پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هفدهم، شماره ۲، پی در پی ۸۶، صفحات ۹۱ تا ۹۷
خرداد و تیر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۸

ترانسفکشن رده سلولی PC12 بوسیله وکتور بیانی pEGFPNI -NT4 و بررسی بیان پروتئینی آن

مریم‌سادات خرمگاه[۱]، دکتر علی‌اصغر کرامتی‌نیا[۲*]، دکتر نصرت‌اله ضرغامی[۳]، دکتر محمدحسن کریم‌فر[۴]، دکتر سید مجتبی محدث اردبیلی[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲. دکتری حرفه‌ای پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. استاد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۵. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

سابقه و هدف: یکی از تکنیک‌های پایه‌ای مهم برای مطالعه یک پروتئین اختصاصی در بیولوژی مولکولی، کلون کردن و بیان آن در سلول می‌باشد. از جمله روشهای منتقل کردن ژن، روشهای غیر ویروسی است که کم‌هزینه‌تر، آسانتر و ایمنتر می‌باشند. یکی از ژن‌های مهم که کاربردهای بالینی فراوانی دارد ژن NT4 است. این ژن یکی از اعضای خانواده نوروتروفیک است و در سلول‌های گلیال سیستم اعصاب محیطی و مرکزی بیان می‌شود. این نوروتروفین در بیان ژنی، بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت دارد. هدف از انجام این پژوهش، ساب‌کلونینگ و ترانسفکت این ژن به منظور مطالعه و دسترسی بیشتر با توجه به نیاز به این فاکتور نوروتروفیک در فعالیتهای ژن درمانی است.

مواد و روشها: در این تحقیق، ژن NT4 با روش PCR در پلاسمید pCMV-SPORT6 کلون گشته و پس از آن در باکتری اشرشیاکلی سوش DH5-α ترانسفورم شد. پلاسمید نوترکیب از باکتری میزبان استخراج و ژن NT4 با استفاده از آنزیم Not I ,Sal I از پلاسمید جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید برای پذیرش قطعه NT4 و انجام کلونینگ با آنزیم Hind III برش داده شد و ژن NT4 درون پلاسمید pEGFP-NI ساب‌کلون شد. محصول واکنش اتصال در باکتری فوق ترانسفورم و در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری تخلیص و در مرحله بعد در سلول PC12 ترانسفکت گردید و در خاتمه بیان پلاسمید نوترکیبب با روش western blotting, SDS PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز آنزیمی و تعیین توالی نشان داد پلاسمید ژن مورد نظر حاوی توالی صحیحی بوده و تطابق کامل با توالی ژن مورد نظر در بانک ژن دارد. در آنالیز پروتئین‌های جدا شده از سلول‌های ترانسفکت شده با روش SDS-PAGE، باندی حدود ۴۵ کیلودالتون مشاهده شد که با آنتی‌بادی مونوکلونال در آنالیز وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: این پلاسمید به دلیل ساختار صحیح، جهت انتقال به سیستم یوکاریوتی و ارزیابی بیان مناسب می‌باشد.

واژگان کلیدی: ترانسفکشن، کلونینگ مولکولی، نوتروفین ۴، وکتورهای ژنتیکی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Sadat Khoramgah MS, Keramati Nia AA, Zarghami NA, Karim far MH, Mohades Ardebili M. Transfection of PC12 cell line by pEGFPNI- NT4 and protein expression analysis. Pejouhandeh 2012;17(2):91-7.

مقدمه

یکی از تکنیک‌های پایه‌ای مهم برای مطالعه یک پروتئین اختصاصی در بیولوژی مولکولی، کلون کردن و بیان آن در سلول می‌باشد. از جمله روشهای منتقل کردن ژن، روشهای غیر ویروسی است که کم هزینه‌تر، آسانتر و ایمنتر برای اجرا می‌باشند. برای انتقال ژن درمان کننده مورد نظر، باید یک حامل تحت عنوان وکتور استفاده شود (۱). وکتورهای پلاسمیدی، مولکول‌های کوچکی از مارپیچ دولایه DNA می‌باشند که به طور گسترده در انتقال ژن پستانداران و بیان آن استفاده می‌شوند. ژن طراحی شده به درون پلاسمید وارد

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر علی‌اصغر کرامتی‌نیا؛ تهران، بزرگراه چمران، ولنجک، خیابان تابناک، بلوار دانشجو، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی؛ پست الکترونیک: dr.keramatinia@yahoo.com

شده، سپس پلاسمید به درون جمعیت سلولی مورد نظر انتقال می‌یابد. ورود پلاسمید به درون سلول بوسیله مواد شیمیایی تسهیل می‌شود. پلاسمید دارای اجزای پروموتور ویژه می‌باشد که ساخت پروتئین مورد نظر را پیش می‌برند. همچنین اغلب محتوی شاخصهای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک می‌باشند. یکی از محدودیتهای شایع انتقال ژن غیرویروسی، بیان ژن به‌صورت ناپایدار در این روش است که نتیجه کارآیی کم آن می‌باشد (۲). در تحقیقات مختلف به طور متداول ترانسفکت نمودن به سه روش انجام می‌شود. این سه روش عبارتند از استفاده از فسفات کلسیم، استفاده از لیپوزوم (روش لیپوفکشن) و استفاده از ناقلهای ویروسی. از دو روش اول جهت ترانسفکت نمودن موقتی و از روش آخر جهت ترانسفکت نمودن پایدار و دائمی استفاده می‌شود (۳). در روش لیپوفکشن، ترانسفکت کردن با استفاده از لیپوزوم، یک روش برای وارد کردن ماده ژنتیکی به داخل سلول می‌باشد. لیپوزومها وزیکول‌هایی هستند که به دلیل داشتن فسفولیپید دو لایه، به راحتی قادر به اتصال به غشای سلول‌ها می‌باشند. این روش انتقال، راه را برای انتقال بسیاری از فاکتورهای مورد نیاز به داخل سلول‌ها فراهم کرده است (۴).

استفاده از فاکتورهای رشد و عوامل محافظت کننده نورون‌ها سالها به وسیله محققین مختلف بررسی شده است. آزمایشات مختلف در مدل‌های تجربی اثر حفاظتی فاکتورهای رشد در بیماریهای سیستم عصبی مرکزی مانند سکته‌های مغزی یا ضربات مغزی و بیماریهای نورودژنراتیو را اثبات کرده‌اند. بعضی از این فاکتورهای رشد مانند نوروتروفین‌ها مورد استفاده کلینیکی قرار گرفته‌اند. نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقا، تمایز و مرگ جمعیتهای مختلفی از نورون‌های دوپامینرژیک، حسی و حرکتی را تنظیم می‌کنند. آزمایشات مختلف اثر تروفیک این فاکتورها را در رشد سیستم عصبی نشان داده‌اند. با این وجود، مکانیزم دقیق اثر حفاظتی این فاکتور رشد بر روی نورون‌ها نشان داده نشده است (۵). یکی از اعضای خانواده فاکتورهای نوروتروفیک، ژن NT4 می‌باشد که در سلول‌های گلیال سیستم اعصاب محیطی و مرکزی بیان می‌شود. این نوروتوروفین در بیان ژنی، بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت دارد. این فاکتور بر روی کروموزوم 19Q13.3 قرار دارد و در دوران قبل از تولد میزان آن افزایش پیدا می‌کند (۶). در صورت فقدان یا جهش در ژن مربوط به این فاکتور، بسیاری از بیماریهای سیستم عصبی همانند هانتینگتون امکان بروز پیدا می‌کنند. همچنین ژن مربوط به این فاکتور در کانسر پستان باعث تنظیم بقا و رشد سلول‌ها می‌شود (۷). NT4 یک اثر اتوکرین محافظتی بر روی نورون‌های آسیب دیده در ضایعات سیستم عصبی مرکزی دارد. بررسیهای ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که سلول‌های ترانسپلنت حاوی ژن ترانسفکت شده این فاکتور قادر به بیان مارکر فوق هستند. به منظور افزایش کارآیی فعالیت نوروتروفیک این ژن، Huang و همکاران (۸) سلول‌های بنیادی جنینی موش را ابتدا به سلول‌های پیش‌ساز عصبی و گلیایی متمایز کرده، سپس با کلونینگ ژن حامل این فاکتور و ترانسفکت آن به این سلول‌ها و تزریق آن به منطقه صدمه دیده موش صحرایی به وسیله تکنیک CCI، به نتایج مهمی دست پیدا کردند. مؤلفین گزارش کردند که ترانسپلنت این سلول‌های بنیادی تمایز یافته به منطقه آسیب دیده باعث بهبود در رفتارهای حسی و حرکتی این موشهای صحرایی در مدت ۲ هفته تا یک ماه، در مقایسه با گروه کنترل، می‌شود. همچنین حجم منطقه آسیب دیده در مدت ۴۰ روز بعد از آسیب به مقدار قابل توجهی کم شده بود (۹).

ترانسفکت و کلونینگ ژن در زمره ضروری‌ترین روشهای مرتبط با مطالعات تکاملی، بیولوژیکی، تشخیص بیماریها، و همچنین درمان و پیشگیری از آنها به شمار می‌رود. با توجه به نیاز به این فاکتور نوروتروفیک در فعالیتهای ژن درمانی، بر آن شدیم تا با ساب‌کلونینگ و ترانسفکت آن، زمینه را برای دسترسی بیشتر به ژن NT4 فراهم کنیم.

مواد و روشها

ساب کلونینگ

در این مطالعه، ابتدا وکتور حامل به منظور تکثیر در سویه DH5-α باکتری E.Coli ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط لوریانی برانت (LB) در داخل Shaker انکوباتور کشت داده شدند. به محیط کشت آمپی‌سیلین اضافه گردید. روز بعد باکتری‌های رشد کرده از انکوباتور خارج و جهت استخراج پلاسمید آماده شدند. استخراج با استفاده از کیت High pure plasmid isolation (fermentas) انجام شد. به منظور تأیید وجود ژن بر روی وکتور حامل، از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های NotI, Sal I به صورت تک و دوتایی استفاده شد. سپس محصولات استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز run گردید.

امپلیفیکاسیون

ابتدا پرایمر مناسب برای جداسازی قطعه ژنی از وکتور طراحی شد و از پلاسمید به عنوان الگو استفاده شد. پس از طراحی

پرایمرهای مناسب، برای تکثیر از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی به صورت ۳۰ سیکل ۹۵ درجه ۶ دقیقه، ۵۸ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه یک دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه و ۲۵ درجه ۵ دقیقه استفاده شد. دماهای مختلف اتصال پرایمر به الگو جهت PCR مورد آزمایش قرار گرفت، و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه انتخاب شد. پرایمر طوری طراحی گردید که سایت‌های برشی که در ابتدا و انتهای ژن قرار می‌گیرند، در محل تجمع سایت‌های آنزیمی پلاسمید در پایین دست پروموتر وجود داشته و بر روی خود ژن وجود نداشته باشند. قطعه ژنی که با PCR تکثیر شده بود با استفاده از clean up gene kit خالص‌سازی شد. همزمان وکتور بیانی مورد نظر در محیط LB کشت و تکثیر شد و با استفاده از آنزیم Hind III خطی شد. سپس قطعه ژنی مذکور طی فرآیند الحاق (ligation) و با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase به وکتور مورد نظر وارد شد. پس از آن محصول الحاق به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول حاصل از الحاق وارد پروسه ترانسفورم گردید و برای تأیید ورود ژن به داخل وکتور مقصد، بر روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. در نهایت کلونی‌های تکثیر یافته، وارد مرحله Colony PCR شدند. در این مرحله کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک بوسیله سمپلر برداشته شده و همراه با پرایمرهای Reverse، Forward و آنزیم Taq DNA polymerase وارد میکروتیوب شده و در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. محصول PCR بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و نمونه‌های مثبت که باند مشخصی را ایجاد کرده بودند به محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه گردید. روز بعد، محصول توسط کیت High pure plasmid isolation kit تخلیص شد. در ادامه، آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب، به وسیله دو آنزیم همزمان و با بافر مشترک آنها انجام گرفت. محل اثر این دو آنزیم بر روی پلاسمید در دو سوی قطعه insert شده قرار داشت. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند و سپس کل نمونه‌ها بر روی ژل run گردید. نمونه‌هایی که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان دادند برای تأیید نهایی و تعیین توالی به شرکت sequence lab کشور آلمان فرستاده شدند. سپس نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast جهت تطابق با ژن‌های موجود در بانک ژنتیکی بررسی شد.

ترانسفکشن

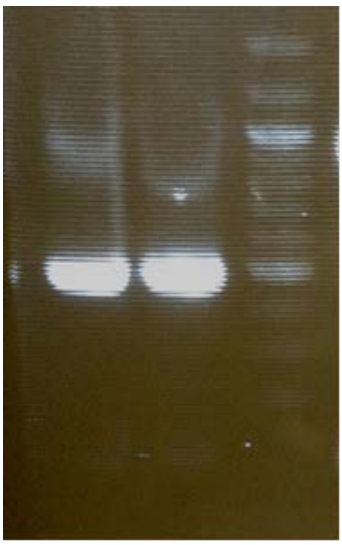
در مرحله بعد به منظور ورود ژن به داخل سلول از روش ترانسفکشن استفاده شد. در این روش، ژن طراحی شده به درون پلاسمید وارد شده، سپس پلاسمید به درون جمعیت سلولی PC12 انتقال می‌یابد. ترانسفکت در ظروف کشت ۶ خانه که ۲۴-۴۸ ساعت قبل در آن سلول کشت داده شده است، صورت می‌گیرد. در زمان ترانسفکت تعداد سلول‌ها به $۲/۵\times۱۰^{۵}$ در هر ظرف می‌رسد. ترانسفکت کردن با استفاده از لیپوزوم انجام می‌شود. ترانسفکت کردن لیپوزومی معمولاً بوسیله کیت‌های استاندارد انجام می‌شود. در این روش از راژین تروبوفکت استفاده شد: یک میکروگرم از DNA پلاسمیدی را به ۳۵۰µL از محیط فاقد سرم اضافه کرده و اجازه می‌دهیم که ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی بماند. بطور همزمان ۱۰µL از توربوفکت را به ۳۵۰µL از محیط افزوده و این مخلوط را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط باقی می‌گذاریم تا کاملاً مخلوط شود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه محتوای این دو تیوب را با یکدیگر مخلوط نموده و اجازه می‌دهیم به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی بماند. پس از گذشت این مدت، محتوای میکروتیوب را روی سلول‌ها ریخته و آنرا به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار می‌دهیم. در نهایت به این سلول‌ها محیط کشت و سرم اضافه شده و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده می‌شوند. پس از ترانسفکت نمودن محیط کشت، سلول‌ها در روز بعد از ترانسفکت تعویض گردید.

در این پژوهش جهت بررسی تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتی از آزمایشهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ استفاده گردید. وسترن بلاتینگ بر پایه واکنش اولیه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی می‌باشد. در این روش ابتدا بلاتینگ پروتئین‌ها انجام می‌شود. در بلاتینگ باندهای پروتئینی از ژل به غشا منتقل می‌شوند. در عمل بلاتینگ مولکول‌های پروتئین از زمینه ژل خارج و در سطح غشا در همان موقعیت قرار می‌گیرند. برای تشخیص پروتئین‌های منتقل شده به غشا می‌توان از لیگاندها یا آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده کرد. در این پژوهش ابتدا با روش SDS-PAGE باندهای پروتئین‌های مایع رویی از یکدیگر جدا شدند. سپس در وسترن بلاتینگ، با آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی NT4 مجاور، و نتایج بررسی گردید.

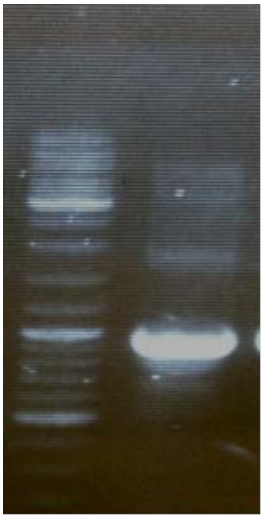
یافته‌ها

وکتور به منظور تکثیر وارد پروسه ترانسفورم شد. پس از رسوب‌گیری نمونه‌ها توسط کیت High pure plasmid تخلیص شد و با استفاده از آنزیم‌های هضم کننده Not I, Sal I آنالیز آنزیمی شد سپس یک میکرولیتر از محصولات هضم و

پلاسمید بر روی ژل آگاروز لود شد که نتیجه حاکی از صحت کار تخلیص و هضم بود (شکل۱). سپس پلاسمید جهت امپلیفیکاسیون به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد که در نتیجه، ژن مورد نظر به مقدار لازم تکثیر پیدا کرد (شکل۲). پلازمید جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال و بعد از تأیید توالی و بلاست وارد مرحله بعدی گردید.



شکل۱. محصول استخراج پلاسمید
ستون۱: مارکر 1000 bp ستون ۲ و ۳: pCMV-SPORT6-NT4

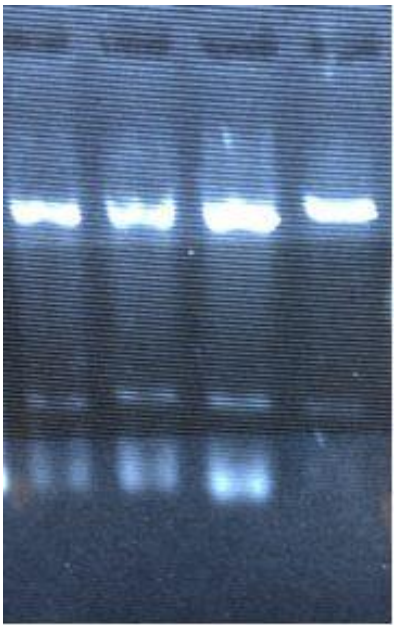


شکل۲. PCR ژن NT4
ستون۱: مارکر 100bp، ستون ۲: ژن NT4

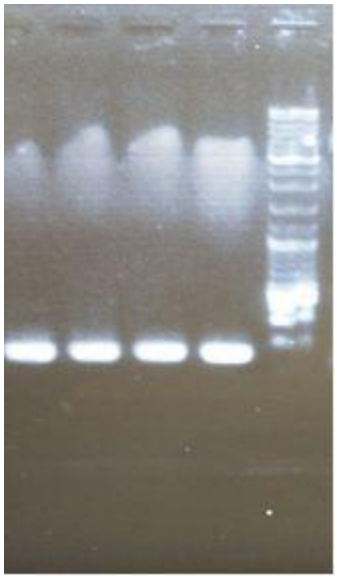
بعد از فرآیند امپلیفیکاسیون، محصول PCR بوسیله هضم آنزیمی به منظور ایجاد انتهای چسبنده آماده گردید و با استفاده از clean up gene kit خالص‌سازی شد. همچنین وکتور بیانی pEGFP-Nl با کشت در محیط LB تکثیر یافته و با فرآیند هضم توسط آنزیم Xho I خطی شد و برای فرآیند الحاق آماده گردید. بعد از الحاق، محصول مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت انکوبه شد و وارد پدیده ترانسفورم گردید و محصول ترانسفورم بر روی پلیت‌های آنتی‌بیوتیکی کشت داده شد.

نمونه‌های مثبت جدا گشته و با استفاده از Colony PCR از نظر ورود ژن تأیید شدند (شکل ۳). سپس در محیط LB کشت داده شده و استخراج پلاسمید انجام گرفت. محصول استخراج بوسیله آنزیم‌های Hind III و Xho I، آنالیز آنزیمی شد و ژن مورد نظر بروی ژل مشاهده گردید (شکل۴). سپس آزمون PCR برای ژن انجام شد (شکل ۵) و در پایان نمونه استخراج شده برای تعیین توالی ارسال شد. پس از بررسی، نتایج حاکی از موفقیت کلونینگ و تایید تعیین توالی بود.

شکل۳. Colony PCR محصول الحاق
ستون ۱: مارکر 1000 bp، ستون ۵-۲: نمونه‌های مثبت

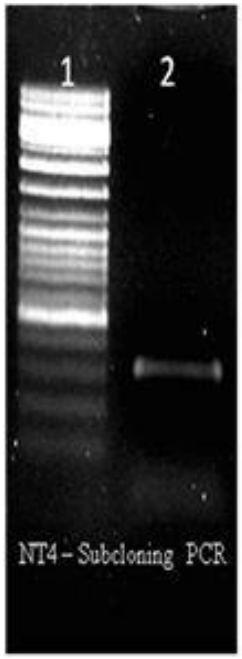


شکل ۴. هضم آنزیمی بوسیله Xho,Hind III I
ستون ۴-۱: pEGFP-Nl-NT4

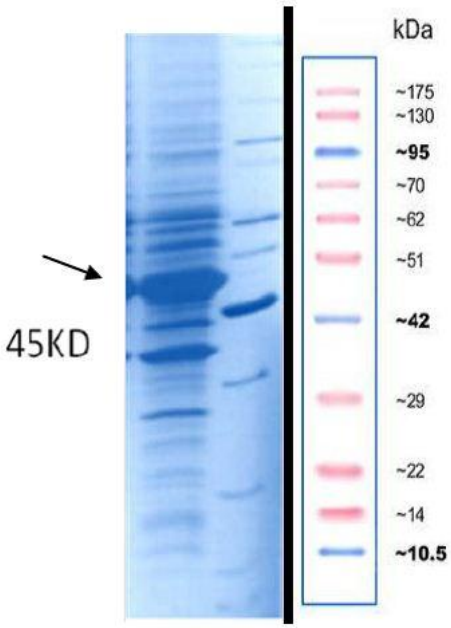


شکل ۵. PCR ژن NT4 بعد از الحاق
ستون ۱: مارکر 100 bp، ستون ۵-۲: ژن NT4

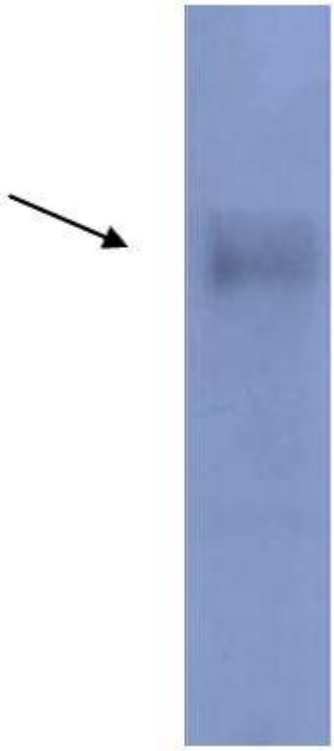
بعد از انجام ترانسفکت به منظور بررسی بیان ژن، RNA سلول‌های ترانسفکت شده استخراج گردید و cDNA آنها تهیه شد. سپس بر روی آنها PCR انجام شد (شکل ۶). بعد از آن سلولهای ترانسفکت شده توسط ProteoJET™ Membrane ***Protein*** Extraction ***Kit*** – Fermentas لیز شدند و پس از سانتریفیوژ، جهت ارزیابی بیان پروتئین مورد بررسی قرار گرفتند که ابتدا با استفاده از SDS PAGE باند پروتئینی مشاهده شد و سپس توسط وسترن بلاتینگ تأیید شد (شکل ۷ و ۸).



شکل ۶. RT-PCR ژن NT4 بعد از ترانسفکت



شکل ۷. SDS PAGE ژن NT4



شکل ۹. Western blotting NT4

بحث

نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقا، تمایز و مرگ جمعیتهای مختلفی از نورون‌های دوپامینرژیک، حسی و حرکتی را تنظیم می‌کنند. NT4 یکی از اعضای خانواده نوروتروفیک می‌باشد که در سلول‌های گلیال سیستم اعصاب محیطی و مرکزی بیان می‌شود. این نوروتوروفین در بیان ژنی، بقا و تمایز رده‌های مختلف نورونی شرکت دارد. در

دهه گذشته از فاکتورهای نوروتروفیک به منظور درمان بیماریها، خصوصاً ضایعات مغزی استفاده شده است (۵ و ۶). هدف از این مطالعه، ساب‌کلونینگ و ترانسفکت ژن NT4 در پلاسمید pEGFP-NI به منظور افزایش کارآیی این فاکتور نوروتروفیک بود که کاربرد گسترده بالینی دارد. پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه pEGFP-NI شرکت invitrogen بود که دلیل انتخاب این وکتور، بیان بالای آن نسبت به وکتور مقصد بود. لی‌پینگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ کلونینگ ژن NT4 در یک لنتی‌ویروس را به منظور استفاده کلینیکی در درمان سرطان همراه با فاکتور P53 انجام داده و ثابت کردند که این فاکتور می‌تواند منجر به آپوپتوز سلول‌های سرطانی شود (۱۰). برخی دیگر از محققان توانستند با استفاده از کلونینگ این ژن در درمان ناشنوایی ناشی از فقدان سلول‌های مویی و دیگر بیماریها قدم بردارند و اریکسون در سال ۱۹۹۶ با استفاده از کلونینگ ژن‌های نوروتروفیک و بیان آن به بررسی این ژن و فعالیت آن پرداخت (۱۴-۱۱). در این تحقیق با توجه به نیاز به تولید ژن NT4 در ژن درمانی و درمانهای کلینیکی، این ژن با استفاده از روش PCR در پلاسمید pCMV-SPORT6 کلون و پس از آن در باکتری اشرشیاکلی سوش DH5-α ترانسفورم شد. سپس پلاسمید نوترکیب از باکتری میزبان استخراج و ژن NT4 با استفاده از آنزیم Not I SaI I,از پلاسمید جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید برای پذیرش قطعه NT4 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم Hind III برش داده شد و ژن NT4 درون پلاسمید pEGFP ساب‌کلون شد. محصول واکنش اتصال در باکتری فوق ترانسفورم و در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری تخلیص و در مرحله بعد در سلول pc12 ترانسفکت گردید و در خاتمه بیان پلاسمید نوترکیب با روش SDS PAGE, western blotting مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه نتایج این تحقیق، این پلاسمید به دلیل ساختار صحیح جهت انتقال به سیستم یوکاریوتی و ارزیابی بیان مناسب می‌باشد. سیستم بیانی باکتریایی با وجود مزیتهای زیاد از جمله سطح بالای بیان، سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم هزینه بودن، به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری و تغییرات پس از ترجمه، برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی مثل این پروتئین مناسب نیست. مزایای سیستم‌های یوکاریوتی شامل اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه می‌باشد، که این سیستم برای تولید بالای پروتئین‌های یوکاریوتی منحصر به فرد است. بنابراین ما در این تحقیق از رده سلولی PC12 استفاده کردیم. این سلول به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و اغلب در تحقیقات بیولوژیک و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در حال حاضر یک سکوی ثابت برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و پروتئین‌های نوترکیب ایجاد کرده است.

ترانسفکشن سلول‌های رده PC12 توسط عوامل مختلفی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به رسپتور استروژن اشاره کرد (۱۵). سوزان و همکارانش (۱۹۹۰) ویژگیهای سلول‌های NGF-PC12 و ترانسفکت ناپایدار آنها را مورد بررسی قرار دادند. آنها با استفاده از لیپوفکتین توانستند میزان کارآیی ترانسفکت و مقدار زنده ماندن سلول‌ها را در رده سلولی PC12 بهبود ببخشند، ولی نوع ترانسفکت آنها موقتی بود (۱۶). گاردنر و همکاران در سال ۲۰۰۹ با ترانسفکشن سلول‌های PC12 توسط فاکتور NGF توسط یک عامل واسطه Fuegene Reagen به نتایج مناسبی رسیدند و این نتایج را با سایر عوامل ترانسفکت کننده مقایسه کردند (۱۷).

یانکر و همکاران (۱۹۹۰) با ترانسفکت سلولهای PC12 توسط GAP-43 توانستند به این نتیجه برسند که این عامل در پتانسیل عمل فاکتور NGF نقش ایفا می‌کند (۱۸). در این پژوهش یک محصول پروتیئنی ایجاد گردید که از آن می‌توان برای ترانسپلنت استفاده کرد. این امر گامی بزرگ در درمان بیماریهای عصبی به حساب می‌آید و این مسأله‌ای است که در پژوهشهای قبلی به آن اشاره نشده است.

نتیجه‌گیری

آنالیز آنزیمی و تعیین توالی نشان داد پلاسمید ژن مورد نظر حاوی توالی صحیحی بوده و تطابق کامل با توالی ژن مورد نظر در بانک ژن دارد. در آنالیز پروتئین‌های جدا شده از سلول‌های ترانسفکت شده با روش SDS-PAGE، باندی حدود ۴۵ کیلودالتون مشاهده شد که با آنتی‌بادی مونوکلونال در آنالیز وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. در پایان اینگونه می‌توان نتیجه گرفت که این پلاسمید به دلیل ساختار صحیح برای انتقال به رده سلولی PC12 و ارزیابی بیان مناسب بود.

REFERENCES

1. Menuel S, Fontanay S, Clarot I, Duval RE, Diez L, Marsura A. Synthesis and complexation ability of a novel bis-(guanidinium)-tetrakis-(beta-cyclodextrin) dendrimeric tetrapod as a potential gene delivery (DNA and siRNA) system. Study of cellular siRNA transfection. Bioconjug Chem 2008;19(12):2357-62.

2. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 1973;52(2):456-67.

3. Tsukakoshi M, Kurata S, Nomiya Y, Ikawa Y, Kasuya T. A Novel Method of DNA Transfection by Laser Microbeam Cell Surgery. Appl Phys B 1984;35(3):135-40.

4. Fischer D, von Harpe A, Kunath K, Petersen H, Li Y, Kissel T. Copolymers of ethylene imine and N-(2-hydroxyethyl)-ethylene imine as tools to study effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes. Bioconjugate Chem 2002;13(5):1124-33.

5. Reichardt LF .Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006;361(1473):1545-64.

6. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 1993;260(5111):1130-2.

7. Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. Clin Cancer Res 2001;17(7):1741-52.

8. Huang T, Krimm RF. Developmental expression of Bdnf, Ntf4/5, and Trk-B in the mouse peripheral taste system. Dev Dyn 2010;239(10):2637-4.

9. Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, et al. Mammalian neurotrophin-4: Structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(7):3060-4.

10. Song LP, Li YP, Wang N, Li WW, Ren J, Qiu SD, et al .NT4(Si)-p53(N15)-antennapedia induces cell death in a human hepatocellular carcinoma cell line. World J Gastroenterol 2009;15(46):5813-20.

11. Zheng G, Zhu K, Wei J, Jin Z, Duan M. Adeno-associated viral vector-mediated expression of NT4-ADNF-9 fusion gene protects against aminoglycoside-induced auditory hair cell loss in vitro. Acta Otolaryngol 2011;131(2):136-41.

12. Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, et al. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. J Neurosci 1996 ;16(17):5361-71.

13. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science 1990;247(4949 Pt 1):1446-51.

14. Farhi J, Fisch B, Garor R, Peled Y, Pinkas H, Abir R. Neurotrophin 4 enhances in vitro follicular assembly in human fetal ovaries. Fertil Steril 2011;15;95(4):1267-71.

15. Gollapudi L, Oblinger MM. Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. J Neurosci Res 1999;56(1):99-108.

16. Muller SR, Sullivan PD, Clegg DO, Feinstein SC. Efficient transfection and expression of heterologous genes in PC12 cells. DNA Cell Biol. 1990 Apr;9(3):221-9.

17. Gardner A, Bohlke M. Transfection of nerve growth factor differentiated PC12 cells with FuGene® HD transfection reagent. Biochimia 2009;1(3):122-31.

18. Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL. Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. Brain Res Mol Brain Res 1990;7(1):39-44.