تا رشد و تکثیر سلول‌های ترانسفکت شده با مشکلات ناشی از آلودگی محیط با سلول‌های مرده، مواجه نشود. سلول‌های ترانسفکت شده به تدریج تکثیر شدند و کلونی‌هایی را در محیط کشت تشکیل دادند. پس از گذشت حدود ۱۰روز فقط سلول‌هایی در محیط کشت باقی ماندند که ترانس ژن و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک به داخل ساختمان کروموزومی آنها وارد شده باشد. این سلول‌ها که قادر بودند به طور دایم ژن فاکتور رشد عصب را بیان کنند به منظور انجام واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR) و پس از آن عمل پیوند تکثیر شدند. در مورد سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pIRES2-EGFP اگر چه در تعداد کمی از آنها بیان ژن GFP مشاهده شد اما پس از گذشت چند روز به تدریج بیان ژن در سلول‌های ترانسفکت شده از دست رفت و هنگامی که کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط کشت رشد می‌کردند کلونی‌های مذکور اگرچه مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند اما بیان ژن GFP در آنها مشاهده نشد.

به منظور تایید بیان ژن BDNF ترانسفکت شده، از روش RT-PCR استفاده شد. به همین منظور کل RNA از سلول‌های حاصل از تکثیر کلونی‌های سلولی مقاوم به آنتی‌بیوتیک G418 در شرایط RNAase free استخراج شد و کمیت و کیفیت RNAی به دست آمده به کمک اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. در بررسی ژل دو باند مربوطه به RNA S18 و RNA S28 به وضوح مشاهده شد که نشان‌دهنده عدم تجزیه RNA است (شکل۶). همچنین نسبت به دست آمده برای A260 /A280 نشان دهنده درجه بالای خلوص RNA و عدم آغشتگی آن با پروتیین و DNAی ژنومی بود. سپس واکنش RT روی RNA استخراج شده و به دنبال آن واکنش PCR روی محصول RT انجام شد. الکتروفورز محصول PCR باندی را نشان داد که اندازه آن معادل با اندازه قطعه طراحی شده (189 bp) بود (شکل B۵).



شکل ۶: الگوی باندینگ RNA سالم و دست‌نخورده، باندهای ۱۸S و ۲۸S به وضوح مشاهده شده و نمونه از حداق

بحث

در فرآیند انتقال ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتی و خصوصا الکتروپوریشن عوامل مختلفی موثر است که از جمله آنها می‌توان به نوع سلول، تعداد سلول‌های مورد استفاده برای هر بار الکتروپوریشن، تعداد پاساژ سلول‌ها بعد از ذوب شدن، کیفیت و کمیت پلاسمیدها، زمان پالس، ولتاژجریان الکتریکی، دمای محیط در هنگام آزمایش و اسمولاریته بافر مورد استفاده برای انتقال سلول‌ها به دستگاه، اشاره کرد. در سایت اینترنتی شرکت سازنده دستگاه‌های الکتروپوریشن، در کتابچه راهنمای دستگاه یا مقالات معتبر دیگر اکثر پارامترهای ضروری جهت الکتروپوریشن بعضی از دودمان های سلولی ثبت شده است. این پارامترها که با انجام تحقیقات مکرر به دست آمده، می‌تواند به میزان بالایی مورد استفاده محققین بعدی قرار گیرد. اگرچه تجربه نشان داده است که دودمان سلولی CCE دودمان مناسبی جهت گرفتن بیان موقت یا دایم بعضی از ژن‌ها است (۲۴) اما از آنجایی‌که دودمان سلولی مذکور

تا به حال با پلاسمیدها و ژن‌های مذکور و همچنین دستگاه مولتی پوراتور ترانسفکت نشده بود، بخشی از فعالیت‌های انجام شده در این پژوهش به یافتن پارامترهای مناسب جهت الکتروپوریشن سلول‌ها با استفاده از دستگاه مذکور اختصاص داده شد که نهایتا پارامترهای مناسبی جهت الکتروپوریشن سلول‌ها به دست آمد.

دراین پژوهش ترانسفکشن پایدار (Stable transfection) سلول‌های CCE با استفاده از پلاسمید PIRES2-EGFP عملی نشد، به طوری که پس از مشاهده سلول‌های ترانسفکت شده با پروتیین فلورسنت سبز، گرفتن کلونی‌هایی که به طور دایم این پروتیین را بیان کنند امکان‌پذیر نبود. اگر چه کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک G418 در محیط کشت رشد می‌کردند. اما هیچ‌کدام از کلونی‌ها پروتیین فلورسنت سبز را بیان نمی‌کردند. نتایج مشابهی پس از پنج بار تکرار به دست آمد.

چانگ و همکاران گزارش کرده‌اند که به کار گیری پلاسمید حاوی ژن پروتیین فلورسنت سبزی (GFP) که پروموتور آنها CMV است، برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی مناسب نیست و پروموتور مذکور در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز نیافته، به شکل غیرفعال باقی می‌ماند و فقط در درصدی از سلول‌های تمایز یافته و پیش‌ساز عصبی پروموتور فعال بوده و ژن گزارش‌گر بیان می‌شود (۱۶). در این پژوهش هم علاوه بر اینکه درصد سلول‌های ترانسفکت شده خیلی پایین بود اکثر سلول‌هایی که بیان GFP در آنها مشاهده شد سلول‌های تمایز یافته با مورفولوژی شبه عصبی (تمایز خود به خودی) بودند. پلاسمید و رده‌های سلولی مورد استفاده در تحقیق آنها شامل pIRES-hrGFP و سلول‌های بنیادی رویانی D3 و J1 بود. متعاقب این گزارش وارد و استرن نتایج مطالعه قبلی را غیرقابل قبول خوانده و اظهار کردند پروموتور CMV پروموتوری است که برای رده‌های سلولی متنوعی استفاده می‌شود. این محققین با به کار گیری پلاسمید pEGFP-N1 (حاوی پروموتور CMV) و پنج دودمان سلولی ES (BL/6III, D3, E14TG2a, MESC20 & 129) نشان دادند که بیان GFP در تمام این سلول‌ها مشاهده شده و کارآیی ترانسفکشن در آنها بیشتر از ۵۰ درصد بود (۱۷). هر دو گروه از روش لیپوفکشن برای گرفتن بیان موقت از سلول‌ها استفاده کردند. این گروه پس از بررسی دلایل احتمالی تفاوت نتایج مطالعه خود با نتایج مطالعه چانگ به این نتیجه رسیدند که احتمالاً پلاسمیدهای حاوی بخش IRES برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی مناسب نیستند و متفاوت بودن نتایج آنها ممکن است به تفاوت در پلاسمیدهای به کار رفته شده برگردد. اگرچه وارد و استرن همچنین اظهار کردند در تحقیقی که گزارش آن را منتشر نکرده‌اند توانسته‌اند با کمک پلاسمید pIRESneo2 به طور موفقیت‌آمیزی سلول‌های بنیادی رویانی را ترانسفکت کنند (۱۷). در همین ارتباط لازم به ذکر است که پلاسمید pIRESneo2 دارای یک تفاوت اساسی با پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق یعنی pIRES2-EGFP است. به طوری که دارای بخشی به نام IVC است که طبق توضیحات شرکت سازنده این بخش که یک ایترون سنتتیک است و باعث افزایش پایداری mRNA می‌شود (Clonetech). از آنجایی که دودمان سلولی D3 در هر دو مطالعه مورد استفاده واقع شد، احتمالاً نوع دودمان سلولی نمی‌تواند عامل مهمی در کسب نتایج متفاوت توسط محققین مذکور باشد. پلاسمید مورد استفاده در این پژوهش حاوی پروموتور CMV و بخش IRES بود. مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج مطالعات مذکور نشان می‌دهد که پلاسمید PIRES2-EGFP به کار گرفته شده در این پژوهش قادر به ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی با کارآیی بالا نبوده و علت احتمالی آن وجود بخش IRES در ساختمان پلاسمید است و نه پروموتور CMV. لازم به ذکر است نتایجی که در این پژوهش در ترانسفکشن پایدار سلول‌های CCE با استفاده از پلاسمید pcDNA3-hBDNF-v5 (حاوی پروموتور CMV) کسب شد، گواه دیگری بر مناسب بودن پروموتور CMV برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی رویانی و فعال بودن آن در این سلول‌ها است که نتایج مطالعه وارد و استرن را تایید می‌کند.

از طرف دیگر در پژوهش حاضر، گرفتن لاین پایدار از سلول‌های بنیادی رویانی ترانسفکت شده با ژن BDNF امکان‌پذیر شد که از آن می‌توان برای رسیدن به اهداف درمانی به شکل ژن درمانی و سلول درمانی در بیماری‌های مختلفی مانند پارکینسون استفاده کرد. چرا که نتایج تحقیقات انجام شده تاکنون نشان داده است فاکتور رشد BDNF به شکل In vitro بر روی بهبود سلول‌های دوپامینرژیک موثر است (۱۸).

نتیجه‌گیری

بر اساس این پژوهش می‌توان گفت پروموتور CMV در سلول‌های بنیادی رویانی تمایز یافته فعال است اما پلاسمید pIRES2-EGFP وکتور مناسبی برای ترانسفکشن پایدار سلول‌های بنیادی رویانی نیست.

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از مساعدت‌های خانم‌ها فریبا اسماعیلی،آناهیتا حمیدی و پروانه نیک‌پور و آقایان مجتبی عمادی و محمود فراز، دانشجویان محترم گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس و نیز کارکنان محترم پژوهشکده ابن سینا خصوصاً معاونت محترم پژوهشی جناب آقای دکتر صادقی بهره‌مند شدیم که از ایشان قدردانی می‌شود.

Refrences

1. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292(5819):154-156

2. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci 1981; 78(12):7634-8

3. Ma H, Liu Q, Diamond SL, Pierce EA: Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency. Methods 2004; 33(2):113-120
4. Bradley A, Hasty P, Davis A, Ramirez-Solis R: Modifying the mouse: design and desire. Biotechnol 1992; 10(5): 534-539
5. Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J: Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. Reprod Fertil Dev 1998: 10(1): 31-47
6. Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM: Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. Stem Cells 2004; 22(4): 531-543
7. Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M: Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. Science 1998; 281(5377): 692-695
8. Dohrmann C, Gruss P, Lemaire L: Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. Mech Dev 2000; 92(1): 47-54
9. Xian HQ, Gottlieb DI: Peering into early neurogenesis with embryonic stem cells. Trends Neurosci 2001; 24(12): 685-686
10. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki Ji J, Niwa H: Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. Genes Dev 2002; 16(7): 784-789
11. Ishizaka S, Shiroi A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K: Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. FASEB 2002; 16(11): 1444-1446
12. Ma H, Diamond SL: Nonviral gene therapy and its delivery systems. Curr Pharm Biotechnol 2001; 2(1): 1-17
13. Watanabe M, Shirayoshi Y, Koshimizu U, Hashimoto S, Yonehara S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nakatsuji N: Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control. Exp Cell Res 1997; 230(1): 76-83
14. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F: Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proc Natl Acad Sci 2000; 97(4): 1607-1611
15. Doetschman T, Maeda N, Smithies O: Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci 1988; 85(22): 8583-8587
16. Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS: Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. Stem Cells 2002; 20(2): 139-145
17. Ward CM, Stern PL: The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Stem Cells 2002; 20(5): 472-475
18. Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, Hefti F: Promotion of central cholinergic and dopaminergic neurons differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 961-965
19. Sambrook J, Russell DV: Molecular cloning. A Laboratory Manual, New york, Cold spring Harbor Laboratory press 2001
20. Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Matsumura K, Kawasaki K, Shibuya M, Nishikawa SA: chemically defined culture of VEGFR2+ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. Blood 2003; 101(6): 2261-2267
21. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic .lineages Develop 1998; 125: 1747-1757
22. Xian HQ, McNichols E, St Clair A, Gottlieb DI: A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene targeting. Stem Cells 2003; 21(1): 41-49
۲۳. اسماعیلی فریبا: ارزیابی القای بیان ژن فاکتورهای نوروتروفیک توسط دپرنیل در سلول‌های بنیادی رویانی پس از تمایز این سلول‌ها به اپی‌تلیوم عصبی، پایان‌نامه دکتری، ۱۳۸۳
24. Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SKL: Sox2 regulatory sequences direct expression of a geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. Develop 2000; 27: 2367-2382