مقاله پژوهشی

انتخاب بهترین وکتور ویروسی برای مهار اختصاصی ژن Creb1 در رده سلولی 293T

الیکا اسماعیل زاده[۱]، مهدی بنان[۲*]

۱-کارشناس ارشد ژنتیک انسانی
۲-دکترای ژنتیک مولکولی، استادیارمرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

چکیده

در این مطالعه چندین shRNA اختصاصی ژن Creb-1را که پس از طراحی در وکتور های لنتی کلون شده بودند، با سیستم انتقال گذرا در سلولهای 293T مورد بررسی قرار دادیم. بیان نسبی Creb-1 توسط سیستمqRT-PCR تعیین شد.همه shRNAها منجر به کاهش بیان ژن Creb-1 شدند .یک shRNA در کاهش بیان ژن مورد نظر از همه موثرتربود. فعالیت siRNAها که توسط رینلد پیش بینی شده بود با مقدار فعالیت واقعی آنها مورد مقایسه قرار گرفت. مطالعات ما یک ارتباط کلی بین فعالیت واقعیsiRNAها و فعالیت پیش‌بینی شده آنها را نشان داد.

واژگان کلیدی: RNA, Small Interfering ؛ Creb1؛ qRT-PCR

مقدمه

پروتئین CREB[۱] در همه سلولهای بدن بیان میشود واز فاکتورهای رونویسی می‌باشد که فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک‌های سلولی مثل , cAMP Ca۲+ ، هیپوکسی، نور UV و فاکتورهای رشد افزایش می‌یابد. فعال شدن CREBبا فسفریلاسیون آن در Ser-۱۳۳ توسط Ser/Thr کینازهاصورت می‌گیرد(۱) پروتئین‌های CREB۱,CREB۲ میتوانند در پایین دست مسیر سیگنالی p۳۸ MAPK[۲] که در گروه Ser/Thr kinaseها هستند، قرار بگیرند(۲).

با استفاده از پدیده RNAi[۳] می‌توان جهت بررسی نقش این ژن در مسیرهای سیگنالی داخل سلولی استفاده کرد. RNAi یک پروسه سلولی جهت تنظیم بیان ژن‌ها می باشد و در دفاع ذاتی بسیاری از ارگانیسم‌ها دخیل است. RNAi همچنین به عنوان ابزاری برای جستجو در مورد عملکرد ژن‌ها استفاده شده است (۳).

siRNA مولکولهای RNA کوچک دو رشته ای حدودا ۱۹-۲۱ نوکلئوتیدی هستند که می توانند بصورت هدفمند به mRNA ژنهای معین در مرحله بعد از رونویسی متصل شوند و منجر به مهار آن شوند (۵و۴). دو روش اصلی به منظور مهار ژنها وجود دارد: استفاده از siRNA واستفاده از وکتورهای پلاسمیدی وکتورهای ویروسی بیان کننده یک shRNA و این shRNA در نهایت به یک siRNA فعال پردازش می‌شود(۶) .به دو حالت می‌توان توالی shRNA رابرای تحقیقات انتخاب کرد،در حالت اول می‌توان

* مهدی بنان، PhD
دکترای ژنتیک مولکولی، استادیارمرکز تحقیقات ژنتیک
تهران، اوین بلوار دانشجو، بن بست، کودکیار ، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
پست الکترونیک: mbbanan@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

1. Ca2+ / cAMP Response Element-binding Protein
2. Mitogen Activated protein Kinase
3. RNA interference

Archive of SID
www.SID.ir

از توالی‌هایی که قبلا مورد آزمایش گرفته و دارای مهار مطلوب برای ژن مورد نظر می‌باشند استفاده کردوحالت دیگر استفاده از کتابخانه طراحی شده shRNA و غربالگری آنها جهت گزینش بهترین shRNA با بیشترین اثر برای مهار ژن مورد نظر می‌باشد ،ما در این بررسی از وکتورهای رتروایرال انتقالی PlKO حاوی shRNA (از شرکت سیگما) استفاده کردیم. این وکتورها علاوه بر توالی‌های متفاوت shRNA برای ژن Creb۱ تحت کنترل پروموتر U۶، توالی LTR را نیز داشته که می توانند بداخل ژنوم میزبان وارد گردند. برای این منظور نیاز به سه وکتور دیگر میباشد که هر کدام بخش‌های مختلف ویروس را بیان می‌کنند(۷). در مطالعات گذشته مهار ۱۲ عددژن مربوط به خانواده تیروزین کیناز را در سلولهای سرطانی ریوی بنام A۵۴۹ با استفاده از کتابخانه ای از وکتورهای PLKO مورد بررسی قراردادندو در یافتند از پنج shRNA متفاوت برای هر ژن حداقل یک shRNA دارای بیشترین اثر مهاری می‌باشد(۸). ما در این مطالعه برای انتخاب بهترین وکتور انتقالی PlKO ابتدا آنها را با استفاده از واکنشگر لیپوفکتامین، بصورت مجزا در داخل سلولهای چسبندهT۲۹۳ وارد کردیم و با استفاده از سیستم Real time PCR میزان مهار ژن Creb۱را در این سلولها چک کردیم. در نهایت میزان اثر این وکتورها را با میزان فعایت پیش بینی شده آنها، از نظر معیارهای طراحی رینلد مورد بررسی قرار دادیم .

روش بررسی : نوع مطالعه پایه ای- کاربردی می‌باشد. مطالعات بر روی سلولهای سرطانی رده T۲۹۳ صورت گرفت و روش کار بطور کامل شرح داده شده است:

کشت سلولهایT۲۹۳ با استفاده از محیطDMEM[4] حاوی۱۰٪ FBSو ۱٪ آنتی بیوتیکهای پنی سیلین در یک فلاسک ۲۵ سانتی متر مکعب وتقسیم سلولها پس از ۲۴ ساعت در ۵ چاهک از یک پلیت ۱۲ خانه (مقدار سلولها طوری انتخاب می‌شوند که پس از ۲۴ ساعت فقط ۵۰درصد سطح پلیت را پر کنند).

پس از ۲۴ ساعت انتقال گذرا سلولها با پلاسمیدهای مربوطه توسط واکنشگر لیپوفکتامین صورت می‌گرفت (یک چاهک بعنوان کنترل با وکتور PlKo فاقدshRNA ویک چاهک باوکتورPSV-βGal وبه بقیه چاهکها هر کدام، وکتورهای PlKo حاوی shRNA از شماره ۲ تا ۴ اضافه می‌شدند).نسبت واکنشگر و پلاسمید در این

جدول۱- پرایمرهای طراحی شده ژنهای وGAPDH ژن CREB1 جهت انجام Real Time PCR

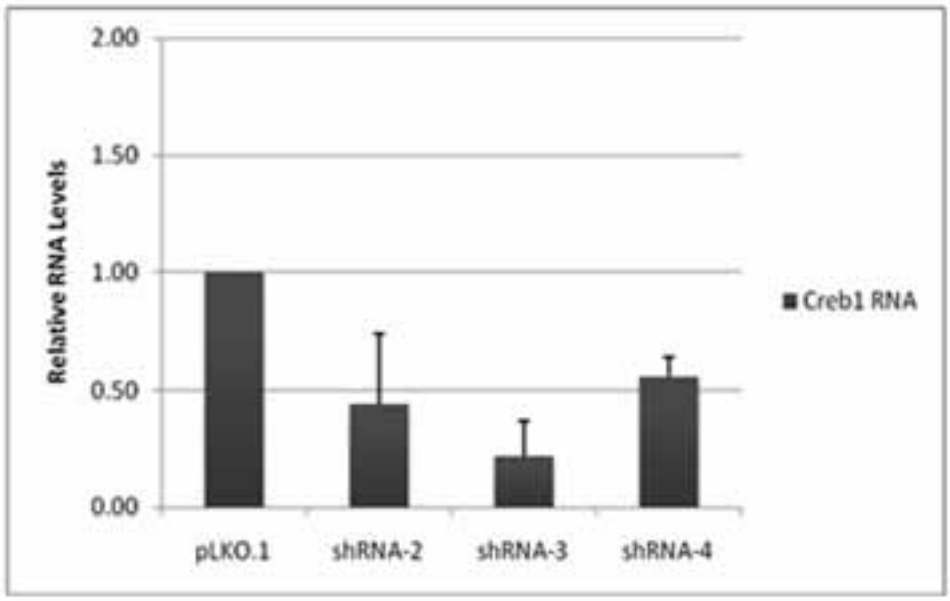
GAPDH F	5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'
GAPDH R	5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
CREB F	5'- CACCTGCCATCACCACTGTAA-3'
CREB R	5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'

جدول۲- برنامه Real Time PCR در دستگاه ABI7500(9).

Step	Time	Temperature	Ramp rate	Additional comments
PCR initial activation step	5 min	95°C	Maximal/ fast mode	HotStarTaq Plus DNA Polymerase is activated by this heating step
Two-step cycling				
Denaturation	10 s	95°C	Maximal/ fast mode	
Combined annealing/ extension	30 s	60°C*	Maximal/ fast mode	Perform fluorescence data collection
Number of cycles	35–40			The number of cycles depends on the amount of template DNA

4. Double Modify Eagle Media

www.SID.ir



شکل ۱ – shRNA3 در سه بار انجام آزمایشات بطور میانگین ٪ ۷۸ میزان بیان ژن Creb1 را نسبت به بیان آن در سلولهای کنترل که فقط با وکتور PLKO ترانسفکت شده اند کاهش داده است.

مرحله ۳ به ۱ انتخاب شد.

۲۴ ساعت بعداز عمل انتقال ،رنگ آمیزی با استفاده از کیت βGal Staining–برای چاهک مربوط به وکتور βGal صورت می‌گرفت. وکتور PSV–βGal بیان کننده ژن بتاگالاکتوزیداز می‌باشد و جهت بررسی میزان ورود وکتوربه سلولهااز این آن استفاده می‌شود.سلولهایی که این وکتور را دریافت کرده اند پس از رنگ آمیزی با X–Gal رنگ آبی را ایجاد می‌کنند.

۲۴ ساعت پس از بررسی میزان ورود وکتور به سلولها، استخراج RNA و تهیه cDNA از آنها انجام می‌گرفت. واکنش Real Time PCRدر این مرحله با استفاده از پرایمرهای CREB۱ و GAPDH (کنترل داخلی) انجام می‌شد. جهت اطمینان از صحت انجام واکنش Real Time PCR، آزمایشها بصورت دوتایی[5] انجام می‌گرفت.

یافته‌ها:

درشکل شماره ۱ نتایج حاصل از آزمایش Real Time PCR در سه بار تکرار این بررسی درج شده است همانطور که مشاهده می‌کنید shRNA–۳ در سه بار انجام آزمایشات بطور میانگین ٪۷۸ میزان بیان ژن Creb۱ را نسبت به بیان آن در سلولهای کنترل که فقط با وکتور PLKO ترانسفکت شده اند کاهش داده است.

و میزان کاهش بیان این ژن توسط shRNA–۲ وshRNA–۴ بترتیب ٪۵۶ و٪۴۴ نسبت به سلول کنترل می‌باشد.

بحث:

در این تحقیق سه وکتور ویروسی PlKO با shRNAهای متفاوت جهت کاهش بیان ژن Creb۱ در سلولهای ۲۹۳T مورد بررسی قرار گرفتند .هدف از این بررسی انتخاب بهترین shRNA با بیشترین اثر برای مهار ژن Creb۱ بود .رینلد پیش از این ۱۸۰ siRNA برعلیهmRNA ژن FireflyLuciferase وmRNA ژن انسانیCyclophilin B هر کدام بطول ۱۷۹باز (۹۰ siRNA برای هر کدام) را بررسی کرد. رینلد با این بررسی دریافت که عملکرد بهتر هر siRNA به خصوصیات فردی آن مربوط میشود ونه به محل اتصال آن بر روی mRNA ژن هدف (۱۰).

با استفاده از معیارهای امتیازدهی رینلد ،امتیازات siRNAs استفاده شده در این تحقیق محاسبه گردید (جدول۳–). حداکثر امتیاز هر siRNA براساس این معیارها ۸ امتیاز می‌باشد.

در جدول شماره ۴ توالی‌هایshRNA استفاده شده در این تحقیق و امتیاز دریافتی هر کدام بر اساس معیارهای رینلد مشخص شده

5. Duplicate

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳ – معیارهای امتیازدهی رینلد (۱۰).

موارد	توضیح	امتیاز
۱	دارا بودن نوکلئوتیدهای GC بمیزان (۳۰٪-۵۲٪)	۱
۲	دارا بودن حداقل ۳ نوکلئوتیدA یاU در موقعیت ۱۵-۱۹	۱ امتیاز به ازای هر Aیا U
۳	نبود توالی تکراری در داخل ساختار (Tmپائین)	۱
۴	نوکلئوتید A در موقعیت ۱۹	۱
۵	نوکلئوتید A در موقعیت ۳	۱
۶	نوکلئوتید Uدر موقعیت ۱۰	۱
۷	نبودن نوکلئوتید Cیا G در موقعیت ۱۹	-۱
۸	نبودن نوکلئوتید C در موقعیت ۱۳	-۱

جدول۴ – توالی سهshRNA متفاوت برای مهارژن Creb۱وامتیاز مربوط به هرکدام

امتیاز	توالی	شماره
۴	GCAAACATTAACCATGACCAACTCGAGTTGGTCATGGTTAATGTTTGC	(۲)shRNA
۵	CGTCTAATGAAGAACAGGGAACTCGAGTTCCCTGTTCTTCATTAGACG	(۳)shRNA
۲	CAGTGGATAGTGTAACTGATTCTCGAGAATCAGTTACACTATCCACTG	(shRNA(۴

است .همانطور که توضیح داده شد با استفاده ازshRNA شماره ۳ بیشترین مهار برای ژن Creb۱ را در سلولهای ۲۹۳T داشتیم و این shRNA بالاترین امتیاز (۵ امتیاز) را نسبت به shRNAهای دیگر دریافت کرد.

این نتایج نشان می‌دهد که لحاظ شرایط رینلد در طراحی siRNA می‌تواند منجر به عملکرد بهتر آن گردد.

References:

1. Shi, Y., Venkataraman S. L., Dodson, G E., Mabb AM., LeBlanc S. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. PNAS 2004;101: 5898-5903.
2. Sangerman, J., Lee, M. S., Yao X., Oteng E., Hsiao, C., Zein S., Li W., Acquash S. Mechanism for fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves γ-globin activation by CREB1 and ATF-2. Blood2006; 108: 3590-3599.
3. www.Ambion.com
4. Bantounas I, Phylactou LA & Uney JB. RNA interferences and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. Molecular Endocrinology 2004; 33:545-557
5. Yah-Yu J, stacy L & Turner D.L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammaliam cells. Molecular Endocrinology 2002;6047-6052
6. Echeverri,J., Perrimon,N.High throughput RNAi screening in cultured cells. Nature publishing group 2006;7:373-384
7. www.Invitrogene.com
8. Jason Moffat, Dorre A. Grueneberg, Xiaoping Yang, So Young Kim, Angela M. Kloepfer,Gregory Hinkle A Lentiviral RNAi Library for Humanand Mouse Genes Applied to anArrayed Viral High-Content Screen.Cell 2006; 124, 1283–1298
9. www3.appliedbiosystems.com
10. Angela Reynolds,Devin Leake,et al. Retional siRNA design for RNA interference. Nature biotechnology 2004;doi:10.1038/nbt936

Archive of SID
www.SID.ir