

قابلیت ترانسفکشن و ترانسدوکشن سلول‌های جوجه رده LMH و مقایسه آن با سلول‌های انسانی رده HEK-293T

عباس رحیمی شم‌آبادی^۱، موسی گردانه^{۲*} Ph.D.، مسعود علی‌پناه^۳ Ph.D.، احسان قریب^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران و دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان
- ۲- دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
- ۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، و پردیس کیش دانشگاه تهران
- * پست الکترونیک نویسنده مسئول: mossa65@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی کارایی جذب DNA و انتقال ژن به سلول‌های کبدی جوجه نژاد لگهورن در دو سطح ترانسفکشن و ترانسدوکشن با لنتی ویروس‌های نو ترکیب و شدت بیان ترانسژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای ترانسفکشن یا ترانسدوکشن ویروسی، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و در مراحل مختلف با میکروسکوپ فلورسنس مشاهده گردیدند. تعداد سلول‌های GFP (Green Fluorescent Protein-positive) با نرم افزار Grid Cell Counter و شدت بیان ترانسژن با نرم افزار ImageJ محاسبه و داده‌ها با نرم افزار SPSS آنالیز شدند.

نتایج: بیان ژن GFP، در سطح ترانسفکشن، در سلول‌های HEK (Human Embryonic Kidney) و LMH (Chicken hepatoma) cell line) به ترتیب ۶ ساعت و ۹ ساعت بعد از انتقال ژن و در مرحله ترانسدوکشن به ترتیب ۲۲ ساعت و ۳۶ ساعت بعد مشاهده شدند. شمارش سلول‌های GFP⁺، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد که سلول‌های HEK و LMH به ترتیب ۴۰ درصد و ۳۵ درصد DNA را دریافت و بیان کرده‌اند. این مقادیر در ۷۲ ساعت بترتیب به ۹۵ درصد و ۴۸ درصد رسید. شمارش سلول‌های مثبت ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از ترانسدوکشن ویروسی نیز الگویی مشابه از نظر دریافت DNA توسط دو رده سلولی مزبور را به اثبات رسانید. لیکن آنالیز شدت بیان GFP نشان داد که رده HEK و LMH بترتیب ۷۴ درصد و ۸۹ درصد GFP را با اختلاف معنی‌داری ($P < 0.01$) بیان کردند.

نتیجه گیری: نتایج حاصله نشان داد که سلول‌های HEK از قدرت جذب بالاتری برای دریافت DNA برخوردار هستند با این حال سلول‌های LMH قادرند ژن‌های خارجی را با شدت بیشتری بیان نمایند.

واژگان کلیدی: جوجه، LMH، لنتی ویروس، ترانسفکشن، ترانسدوکشن

مقدمه

سالیان زیادی است که تخم مرغ و جنین جوجه بعنوان مدلی مناسب برای مطالعات فیزیولوژیکی، تهیه آنتی بادیهای تجاری و واکسن بیماریها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از دلایل این رویکرد می‌توان هزینه پائین تولید انبوه تخم مرغ، دوره کوتاه انکوباسیون، سیکل زندگی و تولید مثل کوتاه طيور نسبت به پستاندارانی که بعنوان حیوان آزمایشگاهی مطرح هستند و وجود محیط استریل داخل تخم مرغ را نام برد. بدین علت روشهای استخراج و تخلیص پروتئینهای مختلف از تخم مرغ نیز چندین دهه قبل ابداع شده (۱) و به سهولت قابل انجام است (۲ و ۳).

در عرصه مطالعات و تولیدات بیوتکنولوژی، تولید حیوانات تراریخته بعنوان مدل بیماریهای صعب‌العلاج و نیز بعنوان بیوراکتورهای قابل دسترس و مطمئن در سالهای اخیر مرسوم شده است (۴-۷). جوجه طیور از جمله حیواناتی است که بصورت تراریخته تولید و گزارش شده است (۸-۱۰). در مقایسه با سایر مدل‌های حیوانی، طیور از مزایای خاصی بخصوص در عرصه تولید مولکول‌های آنتی بادی برخوردار است. این مزایا عمدتاً بر سه دسته تقسیم بندی می‌شوند: ۱) مزایای بیولوژیکی که بیان درست پروتئینها و پردازش مناسب آنها در طی بیان (مثل گلیکوزیلاسیون و سیالیلاسیون آنتی بادیها متناسب با آنچه در سلول‌های انسانی روی می‌دهد) (۱۱) را شامل می‌شود، ۲) مزایای سرعت و میزان تولید بدلالی از قبیل زمان کوتاه انکوباسیون یعنی ۳ هفته و زمان نسبتاً کوتاه پرورش یک نسل یعنی حدود ۲۰ هفته و سرعت و سهولت افزایش سطح تولید محصول (Scale-up) نسبت به سیستمهای دیگر و ۳) هزینه پائین تولید از جمله عدم نیاز به فرمانتورهای بزرگ و روشهای پیچیده و پرهزینه استریلیزاسیون، تخلیص و تغلیظ محصول (۱۲).

انتقال ژن خارجی به درون سلولها که لازمه ایجاد حیوانات تراریخته می‌باشد عمدتاً بدو روش غیر ویروسی و ویروسی انجام می‌پذیرد. در روش‌های غیر ویروسی میزان موفقیت انتقال ژن پایین بوده و نمی‌توان انتظار داشت که قطعه ژن هدف بمیزان بالایی وارد ژنوم سلول شود. درصد الحاق ترانسژن در ژنوم سلول و میزان بیان آن نیز عموماً پایین می‌باشد (۱۳). این در حالیکه ویروس‌ها به طور طبیعی از توانایی بالایی در انتقال و الحاق ژنوم خود در سلول میزبان برخوردارند (۱۴). بعلاوه با افزایش اطلاعات در مورد چرخه زندگی و ساختار ژنتیکی ویروسها و

نتیجتاً دستکاری‌های هدفمند بر روی ژنوم آنها، کارائی و پتانسیل ناقلین ویروسی برای انتقال ژنهای خارجی و الحاق آنها در ژنوم میزبان بهینه سازی می‌شود (۱۵).

رده سلول‌های Chicken hepatoma cell line LMH در سال ۱۹۸۱ توسط کیتاگوا در پی تیمار سلول‌ها با دی اتیل نیتروز آمین تثبیت گردید (۱۶). این رده سلولی از سلول‌های سرطانی کبد جوجه نژاد لگهورن جدا شده‌اند و از مورفولوژی دندریتی برخوردار هستند. از این سلول‌ها رده دیگری بنام LMH-2A مشتق شده است که در آنها ژن گیرنده استروژن با استفاده از تکنیک ترانسفکشن تثبیت شده است (۱۷ و ۱۸). بنابراین اطلاعات موجود در سایت ATCC (American Type Culture Collection) سلول‌های LMH از قابلیت نسبتاً خوبی برای ترانسفکشن و دریافت توالی‌های نوکلئوتیدی برخوردار می‌باشند.

پتانسیل سلولهای جوجه در دریافت و بیان ژن خارجی برای تولید جوجه‌های تراریخته اهمیت زیادی دارد. در این راستا و در مطالعه حاضر قابلیت ترانسفکشن سلولهای LMH و دریافت توالی نوکلئوتیدی خارجی با استفاده از روش رسوب DNA - فسفات کلسیم بررسی و با سلول‌های استاندارد Human Embryonic Kidney (HEK)-293T مقایسه شده است. ما همچنین قابلیت ترانسداکشن رده سلولی LMH بالنتی ویروسهای نوترکیب با منشاء انسانی را بررسی و با سلول‌های HEK-293T مقایسه کردیم.

مواد و روش‌ها

بیولوژی مولکولی: ناقلین لنتی ویروسی بنامهای pNL-EGFP/CMV-WPRE (ناقل انتقال یا ترانسفر)، pCD/NL-BH* $\Delta\Delta\Delta$ (ناقل بسته بندی ویروس) و LTR-G (ناقل غشائی) از آزمایشگاه Dr. J. Reiser تهیه شد (۱۹). خالص سازی نمونه‌های پلاسمیدی با استفاده از کیت Maxiprep از کیاژن و براساس دستورالعمل سازنده آن انجام شد.

کشت سلول: بر طبق گزارش قبلی ما (۲۰) سلولهای مولد ویروسی از رده HEK-293T (یا مختصراً HEK) در محیط Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) بهمراه ۱۰ درصد سرم FBS در شرایط ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂

استفاده از Amicon-100 MW (Millipore) عینا مطابق گزارش قبلی تغلیظ گردید (۲۱). برای آلوده ساختن سلول‌های هدف حجم‌های معینی (به بخش نتایج رجوع شود) از این استوک تغلیظ شده ویروسی به آرامی به سلول‌ها اضافه شد و در شرایط رشد ذکر شده در بالا انکوبه گردید تا بیان ترانسژن فلورسنسی رویت شود. تصاویر سلول‌ها در مراحل ترانسفکشن سلولی و ترانسدوکشن ویروسی را با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس جمع آوری و برای آنالیزهای بعدی ذخیره گردید.

محاسبه سلول‌های GFP⁺: برای شمارش سلول‌ها حدود ۱۰ میدان میکروسکوپی مختلف از هر چاهک ۹۶ خانه مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از تصاویر این میداين، درصد سلول‌های GFP⁺ با استفاده از نرم افزار Grid Cell Counter محاسبه گردید (۲۲).

محاسبه شدت بیان GFP: برای آنالیز شدت بیان در مرحله ترانسدوکشن ویروسی، سلول‌ها بصورت تریپلیکیته (۳ چاهک) برای هر رده سلولی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت و با یک دهم از استوک ویروسی آلوده گردید. هفتاد و دو ساعت پس از ترانسدوکشن تصاویر فلورسنسی از سلول‌ها گرفته شد تا برای آنالیز بعدی بکار رود. این آزمایش برای ۳ بار و هر بار بطور مجزا تکرار گردید و در مجموع از ۹ چاهک از هر نمونه تصویر برداری شده و مورد آنالیز قرار گرفت. علاوه بر ۹ چاهک تیمار شده با ویروس، از ۶ چاهک دست نخورده از هر رده سلولی (۲ چاهک در هر آزمایش) نیز در زیر نور فلورسنس عکسبرداری شد تا بعنوان زمینه در محاسبات بکار رود. پس از این مرحله مجموع سلول‌های موجود در هر چاهک تیمار شده با ویروس به روش رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش گردید. برای آنالیز شدت بیان در تصاویر از نرم افزار ImageJ (۲۳) استفاده شد بدین ترتیب که ابتدا ارقام مربوط به میزان کل فلورسنس هر چاهک و سپس مقادیر فلورسنس زمینه با این نرم افزار بدست آمد. پس از تفریق مقادیر زمینه از مقادیر کل، میزان فلورسنس حاصله از هر چاهک را به نسبت مجموع سلول‌های موجود در آن چاهک محاسبه گردید. نهایتاً متوسط مقادیر مربوط به همه ۹ چاهک از هر نمونه را بدست آورده و داده‌های حاصله را جهت تجزیه و تحلیل آماری بکاربرده شد.

آنالیز آماری: داده‌های مندرج در تصاویر نماینده متوسط (Mean±SEM) حد اقل ۳ آزمایش جداگانه است که بصورت

کشت و در حد ۸۰-۹۰ درصد Confluency پاساژ داده شدند. برای ترانسفکشن و تولید ویروس ۲ میلیون سلول در پتری دیشه‌های ۱۰ سانتی‌گراد و مخصوص کشت سلول ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد حدوداً ۵۰-۶۰ درصد فضای پتری دیش را پر نمایند.

سلول‌های LMH با مشخصات ATCC, CRL-2117 از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور ایران-تهران) تهیه شده و عینا مطابق گزارش قبلی کشت و تکثیر داده شدند (۲۱). بطور خلاصه برای کشت این سلول‌ها از محیط Waymouth MB 752/1 (از شرکت GIBCO) با ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ میکروگرم گرم بر میلی لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ استفاده شد. برای کشت مجدد سلول‌ها، کف فلاسکها و پلیتهای سلولی در ابتدا با ژلاتین ۱ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه پوشانده شد تا از چسبندگی کامل سلول‌ها اطمینان حاصل شود. برای سهولت در شمارش سلول‌های GFP⁺، ترانسفکشن و ترانسدوکشن هر دو رده سلولی در پلیتهای ۹۶ خانه و با کاشت اولیه ۳۰۰۰ سلول از هر دو رده صورت پذیرفت.

تولید و تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلول‌های هدف:

تمامی مراحل فوق الذکر مطابق گزارش قبلی انجام گردید (۲۱). بطور خلاصه برای تولید لنتی ویروسهای نوترکیب و فعال، سلول‌های مولد ویروس همزمان با سه ناقل لنتی ویروسی به میزان ۱۵ میکروگرم از ناقل ترانسفر، و ۱۰ میکروگرم از هر یک از ناقلین بسته بندی و غشائی با روش استاندارد رسوب DNA- فسفات کلسیم ترانسفکت شد. توضیح بیشتر آنکه مقادیر DNA به همراه ۱۲۵ میلی مولار فسفات کلسیم با افزوده آب استریل به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و بصورت قطره ای به ۵۰۰ میکرولیتر محلول (2 X HBS) 2 X Heps Buffered (2 X HBS: NaCl: 174 mM, KCl: 10 mM, Saline اضافه شد. 2 X HBS: NaCl: 174 mM, KCl: 10 mM, Na₂HPO₄.7H₂O: 1.4 mM, D-Glucose: 15 mM, HEPES: 42 mM) پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون مخلوط بدست آمده در دمای اطاق، قطره قطره به سلول‌های زنده در پلیت کشت اضافه شد. بدنبال آن سلول‌ها تا تولید ویروس و رها سازی ذرات ویرویی به محیط در شرایط انکوباتوری مذکور در بالا نگهداری شدند. محیط سلول‌های ترانسفکت شده در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد جمع آوری شده و پس از فیلتراسیون با

رده سلولی با حداقل حجم استوک ویروسی آلوده شدند. متعاقباً سلولهای HEK و LMH بترتیب ۲۲ و ۳۶ ساعت بعد شروع به بیان GFP نمودند. بکارگیری حجم‌های سریالی از استوک ویروسی و سپس شمارش سلولهای GFP⁺ در مقاطع زمانی ۳۶ ساعت برای سلولهای HEK و ۴۸ ساعت برای سلولهای LMH نشان داد که در یک محدوده از تیترو ویروسی، غلظت ویروس نو ترکیب با تعداد سلولهای بیان کننده ترانسژن در مورد هر دو رده سلولی رابطه مستقیم دارد (نمودار ۱-ب). ترانسدوکشن سلولهای رده HEK و LMH با یک بیستم استوک ویروسی بترتیب ۱۶ و ۱۰ سلول GFP⁺ ایجاد نمود که ۳ برابر بیشتر از زمانی است که سلولها رقت یک پنجاهم ویروسی را دریافت کردند. از نقطه نظر آماری این تفاوت نتیجه بین رقت‌های یک پنجاهم و یک بیستم برای هر دو رده سلولی بسیار معنی‌دار بود (Student t-test; P<0.001). افزایش غلظت ویروس از یک بیستم به یک دهم نیز تعداد سلولهای مثبت در هر دو رده را ۳ برابر دیگر افزایش داد و برای رده HEK و LMH بترتیب به ۵۱±۳ و ۳۲±۳ رسانید و این افزایش برای هر دو رده سلولی بسیار معنی‌دار بود (P<0.001).

تریپلیکیته و یا بیشتر تکرار شده اند. برای آنالیز تفاوت بین دو گروه از تست Student's t-test (Student's t-test) استفاده شد و متعاقباً با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 مورد بررسی قرار گرفت. ارزش P<0.05 بصورت معنی‌دار و ارزشهای P<0.01 بصورت بسیار معنی‌دار تفسیر گردید.

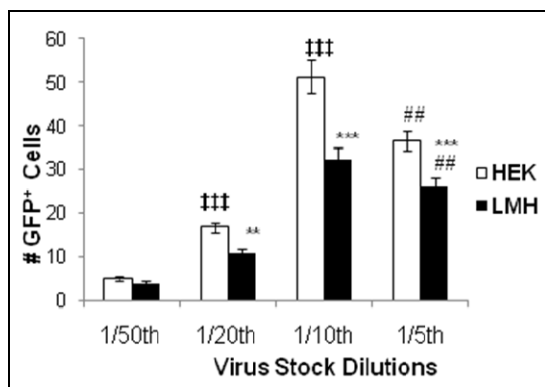
نتایج

آغاز بیان ترانسژن در مرحله ترانسفکشن

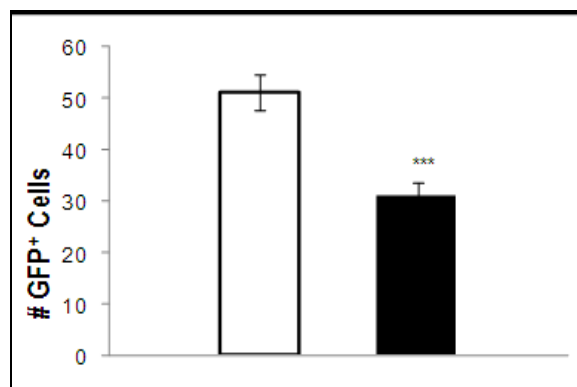
مشاهده مستقیم سلولها در فواصل زمانی متوالی بعد از ترانسفکشن نشان داد که GFP در سلولهای HEK و LMH به ترتیب ۶ و ۹ ساعت پس از پایان ترانسفکشن قابل رویت می‌باشد. پس از گذشت ۱۲ ساعت از ترانسفکشن، تعداد سلولهای HEK مثبت بطور متوسط به ۵۱±۱ عدد در هر میدان میکروسکوپی رسید. این در حالیست که تعداد سلولهای LMH مثبت ۲۰ ساعت پس از ترانسفکشن بطور متوسط ۳۲±۲ عدد در هر میدان بود (نمودار ۱-الف). آنالیز آماری تفاوت این دو گروه را بسیار معنی‌دار نشان داد (Student's t-test; P<0.01).

آغاز بیان ترانسژن در مرحله ترانسدوکشن

برای مشاهده بیان در اولین فاصله زمانی پس از ترانسدوکشن، دو



ب



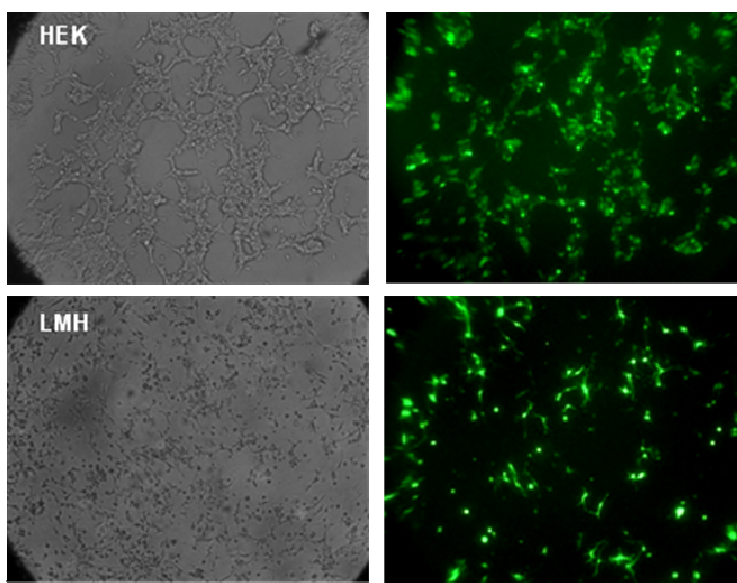
الف

نمودار ۱: الف- شمارش سلولهای GFP⁺ در آغاز ترانسفکشن: این شمارش برای سلولهای HEK و LMH بترتیب ۱۲ و ۲۰ ساعت پس از ترانسفکشن و یا استفاده از میکروسکوپ فلورسنس صورت گرفت. هر ستون نماینده متوسط تعداد سلولهای شمارش شده در ۱۰ میدان میکروسکوپی است (این میداين در بزرگنمایی 100x ایجاد شدند) که با استفاده از نرم افزار Grid Cell Counter و با پیروی از دستورالعمل وبسایت محاسبه گردید. تفاوت آماری بین دو گروه با علامت *** (P < 0.001) نشان داده شده است ب- سلولها با رقتهای سریالی از استوک ویروسی آلوده شدند. شمارش سلولی برای سلولهای HEK و LMH بترتیب ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از ترانسدوکشن صورت گرفت. هر ستون نماینده متوسط تعداد سلولهای شمارش شده در ۱۰ میدان میکروسکوپی (بزرگنمایی 100x) میباشد که با استفاده از نرم افزار Grid Cell Counter و با پیروی از دستورالعمل وبسایت محاسبه گردید. علائم موجود در دیاگرام حاصل آنالیز آماری داده ها بشرح زیر است: علامت * (P < 0.01) و یا ** (P < 0.001) برای تفاوتهای آماری بین دو رده سلولی در هر گروه از داده ها، علامت ## (P < 0.01) برای تفاوتهای آماری بین سلولهای یک رده که با رقتهای یک دهم و یک پنجم از استوک ویروس تیمار شده اند، علامت ### (P < 0.001) برای تفاوتهای آماری بین سلولهای یک رده که با رقتهای یک پنجاهم و یک بیستم و یک دهم از استوک ویروس تیمار شده اند.

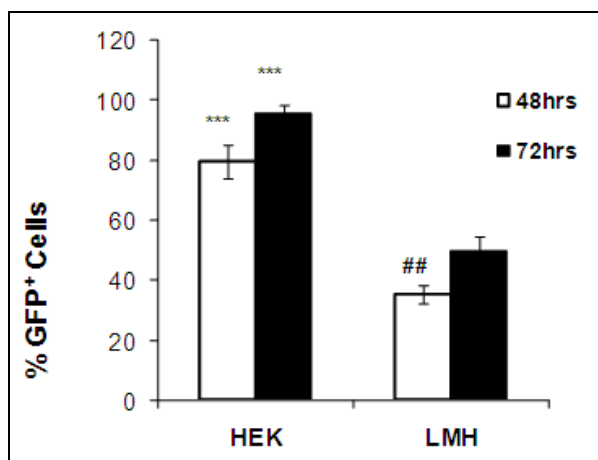
گردید: تعداد سلولهای HEK و LMH که GFP⁺ بودند بترتیب به ۲ ± ۳۶ و ۲ ± ۲۶ کاهش پیدا کرد و این کاهش از نظر آماری برای هر دو رده سلولی بسیار معنی‌دار بود (P<0.01).

مقایسه سلولهای بین دو رده مختلف در هر ۳ گروه از رقت‌های ویروسی (یعنی یک بیستم، یک دهم و یک پنجم) نیز نشانگر آن است که تعداد سلولهای GFP⁺ از رده HEK به مراتب بیشتر از رده LMH می‌باشد بطوریکه این تفاوت از نظر آماری در هر ۳ گروه مزبور بسیار معنی‌دار بود (P<0.01) (نمودار ۱-ب).

بررسی سلولهایی که حجم یک پنجم (یعنی ۱۰۰ میکرولیتر از کل ۵۰۰ میکرولیتر استوک ویروسی) و حجم‌های بالاتر استوک ویروس را دریافت کرده بودند نشان داد که مصرف بیش از حد مقدار ویروس باعث کاهش محسوس رشد و بقاء سلولها می‌شد. به این علت و همانطور که در نمودار ۱-ب مشخص است تعداد سلولهای GFP⁺ که با این حجم از استوک ویروسی تیمار شده بودند به مراتب کمتر از تعداد سلولهایی بودند که حجم‌های پائین تر ویروس را دریافت کرده بودند. به این ترتیب روند افزایش سلولهای GFP⁺ با افزایش بیشتر غلظت ویروسی نه تنها متوقف شد بلکه در حضور یک پنجم از استوک ویروسی معکوس



شکل ۱: ترانسفکشن سلولهای HEK و LMH: تصویر فاز کنتراست و فلورسنت از سلولهای ترانسفکت شده. این تصاویر نمایانگر بیان ژن GFP در هر دو رده سلولی میباشد. بزرگنمایی: 100x

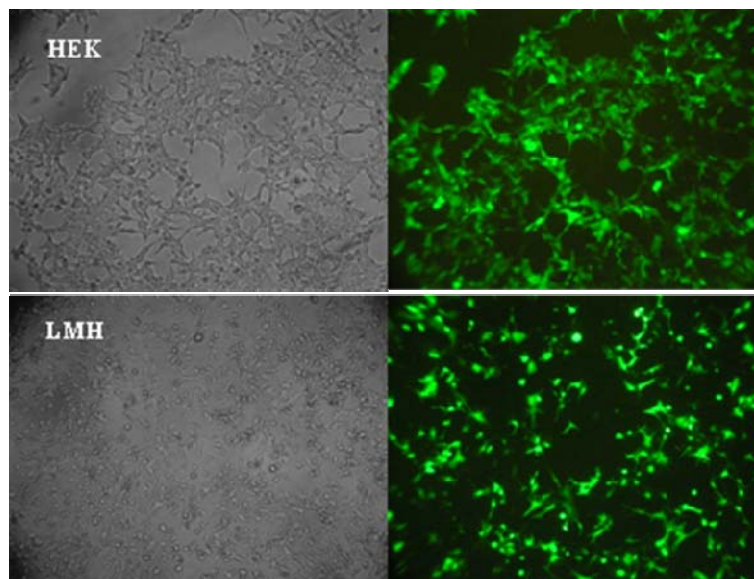


نمودار ۲: شمارش سلول های GFP⁺ در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن هر ستون نماینده متوسط تعداد سلولهای شمارش شده در ۱۰ میدان میکروسکوپی میباشد که با استفاده از نرم افزار Grid Cell Counter و با پیروی از دستورالعمل موجود در وبسایت آن محاسبه گردید. تفاوت آماری بین دو رده سلولی در هر مقطع زمانی با علامت ## (P < 0.01) و برای تفاوتهای آماری بین ۴۸ و ۷۲ ساعت در داخل یک رده سلولی با علامت *** (P < 0.001)

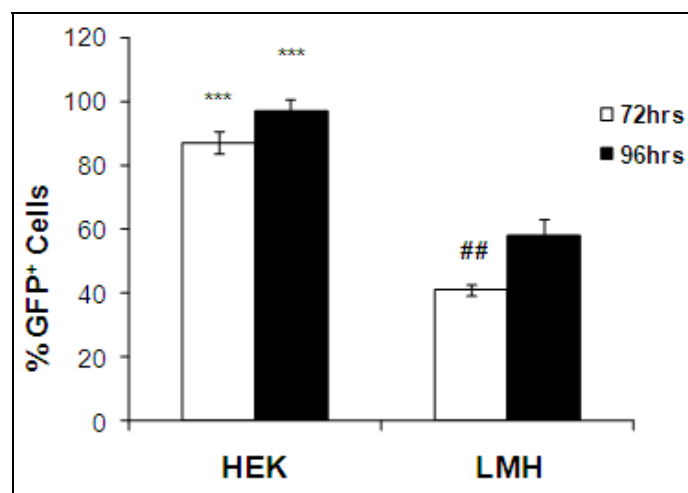
شد (شکل ۲). بدین منظور حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی مشخص برای هر نمونه چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۳ درصد سلولهای مثبت را در این بررسی نشان می‌دهد. بر این اساس، در ۷۲ ساعت میزان سلولهای HEK و LMH به ترتیب 87 ± 4 درصد و 41 ± 3 درصد و در ۹۶ ساعت به ترتیب 97 ± 4 درصد و 58 ± 5 درصد بوده است. آنالیز آماری این داده‌ها نشان داد که تفاوت بسیار معنی داری بین دو رده سلولی در هر دو مرحله ترانسفکشن و ترانسدوکشن وجود دارد ($P < 0.001$).

مقایسه ترانسداکشن سلول‌های HEK و LMH

با توجه به اینکه حجم‌های بالای استوک ویروسی، رشد سلولها را تحت تاثیر قرار داد ما برای ایجاد ترانسدوکشن حداکثری، سلولها را با یک دهم از استوک اولیه ویروسی (یعنی ۵۰ میکرولیتر از کل ۵۰۰ میکرولیتر) آلوده شدند. ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت بعد از آلوده کردن سلول‌ها با ویروس نو ترکیب این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی و برای آنالیز و محاسبه میزان بیان از بخشهای مختلف چاهک کشت سلول عکسبرداری



شکل ۲: ترانسدوکشن سلولهای HEK و LMH: تصویر فاز کنتراست و فلورسنت از سلولهای آلوده شده با ویروس. این تصاویر نمایانگر بیان ژن GFP در هر دو رده سلولی میباشد. بزرگنمایی: 100x

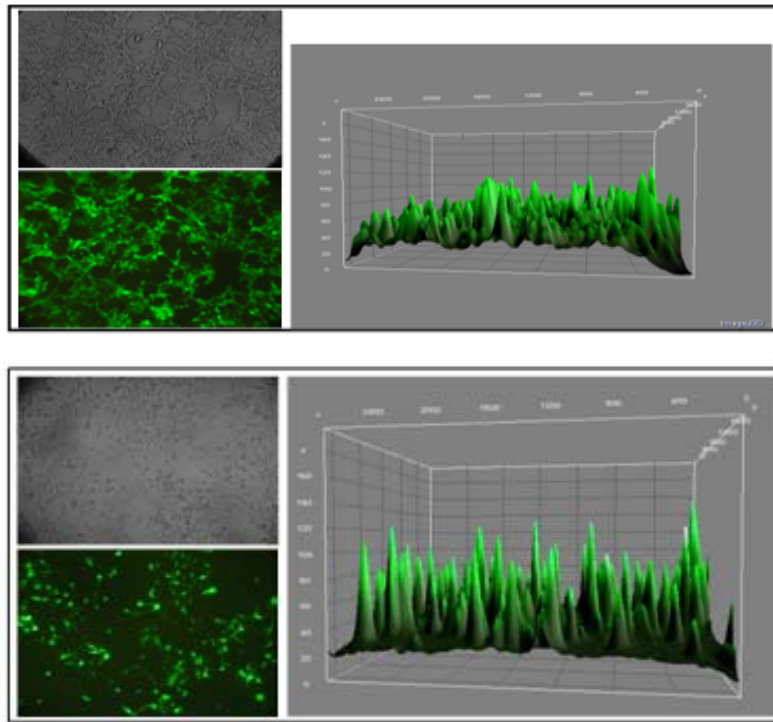


نمودار ۳: شمارش سلولهای GFP⁺ در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسدوکشن. سلولها با رقت یک دهم از استوک اولیه ویروسی آلوده شدند. هر ستون نماینده متوسط تعداد سلولهای شمارش شده در ۱۰ میدان میکروسکوپی میباشد که با استفاده از نرم افزار Grid Cell Counter و با پیروی از دستورالعمل موجود در وبسایت آن محاسبه گردید. تفاوت آماری بین دو رده سلولی در هر مقطع زمانی با علامت *** ($P < 0.001$) و برای تفاوتهای آماری بین ۷۲ و ۹۶ ساعت در داخل یک رده سلولی با علامت ## ($P < 0.01$) نشان داده شده است.

HEK 74 ± 3 درصد و در رده LMH 89 ± 7 درصد می‌باشد. آنالیز آماری این داده‌ها نشان داد که سلولهای LMH نسبت به سلولهای HEK قادرند پروتئین ترانسژن را در سطح نسبتاً بالاتری بیان نمایند و این اختلاف شدت بیان بین دو رده سلولی معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار ۴).

مقایسه شدت بیان GFP در سلول‌های رده HEK-293T و LMH

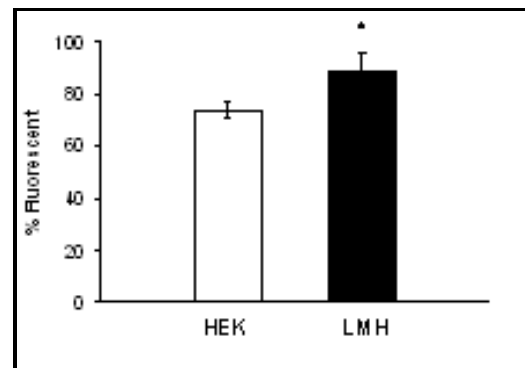
شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی سلولها پس از ترانسدوکشن و نیز دیاگرام حاصل از آنالیز آنها با ImageJ را نشان می‌دهد. مطابق آنچه در بخش روشها گفته شد تصاویر فلورسنتی از ۹ چاهک از رده سلولی آنالیز شد و نشان داد که متوسط شدت بیان در رده



شکل ۳: شدت بیان در سلولهای HEK پس از ترانسدوکشن: این تصاویر سلولی ۷۲ ساعت پس از ترانسدوکشن با رقت یک دهم از استوک ویروسی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت تهیه شده اند (بزرگنمایی: 100x). سپس با قرار دادن تصاویر در نرم افزار ImageJ کل فیلد هر تصویر انتخاب شده و میزان Pixelهای موجود که نمایانگر شدت بیان میباشد محاسبه گردید که حاصل آن بصورت دیاگرام نشان داده می‌شود.

بحث

در این مطالعه، پتانسیل سلولهای کبدی جوجه را در جذب DNA خارجی، در پذیرفتن لنتی ویروس نوترکیب و الحاق و بیان ترانسژن آن بررسی شد. سلولهای انسانی HEK بعنوان سلولهای استاندارد برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب با منشاء HIV-1 بطور وسیع بکار برده می‌شود. در مقایسه با آنها، سلولهای LMH توانایی ضعیف تری برای ترانسفکشن شدن و نیز آلودگی با لنتی ویروس را نشان دادند. در عین حال تعداد بیشتری از سلولهای LMH را نسبت به مرحله ترانسفکشن بیان کردند. جالب آنکه شدت بیان در سلولهای LMH نسبت به سلولهای HEK در هر مرحله بیشتر بود. نهایتاً ما توانستیم قدرت سلولهای جوجه را در تولید و بسته بندی لنتی ویروسهای نوترکیب به اثبات برسانیم.



نمودار ۴: آنالیز میزان فلورسنت ناشی از بیان GFP توسط سلولهای HEK و LMH ۷۲ ساعت پس از ترانسدوکشن ویروسی. هر ستون نماینده متوسط شدت بیان حاصل از ۹ میدان میکروسکوپی (یک میدان فراگیر از هر چاهک) میباشد که با آنالیز آماری داده های شکل ۳-الف و ۳-ب بدست آمد. تفاوتهای آماری بین دو رده سلولی با علامت * مشخص شده است. ($P < 0.05$)

و ژن هدف با این نسبت وارد ژنوم سلول‌ها شده است. این نسبت برای سلول‌های HEK حدود ۹۶ درصد بود. قابلیت ترانسداکشن سلول‌های LMH نسبت به سلول‌های HEK293T حدود ۶۰ درصد برآورد شد. با انجام مطالعات بیشتر با پروموتورهای مختلف، ترکیبات شیمیایی مثل پولی برن و غیره میزان ترانسدوکشن را بالا می‌برد. بنابراین می‌توان درصد مزبور را بالاتر برد تا میزان بیان نیز افزایش یابد.

آزمایشات ما همچنین نشان داد که با وجود قابلیت پائین تر سلول‌های LMH در جذب DNA خارجی، شدت بیان ترانسژن در این سلول‌ها به مراتب بیشتر از شدت بیان در سلول‌های HEK بوده است. تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای راجع به شدت بیان ترانسژن در سلول‌های LMH و مکانیسم‌های درون سلولی و مولکولی آن گزارش نشده است. بنابراین جوانب مختلف این موضوع از دیدگاه سلولی و مولکولی قابل بررسی است. از جمله تفاوت‌های دو رده سلولی در تنظیم بیان ژن و فاکتورهای رونویسی موجود بایستی مطالعه و روشن شود. با این وصف، شاید بالا بودن شدت بیان بتواند ضعف این سلول‌ها در جذب DNA خارجی را جبران نماید. به این ترتیب فزونی شدت بیان با اهداف متعددی از نظر استفاده از سلول‌های جوجه و بخصوص تخم مرغ بعنوان بیوراکتور هم راستا خواهد بود.

نتیجه گیری

در مجموع مطالعه حاضر قابلیت ترانسفکشن و ترانسدوکشن ویروسی دو رده سلولی HEK و LMH را با همدیگر مقایسه کرده است. نتایج حاصله نشان می‌دهد که قدرت جذب سلول‌های LMH نسبت به سلول‌های HEK در جذب DNA خارجی بطور معنی‌دار پایین می‌باشد. در عین حال سلول‌های LMH از توانایی بالایی در بیان ژن‌های خارجی برخوردارند، موضوعی که بایستی در سطح مولکولی بررسی گردد. نتایج ما می‌تواند در انتقال ژن به سلول‌های جوجه با اهداف مختلف تشخیصی و تولیدی در کنار مطالعات بنیادی موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری تکنیکی آقای یاسین پناهی و خانم سحر شجاعی سپاسگزاری می‌شود.

سلول‌های HEK-293T با برخورداری از آنتی ژن T متعلق به ویروس SV40 و در نتیجه مهار فعالیت پروتئین ضد توموری pRb (۲۴) از توانایی بالایی برای بیان اجزاء ویروسی و بسته بندی ویروس‌های کامل برخوردار می‌باشند. بنابراین سلول‌های مزبور به سهولت ژن‌های خارجی را جذب می‌کنند و درصد بالایی سلول‌های GFP⁺ در بین جمعیت HEK نسبت به جمعیت LMH غیر منتظره نیست بخصوص که سازه‌های لنتی ویروسی از ویروس انسانی HIV-1 منشاء می‌گیرند.

عوامل مختلفی مانند نوع و سلامت سلول، نحوه رشد و پاساژ سلولی، کمیت و کیفیت DNA پلاسمیدی مورد استفاده، ترکیبات مورد استفاده برای ترانسفکشن، و نهایتاً تیترا ویروسی و اندازه توالی ترانسژن در جذب و الحاق ترانسژن در ژنوم سلول هدف موثر می‌باشد. نتایج آزمایشات ما در مراحل ابتدایی ترانسفکشن نشان می‌دهد که قابلیت ترانسفکشن سلول‌های LMH حدود ۴۶٪ سلول‌های استاندارد HEK می‌باشد که البته این نسبت در ۷۲ ساعت بعد به ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد. یکی از دلایل مهم قابلیت ترانسفکشن پایین سلول‌های LMH می‌تواند کوچکتر بودن اندازه این سلول‌ها باشد به طوری که اندازه این سلول‌ها حدود یک سوم سلول‌های HEK است که این موضوع می‌تواند باعث تماس کمتر سطح سلول با رسوبات DNA - فسفات کلسیم شده و ورود سازه ژنی به داخل سیتوپلاسم سلول کمتر گردد. این در حالیست که سلول‌های HEK علاوه بر اندازه بزرگتر و رشد سریعتر، دارای چسبندگی زیادی بوده و سلول در حالت چسبیده به کف فلاسک پهن شده و دارای سطح تماس زیادی می‌باشند که این موضوع می‌تواند باعث افزایش ورود سازه‌های ژنی طی مکانیسم فاگوسیتوزی به درون سلول باشد. سلول‌های LMH تمایل زیادی به گروه بندی در کف فلاسک و پلیت کشت دارند و به دست آوردن یک کشت یکنواخت از سلول‌های LMH بسیار دشوار می‌باشد. بدین علت تجمع غیر همگون این سلول‌ها در نواحی مختلف فلاسک و پلیت می‌تواند کارایی ترانسفکشن را نسبت به سلول‌های HEK کاهش دهد. از سوی دیگر قابلیت ترانسدوکشن سلول‌ها با ویروس‌های نوترکیب، در کنار ویژگی‌های خود سلول و نوع پروموتور بکار رفته به عواملی همچون نوع ویروس، ساختار پوششی آن و نحوه ترانسدوکشن بستگی دارد. نتایج بدست آمده در سطح ترانسدوکشن نشان می‌دهد که از نظر تعداد سلول‌های GFP⁺، سلول‌های LMH حدود ۵۸ درصد قابلیت ترانسدوکشن داشته

منابع

1. Rhodes MB, Azari PR, Feeney RE. Analysis, fractionation and purification of egg white proteins with cellulose-cation exchanger. *J Biol Chem.* 1958; 230(1): 399-408.
2. Guérin-Dubiard C, Pasco M, Hietanen A, Quiros del Bosque A, Nau F, Croguennec T. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *Chromatogr A.* 2005; 1090(1-20):58-67.
3. Tankrathok A, Daduang S, Patramanon R, Araki T, et al. Purification process for the preparation and characterizations of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, and ovomucoid. *Prep Biochem Biotechnol.* 2009; 39(4):380-99.
4. Houdebine LM. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol.* 2007; 360:163-202. Review.
5. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009; 32(2):107-21.
6. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(9):1117-25. Review.
7. Goldman IL, Kadulin SG, Razin SV. Transgenic animals in medicine: integration and expression of foreign genes, theoretical and applied aspects. *Med Sci Monit.* 2004; 10(11):RA274-85.
8. Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, et al. Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures. *Poult Sci.* 2002a; 81(2):202-12.
9. Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, et al. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol.* 2002b; 20(4):396-9.
10. Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today.* 2005; 10(3):191-6.
11. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology.* 2000; 10(5):477-86.
12. Harvey AJ, Ivarie R. Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poult Sci.* 2003; 82(6):927-30.
13. Twyman RM. *Gene Transfer to Animal Cells (Advanced Methods).* UK. BIOS Scientific Publishers. 2005; 28-41.
14. Houdebine LM. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol.* 2002; 98 (2-3): 145-160.
15. Blomer U., Ganser A and Scherr M. Invasive drug delivery. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 513: 431-451.
16. Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. Established and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.* 1987; 47: 4460-4.
17. Binder R, MacDonald CC, Burch JB, Lazier CB, et al. Expression of endogenous and transfected apolipoprotein II and vitellogenin II genes in an estrogen responsive chicken liver cell line. *Mol Endocrinol.* 1990; 4: 201 -208.
18. SENSEL MG, BINDER R, LAZIER CB, WILLIAMS DL. Reactivation of apolipoprotein II gene transcription by cycloheximide reveals two steps in the deactivation of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 1733-1742.
19. Pluta K, Luce ML, Bao L, Agha-Mohammadi S, Reiser J. Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med.* 2005; 7:803-817.
20. Gardaneh M, Gholami M and Maghsoudi M. Synergy between glutathione peroxidase-1 and astrocytic growth Factors suppresses free radical generation and protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine. *Rejuven Res.* 2011; Jan 11. [Epub ahead of print]
21. [Rahimi A, Gardaneh M, Alipakah M, Panahi Y. Recombinant lentivirus-mediated gene transfer into chicken liver cell line LMH. *Modares Biological Science and Technology.* 2010; 1: 53-60]. Persian.
22. <http://www.dnabaser.com/download/Cell counter/grid-cell-counter.html>
23. <http://rsbweb.nih.gov/ij>
24. Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R; Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977; 36 (1): 59-72.

Transfectability and Transducibility of chicken liver cell line LMH compared to human cell line HEK-293T

Rahimi ShamAbadi A, M.Sc. Student¹, Gardaneh M, Ph.D.^{2*},
Alipanah M, Ph.D.³, Gharib A, M.Sc. Student⁴

1-Postgraduate Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, and Faculty of Agriculture, Zabol University, Pardis-e-Daneshgah, Zabol, Sistan-Baloochestan.

2- Assistant Professor in Molecular Genetics, Dept. of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran

3- Assistant Professor in Animal Genetics, Faculty of Agriculture, Zabol University, Sistan-Baloochestan,

4- Postgraduate Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, and Pardis-e-Kish, University of Tehran, Kish Island.

* Email corresponding author: mossa65@nigeb.ac.ir

Received: 8 Feb. 2011

Accepted: 20 Apr. 2011

Abstract

Aim: The aim of this study is to examine the efficiency of DNA absorption and gene transfection to chicken hepatoma cells line LMH at both transfection and transduction levels using recombinant lentiviruses. Then transgene expression level was studied.

Material and Methods: The cells were cultivated in 96-well plates for viral transfection or transduction and then studied using fluorescent microscope in different stages. Green Fluorescent Protein-positive (GFP) cells counted by Grid Cell Counter software and transgene expression level calculated using ImageJ software. Data analyzed using SPSS.

Results: GFP gene expression began 6 and 9 hours after transfection in HEK and LMH cells, respectively. These times were increased, respectively, to 22 and 36 hours post-transduction. Counting GFP⁺ cells 48 hours post-transfection showed that HEK and LMH cells have received and expressed 40% and 35% of DNA. These levels increased to 95% and 48% respectively in 72 hours. Also counting HEK⁺ cells at 72 and 96 hours viral post-transduction confirmed the similar pattern of receiving DNA by both HEK and LMH cells. Therefore, analyzing of GFP expression level showed that HEK and LMH classes expressed GFP in 74% and 89% ($P < 0.01$ significant).

Conclusion: Overall, our results indicated that HEK cells have higher potential to absorption of foreign genes whereas the intensity of expression is higher in LMH cells.

Keywords: Chicken, LMH, Lentivirus, Transfection, Transduction.