



Luciferase Assay for Demonstrate the Competence of Selective MicroRNA of *let-7b* in Suppressing HCV Replication

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Shafaati M.¹ MSc,
Jamalidous M.*² PhD,
Kargar M.¹ PhD,
Arefian E.³ PhD,
Kafilzadeh F.¹ PhD

How to cite this article

Shafaati M, Jamalidous M, Kargar M, Arefian E, Kafilzadeh F. Luciferase Assay for Demonstrate the Competence of Selective MicroRNA of *let-7b* in Suppressing HCV Replication. Pathobiology Research. 2020;23(2): 67-74.

¹Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Zand Street, Namazi Square, Shiraz, Iran. Postal Code: 7193613311

Phone: -

Fax: +98 (713) 6474303

maryam.shafaati@gmail.com

Article History

Received: March 07, 2020

Accepted: June 20, 2020

ePublished: July 20, 2020

ABSTRACT

Aims The development of new antiviral agents is an appropriate approach to eradicate hepatitis C infection. Due to the lack of suitable animal models, there is always a barrier to the proper evaluation of antiviral compounds *in vivo*. The growing attention to microRNAs is a new strength in antiviral therapy. The aim of the present study was to use luciferase assay to confirm the specific interaction between miRNA and genomic RNA of hepatitis C virus (HCV) genotype 1b to suppress the replication of the virus.

Materials & Methods The NS5B genomic fragments of the HCV genome were sub-cloned into the psiCHECK-2-TM vector as MRE. The relative expression of lentivirus vectors expressing miRNAs in Huh7.5 cells was assessed through fluorescence microscopy and real-time PCR. The lentivirus expressing *let-7b* was transduced to Huh7.5 cells. The NS5B-psiCHECK-2-TM (MRE) was transfected to the Huh7.5 cell. The relative expression of luciferase was measured using a luciferase dual assay kit.

Findings With the use of lentiviruses expressing *let-7b*, high and permanent expression of *let-7b* was created in the target cell. On the other hand, the specific attachment of the responsive sequence (NS5B) to the microRNA of *let-7b* was shown by decreasing luciferase light.

Conclusion Lentiviral vectors are used to maintain high and stable expression of microRNAs in cells. The use of luciferase assay is one of the most appropriate methods to confirm the interaction between miRNA-mRNA that can be used for other viral genes with different microRNAs.

Keywords Luciferase; miRNA; HCV; Lentiviral

CITATION LINKS

[1] Engineered luciferases for molecular sensing in living cells [2] Bioluminescence imaging of Hepatitis C virus NS3/4A serine protease activity in cells and living animals [3] Replication of hepatitis C virus [4] Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a [5] New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection [6] Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops [7] miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [8] Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection [9] Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway [10] Computational approaches for microRNA studies: A review [11] MicroRNAs: Role in hepatitis C virus pathogenesis [12] High-throughput luciferase reporter assay for small-molecule inhibitors of microRNA function [13] Hsinchu: National Chiao Tung University [14] *Let-7b* is a novel regulator of hepatitis C virus replication [15] Control of developmental timing in animals [16] Liver micro-RNAs and their role in different HCV genotype infections [17] The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase [18] Bioluminescence imaging allows monitoring hepatitis C virus core protein inhibitors in mice [19] Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma [20] Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus [21] Inhibition of microRNA-199a-5p reduces the replication of HCV via regulating the pro-survival pathway [22] Design of vectors for optimizing transgene expression [23] Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding [24] Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation

سنجش لوسیفراز روشی برای نشان دادن صلاحیت میکرو RNA *let-7b* انتخابی در سرکوب تکثیر ویروس هپاتیت C

مریم شفاعتی MSc

گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

مربی جمالی دوست PhD

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

محمد کارگر PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

احسان عارفیان PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

فرشید کفیل‌زاده PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

چکیده

اهداف: توسعه عوامل ضد ویروسی جدید رویکردی مناسب برای ریشه‌کن شدن عفونت هپاتیت C است. به دلیل عدم وجود مدل‌های حیوانی مناسب همواره سدی برای ارزیابی مناسب ترکیبات ضد ویروسی در محیط زنده وجود دارد. توجه روزافزون به microRNAها نقطه قوت جدیدی در درمان‌های ضد ویروسی محسوب می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، استفاده از سنجش لوسیفراز برای تایید میان‌کنش بین miRNA و RNA ژنومی ویروس هپاتیت C (HCV) ژنوتیپ 1b به منظور سرکوب تکثیر این ویروس است.

مواد و روش‌ها: قطعات ژنومی *NS5B* از ژنوم ویروس هپاتیت C به عنوان ناحیه MRE درون وکتور psiCHECK-2-TM ساب‌کلون شد. بیان نسبی وکتورهای لنتی ویروس بیان‌کننده miRNA در سلول Huh7.5 از طریق میکروسکوپ فلورسانس و real-time PCR ارزیابی شد. لنتی ویروس بیان‌کننده *let-7b* به سلول‌های Huh7.5 ترانسداکت شد. *NS5B-psiCHECK-2-TM* (MRE) به سلول Huh7.5 مورد نظر ترانسفکت شد. به کمک کیت سنجش دوگانه لوسیفراز بیان نسبی لوسیفراز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: با استفاده از لنتی ویروس‌های بیان‌کننده *let-7b* شرایط بیان بالا و دایمی از *let-7b* در سلول مورد نظر ایجاد شد. از سوی دیگر اتصال اختصاصی توالی پاسخ دهنده (*NS5B*) به میکرو RNA *let-7b* با کاهش نور لوسیفراز نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: برای حفظ بیان بالا و پایدار میکرو RNAها در سلول از وکتورهای لنتی ویروس استفاده می‌شود. استفاده از سنجش لوسیفراز یکی از مناسب‌ترین روش‌های تایید میان‌کنش بین miRNA-mRNA است که می‌تواند برای ژن‌های ویروسی دیگر با میکرو RNAهای متفاوت استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: لوسیفراز، miRNA، HCV، لنتی ویروس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۳۱

*نویسنده مسئول: maryam.shafaati@gmail.com

مقدمه

طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیش از صد و هفتاد میلیون نفر در سراسر جهان به طور مزمن به ویروس هپاتیت C آلوده هستند که خود خطر ابتلا به سیروز و سرطان کبد (HCC) ناشی از ویروس هپاتیت C را افزایش می‌دهد [1]. استقبال پایین

در استفاده از درمان‌های ترکیبی مبنی بر پگ- اینترفرون با ریبوورین در بین بیماران باعث شده است تا استراتژی‌های جدید و مناسبی برای درمان مطرح شود [2]. تکثیر ویروس هپاتیت C تا حد زیادی وابسته به بلوغ پیش‌سازهای پلی‌پروتئین ویروسی است که به ۱۰ پروتئین ویروسی (NS3-NS2-p7-E2-E1-C-NH₂-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH) شکافته می‌شود. در این میان پروتئین غیرساختاری NS5B یک آنزیم کلیدی و مهم است که در روند تکثیر ویروس نقش مهمی را بر عهده دارد [3, 4]. NS5B به عنوان RNA پلی‌مراز وابسته به RNA در پردازش ژنوم ویروس هپاتیت C و ایجاد رشته الگوی منفی دخالت دارد. ساختار این پروتئین در میان تمام ژنوتیپ‌های این ویروس حفاظت شده است. این آنزیم دارای دو جایگاه یکی برای اتصال به ترکیبات نوکلئوتیدی و دیگری برای اتصال ترکیبات غیرنوکلئوتیدی است [5]. عدم وجود مدل‌های حیوانی قوی، همواره مانعی برای بررسی و غربالگری داروهای ضد ویروسی در داخل بدن است [6].

اخیراً میکرو RNAها (miRNAs) یک رویکرد نوین در درمان محسوب می‌شوند [7]. میکرو RNAها مولکول‌های RNA غیرکدکننده کوچک، درون‌زا، تک‌رشته‌ای با ۲۲ نوکلئوتید هستند که عمدتاً با اتصال به ناحیه ۳' UTR از mRNA هدف بیان و عملکرد ژن را در یک توالی خاص تنظیم می‌کنند [7]. میکرو RNAها بیان ژن‌ها را از طریق مهار ترجمه یا سرعت‌بخشیدن به تخریب mRNA تنظیم می‌کنند [8]. آنها از ژنوم رونویسی می‌شوند و تحت فرآیند پس از ترجمه بالغ می‌شوند که مسیر تکامل miRNA نامیده می‌شود. میکرو RNAها بیش از ۳۰٪ کل ژن‌ها را کنترل می‌کنند، بنابراین به طور تقریبی در هر مسیر ژنتیکی درگیر هستند [9]. miRNAها در توسعه فرآیندهای بیولوژیکی شناخته شده‌اند و در حال حاضر به عنوان بیومارکر در تشخیص و ریسک ابتلا به بیماری‌ها شناخته می‌شوند. همچنین در فرآیندهای بیولوژیکی، زمان رشد و نمو، تکثیر، تمایز، متابولیسم، ترمیم، پیری، مرگ سلولی و سرطان کاربرد دارند [10]. به عنوان اولین سری از داروهایی که به طور مستقیم ژنوم ویروس هپاتیت C را هدف قرار می‌دهند می‌توان به Miravirsen اشاره کرد که یک نوع microRNA است. این دارو، آنتاگونیست miR-122 است که سبب مهار ترجمه ژنوم ویروس می‌شود و در فاز ۲ (IIa) کلینیکال تریال (آزمایشات بالینی) به سر می‌برد. miR-122 به صورت اختصاصی به ناحیه ۵' UTR ژنوم ویروس اتصال می‌یابد و به تکثیر ویروسی و افزایش سنتز پروتئین‌های ویروسی کمک می‌کند. داروی Miravirsen الیگونوکلئوتید آنتی‌سنس برای miR-122 است که با مسدود کردن این مسیر سبب کاهش سطح RNA ویروسی در عفونت‌های مزمن ویروس هپاتیت C با ژنوتیپ ۱ می‌شود [11]. میکرو RNAها با بسیاری از بیماری‌های انسانی از جمله سرطان و عفونت‌های ویروسی مرتبط هستند و شناسایی آنها به عنوان یکی از اهداف بالقوه برای کشف دارو لحاظ شده است [12].

(Invitrogen؛ ایالات متحده) کشت داده شد و درون انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷°C نگهداری شد. هر دو تا سه روز یکبار محیط کشت سلول بررسی شد.

آماده سازی پلاسمید بیانی pCon-1

وکتور pCon-1 حاوی ژنوتیپ 1b از ویروس هپاتیت C توسط دکتر روانشاد (دانشگاه تربیت مدرس تهران؛ ایران) اهدا شد. وکتور به روش ماکسی پریپ از *E. coli* سویه DH5α استخراج شد. کیفیت و غلظت DNA استخراج شده به کمک ژل الکتروفورز و اندازه گیری جذب نوری (OD) در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به کمک دستگاه نانودراپ (Thermo؛ ایالات متحده) تایید شد.

آماده سازی سازه های MRE

طراحی پرایمر به منظور تکثیر ژن NS5B

توالی ژن NS5B از ژنوم ویروس هپاتیت C ژنوتیپ 1b با ACC: AJ238799 از پایگاه NCBI گرفته شد. به کمک نرم افزار Gene Runner 6 پرایمرهای سنس و آنتی سنس برای این ژن طراحی شدند. کارآزمایی پرایمرهای مورد نظر تایید و در نهایت بلاست شد. توالی پرایمرهای ناحیه MRE از ژن NS5B به ترتیب شامل ۳' - ۵' (NS5B): CTGAGCTTGTGCGTTATCTGTGAAAG R (NS5B): ۳' - ۵' CTGAGGGCCATGGAGTCGTTG- حاوی سایت برشی آنزیم محدودالتر Xho-1 (Invitrogen؛ ایالات متحده) بود. تکثیر ژن ها به کمک روش PCR با برنامه دمایی ۹۴°C (۱۰ دقیقه)، ۹۴°C (۴۵ ثانیه)، ۶۲/۵°C (۴۵ ثانیه) و ۷۲°C (۴۵ ثانیه) در ۳۵ سیکل انجام شد. مطابق روش کلونینگ TA قطعات تکثیری NS5B درون وکتور pTZ57R/T پس از هضم آنزیمی کلون شدند و غربالگری کلونی های آبی- سفید انجام و در نهایت توالی یابی به کمک پرایمرهای M13 (ماکروژن؛ کره جنوبی) تایید شد.

ساب کلونینگ ژن NS5B درون وکتور psiCHECK-2-TM

به منظور ایجاد سازه ژنتیکی NS5B/psiCHECK-2، وکتور psiCHECK-2-TM و قطعه ژنی استخراج شده از کلونینگ وکتور ایجاد شده در مرحله قبل در مقیاس بالا تحت فرآیند هضم آنزیمی قرار گرفتند و مطابق پروتکل درون وکتور مذکور ساب کلون شد و در نهایت توسط PCR و توالی یابی کلون صحت با چرخش صحیح انتخاب و تایید شد.

تهیه و آماده سازی رده سلولی Huh7.5 حاوی لنتی ویروس های بیان کننده میکروRNA های let-7b (Huh7.5/let-7b) و سلول کنترل آن (Huh7.5/mock)

ترانس داکشن لنتی ویروس های بیان کننده let-7b و mock به درون سلول Huh7.5

لنتی ویروس بیان کننده میکروRNA *let-7b* و وکتور لنتی ویروس mock (Biosettia؛ ایالات متحده) طبق دستورالعمل توسط ۸ میکروگرم بر میلی لیتر پلی برن به درون سلول ترانسداکت شدند. سلول های حاوی لنتی ویروس ها با بیان پایدار از میکروRNA های

با توجه به داده های پایگاه بیوانفورماتیک ViTa [13] تکثیر و همانندسازی ویروس هپاتیت C در سلول های Huh7.5 توسط میکروRNA انتخابی *let-7b* سرکوب یا کاهش می یابد [14]. میکروRNA *let-7b* به عنوان یک تنظیم کننده منفی در سلول های کبد با تعامل بین دو ناحیه از ژنوم ویروس هپاتیت C شامل نواحی کدکننده 5' UTR و NS5B، تجمع ذرات ویروسی را کاهش می دهد [14]. شناسایی پیش ساز میکروRNA *let-7b* به مطالعات *C. elegans* مرتبط است که بعداً در خانواده RNA های کوچک غیرکدکننده به نام microRNAها طبقه بندی شد [15]. شفاعتی و همکاران نشان دادند که میکروRNA های سرکوبگر ژنوم ویروس هپاتیت C در هر ژنوتیپ به ناحیه متفاوتی از ژنوم متصل می شوند و عملکرد میکروRNA های کبدی در ژنوتیپ های مختلف ویروس هپاتیت C متفاوت است [16]. آزمون دوگانه لوسیفراز (dual luciferase assay) یکی از راه های تعیین میان کنش مستقیم بین میکروRNAها با ناحیه 3' UTR ژن های هدف (MRE: miR responded element) است. اگر اتصال به این ناحیه با جفت بازهای بالایی رخ دهد، ترجمه mRNA هدف تخریب می شود، اما اگر اتصال با بازهای جفت شده کمتری رخ دهد از ترجمه یا رونویسی mRNA هدف جلوگیری می شود [17]. در مطالعه حاضر، از یک سیستم سنجش دوگانه گزارشگر مبتنی بر لوسیفراز کرم شب تاب استفاده شد. هدف از این مطالعه استفاده از روش لوسیفراز برای نشان دادن میان کنش اختصاصی بین miRNA و mRNA هدف است. در نهایت هدف از این مطالعه استفاده از میکروRNA های انتخابی در سلول های رده Huh7.5 آلوده به رپلیکون HCV (که به طور بالقوه HCVcc نامیده شدند) به منظور کاهش همانندسازی ویروس هپاتیت C است.

مواد و روش ها

بررسی داده های پایگاه بیوانفورماتیکی ViTa و مقالات قبلی به منظور یافتن ناحیه هدف میکروRNA انتخابی

با بررسی مقالات پیشین و داده های موجود در منابع در دسترس از جمله پایگاه اطلاعاتی miRBase و TargetScan آن دسته از میکروRNAهایی که به صورت بالقوه سبب کاهش تکثیر ویروس هپاتیت C شده اند، در نظر گرفته شد. با در نظر گرفتن امتیاز داده های ViTa به میکروRNAها، *let-7b* انتخاب شد. همچنین مشخص شد که *let-7b* بر روی دو ناحیه از ژنوم ویروس (NS5B و 5' UTR) به صورت بالقوه توانایی مهار ژنوم ویروس را دارد.

کشت رده سلولی Huh7.5

رده سلولی Huh7.5 با توافق آقای دکتر مایک پیرس (نیویورک؛ ایالات متحده) توسط دکتر حسینی (دانشگاه علوم پزشکی شیراز؛ ایران) اهدا شد. *Huh7.5/let-7b* و *Huh7.5/mock* در محیط DMEM (Gibco؛ ایالات متحده) حاوی ۱۰% سرم جنین گاو (FBS)، ۱/۱۰ مولار (Invitrogen؛ ایالات متحده)، ۵/۱۰۰% ال-گلوتامین و ۱% (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) آنتی بیوتیک پن استرپ

یافته‌ها

ژنوم ویروس هپاتیت C شامل توالی‌های هدف **let-7b**

به منظور پیداکردن ناحیه مکمل با میکروRNA مذکور در ژنوم تام ویروس هپاتیت C ژنوتیپ 1b (pCon-1 Gene Bank Accession No: AJ238799 in ViTa virus miRNA target) از داده‌های پایگاه بیوانفورماتیک ViTa استفاده شد (شکل ۱).

توالی هدف miRNA در ژن *NS5B* از ژنوتیپ 1b ویروس هپاتیت C از پایگاه داده‌های بیوانفورماتیک ViTa استخراج شد. با توجه به اطلاعات پایگاه داده‌های ViTa، بیان میکروRNA **let-7b** در بافت کبد با حداقل انرژی آزاد (Mfe) ۲۰- کیلوکالری بر مول با امتیاز ۱۶۹ از ViTa بود. ناحیه کلون شده از ژن *NS5B* که **let-7b** آن را مورد هدف قرار می‌دهد شامل توالی نوکلئوتیدی ۸۹۶۲ تا ۸۹۸۰ است. ناحیه میان‌کنش miRNA-mRNA در شکل ۲ نشان داده شده است.

تهیه پلاسمید نوترکیب **NS5B/psiCHECK-2**

برای تهیه پلاسمید نوترکیب NS5B/psiCHECK-2، ابتدا طی واکنش PCR، قطعه ژنومی ۴۶۵ جفت بازی از ژن *NS5B* با الگو قراردادن DNA پلاسمیدی pCon-1 تهیه شد (شکل ۳). در مرحله دوم ژن مذکور به درون وکتور کلونینگ pTZ57R/T کلون شد که نتایج حاصل از بررسی حضور ژن *NS5B* در درون این وکتور پلاسمیدی در شکل ۴ نشان داده شده است. در نهایت نتایج حاصل از هضم آنزیمی سازه ژنتیکی NS5B/psiCHECK-2 و تایید وجود ژن *NS5B* به‌عنوان ژن MRE با چرخش صحیح در شکل ۵ نشان داده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل ۱٪ آگارز تولید پلاسمیدهای نوترکیب را تایید کرد.

تایید القای سلول **Huh7.5** با لنتی‌ویروس‌های بیان‌کننده **let7b** و **mock** و ایجاد رده‌های سلولی **Huh7.5/let7b** و **Huh7.5/mock**

به دلیل وجود ژن بیان‌کننده رنگ فلورسانس قرمز (ان-استیل پرومپتین ترانسفران) در ساختار ژنی وکتورهای لنتی‌ویروس شرکت بیوستیا، ایجاد رده‌های سلولی **Huh7.5/let7b** و **Huh7.5/mock** با کمک میکروسکوپ رد فلورسانس در طول موج ۶۱۰/۵۸۷ نانومتر مورد تایید قرار گرفت (شکل ۶).

ازدیاد بیان **let-7b** در سلول‌های **Huh7.5** و مهار بیان **NS5B** از طریق سنجش لوسیفراز

میان‌کنش بین *NS5B* و **let-7b** در سلول **Huh7.5** سبب کاهش نور لوسیفراز شد. کاهش نور گزارشگر رنیلا، بیان ژن *NS5B* را به‌طور چشمگیری کاهش داد و نشان داد که اتصال مناسب بین ناحیه ژنی MRE و میکروRNA مذکور وجود دارد. فعالیت رنیلا لوسیفراز به‌عنوان شاخص اثر ۳' UTR بر روی پایداری ترجمه محسوب شد. گزارشگر کرم شب‌تاب به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی متغیرها استفاده شد. داده‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p < 0.001$). نرمال‌سازی داده‌ها با سه بار تکرار به کمک

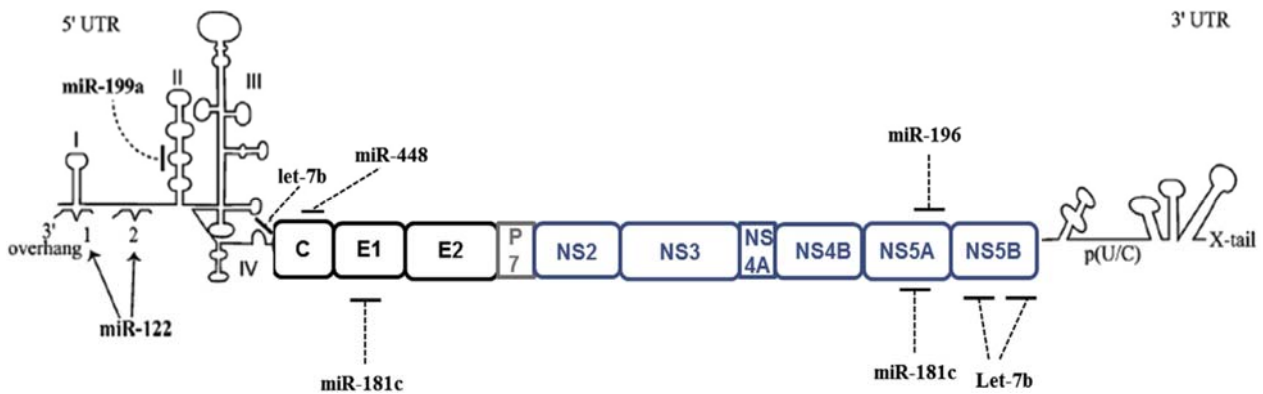
مذکور در حضور پرومپتین (۱/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ایزوله و کشت داده شدند. شاخص تعدد عفونت (MOI) برابر ۳ به ازای هر ۱۰۰۰ سلول در یک میلی‌لیتر برای هر یک از وکتورهای لنتی‌ویروس (سیگما آلدیج؛ ایالات متحده) در نظر گرفته شد. به‌منظور تایید ترانس‌داکشن لنتی‌ویروس‌ها به سلول از میکروسکوپ رد فلورسانس (BioTek؛ ایالات متحده) در طول موج ۵۷۸ به ۶۱۰ نانومتر استفاده شد. تیتراژ لنتی‌ویروس‌ها با روش Real time PCR و به کمک کیت کمی بن‌میر q-PCR (stem cell stech) و همچنین کیت سنتز cdNA آن، پس از استخراج RNA تام با TriZol (Invitrogen؛ ایالات متحده) تعیین شد. با کیت سنتزی بن‌میر BON-miR 1st-strand cDNA synthesis kit (بن‌یاخته؛ ایران)، واکنش پلی‌آدنیلایسون و سپس رونویسی معکوس میکروRNAها انجام و RNA پلی‌آدنیل به cdNA مربوطه آماده QPCR تبدیل شد و در نهایت، با استفاده از کیت High-Specificity miRNA QPCR Core Reagent Kit (بن‌یاخته؛ ایران) و با کمک پرایمر رفت اختصاصی BON-miR موجود، qRT-PCR برای miRNA مورد نظر انجام شد. در کیت مورد استفاده، پرایمر برگشت برای تمام میکروRNAها یونیورسال طراحی می‌شود. از طرف دیگر کنترل داخلی U6 (ژن خانه‌نگهدار در بیان نسبی miRNAs) برای اندازه‌گیری بیان نسبی میکروRNAها به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد استفاده قرار گرفت.

ترانسفکشن پلاسمیدهای نوترکیب **NS5B/psiCHECK-2** و **GAPDH/psiCHECK-2** به رده‌های سلولی **Huh7.5/mock**، **Huh7.5/let7b** و **Huh7.5/mock** نرمال

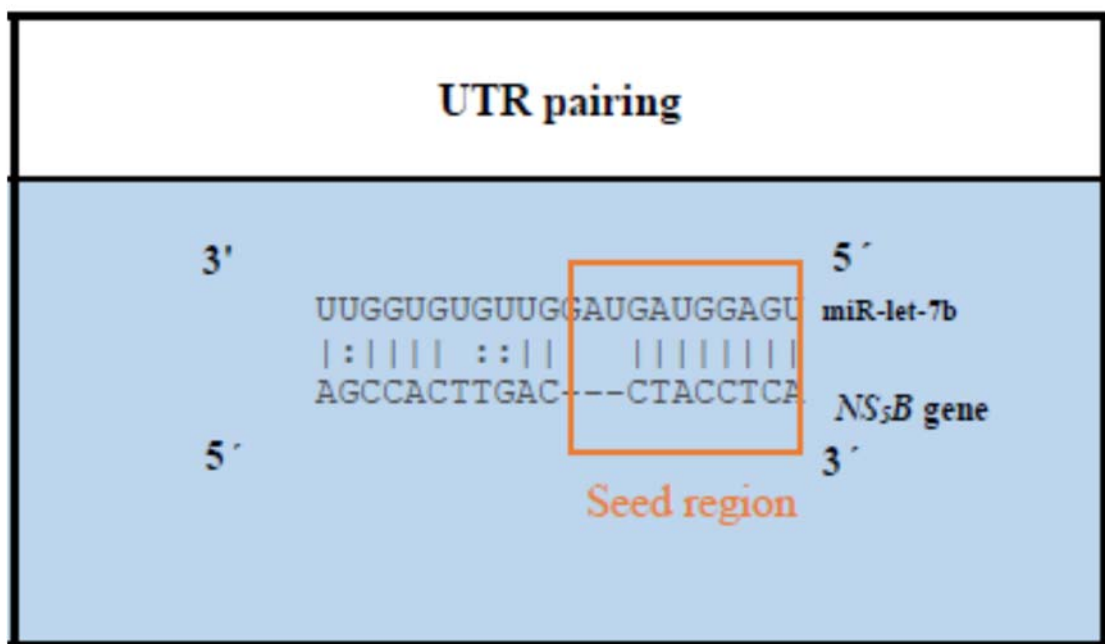
به کمک دستورالعمل لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen؛ ایالات متحده) سازه‌های ژنتیکی NS5B/psiCHECK-2 و GAPDH/psiCHECK-2 (اهدایی توسط آقای دکتر آتشی از دانشگاه تربیت مدرس تهران؛ ایران)، به‌عنوان کنترل داخلی به رده‌های سلولی **Huh7.5/mock**، **Huh7.5/let7b** و **Huh7.5** نرمال ترانسفکت شدند.

آزمون سنجش دوگانه لوسیفراز

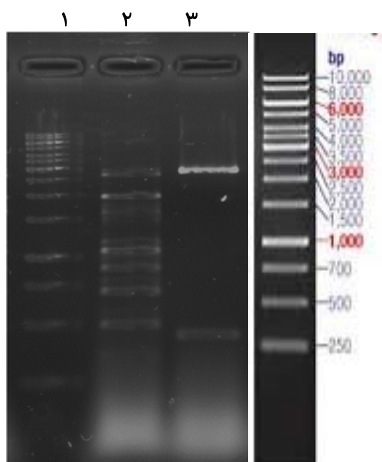
برای انجام آزمون دوگانه لوسیفراز از کیت dual Luciferase reporter assay system (Promega؛ ایالات متحده) استفاده شد. به‌طور خلاصه یک روز قبل از القا 1×10^5 از هر کدام از رده‌های سلولی تهیه‌شده در دو ردیف از یک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. طبق دستورالعمل کیت لوسیفراز مراحل مختلف آزمایش انجام شد و در نهایت میزان نور منتشرشده با کمک دستگاه لومینومتر POLARstar Omega (BMG LABTECH؛ آلمان) مورد سنجش قرار گرفت. سنجش لوسیفراز از تقسیم نسبت کرم شب‌تاب به رنیلا و نرمال‌سازی داده‌ها آنالیز شد. تمام آزمایشات با حداقل سه بار تکرار به کمک آزمون‌های آماری تی‌تست مستقل، من‌ویتنی و آنووا در SPSS 16 و Graph Pad prism 6 انجام شدند. در تمام آزمون‌ها اختلاف معنی‌دار بین بازه مورد قبول $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.



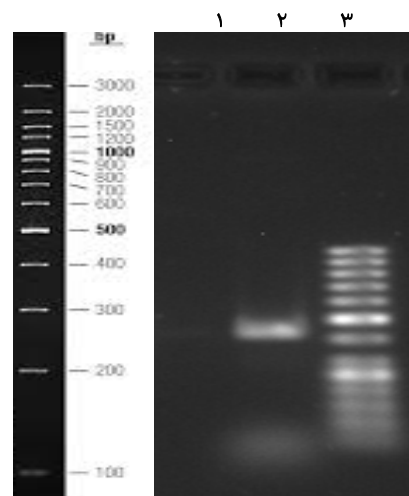
شکل ۱) نواحی هدف میکروRNA سلولی let-7b بر روی ژنوم ویروس هپاتیت C



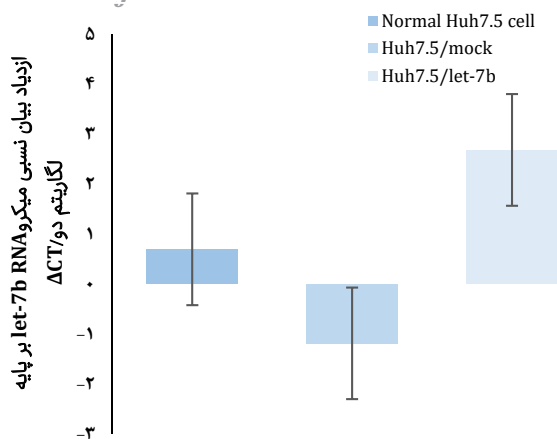
شکل ۲) نواحی هدف میکروRNA سلولی let-7b بر روی ژنوم ویروس هپاتیت C



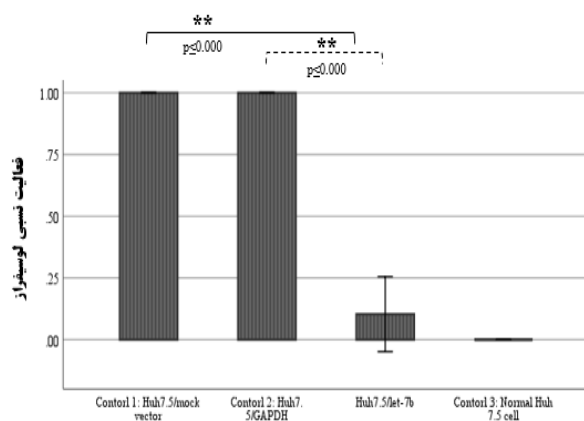
شکل ۴) هضم آنزیمی با آنزیم محدودالتر Xho-1 برای کلون T.A-NS5B؛ ستون ۳ نمایش‌دهنده کلون TA-NS5B و ستون ۱ DNA ladder با اندازه یک کیلوباز و اندازه باند وکتور (pTZ57R/T), TA, ۲۸۸۶ جفت باز بود.



شکل ۳) تکثیر ژن NS5B با روش PCR؛ اندازه قطعه ژن NS5B برابر ۴۶۵ جفت باز (ستون دوم) و اندازه DNA ladder در ستون سوم ۵۰۰ جفت باز بود.

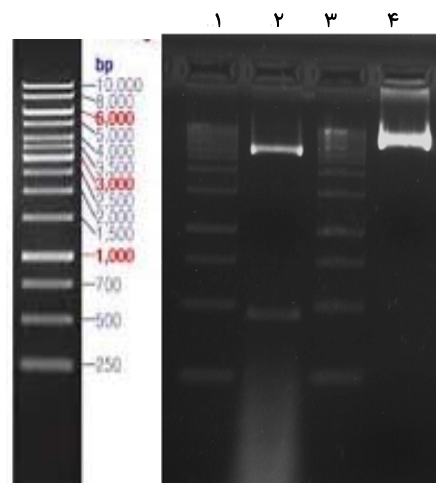


نمودار ۱ بیان let-7b در سلول‌های Huh7.5؛ آنالیز بیان نسبی میکروRNA با Real-time PCR Relative نشان داد که سطح بیان میکروRNA در حالت پس از القا چندین برابر بیشتر از حالت قبل از القا به سلول است.

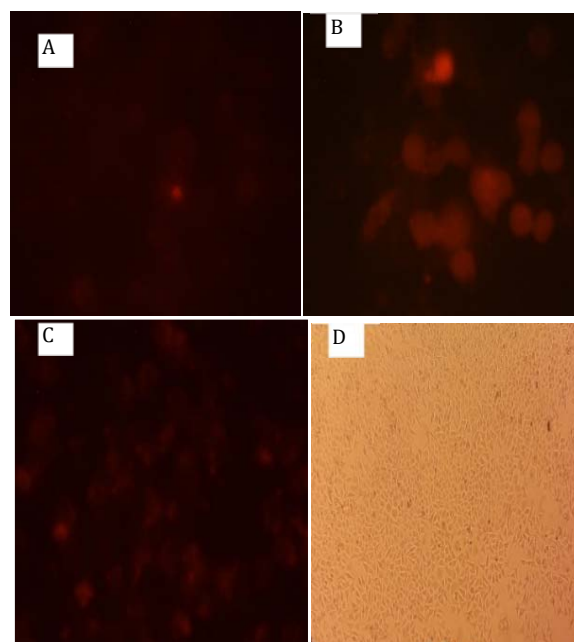


نمودار ۲ سنجش گزارشگر لوسیفراز در شرایط آزمایشگاهی و میان‌کنش NS5B-let-7b؛ ستون اول (کنترل ۱): سنجش دوگانه لوسیفراز بین قطعه کلون شده NS5B و وکتور لنتی ویروس mock؛ ستون دوم (کنترل ۲): سنجش دوگانه لوسیفراز بین mRNA ژن GAPDH با let-7b؛ ستون سوم: سنجش دوگانه لوسیفراز بین NS5B-let-7b؛ ستون چهارم (کنترل ۳): سلول Huh7.5 طبیعی؛ ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری است (p < 0.01).

نمودار ۲ سنجش گزارشگر لوسیفراز در شرایط آزمایشگاهی و میان‌کنش NS5B-let-7b را نشان می‌دهد. بیان نسبی سنجش لوسیفراز از نسبت لوسیفراز کرم شب‌تاب به رنیلا لوسیفراز به دست آمد و با سلول Huh7.5 حاوی لنتی ویروس mock (کنترل ۱)، سلول Huh7.5 حاوی سازه GAPDH/psiCHECK-2 (کنترل ۲) و سلول Huh7.5 نرمال (کنترل ۳) مقایسه شد. اختلاف معنی‌دار و نرمال‌سازی همه داده با سه بار تکرار از طریق آزمون آنووا و من‌ویتنی (p < 0.01) محاسبه شد. در نمودار ۲، ستون اول (کنترل ۱)، سنجش دوگانه لوسیفراز بین قطعه کلون شده NS5B و وکتور لنتی ویروس mock بود که با افزایش فعالیت لوسیفراز ارتباط داشت. ستون دوم (کنترل ۲)، سنجش دوگانه لوسیفراز بین



شکل ۵ هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالثر و تولید سازه‌های MRE؛ آنزیم برشی Xho-1 برای کلون pSiCHECK2-NS5B (ستون ۲) نشان داده شد. ستون‌های ۱ و ۳ با اندازه یک کیلوباز و ستون ۴ نشان‌دهنده کلون pSiCHECK2-NS5B بدون هضم آنزیمی بود (حالت خطی). اندازه باند وکتور psiCHECK-2-NS5B برابر با ۶۲۷۳ جفت باز بود.



شکل ۶ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های Huh7.5 ترانسداکت شده با let-7b و وکتور mock: A و B: مورفولوژی و صحت ترانسداکت میکروRNAها به سلول از طریق نشر نور قرمز فلورسانس نشان داده شد؛ C: سلول کنترل Huh7.5 بدون نشر نور فلورسانس قرمز بود. D: مورفولوژی سلول‌های Huh7.5 در زیر میکروسکوپ معکوس را نشان می‌دهد.

ازدیدیاد سطح بیان let-7b در رده سلولی Huh7.5/let7b در مقایسه با رده سلولی Huh7.5/mock و Huh7.5 نرمال
سطح بیان let-7b در رده سلولی Huh7.5/let7b در مقایسه با رده‌های سلولی Huh7.5/mock و Huh7.5 نرمال ۶/۵ برابر افزایش یافت (به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ؛ نمودار ۱).

ویروس هپاتیت C داشت. به همین منظور درون وکتور psiCHECK-2 بعد از ژن گزارشگر رنیلایک توالی پاسخ‌دهنده به میکروRNA درج شد تا امکان اندازه‌گیری سطح بیان let-7b به توالی هدف خود روی ژنوم ویروس هپاتیت C و عملکرد آن فراهم شود. موراکامی و همکاران از روش لوسیفراز برای اتصال miRNA با نواحی مکمل خود در ژنوم ویروس هپاتیت C استفاده کردند. آنها نشان دادند که استفاده از miR-199a به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی سبب کاهش تکثیر ویروس هپاتیت C ژنوتیپ 1b و 2a می‌شود^[4]. ویلسون و همکاران نشان دادند که کاهش بیان لوسیفراز وابسته به سطح بیان پروتئین آرگونات از میکروRNA ۱۲۲ باعث افزایش RNA-HCV می‌شود^[21]. وانگ و همکاران نشان دادند که miR-199a-5p سبب کاهش تکثیر ویروس هپاتیت C می‌شود^[24]. یکی از مزایای استفاده از گزارشگر دوگانه لوسیفراز کارایی تغییرات در زمان ترانسفکشن ژن‌ها به سلول است. از این روش به‌راحتی می‌توان برای سایر رده‌های سلولی و میکروRNAهای دیگر استفاده کرد^[22]. کاهش نور لوسیفراز اندازه‌گیری شده نشان‌دهنده اتصال صحیح بین سلولی Huh7 استفاده کرد. کندی و همکاران از روش لوسیفراز در رده سلولی Huh7 استفاده کردند که به‌طور پایدار سیستم گزارشگر miR-122 را بیان می‌کرد. با استفاده از این رده سلولی پایدار به جای ترانسفکشن گذرا هم زمان و هزینه کمتری را داشت و هم تغییرات مربوط به ترانسفکشن موقت و دستکاری‌های اضافی را حذف می‌کرد. همچنین آنها گزارش کردند که ایجاد این رده سلولی تنها به سلول Huh7 و miR-122 معطوف نمی‌شود بلکه برای هر رده سلولی و میکروRNA دیگری قابل انجام است^[12]. از نتایج سنجش لوسیفراز در این مطالعه برای کاهش لود ویروس هپاتیت C ژنوتیپ 1b در رده سلولی Huh7.5/HCVcc استفاده شد^[21]. در نتیجه روش آزمون دوگانه لوسیفراز امکان نظارت کنتیک ژن‌های ویروسی با mRNAهای هدف خود را در سلول‌های زنده مانند شرایط کشت آزمایشگاهی فراهم می‌کند. از این روش برای غربالگری ترکیبات ضدویروسی به ناحیه هدف خود نیز استفاده می‌کنند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مرکز میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی شیراز که بودجه این طرح را تامین کرد و همچنین از همکاران بخش ویروس‌شناسی این مرکز و به‌طور ویژه از سرکار خانم ماندانا نماینده به‌خاطر کمک شایان خود در پیشبرد این مطالعه کمال تشکر و سپاسگزاری را ابراز می‌دارند. همچنین از حمایت‌های آقای دکتر مازیار صیایان، تشکر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم شفاعتی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵٪): مرضیه جمالی دوست (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۳۵٪): محمد کارگر

mRNA ژن GAPDH با let-7b را نشان داد که به‌دلیل عدم اتصال miRNA-mRNA با افزایش فعالیت لوسیفراز ارتباط داشت. ستون سوم سنجش دوگانه لوسیفراز بین NS5B-let-7b را نشان داد که به‌دلیل اتصال miRNA-mRNA فعالیت لوسیفراز کاهش چشمگیری مشاهده شد. ستون چهارم (کنترل ۳) دارای سلول Huh7.5 طبیعی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

ژنوم ویروس هپاتیت C از جنس RNA تک‌رشته‌ای با حس مثبت است که به‌عنوان mRNA و الگوی تکثیر عمل می‌کند. تخریب RNA ویروس سبب عدم تولید مستقیم پروتئین‌های ویروسی و همانندسازی آن می‌شود^[18]. مطالعات نشان داده‌اند که میکروRNAها با ماهیت ssRNA می‌توانند بر روی مسیر همانندسازی ویروس‌ها و دیگر مسیرها تاثیر بگذارند^[19] که این اثر گاهی می‌تواند به شکل تنظیم مثبت باشد (مانند آنچه در مورد miR-122 وجود دارد و سبب افزایش تکثیر ویروس هپاتیت C می‌شود) [11, 20] و گاهی نیز در قالب تنظیم منفی عمل می‌کنند و سبب سرکوب یا کاهش تکثیر ویروس HCV می‌شوند^[21]. در مطالعه حاضر، میکروRNA انتخاب شده let-7b با توجه به نتایج بیوانفورماتیک که در مرحله اول مطالعه انجام شد، دارای اثر کاهشی یا سرکوبگری بر روی ژنوم ویروس هپاتیت C بود. میکروRNAهای دارای تنظیم‌کنندگی منفی بر روی همانندسازی ویروس هپاتیت C، خود کاندیدی برای داروهای ضدویروسی در آینده‌ای نزدیک هستند^[13]. از آنجا که محصول توالی ژنی NS5B در همانندسازی ویروس هپاتیت C نقش پررنگی دارد، انتخاب میکروRNAهایی که این توالی ژنی را مورد هدف قرار دهند و از طرفی خود نقش سرکوبگری در تکثیر ویروس هپاتیت C داشته باشند از دلایل مهم انتخاب let-7b در این مطالعه بود.

وکتورهای مبتنی بر لنتی ویروس سبب بیان طولانی‌مدت ترانس ژن درون بسیاری از سلول‌ها مانند سلول‌های مغز استخوان، سلول‌های کبدی، ماهیچه‌ای و غیره می‌شوند. آنها می‌توانند طیف بسیاری از سلول‌های تقسیم‌شونده و غیرتقسیم‌شونده را آلوده کنند^[22]. از این خواص برای انتقال ژن‌های RNA کوچک مانند siRNA و miRNA استفاده می‌شود. در این مطالعه نیز برای القای let-7b از وکتور لنتی ویروس استفاده شد.

آزمون دوگانه لوسیفراز یا تولید نور بیولومینسانس در سیستم‌های زیستی توسط آنزیم لوسیفراز کاتالیز می‌شود. به‌دلیل حساس بودن آنزیم فوق به دما و سطح پایین پیش‌ماده لوسفرین استفاده آن در محیط زنده با محدودیت روبه‌رو است^[23]. به‌دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز کرم شبتاب بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. وانگ و همکاران از سیستم آزمون دوگانه گزارشگر مبتنی بر لوسیفراز کرم شبتاب استفاده کردند^[2]. سلول کبدی Huh7.5 فاقد نشر نور لوسیفراز است. در این مطالعه از میکروRNA let-7b استفاده شد که نقش بازدارندگی بر روی تکثیر

molecule inhibitors of microRNA function. *J Biomol Screen*. 2012;17(6):822-8.

13- vita.mbc.nctu.edu.tw [Internet]. Hsinchu: National Chiao Tung University; 2006 [cited 2017 July 9]. Available from: <http://vita.mbc.nctu.edu.tw>

14- Cheng JC, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, et al. Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(15):2621-33.

15- Rougvie AE. Control of developmental timing in animals. *Nat Rev Genet*. 2001;2(9):690-701.

16- Shafaati M, Jamalidoust M, Ziyaeyan M, Kargar M, Arefian E. Liver micro-RNAs and their role in different HCV genotype infections. *Pathobiol Res*. 2018;20(4):1-19. [Persian]

17- Alipour BS, Hosseinkhani S, Ardestani SK, Moradi A. The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase. *Photochem Photobiol Sci*. 2009;8(6):847-55.

18- Du J, Zhao F, Zhou Y, Yan H, Duan XG, Liang SQ, et al. Bioluminescence imaging allows monitoring hepatitis C virus core protein inhibitors in mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e14043.

19- Gupta P, Cairns MJ, Saksena NK. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Virology*. 2014;11(1):64.

20- Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono Ch, Katoh H, Morita E, et al. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2012;86(15):7918-33.

21- Wang H, Gao H, Duan Sh, Song X. Inhibition of microRNA-199a-5p reduces the replication of HCV via regulating the pro-survival pathway. *Virus Res*. 2015;208:7-12.

22- Houdebine LM. Design of vectors for optimizing transgene expression. In: Pinkert CA, editor. *Transgenic animal technology*. 3rd Edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. pp. 489-511.

23- Chan CH, Yu TH, Wong KB. Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding. *PloS One*. 2011;6(6):e21624.

24- Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD. Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol*. 2011;85(5):2342-50.

(نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۰٪)؛ احسان عارفیان (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ فرشید کفیلزاده (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۰٪)

منابع مالی: حمایت مالی مطالعه حاضر بر عهده مرکز میکروبیوشناسی بالینی استاد البرزی شیراز بوده است.

منابع

- 1- Binkowski B, Fan F, Wood K. Engineered luciferases for molecular sensing in living cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(1):14-8.
- 2- Wang L, Fu Q, Dong Y, Zhou Y, Jia Sh, Du J, et al. Bioluminescence imaging of Hepatitis C virus NS3/4A serine protease activity in cells and living animals. *Antivir Res*. 2010;87(1):50-6.
- 3- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453-63.
- 4- Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol*. 2009;50(3):453-60.
- 5- Pockros PJ. New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection. *Ther Adv Gastroenterol*. 2010;3(3):191-202.
- 6- Mortazavi M, Hosseinkhani S. Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops. *Protein Eng Des Sel*. 2011;24(12):893-903.
- 7- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;39(suppl-1):D152-7.
- 8- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327(5962):198-201.
- 9- Deiters A. Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. *AAPS J*. 2010;12(1):51-60.
- 10- Li L, Xu J, Yang D, Tan X, Wang H. Computational approaches for microRNA studies: A review. *Mamm Genome*. 2010;21(1-2):1-12.
- 11- Shrivastava Sh, Steele R, Ray R, Ray RB. MicroRNAs: Role in hepatitis C virus pathogenesis. *Genes Dis*. 2015;2(1):35-45.
- 12- Connelly CM, Thomas M, Deiters A. High-throughput luciferase reporter assay for small-