

بررسی ترانسفکت وکتورهای نو ترکیب آدنووایروسی فاقد ژن گزارشگر و تیتراسیون آن با روش‌های مولکولی: راهنمای عملی

کامران عطاردی^۱، علی اکبر پورفتح‌اله^۲، حسن ابوالقاسمی^۳، ناصر امیری زاده^۴، مهریار حبیبی رودکنار^۵، غلامرضا خمیسی پور^۶

چکیده

سابقه و هدف

خصوصیات بیولوژی آدنووایروس، 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 آدنووایروس 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 آدنووایروس نو ترکیب، 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. تیترا وایروس به روش Real-time PCR و با استفاده از آغازگرهای تشخیصی بر روی DNA استخراج شده از لیزات وایروس تعیین شد.

یافته‌ها

وجود ترانس ژن در سازه ژنی نو ترکیب 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 وایروس با استفاده از Real-time PCR حدود $10^7 \times 5$ در واحد حجم (میلی لیتر) برآورد شد.

نتیجه گیری

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

کلمات کلیدی: آدنووایروس‌ها، ترانسفکشن، PCR

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۵

تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۴

۱- PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

۳- فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه‌اله و مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۴- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- PhD بیوتکنولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۶- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر - بوشهر - ایران

مقدمه

وکتورهای نو ترکیب آدنو ویروس به عنوان ابزار انتقال ژن در تحقیقات پایه و هم چنین در درمان بسیاری از بیماری‌ها و واکسیناسیون کاربرد دارند (۱-۴). خصوصیات زیستی آدنو ویروس نظیر توانایی انتقال ژن به طیف وسیعی از سلول‌های در حال تقسیم و خفته، تیترا بالای ویروسی و سطح افزون بیان ترانس ژن، آن را به وکتوری مناسب مبدل کرده است (۵). وکتورهای آدنو ویروسی عمدتاً از طریق حذف ژن‌های E1 و E3 آدنو ویروس انسانی سرو تیپ ۲ و ۵، با ویژگی نقصان در همانند سازی (replication defective) طراحی می‌شوند و از این رو برای تکثیر (propagation) به سلول‌های تامین کننده پروتئین E1، نظیر رده سلولی HEK 293A نیاز دارند (۶). یکی از نگرانی‌های کار با وکتور آدنو ویروس (AdV)، احتمال به وجود آمدن آدنو ویروس با توانایی همانند سازی (Replication Competent Adenovirus (RCA) در جمعیت آدنو ویروس با نقصان همانند سازی است. در واقع رخداد RCA نتیجه کراسینگ آور دو گانه بین توالی‌های همولوگ موجود در آدنو ویروس نو ترکیب 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 آدنو ویروسی؛ پایش ترانسفکشن (transfection) و تعیین دقیق، سریع و تکرار پذیر تعداد ذرات ویروس در نمونه ذخیره (stock) است (۹، ۵). بعضی از وکتورهای آدنو ویروسی 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 آدنو ویروسی، باعث محدودیت پایش ترانسفکشن می‌شود. تعداد ذرات آدنو وکتور نو ترکیب در اثر آلوده کردن سلول هدف و نهایتاً همسانه سازی ژن مورد نظر بسیار حایز اهمیت است، لذا محققین روش‌های مختلفی را برای تعیین تیترا ویروس به کار می‌گیرند که مبتنی بر دو روش اندازه گیری ذرات عفونت‌زا (infectious) یا پارتیکل ویروس (ذرات عفونت‌زا و غیر عفونت‌زا) است. ذرات

عفونت‌زای آدنو ویروس با دو روش تشکیل پلاک و دوز عفونت‌زای کشت بافت ۵۰٪ [Tissue-culture (TCID 50) infectious dose 50%] اندازه گیری می‌شود (۹). تیتراسیون آدنو ویروس به روش تشکیل پلاک محدودیت‌های متعددی دارد، در این روش نوع رده سلولی، اپراتور و متغیرهای آزمایشگاهی، تیتراسیون ویروس را تحت الشعاع 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 آدنو ویروس (adenovirus death protein)، از دیگر محدودیت‌های این روش محسوب می‌شوند (۱۰). تعداد پارتیکل آدنو ویروس عمدتاً با استفاده از جذب نوری نمونه ذخیره ویروس (viral stock) در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام می‌پذیرد که به علت اندازه گیری هم زمان DNA فاقد کپسید (non capsidated DNA) و هم چنین ژنوم ناقص ویروس (incomplete genome) قادر به تخمین صحیحی از تیترا عفونت‌زای ویروس نیست (۱۱). تیتراسیون آدنو ویروس با روش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی DNA آدنو ویروس انجام پذیرفته است (۱۲-۱۴). در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن، موفقیت ترانسفکشن وکتور آدنو ویروس نو ترکیب 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 (اینیتر وژن) به عنوان وکتور آدنو ویروس استفاده شد.

ساخت آدنو ویروس نو ترکیب:

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

LB حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و کلرامفنیکل کشت داده شدند. هم چنین کلون ها با روش PCR به وسیله آغازگرهای تشخیصی با اندازه قطعه تکثیری ۱۲۹ bp و آغازگرهای توالی کامل (Full length) با اندازه تکثیری ۳۶۵۷ bp تعیین هویت شدند. صحت جهت قرار گرفتن ترانس ژن در سازه ژنی با آزمون PCR و با استفاده از آغازگر RT-jag1 reverse (طراحی شده به منظور اتصال به انتهای ۳' «نوکلئوتید ۲۳۲۴» CDS ژن Jag1) و آغازگر T7 promoter (طراحی شده به منظور اتصال به ساختار وکتور) با اندازه قطعه تکثیری ۲۴۰۳ bp مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱ و ۲). نهایتاً وجود ترانس ژن و صحت جهت قرار گرفتن آن در سازه ژنی یکی از کلون ها (کلون شماره ۲) با تعیین توالی بررسی شد.

جدول ۲: مقادیر و غلظت های استفاده شده در آزمون های PCR

معرف های 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 سلول های HEK293A:

سازه ژنی pAd/DEST-jag1 با استفاده از آنزیم اندونوکلاز PacI خطی گردید و ۵ میکروگرم از آن به ازای ۱۰۰۰۰۰ سلول HEK293A با استفاده از فسفات کلسیم ترانسفکت شد (۱۴). هفته ای دو بار نیمه از محیط کشت (DMEM/High glucose) تعویض شد و پس از سه هفته، لیزات ویروس طی سه مرحله با فریز و یخ گشایی سلول های ترانسفکت شده تهیه شد.

بررسی ترانسفکشن سلول های HEK293A:

مولکول DNA با وزن مولکولی کم (low molecular

نانوگرم از کلون ORFEXPRESS-shuttle به همراه ۳۰۰ نانوگرم از وکتور مقصد با بافر (pH ۰/۸) TE (Tris-EDTA) به حجم ۸ میکرولیتر رسید و پس از افزودن ۱ میکرولیتر آنزیم (اینویتروزن) LR clonase II، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ °C انکوبه شد. نهایتاً با افزودن ۱ میکرولیتر proteinase K و انکوباسیون ۱۰ دقیقه ای در ۳۷ °C، محصول واکنش به باکتری DH5α، ترانسفورم شد و در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. پس از ترانسفورماسیون، پلاسمید کلون های رشد کرده با استفاده از کیت High pure plasmid extraction شرکت رُوش طبق دستورالعمل سازنده استخراج و به منظور پایش حضور ترانس ژن در سازه ژنی از نظر اندازه، 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

تایید حضور توالی کد کننده ژن Jag1 در سازه ژنی pAd/DEST-jag1:

وکتور pAd/CMV/V5/DEST در جایگاه نو ترکیبی خود دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل است که با انجام واکنش LR حذف می گردد، لذا به منظور غربال کلون های به دست آمده از نظر تشکیل یا عدم تشکیل کلون های موتانت، کلون های مثبت هم زمان روی دو محیط

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.

$(650 \times 10^9 \times \text{طول قطعه}) / (10^{23} \times 6/0.22 \times \text{مقدار DNA بر حسب نانوگرم}) = \text{تعداد ذرات ویروس}$
نهایتاً واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت Fast (کیاژن) start syber green و آغازگرهای تشخیصی با دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 طبق برنامه زیر انجام پذیرفت (جدول ۳):

- واسرشت DNA برای ۱۰ دقیقه در 95°C (یک سیکل)
- ۱۰ ثانیه در 95°C
- ۱۰ ثانیه در 58°C
- ۱۰ ثانیه در 72°C
- 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 58°C و افزایش حرارت تا 95°C به ازای $0/1^\circ\text{C}$ در ثانیه انجام پذیرفت. در طول سیکل‌های تکثیر، شدت فلورسانس در پایان هر سیکل elongation اندازه‌گیری شد. میزان فلورسانس به صورت پیوسته حین

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 ۲۰۰۰۰۰ سلول HEK 293A در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/High glucose به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر از لیزات ویروس آلوده شد و ۲۰۰۰۰۰ 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 37°C انکوبه شد، سپس هضم پروتئین با استفاده از Proteinase K و انکوباسیون ۲ ساعته در 37°C انجام پذیرفت. مولاریته محلول به دست آمده با استفاده از NaCl ۵ مولار به ۱ مولار رسید و یک شبانه روز در 4°C قرار داده شد.

جهت کاهش غلظت نمک بعد از سانتریفوژ و تخلیه مایع رویی، 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/ایزوامیل الکل (۱:۲۴:۲۵) و کلروفرم/ایزوامیل 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:

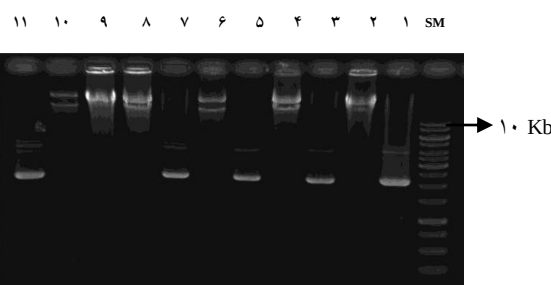
DNA با وزن مولکولی کم از ۱۰۰ میکرولیتر لیزات ویروس استخراج شد و در ۷۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت محلول در آمد. از پلاسمید تخلیص شده pAd/DEST-jag1 با غلظت ۹۳/۵ نانوگرم در میکرولیتر به عنوان استاندارد استفاده شد و تعداد ذرات ویروس با در نظر گرفتن تعداد جفت بازهای تشکیل‌دهنده آن محاسبه گردید. طول وکتور pAd/CMV/V5/DEST معادل ۳۶۶۸۶

سیکل ذوب با افزایش تدریجی دما اندازه گیری شد.

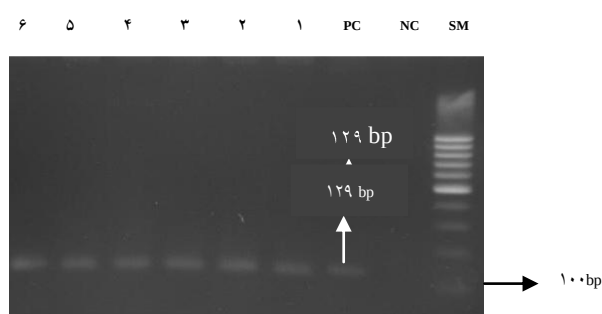
یافته ها

ساخت آدنو ویروس نو ترکیب:

به منظور بررسی واکنش LR، پلاسمیدهای استخراج شده از ۱۱ کلون رشد کرده در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، الکتروپورز شد. پلاسمید ۶ کلون از نظر اندازه، احتمال حضور CDS ژن jag1 را مطرح می کرد (شکل ۱).



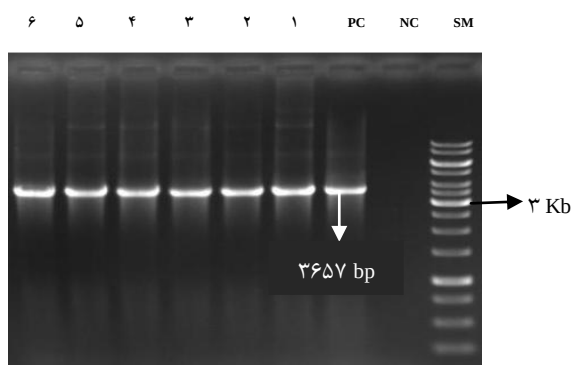
شکل ۱: الکتروپورز پلاسمید کلون های واکنش LR بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱ kb، اندازه پلاسمیدهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۹ و ۱۰ احتمال حضور CDS ژن jag1 را مطرح می نماید.



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

در بررسی ۶ کلون به دست آمده، هیچ یک از آنها روی محیط حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل رشد نکرد و بدین ترتیب احتمال تشکیل کلون های موتانت منتفی

گردید و از طرفی احتمال حضور توالی کدکننده ژن jag1 در کلون های مذکور قوت گرفت. به منظور تایید حضور توالی کدکننده ژن jag1 در کلون ها با استفاده از آغازگرهای تشخیصی و توالی کامل روی کلون های مثبت، PCR انجام شد و وجود توالی کدکننده مورد نظر در تمامی کلون ها تایید گردید (شکل های ۲ و ۳).



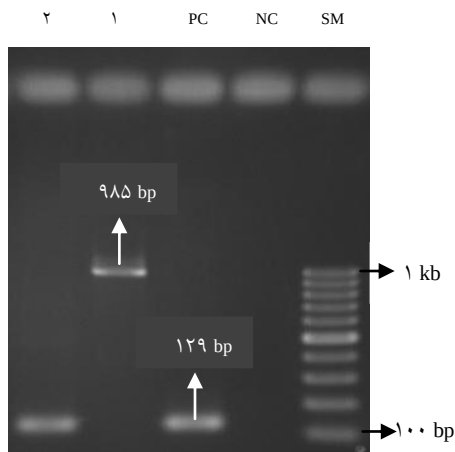
شکل ۳: الکتروپورز محصولات PCR پلاسمیدهای کلون های مثبت با استفاده از آغازگرهای توالی کامل بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱ kb، ستون NC مربوط به کنترل منفی (فاقد الگو)، ستون PC مربوط به کنترل مثبت (کلون ORFEXPRESS-shuttle واجد CDS ژن jag1) و ستون های ۱ تا ۶ مربوط به کلون های مثبت.

به منظور تایید صحت جهت قرار گرفتن توالی کدکننده ژن jag1 در سازه ژنی pAd/DEST-jag1 با استفاده از آغازگرهای ترکیبی T7promoter و jag1-R، Real PCR انجام پذیرفت که نتیجه آن مبین صحت جهت توالی کدکننده مورد نظر در تمامی کلون های مثبت بود (شکل ۴). در نهایت پلاسمید یکی از کلون ها (کلون شماره ۲) جهت تایید نهایی تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور توالی کدکننده ژن jag1 را مورد تایید قرار داد.

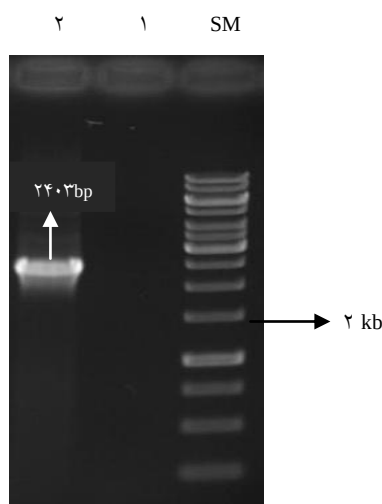
پایش ترانسفکشن سلول های HEK 293 A به وسیله سازه ژنی pAd/DEST-jag1:

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

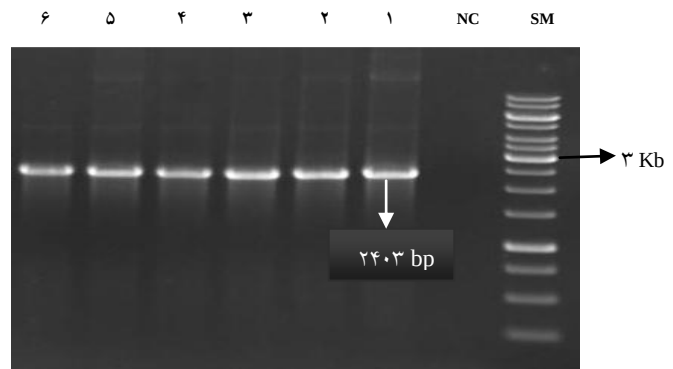
نمونه با خط حد به عنوان threshold cycle (Ct) value تعریف می شود.



شکل ۵: الکتروفورز محصولات PCR مولکول های DNA استخراج شده از سلول های 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 سلول های ترانسفکت نشده و ستون ۲ مربوط به DNA استخراج شده از سلول های ترانسفکت شده



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



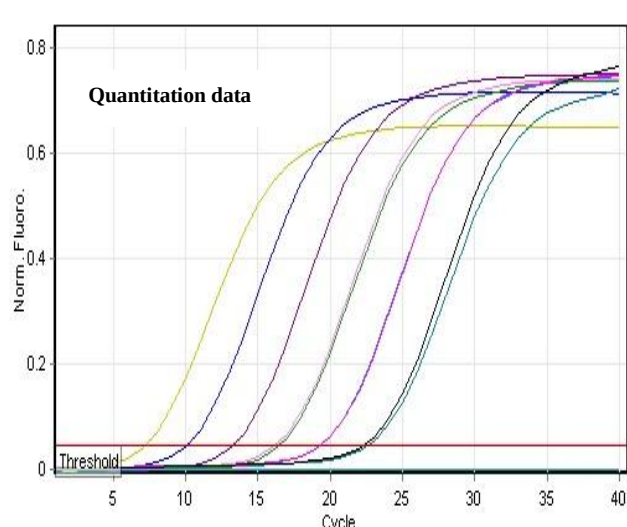
شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR پلاسمیدهای کلون های مثبت با استفاده از آغازگرهای ترکیبی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱kb، ستون NC مربوط به کنترل منفی (فاقد الگو) و ستون های ۱ تا ۶ مربوط به کلون های مثبت

انجام شد، که نتیجه آن مؤید موفقیت ترانسفکشن سلول های مورد نظر بود (شکل ۵). همان طور که در شکل ۵ ملاحظه می شود، 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 سلول های HEK 293A ژن Jag1 (ترانس ژن) را بیان می کنند، به منظور تایید نتیجه به دست آمده در پایش ترانسفکشن با استفاده از آغازگرهای تشخیصی، DNA استخراج شده از سلول های 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:

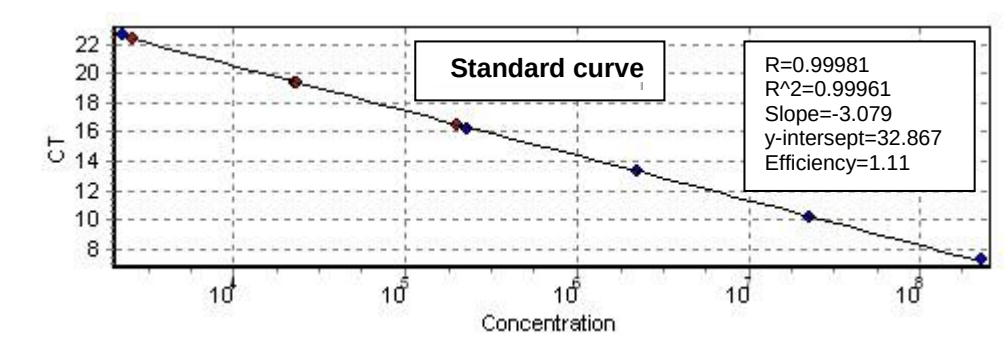
Real-time PCR با استفاده از دستگاه corbett Rotor-Gene 6000 انجام پذیرفت بدین ترتیب که با تخمین $10^9 \times$ ذره ویروس در میکرولیتر از پلاسمید تخلیص شده و با استفاده از رقت های لگاریتمی 10^{-1} تا 10^{-6} از آن، amplification plot نمونه های استاندارد پلاسمید ترسیم شد (شکل ۷).

وقتی محور y به صورت لگاریتمی است، حد (threshold) به شکلی تعیین می شود تا در ناحیه خطی نمودار تکثیر قرار گیرد. نقطه تقاطع amplification plot هر



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

شکل ۷: **amplification plot** از نمونه های استاندارد پلاسمید به همراه لیزات ویروس (بدون رقت و با رقت های 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 می شود. نمونه های واجد ذرات ویروسی (copy number) بیشتر حد را در سیکل پایین تری قطع می کنند و بالطبع در محدوده سمت چپ نمودار قرار می گیرند. در این نمودار، اولین نمونه ای که حد را قطع می کند، دارای $10^8 \times 2/07$ کپی از پلاسمید نو ترکیب آدنو ویروس است.

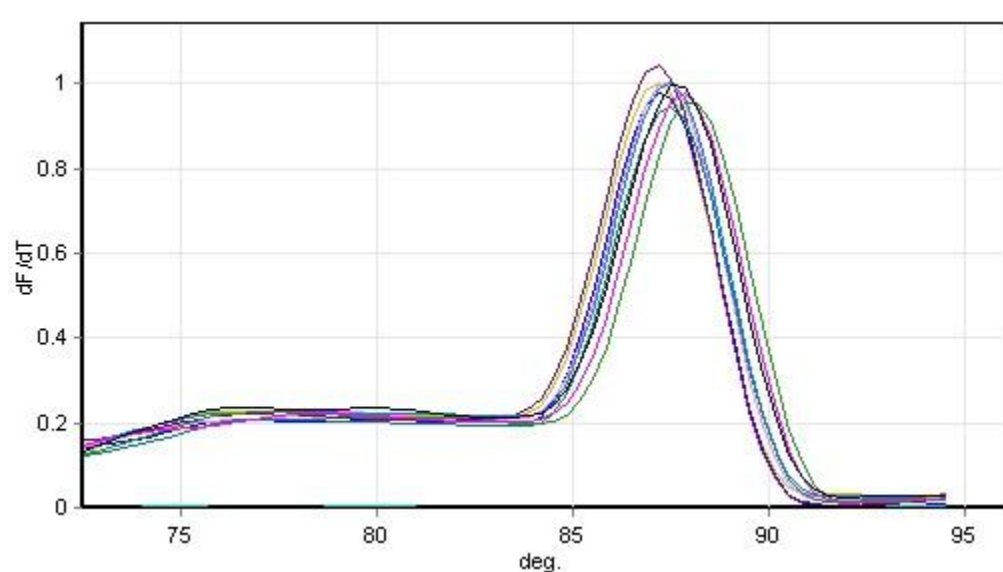


شکل ۸: نمودار استاندارد با قرار دادن Ct در مقابل copy number پلاسمید برای هر نمونه استاندارد ترسیم می شود. محدوده کمی نمودار استاندارد ترسیم شده بین $10^8 \times 2/07$ تا $10^3 \times 2/04$ است. معادله نمودار استاندارد مبنای محاسبه copy number نمونه های مجهول بر اساس Ct آن ها قرار می گیرد. R^2 : coefficient of determination، Slope: شیب خط، y-intercept: محل تلاقی نمودار با محور y ها.

آنالیز نمودار ذوب در محدوده ۸۸ درجه سانتی گراد، 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، تیتروسی ویروس در نمونه لیزات

نرم افزار Rotor-Gene 6000 با قرار دادن Ct هر یک از نمونه های استاندارد در مقابل copy number آن، نمودار استاندارد را رسم می کند. هم چنین این نرم افزار با مقایسه Ct نمونه های مجهول با نمودار استاندارد، copy number نمونه های مذکور را محاسبه می کند (شکل ۸).



شکل ۹: نمودار melting، در نقطه melting 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.

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. همان‌طور که اشاره شد تیتراسیون وکتورهای آدنوویروسی نو ترکیب با روش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی DNA آدنوویروس انجام پذیرفت (۱۱-۱۳).

آلودگی DNA تخلیص شده با DNA ویروسی فاقد کپسید و ژنوم ناقص ویروس، باعث انحراف نتایج روش Real-time PCR در تخمین تیتراژ آدنوویروس نو ترکیب 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 تیتراژ وکتورهای آدنوویروسی به روش Real-time

ویروس $10^7 \times 4/02$ در واحد حجم (میلی لیتر) برآورد شد: (Real-time PCR copy number/ $3/5 \times 10 \times 70$) ضرب رقت = تیتراژ ویروس

اعمال ضرب $3/5$ ، به دلیل استفاده از $3/5 \mu L$ از DNA استخراج شده از لیزات ویروس است. اعمال ضرب 70 به دلیل استخراج DNA از $100 \mu L$ لیزات ویروس و محلول نمودن آن در $70 \mu L$ آب مقطر و اعمال ضرب 10 جهت تعمیم تیتراژ ویروس به واحد حجم (میلی لیتر) 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 (۱۶، ۱۷). 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

DNA استخراج شده از سلول های ترانسفکت شده، مهر تاییدی است بر وجود سازه مورد نظر در سلول های مکمل و می تواند به تنهایی شاهد موفقیت یا عدم موفقیت ترانسفکشن باشد. در این تحقیق با استفاده از DNase 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.

نتیجه گیری

عدم وجود ژن گزارشگر در وکتورهای آدنو ویروسی، مراحل پایش ترانسفکشن را با محدودیت مواجه می کند. اما می توان با بهره گیری از روش های 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 محدودیت های کیفی تیتراسیون ویروس، می توان از روش جایگزین Real-time PCR بهره برد. پیشنهاد می گردد 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.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه دکترای هماتولوژی مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می باشد. 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 می گردد.

PCR مرتفع گردید (۱۹). وکتورهای آدنو ویروسی با حذف ژن های E1 و E3 به شکل replication defective در می آیند و به منظور تولید ویروس نیاز به سلول های مکملی دارند که پروتئین ژن های حذف شده را کد می کنند (۷). یکی از محدودیت های تولید و خصوصاً ازدیاد ویروس در سلول های مکمل، احتمال وقوع نو ترکیبی همولوگ بین ژنوم سلول مکمل و آدنو ویروس نو ترکیب است که منجر به جایگزینی ژن E1 به جای ترانس ژن شده، بدین ترتیب آدنو ویروس (RCA) replication competent ایجاد شده و ترانس ژن مورد نظر حذف می گردد (۷، ۸). روش های مولکولی تیتراسیون ویروس که تاکنون به کار گرفته شده اند، قادر به افتراق RCA از وکتور آدنو ویروسی نو ترکیب واجد ترانس ژن نبوده و نهایتاً منجر به انحراف نتایج از آزمون های کیفی می شود. لذا به نظر می رسد جهت تیتراسیون ویروس، استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانس ژن یا آغازگرهای ترکیبی (ترانس ژن و قطعه ای از وکتور) نسبت به آغازگرهای قطعات وکتور در افتراق ذرات RCA از وکتور آدنو ویروس نو ترکیب و احتراز از تخمین نامتعارف (overestimation) تیترو ویروس، ارجحیت داشته باشد. هم چنین با استفاده از آغازگرهای مختص ترانس ژن، موفقیت یا عدم موفقیت ترانسفکشن سلول های مکمل نظیر HEK 293A را به وسیله وکتورهای آدنو ویروسی نو ترکیب 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 آگزون مجاور با طول زیاد اینترون (long intron exclusion) مرتفع می گردد. در این مطالعه وجود باند ۹۸۵ bp در ستون ۱ شکل ۵، نشان دهنده وجود این ژن در ساختار ژنومی سلول مکمل (گروه کنترل) و باند ۱۲۹ bp مؤید وجود سازه مورد نظر در سلول های مکمل ترانسفکت شده است. یقیناً عدم رؤیت باند در آزمون مولکولی با آغازگرهای ترکیبی روی

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, Bluysen HA, De Raeymaeker M, Lauryens 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.

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

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Faculty of Medical Sciences, Baghyatallah University, Tehran, Iran

⁴Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Booshehr University of Medical Sciences, Booshehr, Iran

Abstract

Background and Objectives

Biological 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 transfer 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