مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۱/هفته‌ی سوم تیر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

روشی آسان و ابتکاری جهت عبور Small Interfering RNA (siRNA) از غشای سلول‌های یوکاریوتی: Toxoplasma Gondii به عنوان نمونه

عباسعلی اسکندریان[۱]، مجتبی عظیمی رسکتی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های یوکاریوتی دارای اندامک‌های غشادار هستند. با توجه به شیوع بالای عفونت Toxoplasmosis و کمبود داروهای مؤثر به ویژه بر روی مرحله‌ی کیستی انگل، مطالعه‌ی حاضر با هدف افزودن Small interfering RNA (siRNA) در زمان تکثیر میکروارگانیسم به محیط جهت عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌های Toxoplasma gondii انجام شد.

روش‌ها: Toxoplasma gondii در موش سوری تکثیر شد. طراحی siRNA با توالی مناسب به صورت In silico برای قسمتی از ژن Dihydrofolate reductase (DHFR) صورت گرفت. جهت بررسی میزان انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های گردآوری شده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم گردید.

یافته‌ها: میزان انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل با استفاده از روش Addition before barrier arise style (ABBAS) معادل ۷۳ درصد بود. میانگین زمان مرگ موش‌های تیمار شده با siRNA، به طور تقریبی ۲ روز بعد از زمان مرگ موش‌های گروه شاهد بود.

نتیجه‌گیری: Toxoplasma gondii دارای غشای دو لایه‌ای کمپلکس غشای داخلی می‌باشد. احتمال می‌رود موفقیت این روش در عبور هر چه بیشتر siRNA به داخل سیتوپلاسم تاکی‌زوئیت‌ها، به این علت است که مولکول siRNA قبل از تشکیل کامل غشا و یا هنگامی که غشا منافذ بزرگ‌تری دارد، وارد سلول می‌شود.

واژگان کلیدی: Small interfering RNA، یوکاریوت، Toxoplasma gondii

ارجاع: اسکندریان عباسعلی، عظیمی رسکتی مجتبی. **روشی آسان و ابتکاری جهت عبور Small Interfering RNA (siRNA) از غشای سلول‌های یوکاریوتی: Toxoplasma Gondii به عنوان نمونه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۱): ۵۷۶-۵۷۱

مقدمه

سلول‌های یوکاریوتی اندامک‌های غشادار دارند و این آشکارترین تفاوت سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی می‌باشد (۱). غشای سلول‌های یوکاریوت به طور فیزیکی محل رونویسی ژن را از محل ترجمه جدا می‌کند؛ چرا که ریبوزوم فقط در سیتوپلاسم وجود دارد. بنابراین، تنظیم بیان ژن‌های یوکاریوت از مراحل متعددی می‌گذرد که این مراحل در پروکاریوت‌ها وجود ندارند و در این مراحل است که مکان‌هایی برای تنظیم بیان مهیا می‌گردد. متیلاسیون DNA، می‌تواند الگوهای بیان ژن را تغییر دهد. علاوه بر بسته‌بندی DNA توسط هیستون‌ها، میزان متیله شدن DNA نیز مکانیسم دیگری برای جلوگیری از بیان نامناسب ژن‌ها در انواع خاصی از سلول‌ها محسوب می‌شود (۲).

امروزه، استفاده از تکنیک micro RNA کاربردهای وسیعی پیدا کرده است. نقش دفاعی RNA interference (RNAi) علیه اسیدهای نوکلئیک اگزوژن مثل ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها به اثبات رسیده است (۴-۳). در مسیر RNAi دو نوع Small RNA شامل Small interfering RNA (siRNA) و microRNA (miRNA) وجود دارد. siRNA، با طول ۲۴-۲۱ نوکلئوتید، دو رشته‌ای است و در انتهای ۳، دارای ۲ نوکلئوتید به صورت آویزان (Overhang) می‌باشد (۵).

علاوه بر نقش RNAi در مهار بیان ژن، این مکانیسم می تواند به عنوان یک پتانسیل درمانی علیه طیف وسیعی از اختلالات مثل سرطان، بیماری‌های عفونی و اختلالات متابولیک عمل نماید (۵).

۱- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: عباسعلی اسکندریان
Email: aeskandarian@med.mui.ac.ir

از آن جایی که برای هر گونه استفاده از فن‌آوری RNAi توانایی در فرستادن siRNA به داخل سیتوپلاسم سلول‌های مورد نظر گامی اساسی در این تکنیک می‌باشد، نحوه‌ی عبور siRNA از غشای سلول‌های مورد نظر از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو، از روش‌های مختلفی نظیر Soaking، شوک حرارتی و الکتروپوراسیون به این منظور استفاده شده است. با این وجود، ممکن است روش‌های پیش‌گفته در مورد تمام سلول‌ها به میزان رضایت‌بخش نتیجه نداشته باشد. اگر چه روش الکتروپوراسیون کارآمدترین روش ارایه شده در این زمینه می‌باشد، این روش در مورد تک‌یاخته‌های انگلی بسیار محدود بوده است. در زمینه‌ی استفاده از این روش، در مطالعه‌ی حاضر تجارب پژوهشگران بر روی Toxoplasma gondii متمرکز گردید.

Toxoplasma gondii انگل اجباری داخل سلولی است که به شاخه‌ی Apicomplexa تعلق دارد. این تک‌یاخته، عامل بیماری Toxoplasmosis است که بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان و بسیار شایع می‌باشد.

با توجه به شیوع بالای عفونت Toxoplasmosis و ایجاد مقاومت نسبت به داروهای پیریمتامین و سولفادیازین و همچنین، با توجه به کاربرد های وسیع تکنیک siRNA و اثبات توانایی آن در مهار بیان اختصاصی ژن، هدف از انجام این پژوهش، افزودن siRNA در زمان تکثیر میکروارگانیسم به محیط، جهت عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌های Toxoplasma gondii بود. این روش با عنوان Addition before barrier arise style (ABBAS) نام‌گذاری گردید.

روش‌های Soaking و الکتروپوراسیون جهت عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته و نتایج رضایت‌بخشی در پی استفاده از آن‌ها حاصل نشده بود. از این رو، تجارب بر روی روش‌های دیگری متمرکز گردید که افزودن siRNA در زمان تکثیر Toxoplasma gondii به محیط، خوشبختانه نتایج مطلوبی را به همراه داشت.

غشای Toxoplasma gondii با غشای بسیاری از سلول‌های یوکاریوتی متفاوت است. این انگل، دارای غشای دو لایه‌ای کمپلکس غشای داخلی (Inner membrane complex یا IMC) است که شامل کیسه‌ی وزیکولی مسطح موجود در قسمت زیرین غشای پلاسمایی و مقابل (Subpellicular microtubules) می‌باشد. در انتهای قدامی در قسمت لوله مانند که Conoid نامیده می‌شود، دو حلقه‌ی Preconoidal وجود دارد که Apical polar ring را می‌سازد (۷-۶).

روش‌ها

طراحی siRNA طراحی siRNA با توالی مناسب به صورت In silico برای قسمتی از ژن Dihydrofolate reductase (DHFR) صورت گرفت. برای جستجوی شباهت‌های توالی‌های کوتاه در تمام ژنوم جهت به حداقل رساندن اثر Off-target نرم‌افزارهای Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) و dsDirect مورد استفاده قرار گرفت.

سفارش سنتز توالی‌های طراحی شده‌ی siRNA به شرکت Eurofins (Germany) داده شد. توالی و اطلاعات siRNA اختصاصی ژن DHFR در جدول ۱ آمده است.

کشت انگل و آماده‌سازی نمونه‌ها: Toxoplasma gondii در موش سوری نگهداری و تکثیر شد. مقدار ۰/۵ میلی‌متر از سوسپانسیون انگلی محتوی ۱۰۷ × ۱ تاکی‌زوئیت به صورت داخل صفاقی و در شرایط استریل به موش سوری تزریق و ۴ روز پس از آن، با رعایت موارد اخلاقی، موش در شرایط بیهوشی کشته و اگزودای صفاقی محتوی تاکی‌زوئیت‌های Toxoplasma gondii جمع‌آوری و آن گاه، پس از دو بار شستشو با Phosphate-buffered saline (PBS)، برای مراحل بعدی آماده شد. پس از سانتریفیوژ با شتاب ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی خارج و سپس مقدار ۶۰ میکرولیتر از siRNA اختصاصی ژن DHFR معادل ۲ میکرومولار به نمونه اضافه گردید. به عنوان شاهد Scramble، به جای siRNA، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Label IT® RNAi Delivery Control معادل ۲ میکرو مولار افزوده شد و در نهایت، به کووت‌های ۰/۴ سانتی‌متر-گپ (cm-gap) انتقال یافت. کووت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند.

جدول ۱. توالی و اطلاعات Small interfering RNA (siRNA) اختصاصی ژن Dihydrofolate reductase (DHFR)

نام	موقعیت شروع	جهت	توالی		
DHFR ۰۱	۷۸۱	Anti-sense	AGAAUCCUUGUACUCUUCCTT	۵	۳
		Sense	GGAAGAGUACAAGGAUUCUTT	۵	۳
DHFR ۰۲	۹۳۲	Anti-sense	UGUUUGAAAGAAUGUCAUCTT	۵	۳
		Sense	GAUGACAUUCUUUCAAACATT	۵	۳

DHFR: Dihydrofolate reductase

نمونه‌های مورد استفاده برای آزمایش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) و فلوسیتومتری، به پلیت‌های ۱۲ چاهکی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر Roswell Park Memorial Institute (RPMI) و Fetal bonvine serum (FBS) ۱۰ درصد انتقال یافتند و به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با Carbon dioxide (CO_2) ۵ درصد انکوبه شدند. هر چاهک، محتوی ۲×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت برای آزمایش MTT بود. برای فلوسیتومتری، ۱×۱۰^{۷} تاکی‌زوئیت در هر چاهک اضافه شد. میزان بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید که در آن چگالی نوری با عبارت Optical density (OD) نمایش داده شده است:

۱۰۰ × OD شاهد/OD نمونه = بقای سلول‌ها

انتقال siRNA انتقال siRNA در زمان تکثیر میکروارگانیسم به محیط جهت عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌های Toxoplasma gondii با استفاده از روش ABBAS صورت گرفت.

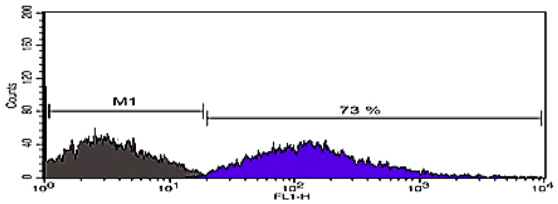
فلوسیتومتری: جهت تعیین میزان انتقال siRNA نشان دار به داخل انگل، از روش فلوسیتومتری با دستگاه FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) استفاده شد.

بررسی بقای موش سوری: برای بررسی میزان بقای موش‌های تیمار شده با siRNA اختصاصی ژن DHFR در مقایسه با موش‌های گروه شاهد، از موش‌های سوری استفاده شد. برای انجام این آزمایش، موش‌ها در دو گروه مورد و شاهد قرار داده شدند که هر گروه شامل ۳۰ سر موش بود. ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون انگلی حاوی ۲×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت و مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر دو siRNA اختصاصی ژن DHFR به صورت داخل صفاقی به موش‌های موجود در گروه آزمایش تزریق گردید. موش‌های گروه شاهد با ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون انگلی شامل ۲×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت وحشی آلوده شدند. در نهایت، زمان مرگ موش‌های گروه‌های مورد و شاهد به دقت ثبت شد و به صورت میانگین با یکدیگر مقایسه گردید. زمان مرگ موش‌های این دو گروه، هر ۶ ساعت بررسی شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های گردآوری شده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. جهت مقایسه‌ی میانگین داده‌ها، بین گروه‌های شاهد و مورد، از آزمون One-way ANOVA استفاده گردید. $P \leq ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

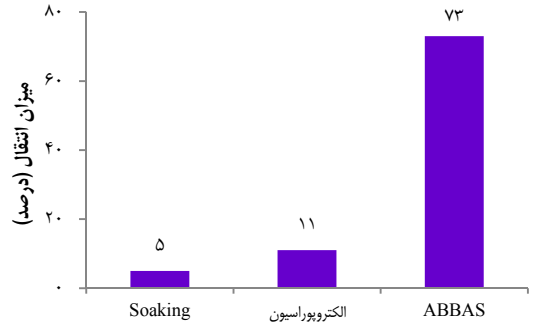
یافته‌ها

نتایج مربوط به فلوسیتومتری: جهت بررسی میزان انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل با استفاده از شیوه‌های مختلف، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. نتایج حاصل از انجام آزمایش فلوسیتومتری با روش ABBAS در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. میزان انتقال Small interfering RNA (siRNA) نشان‌دار به داخل انگل به روش Addition before barrier arise style (ABBAS)

در این نمودار، محور افقی شدت فلورسنت شناسایی شده توسط شناساگر Fluorescent intensity histogram (FL1-H) و محور عمودی جمعیت انگل‌ها را نشان می‌دهد. همچنین، میزان ۷۳ درصد موفقیت در عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌ها به روش ABBAS مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. میزان انتقال Small interfering RNA (siRNA) به داخل انگل با استفاده از روش‌های مختلف

در شکل ۲، محور افقی روش‌های به کار رفته در انتقال Small interfering RNA (siRNA) به داخل انگل و محور عمودی میزان موفقیت در عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌ها به درصد را نشان می‌دهند.

ABBAS: Addition before barrier arise style

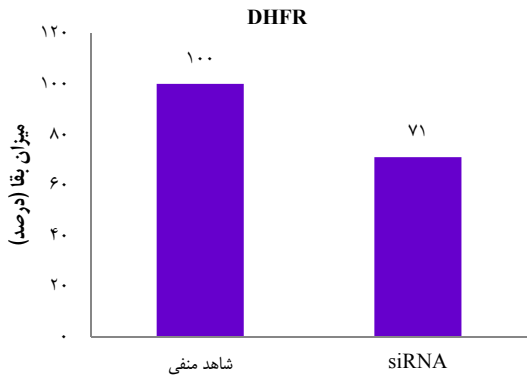
از روش‌های Soaking و الکتروپوراسیون نیز جهت انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل استفاده شد. با استفاده از روش‌های Soaking و الکتروپوراسیون به ترتیب میزان ۵ و ۱۱ درصد عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌ها مشاهده شد که در مقایسه با روش ABBAS (۷۳ درصد)، انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل به طور چشم‌گیری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل ۲).

شایان ذکر است که در پژوهش حاضر، برای انجام روش

الکتروپوراسیون، دستگاه Electroporation بر روی مقاومت ۵۰ اهم، ولتاژ ۲ کیلوولت، ظرفیت ۵۰ میکروفاراد و طول پالس ۱/۹۸ میلی‌ثانیه (ms) تنظیم گردید که چنانچه اشاره شد، نتایج رضایت‌بخش نبود.

نتایج مربوط به آزمایش MTT: تجارب در همه‌ی گروه‌ها به صورت تکرار سه تایی (Triplicate) انجام شد، میانگین نتایج حاصل به دست آمد و میانگین بقای گروه تحت مورد با گروه شاهد با استفاده از آزمون آماری One- way ANOVA اختلاف معنی‌داری را بین گروه واجد siRNA اختصاصی ژن نسبت به گروه شاهد منفی نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$).

میزان بقای انگل‌های واجد siRNA معادل ۷۰/۷۶ بود که ۲۹/۲۳۱ نسبت به انگل‌های گروه شاهد منفی کاهش داشت و این مقدار کاهش، به لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۳).



شکل ۳. میزان بقای تاکی‌زوئیت‌ها در گروه‌های واجد Small interfering RNA (siRNA) و شاهد منفی

DHFR: Dihydrofolate reductase

میزان بقای موش سوری (In vivo): ۴ روز بعد از تزریق، اولین موش گروه شاهد در ساعت ۱۸:۳۰ تلف شد و از این لحظه برای موش‌های گروه مورد با siRNA زمان ثبت شد. میانگین زمان مرگ موش‌های تیمار شده با siRNA حدود ۲ روز بعد در ساعت ۱۱:۱۵ بود. در واقع، نتیجه‌ی حاصل شده نشان دهنده‌ی عملکرد درست این روش و افزایش ۴۱ ساعته‌ی میانگین طول عمر موش‌های تیمار شده با siRNA بود.

بحث

برای استفاده از روش‌های RNAi، عبور micro RNAی طراحی شده، اولین گام اساسی برای هر گونه استفاده از آن می‌باشد. در این مطالعه، از روش‌های Soaking و الکتروپوراسیون جهت عبور siRNA از غشای تاکی‌زوئیت‌ها استفاده و نتایج رضایت‌بخشی حاصل نشد. در نهایت، افزودن siRNA در زمان تکثیر انگل (ABBAS) بررسی شد. میزان siRNA منتقل شده به سلول با استفاده از روش فلوسیتومتری ۷۳ درصد بود.

Toxoplasma gondii دارای غشای دو لایه‌ای کمپلکس غشای داخلی است که شامل کیسه‌ی وزیکولی مسطح موجود در قسمت زیرین غشای پلاسمایی و مقابل می‌باشد. احتمال می‌رود موفقیت این روش در عبور هر چه بیشتر siRNA به داخل سیتوپلاسم تاکی‌زوئیت‌ها، به این علت است که مولکول siRNA قبل از تشکیل کامل غشا و یا هنگامی که غشا منافذ بزرگ‌تری دارد، وارد سلول می‌شود.

مدت زمان بقای موش‌های تیمار شده با siRNA اختصاصی ژن DHFR نشان داد که اثر siRNA اختصاصی این ژن، قوی می‌باشد. اگر چه در مورد آزمون میزان بقای انگل (MTT assay) فقط ۷۰/۷۶۹ درصد بقای تاکی‌زوئیت‌ها و ۲۹/۲۳۱ درصد مرگ و میر آن‌ها مشاهده شد، اما این مورد بسیار طبیعی است و به خصوصیات ژن DHFR بر می‌گردد. به همان نسبت که تاکی‌زوئیت‌ها در حین انجام مراحل، قبل از تزریق به موش‌ها به تعداد زیادی از بین رفتند، در بدن موش‌ها نیز در حال از بین رفتن هستند و در نتیجه، بیماری‌زایی آن‌ها کاهش یافته است و موش‌ها در مدت زمان پیش‌گفته تلف شده‌اند.

بر اساس جستجوهای انجام شده در پایگاه‌های داده، پژوهش مشابهی از نظر روش و انگل مورد استفاده یافت نشد. در انگل Brugia malayi، انتقال siRNA به داخل سلول با استفاده از روش الکتروپوراسیون صورت گرفته بود و محققین توانستند در شرایط آزمایشگاهی، کاهش قابل توجهی در ژن Independent phosphoglycerate mutase مشاهده کنند (۸). در انگل Acanthamoeba، انتقال siRNA به داخل سلول با استفاده از روش Soaking صورت گرفته بود و محققین توانستند در شرایط آزمایشگاهی کاهش قابل توجهی در ژن میوزین IC مشاهده کنند (۹). از روش الکتروپوراسیون جهت انتقال siRNA به داخل سلول و مهار ژن Adenosine kinase در انگل Toxoplasma gondii استفاده و نتیجه‌ی مطلوبی حاصل شد (۱۰)، اما بررسی‌های انجام شده نشان داد که در زمان اجرای مطالعه‌ی حاضر، کیت مورد استفاده در آن مطالعه، تولید نمی‌شد.

در پژوهش حاضر، در ابتدا روش Soaking و سپس، روش الکتروپوراسیون استفاده شد، اما به علت این که میزان اندکی نتیجه به دست آمد، به این منظور از روش فلوسیتومتری جهت بررسی میزان انتقال siRNA نشان‌دار به داخل انگل استفاده شد و میزان ۷۳ درصد موفقیت در انتقال siRNA با استفاده از روش ABBAS مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی انگل‌شناسی

به شماره‌ی ۳۹۴۴۲۸ است که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. از همکاری مسؤولان بخش انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و آزمایشگاه مرجع قدردانی می‌گردد.

References

1. Margulis L. Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the precambrian earth. New Haven, CT: Yale University Press; 1970.
2. Lizardi PM, Yan Q, Wajapeyee N. Analysis of DNA Methylation in Mammalian Cells. Cold Spring Harb Protoc 2016. [Epub ahead of print].
3. Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. Pharmacol Ther 2005; 107(2): 222-39.
4. Nicolas FE, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM. Loss and retention of RNA interference in fungi and parasites. PLoS Pathog 2013; 9(1): e1003089.
5. Ambesajir A, Kaushik A, Kaushik JJ, Petros ST. RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. Saudi J Biol Sci 2012; 19(4): 395-403.
6. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64(3): 607-23.
7. Morrissette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66(1): 21-38.
8. Singh PK, Kushwaha S, Mohd S, Pathak M, Misra-Bhattacharya S. In vitro gene silencing of independent phosphoglycerate mutase (iPGM) in the filarial parasite Brugia malayi. Infect Dis Poverty 2013; 2(1): 5.
9. Martin-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Lopez-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Pinero JE, Valladares B, et al. Evaluation of Acanthamoeba myosin-IC as a potential therapeutic target. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(4): 2150-5.
10. Yu L, Gao YF, Qiao ZP, Li CL, Li X, Shen JL. Toxoplasma gondii: siRNA can mediate the suppression of adenosine kinase expression. Exp Parasitol 2008; 118(1): 96-102.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.01.2017
Vol. 35, No. 431, 3rd Week, July 2017
Accepted: 08.03.2017

A Simple and Innovative Method for Cell Membrane Passing the Small Interfering RNA (siRNA) in Eukaryotic Cells; Toxoplasma Gondii as an Experience

Abbas Ali Eskandarian[1], Mojtaba Azimi-Resketi[2]

Original Article

Abstract

Background: Eukaryotic cells have membrane organelles. Due to the high prevalence of toxoplasmosis and lack of effective drugs especially on dormant cystic stages, we aimed adding small interfering RNA (siRNA) in culture medium on the proliferation period of microorganism in order to transmit siRNA into the tachyzoite of Toxoplasma gondii (T. gondii) named addition before barrier arise style (ABBAS).

Methods: T. gondii was proliferated in mouse. Based on dihydrofolate reductase gene sequence, was designed siRNA using in-silico method. The flow cytometry method was used to estimate the transmission rate of tagged siRNA into the parasite. Statistical analysis was accomplished using SPSS software.

Findings: The transmission rate of tagged siRNA into the parasite was 73% using ABBAS. The mean death time of siRNA-treated mice was approximately 2 days later than control group.

Conclusion: T. gondii possess an inner membrane complex (IMC). Probably success of this method in passing more siRNA into the cytoplasm of tachyzoites is due to the fact that siRNA molecule enters the cell prior to absolute formation of the membrane or when the membrane possesses larger pores.

Keywords: Small interfering RNA, Eukaryote, Toxoplasma gondii

Citation: Eskandarian AA, Azimi-Resketi M. **A Simple and Innovative Method for Cell Membrane Passing the Small Interfering RNA (siRNA) in Eukaryotic Cells; Toxoplasma Gondii as an Experience.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(431): 571-6.

1- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Abbas Ali Eskandarian, Email: aeskandarian@med.mui.ac.ir