

## ساخت لنتی ویروس های نوترکیب ناقل ژن DJ-1 و انتقال آن ها به سلول های انسانی

عمران اسماعیل زاده<sup>۱</sup> M.Sc.، موسی گردانه<sup>۱\*</sup> Ph.D.

- گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری  
\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [mossa65@nigeb.ac.ir](mailto:mossa65@nigeb.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲

### چکیده

**هدف:** اهداف این مطالعه ساب کلونینگ ژن DJ-1 (PARK7) به درون وکتور انتقال لنتی ویروسی، تولید لنتی ویروس های نوترکیب و آلوده سازی سلول های هدف با این ویروس ها می باشند.

**مواد و روش ها:** ژن DJ1 با استفاده از آنزیم های محدود کننده EcoR1 و Xho1 از وکتور pcDNA-DJ1 به دست آمد. وکتور انتقالی لنتی ویروس به صورت همزمان توسط آنزیم های محدود کننده EcoR1 و Sal1 بریده شد. ژن DJ1 توسط آنزیم DNA لیگاز T4 به داخل وکتور ترانسفر و بالادست ژن DJ1 وارد شد، به طوریکه توالی DJ1-IRES-Jred در پایین دست و تحت کنترل پروموتور CMV قرار گرفت. برای تولید لنتی ویروس های نوترکیب، وکتور ساخته شده به همراه دو وکتور بسته بندی و پوشش ویروس به طور همزمان به درون سلول های HEK (Human Embryonic Kidney) انتقال داده شدند. ویروس های ساخته شده برای آلوده سازی سلول های هدف استفاده شدند.

**نتایج:** برای اطمینان از درستی ساب کلونینگ از تست های آنزیمی و PCR استفاده شد. همچنین برای مشاهده بیان ژن Jred که نشان دهنده موفقیت ما در انتقال ژن می باشد، از میکروسکوپ فلورسانس استفاده شد. سپس برای مشاهده افزایش بیان ژن DJ1 در سلول های آلوده شده نسبت به سلول های طبیعی، از تست RT-PCR استفاده شد.

**نتیجه گیری:** این مطالعه کاربرد موفقیت آمیز ناقل های لنتی ویروسی در انتقال ژن به سلول های یوکاریوتی را نشان می دهد و روشن می سازد که این ناقل ها می توانند در درمان بیماری های سیستم عصبی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژگان کلیدی:** کلونینگ، DJ1، لنتی ویروس.

## مقدمه

کد کننده DJ-1 بود. با انتقال این سازه به سلول‌های مولد ویروس، لنتی ویروس‌های نو ترکیب ساخته شد که پس از آلوده کردن سلول‌های هدف قادر به هدایت بیان چشمگیر DJ-1 در این سلول‌ها بود. این سازه لنتی ویروسی اکنون می‌تواند به‌عنوان ابزاری مهم برای مطالعات عمل‌کردی DJ-1 به‌کار گرفته شود.

## مواد و روشها

**تهیه پلاسمیدهای ویروسی:** ناقل‌های ویروسی شامل ناقل بسته بندی ( $\Delta\Delta\Delta pCD/NL-BH^*$ ) ناقل پوششی (LTR-G) و ناقل ترانسفر (PLV-Jred) با استفاده از کیت Maxiprep از کپازن خالص سازی شدند (۱۴).

## برش ناقل انتقالی برای وارد سازی قطعه هدف

**(Digestion):** برای وارد کردن ژن DJ-1 به درون ناقل انتقالی و بالادست ژن Jred، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های EcoR1 و Sal1، پلاسمید ترانسفر لنتی ویروس را برش داده شد تا با از دست دادن قطعات اضافی به‌صورت یک پلاسمید خطی درآید. به این صورت که طبق دستورالعمل، پلاسمید مورد نظر همراه با آنزیم‌های مذکور و بافرهای مخصوص آنها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه کردیم. محصول هضم آنزیمی را با استفاده از ژل آگاروز، الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج از ژل (سیناژن) بازیابی گردید. به‌طور همزمان ژن DJ-1 با استفاده از دو آنزیم EcoR1 و Xho1 از داخل پلاسمید pCDNA-DJ1 خارج و به‌طرز مشابه از روی ژل آگاروز استخراج شد.

## وارد سازی ژن DJ-1 به درون ناقل انتقالی (Ligation):

با توجه به سازگار بودن انتهای اسپسبند حاصل از برش با آنزیم‌های Sal1 و Xho1، محصول این دو هضم آنزیمی به‌طور مستقیم و با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز و طی یک واکنش لیگاسیون بهم پیوند شد. محصول واکنش با ترانسفورماسیون به‌روش شوک حرارتی به باکتری‌های Escherichia coli Top10 مستعد شده منتقل گردید. کولونی‌های حاصل از رشد این باکتری‌ها به‌طور تصادفی مورد غربالگری به‌روش Cracking قرار گرفت. به این‌صورت که باکتری‌ها طبق پروتکل به‌صورت نسبی هضم شده و محلول رویی حاوی DNA روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و سپس از نمونه‌های مشکوک DNA پلاسمیدی استخراج شده و روی آنها تست آنزیمی و PCR انجام شد و سرانجام نمونه مورد نظر شناسایی و انتخاب گردید.

بیماری پارکینسون در زمره بیماری‌های زوال نورونی است که با وجود ناشناخته بودن علت یا علل آن، بسیاری از زوایای تاریک مرتبط با زیست‌شناسی مولکولی این بیماری اکنون آشکار شده و پشتوانه قابل اطمینانی برای درمان‌های نوین پارکینسون به‌وجود آورده است. مطالعه روی برخی بیماران که شیوع خانوادگی پارکینسون در آنها برجسته بوده است باعث شناسایی تعدادی از ژن‌های مهم و دخیل در شکل‌گیری این بیماری شده است. ژن PARK7 یا DJ1 سومین ژن شناخته شده مرتبط با بیماری پارکینسون می‌باشد که جهش در آن باعث فرم اتوزومال مغلوب از بیماری پارکینسون می‌شود و در ابتدا به‌عنوان یک انکوژن شناخته شد (۱). همگام با آن مشخص شد که این ژن پروتئینی می‌سازد که در باروری رت‌های نر و دیگر پستانداران نقش دارد (۳ و ۲). با مشخص شدن نقش این ژن در نوعی از بیماری خانوادگی پارکینسون که به‌صورت اتوزومی مغلوب انتقال می‌یابد، مطالعه بر روی آن افزایش یافت (۴). در بیماری پارکینسون، این ژن در پاسخ به استرس اکسیداتیو نقش دارد و جهش‌هایی که باعث از دست رفتن عمل‌کرد این ژن می‌شوند، باعث افزایش میزان این استرس اکسیداتیو می‌گردند (۶، ۵ و ۷). چندین مکانیسم برای عمل‌کرد این ژن در پاسخ به استرس اکسیداتیو گزارش شده است. از جمله اینکه محصول این ژن یک چپرون وابسته به حالت احیا می‌باشد (۸). احتمالاً نقش چپرونی محصول این ژن از تراکم آلفاسینوکلئین در سلول‌ها جلوگیری می‌کند (۸ و ۹). این خصوصیت ژن می‌تواند بسیار مهم باشد. زیرا آلفا سینوکلئین و بویی کوئتین از فراوان‌ترین پروتئین‌هایی هستند که در سیتوپلاسم سلول‌های افراد پارکینسونی وجود دارند (۱۰). از دیگر شیوه‌های فعالیت این ژن می‌توان به نقش این ژن در تنظیم منفی آپوپتوزیس در حالت احیا سلول‌ها اشاره کرد، که احتمالاً از طریق فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt عمل می‌کند (۱۱ و ۱۲). همچنین نقش‌های محافظتی بیشتری نیز برای این ژن گزارش شده است (۱۳).

نقش DJ-1 در پیشگیری از بروز علائم پارکینسون به‌خصوص از نظر حفاظت نورون‌های دوپامین‌ساز در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته است. برای آنکه عمل‌کرد DJ-1 در مقابله با سیگنال‌های مرگ در این دسته نورون‌ها بهتر و بیشتر روشن شود، در مطالعه جاری و به‌عنوان گام نخست، یک سازه لنتی ویروسی ساخته شده که حامل توالی

RNA سلول‌لی با استفاده از کیست مربوطه (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) استخراج شده و پس از اطمینان از سلامت کامل آن در روی ژل، دو میکروگرم از آن برای سنتز cDNA تحت شرایط گزارش شده به کار برده شد (۱۵). ساخت cDNA به کمک ترانسکریپتاز معکوس از (Fermentas, Lithuania) و در حضور هگزامرها راندوم و RNase Inhibitor صورت گرفت. برای تکثیر یک قطعه ۱۸۵ جفت بازی از cDNA مربوط به DJ-1 انسانی، جفت پرایمر زیر بر اساس توالی کد کننده آن به شرح زیر طراحی و سنتز شد.

(NM\_007262.4 GenBank accession no.):

Forward: 5'- CGGGGTGCAGGCTTGTA AAA -3',

Reverse: 5'- ACCACATCACGGCTACTG -3'.

مقادیر یکسان از هر نمونه cDNA برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲ دقیقه دناتوراسیون نمونه‌ها در در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واکنش PCR با ۳۰ سیکل دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ دقیقه و مرحله Annealing در ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و مرحله Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه) به انجام رسید. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۲ درصد آنالیز و تصویر برداری شد. شدت باندهای این تصاویر با استفاده از نرم افزار US-Scan-It Gel Analysis Software (Skill Scientific Inc. Orem, Utah) اندازه گیری گردید.

## نتایج

### بازیابی قطعات DNA مورد نظر:

واکنش Digestion روی ناقل لنتی ویروسی (شکل ۱) و همچنین روی ناقل حاوی ژن DJ-1 (شکل ۲) با موفقیت انجام شد.

### استخراج قطعات مورد نظر از روی ژل آگاروز:

قطعه‌ی حدود ۱۲ کیلو بازی وکتور خطی شده و قطعه‌ی ۸۵۰ جفت بازی DJ-1 با استفاده از کیت استخراج از ژل، از روی ژل آگاروز استخراج شده و به منظور تعیین غلظت، به‌طور همزمان روی ژل آگاروز، الکتروفورز گردیدند (شکل ۳).

### تست کرکینگ:

پس از انجام واکنش Ligation تعدادی از کلونی‌ها به صورت اتفاقی انتخاب شده و روی آن‌ها تست کرکینگ انجام شد و

کشت سلول: سلول‌های HEK-293T به‌عنوان مولد ویروس در محیط FBS+10% DMEM شرکت Gibco در دمای ۳۷ درجه و CO<sub>2</sub> ۵ درصد کشت و پاساژ داده شدند. دو میلیون سلول در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد ۵۰ تا ۶۰ درصد پتری دیش را پر کنند. برای آلوده سازی ویروسی تعداد ۵۰ هزار سلول HEK-293T در پلیت ۲۴ خانه، ۲۴ ساعت قبل از آلوده سازی کشت داده شدند.

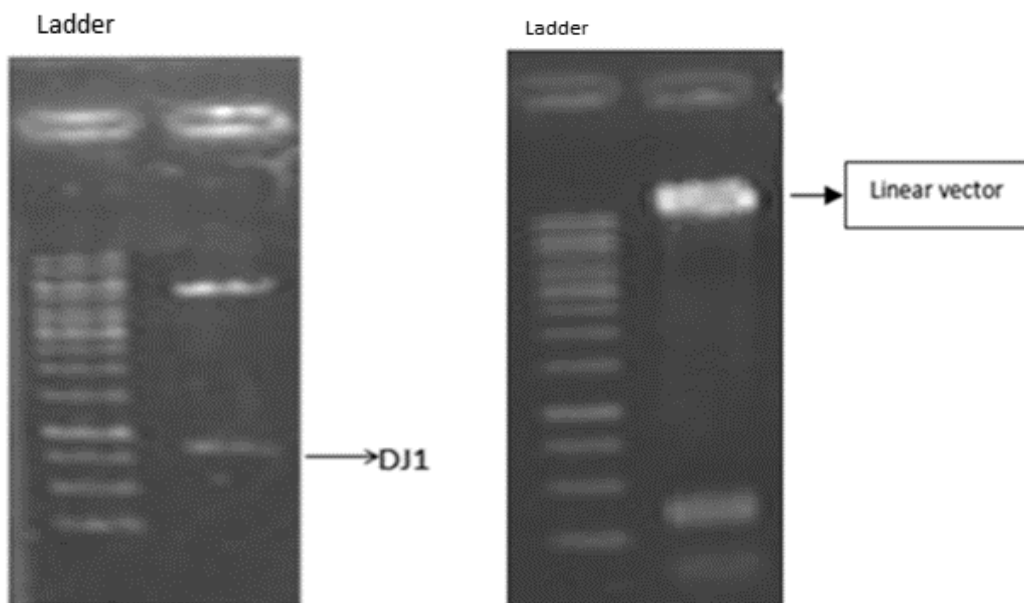
**تولید ویروس:** برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب وفعال، سلول‌های مولد ویروس را همزمان با سه ناقل لنتی ویروسی به مقدار ۱۵ میکروگرم از ناقل ترانسفر و ۱۰ میکروگرم از هریک از ناقلین بسته بندی و غشایی، با روش رسوب DNA-فسفات کلسیم ترانسفکت شد. برای تشکیل این رسوب، DNAهای مذکور همراه با ۵۰ میکرولیتر از کلرید کلسیم ۲/۵ میلی مولار، با آب استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسید و به این محلول در حالی که روی شیکر در حال چرخان بود هم حجم آن HEPES به آرامی اضافه شد. محلول حاصل را ۲۰ دقیقه در زیر هود انکوبه شد تا رسوب مطلوب به دست آید. سپس این رسوب به آرامی و قطره قطره به محیط سلول‌های هدف اضافه گشت. سلول‌ها به مدت ۸ ساعت انکوبه شدند و سپس محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. پس از این مراحل سلول‌ها تا زمان تولید ویروس و رها سازی آن به محیط کشت، در شرایط انکوباتوری ذکر شده نگهداری شدند.

### تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلول‌های هدف: محیط کشت

سلول‌های ترانسفکت شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس محیط فیلتر شده به درون ستون‌های آمیکون MW ۱۰۰ (شرکت کیاژن) ریخته و مدت ۱۰ دقیقه در دور 4000 rpm سانتریفیوژ گشت. محلول باقیمانده پشت فیلتر که تغلیظ شده و پر از ذرات ویریونی بود جمع آوری شد. حجم‌های مختلف از این محلول برای آلوده سازی سلول‌های هدف استفاده شد. سپس سلول‌ها در شرایط انکوباتوری ذکر شده قرار داده شدند تا بیان ژن Jred موجود در ناقل انتقالی، در زیر میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شود. پس از این مرحله با استفاده از تکنیک RT-PCR از افزایش بیان ترانسژن DJ-1 اطمینان حاصل گردید.

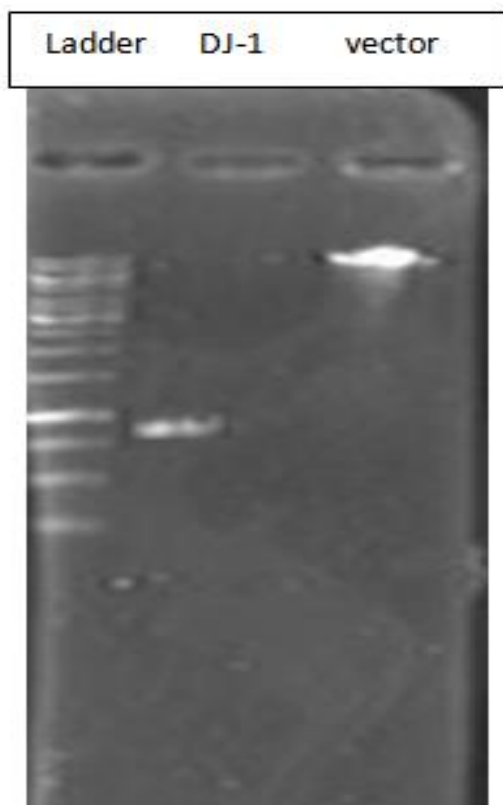
**استخراج RNA و آزمایش RT-PCR:** همان‌طور که قبلا گزارش کرده ایم، ۹۶ ساعت پس از ترانسدوکشن سلولی، کل

نمونه‌هایی که روی ژل کمتر از بقیه حرکت کرده بودند انتخاب گردید (شکل ۴).

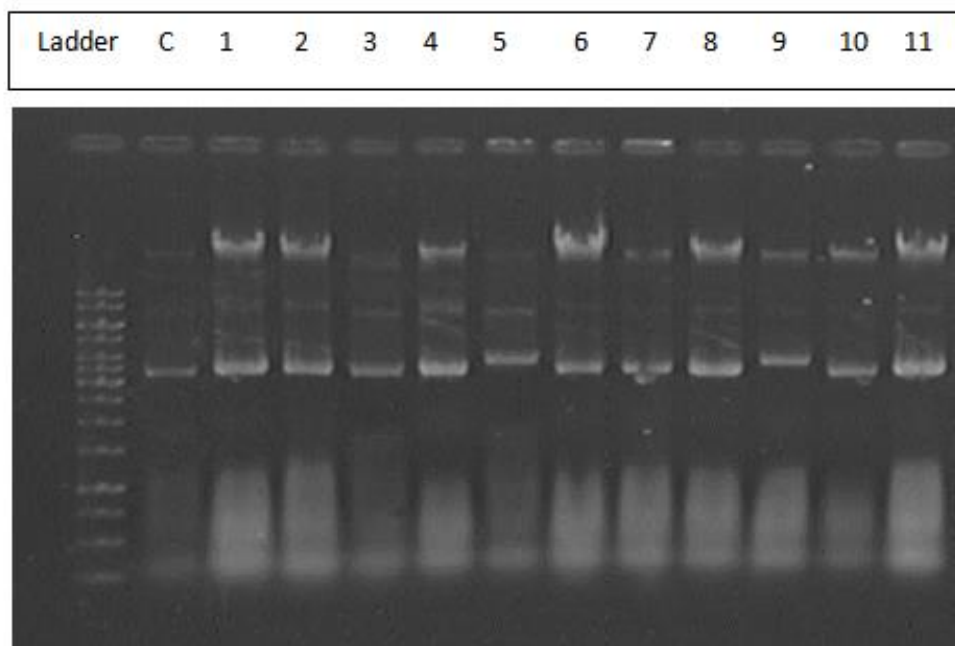


شکل ۲: برش ناقل *pcDNA-DJ1* و خروج ژن *DJ1*

شکل ۱: خطی شدن ناقل لنتی ویروسی *pLV-Jred*



شکل ۳: بازیابی قطعات از ژل



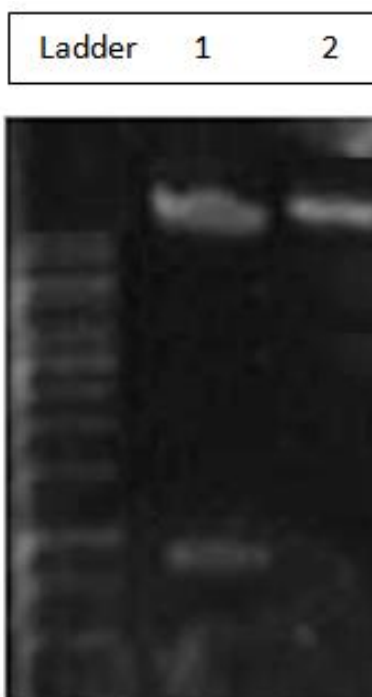
شکل ۴: تست کرکینگ

#### تست PCR

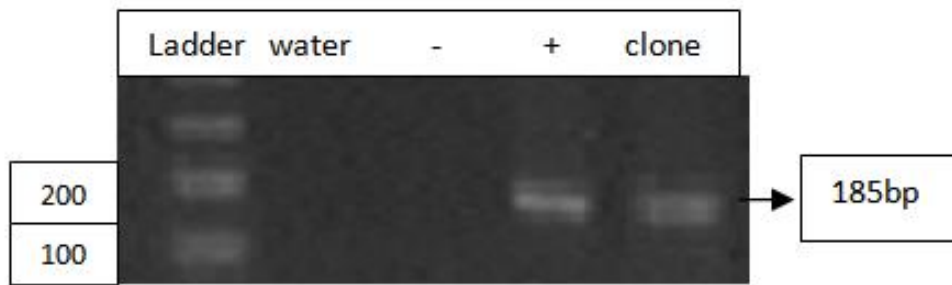
برای اطمینان کامل از درستی کلون به دست آمده، با استفاده از پرایمرهای موجود، برای نمونه مثبت واکنش PCR انجام گردید و نتیجه‌ی آن نشان دهنده صحت این کلونی بود (شکل ۶).

#### تست Digestion

به منظور اطمینان از صحت نمونه‌های انتخاب شده، این نمونه‌ها با آنزیم‌های EcoR1 و Sal1 بریده شدند که در یکی از دو نمونه، قطعات به دست آمده نشان از صحت کلنی‌ها در این مرحله داشت (شکل ۵).



شکل ۵: تست آنزیمی کلون مورد نظر و به دست آمدن قطعات مورد انتظار



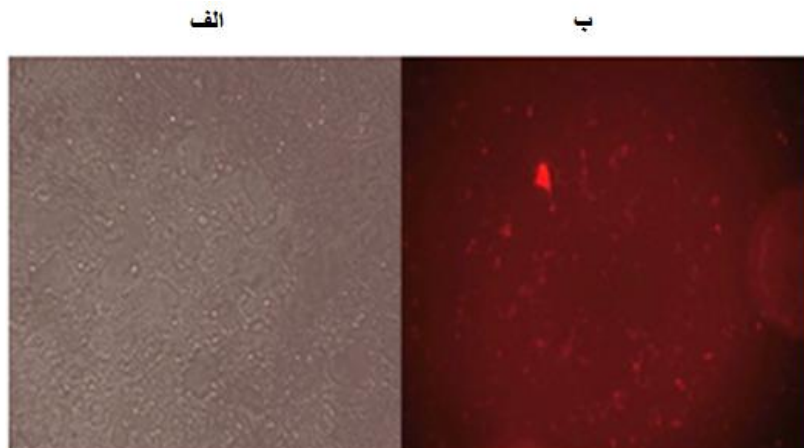
شکل ۶: واکنش PCR بر روی نمونه مثبت و نمونه مورد نظر برای ژن DJ1

ترانسداکشن سلول‌های هدف و بیان ژن گزارشگر:

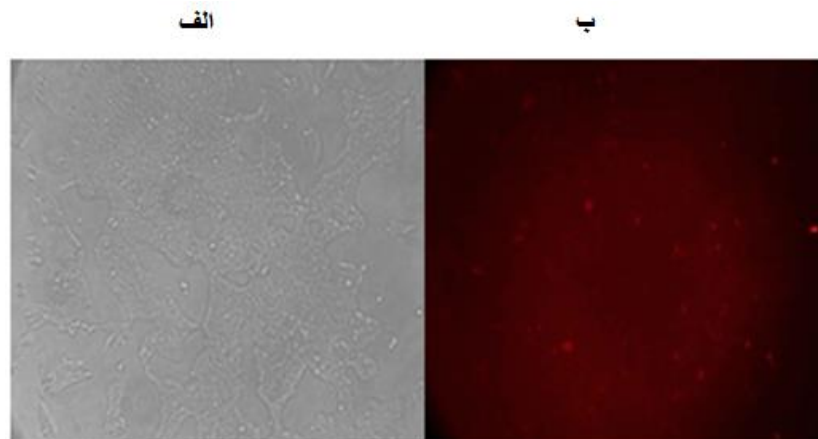
حدود ۳۶ ساعت پس از افزودن استوک ویروسی به سلول‌های هدف اولین نشانه‌های بیان Jred با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شد و موفقیت آمیز بودن ترانسداکشن را به اثبات رساند. بیان Jred در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر خود رسید (شکل ۸).

موفقیت مرحله ترانسفکشن:

مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس در فواصل زمانی متوالی پس از ترانسفکشن، آغاز بیان ژن Jred را در سلول‌های HEK-293T، ۹ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد و در ساعات بعدی بیان این ژن تشدید گردید (شکل ۷).



شکل ۷: بیان ژن Jred در زیر میکروسکوپ فلورسنس. الف) سلول‌های HEK-293T قبل از ترانسفکشن، ب) سلول‌های HEK-293T، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن. (بزرگنمایی: ۱۰۰×)

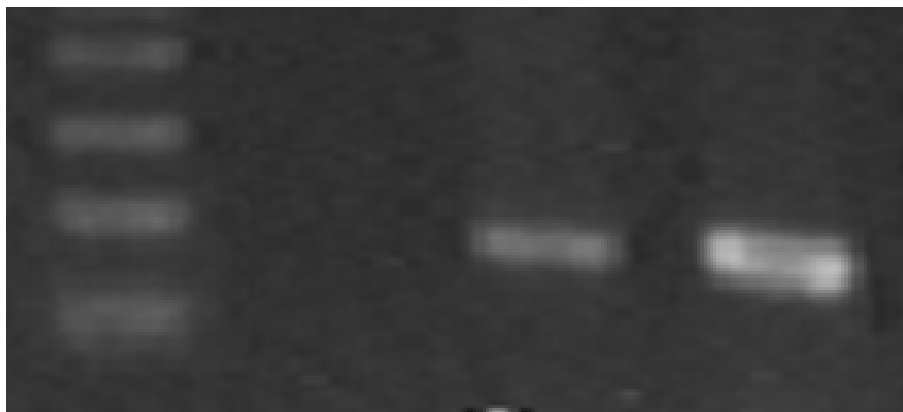


شکل ۸: بیان ژن Jred در زیر میکروسکوپ فلورسنس. الف) سلول‌های HEK-293T قبل از ترانسداکشن، ب) سلول‌های HEK293T، ۷۲ ساعت پس از ترانسداکشن. (بزرگنمایی: ۲۰۰×)

## افزایش بیان ژن DJ-1:

میزان بیان ژن DJ-1 قبل و بعد از ترانسداکسیون مشاهده گردید (شکل ۹). این آزمایشات نشان داد که میزان بیان DJ-1 در سلول‌های آلوده شده به ویروس pLV-DJ-1 نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافته است.

یک هفته پس از آلوده شدن سلول‌های HEK-293T با ویروس‌های هدف و اطمینان از بیان ترانسژن گزارشگر، RNA این سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از تکنیک RT-PCR



شکل ۹: تصویر ژل الکتروفورز از واکنش RT-PCR بر روی ژن DJ-1

ژن‌های غیر ضروری و بیماری‌زای ویروسی حذف شده و دارای نقص در سیستم همانند سازی می‌باشند. حاملین لنتی ویروسی نسل سوم از ۴ حامل مجزای لنتی ویروسی تشکیل شده‌اند که یکی از آنها حامل انتقال و بقیه حاملین کمکی برای بسته بندی لنتی ویروس‌ها می‌باشند. به دلیل عدم وجود همولوژی بین این ۴ حامل، امکان نوترکیبی و قرار گرفتن ژن‌های لنتی ویروسی در مجاور هم کاهش یافته و ایمنی آنها افزایش پیدا کرده است (۱۹). یکی از مهم‌ترین معایب حاملین لنتی ویروسی، ورود اتفاقی آنها به داخل ژنوم میزبان و احتمال ایجاد جهش‌های زایی دخیلی آنهاست (۲۰). در این مطالعه ما توانستیم لنتی ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن DJ1 را با موفقیت تولید کنیم که می‌توانند در مطالعات بعدی به منظور بررسی افزایش بیان این ژن در مقابله با عوامل گوناگون از جمله رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار گیرند.

## نتیجه گیری

نتیجه این مطالعه کاربرد موفقیت آمیز ناقل‌های لنتی ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی را نشان می‌دهد و روشن می‌سازد که این ناقل‌ها می‌توانند در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از قبیل پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار گیرند، همان گونه که امروزه به طور وسیعی از آنها در سراسر دنیا استفاده می‌شود.

## بحث

امروزه انتقال ژن یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در رابطه با تشخیص، پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری پارکینسون تحت عنوان ژن درمانی به‌شمار می‌رود. ناقلین مختلف و متعددی برای انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند که می‌توان آنها را به دو گروه ناقلین ویروسی و ناقلین غیر ویروسی دسته بندی کرد (۱۶). از بین ناقلین ویروسی، لنتی ویروس‌ها به دلیل داشتن خصوصیات برجسته در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ویروس‌ها متعلق به خانواده رترو ویریده بوده و همانند رترو ویروس‌ها قادرند پس از ورود به سلول میزبان ژنوم خود را به داخل ژنوم میزبان وارد سازند. رترو ویروس‌ها زمانی قادرند این کار را انجام دهند که سلول در حال تقسیم باشد ولی لنتی ویروس‌ها می‌توانند بدون نیاز به تقسیم سلولی وارد هسته سلول میزبان شده و ژنوم خود را به داخل ژنوم میزبان متصل کنند (۱۷). حذف برخی از ژن‌های اصلی، فرعی و تنظیمی و همچنین جهش‌های حذفی (حذف ۴۰۰ نوکلئوتید از ناحیه U3) در نواحی ضروری LTR<sup>۲۳</sup> که مربوط به افزایشنده (Enhancer) و پروموتور (Promoter) می‌باشد، منجر به غیر فعال سازی نسخه برداری از پروویروس شده و ناقلین حاصل از این جهش‌ها تحت عنوان ناقلین SIN (Self inactivating vectors) نامیده می‌شوند (۱۸).

در این حامل‌ها به منظور افزایش ایمنی زیستی، تعداد زیادی از

Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(3): 207–219.

11. Kim RH, Peters M, Jang YJ, et al. (16 co-authors). Dj-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 2005; 7(3): 263–273.

12. Yang Y, Gehrke S, Haque ME, et al. (12 co-authors). Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(3): 13670–13675.

13. Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, et al. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2005; 14(9): 1231–1241.

14. Esmailzadeh E, Gardaneh M, Vaziri HR. The Concomitant Effect of Shikonin and Glutathione Peroxidase-1 on Enhanced Survival of Dopaminergic Neurons against Parkinsonian Toxicity. *JCT*. 2012; 3(2): 153-160.

15. Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol*. 2002; 21(12): 937-51. Review.

16. Neeltje A, Verma KM. Gene therapy with viral vector. *Ann Rev Toxicol*. 2003; 43(7): 413-439.

17. Esmailzadeh E, Gardaneh M, Gharib E, Sabouni F. Shikonin Protects Dopaminergic Cell Line PC12 Against 6-Hydroxydopamine-Mediated Neurotoxicity Via Both Glutathione-Dependent and Independent Pathways and by Inhibiting Apoptosis. *Neurochem res*. 2013; 38(8): 1590-604.

18. Lever AML, Strappe PM, Zhao J. Lentiviral vectors, *J Biomed Sci*. 2004; 11(3): 439-449.

19. Pawliuk R, Bachelot T, Raftopoulos MH, et al. Retroviral vectors aimed at gene therapy of human  $\alpha$ -globin gene disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 850: 151-162.

20. Kalberer PC, Pawliuk R, Imren S, et al. Preselection of retrovirally transduced bone marrow avoid subsequent stem cell gene silencing and age-dependent extinction of expression of human  $\alpha$ -globin in engrafted mice. *PNAS*. 2000; 97(10): 5411-5415.

## تشکر و قدردانی

از همکاری تکنیکی آقای عباس رحیمی در تهیه این مقاله سپاسگزار می‌شود. هزینه انجام این پژوهش از طریق طرح شماره ۴۲۰ مصوب پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تامین شده است.

## منابع

1. Nagakubo D, Taira T, Kiatara H, Ikeda M, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 231(2): 509–513.

2. Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 251(2): 545–549.

3. Welch JE, Barbee RR, Roberts NL, Suarez JD, et al. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. *J Andrology*. 1998; 19(4): 385–393.

4. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. (18 co-authors). Mutation in the Dj-1 gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Science*. 2003; 299(4): 256–259.

5. Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 312(4): 1342–1348.

6. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(24): 9103–9108.

7. Martinat C, Shendelman S, Jonason A, Leete T, et al. Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES-derived cell model of primary Parkinsonism. *PLoS Biol*. 2004; 2(4): 1754–1763.

8. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, et al. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*. 2004; 2(4): 1764–1773.

9. Zhou W, Freed CR. DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T  $\alpha$ -synuclein toxicity. *J Biol Chem*. 2005; 280(52): 43150–43158.

10. Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in



## Production of Carrying DJ-1 Gene Recombinant Lentiviruses and Their Transition to Human Cells

Esmailzadeh E, M.Sc.<sup>1</sup>, Gardaneh M, Ph.D<sup>1\*</sup>

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

\* Email corresponding author: [mossa65@nigeb.ac.ir](mailto:mossa65@nigeb.ac.ir)

Received: 22 Mar. 2013

Accepted: 20 Aug. 2013

---

### Abstract

**Aim:** The aims of this study were subcloning of Dj-1(PARK7) gene to lentiviral transfer vector, recombinant lentiviruses production and target cells infection with these viruses .

**Material and methods:** DJ1 gene obtained from pcDNA-DJ1 vector using restriction enzymes EcoR1 and Xho1. Lentiviral transfer vector was coincidental digested using EcoR1 and Sall enzymes. DJ-1 gene was interred into the lentiviral transfer and upstream of Jred gene using T4-DNA ligase. As DJ1-IRES-Jred sequence was placed in downstream and control of CMV promoter. To production of recombinant lentiviruses, the made vector is coincidental transferred into the HEK-293T (Human Embryonic Kidney) cells with two packaging and envelope lentiviral vectors. Produced virus was used for target cells infection.

**Results:** For integrity of subcloning, enzymatic tests and PCR were used.

Fluorescent microscopy also used to show expression of Jred reporter gene that showed the success of our gene transferring .Then RT-PCR was done for showing overexpression of DJ1 gene in transduced cells compare with normal cells.

**Conclusion:** This study show the lentiviral vectors success in gene transferring to eukaryotic cells and clear that this vectors can be used in treatment of nervous system diseases.

**Keywords:** Cloning, DJ1, lentivirus