خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۴ زمستان ۹۱ (۳۹۰-۳۸۰)

مقاله پژوهشی

بررسی ترانسفکت وکتورهای نوترکیب آدنوویروسی فاقد ژن گزارشگر و تیتراسیون آن با روش‌های مولکولی: راهنمای عملی

کامران عطاردی[۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، حسن ابوالقاسمی[۳]، ناصر امیری‌زاده[۴]، مهریار حبیبی رودکنار[۵]، غلامرضا خمیسی‌پور[۶]

چکیده

سابقه و هدف

خصوصیات بیولوژی آدنوویروس، آن را به وکتوری مناسب در تحقیقات پایه به عنوان ابزار انتقال ژن و هم چنین در درمان بالینی بسیاری از بیماری‌ها و واکسیناسیون مبدل کرده است. در این مطالعه، ترانسفکشن آدنوویروس فاقد ژن گزارشگر و هم چنین تیتراسیون آن به وسیله روش‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، پس از ساخت آدنوویروس نوترکیب، وجود ترانس ژن در سازه ژنی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن با روش PCR و هم چنین تعیین توالی ارزیابی شد. به منظور پایش ترانسفکشن، DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. تیتر ویروس به روش Real-time PCR و با استفاده از آغازگرهای تشخیصی بر روی DNA استخراج شده از لیزات ویروس تعیین شد.

یافته‌ها

وجود ترانس ژن در سازه ژنی نوترکیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن و هم چنین تعیین توالی تایید شد. بررسی DNA استخراج شده از سلول‌های HEK 293A ترانسفکت شده، موفقیت کیفی ترانسفکشن را مورد تایید قرار داد و هم چنین تعداد ذرات ویروس با استفاده از Real-time PCR حدود ۵×۱۰^{۷} در واحد حجم(میلی‌لیتر) برآورد شد.

نتیجه گیری

با طراحی و مهندسی هدفمند آغازگر، می‌توان موفقیت یا عدم موفقیت ترانسفکشن را به صورت کیفی در کار با وکتورهای آدنوویروسی فاقد ژن گزارشگر، ارزیابی نمود. هم چنین با استفاده از روش Real-time PCR و به کارگیری روش‌های مناسب جداسازی ژنوم کامل ویروس از لیزات آن، از محدودیت‌های تیتراسیون کیفی آدنوویروس اجتناب ورزید.

کلمات کلیدی: آدنوویروس‌ها، ترانسفکشن، PCR

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۵
تاریخ پذیرش: ۹۱/ ۴/۴

۱- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۳ـ فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه‌اله و مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۴- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- PhD بیوتکنولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۶- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر ـ بوشهر ـ ایران

مقدمه

وکتورهای نوترکیب آدنوویروس به عنوان ابزار انتقال ژن در تحقیقات پایه و هم چنین در درمان بسیاری از بیماری‌ها و واکسیناسیون کاربرد دارند(۴-۱). خصوصیات زیستی آدنوویروس نظیر توانایی انتقال ژن به طیف وسیعی از سلول‌های در حال تقسیم و خفته، تیتر بالای ویروسی و سطح افزون بیان ترانس ژن، آن را به وکتوری مناسب مبدل کرده است(۵). وکتورهای آدنوویروسی عمدتاً از طریق حذف ژن‌های E1 وE3 آدنوویروس انسانی سروتیپ ۲ و ۵، با ویژگی نقصان در همانندسازی(replication defective) طراحی می‌شوند و از این رو برای تکثیر (propagation) به سلول‌های تامین‌کننده پروتئین E1 ، نظیر رده سلولی HEK 293A نیاز دارند(۶). یکی از نگرانی‌های کار با وکتور آدنوویروس(AdV) ، احتمال به وجود آمدن آدنوویروس با توانایی همانندسازی(Replication Competent Adenovirus (RCA)) در جمعیت آدنوویروس با نقصان همانندسازی است. در واقع رخداد RCA نتیجه کراسینگ‌آور دوگانه بین توالی‌های همولوگ موجود در آدنوویروس نوترکیب و ژنوم رده سلولی HEK 293A است(۷). این رخداد منجر به جایگزینی ترانس ژن با ناحیه E1 شده و به این ترتیب RCA بی‌نیاز از رده سلولی مکمل (complementing cell line) تولید می‌شود(۸). یکی از مراحل کلیدی کار با وکتورهای آدنوویروسی؛ پایش ترانسفکشن(transfection) و تعیین دقیق، سریع و تکرارپذیر تعداد ذرات ویروس در نمونه ذخیره(stock) است(۹، ۵). بعضی از وکتورهای آدنوویروسی واجد ژن گزارشگر(reporter gene) هستند که از این رهگذر می‌توان میزان موفقیت ترانسفکشن را به صورت مستقیم ارزیابی کرد(۵). عدم وجود ژن گزارشگر در وکتورهای آدنوویروسی، باعث محدودیت پایش ترانسفکشن می‌شود. تعداد ذرات آدنووکتور نوترکیب در اثر آلوده کردن سلول هدف و نهایتاً همسانه‌سازی ژن مورد نظر بسیار حایز اهمیت است، لذا محققین روش‌های مختلفی را برای تعیین تیتر ویروس به کار می‌گیرند که مبتنی بر دو روش اندازه‌گیری ذرات عفونت‌زا(infectious) یا پارتیکل ویروس(ذرات عفونت‌زا و غیر عفونت‌زا) است. ذرات عفونت‌زای آدنوویروس با دو روش تشکیل پلاک و دوز عفونت‌زای کشت بافت ۵۰٪ [(TCID 50) Tissue-culture infectious dose 50%] اندازه‌گیری می‌شود(۹). تیتراسیون آدنوویروس به روش تشکیل پلاک محدودیت‌های متعددی دارد، در این روش نوع رده سلولی، اپراتور و متغیرهای آزمایشگاهی، تیتراسیون ویروس را تحت‌الشعاع قرار می‌دهند. هم چنین زمان طولانی(۲ تا ۴ هفته) انجام آزمایش و مشکلات تشخیص پلاک‌های کوچک تشکیل شده به دلیل عدم بیان پروتئین مرگ‌آور آدنوویروس(adenovirus death protein)، از دیگر محدودیت‌های این روش محسوب می‌شوند(۱۰). تعداد پارتیکل آدنوویروس عمدتاً با استفاده از جذب نوری نمونه ذخیره ویروس(viral stock) در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام می‌پذیرد که به علت اندازه‌گیری هم زمان DNA فاقد کپسید (non capsidated DNA) و هم چنین ژنوم ناقص ویروس(incomplete genome) قادر به تخمین صحیحی از تیتر عفونت‌زای ویروس نیست(۱۱). تیتراسیون آدنوویروس با روش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی DNA آدنوویروس انجام پذیرفته است(۱۴-۱۲). در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن، موفقیت ترانسفکشن وکتور آدنوویروس نوترکیب فاقد ژن گزارشگر به روش PCR و هم چنین تیتراسیون ویروس به روش PCR کمی(Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. از وکتور pAd/CMV/V5-DEST (اینویتروژن) به عنوان وکتور آدنوویروس استفاده شد.

ساخت آدنوویروس نوترکیب:

توالی کدکننده(CDS) ژن jag1 با استفاده از تکنولوژی gateway توسط آنزیم(اینویتروژن) LR clonase II از کلون(ژن کوپای) ORFEXPRESS-shuttle به وکتور مقصد، (اینویتروژن) pAd/CMV/V5/DEST انتقال داده شد و سازه ژنی pAd/DEST-jag1 تشکیل گردید. به این منظور ۱۰۰

نانوگرم از کلـون ORFEXPREES-shuttle بـه همـراه ۳۰۰ نانوگرم از وکتور مقصد با بافر(۰/۸ pH) TE (Tris-EDTA) به حجم ۸ میکرولیتر رسید و پس از افزودن ۱ میکرولیتر از آنزیم(اینویتروژن) LR clonase II ، به مدت ۱۸ سـاعت در دمـای ۲۵ ºC انکوبـه شـد. نهایتـاً بـا افـزودن ۱ میکرولیتـر proteinase K و انکوباسـیون ۱۰ دقیقـه‌ای در ۳۷ ºC ، محصول واکنش به بـاکتری DH5α ، ترانسـفورم شـد و در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشـت داده شـد. پس از ترانسفورماسیون، پلاسمید کلون‌های رشد کـرده بـا اسـتفاده از کیـت High pure plasmid extraction شـرکت رُوش طبق دستورالعمل سازنده استخراج و به منظور پایش حضور ترانس ژن در سـازه ژنـی از نظـر انـدازه، روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در بررسی حضور ترانس ژن در سازه ژنی، ترانسفکشن و تیتراسیون

آغازگرهای توالی کامل (full length)	
Jag1-F	CGC GTC GAC ATG CGT TCC CCA CGG AC
Jag1-R	CCC AAG CTT CTA TAC GAT GTA CTC CAT TCG
اندازه قطعه تکثیری	۳۶۵۷ bp
آغازگرهای تشخیصی	
Real jag1-F	TGA AAG ACC ACT GCC GCA CGA C
Real jag1-R	TTG CAC TTC CCG TGA GGA CCA C
اندازه قطعه تکثیری	۱۲۹ bp
آغازگرهای ترکیبی	
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
RT jag1-R	TCCCAGCCTTCCTTGCAGAC
اندازه قطعه تکثیری	۲۴۰۳ bp

تاییـد حضـور تـوالی کدکننـده ژن Jag1 در سـازه ژنـی pAd/DEST-jag1:

وکتور pAd/CMV/V5/DEST در جایگاه نوترکیبی خود دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل اسـت کـه بـا انجام واکنش LR حذف مـی‌گـردد، لـذا بـه منظـور غربـال کلون‌های به دست آمده از نظـر تشـکیل یـا عـدم تشـکیل کلون‌های موتانت، کلون‌های مثبت هم زمان روی دو محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل کشت داده شدند. هم چنـین کلـون‌هـا بـا روش PCR بـه وسـیله آغازگرهای تشخیصی بـا انـدازه قطعـه تکثیـری ۱۲۹ bp و آغازگرهای توالی کامل(Full length) با انـدازه تکثیـری bp ۳۶۵۷ تعیین هویـت شـدند. صـحت جهـت قـرار گـرفتن ترانس ژن در سازه ژنـی بـا آزمـون PCR و بـا اسـتفاده از آغازگر RT-jag1 reverse (طراحی شده به منظور اتصال بـه انتهای '۳ «نوکلئوتید ۲۳۲۴» CDS ژن Jag1) و آغازگر T7 promoter (طراحی شده به منظور اتصال به ساختار وکتور) بـا انـدازه قطعـه تکثیـری bp ۲۴۰۳ مـورد ارزیـابی قـرار گرفت(جداول ۱ و ۲). نهایتاً وجـود تـرانس ژن و صـحت جهت قرار گرفتن آن در سازه ژنی یکی از کلـون‌هـا(کلـون شماره ۲) با تعیین توالی بررسی شد.

جدول ۲: مقادیر و غلظت‌های استفاده شده در آزمون‌های PCR

معرف‌های مصرفی	آزمایش(آزمون)	کنترل منفی
PCR grade dNTP mix	۲۰۰ µM (هر نوکلئوتید)	۲۰۰ µM (هر نوکلئوتید)
Upstream primer	۰/۵ µM	۰/۵ µM
Downstream primer	۰/۵ µM	۰/۵ µM
Template DNA	۱۰۰ ng	–
PCR reaction buffer,10X	۲/۵ µL	۲/۵ µL
Water,PCR grade	up to ۲۵ µL	up to ۲۵ µL
Taq DNA polymerase	۱ U/reaction	۱ U/reaction

ترانسفکشن سلول‌های HEK293A:

سـازه ژنـی pAd/DEST-jag1 بـا اسـتفاده از آنـزیم اندونوکلئاز PacI خطی گردید و ۵ میکروگرم از آن به ازای ۱۰۰۰۰۰۰ سلول HEK293A با استفاده از فسـفات کلسـیم ترانسفکت شد(۱۴). هفته‌ای دو بار نیمی از محـیط کشـت (DMEM/High glucose) تعویض شد و پس از سـه هفتـه، لیزات ویـروس طـی سـه مرحلـه بـا فریـز و یـخ گشـایی سلول‌های ترانسفکت شده تهیه شد.

بررسی ترانسفکشن سلول‌های HEK293A:

مولکـول DNA بـا وزن مولکـولـی کم(low molecular

weight DNA) با استفاده از DNase (جهت احتراز از جداسازی DNA فاقد کپسید) و روش Hirt از سلول‌های ترانسفکت شده و هم چنین سلول‌های ترانسفکت نشده (به عنوان کنترل) استخراج شد(۱۵). به این منظور ابتدا تعداد ۲۰۰۰۰۰۰ سلول HEK 293A در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/High glucose به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر از لیزات ویروس آلوده شد و ۲۰۰۰۰۰۰ سلول HEK 293A به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

پس از سه روز رسوب سلول‌های آلوده شده و کنترل در بافر هضم‌کننده، DNA به شکل محلول در آمد و مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ ºC انکوبه شد، سپس هضم پروتئین با استفاده از Proteinase K و انکوباسیون ۲ ساعته در ۳۷ ºC انجام پذیرفت. مولاریته محلول به دست آمده با استفاده از NaCl ۵ مولار به ۱ مولار رسید و یک شبانه روز در ۴ ºC قرار داده شد.

جهت کاهش غلظت نمک بعد از سانتریفوژ و تخلیه مایع‌رویی، به میزان دو برابر حجم اولیه آب مقطر به رسوب باقیمانده اضافه شد و DNA طی سه مرحله به ترتیب با استفاده از محلول اشباع بافر TE با فنل، فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) و کلروفرم/ایزوآمیل الکل(۱:۲۴) استخراج شد و بعد از ترسیب به وسیله اتانل خالص در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت محلول در آمد. DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل، با استفاده از آغازگرهای تشخیصی و جهت تایید با استفاده از آغازگرهای ترکیبی به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

تیتراسیون ویروس به وسیله Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای تشخیصی :

DNA با وزن مولکولی کم از ۱۰۰ میکرولیتر لیزات ویروس استخراج شد و در۷۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت محلول درآمد. از پلاسمید تخلیص شده pAd/DEST-jag1 با غلظت ۹۳/۵ نانوگرم در میکرولیتر به عنوان استاندارد استفاده شد و تعداد ذرات ویروس با در نظر گرفتن تعداد جفت بازهای تشکیل‌دهنده آن محاسبه گردید. طول وکتور pAd/CMV/V5/DEST معادل ۳۶۶۸۶ جفت باز است که در حین انجام واکنش LR ، ۲۲۴۳ جفت باز آن حذف می‌گردد و به جای آن طول قطعه ترانس ژن ۳۶۵۷ bp به انضمام ۶۱ جفت باز جدید وارد سازه ژنی شده و بدین ترتیب طول سازه ژنی pAd/DEST-jag1 بالغ بر ۳۸۱۶۱ جفت باز می‌شود. تعداد ذرات ویروس در پلاسمید تخلیص شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و از رقت‌های لگاریتمی 10^{-1} تا 10^{-6} آن به عنوان استاندارد استفاده شد.

(۶۵۰ × 10^{9} × طول قطعه)/(10^{23} × ۶/۰۲۲ × مقدار DNA بر حسب نانوگرم)= تعداد ذرات ویروس

نهایتاً واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت Fast start syber green (کیاژن) و آغازگرهای تشخیصی با دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 طبق برنامه زیر انجام پذیرفت(جدول ۳):

- واسرشت DNA برای ۱۰ دقیقه در ۹۵ ºC (یک سیکل)
- ۱۰ ثانیه در ۹۵ ºC
- ۱۰ ثانیه در ۵۸ ºC
- ۱۰ ثانیه در ۷۲ ºC
- تکرار مراحل ۲ تا ۴ برای ۴۰ سیکل

جدول ۳: مقادیر و غلظت‌های استفاده شده در آزمون Real-time PCR

معرف‌های مصرفی	استاندارد	آزمایش (آزمون)	کنترل منفی
Fast start syber green	۱۰ µL	۱۰ µL	۱۰ µL
Real jag1-F (۱۰ µM)	۱ µL	۱ µL	۱ µL
Real jag1-R (۱۰ µM)	۱ µL	۱ µL	۱ µL
آب مقطر دیونیزه	۷ µL	۴/۵ µL	۸ µL
Standard template	۱ µL	–	–
Test template	–	۳/۵ µL	–

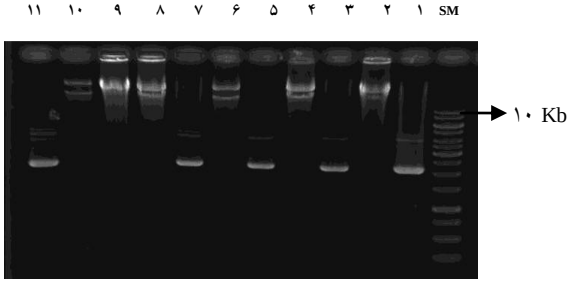
آنالیز نمودار ذوب(melting) در پایان برنامه PCR با ۱۰ ثانیه آنیلینگ در ۵۸ ºC و افزایش حرارت تا ۹۵ ºC به ازای ۰/۱ ºC در ثانیه انجام پذیرفت. در طول سیکل‌های تکثیر، شدت فلورسانس در پایان هر سیکل elongation اندازه‌گیری شد. میزان فلورسانس به صورت پیوسته حین

سیکل ذوب با افزایش تدریجی دما اندازه‌گیری شد.

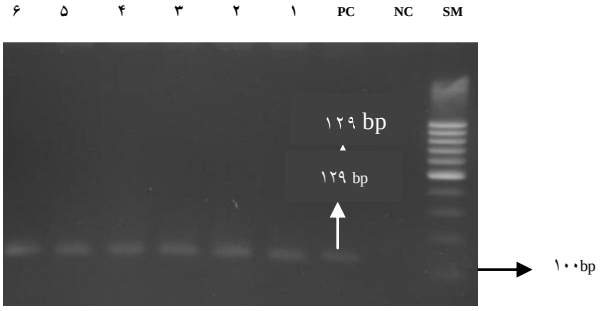
یافته‌ها

ساخت آدنوویروس نوترکیب:

به منظور بررسی واکنش LR ، پلاسمیدهای استخراج شده از ۱۱ کلون رشد کرده در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، الکتروفورز شد. پلاسمید ۶ کلون از نظر اندازه، احتمال حضور CDS ژن jag1 را مطرح می‌کرد(شکل ۱).

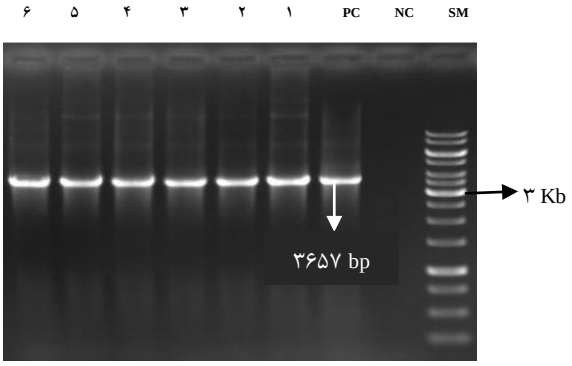


شکل ۱: الکتروفورز پلاسمید کلون‌های واکنش LR بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر kb ۱ ، اندازه پلاسمیدهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۹ و ۱۰ احتمال حضور CDS ژن jag1 را مطرح می‌نماید.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR پلاسمیدهای کلون‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای تشخیصی. بر روی ژل آگاروز ۲ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر bp ۱۰۰، ستون NC مربوط به کنترل منفی(فاقد الگو)، ستون PC مربوط به کنترل مثبت(کلون ORFEXPRESS-shuttle واجد CDS ژن jag1) و ستون‌های ۱ تا ۶ مربوط به پلاسمید کلون‌های مثبت.

در بررسی ۶ کلون به دست آمده، هیچ یک از آن‌ها روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل رشد نکرد و بدین ترتیب احتمال تشکیل کلون‌های موتانت منتفی گردید و از طرفی احتمال حضور توالی کدکننده ژن jag1 در کلون‌های مذکور قوت گرفت. به منظور تایید حضور توالی کدکننده ژن jag1 در کلون‌ها با استفاده از آغازگرهای تشخیصی و توالی کامل روی کلون‌های مثبت، PCR انجام شد و وجود توالی کدکننده مورد نظر در تمامی کلون‌ها تایید گردید(شکل‌های ۲ و ۳).



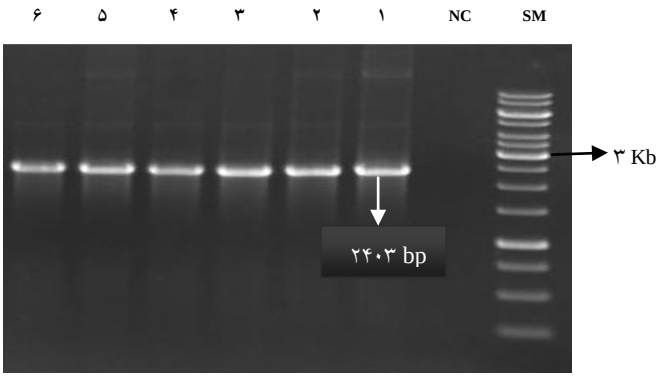
شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR پلاسمیدهای کلون‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای توالی کامل بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر kb ۱، ستون NC مربوط به کنترل منفی(فاقد الگو)، ستون PC مربوط به کنترل مثبت(کلون ORFEXPRESS-shuttle واجد CDS ژن jag1) و ستون‌های ۱ تا ۶ مربوط به کلون‌های مثبت.

به منظور تایید صحت جهت قرار گرفتن توالی کدکننده ژن jag1 در سازه ژنی pAd/DEST-jag1 با استفاده از آغازگرهای ترکیبی T7promoter و Real jag1-R ، PCR انجام پذیرفت که نتیجه آن مبین صحت جهت توالی کدکننده مورد نظر در تمامی کلون‌های مثبت بود(شکل ۴).

در نهایت پلاسمید یکی از کلون‌ها(کلون شماره ۲) جهت تایید نهایی تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور توالی کدکننده ژن jag1 را مورد تایید قرار داد.

پایش ترانسفکشن سلول‌های HEK 293 A به وسیله سازه ژنی pAd/DEST-jag1 :

به منظور پایش ترانسفکشن با استفاده از آغازگرهای تشخیصی روی DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل(ترانسفکت نشده)، آزمون PCR



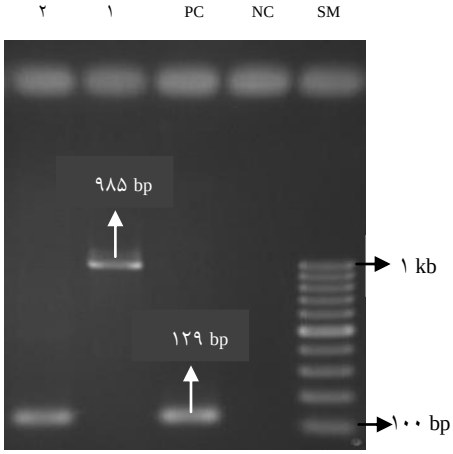
شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR پلاسمیدهای کلون‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای ترکیبی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱kb، ستون NC مربوط به کنترل منفی (فاقد الگو) و ستون‌های ۱ تا ۶ مربوط به کلون‌های مثبت

انجام شد، که نتیجه آن مؤید موفقیت ترانسفکشن سلول‌های مورد نظر بود(شکل ۵). همان طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، وجود باند ۱۲۹ bp در ستون دوم و وجود باند ۹۸۵ bp در ستون اول(کنترل) به جای باند مورد نظر(۱۲۹ bp)، نمایانگر موفقیت ترانسفکشن بود. از آن جا که سلول‌های HEK 293A ژن Jag1 (ترانس ژن) را بیان می‌کنند، به منظور تایید نتیجه به دست آمده در پایش ترانسفکشن با استفاده از آغازگرهای تشخیصی، DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل با استفاده از آغازگرهای ترکیبی نیز مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۶).

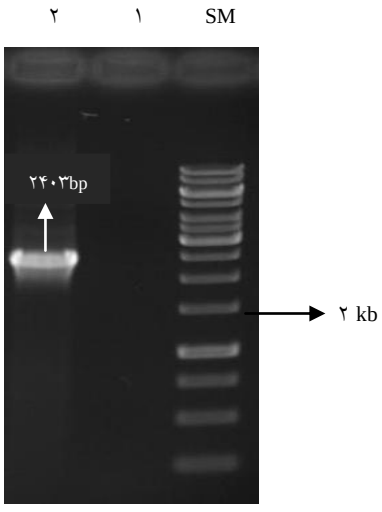
تیتراسیون ذرات ویروس به دست آمده به روش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای تشخیصی:

Real-time PCR با استفاده از دستگاه corbett Rotor-Gene 6000 انجام پذیرفت بدین ترتیب که با تخمین $۱۰^{۹} \times ۲/۲۷$ ذره ویروس در میکرولیتر از پلاسمید تخلیص شده و با استفاده از رقت‌های لگاریتمی $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۶}$ از آن، amplification plot نمونه‌های استاندارد پلاسمید ترسیم شد(شکل ۷).

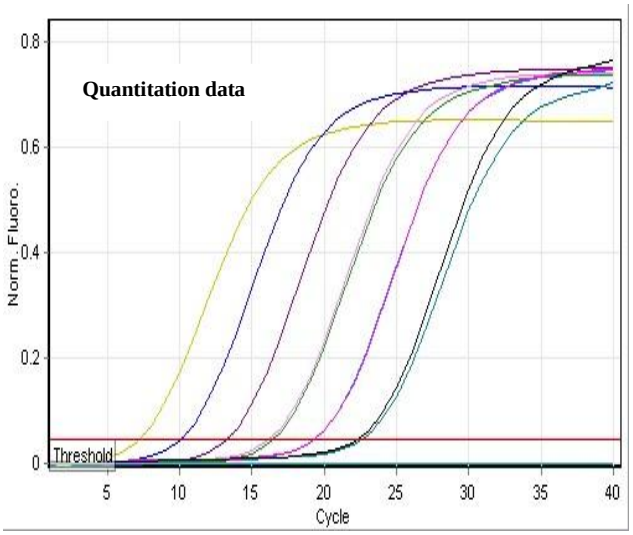
وقتی محور y به صورت لگاریتمی است، حد (threshold) به شکلی تعیین می‌شود تا در ناحیه خطی نمودار تکثیر قرار گیرد. نقطه تقاطع amplification plot هر نمونه با خط حد به عنوان threshold cycle (Ct) value تعریف می‌شود.



شکل ۵: الکتروفورز محصولات PCR مولکول‌های DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل(ترانسفکت نشده) با استفاده از آغازگرهای تشخیصی. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱۰۰ bp ، ستون NC مربوط به کنترل منفی PCR (فاقد الگو)، ستون PC مربوط به کنترل مثبت(کلون ORFEXPRESS-shuttle واجد CDS ژن Jag1)، ستون ۱ مربوط به DNA استخراج شده از سلول‌های تراسفکت نشده و ستون ۲ مربوط بهDNA استخراج شده از سلول‌های ترانسکفت شده

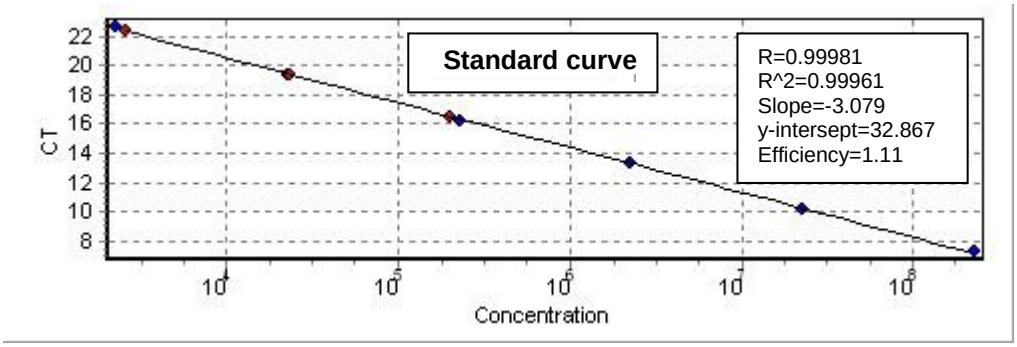


شکل ۶: الکتروفورز محصول PCR مولکول DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از آغازگرهای ترکیبی. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱ kb ، ستون ۱ مربوط به DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت نشده و ستون ۲ مربوط به DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1		ST1	Standard	7.26	2.27E+08	2.07E+08	8.7%
2		ST2	Standard	10.12	2.27E+07	2.45E+07	7.8%
3		ST3	Standard	13.33	2.27E+06	2.22E+06	2.3%
4		ST4	Standard	16.27	2.27E+05	2.45E+05	8.1%
5		ST5	Standard	19.37	2.27E+04	2.43E+04	6.9%
6		ST6	Standard	22.68	2.27E+03	2.04E+03	10.1%
7		T1(neat)	Unknown	16.54		2.01E+05	
8		T2(1/10)	Unknown	19.42		2.34E+04	
9		T3(1/100)	Unknown	22.37		2.56E+03	
10		NC	NTC	NEG (NTC)			

شکل ۷: amplification plot از نمونه‌های استاندارد پلاسمید به همراه لیزات ویروس(بدون رقت و با رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰). تغییر فلورسانس (Norm. Fluoro) در مقابل تعداد سیکل PCR ترسیم شده است. خط افقی قرمز نمایانگر حد(threshold) است که از آن برای تعیین Ct values استفاده می‌شود. نمونه‌های واجد ذرات ویروسی(copy number) بیشتر حد را در سیکل پایین‌تری قطع می‌کنند و بالطبع در محدوده سمت چپ نمودار قرار می‌گیرند. در این نمودار، اولین نمونه‌ای که حد را قطع می‌کند، دارای $۲/۰۷ \times ۱۰^{۸}$ کپی از پلاسمید نوترکیب آدنوویروس است.

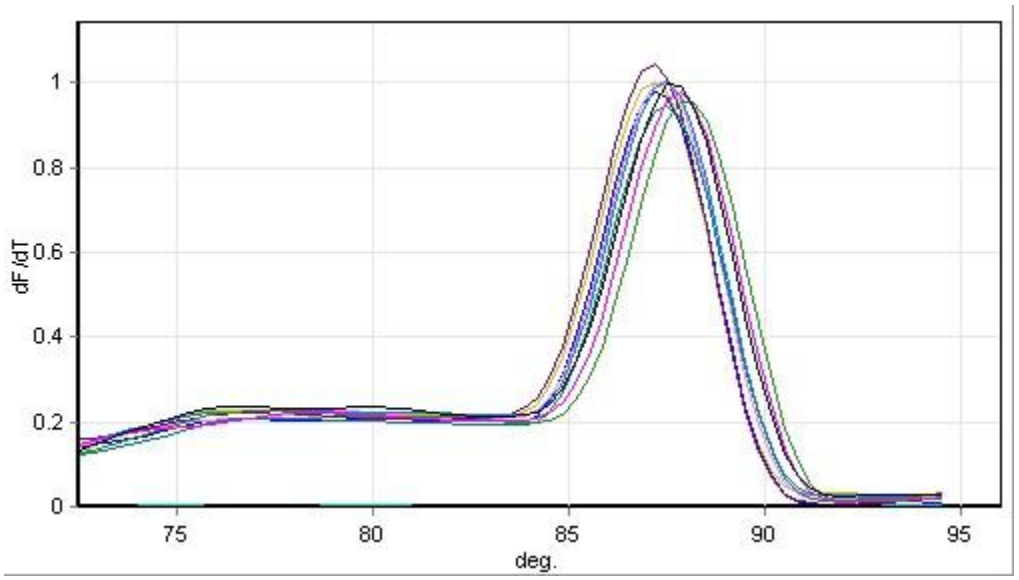


شکل ۸ : نمودار استاندارد با قرار دادن Ct در مقابل copy number پلاسمید برای هر نمونه استاندارد ترسیم می‌شود. محدوده کمی نمودار استاندارد ترسیم شده بین $۲/۰۷ \times ۱۰^{۸}$ تا $۲/۰۴ \times ۱۰^{۳}$ است. معادله نمودار استاندارد مبنای محاسبه copy number نمونه‌های مجهول بر اساس Ct آن‌ها قرار می‌گیرد. R^2 : coefficient of determination ، Slope : شیب خط، y-intersept : محل تلاقی نمودار با محور y ها.

نرم‌افزار Rotor-Gene 6000 با قرار دادن Ct هر یک از نمونه‌های استاندارد در مقابل copy number آن، نمودار استاندارد را رسم می‌کند. هم چنین این نرم‌افزار با مقایسه Ct نمونه‌های مجهول با نمودار استاندارد، copy number نمونه‌های مذکور را محاسبه می‌کند(شکل ۸).

آنالیز نمودار ذوب در محدوده ۸۸ درجه سانتی‌گراد، نشان از ویژگی مطلوب آغازگرهای طراحی شده و هم چنین عدم آلودگی(mispriming) و تشکیل آغازگر دایمر دارد(شکل ۹).

با استفاده از فرمول زیر، تیتر ویروس در نمونه لیزات



شکل۹ : نمودار melting ، در نقطه meltcng دو رشته DNA از هم جدا می‌شوند و میزان فلورسانس به سرعت کاهش می‌یابد. نرم‌افزار میزان تغییرات نسبی واحد فلورسانس به زمان(df/dt) را روی محور y در مقابل تغییرات دما روی محور x قرار می‌دهد و بدین ترتیب نمودار melting نمایش داده می‌شود.

ویروس $۴/۰۲ \times ۱۰^{۷}$ در واحد حجم(میلی‌لیتر) برآورد شد: (Real-time PCR copy number/ ۳/۵) ۷۰ × ۱۰ × ضریب رقت = تیتر ویروس

اعمال ضریب ۳/۵ ، به دلیل استفاده از ۳/۵ µL از DNA استخراج شده از لیزات ویروس است. اعمال ضریب ۷۰ به دلیل استخراج DNA از ۱۰۰ µL لیزات ویروس و محلول نمودن آن در ۷۰ µL آب مقطر و اعمال ضریب ۱۰ جهت تعمیم تیتر ویروس به واحد حجم(میلی‌لیتر) است.

بحث

ژن‌های گزارشگر(reporter) نظیر پروتئین فلورسانس سبز(GFP)، لوسیفراز و بتاگالاکتوزیداز به منظور پایش آسان بیان، اهداف مناسبی برای آنالیز ترانسفکشن قلمداد می‌شوند. نمایش بیان GFP در سال ۱۹۹۴ توسط چالفی در میزبان دریافت کننده ژن و کلونینگ آن توسط پراشر در سال ۱۹۹۵، پنجره‌ای تازه برای کاربردهای زیستی این مولکول گشود(۱۷، ۱۶). هم چنین خصوصیات لوسیفراز، آن را به نشانگر مناسبی برای انتقال ژن تبدیل کرد. این مولکول با حداقل سمیت برای متابولیسم سلولی، از یاخته‌های گیاهی و جانوری استخراج شده و به آسانی با لومینومتر قابل اندازه‌گیری است(۱۸). با تمام مزایایی که ژن‌های گزارشگر در فرآیند کلونینگ ژن دارند، گروهی از محققین به دلیل افزایش ظرفیت کلونینگ وکتور طراحی شده، از به کارگیری آن اجتناب می‌ورزند. در چنین شرایطی پایش مستقیم ورود وکتور حامل ژن مورد نظر به میزبان امکان‌پذیر نیست و ناگزیر باید از روش‌های غیر مستقیم مولکولی نظیر ارزیابی سازه تشکیل یافته با آغازگرهای طراحی شده برای قسمتی از ساختمان وکتور یا ژن مورد نظر استفاده کرد. همان طور که اشاره شد تیتراسیون وکتورهای آدنوویروسی نوترکیب با روش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی DNA آدنوویروس انجام پذیرفت(۱۳-۱۱).

آلودگی DNA تخلیص شده با DNA ویروسی فاقد کپسید و ژنوم ناقص ویروس، باعث انحراف نتایج روش Real-time PCR در تخمین تیتر آدنوویروس نوترکیب می‌شود. با بهره‌گیری از روش‌های اصلاح شده جداسازی DNA و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه نزدیک به انتهای راست ژنوم ویروس، موانع موجود در سنجش صحیح تیتر وکتورهای آدنوویروسی به روش Real-time

PCR مرتفع گردید(۱۹). وکتورهای آدنوویروسی با حذف ژن‌های E1 و E3 به شکل replication defective در می‌آیند و به منظور تولید ویروس نیاز به سلول‌های مکملی دارند که پروتئین ژن‌های حذف شده را کد می‌کنند(۷). یکی از محدودیت‌های تولید و خصوصاً ازدیاد ویروس در سلول‌های مکمل، احتمال وقوع نوترکیبی هومولوگ بین ژنوم سلول مکمل و آدنوویروس نوترکیب است که منجر به جایگزینی ژن E1 به جای ترانس ژن شده، بدین ترتیب آدنوویروس replication competent (RCA) ایجاد شده و ترانس ژن مورد نظر حذف می‌گردد(۸، ۷). روش‌های مولکولی تیتراسیون ویروس که تاکنون به کار گرفته شده‌اند، قادر به افتراق RCA از وکتور آدنوویروسی نوترکیب واجد ترانس ژن نبوده و نهایتاً منجر به انحراف نتایج از آزمون‌های کیفی می‌شود. لذا به نظر می‌رسد جهت تیتراسیون ویروس، استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن یا آغازگرهای ترکیبی(ترانس ژن و قطعه‌ای از وکتور) نسبت به آغازگرهای قطعات وکتور در افتراق ذرات RCA از وکتور آدنوویروس نوترکیب و احتراز از تخمین نامتعارف(overestimation) تیتر ویروس، ارجحیت داشته باشد. هم چنین با استفاده از آغازگرهای مختص ترانس ژن، موفقیت یا عدم موفقیت ترانسفکشن سلول‌های مکمل نظیر HEK 293A را به وسیله وکتورهای آدنوویروسی نوترکیب فاقد ژن گزارشگر مورد پایش قرار داد. اما چنانچه سلول مکمل ترانس ژن مورد نظر را بیان نماید، محدودیت پایش مولکولی ترانسفکشن با طراحی و انتخاب آغازگرهای منطبق با دو اگزون مجاور با طول زیاد اینترون(long intron exclusion) مرتفع می‌گردد. در این مطالعه وجود باند bp ۹۸۵ در ستون ۱ شکل ۵، نشان‌دهنده وجود این ژن در ساختار ژنومی سلول مکمل(گروه کنترل) و باند bp ۱۲۹ مؤید وجود سازه مورد نظر در سلول‌های مکمل ترانسفکت شده است. یقیناً عدم رؤیت باند در آزمون مولکولی با آغازگرهای ترکیبی روی DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده، مهر تاییدی است بر وجود سازه مورد نظر در سلول‌های مکمل و می‌تواند به تنهایی شاهد موفقیت یا عدم موفقیت ترانسفکشن باشد. در این تحقیق با استفاده از DNAse در استخراج ژنوم ویروس، سعی شد تا از شناسایی DNA غیر کپسیدی اجتناب گردد، هم چنین با استفاده از آغازگرهای تشخیصی ترانس ژن مورد نظر از تشخیص ذرات ویروسی replication competent اجتناب گردید.

نتیجه‌گیری

عدم وجود ژن گزارشگر در وکتورهای آدنوویروسی، مراحل پایش ترانسفکشن را با محدودیت مواجه می‌کند. اما می‌توان با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی مبتنی بر مهندسی صحیح آغازگر، موفقیت ترانسفکشن را به صورت کیفی ارزیابی نمود و از ادامه غیر هدفمند کلونینگ پرهیز کرد. هم چنین به منظور احتراز از محدودیت‌های کیفی تیتراسیون ویروس، می‌توان از روش جایگزین Real-time PCR بهره برد. پیشنهاد می‌گردد جهت افزایش دقت و تمیز ذرات ویروسی با ویژگی نقصان در همانندسازی (replication defective)، از ذرات ویروسی با توانایی همانندسازی(replication competent) با استفاده هم زمان از آغازگرهای تشخیصی ترانس ژن و آغازگرهای انتهای راست ژنوم ویروس، آزمون Real-time PCR به صورت multiplex انجام پذیرد.

تشکروقدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دکترای هماتولوژی مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات انتقال خون و مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون به جهت تامین بودجه این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References :

1- Miller AD. Human gene therapy comes of age. Nature 1992; 357(6378): 455-60.
2- Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. Annu Rev Biochem 1993; 62: 191-217.
3- Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors Methods in Molecular Biology 1991; 7: 109-128.
4- Berkner KL. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. Biotechniques 1988; 6(7): 616-29.
5- He TC, Zhou S, Costs LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant denovireses. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 95(5): 2509-14.
6- Graham FL, Smiley J, Russel WC, Narin R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977: 36(1): 59-74.
7- Lochmuller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, *et al*. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. Hum Gene Ther 1994; 5(12): 1485-91.
8- Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, *et al*. Characterization of replication-competent adenovirus isolates from larg-scale production of a recombinant adenoviral vector. Hum Gene Ther 1999; 10(1): 113-121.
9- Miherder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol 1996; 70(11): 7498-509.
10- Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WSM. The adenovirus death protein (E3-11.6k) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. J Virol 1996; 70(4): 2296-306.
11- Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, *et al*. Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBER green real-time polymerase chain reaction assay. Pediatr Int 2005; 47(3): 286-91.
12- Heim A, Ebent C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by Real-time PCR.J Med Virol 2003; 70(2): 228-39.
13- Ma L, Bluyssen HA, De Raeymaeker M, Laurysens V, van der Beek N, Pavliska H, *et al*. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative Real-time PCR. J Virol Methods 2001; 93(1-2): 181-8.
14- Chen CA, Okayama H. Calcium-phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. Biotechniques 1988; 6(7): 632-8.
15- Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J Mol Biol 1967; 26(2): 365-9.
16- Chalfie M, Tu Y, Euskerchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 1994; 263(5148): 802-5.
17- Prasher DC. Using GFP to see the light. Trends Genet 1995; 11(8): 320-3.
18- Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. Anal Biochem 1994; 219(2): 169-81.
19- Thomas MA, Lichtenstein DL, Krajcsi P, Wold WS. A Real-time PCR method to rapidly titer adenovirus stocks. Methods Mol Med 2007; 130: 185-92.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 9(4): 380-390

Original Article

Evaluation of non-reporter adenovirus vector transfection and its titration by molecular methods: a practical guide

Atarodi K.[1,2], Pourfathollah A.A.[2], Abolghasemi H.[3,4], Amirizadeh N.[1], Habibi Roudkenar M.[1], Khamisipour Gh.R.[5]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Faculty of Medical Sciences, Baghyatallah University, Tehran, Iran
[4]Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Booshehr University of Medical Sciences, Booshehr, Iran

Abstract

Background and Objectives

Biologival features of adenoviruses have made them vectors of choice for gene transfer in basic research as well as in clinical treatment and vaccination. The key steps in the trasnsfer of adenovirus vector gene are transfection monitoring and viral titer determination. We investigated the transfection of non-reporter adenoviruses as well as viral titration using molecular methods.

Materials and Methods

In this experimental study, after the recombinant adenovirus vector construction, the presence of transgenes in gene construct was evaluated by PCR with transgene specific primers and sequencing. After calcium-phosphate transfection of the packaging cell line (HEK 293A), transfection was monitored by PCR using transgene specific primers (diagnostic and compound primers) to analyze DNA extracted from the transfected packaging cell line. The viral titer was determined by Real Time PCR (RT-PCR) using diagnostic primer to analyze DNA extracted from viral lysates.

Results

The presence of transgene in gene construct was confirmed by transgene specific primers and sequencing. Evaluation of DNA extracted from transfected packaging cells confirmed the efficiency of monitoring of transfection. The viral titer was estimated to be about 4×10^7 viral particles/ml by RT-PCR.

Conclusions

Careful primer design is the key to the efficient monitoring of non-reporter adenovirus vector transfection. The appropriate genomic purification and the use of RT-PCR technique would also avoid the disadvantages of functional titration of adenoviruses.

Key words: Adenoviruses, Transfection, PCR

Received: 25 Jan 2012
Accepted:24 Jun 2012

Correspondence: Pourfathollah AA., PhD of Immunology. Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 8801101; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: *pourfa@modares.ac.ir*