مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۵/هفته چهارم فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴

مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP–۱۰ با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های Human embryonic kidney

هادی میرزاپور[۱]، آرزو کرم‌زاده[۱]، دکتر حسین خان احمد[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]، دکتر مجید خیرالهی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از چالش‌های پیش رو در روش‌های مرسوم تولید پروتئین نوترکیب که ترانسژن به صورت خطی به سلول میزبان وارد می‌شود، هتروژنی در تعداد نسخه‌های ترانسژن در کلون‌های مختلف به دست آمده است که منجر به بیان ژن در سطوح مختلف می‌شود. گذشته از کارایی پایین درج خطی در ژنوم میزبان، پدیده‌ای دیگر به نام Position effect باعث کمتر شدن کارایی بیان ژن می‌گردد. PiggyBac کلاسی از DNA ترانسپوزونی است که می‌تواند به صورت مکانیزم Cut and paste در ژنوم سلول میزبان جابه‌جا شود. برخی خصوصیات منحصر به فرد این ترانسپوزون، آن را به یکی از وکتورهای مناسب در مطالعات انتقال ژن تبدیل کرده است. انتقال ترانسژن با حجم بالا و درج در نواحی فعال از نظر رونویسی، از جمله خصوصیات مهم این ترانسپوزون است که می‌توان از آن در تولید پروتئین نوترکیب با کارایی بالا بهره برد. در این تحقیق، تعداد نسخه‌های درجی در کلون‌های به دست آمده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی این سیستم در رده‌ی سلولی HEK (Human embryonic kidney) مقایسه شده است.

روش‌ها: تولید سازه‌های تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی سیستم ترانسپوزاز حاوی ژن IP–۱۰ و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین با استفاده از روش‌های کلونینگ مولکولی به انجام رسید. رده‌ی سلولی HEK پس از تکثیر در پلیت‌های سلولی جهت انجام ترانسفکشن Seed شدند. سازه‌ها با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ترانسفکت شدند و پس از ۴۸ ساعت مورد تیمار با آنتی بیوتیک هیگرومایسین به مدت دو هفته قرار گرفتند. کلون‌های به دست آمده پس از استخراج DNA ژنومی با تکنیک Absolute real-time PCR (Absolute real-time polymerase chain reaction) از نظر تعداد نسخه‌های ژنی درج شده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تعداد نسخه‌های ژنی به دست آمده با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی در هر سلول، برابر با ۵ نسخه بود؛ در حالی که این عدد در سیستم دو پلاسمیدی برابر با دو نسخه بود.

نتیجه‌گیری: بررسی نتایج حاصل از تعداد نسخه‌های درجی در سیتم‌های تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی نشان داد که سیستم تک پلاسمیدی کارایی بالاتری از لحاظ تعداد نسخه‌های درجی دارد و می‌توان با کلون کردن ژن مورد نظر و کاست بیان کننده‌ی آنزیم ترانسپوزاز در یک پلاسمید واحد، تعداد نسخ بیشتری جهت بیان بیشتر پروتئین نوترکیب به دست آورد.

واژگان کلیدی: PiggyBac ترانسپوزون، ژن درمانی، پروتئین نوترکیب، تعداد نسخه‌های ترانسژن

ارجاع: میرزاپور هادی، کرم‌زاده آرزو، خان احمد حسین، صالحی رسول، خیرالهی مجید. **مقایسه‌ی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ژن IP–۱۰ با استفاده از سیستم تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی بر اساس سیستم ترانسپوزونی PiggyBac در ژنوم سلول‌های Human embryonic kidney.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۸۱–۱۷۰

---

*این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۳۱۴۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین خان احمد
Email: hossein_khanahmad@yahoo.com

مقدمه

روش مرسوم در تولید پروتئین نوترکیب بر پایه‌ی درج تصادفی ترانسژن در ژنوم میزبان استوار است. در این روش سازه‌ها به صورت پلاسمید حلقوی یا خطی به درون سلول ترانسفکت می‌شوند و در gapهایی که ناشی از شکست رشته‌ی DNA است به درون ژنوم وارد می‌گردند. بدین ترتیب، ترانسژن جزیی از ژنوم میزبان می‌شود و در هر بار تقسیم سلولی، به سلول دختر نیز منتقل می‌گردد. روش مرسوم تولید کلون‌های سلولی پایدار بر پایه‌ی درج تصادفی Heterologous DNA در ژنوم میزبان، زمانبر و پرزحمت است و با مقدار تولید غیر قابل پیش‌بینی محصول همراه است (۱).

سلول‌های نوترکیب حاصل از روش ورود استاندارد DNA (Standard transfection)، از نظر تعداد کپی‌های Heterologous DNA و نیز محل درج (Site of insertion) بسیار هتروژن هستند و منجر به طیف وسیعی از سلول‌های نوترکیب مختلف از نظر تولید پروتئین می‌شوند. به همین دلیل، مرحله‌ی انتخاب (Clonal selection) برای حذف سلول‌هایی که محصول را تولید نمی‌کنند و یا در مقدار اندک تولید می‌کنند، ضروری به نظر می‌رسد.

به همین خاطر، شمار زیادی از سلول‌های منتخب برای این که مشخص شود کدام کلون سلولی محصول پروتئین نوترکیب را به میزان مورد توجه تولید می‌کند، باید از این نظر غربالگری شوند که با طولانی شدن زمان غربالگری و تحمیل هزینه‌ی فراوان همراهند (۲). از سوی دیگر، در این روند احتمال یافتن کلونی مناسب با تولید بالای پروتئین کم است (۳). علاوه بر این، رده‌های سلولی منتخب، هر چند ماه به خاطر Transcription silencing باید تحت بررسی از نظر بیان ژن قرار گیرند (۴).

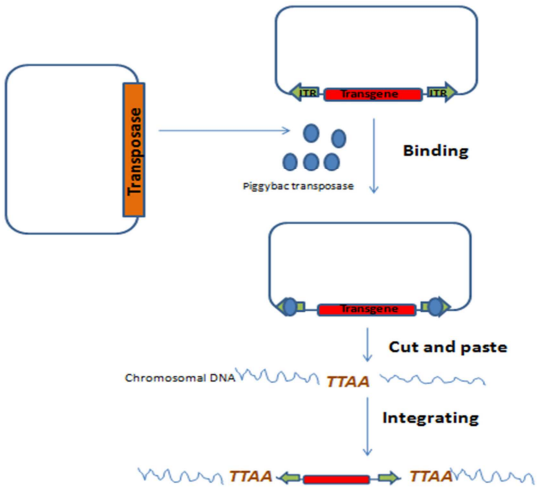
پدیده‌ی Transcription silencing زمانی مطرح می‌شود که ترانسژن مورد نظر در نواحی غیر فعال از نظر رونویسی درج گردد یا یک عنصر مهار کننده‌ی رونویسی (Silencer) در مجاورت این ترانسژن با تداخل در بیان آن باعث کاهش بیان گردد. از این پدیده به عنوان PEV (Position effect variegation) یا اثر مکانی یاد می‌شود. این پدیده اولین بار در مطالعه‌ای که رنگ چشم جهش یافته‌ی مگس سرکه را بررسی می‌کرد، توسط Weiler و Wakimoto مشاهده شد (۵). این پدیده به وفور در سیستم بر پایه‌ی درج خطی در تولید پروتئین‌های نوترکیب دیده می‌شود و علت اصلی هتروژن بودن کلون‌های نوترکیب مختلف، از نظر میزان بیان ترانسژن است.

عناصر ترانسپوزونی به صورت معمول در دستورزی ژنتیکی ارگانیسم‌های پست‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در عوض، استفاده از آن‌ها در مهره‌داران به دلیل فقدان سیستمی با کارایی بالا در ترانسپوزیشن محدود شده بود تا این که قابلیت ترانسپوزونی PiggyBac در مهره‌داران از جمله انسان و موش به اثبات رسید.

PiggyBac جزء کلاس DNA ترانسپوزون‌ها بود و از ژنوم حشره‌ای به نام Trichoplusiani استخراج گردید (۶). چندین ویژگی منحصر به فرد، سیستم PiggyBac را از سایر سیستم‌های ترانسپوزونی متمایز می‌کند. ویژگی‌هایی از قبیل کارایی بالاتر ترانسپوزونی در مقایسه با سایر سیستم‌های ترانسپوزونی، قدرت درج یک ترانسژن حتی تا اندازه‌ی ۱۴ کیلوباز بدون این که کارایی ترانسپوزونی کاهش پیدا کند و عدم

وجود پدیده‌ی Foot printing که در سایر سیستم‌های ترانسپوزونی مشاهده می‌شود، از جمله مزایای این سیستم ترانسپوزونی می‌باشند (۷).

این پدیده به ایجاد جهش در محل استقرار ترانسپوزون هنگام خروج از موضع خود گفته می‌شود. مکانیسم انتقالی در سیستم ترانسپوزنی PiggyBac به صورت Cut and paste است و بر اساس شناسایی سکانس TRE (Terminal repeat element) موجود در دو طرف ترانسژن توسط آنزیم ترانسپوزاز، برش و درج توسط این آنزیم صورت می‌گیرد (شکل ۱).



شکل ۱. شمایی از نحوه‌ی انتقال ژن در سیستم ترانسپوزونی PiggyBac

درج قطعه‌ی ترانسژن به صورت هدفمند در ناحیه‌ی اختصاصی با توالی تترانوکلئوتیدی TTAA و با دوپلیکاسیون این توالی صورت می‌گیرد (۸). درج در ناحیه‌ی اختصاصی نشان از درج هدف‌دار و غیر تصادفی در ژنوم است؛ به طوری که نشان داده شده است که این درج در نواحی فعال از نظر رونویسی می‌باشد (۹). ساختار این سیستم شامل یک سکانس ۱۳ جفت بازی به عنوان Terminal repeat و یک سکانس ۱۹ جفت بازی به عنوان Internal repeat به همراه یک سکانس بینابینی ۳ جفت بازی بین این دو در انتهای ’۵ و همچنین سکانس بینابینی ۳۱ جفت بازی در انتهای ’۳ و نیز (Open reading frame) ORF آنزیم ترانسپوزاز (۲/۱ کیلوباز) است (۱۰).

در این مطالعه، تعداد نسخ درج شده‌ی ترانسژن موشی IP-۱۰ با استفاده از سیستم ترانسپوزونی PiggyBac بررسی شد. گروه دو پلاسمیدی شامل پلاسمید بیان کننده‌ی آنزیم ترانسپوزونی PiggyBac و نیز پلاسمید Donor که با کلون کردن ژن موشی IP-۱۰ و ژن مقامت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین در پلاسمید حاوی نواحی تکراری انتهایی PiggyBac به دست آمده می‌باشد. گروه تک پلاسمیدی نیز با کلون سکانس کد کننده‌ی ژن ترانسپوزاز در پلاسمید Donor به دست می‌آید. پس از ترانسفکشن سازه‌ها به سلول و انتخاب کلون‌های نوترکیب، سلول‌ها جهت بررسی تعداد نسخه‌ی ژنی با Absolute Real-time PCR (Absolute real-time polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفتند.

روش‌ها

طراحی و ساخت سازه‌ی دو پلاسمیدی

این سیستم حاوی دو پلاسمیدHelper و Donor می‌باشد. پلاسمید Donor حاوی تکرار انتهایی معکوس (TRE) است که در دو انتهای کاست بیان ترانسژن (IP-۱۰+Hyg) قرار گرفته است. پس از سنتز نواحی انتهایی، توالی ۲A پپتید و تعبیه‌ی جایگاه‌های آنزیمی مناسب در میان آن، ترانسژن در میان آن قرار گرفت. کاست بیانی حاوی ترانسژن

IP-10 از پلاسمید pTRE-IP-10 با استفاده از PCR و سایت تعبیه شده‌ی آنزیم BglII در انتهای پرایمر فوروارد و سایت شناسایی SacII در انتهای پرایمر ریورس از این پلاسمید تکثیر شد.

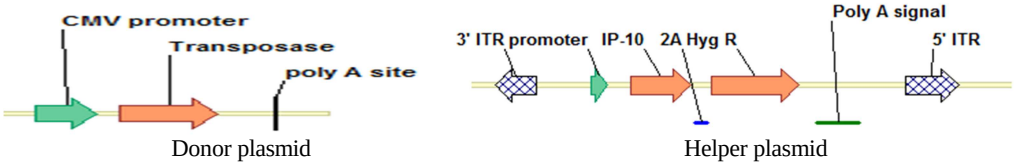
ژن شاخص انتخاب آنتی بیوتیک یوکاریوتی هیگرومایسین از پلاسمید pCDNA۳/۱/Hyg با سایت‌های آنزیمی AflII در انتهای پرایمر فوروارد و سایت آنزیمی AgeI در انتهای پرایمر ریورس با PCR تکثیر شد و پس از هضم آنزیمی توالی سنتز شده و طی واکنش‌های لیگاسیون، قطعات در سایت‌های تعبیه شده‌ی آنزیمی، در بین توالی انتهایی معکوس قرار گرفت. نمایی از دو پلاسمید مورد نظر در این سیستم در شکل ۲ نشان داده شده است.

ساخت سازه‌ی تک پلاسمیدی (Helper-independent plasmid)

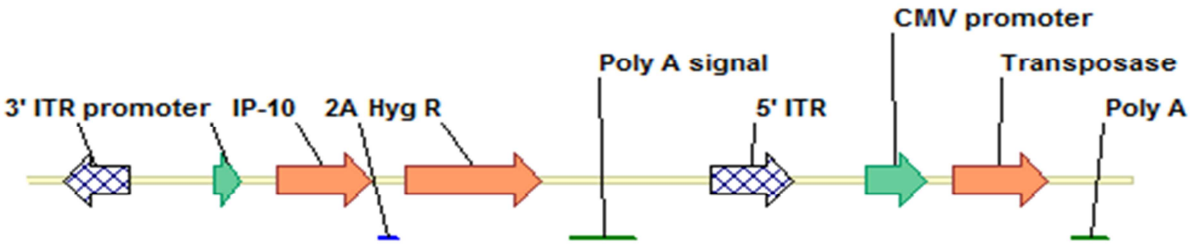
این سیستم در یک سازه‌ی واحد، حاوی کاست بیان کننده‌ی آنزیم ترانسپوزاز و ترانسژن IP-10 محصور شده در توالی‌های انتهایی معکوس می‌باشد. کاست بیان کننده‌ی ترانسپوزاز از طریق PCR از روی پلاسمید pCMV-HyPBase با استفاده از پرایمرهای فوروراد و ریورس دارای سایت آنزیم‌های Nhe۱ و MluI تکثیر شد و در سایت آنزیم‌های مورد نظر در پلاسمید حاصل از مرحله‌ی قبل قرار گرفت. واکنش هضم بر روی پلاسمید Backbone جهت قرارگیری محصول PCR (کاست ترانسپوزاز) به این صورت انجام شد: در حجم ۲۰۰ میکرولیتر واکنش هضم، ۲۰ میکرولیتر از بافر آنزیم ۱۰X، ۷۰ میکرولیتر از پلاسمید و ۱۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از آنزیم‌ها (MluI و NheI) به واکنش اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت.

واکنش لیگاسیون جهت قرارگیری کاست ترانسپوزاز در پلاسمید Backbone بدین صورت انجام گرفت: پس از محاسبه‌ی نسبت مولی ۳ به ۱ به ترتیب برای قطعه‌ی Insert و پلاسمید Backbone، مخلوط واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از بافر لیگاسیون ۱۰X، ۱۰ میکرولیتر از Insert، ۵ میکرولیتر از Backbone، ۱۱ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از آنزیم T۴ DNA Ligase بود. مخلوط واکنش یک ساعت در دمای اتاق و به صورت Overnight در دمای ۴ °C در یخچال قرار گرفت.

پس از انجام واکنش لیگاسیون، مرحله‌ی ترانسفورماسیون جهت تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب در باکتری‌های مستعد شده (Competent) با استفاده از روش کلسیم کلراید (CaCl۲) با شوک حرارتی (Heat shock) انجام پذیرفت و کلون‌های نوترکیب در محیط کشت LB agar با استفاده از آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتخاب شدند. پس از انتخاب کلونی‌های نوترکیب، با استفاده از روش Quick check صحت درج قطعه‌ی Insert در پلاسمید نوترکیب بررسی شد. شمایی از این سیستم در شکل ۳ موجود است.



شکل ۲. نمایی از سازه‌های پلاسمید Helper و Donor



شکل ۳. نمایی از سازه‌ی تک پلاسمیدی

کشت سلول‌های HEK (Human embryonic kidney cell)

سلول‌های HEK (Human embryonic kidney) از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور ایران) خریداری شدند و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسید کربن و حرارت ۳۷ °C کشت داده شدند. پس از رسیدن به تعداد مورد نظر، سلول‌ها برای ترانسفکشن سازه‌ها آماده شدند.

ترانسفکشن سلول‌های HEK با Lipofectamin ۲۰۰۰ Transfection Reagent

در یک چاهک ۶ خانه‌ای تعداد $۲/۵ \times ۱۰^{۵}$ سلول در ۲ میلی‌لیتر Growth medium، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند. ۲ ساعت قبل از ترانسفکشن، محیط کشت قبلی با محیط تازه تعویض شد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده، ۴ میکروگرم از DNA در ۲۵۰ میکرولیتر از Serum free DMEM رقیق شد و به آرامی با ۱۰ میکرولیتر محلول Lipofectamin ۲۰۰۰ Transfection Reagent مخلوط و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس کل مخلوط به هر چاهک اضافه گردید. پلیت تکان داده شد و در دمای ۳۷ °C در انکوباتور دی اکسید کربن قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت فرصت جهت بیان ژن مقامت به هیگرومایسین، برای انتخاب کلون‌های نوترکیب، سلول‌ها به مدت ۲ هفته در محیط حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین ۱۵۰ µg/ml قرار داده شد. سلول‌ها در ۲ گروه مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. گروه اول شامل ترانسفکشن سیستم دو پلاسمیدی که عبارت از پلاسمیدهای Helper و Donor بودند و گروه دوم ترانسفکشن گروه تک پلاسمیدی. هر یک از گروه‌ها در ۳ چاهک پلیت ۶ خانه مورد ترانسفکشن قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومیک جهت بررسی تعداد نسخه‌های درج شده

استخراج DNA با استفاده از AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit شرکت Bioneer با شماره‌ی کاتالوگ Cat. No.: K-۳۰۳۲ صورت گرفت. $۱۰^{۵}$سلول پس از جمع‌آوری مطابق با پروتکل شرکت سازنده مورد استخراج DNA ژنومی قرار گرفتند.

رسم منحنی استاندارد جهت اندازه‌گیری تعداد نسخه‌های درج شده در ژنوم سلول

جهت بررسی دقیق تعداد نسخه‌های ژنی با استفاده از Absolute real-time PCR، رسم منحنی استاندارد بر

اساس رقت‌های سریالی از پلاسمید حاوی ترانسژن IP-۱۰ نیاز می‌باشد. در این مرحله، ابتدا غلظت پلاسمید حاوی ترانسژن توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و سپس تعداد کپی مورد نظر در دو میکرولیتر موجود در واکنش PCR محاسبه شد. رقت‌های متوالی (۳۰-300000 کپی ژن در هر واکنش) از این پلاسمید برای رسم منحنی استاندارد بر اساس Ct Value به دست آمده از هر یک رقت‌های سریالی پلاسمید تهیه شد. مراحل کار به این صورت بود که ابتدا Mass پلاسمید با ضرب اندازه‌ی آن در عدد g/bp ۱/۰۹۶e-۲۱ به دست آمد. سپس Mass of plasmid DNA در هر یک از رقت‌ها (۳۰-300000) به دست آمد و پس از آن غلظت DNA پلاسمیدی برای رسیدن به کپی مورد نظر با تقسیم بر عدد ۲ (مقداری از DNA که در واکنش وارد شد) محاسبه شد. سپس با انجام معادله‌ی $C_1V_1 = C_2V_2$ سریال دایلوشن از Stock پلاسمیدی تهیه شد. کارایی PCR نیز با استفاده از فرمول $E = (10^{-1/slope}) - 1$ به دست آمد. پرایمر فوروارد مورد استفاده جهت تکثیر سکانس ژن IP-۱۰، ۵’ TCCTCATGGCTGTTTCTGG ۳’ و پرایمر ریورس ۵’ GTCACCATCCTTTTGCCAG ۳’ بود.

روش بررسی کارایی ترانسپوزونی بر اساس Real-time PCR

جهت بررسی این که تعداد نسخه‌های درج یافته در ژنوم بر اساس فعالیت ترانسپوزونی Piggybac بوده است یا حاصل درج راندوم پلاسمید، روش تأییدی بر اساس Real-time PCR انجام پذیرفت. بدین صورت که پرایمرها در این روش طوری طراحی شدند که یکی از پرایمرها در داخل توالی انتهایی ترانسپوزون و دیگری در سکانس پلاسمیدی خارج از توالی انتهایی قرار بگیرند (شکل ۴). تکثیر پرایمرها نشان از درج راندوم دارد و با محاسبه‌ی تعداد دقیق کپی آن‌ها و کسر آن از تعداد نسخه‌های هر گروه، میزان فعالیت ترانسپوزونی مشخص می‌شود. توالی پرایمرها به ترتیب زیر است:

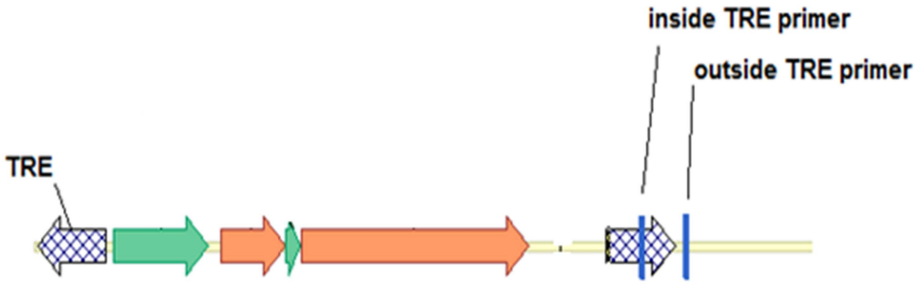
Forward:
۵’ACAGACCGATAAAACACATGC۳’

Reverse:
۵’CTCACTATAGGGCGAATTGG۳’

یافته‌ها

نتایج حاصل از تولید کلون‌های سلولی نوترکیب

پس از آن که سازه‌ی پلاسمیدی حاوی ترانسژن و آنزیم ترانسپوزاز به سلول‌های HEK ترانسفکت شد، سلول‌ها به مدت ۲ هفته تحت تیمار با آنتی بیوتیک



شکل ۴. جایگاه قرارگیری پرایمرهای مخصوص بررسی کارایی ترانسپوزونی

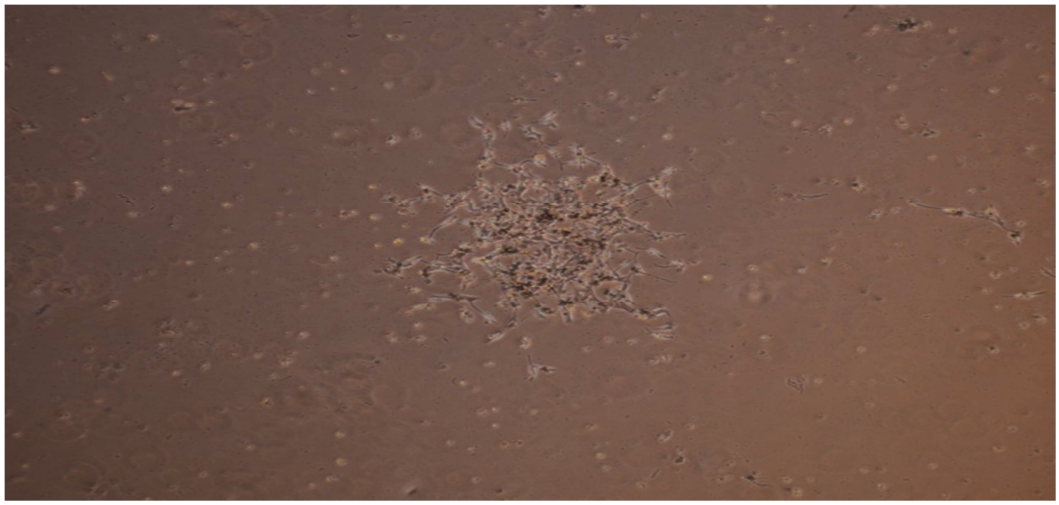
هیگرومایسین با غلظت ۱۵۰ µg/ml قرار گرفتند. محیط‌های کشت سلولی حاوی آنتی بیوتیک هر ۳ روز یک بار تعویض شدند.سلول‌های غیر نوترکیب فاقد پلاسمید مورد نظر از بین رفتند؛ اما کلون‌های نوترکیب مقاوم به هیگرومایسین باقی ماندند. پس از دو هفته از تیمار آنتی بیوتیک هیگرومایسین، ۲۱ کلون نوترکیب در ۳ چاهک پلیت ۶ خانه در گروه تک پلاسمیدی و ۱۳ کلون در گروه دو پلاسمیدی مشاهده گردید. گروه شاهد منفی حاوی پلاسمید Mock نیز پس از ۲ هفته از بین رفت (شکل ۵).

نتایج حاصل از استخراج DNA و بررسی تعداد نسخه‌های درج شده‌ی ترانسژن IP-۱۰

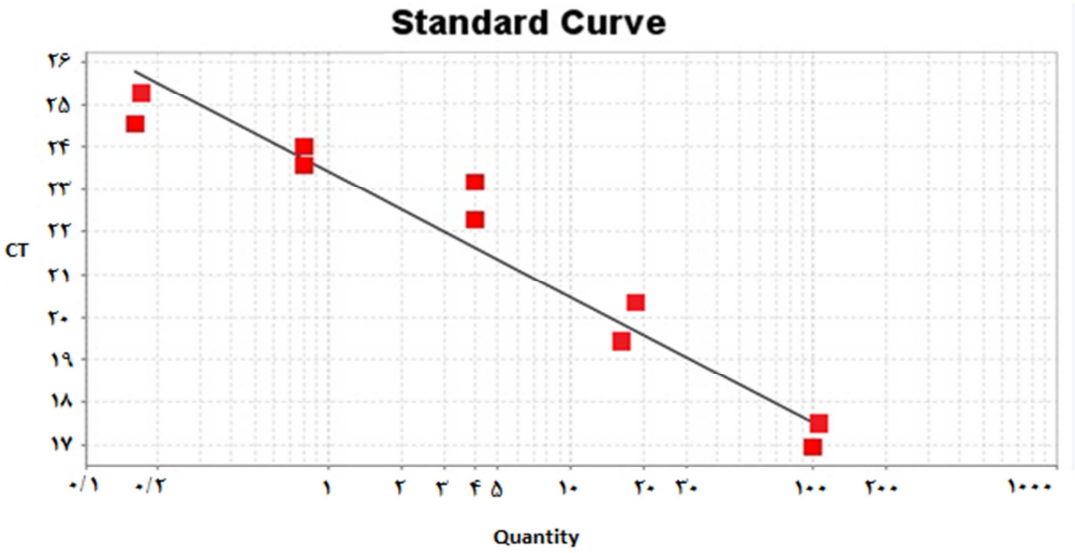
جهت اطمینان از کیفیت DNAهای استخراجی هر یک از آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد. باند حاصل از استخراج، به صورت یک باند قوی بر روی ژل آگارز مشاهده شد که نشان از کیفیت خوب استخراج DNA دارد.

رسم منحنی استاندارد با رقت‌های سریالی پلاسمید (تعداد نسخه‌های ۳۰۰۰۰۰-۳۰) حاوی ترانسژن IP-۱۰ بر اساس Ct value به دست آمده از هر یک از رقت‌ها توسط دستگاه رسم شد (شکل ۶). همچنین بر اساس Ct value به دست آمده از نمونه‌ی DNA کلون‌های نوترکیب هر یک از گروه‌ها، مقدار مورد نظر توسط دستگاه به صورت خودکار محاسبه گردید (شکل ۷).

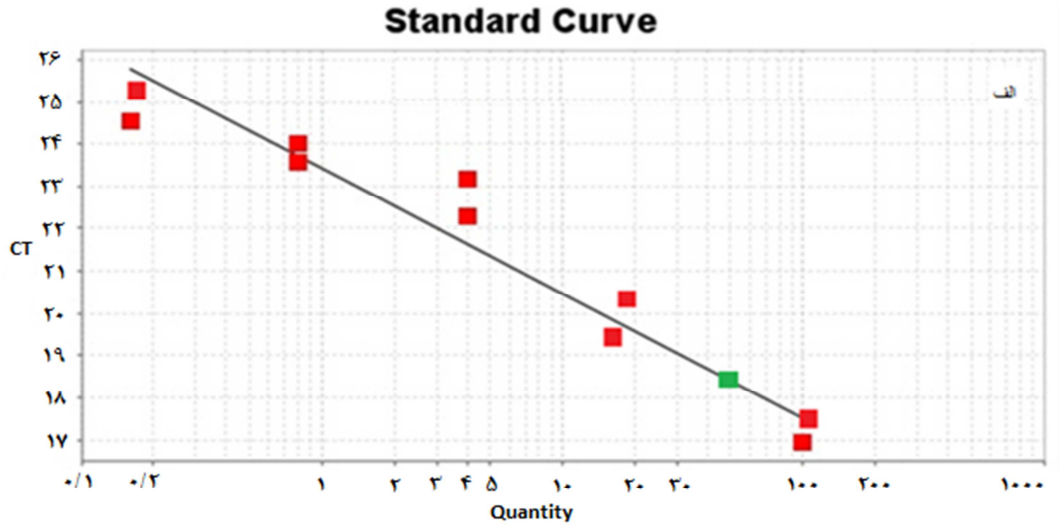
این مقدار برای گروه تک پلاسمیدی و دو پلاسمیدی به ترتیب برابر با $۱۵۱/۵۱ \times ۱۰^{۳}$ و ۶۰×۱۰^{۳} کپی در ۲ میکرولیتر DNA واکنش PCR بود. از آن جایی که این تعداد کپی در حجم ۲ میکرولیتر با غلظت ۱۰۰ ng/µL از DNA ژنومی در واکنش PCR بود و نیز این مقدار نماینده‌ی سلول‌هایی با تعداد نامشخص است. پس از محاسبه‌ی نهایی و لحاظ کردن Diploid genome equivalent که در سلول‌های انسانی برابر ۶/۶ pg/diploidgenome است، تعداد نسخه‌ها در هر گروه به دست آمد که در سیستم تک پلاسمیدی برابر با ۵ نسخه و در سیستم دو پلاسمیدی برابر با ۲ نسخه در هر سلول محاسبه شد. بر اساس شیب خط منحنی حاصل از نمودار استاندارد و قرار دادن آن در فرمول، کارایی PCR برابر با ۹۵ درصد محاسبه شد.

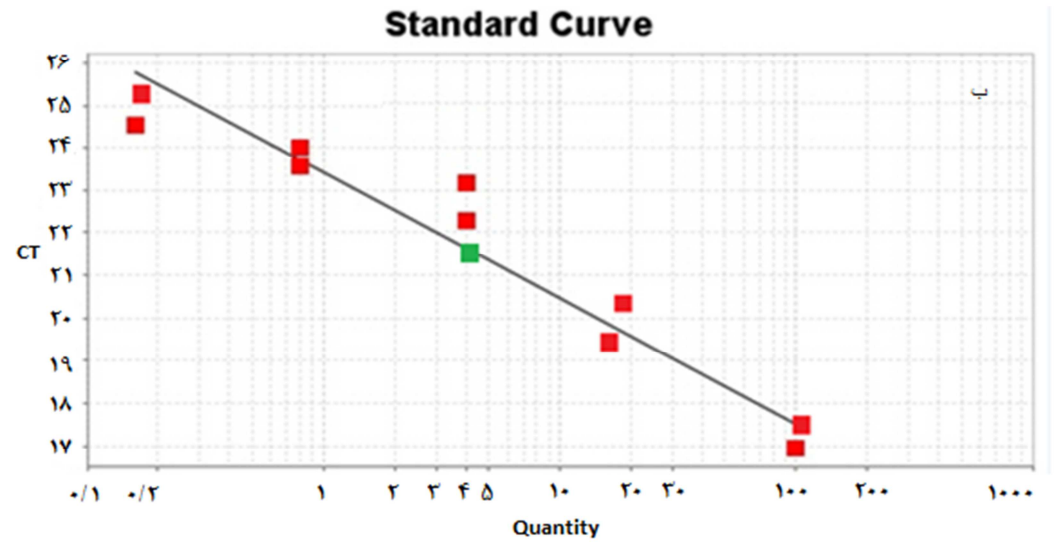


شکل ۵. نمایی از یک کلون نوترکیب پس از دو هفته تیمار سلول‌ها با آنتی بیوتیک هیگرومایسین



شکل ۶. منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های سریالی حاوی پلاسمید ژن IP-۱۰





شکل ۷. موقعیت تکثیر ژن IP-۱۰ در گروه تک پلاسمیدی (الف) و دو پلاسمیدی (ب)

نتایج حاصل از بررسی درج به واسطه‌ی فعالیت ترانسپوزنی

بر اساس منحنی استاندارد رسم شده جهت اندازه‌گیری تعداد نسخه‌های ژنی و سپس انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌ی DNA با پرایمرهای مخصوص، مقدار درج تصادفی در سلول بررسی شد. بدین صورت که در گروه تک پلاسمیدی میانگین تعداد نسخه‌ی تصادفی، ۱ نسخه در هر سلول به دست آمد.

بحث

نتایج این مطالعه، توانایی سیستم تک پلاسمیدی PiggyBac در تشکیل کلون‌های نوترکیب سلولی HEK را نشان داده است. بررسی کلون‌های به دست آمده بعد از یک ماه از مرحله‌ی ترانسفکشن از نظر بیان ژن تأیید نمود که ترانسژن مورد نظر در ژنوم سلول درج پایدار شده و بیان آن‌ها به صورت دایمی است؛ زیرادر بیان موقت حداکثر ۴ تا ۷ روز بیان ژن در سلول وجود دارد.

بررسی تعداد نسخه‌های درج شده در ژنوم در کلون‌های نوترکیب با استفاده از Absolute real-time PCR مشخص نمود که در کلون نوترکیب گروه تک پلاسمیدی، تعداد نسخه‌های ژنی برابر با ۵ نسخه در هر سلول بوده است. این عدد مطابق با سایر مطالعاتی بود که از PiggyBac در تولید کلون‌های نوترکیب استفاده کرده بودند (۱۱).

همچنین جهت بررسی این که آیا نسخه‌های درج شده حاصل فعالیت ترانسپوزونی است یا درج تصادفی اتفاق افتاده است، از یک روش PCR based استفاده شد؛ بدین ترتیب که یک جفت پرایمر طوری طراحی شد که یکی از آن‌ها در داخل ناحیه‌ی انتهایی PiggyBac و دیگری در پلاسمید Backbone قرار دارد. تکثیر این واکنش نشان می‌دهد که چند نسخه‌ی درج شده در ژنوم حاصل رویداد Random integration است تا فعالیت ترانسپوزونی. در این مورد نتایج نشان داد که در کلون تک پلاسمیدی، درج تصادفی برابر با یک نسخه بود. بدین ترتیب یکی از ۵ نسخه‌ی درجی در کلون‌های تک پلاسمیدی حاصل درج تصادفی بود و در کلون دو پلاسمیدی درج‌ها مربوط به فعالیت ترانسپوزونی بود.

کاربرد سیستم ترانسپوزونی PiggyBac تنها به تولید رده‌های نوترکیب پایدار محدود نمی‌شود و یکی از کاربردهای آن که مطالعات زیادی درباره‌ی آن صورت گرفت، استفاده از این سیستم در ژن درمانی است. قابلیت درج ایمن و کارایی بیان در ژنوم میزبان از جمله مواردی است که در زمینه‌ی ژن درمانی باید مد نظر قرار گیرد. در سال‌های اخیر وکتورهای ویروسی جهت بیان دایم و یا موقت در فازهای Preclinical به وفور در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲).

گذشته از کارایی بالای ترانسپوزونی PiggyBac در سلول‌های پستانداران، روش‌های انتقال وکتورهای غیر ویروسی کماکان یک چالش عمده در استفاده از این وکتورها محسوب می‌شود. این مشکل وقتی بیشتر جلوه می‌کند که کارایی بالای وکتورهای ویروسی در ترانسداکشن سلول‌های پستانداران، یک مزیت عمده‌ی استفاده از آن‌ها است. در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی جهت بهبود انتقال وکتورهای پلاسمیدی به سلول‌ها با روش‌های غیر ویروسی انجام شده است.

یکی از برجسته‌ترین این تلاش‌ها، تولید وکتورهای هیبرید متشکل از سیستم‌های ویروسی و ترانسپوزونی است. این وکتورها از ویژگی هر دو سیستم بهره می‌گیرند؛ به طوری که مزیت بالای ورود به سلول را از وکتور ویروسی و مزیت درج ایمن در ژنوم را از سیستم ترانسپوزونی در اختیار دارد. سیستم ویروسی در این وکتورها قابلیت درج در ژنوم را به واسطه‌ی جهش در آنزیم اینتگراز از دست می‌دهد؛ در نتیجه، درج‌ها به واسطه‌ی سیستم ترانسپوزونی صورت می‌گیرد.

طی یک مطالعه Vink و همکاران، یک وکتور هیبرید متشکل از لنتی ویروس‌ها و سیستم ترانسپوزونی Sleeping beauty تولید کردند. وکتور ویروسی یک Integrase defective lentivirus بود که قابلیت درج در ژنوم را از دست داده بود. نتیجه‌ی کار آن‌ها، درج ترانسژن در ژنوم با پروفایل مربوط به سیستم ترانسپوزونی بوده است (۱۳).

استفاده از وکتورهای هیبرید که ترکیبی از وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی است، می‌تواند کارایی حاصل از ترانسفکشن سلول‌ها را بالا ببرد و بدین ترتیب با افزایش کارایی ترانسفکشن، تعداد کلون‌های نوترکیب بیشتری به دست آید و در عمل، کلون‌های بیشتری برای بررسی بیان ژنی موجود باشد. تا به حال مطالعه‌ای جهت تولید وکتور هیبرید متشکل از سیستم ترانسپوزونی PiggyBac و سیستم لنتی ویروسی انجام نشده است و به نظر با طراحی این نوع مطالعه، می‌توان به یک سیستم مطلوب چه در زمینه‌ی ژن درمانی و چه صنعت پروتئین نوترکیب دست یافت.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

References

1. Gorman C, Bullock C. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. Curr Opin Biotechnol 2000; 11(5): 455-60.
2. Matasci M, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability. Biotechnol Bioeng 2011; 108(9): 2141-50.
3. Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. Trends Biotechnol 2007; 25(9): 425-32.
4. Kwaks TH, Otte AP. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. Trends Biotechnol 2006; 24(3): 137-42.
5. Weiler KS, Wakimoto BT. Heterochromatin and gene expression in Drosophila. Annu Rev Genet 1995; 29: 577-605.
6. Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. Insect Mol Biol 1996; 5(2): 141-51.
7. Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. Cell 2005; 122(3): 473-83.
8. Bauser CA, Elick TA, Fraser MJ. Proteins from nuclear extracts of two lepidopteran cell lines recognize the ends of TTAA-specific transposons piggyBac and tagalong. Insect Mol Biol 1999; 8(2): 223-30.
9. Galvan DL, Nakazawa Y, Kaja A, Kettlun C, Cooper LJ, Rooney CM, et al. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells. J Immunother 2009; 32(8): 837-44.
10. Fraser MJ, Cary L, Boonvisudhi K, Wang HG.

Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. Virology 1995; 211(2): 397-407.

11. Matasci M, Bachmann V, Baldi L, Hacker DL, De JM, Wurm FM. CHO cell lines generated by PiggyBac transposition. BMC Proc 2011; 5(Suppl 8): 31.

12. Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(4): 1531-6.

13. Vink CA, Gaspar HB, Gabriel R, Schmidt M, McIvor RS, Thrasher AJ, et al. Sleeping beauty transposition from nonintegrating lentivirus. Mol Ther 2009; 17(7): 1197-204.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 06.01.2014
Vol. 32, No. 275, 4th Week, April 2014
Accepted: 05.03.2014

Comparison of Inserted Mouse IP-10 Gene Copy Number in Helper-Dependent and Independent System Based on PiggyBac Transposition in Human Embryonic Kidney Cells

Hadi Mirzapour[1], Arezo Karamzade[1], Hossein Khanahmad PhD[2], Rasoul Salehi PhD[3], Majid Kheirollahi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: A major bottleneck in the production of recombinant proteins in conventional linear method is the heterogeneity in number of transgene copies in the genome of the host cell that lead to variable levels of transgene expression. Aside from the low efficiency of the random integration, other phenomena such as positional effect contribute to low efficiency of transgene expression. PiggyBac is a class of DNA transposons which can transpose through "cut and paste" mechanism in host genome. Some specific characteristic of this transposon makes it promise vector in gene transfer studies. High capacity of transgene transposition and flexibility in molecular engineering of transposase are characteristics of PiggyBac transposons that are important in recombinant protein and gene therapy approaches. The aim of this study was estimation of transgene copy number based on helper-dependent and independent PiggyBac transposition system in human embryonic kidney (HEK) cells.

Methods: Plasmid containing interferon gamma inducible protein 10 (IP-10) coding sequence flanked by PiggyBac terminal repeat element and plasmid containing transposase system and a unit plasmid containing both transposae and IP-10 coding sequence were used for generating recombinant cells in helper-dependent and independent system, respectively. Human embryonic kidney cells were transfected by each group. After clonal selection, absolute quantitative real-time polymerase chain reaction was used for estimation of transgene copy number.

Findings: Estimation of IP-10 copy number has revealed 5 and 2 copies per cell in helper-independent and dependent system, respectively.

Conclusion: Here, we report activity of PiggyBac transposition in human embryonic kidney cell line. PiggyBac helper-independent and dependent system was used for generation of stable cell line producing mouse IP-10 protein and our data confirmed permanent expression of this transgene with the mean of about 5 transgene copies per each cell.

Keywords: Piggybac transposon, Gene therapy, Recombinant protein, Transgene copy number

Citation: Mirzapour H, Karamzade A, Khanahmad H, Salehi R, Kheirollahi M. **Comparison of Inserted Mouse IP-10 Gene Copy Number in Helper-Dependent and Independent System Based on PiggyBac Transposition in Human Embryonic Kidney Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 170-81

* This paper is derived from a MSc thesis No. 391344 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hossein Khanahmad PhD, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com