

Production of Recombinant Lentiviruses Expressing miR-16 by Transient Transfection of 293T Cells

Sadegh Babashah¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Masoud Soleimani^{3**}, Abbas Hajifathali⁴, Mostafa Rezaei Tavirani⁵

1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Associated Professor, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Associated Professor, Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: soleim_m@modares.ac.ir

Received: 01/Feb/2012, Accepted: 02/May/2012

Abstract

Objective: The aim of the present study was the production of recombinant lentiviruses that express miR-16. After transduction, altered expression levels of miRNA and its target protein were analyzed.

Methods: A DNA fragment that contained the miR-16 precursor was cloned in a lentiviral plasmid. Lentiviral vector particles were produced by transient calcium phosphate co-transfection of 293T cells with the combined lenti-miR, structural and packaging plasmids. Viral supernatants were harvested and concentrated by ultracentrifuge. Virus titration was determined by fluorescent microscopy and flow cytometry. Altered expression levels of miR-16 were evaluated by real-time PCR; its protein target was evaluated by Western blot.

Results: The identity of DNA was established by colony-PCR, enzymatic digestion of positive clones, and DNA sequencing. After co-transfection of 293T cells with the combined lenti-miR, structural and packaging plasmids, viral particles were concentrated and the virus titer determined. Maximum expression of the GFP reporter gene was obtained in more than 80% of the cells transduced with lentivirus at MOI=1. Real-time PCR assay showed that miR-16 expression levels significantly increased in transduced cells compared with the control group. As shown by Western blot analysis, miR-16 overexpression downregulated Bcl-2 expression at the protein level.

Conclusion: This lentivirus expression system could be considered as a tool for efficient delivery of produced miRNAs to cells.

Keywords: microRNA, Lentivirus, Transfection, Transduction

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 1-12

تولید لنتی ویروس های نو ترکیب بیان کننده miR-16 توسط ترانسفکشن موقت سلول های 293T

صادق باباشاه^۱، مجید صادقی زاده^{۲*}، مسعود سلیمانی^{۳*}، عباس حاجی فتحعلی^۴، مصطفی رضایی طاویرانی^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- دانشیار، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: sadeghma@modares.ac.ir

**آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی

Email: soleim_m@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۲/۱۲

دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۱۲

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه تولید لنتی ویروس های بیان کننده miR-16 است. پس از ترانسداکشن، تغییرات ایجاد شده در سطوح بیانی این miRNA و پروتئین هدف آن ارزیابی خواهد شد.

مواد و روش ها: قطعه ژنی حاوی توالی پیش ساز miR-16 در پلاسמיד لنتی ویروسی کلون شد. سازه نو ترکیب همراه با پلاسמיד های کد کننده پروتئین های ساختاری و پوششی ویروس توسط کلسیم-فسفات به رده سلولی 293T ترانسفکت شد. سوپ سلولی جمع آوری و ذرات ویروسی توسط اولتراسانتریفیوژ رسوب داده شد و تعیین تیترو ویروس توسط میکروسکوپ فلورسانت و روش فلوسایتومتری انجام یافت. تغییرات در سطوح بیانی miR-16 و پروتئین هدف آن به ترتیب توسط روش های Real-time PCR و لکه گذاری وسترن ارزیابی شد.

نتایج: تأیید حضور ژن در پلاسמיד و درستی توالی آن توسط کلونی-PCR، هضم آنزیمی کلون های مثبت و توالی یابی انجام شد. پس از ترانسفکشن همزمان سلول های 293T با پلاسמיד لنتی-miR و پلاسמיד های ساختاری و پوششی ویروس و تعیین تیترو ذرات ویروسی تغلیظ شده، سلول های مورد نظر با لنتی ویروس نو ترکیب آلوده شدند. بیشینه بیان GFP در بیش از ۸۰ درصد سلول های آلوده شده با لنتی ویروس در $MOI=1$ حاصل شد. بررسی سطوح بیانی miR-16 توسط Real-time PCR نشان داد که بیان این میکرو RNA در سلول های آلوده شده با لنتی ویروس واجد miR-16 در مقایسه با گروه کنترل افزایش محسوسی دارد. تجزیه و تحلیل لکه گذاری وسترن نیز نشان داد بیش بیان miR-16 سبب کاهش بیان پروتئین BCL-2 می شود.

نتیجه گیری: سیستم بیانی لنتی ویروسی ارائه شده می تواند به عنوان ابزاری در راستای تحویل رسانی مؤثر مقلدهای میکرو RNA به سلول پیشنهاد شود.

کلیدواژگان: میکرو RNA، لنتی ویروس، ترانسفکشن، ترانسداکشن

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۱-۱۲

مقدمه

میکرو RNA (miRNA: microRNA) رده جدیدی از مولکول‌های RNA ۲۲ نوکلئوتیدی غیر کد کننده درون زادی است که بیان ژن را در سطح پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA و/یا مهار ترجمه تنظیم می‌نماید [۱-۳]. برای ژنوم انسان ۱۰۰۰ ژن رمز کننده miRNA که حدوداً یک درصد ژنوم را شامل می‌شود، تخمین زده می‌شود. به نظر می‌رسد این miRNA ها تنظیم بیان یک سوم ژنوم انسانی را بر عهده داشته باشد. هر miRNA تقریباً ۲۰۰ رونوشت را به طور مستقیم یا غیر مستقیم هدف قرار می‌دهد، این در حالی است که یک ژن رمز کننده پروتئین نیز می‌تواند با بیش از یک miRNA تنظیم شود [۱]. در حال حاضر تحقیقات گسترده‌ای به منظور شناسایی miRNA ها، اهداف آن‌ها و عملکردهای زیستی‌شان در جریان است. اتصال miRNA ها به ناحیه ترجمه ناشدنی ۳' (3'-UTR) در mRNA هدف از طریق مکمل‌شدگی ناکامل است. مکمل‌شدگی با توالی مابین نوکلئوتیدهای ۲ الی ۸ miRNA (جایگاه اتصال) (Seed Site) برای تشخیص توالی هدف مهم است زیرا تنها این توالی از الیگونوکلئوتید تقریباً ۲۲ بازی miRNA به طور کامل با 3'-UTR در mRNA هدف جفت می‌شود [۴، ۵]. با این وجود شواهد اخیر نشان می‌دهد که miRNA می‌تواند تنظیم بیان ژن را از طریق اتصال به عناصر تشخیصی خارج از جایگاه اتصال موجود در 3'-UTR یا با اتصال به توالی‌هایی در نواحی رمز کننده رونوشت نیز انجام دهد [۶، ۷].

نقش کلیدی miRNA ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های فرایندهای مختلف سلولی نظیر تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) که در سرطان دستخوش تغییرات می‌شود به اثبات رسیده است [۱، ۸، ۹]. با توجه به این عملکردهای وسیع، از miRNA های مختلفی به عنوان انکوژن (Oncogene) یا باز دارنده تومور (Tumor Suppressor) در شبکه‌های اختصاصی تغییر یافته در پیدایش و پیشرفت سرطان

بیش بیان miR-16 به واسطه لنتی ویروس

نام برده می‌شود. از آنجا که بیان نابه‌جای miRNA ها در طیف وسیعی از سرطان‌های انسانی گزارش شده است، به نظر می‌رسد بازگرداندن سطوح بیان miRNA هایی که دارای عملکرد بازدارندگی تومور است با استفاده از سیستم تحویل‌رسانی ویروسی (Viral Delivery System) مقلدهای miRNA که mRNA های ویژه انکوژن‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهد، یک استراتژی درمانی بالقوه باشد [۱۰-۱۴]. هدف از مطالعه حاضر ساخت ناقل نو ترکیب حامل ژن miR-16 (یکی از miRNA های شاخص مرتبط با فرایندهای زیستی که بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها کاهش می‌یابد) و انتقال این سازه ژنی به رده سلولی 293T به منظور بسته‌بندی (Packaging) و تولید لنتی ویروس‌های بیان کننده miR-16 و در نهایت بررسی بیان این miRNA در رده سلولی 293T به عنوان مدل سلولی پذیرنده ویروس است. همچنین از آنجایی که ژن Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) یکی از اهداف شناخته شده miR-16 است، تغییرات سطوح بیانی پروتئین BCL-2 در سلول‌های MCF-7 (Human Breast Adenocarcinoma Cell Line) آلوده شده با لنتی ویروس واجد miR-16 در مقایسه با گروه سلولی کنترل ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت رده‌های سلولی

رده‌های سلولی 293T و MCF-7 در محیط DMEM (Dulbecco Modified Eagles Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (Fetal Bovine Serum: FBS)، ۲ میلی‌مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin G) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و نگهداری شدند.

استخراج DNA و اندازه‌گیری غلظت و تعیین خلوص آن

DNA ژنومی از گلبول‌های سفید خون محیطی با استفاده از روش نمک اشباع (Salting Out) استخراج [۱۵] و غلظت آن توسط اسپکتروفتومتری با جذب نور ماورای بنفش در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. در این طول موج، جذب برابر با عدد یک، معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته‌ای در یک میلی‌لیتر است. کیفیت، یکپارچگی و غلظت DNA استخراج شده نیز توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد.

طراحی آغازگرها (Primers) و تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر

به‌منظور طراحی آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی فرادست و فرودست ژن کد کننده miR-16 که روی کروموزوم ۱۳ انسانی قرار دارد از سایت اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene> دریافت و سپس طراحی آغازگرهای حاوی جایگاه هضم آنزیمی با کمک نرم‌افزار GeneRunner نسخه ۳/۰۵ به‌صورت زیر انجام شد:

آغازگر مستقیم (دارای جایگاه آنزیمی *Bam*HI):

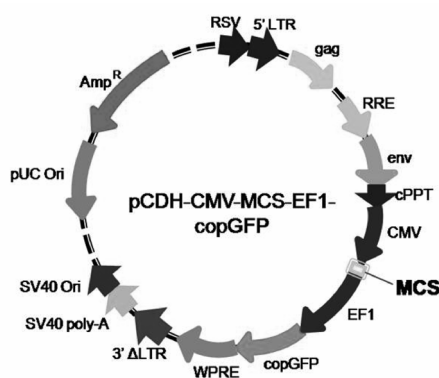
F: 5'-TGG GGA TCC GTA GCA GCA CAT AAT GGT TTG-3'

آغازگر معکوس (دارای جایگاه آنزیمی *Xba*I):

R: 5'-TGA TCT AGA GTC TAT GTT GAA TAT AAA TGT GC-3'

برای تکثیر قطعه ژنی ۵۰۰ جفت‌بازی حاوی توالی پیش‌ساز miR-16، مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۴۰ میلی‌مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم

۱۰۰ میلی‌مولار و ۰/۵ واحد از آنزیم DNA پلیمراز *Taq* تهیه شد. واسرشتگی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد، سپس برنامه تکثیر زیر برای ۳۰ چرخه اجرا شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. همچنین واکنش برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و در انتها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) با استفاده از اشعه ماورای بنفش مشاهده و باندهای ظاهر شده با نشانگر اندازه یک کیلوبازی سنجیده شد.



شکل ۱ نقشه پلاسمید؛ ژن مورد نظر می‌تواند تحت پروموتور CMV (Cytomegalovirus) همراه با کاست بیانی ژن گزارشگر GFP کلون شود. محل همسانه‌سازی چندگانه (Multiple Cloning Site: MCS) پلاسمید دارای توالی‌های محل برش برای آنزیم‌های محدود کننده متعددی از جمله *Bam*HI و *Xba*I است.

همسانه‌سازی ژن miR-16 در پلاسمید pCDH

هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید مورد نظر و سپس اتصال این دو اساس روند همسانه‌سازی ژن (Gene Cloning) است. در این تحقیق از پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cop GFP شرکت System Biosciences (آمریکا) که حاوی کاست ژنی برای بیان پروتئین فلورسانت سبز (GFP) (Gene Cloning) است استفاده شد (شکل ۱). استخراج

کلونی-PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی مستقیم DNA

پس از ۱۸ الی ۲۴ ساعت از پایان مرحله قبل، کلونی‌های منفرد روی پلیت به‌طور مجزا برداشته شد و در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از کمتر از ۱۶ ساعت، استخراج پلاسمید از باکتری‌های کشت داده شده انجام شد. در صورتی که قطعه ژنی مورد نظر در پلاسمید نوترکیب حضور داشته باشد، این قطعه ژنی با آغازگرهای همسانه‌سازی قابل تکثیر است، بنابراین روی پلاسمیدهای استخراج شده واکنش PCR با آغازگرهای همسانه‌سازی انجام شد تا در صورتی که باند مربوط مشاهده شود دلیلی بر حضور قطعه باشد. همچنین از برش آنزیمی پلاسمید استخراج شده توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Xba*I و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز به‌منظور تشخیص کلون مثبت (حاوی پلاسمید نوترکیب) از کلون منفی (فاقد پلاسمید نوترکیب) نیز استفاده شد. در نهایت از توالی‌یابی مستقیم DNA و مقایسه نتیجه توالی‌یابی با توالی ثبت شده در پایگاه اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> به‌منظور حصول اطمینان از درستی توالی قطعه ژنی کلون شده استفاده شد.

انتقال سازه نوترکیب لنتی-miR و پلاسمیدهای کدکننده پروتئین‌های پوششی و ساختاری ویروس به سلول‌های 293T

پس از تأیید حضور ژن در پلاسمید و درستی توالی آن، غلظت پلاسمید استخراج شده توسط بیوفتومتر (Biophotometer) سنجیده شد. تقریباً حدود ۲۴ ساعت پیش از ترانسفکشن (Transfection)، سلول‌های 293T کشت ششانه داده شدند تا به تراکم سطحی ۷۰ درصد برسند. ترانسفکشن همزمان پلاسمید نوترکیب لنتی-miR، پلاسمید

پلاسمید توسط کیت Invitrogen (آلمان) انجام شد. به‌منظور همسانه‌سازی ژن، محصول PCR و DNA پلاسمیدی تخلیص شده توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Xba*I بریده شد. واکنش اتصال (Ligation) محصولات برش یافته توسط آنزیم T4 DNA لیگاز شرکت Fermentase (لیتوانی) مطابق دستورالعمل انجام شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب، آنزیم لیگاز به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد غیر فعال شد.

انتقال پلاسمید کلون شده به سویه باکتریایی STBL-4 و غربال کردن (Screening) کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

باکتری مستعد (Competent Cell) از سویه STBL-4 باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) به روش کلرید کلسیم تهیه شد. برای انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال در مرحله قبل به یک میکروتیوب حاوی ۵۰ میکرولیتر باکتری مستعد افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل شد. سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محیط LB (Lysogeny Broth) مایع فاقد آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب افزوده و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker Incubator) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از دریافت پلاسمید نوترکیب، سلول‌ها روی پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (Ampicillin) کشت داده شدند و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین امکان رشد را تنها برای باکتری‌هایی فراهم می‌کند که پلاسمید نوترکیب حامل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین را دریافت کرده‌اند.

pMD2 (کد کننده پروتئین‌های پوششی) و پلاسמיד Pax2 (کد کننده پروتئین‌های ساختاری gag و pol) توسط لیپوفکتامین 2000 (Lipofectamine 2000) (Invitrogen، آمریکا) مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. محیط کشت پس از ۶ ساعت تعویض شد.

با بیان کنترل درون زاد U6 snRNA سنجیده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط روش بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه (Comparative Threshold Cycle Method) و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد [۱۶].

لکه‌گذاری و سترن (Western Blotting)

پروتئین تام سلولی با استفاده از بافر RIPA (Radioimmuno-Precipitation Assay) استخراج و توسط Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide (SDS-PAGE) (Gel Electrophoresis) روی ژل ۱۲/۵ درصد جداسازی شد. سپس لکه‌ها روی غشای PVDF (Polyvinylidene Fluoride) انتقال یافت و مهار واکنش‌های غیر اختصاصی توسط آنکوباسیون غشا در محلول مسدود کننده (Blocking Solution) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام شد. در گام بعدی، غشا با آنتی‌بادی اختصاصی علیه BCL-2 (Santa Cruz، آمریکا) به مدت ۵ ساعت و آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) به مدت یک ساعت آنکوبه شد. استفاده از آنتی‌بادی بر علیه بتا اکتین (Santa Cruz، آمریکا) نیز به عنوان کنترل بارگذاری (Loading Control) انجام شد تا از میزان یکسان بارگذاری پروتئین‌ها در ژل اطمینان حاصل شود. در پایان علائم توسط کیت ECL شناسایی شد.

تغلیظ ذرات ویروسی و تعیین تیترو ویروسی

پس از ۴۸ ساعت از تعویض محیط کشت، محیط رویی سلول‌ها که حاوی ویروس‌های تولید شده است، جمع‌آوری و اولتراسانتریفوژ (۲۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵۰ دقیقه) انجام شد. رسوب حاصل در محیط DMEM فاقد FBS حل و تقسیم شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تعیین تیترو ویروس‌های تولید و تغلیظ شده، سلول‌های 293T با رقت‌های مختلف ویروس (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرولیتر) آلوده و پس از ۴۸ ساعت میزان بیان پروتئین گزارش گر GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. درصد سلول‌های GFP مثبت نیز توسط روش فلوسایتمتری تعیین و ترانسداکشن (Transduction) سلولی با ضریب آلودگی (Multiplicity of Infection: MOI) تقریباً برابر با ۱ انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و ارزیابی تغییرات

بیان miR-16 توسط Real-time PCR

پس از ۴۸ ساعت از آلوده‌سازی با ویروس، RNA تام از سلول‌های 293T توسط واکنش گر ترایزول (Trizol) استخراج شد. سپس cDNA مربوط به miR-16 توسط کیت Stratagene (آمریکا) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. یک گروه سلولی نیز به عنوان کنترل بدون ترانسداکشن باقی ماندند. در نهایت Real-time PCR کمی به منظور تکثیر miR-16 توسط آغازگر معکوس عمومی کیت و آغازگر مستقیم اختصاصی انجام شد. بیان miR-16 در مقایسه

نتایج

تکثیر ناحیه ژنی حاوی ژن پیش‌ساز

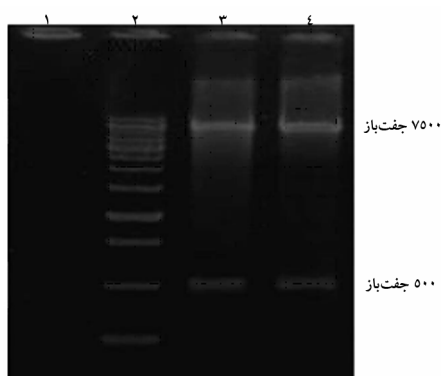
miR-16

نسبت جذب DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر با ۱/۹-۱/۸ بود. الکتروفورز روی ژل آگارز نیز تأیید کننده کیفیت، یکپارچگی و غلظت بالای DNA استخراج شده بود. تکثیر قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-16 توسط PCR، تنها یک باند ۵۰۰ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز معادل با اندازه

بیش بیان miR-16 به واسطه لنتی ویروس

این باکتری‌ها روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و فراهم آمدن امکان غربال باکتری‌های حاوی پلاسمید از باکتری‌های فاقد پلاسمید، چند ده مورد از کلونی‌های رشد یافته مجزا انتخاب شد و پس از استخراج پلاسمید واکنش PCR با آغازگرهای همسانه‌سازی روی آن‌ها انجام گرفت تا صرفاً پلاسمیدهایی برای مراحل بعدی انتخاب شود که دارای قطعه مورد نظر (۵۰۰ جفت‌باز) باشد. نمونه‌ای از محصول واکنش کلونی - PCR در شکل ۳ آمده است.

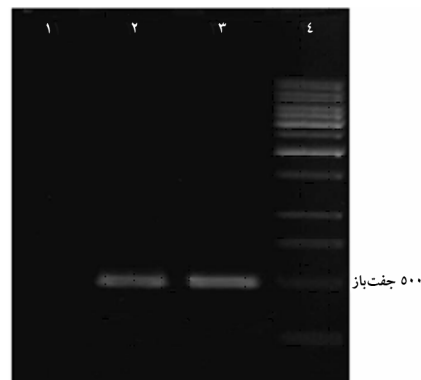
از آنجایی که در صورت ورود قطعه ژنی مورد نظر به پلاسمید تعداد جفت‌بازهای به‌دست آمده متعاقب برش آنزیمی در مقایسه با پلاسمیدهای غیر نوترکیب متفاوت خواهد بود، بنابراین از هضم آنزیمی به‌عنوان روشی برای تأیید کلون‌های مثبت استفاده شد. شکل ۴ نتایج برش آنزیمی پلاسمید استخراج شده توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Xba*I را روی ژل الکتروفورز نشان می‌دهد.



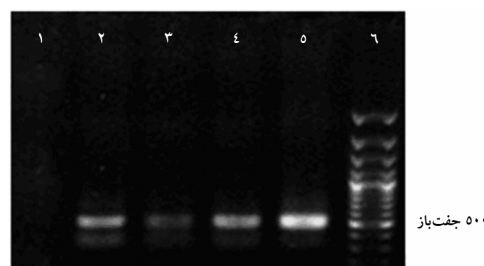
شکل ۴ الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب روی ژل آگارز؛ ستون ۱) کنترل فاقد DNA الگو، ستون ۲) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون ۳ و ۴) باند ۵۰۰ جفت‌بازی مربوط به حضور قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-16 و باند ۷۵۰۰ کیلوبازی مربوط به پلاسمید است.

تعیین توالی ژن پیش‌ساز miR-16 کلون شده در پلاسمید pCDH به‌عنوان گام نهایی و قطعی برای تأیید کلون مثبت تلقی می‌شود. نتایج توالی‌یابی (شکل ۵ الف) و مقایسه آن با توالی ثبت شده در پایگاه اینترنتی NCBI (شکل ۵ ب)

توالی مورد نظر ایجاد کرد که نشان دهنده اختصاصی بودن شرایط دمایی و زمانی تکثیر و آغازگرهای طراحی شده است (شکل ۲).



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-16 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ ستون ۱) کنترل فاقد DNA الگو، ستون ۲ و ۳) محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-16، ستون ۴) نشانگر اندازه ۱ کیلوبازی



شکل ۳ الکتروفورز محصول کلونی - PCR روی ژل آگارز؛ ستون ۱) کنترل فاقد DNA الگو، ستون ۲-۵) محصول PCR به‌دست آمده از کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، ستون ۶) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت‌بازی

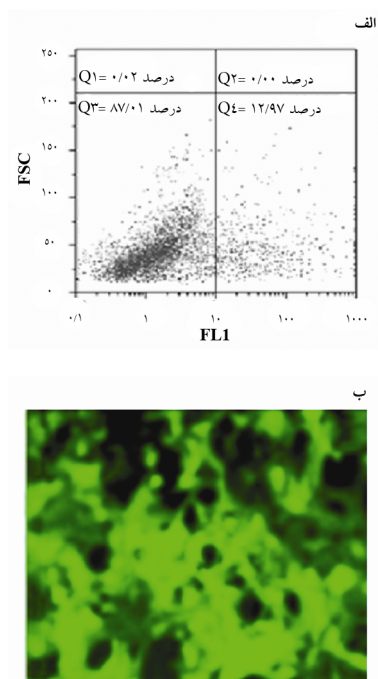
نتایج ترانسفورماسیون (Transformation)

باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال

پس از انجام واکنش برش آنزیمی محصول PCR و پلاسمید pCDH توسط آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Xba*I و انجام واکنش اتصال، پلاسمید نوترکیب به درون سویه STBL-4 باکتری اشریشیا کلی ترانسفورم شد. پس از کشت

miR-16 برابر با $200/4 \times 10^6$ TU (Transducing Units) در میلی لیتر بود.

مشخص نمود قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی کلون شده در پلاسمید توالی مربوط به ژن miR-16 است. این کلون مثبت برای مطالعات بعدی استفاده شد.



الف

```

GTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAAAGGGTGCG
GCCATATTGTGCTGCCTCAAAAAATACAGGATCTGATCTTC
TGAAGAAAATATATTTCTTTTATTATCATAGCTCTTATGATAGC
AATGTCAGCAGTGCCCTTAGCAGCAGCGTAAATATTGGCGTTA
AGATTCTAAAAATATCTCCAGTATTAACTGTGCTGCTGAAGT
AAGGTTGACCATACTCTACAGTTGTGTTTAAATGATATTAAT
GTTACTAATGTGTTTTCAGTTTATTGATAGCTTTTTCAGTATT
ATTGATAATCTGTGTTTATTGATGATCTGTAAAAATGAAT
TAATACTAATTTTTCAGATGTATCATCTCTTAAATACTGTAAT
TGCAATTTAATAATTGTATTGAATGCCATCAAGTTTTTTTAAA
AAGCTTATGCAGCATTAGAGGAATTTATTTTAAATGCACATTTA
TATCAACATAGAC
  
```

ب

```

Query 1      TTATGATAGCAATGTGACAGTGCCTTAGCAGCAGCAATAATATTGGCGTTAAGATTCTAA 60
              |||
Sbjct 31603210 TTATGATAGCAATGTGACAGTGCCTTAGCAGCAGCAATAATATTGGCGTTAAGATTCTAA 31603151

Query 61      AATTATCTCCAGTATTAACTGTGCTGCTGAAGTAAAGTTGACCACTACTACAGT 115
              |||
Sbjct 31603150 AATTATCTCCAGTATTAACTGTGCTGCTGAAGTAAAGTTGACCACTACTACAGT 31603096
  
```

شکل ۵ الف) توالی به دست آمده از تعیین توالی ژن پیش ساز miR-16 مربوط به کلون مثبت، ب) بلاست نتیجه تعیین توالی ژن پیش ساز miR-16 مربوط به کلون مثبت با توالی ثبت شده در پایگاه NCBI

نتایج تولید و تعیین تیتروسیروس های نو ترکیب

به منظور دستیابی به لنتی ویروس های نو ترکیب و فعال، ناقل نو ترکیب لنتی - miR به همراه پلاسمید های کد کننده پروتئین های ساختاری و بسته بندی ویروس به طور همزمان در سلول های 293T ترانسفکت شد. از آنجایی که بالا بودن تیتروسیروس در افزایش توان آلوده سازی ویروس اهمیت به سزایی دارد، ذرات ویروسی پس از تولید، باید تغلیظ شود. در این راستا تغلیظ محیط رویی سلول های 293T ترانسفکت شده، امکان دستیابی به مقادیر زیادی از ذرات ویروسی تولید شده را فراهم نمود. برای تعیین تیتروسیروس، تعداد ثابتی از سلول های 293T (10^5 سلول) با میزان ۵ میکرو لیتر از ویروس تغلیظ شده در سریال های رقت آلوده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، برای تعیین تیتروسلول ها ترپسینه شدند و توسط روش فلوسایتومتری درصد سلول های GFP مثبت اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در $MOI=1$ بیش از ۸۰ درصد سلول ها آلوده شده اند (شکل ۶). تیتروسیروس در سلول های 293T برای لنتی ویروس واجد

شکل ۶ نتایج به دست آمده برای تعیین تیتروسیروس؛ الف) سلول های 293T آلوده شده با لنتی ویروس نو ترکیب واجد miR-16، جمعیت سلولی در ناحیه پایین سمت چپ نشان دهنده درصد سلول های GFP مثبت است. ب) تصویر میکروسکوپ فلورسانس در مورد بیان ژن گزارشگر GFP که طی آن بیش از ۸۰ درصد سلول ها GFP مثبت هستند. این میزان بیشینه از بیان ژن گزارشگر GFP مربوط به ترانسداکشن سلول ها در $MOI=1$ و با رقت ۱۵۰ میکرو لیتری از ویروس است.

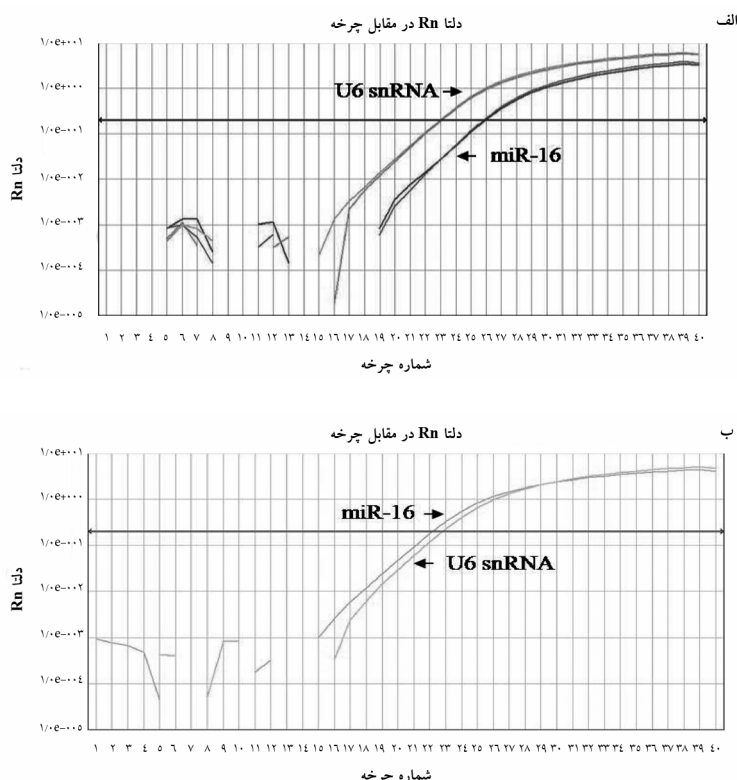
تغییرات در سطوح بیانی miR-16 پس از ترانسداکشن

پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از زمان آلوده سازی سلول های 293T با لنتی ویروس، بررسی سطوح بیانی miR-16 توسط Real-time PCR در دو گروه سلولی آلوده شده و آلوده نشده (گروه کنترل) نشان داد که بیان miR-16 در سلول های آلوده شده با رقت ۱۵۰ میکرو لیتر از ویروس در مقایسه با گروه کنترل افزایش محسوسی دارد. همان گونه که در

بیابان miR-16 به واسطه لنتی ویروس

نسبی (Ratio) بیان miR-16 توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد و نتایج برگرفته از آزمایش‌های متعدد در شکل ۸ نشان داده شده است.

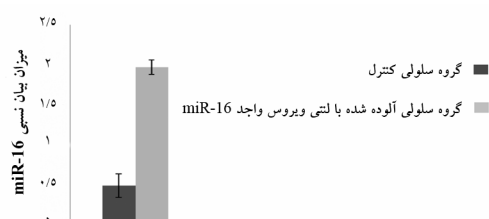
شکل ۷ ملاحظه می‌شود، منحنی تکثیر miR-16 در گروه سلولی آلوده شده با ویروس در مقایسه با گروه سلولی کنترل سریع‌تر وارد فاز تصاعدی تکثیر شده است. محاسبه میزان



شکل ۷ منحنی‌های تکثیر مربوط به cDNA ساخته شده از روی miR-16 در دو گروه سلولی کنترل (الف) و آلوده شده با لنتی ویروس نوترکیب واجد miR-16 (ب)؛ در شکل الف منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۲۳ و منحنی تکثیر miR-16 در چرخه ۲۶ وارد فاز تصاعدی شده و به خط آستانه رسیده است. شکل ب) منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۲۳ و منحنی تکثیر miR-16 در چرخه ۲۲ وارد فاز تصاعدی شده و به خط آستانه رسیده است.

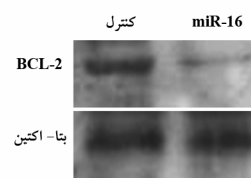
تغییرات در سطوح بیانی پروتئین BCL-2 پس از ترانسداکشن

بررسی‌ها نشان داده‌اند که miR-16 دارای اهداف گسترده‌ای در درون سلول است [۱۷، ۱۸]. از آنجایی که ژن Bcl-2 یکی از شناخته‌ترین اهداف برای miR-16 است، بیان این ژن در سطح پروتئین بررسی شد تا کارایی سیستم تحویل‌رسانی ویروسی ارائه شده در زمینه مهار ترجمه یکی از ژن‌های هدف این miRNA سنجیده شود. برای این منظور سلول‌های سرطانی



شکل ۸ میزان نسبی (Ratio) بیان miR-16 برگرفته از آزمایش‌های متعدد Real-time PCR؛ افزایش محسوس در سطوح بیانی miR-16 در سلول‌های آلوده شده با لنتی ویروس نوترکیب واجد miR-16 در مقایسه با سطوح بیانی پایه miR-16 در گروه سلولی کنترل مشهود است.

MCF-7 که دارای بیان پروتئین BCL-2 هستند، توسط لنتی‌ویروس واجد miR-16 آلوده شدند و پس از ۴۸ ساعت بیان پروتئین BCL-2 توسط لکه‌گذاری وسترن سنجیده شد. همان‌گونه که در شکل ۹ ملاحظه می‌شود، سلول‌های آلوده شده با لنتی‌ویروس واجد miR-16 نسبت به گروه کنترل باند ضعیف‌تری از پروتئین BCL-2 را نشان می‌دهند که نشان‌دهنده کاهش میزان بیان این پروتئین در اثر عملکرد miR-16 است. این در حالی است که تفاوت محسوسی در شدت باند بتا اکتین در دو نمونه ملاحظه نشد که بیانگر تساوی در میزان بارگذاری پروتئین‌ها در دو چاهک است.



شکل ۹ تجزیه و تحلیل لکه‌گذاری وسترن بیان پروتئین BCL-2 در گروه‌های سلولی کنترل و آلوده شده با لنتی‌ویروس واجد miR-16؛ کاهش میزان بیان پروتئین BCL-2 پس از بیش‌بیان miR-16 مشهود است. عدم تفاوت قابل ملاحظه در شدت باند پروتئین بتا-اکتین که به عنوان کنترل میزان بارگذاری در نظر گرفته شده است نمایانگر تساوی در میزان بارگذاری پروتئین‌ها در دو چاهک است.

بحث

مولکول‌های miRNA در روند تکاملی موجودات زنده بسیار حفاظت شده بوده‌است و نقش آن‌ها به‌عنوان عناصر کلیدی برای تنظیم فرایندهای مختلف زیستی نظیر تکثیر، تعیین تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به اثبات رسیده است [۱، ۸، ۹]. از آن‌جا که بیان نابه‌جای miRNA ها در طیف وسیعی از سرطان‌های انسانی گزارش شده است، به‌نظر می‌رسد افزایش سطوح بیانی miRNA هایی که به‌عنوان ژن سرکوب‌گر تومور شناخته شده و در انواع معینی از سرطان‌های انسانی دچار حذف یا تنظیم منفی شده‌است یک استراتژی درمانی بالقوه در درمان سرطان باشد [۱۲-۱۴]. همچنین توانایی miRNA ها در

القای تمایز به سمت یک رده سلولی خاص یا توانایی آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌های کلیدی مؤثر در مسیرهای مولکولی مشخص، نقش بالقوه آن‌ها را در ژن درمانی خاطر نشان می‌سازد [۱۹]. با این وجود پیش از به راه‌اندازی درمان‌های مبتنی بر miRNA باید به مسائل چالش برانگیزی نظیر میزان دوز، ویژگی، کارایی، پایداری، ایمنی و مسائل مربوط به تحویل‌رسانی به سلول نیز توجه ویژه داشت [۲۰، ۲۱].

استفاده از سیستم بیانی لنتی‌ویروس (Lentivirus Expression System) ابزار مناسبی به‌منظور بیان ژن‌های خارجی در اغلب سلول‌های پستانداران است. بسته‌بندی سازه‌های لنتی-ناقل حامل ژن کد کننده miRNA در ذرات ویروسی امکان انتقال کارآمد این سازه‌های بیانی و بیان متعاقب آن‌ها را در سلول‌های مختلف فراهم می‌آورد. سازه بیانی انتقال یافته به سلول‌های هدف توانایی ادغام به داخل DNA ژنومی را دارد و موجب بیان پایا و طولانی مدت (Long-Term) ژن مورد نظر می‌شود [۲۲]. در مطالعه حاضر از سیستم بیانی لنتی‌ویروس به‌منظور افزایش بیان miR-16 در رده سلولی 293T به‌عنوان یک مدل سلولی پذیرنده ویروس استفاده شد. بررسی کمی و مقایسه‌ای سطوح بیانی miR-16، افزایش محسوسی را در میزان رونوشت‌های این miRNA در سلول‌های آلوده شده با لنتی‌ویروس نوترکیب نشان داد. همچنین آلوده‌سازی رده سلولی سرطانی MCF-7 توسط لنتی‌ویروس واجد miR-16 موجب کاهش بیان پروتئین BCL-2 که از اهداف شناخته شده این miRNA است شد. انتظار می‌رود توانایی سیستم تحویل‌رسانی لنتی‌ویروسی ارایه شده در زمینه افزایش سطوح بیانی miR-16 و در نتیجه ایجاد کاهش در سطوح بیانی پروتئین تولید شده توسط ژن هدف آن، در مورد سایر miRNA ها نیز نتایج مشابهی به همراه داشته باشد و یکی از چالش‌های مرتبط با miRNA ها یعنی تحویل‌رسانی مؤثر آن‌ها به سلول را برطرف سازد. بنابراین سیستم فوق می‌تواند در آزمایش‌هایی که به هدف دستیابی به راهکارهای درمانی مبتنی بر تغییر سطوح بیان miRNA ها

است و با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران گروه ژنتیک و گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل همکاری‌های انجام یافته در رابطه با اجرای این تحقیق اعلام می‌دارند.

راه‌اندازی می‌شود، به‌عنوان ابزاری برای تحویل‌رسانی مؤثر مقلدهای miRNA به داخل سلول توصیه شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته ژنتیک مولکولی

منابع

- [1] Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* 2011; 47(8): 1127-37.
- [2] Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 2008; 18(1):113-21.
- [3] Cullen BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; 102(1): 3-9.
- [4] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21(17): 4663-70.
- [5] Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3(3): e85.
- [6] Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, Chowdhury D, Dykxhoorn DM, Tsai P, Hofmann O, Becker KG, Gorospe M, Hide W, Lieberman J. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* 2009; 35(5): 610-25.
- [7] Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 2009; 19(7): 1175-83.
- [8] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle* 2008; 7(20): 3143-8.
- [9] Cho WC. MicroRNAs in cancer - from research to therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(2): 209-17.
- [10] Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, Zhang MQ. Development of the human cancer microRNA network. *Silence* 2010; 1(1): 6.
- [11] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 9; 435(7043): 834-8.
- [12] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259-69.
- [13] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- [14] Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen

- TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130(7): 2113-29.
- [15] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [17] Hanlon K, Rudin CE, Harries LW. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Plos One* 2009; 4(9): e71169.
- [18] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13944-9.
- [19] Fatica A, Rosa A, Ballarino M, De Marchis ML, Rasmussen KD, Bozzoni I. Role of microRNAs in myeloid differentiation. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(Pt 6): 1201-5.
- [20] Tong AW, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther* 2008; 15(6): 341-55.
- [21] Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer* 2007; 120(5): 953-60.
- [22] Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* 2003; 2(3): 251-7.