

مقاله پژوهشی

ساخت حامل های بیانی cDNA PEP موشی و EGFP در سامانه القایی Tet Off

بهشاد منتظری نجف آبادی^۱، کامران قاندری^{۲،۳}، کیانوش درمیانی^{۲،۴}، محمدحسین نصر اصفهانی^{۳*}، زهرا نورمحمدی^۱، یحیی خزائی^۲، محبوبه فروزانفر^۲، عباس کیانی^۲

- ۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
- ۲- گروه زیست فناوری جانوری، پژوهشکده زیست فناوری جانوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران
- ۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
- ۴- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

پراکسی زومها یکی از اندامک های سلولهای یوکاریوتی هستند که دارای وظایف گوناگونی می باشند. یکی از پروتئین های ماتریکس پراکسی زوم به نام پروتئین پراکسی زومی (PEP) نامیده می شود که در سال ۲۰۰۲ کلون گردید. PEP واجد ۲۰۹ اسید آمینه است و به نظر می رسد که در تمایز بافت های جنین موش نقش دارد. از جمله خصوصیات این پروتئین، افزایش بیان طی میوزن و تمایز مغز جنین موش می باشد. برای تحقیق بر روی نحوه عملکرد این پروتئین بر مکانیسم نوروزن نیاز بود که بتوان در مراحل مختلف نوروزن، این ژن را خاموش یا روشن کرد و نتایج حاصل از تغییر در بیان آن را بررسی نمود. لذا در مطالعه حاضر cDNA PEP را در سیستم بیانی یوکاریوتی سامانه القایی Tet off وارد نمودیم تا بتوان در آینده آن را به رده سلولی بنیادی ترانسفکت نماییم و بیان بیش از حد آن را توسط داکسی سیکلین یا تتراسیکلین با تنظیم سطح آنتی بیوتیک در سلول های بنیادی موشی بررسی نماییم. برای این منظور نیاز بود که cDNA هدف تکثیر شود و سپس به داخل حامل الحاق گردد. بنابراین در طراحی پرایمر وجود دو محل برش آنزیم محدودالانتر در ابتدا و انتهای ژن همساز با حامل و همچنین توالی Kozak جهت بیان بیشتر پروتئین PEP در نظر گرفته شد و cDNA PEP تکثیر گردید. با تاثیر آنزیم های محدودالانتر در دو انتهای cDNA PEP نهایتاً قطعه برش یافته به داخل حامل pTRE2pur از سیستم بیانی Tet off وارد شد. سیستم بیانی Tet off یک سیستم بیانی دوگانه می باشد، به این معنی که واجد یک وکتور به نام Tet off است که یک عنصر پروتئینی را تولید کرده که به واسطه ی آنتی بیوتیک تتراسیکلین یا داکسی سیکلین بیان ژن را در وکتور دوم به نام pTRE2pur، روشن و خاموش می کند. در این سیستم ابتدا باید وکتور Tet off را به سلول هدف ترانسفکت کرده و دودمان سلول پایدار ایجاد نمود و سپس وکتور دوم (pTRE2pur) که حامل ژن است را به این دودمان وارد نمود. برای اینکه به طور یقین پایدار بودن سلول به حامل Tet off را به اثبات برسانیم، علاوه بر ساخت TRE2pur/PEP cDNA EGFP را بدخل حامل TRE2pur وارد نموده و سازه TRE2pur/EGFP را تهیه نمودیم.

واژگان کلیدی: پراکسی زوم؛ پروتئین پراکسی زومی؛ سیستم بیانی

مقدمه

پراکسی زومها اندامک های تک غشایی با ماتریکس دانه ای هستند که اولین بار در سال ۱۹۵۴ کشف شدند و میکروبادی نام گرفتند، اما در سال ۱۹۶۵ فعالیت پراکسیداسیونی میکروبادی ها شناسایی شد، لذا این

ساختار پراکسی زوم نام گرفت (۱). پراکسی زوم بالغ اندامک کروی است که در همه یوکاریوتها یافت می شود و عملکرد آن پاک کردن سلول از مواد سمی مثل پراکسیدها است (۲). تشخیص فعالیت پراکسی زوم توسط بیولوژیست بلژیکی به نام Deduve کشف شد (۲). فعالیت های متابولیکی پراکسی زوم شامل اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره، تجزیه پراکسید هیدروژن، سنتز پلاسماوژن ها، ایزوپرنوئیدها، متابولیسم پورین ها و پیریمیدین ها و متانول می باشد. اهمیت عملکردی پراکسی زومها در بیماری های ژنتیکی از قبیل سندرم زلوگر مشخص می شود (۳،۴).

* کامران قاندری PhD، محمد حسین نصر اصفهانی PhD

گروه زیست فناوری جانوری، پژوهشکده زیست فناوری جانوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه رویان، اصفهان

نشانی: اصفهان، خیابان سلمان فارسی، خیابان مهر، کوچه شهید علیخانی، پلاک ۳۷۲
تلفن: ۰۳۱۱-۲۶۱۲۹۰۰

پست الکترونیکی: kamranghaedi@royaninstitute.org & mh_nsar@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱/۱۷

بیانی یوکاریوتی Tet off یک سیستم شامل دو پلاسمید می‌باشد، به این معنی که یک وکتور به نام Tet off که عنصر پروتئینی را تولید می‌کند که این پروتئین به واسطه ی آنتی بیوتیک تتراسیکلین یا داکسی سیکلین بیان ژن را در وکتور دوم به نام pTRE γ pur روشن و خاموش می‌کند. با این سیستم می‌توان میزان بیان ژن را کنترل کرد (۱۹). لذا با انتخاب میزان غلظت آنتی بیوتیک در محیط کشت می‌توان میزان بیان را از صفر تا صد درصد تغییر داد. در این سیستم ابتدا باید وکتور Tet off را به سلول هدف ترانسفکت کرده و سلول پایدار ایجاد نمود و سپس وکتور دوم (pTRE γ pur) که حامل ژن هدف است را به سلول پایدار شده وارد نمود. برای اینکه به طور یقین پایدار بودن سلول بنیادی به حامل Tet off را بتوان به اثبات برسانیم، علاوه بر ساخت cDNA TRE γ pur/PEP پروتئین EGFP را بداخل حامل TRE γ pur وارد نموده و سازه TRE γ pur/EGFP را ساختیم، بنابراین ابتدا این سازه را به داخل سلول‌های پایدار ترانسفکت کردیم و با مشاهده رنگ فلورسانت ثابت کردیم که حامل Tet off در ژنوم این سلول‌ها وارد شده و پایدار است.

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر و PCR جهت تکثیر PEP cDNA

در این تحقیق طراحی پرایمر با در نظر گرفتن دو نکته کلیدی انجام گرفت، اول با عنایت به جایگاه‌های برشی حامل TRE2pur، در ساختار پرایمر رفت (Forward)، در فرا دست PEP cDNA (NCBI accession No: NM_027402) جایگاه برش آنزیم NheI و در ساختار پرایمر برگشت (Reverse)، در پایین دست PEP cDNA جایگاه برش آنزیم ClaI در نظر گرفته شد. نکته دوم اینکه چون در این تحقیق به بیان بالای ژن نیاز بود و ساختار PEP cDNA فاقد توالی Kozak بود، در طراحی پرایمر در جایگاه برش بالا دست از جایگاهی استفاده شد (NheI) که عملاً این توالی را در بالا دست ژن فراهم نماید. در نهایت دو پرایمر Forward و Reverse به وسیله نرم افزار Oligo 6.2 (www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm) و بواسطه شرکت ژن فناوریان تهیه گردید. توالی این دو پرایمر عبارتند از: پرایمر Forward با توالی 5'agctagcatgccccaggccgctgccc3' (ناحیه خط کشی شده مربوط به جایگاه برشی NheI) و پرایمر Reverse با توالی (atcgattcatatctgtgctggaggagacccccac3' 5' ناحیه خط کشی

بیماری‌های پراکسیزومی یک گروه از بیماری‌های اتوزومی مغلوب شامل سندروم زلوگر، نئوناتال آدرنولوکو دیستروفی، بیماری رفسام و Rhizomelic Chondro Dyplasia Punctata (RCDP) می‌باشند که ناشی از نقص در عملکرد متابولیکی بیوسنتز پراکسی زوم میباشند (۵-۹). با عنایت به فقدان DNA در پراکسی زوم، پروتئین‌های پراکسی زومی در سیتوپلاسم توسط پلی ریبوزوم‌های آزاد ساخته می‌شوند و سپس به پیش پراکسی زوم منتقل می‌شوند (۹). برای انتقال پروتئین‌های پراکسی زومی دو نوع سیگنال هدف یابی پراکسی زومی (PTS) وجود دارد که مسئول تشخیص و هدایت پروتئین‌های ماتریکس به داخل پراکسی زوم می‌باشد. سیگنال هدف یابی پراکسی زومی نوع ۱ (PTS1)، شامل سه اسید آمینه سرین، لیزین و لوسین (SKL) در انتهای کربوکسی بیشتر پروتئین‌ها می‌باشد (۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۱۳). سیگنال هدف یابی پراکسی زومی نوع ۲ (PTS2)، یک پپتید ۹ تایی قابل شکست با ترادف R/K,L/V/I,X5,H/Q,L/A می‌باشد که در انتهای آمینی چندین پروتئین مثل ۳-کتواسیل CoA- تیولاز وجود دارد (۱۶، ۱۵، ۱۴).

یکی از پروتئین‌های موجود در ماتریکس پراکسی زوم به نام پراکسی زومال پروتئین (PEP) نامیده می‌شود. cDNA این پروتئین در موش به وسیله Ferrer Martinez در سال ۲۰۰۲ میلادی کلون گردید. این پروتئین از ۲۰۹ اسید آمینه تشکیل شده است که شامل یک دم تری پپتیدی سرین لیزین و ایزولوسین (SKI) در انتهای کربوکسی می‌باشد که شبیه SKL است. مطالعات نشان داده است که ژن PEP در هنگام تمایز بافت‌های مختلف جنین موش بیان متفاوتی دارد (۱۷) از جمله خصوصیات این پروتئین، افزایش بیان طی میوزن و تمایز مغز جنین موش است (۱۷). همچنین مطالعات اخیر بر روی بیان ژن این پروتئین نشان داد که بیان آن به دنبال تیمار سلول‌های پیش ساز عصبی با رتینوئیک اسید افزایش قابل ملاحظه ای می‌یابد (۱۸). از آنجا که برای تحقیق بر روی نحوه ی عمل این پروتئین در فرایند نوروزن نیاز بود که بتوان در مراحل مختلف تمایز عصبی، بیان این ژن را خاموش یا روشن و نتایج حاصل را بررسی کرد، بر آن شدیم که PEP cDNA موشی را در سیستم بیانی یوکاریوتی Tet off وارد کرده تا بتوان در مطالعات آتی به رده سلول‌های بنیادی ترانسفکت کرده تا به وسیله داکسی سیکلین یا تتراسیکلین بیان را تحریک یا متوقف و حتی با تنظیم سطح آنتی بیوتیک میزان بیان را کنترل نماییم. سیستم

gen) خالص سازی گردید. آنگاه قطعه PEP cDNA پس از تیمار پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های (Fermentas) (Ta-ClaI) (NheI) (KaRa) از حامل جدا و پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت استخراج از ژل (Qiagen) خالص گردید. سپس قطعه حامل PEP در جایگاه‌های مرتبط در پلاسمید TRE2pur (Clontech) الحاق شد. نهایتاً محصول الحاق در باکتری پذیرنده سویه TOP10 به وسیله روش شوک حرارتی ترانسفورم شده و از میان کلنی‌های رشد یافته، کلنی‌های واجد پلاسمید حاوی PEP با روش Colony PCR انتخاب گردیدند. کلیه مراحل کار به صورت شمایی در شکل ۱ نشان داده شده است.

ساخت پلاسمید بیانی TRE2pur/EGFP

قطعه حاوی نواحی کد کننده ژن EGFP از پلاسمید pDB2 (۲۱) با استفاده از برش بوسیله آنزیم‌های (Fermentas) BamHI و (NheI) (Fermentas) خارج گردیده و مورد ارزیابی‌های بعدی قرار گرفت. لازم به ذکر است که جایگاه برشی آنزیم BamHI توسط Klenow fragment (Fermentas) به صورت صاف درآمد و سپس مورد استفاده قرار گرفت. همچنین حامل TRE2pur نیز توسط آنزیم (NheI) (TaKaRa), (ClaI) (Fermentas) برش داده شد. جایگاه Cla I نیز توسط Klenow fragment به صورت صاف درآمد. با در نظر گرفتن غلظت‌های مولی مناسب، قطعه حاوی نواحی کد کننده ژن EGFP بواسطه کیت الحاق (TaKaRa) به داخل پلاسمید TRE2pur فرستاده شد. نهایتاً ترانسفورم محصول الحاق در باکتری پذیرنده سویه TOP10 به وسیله روش شوک حرارتی انجام و از میان کلنی‌های رشد یافته، کلنی‌های واجد پلاسمید حاوی EGFP با پرایمرهای اختصاصی با توالی‌های 5'atggtgagcaagggcgaggag3' Forward و 3'attactgtacagctgtccatg3' Reverse توسط روش Colony PCR انتخاب گردیدند.

ترانسفکشن سلولهای CHO و ارزیابی کارایی سیستم القایی توسط EGFP

رده سلولی CHO از سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید. سلولهای CHO در محیط کشت Ham's F12 (Sigma) حاوی FCS 10 (Gibco) % در انکوباتور با ۵٪ CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شد. پس از مفروش شدن کف فلاسک،

شده مربوط به جایگاه برشی (ClaI). برای تکثیر قطعه PEP cDNA بر پایه دستور العمل کیت PCR (Cinnagen) به شرح ذیل انجام گرفت: دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه طی ۲۵ دور PCR بود. در پایان، واکنش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ دقیقه خاتمه یافت. مواد مورد نیاز جهت PCR شامل pEGFP/EGFP-PEP (۲۰) به عنوان الگو با غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر، 10X PCR Buffer به میزان ۵/۲ میکرولیتر و ۱۰ پیکومولار از هر پرایمر، dNTP به میزان ۲/۰ میکرومولار، Smar taq polymerase به اندازه ۲۵/۱ واحد و مابقی واکنش dH2O تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه گردید. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و توسط کیت استخراج از ژل (Qiagen) خالص گردید.

ساخت پلاسمید بیانی TRE2pur/PEP

محصول تکثیر و خالص شده قطعه PEP ابتدا به درون حامل (Fermentas) pTZ57RT ارسال و الحاق گردید. الحاق بر پایه استفاده از کیت الحاق (Fermentas) انجام پذیرفت. در مرحله بعد محلول الحاق حاوی پلاسمیدهای نوترکیب حاصل به روش شوک حرارتی به درون باکتری‌های (Invitrogen) Competent TOP10 ترانسفورم گردیدند. به منظور برداشت کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از غربالگری در محیط کشت حاوی (Sigma) Xgal و (Sigma) IPTG استفاده گردید. لذا کلنی‌های باکتریایی آبی رنگ رشد کرده بر روی محیط کشت فاقد پلاسمید نوترکیب و کلنی‌های باکتریایی سفید رنگ حاوی پلاسمید نوترکیب بودند. در مرحله بعد با انتخاب پنج کلنی سفید رنگ مجدداً به منظور اطمینان از وجود پلاسمید نوترکیب آزمایش Colony PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PEP (ذکر شده در قسمت بالا) صورت پذیرفت. در نهایت دو کلنی مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب برای اطمینان از عدم جهش طی فرآیند PCR برای تعیین توالی به شرکت فزا پژوه ارسال گردید. ضمناً جهت تعیین توالی از دو پرایمر M13 و T7 استفاده شد. بلافاصله پس از اطمینان از عدم جهش در توالی مورد نظر کلنی باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی ۴۰ میلی گرم در هر میلی لیتر آمپی‌سیلین (سیگما) کشت شبانه قرار گرفت. پلاسمیدهای تکثیر یافته توسط کیت (Qia-) Miniprep kit

پرایمرهای طراحی شده تکثیر گردید (شکل ۲). باند نمونه تکثیر شده دارای اندازه bp644 بود. همچنین عدم وجود باندهای دیگر نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش PCR بود. این قطعه خالص گردید و به منظور کلون سازی در حامل pTZ57R/T الحاق شد. باکتری‌های TOP10 ترانسفورم شده توسط محصول الحاق، بر روی محیط کشت حاوی X-gal و آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند. در شکل ۳ colony insert check مربوط به پنج کلونی سفید منفرد به عنوان نمونه مثبت به همراه یک کلونی آبی منفرد به عنوان کنترل منفی نشان داده شده است. در هر پنج کلونی سفید باند ۶۴۴ جفت بازی هدف دیده می‌شود، از طرفی باند مذکور در کلونی منفی دیده نمی‌شود. از میان ۵ کلونی مذکور، وکتور نو ترکیب pTZ57R/T حاوی PEP cDNA موجود در کلونی باکتریایی شماره ۲ انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شد. پس از اطمینان از عدم جهش، حامل مربوطه و حامل TRE2pur توسط دو آنزیم محدودالتر NheI و ClaI مورد هضم قرار گرفتند. شکل ۴ موید صحت هضم دو حامل مورد نظر میباشد. در نهایت PEP cDNA موشی برش یافته در درون حامل TRE2pur ساب کلون شد.

ساخت وکتورهای بیانی TRE2pur/EGFP

به منظور ارزیابی عملکرد سازه Tet off لازم بود تا وکتور TRE2pur حامل یک ژن نشانگر ساخته و بیان ژن نشانگر بررسی شود. همانطور که در شکل B و A مشاهده می‌شود حامل pDB2 واجد EGFP با آنزیم BamHI و حامل TRE2pur با آنزیم ClaI برش داده شد. و انتهای بریده شده هر قطعه به وسیله Klenow fragment به صورت صاف در آمد. شکل C ۵ بریده شدن دو حامل با آنزیم NheI و جدا شدن EGFP از حامل pDB2 را نشان می‌دهد. در نهایت EGFP به داخل TRE2pur وارد شد. پس از غربالگری کلونی‌های مثبت باکتریایی، سازه جدید TRE2pur/EGFP تکثیر و مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی بیان EGFP cDNA بدنال ترانسفکشن Tet off و TRE2pur/EGFP در سلولهای CHO

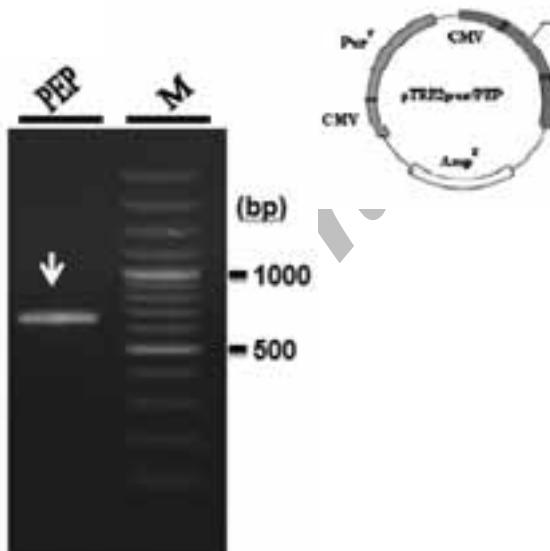
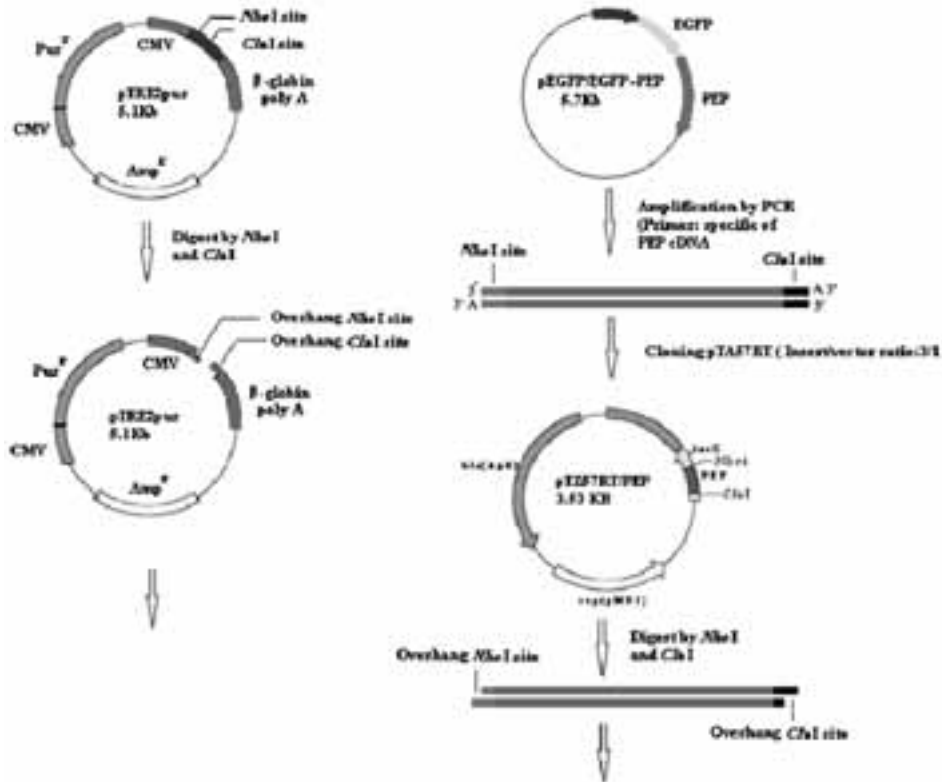
برای اطمینان از عملکرد سازه لازم بود که سازه TRE2pur/EGFP همزمان با Tet off به سلول CHO ترانسفکت گردد و عملکرد سازه نو ترکیب TRE2pur/EGFP با تولید رنگ سبز فلورسانس بررسی شود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انجام مراحل ترانسفکشن، میزان

سلول‌ها به کمک Try/EDTA (Gibco) جدا و پس از شمارش سلولی، تعداد $10^4 \times 14$ سلول در هر خانه ی دیش‌های ۱۲ خانه که از قبل لامل گذاری (لامل 24×24 mm) شده بودند، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۵۰٪-۶۰٪ کف دیش را پر کردند، ابتدا محلول Opti-MEM I حاوی ۱۳۹۵ نانوگرم در هر میکرولیتر از پلاسמיד TRE2pur/EGFP (محلول پلاسמיד) و ۲۵۰ میکرولیتر محلول (Opti-MEM I Gibco) حاوی ۱۰ میکرولیتر Lipofectamine (Invitrogen) 2000 (محلول لیپوفکتامین) تهیه شد. پس از انکوباسیون دو محلول در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، این دو محلول با یکدیگر مخلوط (محلول ترانسفکشن) و محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محیط کشت سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها به آرامی با محیط کشت (Opti-MEM I Gibco) فاقد سرم و آنتی بیوتیک شستشو داده شد. نهایتاً محلول ترانسفکشن همراه با ۲ میلی لیتر محیط Opti-MEM I به هر خانه اضافه شد. سلول‌ها با این محیط به مدت ۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. پس از آن محیط ترانسفکشن حذف و محیط کشت معمول سلول‌های CHO به هر خانه اضافه و سلول‌ها برای ادامه کشت به انکوباتور منتقل گردیدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، به منظور بررسی بیان ژن EGFP در سلول‌های ترانسفکت شده، این سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد (Sigma) فیکس و جهت بررسی میزان فعالیت سازه TRE2pur/EGFP به همراه Tet off، میزان فلورسانسی رنگ سبز توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus BX5 مورد بررسی قرار گرفت. ضمناً جهت بررسی بیشتر کارایی ترانسفکشن با دستگاه فلوسایتمتر FACSCalibur (Becton Dickinson) اندازه گیری و اطلاعات بدست آمده با نرم افزار Cell Quest Pro آنالیز گردید به این صورت که پس از آغاز و انجام آزمایش‌های فلوسایتمتری، نمونه براساس کنترل ترانسفکت نشده بررسی شد. در این روش 10^4 سلول از هر نمونه بررسی گردید، بطوریکه ابتدا در نمودار نقطه‌ای FSC/SSC جمعیت سلول CHO انتخاب و سپس بر اساس آن سلول‌های ترانسفکت شده برای رنگ سبز EGFP در کانال FL1 شناسایی و ارزیابی گردیدند.

نتایج

ساخت TRE2pur/PEP

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شد، قطعه PEP cDNA توسط



شکل ۱: شمای مراحل ساخت حامل بیانی TRE2pur/PEP. به واسطه پرایمرهای اختصاصی، cDNA PEP کلون شده در حامل pEGFP-C1 تکثیر شد. سپس PEP cDNA تکثیر شده از ژل استخراج به داخل حامل T/A کلون گردید. بعد از توالی یابی و حصول اطمینان از عدم جهش، cDNA هدف از حامل T/A جدا شده و مورد هضم دو آنزیم Nhe I و Cla I قرار گرفت. از طرف دیگر حامل TRE2pur نیز با دو آنزیم مذکور برش خورده، در نهایت PEP cDNA به داخل حامل TRE2pur الحاق گردید.

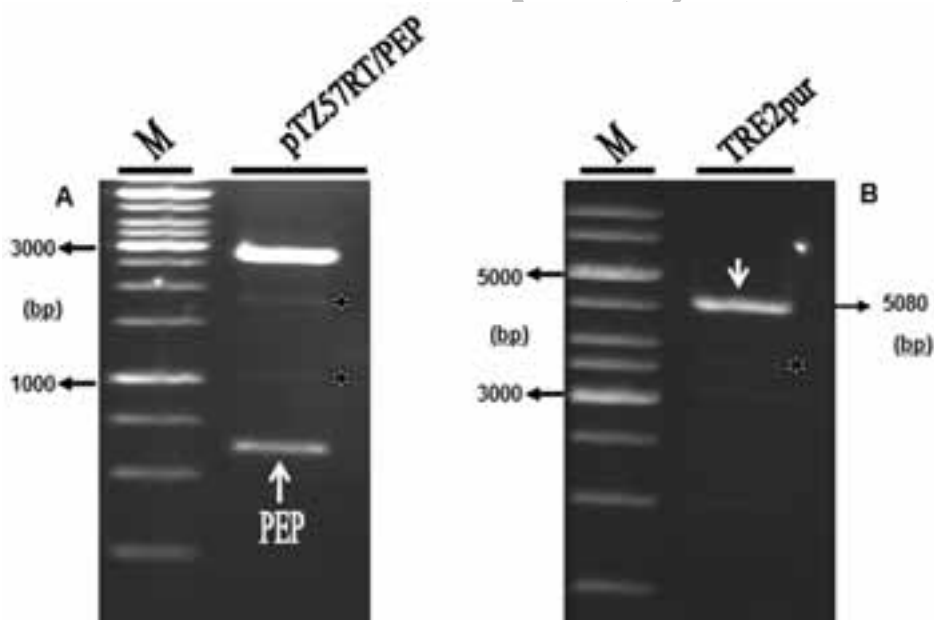
شکل ۲: محصول نمایان سازی شده روی ژل آگارز PEPcDNA موشی تکثیر شده توسط PCR. PEP cDNA موشی کلون شده در حامل pEGFP-C1 توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. کل محصول روی ژل آگارز نمایان سازی گردید و از روی ژل خالص سازی شد. در شکل باند ۶۴۴ جفت بازی بین دو باند ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی در بالاتر از باند ۶۰۰ نمایان است.

فعالیت سازه TRE2pur/EGFP به همراه Tet off با دستگاه فلوسایتومتری اندازه گیری شد (شکل ۶). پس از آنالیز نتایج با نرم افزار Cell Quest همانطور که در شکل مشاهده می شود یک کلونی CHO فاقد سازه نو ترکیب به عنوان کنترل منفی انتخاب گردید.

در این تحقیق به نتایج فلوسایتومتری به تنهایی بسنده نشد و برای اطمینان بیشتر قبل از انجام فلوسایتومتری مقداری از هر نمونه برای بررسی با میکروسکوپ فلورسانس انتخاب و رنگ سبز سلول های مثبت



شکل ۳: Colony insert check پنج کلونی واجد سازه نوترکیب pTZ57RT/PEP. محصول الحاق cDNA PEP موشی با حامل pTZ57RT به باکتری TOP10 ترانسفورم شد و در محیط کشت X-gal کشت داده شد. برای اطمینان از حصول نتیجه پنج کلونی سفید منفرد به عنوان نمونه مثبت به همراه یک کلونی آبی منفرد به عنوان کنترل منفی برای Colony insert check شد، که هر پنج کلونی مثبت باند مورد نظر (644bp) را نشان داد و کلونی منفی نیز باند مذکور را نشان نداد. * از پائین به بالا نمایان گر ۵۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز

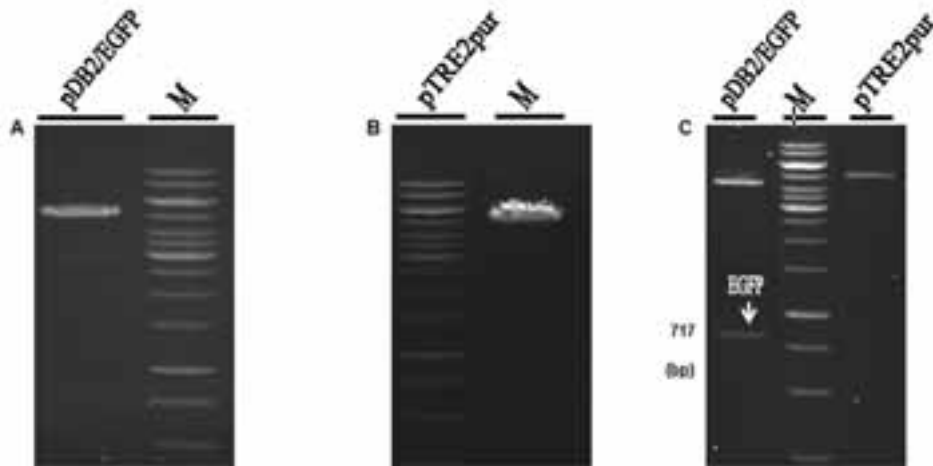


شکل ۴: هضم pTZ57rt/PEP و pTRE2pur با آنزیم‌های ClaI و NheI. شکل A: هضم pTZ57RT/PEP با دو آنزیم مذکور. همان طور که مشخص است باند ۲۸۸۶ جفت بازی pTZ57RT از باند ۶۴۴ جفت بازی PEP کاملاً جدا شده است. باندهای حاصل از برش غیر اختصاصی دو آنزیم در شکل نمایان می‌باشد. شکل B: هضم pTRE2pur با دو آنزیم مذکور. باند ۵۰۸۰ جفت بازی حاصل از برش کاملاً مشخص است. * برش‌های غیر اختصاصی

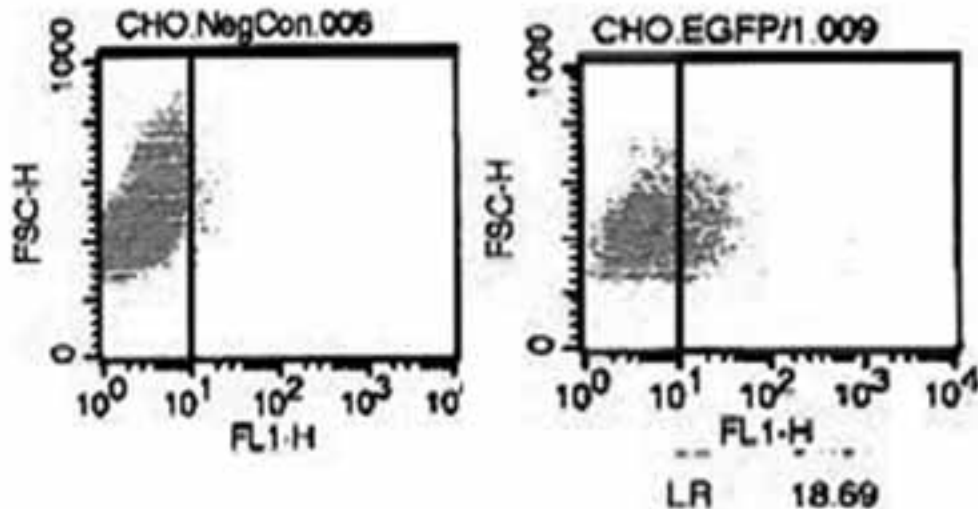
بحث

سیستم بیانی Tet off یک سیستم القائی بیان ژن یوکاریوتی است. Bujard و Gossen در مورد افزایش سطح بیان ژن در این سیستم شرح کاملی داده‌اند. در این سیستم وقتی که در محیط کشت،

که حاصل فعالیت EGFP در حامل TRE2pur بود، مشاهده گردید. در شکل ۷ سلول‌های سبز رنگ حاوی TRE2pur/EGFP نشان داده شده‌اند.



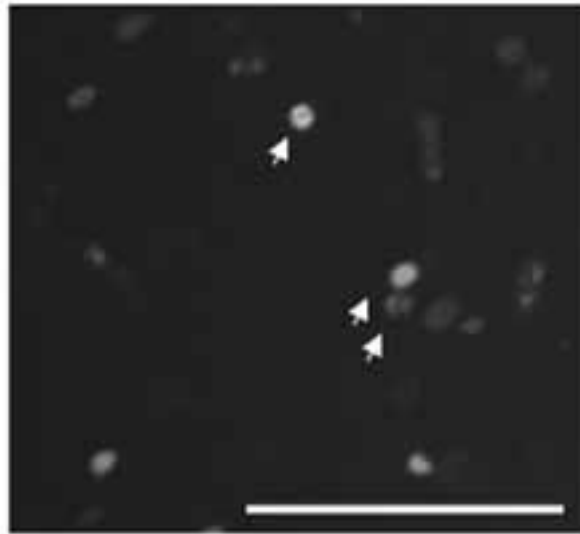
شکل ۵: هضم pDB2 و pTRE2pur. شکل A: هضم pDB2 با آنزیم محدوداثر BamHI. باند ۵۰۴۷ جفت بازی حاصل از برش در مقایسه با حامل برش نخورده قابل تشخیص است. شکل B: هضم pTRE2pur با آنزیم محدوداثر ClaI. باند ۵۱۰۰ جفت بازی pTRE2pur خطی حاصل از برش در شکل مشخص است. شکل C: دو حامل بریده شده در مرحله قبل به طور جداگانه با آنزیم NheI برش داده شد. با هضم pDB2 ژن ۷۱۷ جفت بازی کد کننده EGFP از حامل جدا گردید (پیکان).



شکل ۶: نمودار نقطه‌ای سلول‌های CHO ترانسفکت شده TRE2pur/EGFP و سلول‌های ترانسفکت نشده. نمودار سمت چپ سلول‌های ترانسفکت نشده و نمودار سمت راست سلول‌های ترانسفکت شده پس از انجام فلو سیتومتری می‌باشد.

این سیستم حداکثر سطح بیان قابل توجه می‌باشد زیرا در این سیستم از پروموتور سیستم‌گالوویروس (CMV) استفاده شده است (۱۹). پروتئین منع‌کننده teT (RteT) مهارکننده‌ی منفی ژن مقاومت به تتراسیکلین است. RteT در صورت عدم حضور cT به وسیله اتصال به توالی Tet در اپراتور (TetO) رونویسی این ژن را بلوک

تتراسیکلین یا داکسی‌سیکلین وجود داشته باشد بیان متوقف می‌شود (۱۹). در مقایسه، در سیستم بیانی Tet on در صورت حضور یکی از این دو آنتی‌بیوتیک بیان فعال می‌گردد. در سیستم القایی Tet off بیان به شدت تحت کنترل غلظت آنتی‌بیوتیک است. در مقایسه با دیگر سیستم‌های بیانی که سطح بیان در آنها براحتی قابل حصول نیست، در



شکل ۷: تصویر فلورسنت سلول‌های CHO ترانسفکت شده با TRE2pur/EGFP. رنگ سبز سلول‌ها نشان دهنده عملکرد صحیح سیستم بیانی Tet off حامل EGFP بدون حضور داکسی‌سیکلین یا تتراسیکلین است. بار برابر با ۱ میلی‌متر است.

حامل به درون سلول هدف ترانسفکت شده و در سلول پایدار می‌شود. این حامل مسئولیت ساخت پروتئین tTA را بر عهده دارد. حامل دوم که واجد ژن هدف است حامل TRE است که با توجه به نوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک نام گذاری می‌شود و ژن هدف نیز در آن کلون میگردد، بعد از پایدار شدن حامل اول در سلول به درون آن ترانسفکت خواهد شد. بنابراین با وجود پروتئین tTA می‌توان با استفاده از آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین (Tc) یا داکسی‌سیکلین (Dox) بیان را کنترل کرد. همان طور که از شکل مذکور پرمی‌آید tTA نسبت به توالی TRE گرایش دارد لذا به آن متصل می‌شود و باعث آغاز بیان خواهد شد. آنتی‌بیوتیک Tc یا Dox به ناحیه‌ای از tTA متصل شده لذا گرایش tTA به TRE از بین رفته و از آن جدا شده، بیان متوقف خواهد شد. cDNA ژن هدف در حامل TRE بلافاصله بعد از پروموتور کوچک شده CMV قرار دارد (۱۹).

به نظر می‌رسد که توقف بیان cDNA PEP و یا بیان بیش از حد آن می‌تواند در نوروزن سلول‌ها نقش به‌سزایی داشته باشد (۱۷) که با ساخت این سازه و روشن و خاموش کردن ژن و همچنین افزایش بیان PEP، تاثیرات آن را در نوروزن، در مطالعات آینده بررسی نمود. همانطور که می‌دانیم این ژن به طور طبیعی در خود سلول وجود دارد و طی نوروزن بیان آن افزایش می‌یابد، لذا با این سازه می‌توان تاثیرات بیان بیش از حد ژن را در نوروزن بررسی نمود. بنابراین سازه ساخته شده

می‌کند. TetR و TetO اساس تنظیم و القاء مورد استفاده برای سیستم‌های آزمایشی پستانداران هستند. اولین ترکیب اصلی سیستم Tet پروتئین تنظیمی است که مبتنی بر TetR است. دامنه تغییر یافته فاکتور منع‌کننده رونویسی TetR و ویروس VP16 به فعال‌کننده رونویسی متصل شده در نتیجه پروتئین هیبرید به عنوان tTA (Tetracycline-controlled transactivator) شناخته می‌شود. tTA کدون تنظیمی پلاسمید القایی pTet off است. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به نئومایسین برای غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده پایدار است. دومین ترکیب اصلی پلاسمیدهای القایی برای کنترل ژن درون آن، عنصر واکنش به تتراسیکلین یا TRE (Tetracycline-response element) است. دو سری حامل از سیستم Tet وجود دارند. در این تحقیق از سری pTRE استفاده شد که شامل هفت تکرار ۴۲ جفت بازی توالی Tetracycline TetO (operator) می‌باشد که اندکی قبل از آن در بالا دست پروموتور کوچک شده CMV (PminCMV) قرار داده شده است که در حقیقت یک عنصر فعال‌کننده رونویسی است و در نزدیکی پروموتور CMV عادی قرار دارد و در حامل مذکور حذف شده است در نتیجه از نشست رونویسی ژن جلوگیری می‌شود (۱۹).

همان طور که بیان شد این سیستم دارای دو حامل است حامل اول که نام سیستم از آن گرفته شده است و Tet off نامیده می‌شود. این

تقدير و تشکر

تمامی هزینه انجام این پروژه توسط پژوهشگاه رویان تامین گردید

مذکور قابلیت بررسی‌های بیشتر را در مطالعات بعدی داشته و می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

References:

1. Suzuki Y, Shimozawa N, Imamura A, et al. Clinical, biochemical and genetic aspects and neuronal migration in peroxisome biogenesis disorders. *J Inher Metab Dis.* 2001; 24: 151-165.
2. De Duve C. The peroxisome: A new cytoplasmic organelle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1969;173: 71-83.
3. Furuki S, Tamura SH, Matsumoto N, et al. Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with ex1p-Pex6p complex. *J Biol Chem.* 2006; 281(3):1317-1323.
4. Sheikh FG, Pahan K, Khan M, et al. Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 2961-2966
5. Latruffe N, Vamecq J. Evolutionary aspects of peroxisomes as cell organelles, and of genes encoding peroxisomal proteins. *Biol Cell.* 2000; 92: 389-395.
6. Purdue PE, Lazarow PB. Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 701-752.
7. Subramani S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev.* 1998; 78: 171-188.
8. van den Bosch H, Schutgens R, Wanders R, et al. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:157-197.
9. Lazarow PB, Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1985; 1: 489-530.
10. Baker A, Charlton W, Johnson B, et al. Biochemical and molecular approaches to understanding protein import into peroxisomes. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28: 499-504.
11. Baker A, Sparkes IA. Peroxisome protein import: Some answers, more questions. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; 8:640-647.
12. Gould SJ, Keller GA, Hosken N, et al. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 1989; 108: 1657-1664.
13. Miura S, Kasuya-Arai I, Mori H, et al. Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions in Vitro as a minimal peroxisome-targeting signal. *J Biol Chem.* 1992; 267: 14405-14411.
14. Singh I, Paintlia AS, Khan M, et al. Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res.* 2004; 1022: 1-11.
15. Swinkels W, Gould S, Bodnar A, et al. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* 1991; 10: 3255-3262.
16. Osumi T, Tsukamoto T, Hata S, et al. Aminoterminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181: 947-954.
17. Ferrer-Martinez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR. Mouse PeP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Dev Dyn.* 2002; 224: 154-167.
18. Ostadsharif M, Ghaedi K, Nasr Esfahani M H, et al. Cytosolic localization of Mouse peroxisomal protein/ Δ SKI fused with Enhanced Green fluorescent protein into Chinese Hamster Ovary-K1 and P19 cells. *Yakhteh Med J.* 2009; 11(2): 154-159
19. Yin D. X. Zhu, L. & Schimke, R. T. tetracycline controlled gene expression system achieves high – level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem.* 1996; 235: 195-201.
20. Tanhaei S, Ghaedi K, Karbalaii Kh, et al. Mouse peroxisomal protein cDNA cloning and characterization of its Intercellular localization. *Yakhteh Med J.* 2009; 11(2): 169-203.
21. Keravala A, Portlock J, Nash J, et al. PhiC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. *J Gene Med.* 2006; 8(8):1008-1017