

## Production of Recombinant HEK293T with miR-1 Overexpression as a Biological Model for Cardiac Studies

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Rasekhi M.<sup>1</sup> MSc,  
Bakhshande B.\*<sup>2</sup> PhD,  
Sadeghizadeh M.<sup>2</sup> PhD,  
Salimi A.<sup>3</sup> PhD,  
Soleimani M.<sup>4</sup> PhD

#### How to cite this article

Rasekhi M, Bakhshande B, Sadeghizadeh M, Salimi A, Soleimani M. Production of Recombinant HEK293T with miR-1 Overexpression as a Biological Model for Cardiac Studies. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):1-8.

\*Biotechnology Department, Science Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>1</sup>National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Genetic Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Hematology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Biotechnology Department, No. 13, Shafie Alley, Qods Street, Enqelab Sq., Tehran, Iran  
Phone: +98 (21) 66491622  
Fax: +98 (21) 61113835  
b.bakhshandeh@ut.ac.ir

#### Article History

Received: March 10, 2015  
Accepted: February 5, 2017  
ePublished: March 20, 2018

### ABSTRACT

**Aims** The induction of artificial over-expression of miRNAs is an appropriate approach to more effective cell differentiation. The significant role of microRNA-1(miR-1) has been reported in the development and differentiation of cardiac cells. Lentivirus is an effective vector for stable cell line production. The aim of this study was the production of recombinant HEK293T with miR-1 overexpression as a biological model for cardiac studies.

**Materials & Methods** In this experimental study, HEK 293T cells were cultured in DMEM medium with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and L-glutamine 2mM and Penicillin-Streptomycin 1X in incubator medium. After cloning of miR-1 gene, recombinant clones were selected and the recombination was confirmed by sequencing. The miR-1 carrying vector and auxiliary vectors were packaged in the HEK293T to produce the recombinant virus. The infection of HEK293T by recombinant virus was performed in order to achieve stable cell line. Then, GFP fluorescent marker evaluated the efficiency of transfection and effective virus dilution. Finally, the alteration in expression level of miR-1 was assessed by qPCR. Data analysis was performed by comparing the threshold cycle and Pfaffl method.

**Findings** The most GFP expression was detected in transfected cells by 150 micromole dilution. GFP fluorescent marker facilitated optimization and purification of recombinant cells. qPCR investigation demonstrated the significant increase in expression of miR-1 in transfected cells in comparison to controls.

**Conclusion** The stable recombinant HEK293T miR-1 over-expressing cell line in lentivirus can be utilized as a suitable biological model for investigation of cardiac evolution and development processes.

**Keywords** MicroRNA-1; HEK293 Cells; Cell Differentiation; Viral Cell Transformation; Biological Model

### CITATION LINKS

[1] MicroRNAs in cardiovascular health: From order ... [2] Developing microRNA therapeutics: Approaching the unique ... [3] Computational prediction of microRNA ... [4] Experimental strategies for microRNA ... [5] Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular ... [6] MicroRNAs in the pathogenesis of ... [7] Comparison of miR-24, miR-106 ... [8] MicroRNA signature associated with osteogenic ... [9] A microRNA signature associated with ... [10] Down-regulation of miRNA-221 triggers ... [11] The roles of microRNAs in heart diseases ... [12] and ischemic heart disease: Towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic ... [13] MicroRNAs in cardiomyocyte ... [14] MicroRNA-1 in cardiac diseases and ... [15] The role of microRNA-1 and microRNA-133 ... [16] MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to ... [17] Induction of tolerogenic murine dendritic cells by downregulating the ... [18] Dysregulation of cardiogenesis, cardiac ... [19] MiR-17-92 cluster: An apoptosis ... [20] Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the ... [21] The role of small molecules in musculoskeletal ... [22] Effective combination of hydrostatic pressure and aligned nanofibrous scaffolds on human bladder smooth muscle cells: Implication for bladder tissue ... [23] A review of cellularization strategies for tissue engineering of ... [24] A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem ... [25] When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration - a case study ... [26] MiR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation ... [27] The effect of recombinant lentiviral vector encoding miR-145 on human esophageal cancer ... [28] Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent ... [29] Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem ...

## تولید رده نوترکیب HEK293T با بیش-بیانی پایدار miR-1 به عنوان مدل زیستی برای مطالعات قلبی

مهسا راسخی MSc

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

پهناز بخشنده PhD\*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مجید صادقی زاده PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

علی سلیمی PhD

مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله<sup>(ع)</sup>، تهران، ایران

مسعود سلیمانی PhD

گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** القای مصنوعی بیش-بیان miRNA راهکار مناسبی برای القای موثرتر تمایز سلولی است. نقش موثر miR-1 در تکوین و تمایز سلول‌های قلبی گزارش شده است. لنتی‌ویروس یک ناقل کارآمد برای تهیه رده‌های سلولی پایدار است. هدف پژوهش حاضر تولید رده سلولی با بیش-بیان پایدار miR-1 برای ایجاد یک مدل زیستی برای مطالعات قلبی بود.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش تجربی حاضر، سلول‌های HEK 293T در محیط کشت DMEM به همراه سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ و آل-گلوتامین ۲ میلی‌مولار و پنی‌سیلین-استرپتومایسین 1X در محیط انکوباتور کشت داده شدند. پس از کلون‌کردن ژن miR-1، کلون‌های نوترکیب انتخاب شدند و حضور قطعه ژنی در وکتور نوترکیب با توالی‌یابی تایید شد. وکتور حامل miR-1 به همراه وکتورهای کمکی در سلول HEK293T به صورت ویروس نوترکیب بسته‌بندی شد. ترآلایی سلول‌های HEK293T با ویروس نوترکیب برای تولید رده پایدار انجام شد. سپس کارایی ترآلایی و رقت موثر ویروس با نشانگر GFP سنجش شد. تغییرات بیان miR-1 با روش qPCR بررسی شد. تحلیل داده‌ها از طریق بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه و روش Pfaffl انجام گرفت.

**یافته‌ها:** بیشترین میزان بیان GFP مربوط به سلول‌های آلوده شده با رقت ۱۵۰ میکرومولار بود. نشانگر فلورسنت GFP موجب تسهیل فرآیند بهینه‌سازی و تخلیص سلول‌های نوترکیب شد. در ارزیابی qPCR، بیان miR-1 در سلول‌های ترآلایی شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت.

**نتیجه‌گیری:** رده سلولی پایدار نوترکیب HEK293T بیش-بیان‌کننده miR-1 در لنتی‌ویروس، به عنوان مدل زیستی مناسب برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب است.

**کلیدواژه‌ها:** microRNA-1، سلول‌های HEK293T، تمایز سلولی، ترآلایی ویروسی سلول، مدل زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

\*نویسنده مسئول: b.bakhshandeh@ut.ac.ir

### مقدمه

میکروRNAها (miRs)، دسته‌ای از RNAهای تنظیمی با طول تقریبی ۲۲ نوکلئوتید هستند که بیان ژن را از طریق تخریب رونوشت ژن هدف یا مهار ترجمه کنترل می‌کنند [1, 2]. امروزه بیش از ۱۵۰۰ مولکول miR در پایگاه داده‌های miRBase ثبت شده است. پیش‌بینی‌های رایج‌های مولکول‌های هدف miR ادعا می‌کنند که بیش از ۳۰٪ ژن‌های کدکننده پروتئین در انسان احتمالاً توسط مولکول‌های miR تنظیم و کنترل می‌شوند که این امر miRها را به یک گروه مهم تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی تبدیل می‌کند [3]. به این منظور miRها معمولاً از طریق بخش‌های نوکلئوتیدی ۵' یا ۸' تایی که توالی seed نامیده می‌شود، با ناحیه غیرترجمه‌ای انتهایی (3'UTR) یک یا چند mRNA مکمل

می‌شوند. بنابراین برش توسط مجموعه ریبونوکلوپروتئینی miRNP به ناحیه کدکننده mRNA آسیب نمی‌زند، اما در فرآیند شروع ترجمه تداخل ایجاد می‌کند و سبب خاموشی ژن هدف می‌شود [4, 5]. شواهد متعددی نیز وجود داشته است که miRها در رخداد‌های مولکولی دیگری مانند تنظیم تکوین و هومئوستاز بافت و همچنین در روندهای حیاتی سلول مانند تکثیر، پیری سلولی، آپوپتوز و تمایز نقش دارند [6, 7]. با توجه به اینکه miRها به عنوان کلیدهای تنظیمی در تمایز به رده‌های مختلف سلولی شناخته شده‌اند، به نظر می‌رسد القای مصنوعی بیش-بیان miRها در سلول‌ها با هدف کنترل بیان mRNAهای خاص، یک راهکار مناسب برای القای سلول‌های ترمیم‌کننده بافت‌های آسیب‌دیده باشد [8-10].

مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که microRNA-1 (mir-1) نقش موثری در تکوین و تمایز سلول‌های قلبی دارد و علاوه بر فیزیولوژی قلب، در پاتولوژی و اختلالات عملکردی اندام قلب نیز به نقش این miR تنظیمی اشاره شده است [11-14]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بیان mir-1 در سلول‌های قلبی بالاست و این miR در تکوین هایپرتروفی قلبی نقش دارد [13]. این miR بسیار حفاظت‌شده با هدف‌قراردادن هیستون دیسیتیلاز ۴ (HDAC4) که یک ممانعت‌کننده بیان ژن‌های ماهیچه‌ای است، به ماهیچه‌زایی در عضله قلبی کمک می‌کند [15]. یک گروه تحقیقاتی با استفاده از افزایش بیان mir-1 و چند miR دیگر با روش ترآلایی لنتی‌ویروسی، توانسته‌اند فیبروبلاست‌های قلبی را به سلول‌های ماهیچه‌ای قلب تغییر داده و برنامه سلولی آنها را بازآرایی کنند [16]. لنتی‌ویروس‌ها از مزایای برجسته‌ای نسبت به ویروس‌های دیگر در انتقال پایدار ژن‌ها برخوردارند. این مزایا سبب شده است تا از لنتی‌ویروس‌ها به عنوان ناقلان ژن برتر برای مطالعات فیزیولوژیکی-تکاملی و بیماری‌های مختلف بهره‌برداری شود [17]. در مطالعه دیگری در موش‌های فاقد mir-1 اختلالاتی در هدایت الکتریکی سلول‌های قلبی، شکل‌زایی سلول‌های قلبی و تنظیم چرخه سلولی سلول‌های قلبی گزارش شده است [18]. براساس مطالعات انجام‌شده به نظر می‌رسد بیش-بیان mir-1 در تمایز موثرتر و عملکرد بهتر سلول‌ها به رده قلبی کمک می‌نماید.

در این مطالعه با هدف فراهم‌آوردن زیرساخت‌های لازم برای طب ترمیمی بافت قلب در مطالعات آتی، ساخت ناقل نوترکیب حامل ژن miR-1 و انتقال این سازه ژنی به رده سلولی HEK 293T به منظور بسته‌بندی و تولید لنتی‌ویروس‌های بیان‌کننده miR-1 انجام شد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، تولید رده نوترکیب HEK293T با بیش-بیان پایدار miR-1 به عنوان مدل مطالعات قلبی بود.

### مواد و روش‌ها

**رده سلولی:** در پژوهش تجربی حاضر، سلول‌های HEK 293T در محیط کشت DMEM به همراه سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪، آل-گلوتامین ۲ میلی‌مولار و پنی‌سیلین-استرپتومایسین 1X (شرکت Gibco؛ انگلستان) در محیط انکوباتور حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند.

**تعیین خلوص و غلظت DNA و کنترل کیفی آن:** بدین منظور، گلبول‌های سفید هسته‌دار از خون کامل انسان جداسازی و سپس DNA ژنومی با استفاده از روش نمک‌اشباع استخراج شد. جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه بیوفوتومتر

روی کروموزوم ۱۸ انسانی قرار دارد. از پایگاه داده NCBI با شماره دستیابی NR 110369.1 اخذ شد. پس از شناسایی منطقه کدکننده pre-mir-1، طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار Gen Runner 3 انجام و در نهایت توالی برش آنزیمی با استفاده از آنزیم های محدودکننده XbaI و BamHI و توالی Hanging به انتهای 5' اضافه شد (جدول ۱).

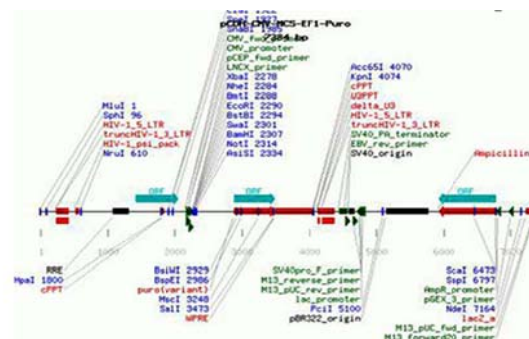
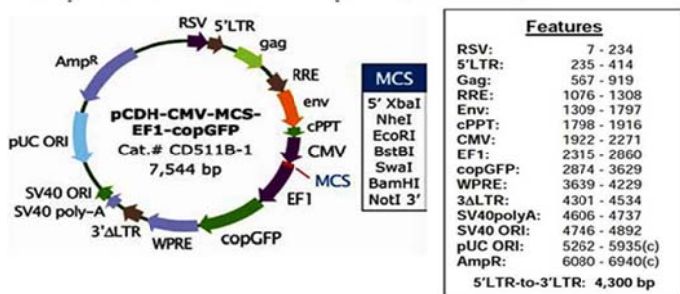
BioPhotometer® D30 (اپندورف؛ آلمان) سنجیده شد. در نهایت به منظور کنترل کیفی DNA، ۷ میکرولیتر از محلول حاوی DNA روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آغازگرها و تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر: به منظور طراحی آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) ابتدا توالی های نوکلئوتیدی فرادست و فرودست ژن کدکننده miR-1 که

جدول ۱) توالی آغازگرها برای برش آنزیمی قطعه

آغازگر	توالی	محتوای GC (درصد)	دمای ذوب (درجه سانتیگراد)
آغازگر مستقیم (دارای جایگاه آنزیمی XbaI)	GTTCTAGAAATACACTCTGTAACACTACAC	۳۶/۴	۶۴
آغازگر معکوس (دارای جایگاه آنزیمی BamHI)	TCGGATCCATTCTCATTCTTTTGTGCTAG	۴۳/۰	۶۴/۴

**کلونینگ ژن microRNA-1 در پلاسمید pCDH:** این مرحله شامل هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید و نهایتاً اتصال این دو بود. در این مطالعه از پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cop GFP (system bioscience؛ ایالات متحده) که حاوی کاست بیان ژن گزارشگر GFP است استفاده شده و توسط کیت استخراج پلاسمید (Invitrogen؛ ایالات متحده) تخلیص شد. در این پلاسمید ژن مارکر GFP و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک استخرج پلاسمید (Invitrogen؛ ایالات متحده) تخلیص شد. در آمپی سیلین وجود دارد (شکل ۱). برای برش آنزیمی از آنزیم های محدودکننده BamHI و XbaI استفاده شد. برای انجام واکنش اتصال (Ligation) محصولات برش یافته از آنزیم T4 DNA ligase (شرکت Fermentas؛ ایالات متحده) استفاده شد. واکنش فوق در دمای اتاق، یک ساعت انکوباسیون شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C قرار گرفت، سپس آنزیم در دمای ۶۵°C به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد.

به منظور تکثیر قطعه ژنی ۷۱۶ جفت بازی حاوی توالی پیش ساز miR-1، مخلوط واکنش PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز) به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (dNTPs، بافر و آنزیم) و ۸/۵ میکرولیتر آب تهیه شد. سپس مخلوط فوق در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf MasterCycler® gradient (اپندورف؛ آلمان) با برنامه یک سیکل به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۲ سیکل (۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، ۳۵ ثانیه در دمای ۵۸°C و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C) و یک سیکل انتهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C قرار داده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید تفکیک شدند و با استفاده از اشعه ماورای بنفش و دستگاه لومینومتر (labnet؛ فنلاند) مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای حاصل با نشانگر نردبانی اکیلوبازی سنجیده شدند.



شکل ۱) نقشه پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cop GFP

نوترکیب بود، روی پلیت های LB آگار دارای آمپی سیلین کشت داده شد. در نهایت پلیت ها به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در ۳۷°C قرار گرفتند. باکتری هایی که روی محیط کشت آمپی سیلین رشد کردند احتمالاً پلاسمید نوترکیب را دریافت کردند. **تایید پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر:** در پژوهش حاضر پس از استخراج پلاسمید به منظور بررسی درستی اتصال از سه روش کلونی PCR برش آنزیمی و در نهایت تعیین توالی پلاسمید نوترکیب استفاده شد. در صورت وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید نوترکیب، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به آن قطعه انجام می شود. بنابراین با بهره گیری از پرایمرهای کلونینگ اولیه واکنش PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده انجام گرفت. سپس برای انتخاب پلاسمید کلون شده، تمامی کلون های الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شد. کلون هایی که حاوی باند ۷۱۶ جفت بازی

انتقال پلاسمید کلون شده به سویه باکتریایی DH5α و غربال کردن کلون های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب: برای وارد کردن پلاسمید به باکتری نوترکیب و تغییر در جداره باکتری و مستعد نمودن آن از کلرید کلسیم استفاده شد. سپس فرآیند انتقال پلاسمید به باکتری که واکنش ترانسفورماسیون نامیده می شود، انجام گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از باکتری مستعد به میکروتیوب استریل انتقال داده شد، سپس ۵ میکرولیتر از پلاسمید به میکروتیوب فوق اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، مخلوط فوق به مدت ۹۰ ثانیه به دمای ۴۲°C منتقل شد و بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB فاقد آنتی بیوتیک افزوده و ۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. مخلوط واکنش در دمای ۴°C در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل که حاوی پلاسمید

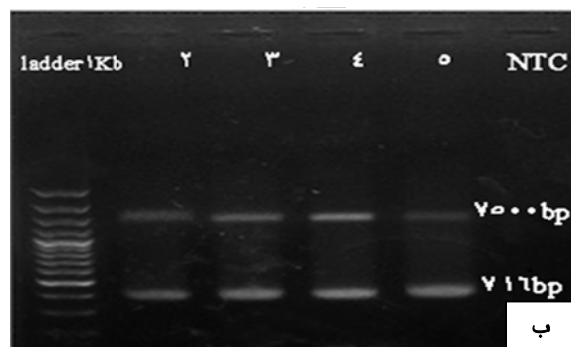
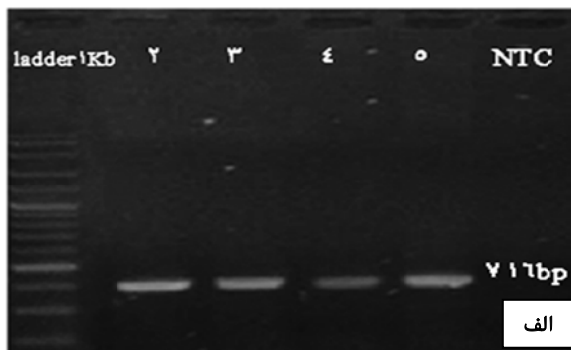
دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  در محیط DMEM، فاقد سرم جنین گاوی نگهداری شد. برای تعیین تیترو ویروس‌های تولید و تغلیظ‌شده، حجم‌های مختلفی از استوک ویروسی (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرولیتر) به سلول‌های HEK293T ترالایی شد. با توجه به وجود ژن GFP، برای اندازه‌گیری کمی و کیفی میزان ترانسفکشن، تکنیک میکروسکوپی فلورسانت مورد استفاده قرار گرفت.

**استخراج RNA، سنتز cDNA و ارزیابی تغییرات بیان microRNA-1 توسط ریل‌تایم PCR:** پس از ۲۴ ساعت از ترالایی ویروسی سلول‌های HEK293T، RNA سلول‌ها توسط واکنشگر ترانزیول استخراج شد. سپس cDNA تک‌رشته‌ای از نمونه RNA با استفاده از کیت Stratagene (Agilent؛ ایالات متحده) منطبق با پروتکل شرکت سازنده ساخته شد. در نهایت این cDNA با پرایمرهای قبلی تشخیص miR-1، تحت آنالیز PCR قرار گرفت. بیان miR-1 با بیان ژن کنترل داخلی U6 snRNA مقایسه شد (U6 قطعه کوتاهی در حد miRs تولید می‌کند).

تحلیل داده‌ها از طریق بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه (Comparative threshold cycle method) و روش Pfaffl انجام گرفت. برای مقایسه میان دو گروه نیز از آزمون T استیودنت صورت گرفت. همه آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند.

### یافته‌ها

نسبت جذب DNA استخراجی از خون محیطی در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰، برابر با ۱/۷-۱/۸ بود. الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ نمایانگر کیفیت مناسب و یکپارچگی DNA تخلیص شده بود (شکل ۲).

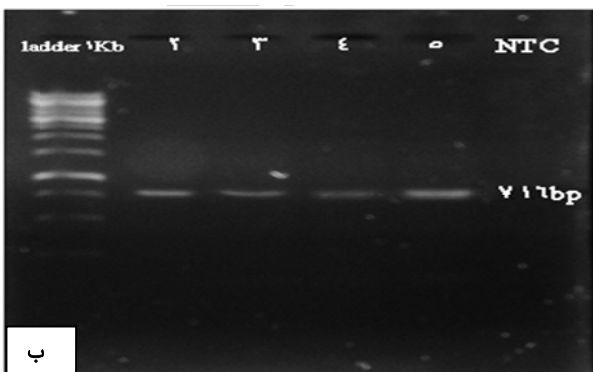
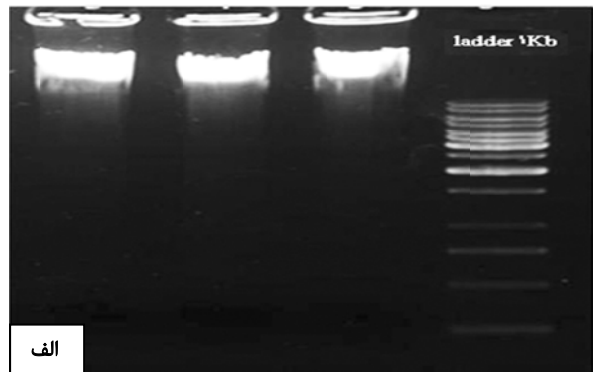


**شکل ۲ (الف)** نتایج الکتروفورز DNA ژنومی ژل آگارز ۱٪ و محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 ژل آگارز ۱/۵٪

(الف) الکتروفورز DNA ژنومی ژل آگارز ۱٪؛ (ب) الکتروفورز محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: نشانگر اندازه یک کیلوبازی، ستون‌های ۲-۵: محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 و ستون ۶: کنترل فاقد DNA الگو (NTC)

قطعه pri-miR-1 بودند. برای مراحل بعدی انتخاب شدند. همچنین با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XbaI، پلاسمیدهای استخراج‌شده از کلون‌های مثبت تکثیرشده در مرحله قبل، برش داده شد و مجدداً توسط الکتروفورز بررسی شدند. نهایتاً برای تایید قطعه ژنی کلون‌شده، پلاسمیدهای مثبت مرحله قبل، تعیین توالی شدند. به‌منظور تایید نهایی کلون مثبت، کلون‌های حاوی ژن پیش‌ساز miR-1 برای تعیین توالی ارسال شد که نتایج خوانش، پس از قرائت در نرم‌افزار chromas 2.6 در سایت NCBI بلاست شد.



**شکل ۲ (ب)** نتایج الکتروفورز DNA ژنومی ژل آگارز ۱٪ و محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 ژل آگارز ۱/۵٪

**تولید ویروس:** تقریباً ۲۴ ساعت قبل از ترانسفورماسیون سلول‌ها با پلاسمید، حدود ۵ میلیون سلول HEK 293T در محیط کشت DMEM به همراه سرم جنین گاوی ۱۰٪ و ال-گلوتامین ۲ میلی‌مولار و پنی‌سیلین-استرپتومایسین 1X کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفته شدند تا به تراکم ۷۰٪ برسند. به‌منظور تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب و فعال، مجموعه پلاسمید نوترکیب لنتی-miR و سایر پلاسمیدهای حامل ژن‌های پوششی و ساختاری ویروس یا استفاده از لیپوفکتامین به درون سلول‌ها ترالایی شد. در مورد کار با لنتی ویروس‌ها، کلیه قوانین ایمنی کاربر و محیط در نظر گرفته شد و همچنین از دکونکس به‌عنوان عامل پاکسازی هود لامینار کلاس دو در این مورد استفاده شد.

**تغلیظ ویروس و تعیین تیترو ویروسی:** پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط سلول‌های ترالایی‌شده جمع‌آوری شد و به‌مدت ۱۵۰ دقیقه در ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل در

حاصل روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند و پس از رشد کلونی‌ها چندین کلونی انتخاب و استخراج پلاسمید انجام گرفت. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به قطعه مورد نظر انجام شد تا تنها پلاسمیدهایی که دارای قطعه مورد نظر هستند، برای مرحله بعد انتخاب شوند. کلون‌های به‌دست‌آمده ممکن بود حاوی قطعه مورد نظر یا پلاسمید خوداتصال‌یافته باشند (شکل ۳).

تکثیر قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 توسط PCR به صورت تک‌باند ۷۱۶ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. اندازه توالی مورد نظر نشان‌دهنده اختصاصیت آغازگرهای طراحی‌شده و بهینه‌بودن شرایط دمایی و زمانی تکثیر بود (شکل ۲). پس از هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید و انجام واکنش اتصال، پلاسمیدهای نوترکیب به درون سویه DH5α باکتری *اشرشیاکلی* (*Escherichia coli*) انتقال داده شدند. باکتری‌های

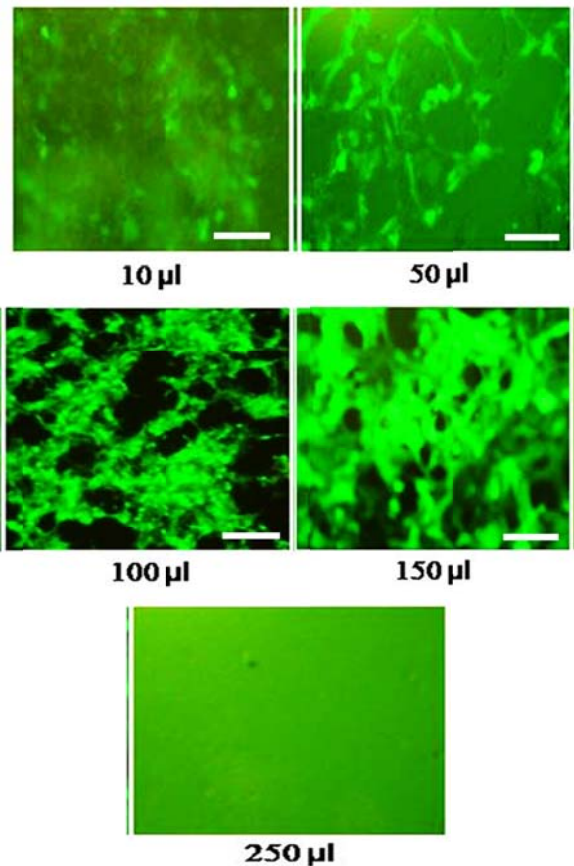
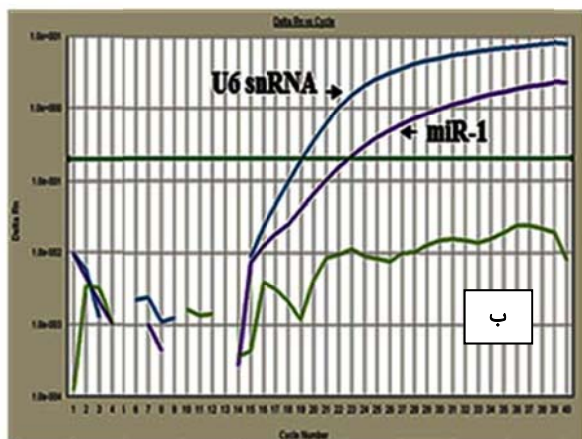
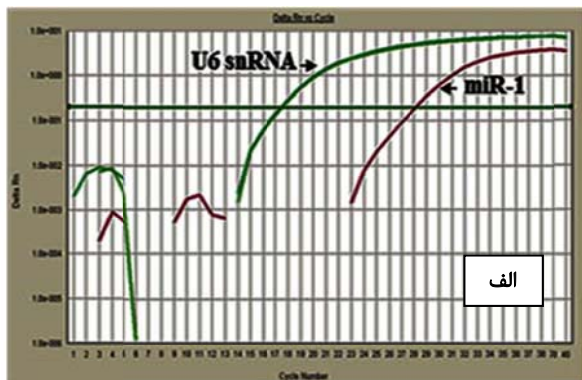
Query 1	AGTTACTGCTCTGAGCTGCCTTCTCTACATCGCAGTGGGGTCAGCTTCTACCGGGC	60
Sbjct 97724	AGTTACTGCTCTGAGCTGCCTTCTCTACATCGCAGTGGGGTCAGCTTCTACCGGGC	97783
Query 61	GGCGTCCCGGGGCTTGGAACTGCATGCAGACTGCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTAT	120
Sbjct 97784	GGCGTCCCGGGGCTTGGAACTGCATGCAGACTGCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTAT	97843
Query 121	ATGCCCATATGGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAGAAGTATGTATCTCAGGCCGGGAC	180
Sbjct 97844	ATGCCCATATGGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAGAAGTATGTATCTCAGGCCGGGAC	97903
Query 181	-TCTCTGCCGCACTGAGGGGCACTCCACACCACGGGGGCGCCGCGGCCGACAGCCAGC	239
Sbjct 97904	CTCTCTGCCGCACTGAGGGGCACTCCACACCACGGGGGCGCCGCGGCCGACAGCCAGC	97963

شکل ۴) بلاست نتیجه تعیین توالی ژن پیش‌ساز miR-1 مربوط به کلون مثبت با توالی ثبت‌شده در پایگاه NCBI

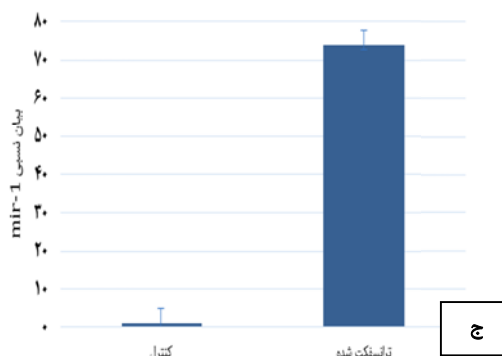
از بین سه مورد از کلون‌های تاییدشده از مرحله قبلی که حاوی ژن پیش‌ساز miR-1 بودند، دو نمونه با قطعه ۱۰۰٪ همخوانی داشت و یک نمونه نیز در یک باز، جهش داشت. برای انجام مطالعات بعدی یکی از کلون‌های مثبت سالم انتخاب شد (شکل ۴).

بالاترین میزان بیان ژن GFP مربوط به ترانسفکشن با رقت ۱۵۰ میکرومولار از ویروس بود که سبب شد بیش از ۷۰٪ سلول‌ها القا شوند و بیان فلورسانت داشته باشند (شکل ۵).

در صورت ورود قطعه مورد کلونینگ به پلاسمید، تعداد جفت‌بازهای به‌دست‌آمده پس از هضم آنزیمی متفاوت می‌شود. در نتیجه به‌منظور تشخیص پلاسمیدهای نوترکیب از برش آنزیمی پلاسمیدها توسط دو آنزیم محدودگر BamHI و XbaI استفاده شد (شکل ۳).



شکل ۵) میزان بیان ژن گزارشگر GFP در سلول‌های 293T القا شده با رقت‌های مختلف از ویروس



**نمودار ۱)** منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته شده از روی miR-1 در دو گروه سلولی القا شده و القا نشده و نتایج آنالیز Pfaffl  
**الف)** منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته شده از روی miR-1 در گروه سلولی القا شده  
**ب)** منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته شده از روی miR-1 در گروه سلولی القا نشده  
**ج)** نتایج آنالیز Pfaffl  
 نتایج به صورت میانگین آماری است.

رقت ۲۵۰ میکرولیتر از ویروس برای سلول قابل تحمل نبود و تمامی سلول‌ها دچار مرگ شدند. متعاقب تاثیر لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 بر سلول‌های نوترکیب HEK 293T در دو گروه ترآلایی شده و کنترل، بررسی الگوی بیانی miR-1 از طریق ریل تایم PCR نشان داد که میزان بیان miR-1 در سلول‌های ترآلایی شده نسبت به سلول‌های کنترل افزایش چشمگیری داشت. به دلیل بیش- بیان miR-1 توسط لنتی ویروس، منحنی تکثیر miR-1 در گروه سلولی القا شده در مقایسه با گروه سلولی القا شده زودتر وارد فاز تصاعدی شد. در سلول‌های گروه کنترل، منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۱۷/۵ و منحنی تکثیر miR-1 در چرخه ۲۸ وارد فاز تصاعدی شد و به خط آستانه رسیدند، در حالی که در سلول‌های آلوده شده با لنتی ویروس نوترکیب، منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۱۹ و منحنی تکثیر miR-1 در چرخه ۲۳ وارد فاز تصاعدی شد و به خط آستانه رسیدند. براساس آنالیز Pfaffl، افزایش تقریباً ۷۳ برابری بیان miR-1 در سلول‌های ترآلایی شده اثبات شد (نمودار ۱).

### بحث

پژوهش حاضر با هدف تولید رده نوترکیب HEK293T با بیان بیانی پایدار miR-1 به عنوان مدل مطالعات قلبی انجام شد. در دهه اخیر دسته جدیدی از RNAهای غیرکدکننده به نام میکروRNA برای تنظیم بیان ژن‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. miRNAها مولکول‌های کوچکی هستند که سبب تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی می‌شوند [1, 2, 19]. نقش این مولکول‌ها در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی از قبیل تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به اثبات رسیده است. اهمیت این مولکول‌ها به اندازه‌ای است که آنها را هم‌ردیف فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها می‌دانند [7, 20]. با توجه به مشکلات فراوان استفاده از فاکتورهای رشد، کنترل اثرات آنها و همچنین هزینه بالا، استفاده از روند جایگزینی که بتواند بدون فاکتورهای رشد، سلول‌های

پرتوان را به سمت سلول‌های دلخواه تمایز دهد، مورد توجه مجامع علمی قرار گرفته است [21]. بدین سبب miRNAها به عنوان کاندید مناسبی برای تنظیم فرآیندهای تکثیر و تعیین نوع تمایز سلولی به حساب می‌آیند، چرا که این مولکول‌ها در روند تکاملی موجودات زنده، بسیار حفاظت شده‌اند و توانایی آنها نیز در روندهای مختلف سلولی از جمله القای تمایز به سمت یک رده خاص به اثبات رسیده است [8, 9]. یکی از ارگان طب ترمیمی و مهندسی بافت قلب، سلول‌های مورد استفاده هستند [22, 23]. به منظور تیمار و آماده‌سازی سلول‌ها و آغاز مسیرهای سیگنالینگ تمایز به یک رده خاص در سلول‌ها، می‌توان از فرآیند بیش- بیان پایدار برخی miRNAها استفاده کرد [10]. در مطالعات بسیاری به نقش فیزیولوژیک و پاتولوژیک miR-1 در تکوین و تمایز رده عضله قلب پرداخته شده است [5, 11, 15, 18]. از طرف دیگر، در بسیاری از مطالعات از لنتی ویروس‌ها در انتقال موثر و پایدار ژن‌ها به درون سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود [24]. در این مطالعه، از سیستم بیانی لنتی ویروس به منظور افزایش بیان پایدار miR-1 در رده سلولی HEK 293T برای تولید یک مدل سلولی قلبی استفاده شد.

مراحل کلون کردن ژن miR-1، انتخاب کلون نوترکیب و تایید کلونینگ انجام و سپس با توالی‌یابی تایید شد. وکتور حامل miR-1 به همراه وکتورهای کمکی در سلول HEK293T به صورت ویروس نوترکیب بسته‌بندی شد. ترآلایی سلول‌های HEK293T با ویروس نوترکیب به منظور تولید رده پایدار انجام شد. کارایی ترآلایی و رقت موثر ویروس از طریق بررسی نشانگر GFP فلورسانت سنجش شد. بیشترین میزان بیان ژن GFP مربوط به سلول‌های ترآلایی شده با رقت ۱۵۰ میکرولیتر بود. نشانگر فلورسنت GFP موجب تسهیل فرآیند بهینه‌سازی و تخلیص سلول‌های نوترکیب شد. مطالعات متعددی به نقش موثر استفاده از نشانگر فلورسانت GFP برای تخلیص آسان‌تر سلول‌های ترآلایی شده با پلاسمید اشاره نموده‌اند [25]. تنها مطالعه‌ای که از نشانگر GFP در انتقال miR-1 استفاده شده است، سلول هدف، سلول بنیادی بود [26].

در نهایت با استفاده از روش qPCR تغییرات بیان miR-1 ارزیابی شد. در این ارزیابی، بیان miR-1 در سلول‌های ترآلایی شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت (تا حدود ۷۳ برابر افزایش) و بدین ترتیب عملکردی بودن وکتور کلون شده نیز تایید می‌شود. این سیستم بیانی لنتی ویروسی به منظور افزایش سطح بیانی میکروRNA، در مورد سایر miRNAها نیز نتایج مشابهی را به همراه داشته است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای از این سیستم ویروسی و پلاسمید حاوی نشانگر GFP، برای افزایش بیان پایای miR-145 در سلول‌های سرطانی مری استفاده شده است [27].

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به استفاده از روش ویروسی جهش‌زای بالقوه به منظور ترآلایی سلول‌ها، استفاده از سلول‌های نامیرا به جای استفاده از سلول‌های پرایمری رده قلبی اشاره کرد.

این رده سلولی پایدار نوترکیب بیش- بیان‌کننده miR-1، می‌تواند به عنوان مدل زیستی مناسبی برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب، غریبالگری داروهای قلبی و مهندسی بافت عضله قلبی استفاده شود. گزارشات و تلاش‌های متعدد از تولید سلول‌های مختلف همانند کاردیومیوسیت [28]، ملانوسیت [29] و سایر سلول‌ها نشانگر این است که در بسیاری از مراکز درمانی و تحقیقاتی دنیا

12- Silvestri P, Di Russo C, Rigattieri S, Fedele S, Todaro D, Ferraiuolo G, et al. MicroRNAs and ischemic heart disease: Towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2009;4(2):109-18.

13- Malizia AP, Wang DZh. MicroRNAs in cardiomyocyte development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011;3(2):183-90.

14- Li J, Dong X, Wang Zh, Wu J. MicroRNA-1 in cardiac diseases and cancers. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(5):359-63.

15- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38(2):228-33.

16- Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res.* 2012;110(11):1465-73.

17- Mahmoodzadeh A, Pourfatollah A, Karimi M, Moazzeni S. Induction of tolerogenic murine dendritic cells by downregulating the co-stimulatory molecule of cd40 using lentivirus vector. *J Zanzan Univ Med Sci Health Serv.* 2014;22(94):1-10. [Persian]

18- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007;129(2):303-17.

19- Ranji N, Sadeghizadeh M, Shokrgozar MA, Bakhshandeh B, Karimipour M, Amanzadeh A, et al. MiR-17-92 cluster: An apoptosis inducer or proliferation enhancer. *Mol Cell Biochem.* 2013;380(1-2):229-38.

20- Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, Dirago L, Nicola NA, et al. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood.* 2005;105(9):3480-7.

21- Lo KW, Ashe KM, Kan HM, Laurencin CT. The role of small molecules in musculoskeletal regeneration. *Regen Med.* 2012;7(4):535-49.

22- Ahvaz HH, Soleimani M, Mobasheri H, Bakhshandeh B, Shakhssalim N, Soudi S, et al. Effective combination of hydrostatic pressure and aligned nanofibrous scaffolds on human bladder smooth muscle cells: Implication for bladder tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(9):2281-90.

23- Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:43.

24- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Ghaemi N. A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology.* 2012;64(5):523-40.

25- Halff EF, Versteeg M, Brondijk TH, Huizinga EG. When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration - a case study for NLRs. *Protein Expr Purif.* 2014;99:27-34.

26- Huang F, Tang L, Fang ZhF, Hu XQ, Pan JY, Zhou ShH. MiR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation of Hes-1. *BioMed Res Int.* 2013;2013: ID 216286.

27- Wang TY, Zhang QQ, Zhang X, Sun QL, Zhao CP, Wang XY. The effect of recombinant lentiviral vector encoding miR-145 on human esophageal cancer cells. *Tumour Biol.* 2015;36(12):9733-8.

سرمایه‌گذاری گسترده‌ای روی این فناوری انجام شده است و نتایج حاصل هم بسیار امیدوارکننده به نظر می‌رسد. بدین ترتیب پیشنهاد می‌شود با مطالعات بیشتر و شناسایی ژن‌های هدف miRهای دخیل در روندهای تمایزی بتوان در آینده از پتانسیل‌های تشخیصی و درمانی آنها به‌خصوص در ژن‌درمانی و پزشکی ترمیمی بهره برد.

## نتیجه‌گیری

رده سلولی پایدار نوترکیب HEK293T بیش- بیانی‌کننده miR-1 در لنتی‌ویروس، به‌عنوان مدل زیستی مناسب برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب است.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

**تعارض منافع:** موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

**سهم نویسندگان:** مهسا راسخی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ بهناز بخشنده (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ علی سلیمی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مسعود سلیمانی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰٪).

**منابع مالی:** موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

## منابع

- 1- Karunakaran D, Rayner KJ. MicroRNAs in cardiovascular health: From order to disorder. *Endocrinology.* 2013;154(11):4000-9.
- 2- Jackson A L, Levin AA. Developing microRNA therapeutics: Approaching the unique complexities. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(4):213-25.
- 3- Hertel J, Langenberger D, Stadler PF. Computational prediction of microRNA genes. *Methods Mol Biol.* 2014;1097:437-56.
- 4- Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):6845-53.
- 5- Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circ Res.* 2012;110(3):483-95.
- 6- Lovat F, Valeri N, Croce CM. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. *Semin Oncol.* 2011;38(6):724-33.
- 7- Ajami M, Atashi A, Soleimani M, Ajami M, Kaviani S. Comparison of miR-24, miR-106a and miR-107 expression in identical twins of different ages. *J Zanzan Univ Med Sci Health Serv.* 2015;23(96):22-33. [Persian]
- 8- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Paylakhi SH, Ghaemi N. MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7569-81.
- 9- Bakhshandeh B, Soleimani M, Paylakhi SH, Ghaemi N. A microRNA signature associated with chondrogenic lineage commitment. *J Genet.* 2012;91(2):171-82.
- 10- Bakhshandeh B, Hafizi M, Ghaemi N, Soleimani M. Down-regulation of miRNA-221 triggers osteogenic differentiation in human stem cells. *Biotechnol Lett.* 2012;34(8):1579-87.
- 11- Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: A novel important regulator. *Curr Med Chem.*

29- Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohya M, et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. PLoS One. 2011;6(1):e16182.

28- So KH, Han YJ, Park HY, Kim JG, Sung DJ, Bae YM, et al. Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells. Int J Cardiol. 2011;153(3):277-85.

Archive of SID