

## Construction of Recombinant Lentiviral Vector Containing shRNA against Mouse Fndc5 Gene in Order to Transduce Mouse Embryonic Stem Cells

Shima Nazem<sup>1</sup>, Kamran Ghaedi<sup>2</sup>, Sadegh Babashah<sup>3</sup>, Majid Sadeghizadeh<sup>4\*</sup>, Mohammad Hossein Nasr Esfahani<sup>5\*\*</sup>

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, and Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 5- Professor, Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

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

\*\*Corresponding Address: Postal Code: 8165131378, Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran  
Email: mh\_nasr@royaninstitute.org

Received: 09/Sep/2016, Accepted: 29/Nov/2016

### Abstract

**Objective:** RNA interference (RNAi) is considered a potential approach to knock down target genes and their functional assessment. Lentiviral vectors serve as an efficient tool to transduce foreign genes in a wide variety of mammalian cells. Fibronectin type I domain-containing 5 (Fndc5) is a glycosylated membrane protein whose transcript levels increase during neural and cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs). Here, we report the efficacy of Fndc5 gene silencing in mESCs using lentiviral vectors that express shRNA.

**Methods:** Two distinct shRNA sequences that targeted Fndc5 coding sequence (CDS) and one scramble shRNA sequence as a negative control were designed and commercially synthesized. Synthetic shRNA oligonucleotides were cloned into a lentiviral inducible vector after annealing downstream of the tetracycline inducible H1 promoter. The recombinant lentiviral vector was packaged in HEK293T cells, then mESCs were transduced by lentiviral particles. Expression of shRNA in transduced cell lines was induced by doxycycline treatment for 48 h.

**Results:** Evaluation of transcript levels of Fndc5 by real-time PCR showed a significant decrease in transduced cells by a mixture of two shRNAs.

**Conclusion:** Taken together, lentiviral-mediated RNAi that targeted the Fndc5 gene could be considered an efficient tool to silence gene expression in the transduced cell line to study the function of Fndc5.

**Keywords:** Fndc5, shRNA, Lentiviral vectors, RNAi

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 59-73

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل RNA کوتاه سنجاق سری اختصاصی علیه ژن FnDC5 موشی برای انتقال به سلول‌های بنیادی جینی

شیما ناظم<sup>۱</sup>، کامران قائدی<sup>۲</sup>، صادق بابا شاه<sup>۳</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۴\*</sup>، محمدحسین نصر اصفهانی<sup>۵\*\*</sup>

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

۲- دانشیار، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان و گروه زیست فناوری سلولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

۵- استاد مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، 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، اصفهان، کدپستی: ۸۱۶۵۱۳۱۳۷۸، خوارسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشگاه زیست فناوری رویان

Email: mh\_nasr@royaninstitute.org

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۹

دریافت مقاله: ۹۵/۰۶/۱۹

### چکیده

**هدف:** RNA مداخله گر یک مکانیسم کارآمد در کاهش بیان ژن‌ها و تعیین عملکرد ژن‌ها است. ناقل‌های لنتی ویروسی ابزارهای مناسبی برای انتقال ژن‌های خارجی به طیف گسترده‌ای از سلول‌های پستانداران است. پروتئین FnDC5 یک پروتئین گلیکوزیله غشایی است که بیان آن طی روند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جینی موشی افزایش می‌یابد. در این مطالعه قابلیت کاهش بیان ژن FnDC5 در سلول‌های بنیادی جینی موشی با استفاده از ناقل‌های لنتی ویروسی بیان کننده RNA کوتاه سنجاق سری بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** به این منظور دو توالی مشخص RNA کوتاه سنجاق سری علیه ناحیه کد کننده رونوشت FnDC5 و یک توالی RNA کوتاه سنجاق سری کنترل به عنوان کنترل منفی طراحی و ساخت شد. قطعات RNA کوتاه سنجاق سری سنتزی پس از دورگه شدن درون ناقل لنتی ویروسی در پایین دست پرموموت H1 القا شونده توسط تراسایکلین کلون شد. ناقل لنتی ویروس نوترکیب درون سلول‌های HEK293T بسته‌بندی شد و سلول‌های بنیادی جینی موشی توسط ذرات ویروسی ترانسداکت شدند. بیان RNA کوتاه سنجاق سری در سلول‌های ترانسداکت شده توسط ۴۸ ساعت تیمار با داکسی‌سایکلین القا شد.

**نتایج:** سنجش میزان بیان رونوشت FnDC5 در سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس‌های نوترکیب حامل هر دو RNA کوتاه سنجاق سری، کاهش بیان معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

**نتیجه گیری:** در مجموع هدف قرار دادن ژن FnDC5 از طریق مکانیسم RNA مداخله گر می‌تواند به عنوان یک ابزار کارآمد در کاهش بیان این ژن در رده سلولی ترانسداکت شده به منظور بررسی عملکرد FnDC5 مورد توجه قرار بگیرد.

**کلیدواژگان:** FnDC5، RNA کوتاه سنجاق سری، ناقل‌های لنتی ویروسی، RNA مداخله گر

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۵۹-۷۳

### مقدمه

RNA مداخله گر (RNA interference: RNAi) یک مکانیسم سلولی برای تنظیم بیان ژن‌ها و کنترل رشد و نمو

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی

کردن سلول‌هایی است که قابلیت تقسیم شدن را ندارند و می‌توانند بیان ژن را داخل سلول به مدت طولانی حفظ کنند [۸-۹] به منظور افزایش اینمی کار با لتنی ویروس‌ها، نسل دوم و سوم از حامل‌های ویروسی ایجاد شدند که در آن‌ها اجزای تشکیل دهنده ویروس در چندین حامل به جای یک حامل توزیع شده‌اند [۱۰، ۱۱].

سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells: ESCs) سلول‌های پرتوانی هستند که از لایه سلولی داخلی بلاستوپیست (Inner Cell Mass: ICM) مشتق می‌شوند و قابلیت تمایز به هر سه لایه سلولی جنینی اندودرمی (سلول‌های کبدی و پانکراس)، مزودرمی (سلول‌های قلبی، ماهیچه‌ای و خونی) و اکنودرمی (سلول‌های عصبی) را دارا هستند [۱۲]. به منظور بررسی نقش ژن‌ها در هر کدام از این فرآیندهای تمایزی می‌توان با به کارگیری مکانیسم RNAi بیان ژن هدف را در این سلول‌ها کاهش داد و از طریق تمایز لاین سلولی به دست آمده به هر کدام از این رده‌های سلولی به بررسی نقش ژن مذبور در این فرآیندها پرداخت.

پروتئین Fndc5 یک پروتئین گلیکوزیله غشایی است که در بافت قلب، مغز و ماهیچه اسکلتی در موش بیان بالا دارد. این پروتئین در سطح سلول توسط یک پروتئاز ناشناخته شکسته می‌شود و به صورت یک هورمون بیتیدی به نام irisin وارد جریان خون می‌شود و نقش مهمی را در تنظیم متابولیسم بدن ایفا می‌کند [۱۳]. مطالعات قبلی نشان داده است که بیان ژن Fndc5 طی روند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موشی افزایش می‌یابد [۱۴، ۱۵]. با توجه به این که کاهش بیان ژن‌ها یکی از مهمترین راه‌ها در بررسی نقش ژن‌ها در مسیرهای مولکولی است [۶]، بنابراین در این مطالعه به منظور بررسی بیشتر نقش ژن Fndc5 در روند تمایز، shRNA اختصاصی علیه رونوشت این ژن در حامل لتنی ویروسی نسل دوم کلون می‌شود و سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط ویروس‌های حامل نوترکیب حاصل ترانسداکت می‌شود و در نهایت بیان ژن هدف در سطح mRNA بررسی می‌شود.

سلولی در مرحله پس از نسخه‌برداری است. این پدیده توسط مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک [Small (or short) interfering RNA: siRNA] واسطه‌گری می‌شود و از لحاظ تکاملی در میان موجودات یوکاریوت حفظ شده است. فعال شدن مسیرهای RNAi در داخل سلول توسط قطعات کوچک (double-stranded RNA: dsRNA) دو رشته‌ای (RNA double-stranded) صورت می‌گیرد که یا به صورت صناعی وارد سلول می‌شود یا توسط پرومترهای داخل سلولی از روی ژنوم سلول رونویسی می‌شود و باعث کاهش بیان ژن هدف به صورت اختصاصی و مؤثر می‌شود. RNA دو رشته‌ای در داخل سیتوپلاسم توسط آنزیم دایسر (Dicer) به قطعات کوچک تر ۲۵-۳۰ نوکلئوتیدی به نام siRNA شکسته می‌شود و siRNA با اتصال به (RNA-Induced Silencing Complex) RISC کمپلکس کاهش ترجمه می‌شود [۱، ۲]. تاکنون با به کارگیری مکانیسم RNAi در مدل‌های سلولی مطالعات متعددی در زمینه بروز سرطان، بیماری‌های عفونی و اختلالات سیستم قلبی و دستگاه عصبی انجام شده است [۵-۷].

یکی از روش‌های بررسی عملکرد ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی کاهش بیان ژن با به کارگیری مکانیسم RNAi است. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی کد کننده small hairpin RNA به آن RNA سنجاق سری کوتاه (shRNA) گفته می‌شود، به صورت مکمل با ژن هدف طراحی می‌شود و با قرار دادن در حامل‌های بیانی مناسب به داخل سلول انتقال داده می‌شود [۶، ۷].

ابزارهای متعددی برای انتقال ژن‌ها به داخل سلول‌ها وجود دارد. یکی از راه‌های کارآمد انتقال ژن‌ها به داخل سلول استفاده از ویروس‌ها و خصوصاً لتنی ویروس‌ها (Lentivirus) است. لتنی ویروس‌ها به عنوان ابزار تحقیقاتی قدرتمند برای وارد کردن یک ژن خارجی در سیستم‌های In vivo و In vitro به کار می‌روند. از جمله محاسن حامل‌های لتنی ویروسی آلوهه

که (<https://www.sigmaldrich.com>) Sigma Aldrich پیش از این در مطالعه‌ای توسط اسپیگلمن (Spiegelman) و همکاران به کار برده شده بود، استفاده شد [۱۶]. توالی‌های siRNA به دست آمده در پایگاه NCBI بلاست (Blast) شدند تا از اختصاصی بودن توالی برای ژن FnDC5 اطمینان حاصل شود. همچنین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین mfold ساختار ثانویه رونوشت FnDC5 ترسیم شد تا siRNA ای که نواحی تک رشته و بدون ساختار ثانویه از رونوشت FnDC5 را هدف قرار می‌داد، انتخاب شود.

رشته‌های shRNA به صورت دو رشته‌ای تعبیه شدند که مکمل هم هستند و در هر رشته بین توالی‌های سنس (sense) و آنتی سنس (antisense) یک لوپ ۹ نوکلئوتیدی طراحی شد. در نهایت دو siRNA علیه رونوشت FnDC5 و یک siRNA کنترل (Scramble) از پایگاه Sigma (Scramble) به منظور طراحی shRNA و همسانه‌سازی در سایت Addgene ارایه شده در مراحل بعدی، جایگاه برش منفرد آنزیم BstZ17I در انتهای توالی shRNA تعبیه شد. توالی shRNA سنتزی در جدول ۱ آمده است.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش دارای مجوز تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان با شماره نامه EC/۹۳/۱۱۲۷ است.

## حامل‌های ویروسی

در این مطالعه از حامل‌های ویروسی pLVTHM و pLVPT-tTR-KRAB و حامل بسته‌بندی psPAX2 که همگی از حامل‌های لتی pLVPT-tTR-GFP مورد استفاده، زن گزارشگر KRAB Green Fluorescent (GFP) با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Blasticidin Protein (Protein Addgene (آمریکا) شد. تمامی حامل‌ها مربوط به شرکت Addgene (<https://www.addgene.org>) بود که به صورت هدیه از پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان دریافت شد.

## طراحی توالی siRNA و رشته‌های shRNA

به منظور به دست آوردن توالی‌های siRNA علیه رونوشت FnDC5 موشی (شماره دستیابی: NM\_027402.4) از سایت

جدول ۱ توالی‌های shRNA سنتزی

MluI	sense	loop	antisense	BstZ17I	ClaI	نام
CGCGTCCCCGCTCTTCTGCCGCCAGTATTCAAGAGAATACTGGCGCAGAACAGAGAGCTTTGGAAAGTACAT 3'	5' بالای 3' پایینی	AGGGGGCGAGAGAACACGGCGTCATAAAGTCTCTTATGACC CGCTCTCTCGAAAAACCTCATATGTAGC 5'	CGCGTCCCCCGAGGCCATAACAACAAGGATICAAGAGATCCTIGTIGTATTGGGCTCGTTTGGAAGTACATACA T3'	shRNA1		
CGCGTCCCCGAGGCCATAACAACAAGGATICAAGAGATCCTIGTIGTATTGGGCTCGTTTGGAAGTACATACA T3'	3' پایینی	AGGGGGCTCGGGTTATGTGTTCTAAAGTCTCTAGAACACAATAACCCGAGAAAAACCTCATATGTAGC 5'	CGCGTCCCCGACCATCAATATGACTAGATTCAAGAGATCTAGTCATATIGATGGTC TTTTGGAAAGTACATACAT 3'	shRNA2		
AGGGGGCTGGTAGTTA TACTGATCTAAGTCTCTAGATCAGTA ACTACCAAGAAAACCTTCATATG TAGC 5'	3' پایینی			Scramble		

قرار داده شد. به منظور تأیید انجام دورگه‌سازی از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد.

## کاهش اندازه حامل pLVTHM

به منظور سهولت در انجام واکنش اتصال بین حامل و قطعات shRNA، با بررسی نقشه حامل، هضم حامل توسط

## دورگه‌سازی رشته‌های shRNA

برای انجام دورگه‌سازی (Hybridization) قطعات shRNA سفارش داده شده، رشته بالایی و پایینی هر با غلاظت‌های یکسان ۲ میکرومولار با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی

را تنها برای باکتری هایی فراهم می کند که پلاسمید نوترکیب حامل ژن مقاومت به آمپیسیلین را دریافت کرده اند.

### کلونی PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی

پس از کشت ۱۶ ساعته باکتری های نوترکیب، تعدادی از کلونی های منفرد روی پلیت آمپیسیلین جدید کشت و شماره گذاری شدند. به منظور تأیید همسانه سازی سازه های (Primers) تولید شده، از روش کلونی PCR با آغازگرهای (Primers) طراحی شده روی shRNA و بدنه حامل استفاده شد. به این منظور قسمتی از کلونی باکتری های شماره گذاری شده به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد و محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد. کلونی های مثبت در محیط مایع (Lysogeny broth: LB) حاوی آمپیسیلین به صورت شبانه (Qiagen) minipreparation کشت داده شدند و توسط کیت Macro Gen (کره جنوبی) ارسال شد.

### همسانه سازی مجدد قطعه ژنی element- H1promoter- shRNA-ampicillin pLVPT- در حامل لتی ویروسی- tTR-KRAB

با توجه به این که حامل هدف اصلی در این مطالعه حامل pLVPT-tTR-KRAB بود، بنابراین سازه \* FspI و MscI و حاوی shRNA توسط آنزیم های Thermoscientific (آمریکا) هضم شد و قطعه ۲ کیلو بازی -tTR-KRAB حاوی shRNA درون حامل هدف اصلی (FspI و MscI) توسط آنزیم pLVPT (هضم شده با آنزیم های Thermoscientific) به روش ذکر شده انجام شد. تأیید همسانه سازی توسط کلونی PCR و هضم آنزیمی BstZ17I به درجه سانتی گراد انجام شد.

آنزیم AgeI (آمریکا) Thermoscientific صورت پذیرفت و قطعه ۶ کیلو بازی حاصل از برش پس از استخراج از ژل آگارز Thermoscientific (آمریکا) به عنوان حامل جدید pLVTHM تحت نام pLVTHM\* استفاده شد.

### همسانه سازی قطعات shRNA درون حامل pLVTHM\*

به منظور ساخت حامل هدف حاوی قطعات shRNA ابتدا حامل pLVTHM\* با آنزیم های ClaI و MluI (آمریکا) Thermoscientific مطابق دستور العمل آنزیم هضم شد. واکنش اتصال قطعات shRNA دورگه شده در پایین دست پرومتر القایی HI توسط آنزیم لیگاز به صورت شبانه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام شد.

### ترانسفورماسیون باکتری اشتریشیا کلی توسط حامل های نوترکیب

باکتری مستعد (Competent cell) از سویه DH5α (Escherichia coli) به روش کلرید کلسمیم تهیه شد. به منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری، محصول واکنش اتصال به باکتری مستعد افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلا فاصله روی یخ منتقل شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط غذی از گلکوزر (broth with Catabolite Repression) افزوده و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور لرزانده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از دریافت پلاسمید نوترکیب، باکتری ها روی پلیت آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپیسیلین (Ampicillin) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپیسیلین امکان رشد

حاوی ژن گوارشگر GFP بود استفاده شد و درصد سلول‌های ترانسفکت شده توسط فلوسایتومتری تعیین شد.

## تغليظ ذرات ويروسى و تعين تيراسيون ويروس

۴۸ ساعت و ۶۰ ساعت پس از ترانسفکشن محیط رویی سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود جداسازی و به مدت ۱۵۰ دقیقه با سرعت ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفیوژ شد. RB20 رسوب ویروسی در محیط کشت اختصاصی سلول‌های HEK293T حل شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تعیین تیر ویروس‌های تولید و تغليظ شده، سلول‌های HEK293T با رقت‌های مختلف از ویروس آلوده شد و درصد سلول‌های ييان‌كتنده پروتين GFP توسط فلوسایتومتری اندازه گيري شد. در نهايىت ترانسداكشن سلولی با ضربه آلودگی (MOI) ۱۰ انجام شد.

### ترانسداكشن سلول‌ها و تيمار آنتى‌بيوتيك

محیط کشت سلول‌های RB20 با محیط حاوی ذرات ویروسی تغليظ شده تعويض شد. به منظور تعیین درصد ترانسداكشن، سلول‌های RB20 توسط ویروس‌های تغليظ شده حاوی حامل pWPXLD آلوده شدند و ۲۴ ساعت بعد درصد سلول‌های GFP مثبت توسط فلوسایتومتری تعیین شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسداكشن، تيمار سلول‌ها با غاپت ۶ ميكروگرم بر ميليليترا از آنتى‌بيوتيك Blasticidin (Invitrogen، آمریکا) آغاز شد.

### استخراج ژنوم از سلول‌های ترانسداكت شده و بررسی ورود shRNA به داخل ژنوم

از رده سلولی به دست آمده پس از پاساژهای مکرر به منظور بررسی ورود shRNA به داخل ژنوم، استخراج DNA توسط كيت Qiagen (آلمان) انجام شد. سپس با استفاده از

## کشت رده‌های سلولی

رده سلولی HEK293T (بانک سلولی پژوهشگاه رویان، ۱ درصد DMEM high Glucose (RSCB درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS (Gibco، آمریکا)، ۱ درصد آمينواسیدهای غير ضروري (L-Glu (Gibco) (NEAA) (Gibco، آمریکا) ۱ درصد ال-گلوتامین (Penicillin/Streptomycin: pen/strep (Gibco، آمریکا) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵ درصد دی اكسيد کربن نگهداری شدند. همچنان سلول‌های بنیادی جنینی موشی به دست آمده از بانک سلولی پژوهشگاه رویان، Royan B20 (RB20) در محیط کشت حاوی ۴۵ درصد DMEM F12 (Gibco، آمریکا) ۴ درصد Bovin serum) BSA (Gibco Neurobasal (Gibco، آمریکا)، ۱ درصد NEAA (albumin N2 supplement ۱ درصد pen/strep ۱ L-Glu (Gibco، آمریکا)، ۲ درصد B27 (Gibco، آمریکا) ۱/۰ درصد PD Sigma (Sigma، آمریکا) ۱/۰ درصد ريزمولوكول Sigma (Sigma، آمریکا) ۰/۱ Leukemia Inhibitory Factor (LIF (Sigma، آمریکا) Chemicon (Chemicon، آمریکا) کشت داده شد.

### ترانسفکشن سلول‌های HEK293T

سلول‌های HEK293T ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن با تراكم ۷۰ درصد در پليت‌های پوشیده شده با ژلاتين ۱/۰ درصد کشت داده شدند. ترانسفکشن سلول‌ها با حامل‌های ویروسی tTR-KRAB psPAX2 و حامل هدف نوترکيب pMD2G LTX به صورت همزمان توسط ليفوفكتامين Thermo Fisher Scientific (Lipofectamine LTX) (آمریکا) انجام شد. محیط کشت سلول‌ها ۶ ساعت پس از ترانسفکشن تعويض شد. همچنان به منظور تعیین درصد ترانسفکشن در گروه كتريال از حامل هدف pWPXLD که

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی

آغازگرهای جلویی (Reverse) و برگشتی (Forward) Mastermix SYBR Green (TaKaRa)، ژاپن) و دستگاه Real-time PCR (Applied Biosystem، آمریکا) استفاده شد. میزان بیان ژن هدف در مقایسه با ژن مرجع گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (Gapdh) [NM\_001289726.1] بررسی شد. سپس تغییرات بیان ژن با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta Ct - 2^{\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

## طراحی آغازگرها

آغازگرهای جلویی (Reverse) و برگشتی (Forward) به منظور بررسی کلونی‌های نوترکیب، یکی روی shRNA و دیگری روی بدنه حامل توسط نرمافزار Oligo 6 طراحی شد. همچنین توالی آغازگرهای مربوط به واکنش Real-AlleleID time PCR (Gapdh، FnDC5) توسط نرمافزار طراحی شد. توالی آغازگرها و طول محصولات در جدول ۲ آمده است.

آغازگرهای مربوط به shRNA وارد شدن توالی حامل در درون ژنوم سلول توسط PCR بررسی شد.

## استخراج RNA، سنتز cDNA و بررسی

### تغییرات بیان ژن FnDC5

به منظور بررسی تغییرات بیان ژن FnDC5، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار با القاکنده داکسی سایکلین (Doxycycline) قرار گرفتند. پس از آن RNA تام سلولی توسط کیت RNeasy mini kit (Qiagen، آلمان) استخراج شد و غلاظت RNA توسط دستگاه نانودرایپ (Thermoscientific، آمریکا) ارزیابی شد. مقادیر مساوی از RNA (یک میکروگرم) توسط آنزیم DNaseI (Thermoscientific، آمریکا) عاری از cDNA synthesis کیت DNA شد و سنتز cDNA توسط Thermoscientific (آمریکا) مطابق دستورالعمل انجام شد. به منظور بررسی میزان مهار ژن FnDC5 از کیت

جدول ۲ توالی آغازگرها و طول محصولات PCR

نام آغازگر	آغازگر جلویی (Forward)	آغازگر برگشتی (Reverse)	طول محصول (جفت باز)
shRNA1	5'-TCGCTATGTGTTCTGGAAA-3'	5'-TCCGCCAGTATTCTCTTG-3'	۱۳۰
shRNA2	5'-TCGCTATGTGTTCTGGAAA-3'	5'-CCAATAACAACAAGGATCTCTTGAA-3'	۱۳۴
Scramble	5'-TCGCTATGTGTTCTGGAAA-3'	5'-CTAGTCATATTGATGGTCGG-3'	۱۰۷
Gapdh	5'-GCCGCCTGGAGAACCC-3'	5'-TGAAGTCGCAGGAGACAAACC-3'	۱۲۱
FnDC5	5'-TCATTGTTGTGGTCCTCTTC-3'	5'-TGAAGTCGCAGGAGACAAACC-3'	۸۱

برش حامل روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و قطعه حامل مورد نظر که اندازه حدود ۶ کیلو باز داشت توسط کیت Qiagen (آلمان) از ژل استخراج شد و مجدداً توسط آنزیم لیگاز T4 حلقوی شد (شکل ۱). نقشه حامل جدید pLVTHM در شکل ۲ آمده است. دورگه‌سازی رشته‌های shRNA در برنامه دمایی ذکر شده انجام شد. به منظور حصول اطمینان از دورگه شدن رشته‌های

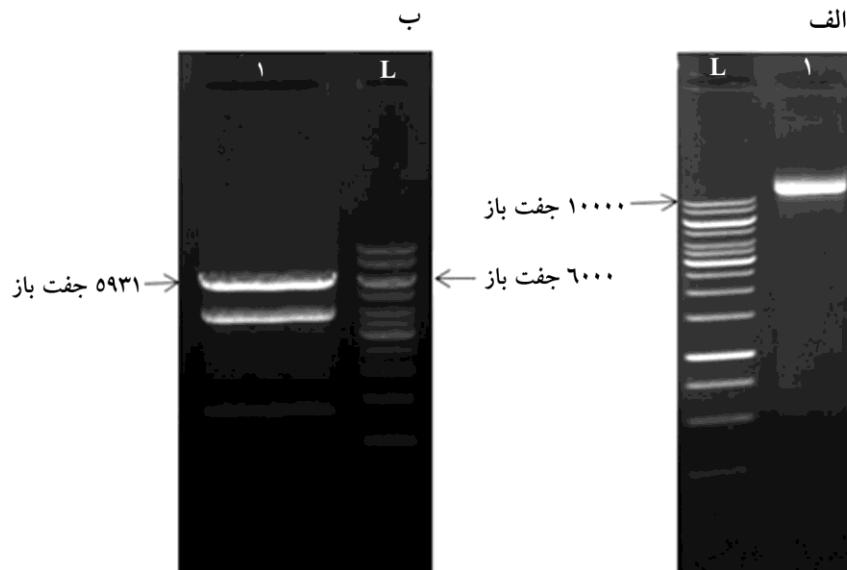
## نتایج

### نتایج مربوط به کاهش اندازه حامل pLVTHM

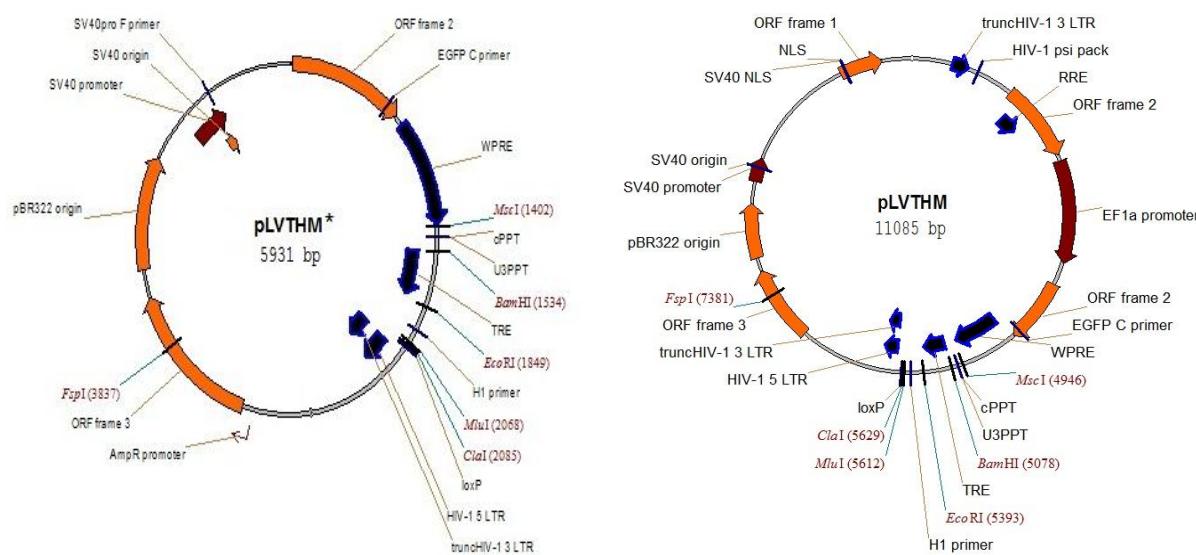
با توجه به این که اختلاف اندازه حامل pLVTHM (حدود ۱۱۶۴۰ جفت باز) و قطعات سنتزی shRNA (حدود ۸۰ جفت باز) زیاد بود، این امر وارد شدن قطعه به حامل را بسیار دشوار نموده بود. بنابراین با بررسی نقشه حامل و با حفظ قسمت‌های مورد نیاز، آنزیم AgeI برای هضم حامل انتخاب شد. قطعات حاصل از

دورگه شده به علت دو رشته‌ای بودن روی ژل بالاتر از shRNA تک رشته‌ای قرار می‌گیرد (شکل ۳).

بالای و پایینی shRNA هر کدام از رشته‌ها به تنها ی و نیز محصول دورگه‌سازی، روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شد.

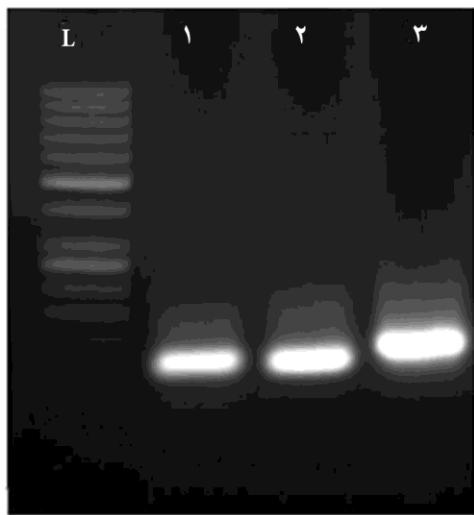


شکل ۱ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل pLVTHM (الف) حامل pLVTHM هضم نشده، (ب) حامل pLVTHM هضم شده با آنزیم AgeI، باند ۵۹۳۱ بازی از ژل تخلیص و به عنوان حامل جدید استفاده شد. L: نشانگر DNA با اندازه ۱ کیلوپاز آنژیم AgeI.



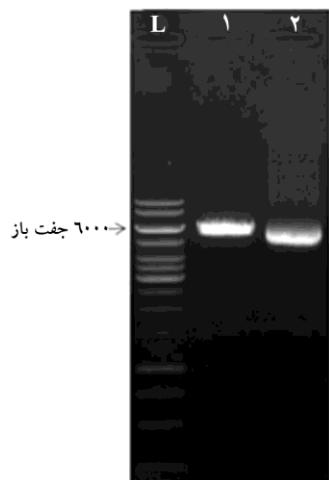
شکل ۲ نقشه حامل‌های pLVTHM و pLVTHM\* ترسیم شده با نرم‌افزار Vector NTI از ۱۱ کیلوپاز به ۶ کلیو باز در\* کاهش یافت. shRNA در بین دو جایگاه برشی MluI و ClaI کلون شد.

### ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی



شکل ۳ الکتروفورز قطعات shRNA سنتزی تک رشته و دورگه شده روی ژل آگارز ۲ درصد؛ ستون ۱) رشته بالایی shRNA، ستون ۲) رشته پایینی shRNA، ستون ۳) رشته بالایی و پایینی shRNA پس از دورگه شدن؛ L: نشانگر DNA اندازه ۱۰۰ جفت باز

H1 از حامل pLVTHM\* توسط هضم آنزیمی جداسازی و TetR درون حامل pLVPT-tTR-KRAB که واجد توالی بود، کلون شد. در نهایت کلونی‌های حاوی حامل نوترکیب PCR شناسایی و pLVPT-tTR-KRAB توسط کلونی PCR شناسایی و توسط برش با آنزیم BstZ17I تأیید شدند (شکل ۶ ب).

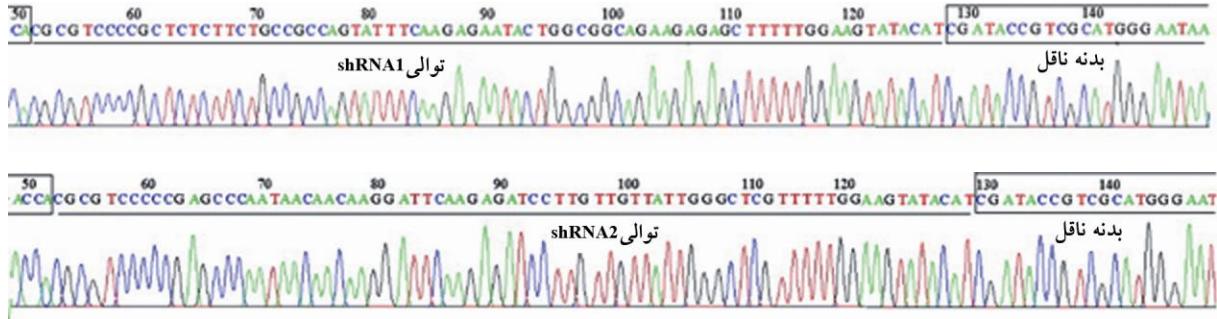


شکل ۴ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل نوترکیب\* pLVTHM\* با آنزیم BstZ17I؛ ستون ۱) حامل نوترکیب هضم شده خطی؛ ستون ۲) حامل نوترکیب هضم نشده؛ L: نشانگر DNA اندازه ۱ کیلوباز

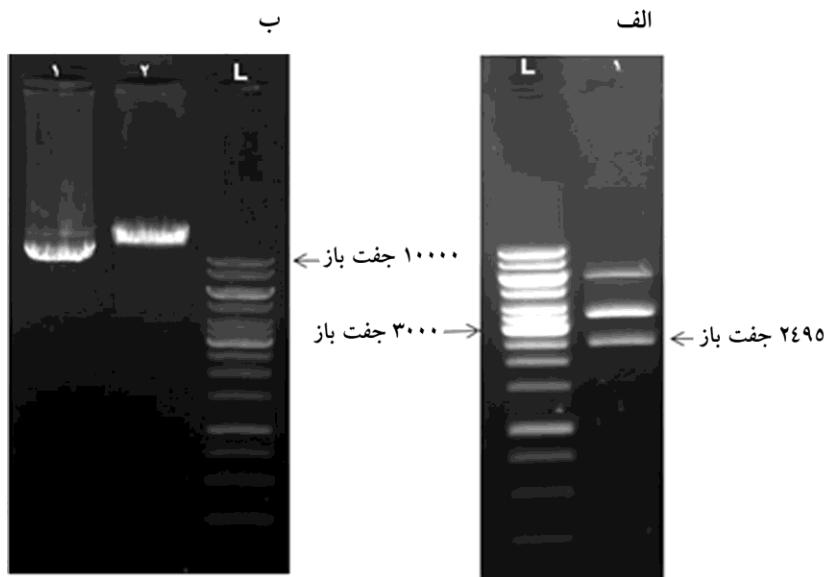
### نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با حامل نوترکیب pLVPT-tTR-KRAB و pLVTHM

پس از انجام دورگه‌سازی قطعات shRNA و هضم آنزیمی حامل pLVTHM\*، واکنش اتصال میان قطعات shRNA دورگه شده و حامل هضم شده انجام گرفت و باکتری‌های DH5α مستعد با محصول واکنش اتصال ترانسفورم شدند. با انجام کلونی PCR روی چند ده مورد از کلونی‌های رشد یافته مجزا روی محیط کشت حاوی آمپیسیلین، کلونی‌های حاوی حامل نوترکیب انتخاب شدند. تأیید کلونی نوترکیب (جواب مثبت در کلونی PCR) توسط هضم با آنزیم BstZ17I (شکل ۶) همچنین تعیین توالی (شکل ۵) انجام شد.

حامل نوترکیب\* pLVTHM\* توسط آنزیم‌های FspI و MscI هضم شد و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و قطعه ۲۴۹۵ جفت بازی (حاوی shRNA کلون شده در پایین دست پروموتر H1) از ژل استخراج شد (شکل ۶ الف). با توجه به این که حامل pLVTHM\* فاقد توالی TetR به منظور القایی نمودن پروموتر H1 بود، بنابراین قطعه حاوی -shRNA



شکل ۵ بخشی از گراف حاصل از توالی یابی حامل نوترکیب pLVTHM\* حامل قطعات shRNA1 و shRNA2



شکل ۶ (الف) هضم آنزیمی حامل pLVTHM\* نوترکیب shRNA و جداسازی قطعه ۲۴۹۵ جفت بازی به منظور همسانه‌سازی مجدد در حامل KRAB-tTR-pLVPT؛  
ب) هضم آنزیمی حامل نوترکیب KRAB-tTR-pLVPT توسط آنزیم *BstZ1I* به منظور تأیید همسانه‌سازی ستون ۱) حامل نوترکیب هضم شده، ستون ۲) حامل نوترکیب هضم نشده؛ (L) نشانگر DNA با اندازه ۱ کیلو باز

shRNA-2 و نیز مخلوطی از ۲ shRNA-1 انجام شد. همچنین درصد ترانسداکشن سلول‌های RB20 توسط فلوسایتومتری ۸۷/۵ درصد برآورد شد (شکل ۷). ۴۸ ساعت پس از ترانسداکشن، تیمار سلول‌های ترانسداکت شده با آنتی‌بیوتیک Blasticidin آغاز شد و به مدت ۲ هفته ادامه یافت. در گروه کنترل (سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس حاوی حامل pWPXLD) ۴۸ ساعت پس از آغاز تیمار با آنتی‌بیوتیک همه سلول‌ها از بین رفتند. پس از ۲ هفته تیمار رده‌های سلولی با غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک

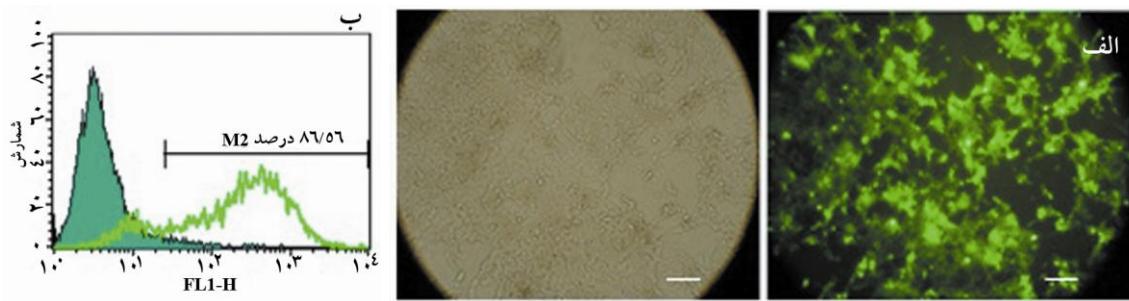
## RB20 ترانسداکشن سلول‌های

به منظور دستیابی به ویروس‌های نوترکیب، سلول‌های pLVPT-tTR-HEK293T توسط حامل هدف نوترکیب HEK293T و نیز حامل‌های کد کننده پروتئین‌های ساختاری و بسته‌بندی ویروس به طور همزمان ترانسفکت شدند. درصد ترانسفکشن سلول‌های HEK293T در گروه کنترل توسط فلوسایتومتری ۹۹/۴ درصد گزارش شد. ترانسداکشن سلول‌های shRNA-1 و shCtrl حاوی RB20 توسط ویروس‌های نوترکیب حاوی

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی

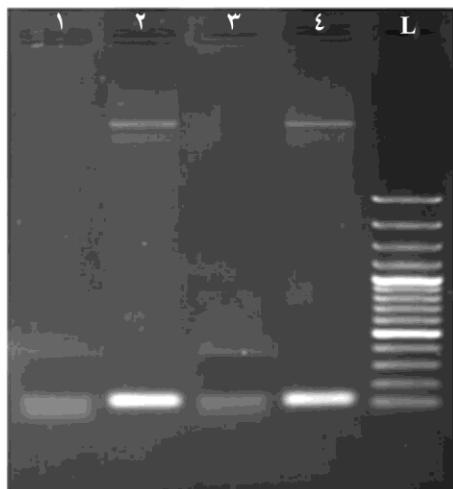
کلونی های سلولی نمودند (شکل ۸).

Blasticidin تک سلول های باقی مانده شروع به تشکیل



شکل ۷ (الف) عکس میکروسکوپ نوری و فلورسنت از سلول های HEK293T ترانسفکت شده با حامل pWXLD ناقل ژن GFP اندازه بار: ۵۰ میکرومتر (ب) گراف فلوسایتمتری مربوط به ترانسداکشن سلول های RB20، ۸۷/۵ درصد سلول ها توسط ویروس های نوترکیب ترانسداکت شده اند.

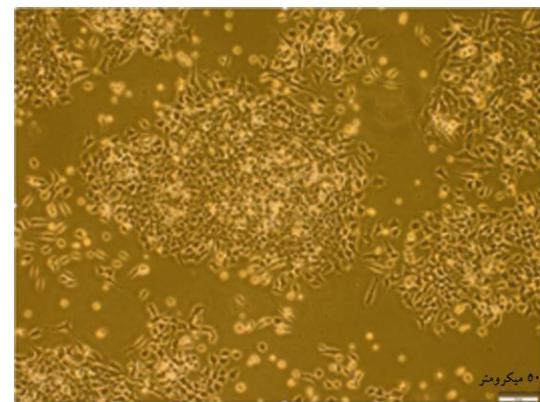
وارد شده است (شکل ۹).



شکل ۹ الکتروفورز محصولات PCR ژنومی روی ژنوم استخراج شده از رده سلولی با آغازگرهای اختصاصی shRNA ستون ۱ و ۳ PCR ژنوم RB20 ستون ۲ و ۴ محصول PCR ژنوم رده سلولی با آغازگر اختصاصی ۲ shRNA1 ۲؛ shRNA1 نشانگر DNA با اندازه ۱۰۰ جفت باز

## بررسی سطوح بیان Fndc5

با توجه به این که shRNA در این مطالعه در پایین دست پرموتور القایی H1 (Tetracycline-on) کلون شد، بنابراین به منظور القای بیان shRNA در درون سلول از داکسی سایکلین (آنالوگ تراسایکلین) استفاده شد. به این منظور



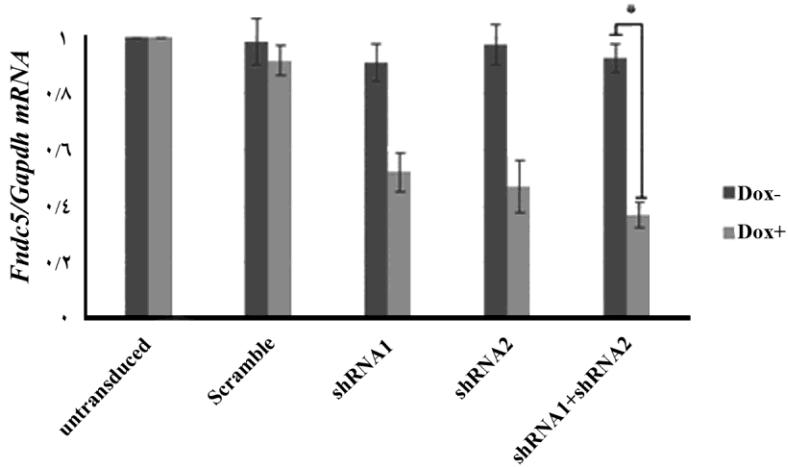
شکل ۸ عکس میکروسکوپ نوری از رده سلولی تولید شده که پس از دو هفته تیمار با آنتی بیوتیک Blasticidin تشکیل کلونی نموده اند. اندازه بار: ۵۰ میکرومتر

## تأیید ورود حامل لنتی ویروس نوترکیب به داخل ژنوم سلول

رده های سلولی پس از ۲ هفته تیمار با آنتی بیوتیک Blasticidin و پاساژهای مکرر به منظور بررسی ورود پلاسمید نوترکیب به داخل ژنوم استخراج DNA شدند. سپس روی ژنوم استخراج شده، با آغازگرهای اختصاصی برای ژن shRNA انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز در رده سلولی ترانسداکت شده با ۲ shRNA1 نشان داد که هر دو shRNA در ساختار ژنوم سلول

رده ترانسداکت شده با ۲، shRNA1 القا شده با داکسی‌سایکلین، کاهش بیان معنی‌دار نسبت به بیان این ژن در همین رده سلولی در عدم حضور داکسی‌سایکلین را نشان می‌دهد (شکل ۱۰).

رده‌های سلولی با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داکسی‌سایکلین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بررسی میزان بیان ژن Fndc5 در رده‌های سلولی در حضور و عدم حضور داکسی‌سایکلین نشان داد که میزان بیان رونوشت Fndc5 در



شکل ۱۰ میزان نسی بیان ژن Fndc5 در سلول‌های RB20 ترانسداکت نشده (Untransduced)، سلول ترانسداکت شده با shCtrl (Scramble)، سلول‌های RB20 ترانسداکت شده با shRNA1 و سلول‌های RB20 ترانسداکت شده با ۲، shRNA2 را در سلول‌های RB20 ترانسداکت شده با ۱، shRNA1+shRNA2 نشان می‌دهد. میزان نسی بیان ژن Fndc5 در Real-time PCR توسط میزان نسی بیان ژن RB20 ترانسداکت شده با shCtrl (Untransduced)، سلول ترانسداکت شده با shRNA1 و سلول‌های RB20 ترانسداکت شده با ۲، shRNA2 را در سلول‌های RB20 ترانسداکت شده با ۱، shRNA1+shRNA2 نشان می‌دهد.

استفاده از پرومودرهاei القایی کاهش بیان ژن‌ها را تحت کنترل درآورد [۱۶-۱۷].

استفاده از سیستم بیانی لتی ویروس یکی از مناسب‌ترین ابزارها برای انتقال ژن‌های خارجی در اغلب سلول‌های مقاوم به ترانسفکشن مانند سلول‌های بنیادی است. مطالعات نشان داده است که بیان ژن‌های خارجی انتقال یافته به سلول‌های بنیادی توسط حامل‌های لتی ویروسی خاموش نمی‌شود و می‌تواند در طول فرآیند تمایز این سلول‌ها پایدار باقی بماند؛ در صورتی که سایر حامل‌های رتروویروسی این ویژگی را ندارند [۲۰]. سازه‌های بیانی انتقال یافته توسط لتی ویروس‌ها قابلیت ادغام در DNA سلول هدف را داراست، بنابراین امکان بیان پایا و طولانی مدت ژن مورد نظر را فراهم می‌کند [۲۱]. در این حامل‌ها به منظور افزایش ایمنی زیستی، تعداد زیادی از

## بحث

در سال‌های اخیر RNAi به عنوان یک روش قوی و اختصاصی برای کاهش بیان ژن استفاده شده است [۱]. کاهش بیان ژن‌ها یکی از ابزارهای ارزشمند در تعیین نقش ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله فرآیندهای تمایز سلول‌های بنیادی است [۲]. RNAi به طور طبیعی در سلول تحت عنوان microRNA ساخته می‌شود و در آزمایشگاه به صورت shRNA یا siRNA ساخته می‌شود و بیان ژن‌های هدف را در مرحله بعد از رونویسی غیرفعال می‌کند [۱]. siRNA به طور وقت بیان ژن هدف را کاهش می‌دهد در حالی که shRNA پایین دست پرومودر مربوط به RNA پلیمراز II و III وارد و نسخه‌برداری می‌شود و بیان ژن هدف را به صورت پایدار و مؤثرتر از siRNA کاهش می‌دهد. علاوه بر این؛ می‌توان با

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن FnDC5 موشی

مجدداً همسانه‌سازی می‌شد. با توجه به این که اختلاف اندازه حامل pLVTHM و قطعات shRNA سنتزی زیاد بود و این امر واکنش اتصال را بسیار دشوار نموده بود، بنابراین با بررسی نقشه حامل و توسط هضم آنزیمی (AgeI) قسمت‌های غیر ضروری از حامل حذف و قطعه جدید با حفظ ori هماننسلسازی، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین و قطعه مورد نیاز برای pLVPT-tTR-KRAB از ژل تخلیص و مجدداً حلقوی شد. بدین ترتیب واکنش اتصال قطعات shRNA دورگه شده در حامل pLVTHM\* (حدود ۶ کیلو باز) به راحتی صورت پذیرفت. سپس قطعات DNA حاوی shRNA1 و shRNA2 و shScramble بطور جداگانه درون حامل انتقالی pLVPT-tTR-KRAB مجدداً همسانه‌سازی شد.

سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط لتی ویروس‌های حاوی shRNA1 و shRNA2 و Scramble مخلوطی از mRNA shRNA1 ترانسداکت شدند. نتایج بررسی میزان بیان ژن FnDC5 در این سلول‌ها نشان داد که هر دو shRNA و مخلوط آن‌ها به طور مؤثر باعث کاهش بیان ژن FnDC5 می‌شوند. پیش از این در مطالعه اسپیگلمن و همکاران توالی‌های shRNA مشابه در نورون‌های کورتیکوئیدی به کار برده شد که به میزان مؤثرتر از مطالعه انجام شده باعث کاهش بیان ژن FnDC5 شده است [۱۶]. هرچند توالی‌های shRNA به کار برده شده در دو مطالعه مشابه هم بود ولی عوامل مختلف از جمله ادغام تصادفی ناقل لتی ویروسی در درون ژنوم، نوع و تعداد سلول هدف، میزان ناقل به کار رفته همگی از جمله عواملی است که بر میزان ترانسداکشن سلولی و به دنبال آن بر کارآیی shRNA در کاهش بیان ژن مؤثر است [۲۴].

با توجه به کاهش بیان ژن FnDC5 به طور مؤثر، می‌توان در مطالعات آینده توسط القای مسیرهای تمایز قلبی و عصبی در رده سلولی به دست آمده به بررسی نقش این ژن در هر یک از این فرآیندها پرداخت. همچنین با توجه به این که پرومتر مورد استفاده در این مطالعه از نوع القایی بود، بنابراین می‌توان آثار کاهش بیان

ژن‌های غیر ضروری و بیماری‌زای ویروسی حذف شده و ویروس در سیستم همانندسازی دچار نقص است. همچنین در نسل دوم و سوم از حامل‌های ویروسی ژن‌های مورد نیاز برای تکثیر و بسته‌بندی اجزای ویروسی به ترتیب در سه و چهار حامل توزیع شده است که یکی از آن‌ها حامل انتقال و بقیه حاملین کمکی برای بسته‌بندی لتی ویروس‌ها هستند. به دلیل عدم وجود همولوژی بین این حامل‌ها، امکان نوترکیبی و قرار گرفتن ژن‌های لتی ویروسی در مجاور هم کاهش یافته و این‌می‌ آن‌ها افزایش پیدا کرده است [۲۲، ۲۳].

هدف از انجام این مطالعه کاهش بیان ژن FnDC5 در سلول‌های بنیادی جنینی موشی است. همان‌طور که گفته شد بیان ژن FnDC5 طی فرآیند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موشی افزایش می‌یابد. با توجه به این که تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف سلول‌های عصبی و قلبی فرآیندی زمان‌بر است، بنابراین به منظور بررسی نقش ژن‌ها در هر کدام از این فرآیندها و نیز القای کاهش بیان ژن‌ها در زمان‌های متفاوت از فرآیند تمایزی، بایستی از رده‌های سلولی پایدار و القایی استفاده شود. به این منظور shRNA که ناحیه کدکننده (Coding Sequence: CDS) ژن FnDC5 را هدف قرار می‌داد از پایگاه اطلاعاتی شرکت Sigma Aldrich (آلمان) بازیابی و ارزیابی شد. دو توالی siRNA که اکثر نرم‌افزارهای طراحی siRNA بر کارآیی آن اتفاق نظر داشتند انتخاب و با توجه به الگوی پیشنهادی پایگاه Addgen برای حامل pLVTHM به shRNA تبدیل شدند.

حامل انتقالی مورد استفاده در این مطالعه حامل-pLVPT-tTR-KRAB دست‌کاری شده بود که در آن ژن گاراشگر GFP با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Blasticidin جایگزین شده بود. به منظور استفاده از shRNA در پایین دست pLVPT-tTR-KRAB به عنوان حامل انتقالی، ابتدا می‌بایست shRNA در پایین دست پرومتر القایی H1 در حامل pLVTHM کلون می‌شد و سپس ناحیه TetO-H1-shRNA (FspI-MscI) از pLVPT-tTR-KRAB جداسازی و درون حامل

مولکولی است که با پشتیبانی مالی پژوهشگاه رویان و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندهای مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران پژوهشگاه رویان بهدلیل همکاری در اجرای این پژوهش اعلام می‌دارند.

ژن را در زمان‌های مختلف از فرآیندهای تمایزی ارزیابی کرد.

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته ژنتیک

## منابع

- [1] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836): 494-8.
- [2] Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004; 35(6): 545-53.
- [3] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 2005; 8(10): 1343-9.
- [4] Ohrt T, Schwille P. siRNA modifications and sub-cellular localization: a question of intracellular transport? *Curr Pharm Des* 2008; 14(34): 3674-85.
- [5] Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, Blackford A, Goodman SN, Bunz F, Watson WH, Gabrielson E, Feinstein E, Biswal S. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7975-84.
- [6] Cullen LM, Arndt GM. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(3): 217-23.
- [7] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16(8): 948-58.
- [8] Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9(5): 457-63.
- [9] Buchschacher GL Jr. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26(1-6): 1-11.
- [10] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; 72(12): 9873-80.
- [11] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 241-5.
- [12] Schroeder IS, Rolletschek A, Blyszzuk P, Kania G, Wobus AM. Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 495-507.
- [13] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP,

## ساخت حامل ویروسی نوترکیب ناقل shRNA اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی

- Spiegelman BM. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463-8.
- [14] Rabiee F, Forouzanfar M, Ghazvini Zadegan F, Tanhaei S, Ghaedi K, Motovali Bashi M, Baharvand H, Nasr-Esfahani MH. Induced expression of Fndc5 significantly increased cardiomyocyte differentiation rate of mouse embryonic stem cells. *Gene* 2014; 551(2): 127-37.
- [15] Ostadsharif M, Ghaedi K, Hossein Nasr-Esfahani M, Mojbafan M, Tanhaie S, Karbalaie K, Baharvand H. The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation. *Differentiation* 2011; 81(2): 127-32.
- [16] Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D, Lin JD, Greenberg ME, Spiegelman BM. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metab* 2013; 18(5): 649-59.
- [17] Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, Turner DL. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(7): e53.
- [18] Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther* 2008; 16(9): 1630-6.
- [19] Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34(3): 263-4.
- [20] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4): 2140-5.
- [21] 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.
- [22] Pawliuk R, Bachelot T, Raftopoulos H, Kalberer C, Humphries RK, Bank A, Leboulch P. Retroviral vectors aimed at the gene therapy of human beta-globin gene disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 151-62.
- [23] Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72(11): 8463-71.
- [24] Zhang B, Metharom P, Jullie H, Ellem KA, Cleghorn G, West MJ, Wei MQ. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2(1): 6.