خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۲ تابستان ۹۴ (۱۱۰-۱۰۱)

مقاله پژوهشی

همسانه‌سازی ژن *SOX2* انسانی در ناقل لنتی ویروسی و القای ژنی در سلول‌های HEK293T

انسیه درباری[۱]، زهرا سهیلا سهیلی[۲]

چکیده

سابقه و هدف

ژن ***SOX2*** در میان گونه‌ها، حفاظت شده بوده و از فاکتورهای مهم در القای سلول‌های پیش‌ساز از سلول‌های تمایز یافته می‌باشد که موجب حفظ خاصیت پرتوانی سلول‌های پیش‌ساز می‌شود. ***SOX2*** ، ***OCT4*** ، ***cMYC*** و ***KLF4*** سبب باز برنامه‌نویسی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی می‌شوند. امروزه از ژن ***SOX2*** در جهت تولید سلول‌های iPS و سلول درمانی استفاده می‌شود. در این تحقیق همسانه‌سازی ژن ***SOX2*** در ناقل لنتی ویروس و آلوده‌سازی سلول‌های HEK293T بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، توالی کدکننده ژن ***SOX2*** سنتز و در ناقل همسانه‌سازی pUC57 دریافت گردید. ژن ساخته شده در ناقل بیانی لنتی ویروس pLEX-MCS ساب ـ کلون شد. سازه نوترکیب توسط روش‌های PCR ، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. ذرات لنتی ویروس در سلول‌های تولید کننده HEK293T تولید شدند. از وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن GFP به عنوان کنترل استفاده شد. سلول‌های HEK293T توسط ذرات ویروسی آلوده شده و به وسیله مقاومت به آنتی‌بیوتیک پورومایسین انتخاب گردیدند. بیان ***SOX2*** در سلول‌های HEK293T توسط RT-PCR بررسی شد.

یافته‌ها

سازه نوترکیب بیان‌کننده ***SOX2*** ساخته و تایید گردید. سلول‌های HEK293T توسط ذرات ویروس آلوده شدند و پس از ۲۴ ساعت، بیش از ۹۰٪ سلول‌های HEK293T بیان GFP را از خود نشان دادند. با استفاده از روش RT-PCR بیان ***SOX2*** در سلول‌های HEK293T تایید شد.

نتیجه گیری

سلول‌های HEK293T با موفقیت سازه‌های نوترکیب را دریافت و ژن‌های GFP و ***SOX2*** را بیان نمودند.

کلمات کلیدی: فاکتور رونویسی ***SOX2*** ، وکتورهای کلونینگ، پروتئین‌های فلورسنت سبز

تاریخ دریافت : ۹۳/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش : ۹۴/ ۲/۳۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی ـ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی ـ استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

مقدمه

در طی تکامل جنینی با تقسیم سلولی، تمایز، مهاجرت و تشکیل اندام‌ها، خاصیت پرتوانی این سلول‌های بنیادی به طور برگشت‌ناپذیر از دست می‌رود. در سال ۲۰۰۶ تاکاهاشی و یاماناکا با بیان چهار فاکتور *c-MYC* ، *KLF4* ، *SOX2* و *OCT4* در سلول‌های تمایز یافته فیبروبلاست، سلول‌های شبیه سلول‌های بنیادی جنینی تولید کردند(۱). این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی(=iPSC induce Pluripotent Stem Cell) نامیده شدند. مزیت ایجاد سلول‌های پرتوان القایی در توانایی آن‌ها در تمایز به تمامی سلول‌های بالغ است. از این رو می‌توان از آن‌ها در درمان بیماری‌های غیر قابل درمان مانند بیماری‌های پارکینسون، آلزایمر، بیماری‌های قلبی و تخریب عصبی استفاده نمود(۲). این فرآیند تولید سلول‌های بنیادی القایی از سلول‌های تمایز یافته«دوباره باز برنامه‌نویسی (reprogramming)» نامیده شد. به دلیل این که منشا اولیه این سلول‌ها می‌تواند خود بیمار باشد، کاربرد این سلول‌ها در سلول درمانی سیستم ایمنی بدن را تحریک نمی‌کند. علاوه بر این، تکنولوژی حاضر به محققان این امکان را می‌دهد که بتوانند بیماری‌ها را در محیط *in vitro* مدل‌سازی کنند و عوامل مؤثر در پیشرفت یا درمان و کنترل بیماری را شناسایی نموده و بهترین روش درمان را انتخاب نمایند(۳). اما استفاده از تکنولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی دارای معایبی نیز می‌باشد(۴). فاکتورهای *c-MYC* و *KLF4* می‌توانند سبب ایجاد تومور گردند(۵). هم چنین برای انتقال فاکتورهای رونویسی القایی باید از لنتی ویروس‌ها استفاده نمود که گاهی با داخل شدن ژنوم ویروس به داخل ژنوم میزبان، جهش و سرطان زایی رخ می‌دهد(۶). امروزه برای جلوگیری از تومورزایی توسط فاکتورهای *c-MYC* و *KLF4* تنها از دو ژن *SOX2* ، *OCT4* برای دوباره باز برنامه‌نویسی استفاده می‌گردد(۷).

ژن پروتئین *SOX2* برای تولید پروتئین‌هایی که در تشکیل بافت‌های مختلف در طی تکامل جنینی نقش حیاتی دارند، لازم است. *SOX2* در زیگوت بیان شده و بیان آن بین مرحله مرولا و بلاستوسیت افزایش پیدا می‌کند. پروتئین آن ۳۱۷ اسید آمینه دارد و به مناطق خاص ژنوم متصل شده و فعالیت ژن‌ها را تنظیم می‌کند(۸).

این پروتئین با *OCT4* بر روی DNA کمپلکس تشکیل می‌دهد و بیان تعدادی از ژن‌ها مانند:

Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog1 *(YES1)*
Fibroblast Growth Factor *(FGF4)*
Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1, *(UTF1)*
Zinc Finger protein *(ZFP206)*

و

F-box and leucine-rich repeat protein *(FBX)*

را که در تکامل جنینی نقش دارند کنترل می‌کند. کمپلکس OCT4 و*SOX2* با پروتئین Nanog واکنش داده و رونویسی فاکتور *Rex1* را تنظیم می‌کند و موجب حفظ خاصیت پرتوانی سلول‌ها می‌شود(۹).

ژن درمانی یک روش درمانی جدید برای درمان بیماری‌های ژنتیکی، متابولیسمی، سرطان، عصبی و ایدز می‌باشد. هدف اصلی از ژن درمانی، انتقال یک ژن خاص به سلول مورد نظر و بیان این ژن برای درمان بیماری است(۱۰). برای ژن درمانی و انتقال ژن مورد نظر به داخل سلول، روش‌های متعددی وجود دارد. این روش‌ها به دو دسته ویروسی و غیر ویروسی تقسیم می‌شوند.

در روش‌های غیر ویروسی، انتقال ژن به وسیله ویروس‌های مصنوعی(لیپوزوم‌ها با ترکیبات مصنوعی)، پلاسمیدهای باکتریایی، وکتورهای پروتئین- چربی و کروموزوم‌های مصنوعی انجام می‌شود(۱۱).

در روش‌های ویروسی، وکتورهای ویروسی adeno-associated viruses ، adenoviruses ، retroviruses ، flavor viruses-herpes-simplex viruses استفاده می‌شوند. هر گروه از این وکتورها برای ژن درمانی در انسان دارای محدودیت‌هایی هستند. به عنوان مثال adenovirus و herpes- simplex viruses با القای سیستم ایمنی میزبان، مانع انتقال پایدار ژن در ژنوم میزبان می‌شوند و انتقال ژنوم در adeno-associated viruses وابسته به وکتورهای کمکی می‌باشند در حالی که توانایی‌های منحصر به فرد لنتی ویروس‌ها مانند توانایی انتقال ژن به صورت کارآمد و با بازدهی بالا به انواع سلول‌های پستانداران، بیان طولانی مدت ژن نوترکیب، توانایی انتقال ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده، عدم ایجاد پاسخ ایمنی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

ناخواسته و توانایی بیان نسبتاً بالای یک ژن در انواع سلول‌های پستانداران، مثل انواع رده‌های سلول‌های بنیادی، منجر به استفاده گسترده از این وکتورها در ژن درمانی در محیط *in vivo* و *in vitro* گردیده است. با این حال اشکالات و نگرانی‌هایی نیز در استفاده از این ابزار مهم وجود دارد. ملاحظات موجود عبارتند از امکان تولید لنتی ویروس‌های قادر به همانندسازی، جابه‌جایی حامل توسط رترو ویروس درون‌زا مستقر در ژنوم بیماران، جهش‌زایی افزایشی که منجر به سرطان می‌شود، تغییر ژرم – لاین که منجر به اثرات بین نسل‌ها شده و انتشار ویروس‌های جدید از بیماران ژن درمانی شده(۱۲). برای تولید لنتی ویروس حاوی ژن مورد نظر در محیط *in vitro* ، از سلول‌های HEK293T استفاده می‌گردد. لنتی‌ویروس‌های نوترکیب را می‌توان از ترنسفکت هم زمان وکتور ناقل ژن به همراه وکتورهای کمکی کدکننده آنزیم‌ها و نوکلئوپوشش‌ها و غشا به سلول‌های HEK293T تولید کرد. این ویروس‌های نوترکیب را می‌توان از محیط‌رویی سلول‌های HEK293T جمع‌آوری کرد. ژن‌های پوششی مختلف اجازه تولید لنتی‌ویروس‌های سروتایپ مختلفی را می‌دهد که تروپیسم‌های(تمایل نسبت به سلولی خاص) متفاوتی را نشان می‌دهند(۱۳). این تحقیق مقدمه‌ای برای استفاده از ناقلین ساخته شده در آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است. در این مرحله هدف تولید ذرات ویروسی ناقل ژن مورد نظر، اثبات آلوده شدن یک نوع سلول آزمایشی و بیان ژن مورد نظر و صحت عملکرد سازه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

تایید سازه نوترکیب PCR2.1SOX2 توسط هضم آنزیمی:

در یک مطالعه تجربی، با توجه به توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI ، توالی ژن *SOX2* تعیین و سفارش ساخت به شرکت Eurofin MWG Operon آلمان ارایه گردید. در هنگام طراحی توالی جهت تسهیل مراحل بعدی همسانه‌سازی، در انتهای '5 جایگاه برشی XhoI و در انتهای '3 جایگاه برشی BamHI قرار داده شد. در نهایت ژن *SOX2* ساخته شده و در پلاسمید pCR2.1 دریافت گردید.

بعد از دریافت سازه ژنی pCR2.1-*SOX2* ، این سازه نوترکیب به باکتری *E.coli-DH5α* مستعد(Competent) با روش شوک حرارتی ترانسفرم گردید و سپس روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. از کلونی‌های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین استخراج پلاسمید با کیت DNA-spin™Plasmid Purification Kit (کیاژن، آلمان) صورت پذیرفت.

واکنش هضم آنزیمی از سازه pCR2.1-*SOX2* و بازیابی ژن *SOX2*:

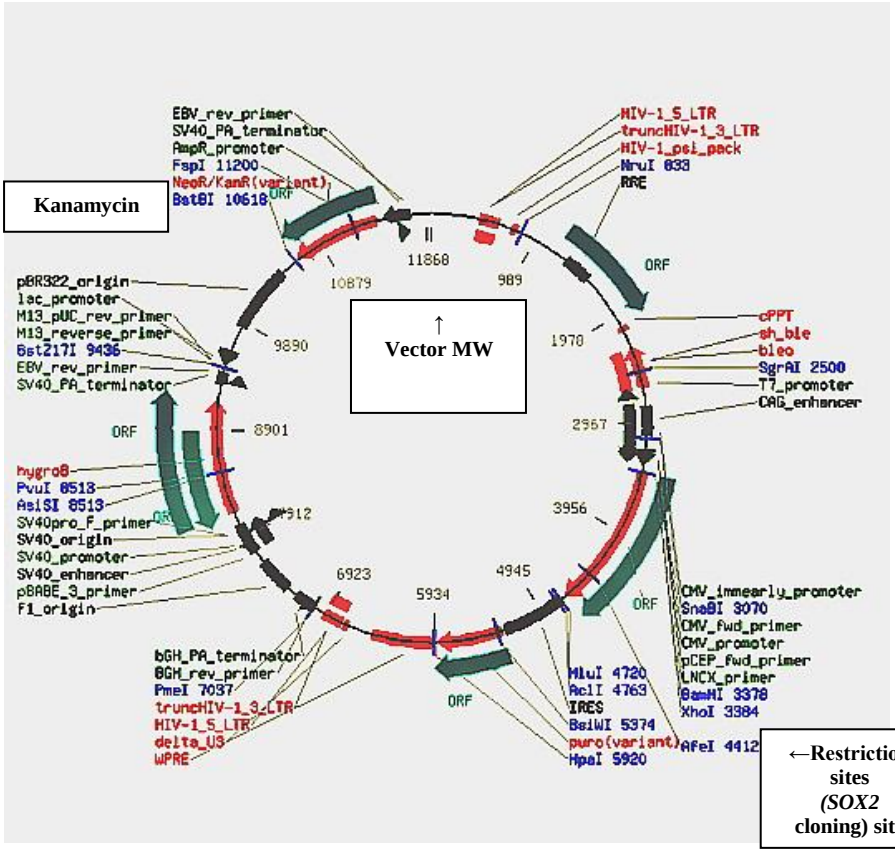
بعد از تایید شدن سازه نوترکیب pCR2.1-*SOX2* ، ژن *SOX2* توسط واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* برش خورده و روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. بدین منظور واکنش هضم آنزیمی در حجم زیادتر(۵۰ میکرولیتر) انجام گردید و بعد از جدا شدن باندها در روی ژل آگارز ۱٪، باند مربوط به ژن *SOX2* (۹۶۶ جفت باز) از روی ژل توسط تیغ اسکالپل بریده شده و توسط کیت تخلیص از روی ژل High Pure DNA Purification Kit شرکت رُوش، تخلیص و برای کلون شدن در پلاسمید pLEX-MCS-pur (ترموساینتیفیک) مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش اتصال و تایید سازه نوترکیب pLEX-*SOX2*-pur:

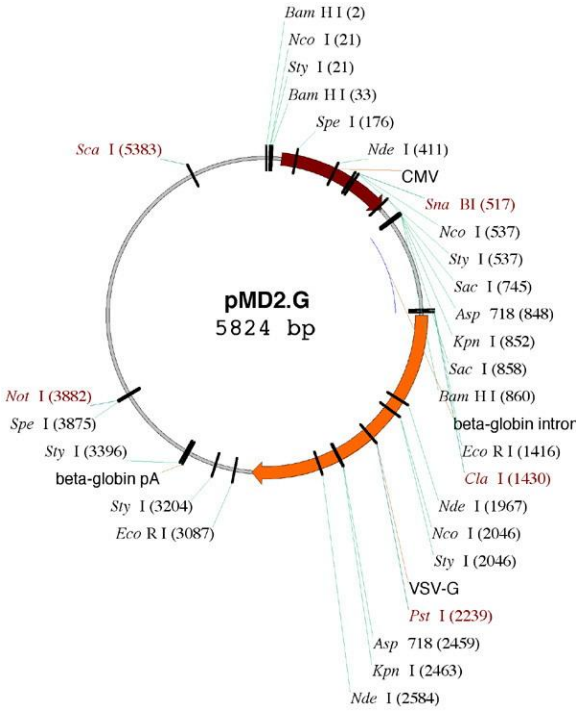
در مرحله بعد، ژن تخلیص شده از روی ژل جهت واکنش لیگاسیون ۱ با ناقل pLEX-MCS مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی ناقل pLEX-MCS توسط آنزیم‌های BamHI و *XhoI* انجام پذیرفت و سپس واکنش لیگاسیون به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد با نسبت ۳:۱ از ناقل به ژن هدف انجام گرفت.

محصول لیگاسیون به باکتری *E.coli*-DH5α مستعد ترانسفرم گردید و روی پلیت LB حاوی ۵۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه قرار گرفت. روز بعد از کلونی‌های رشد یافته استخراج پلاسمید انجام شد و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

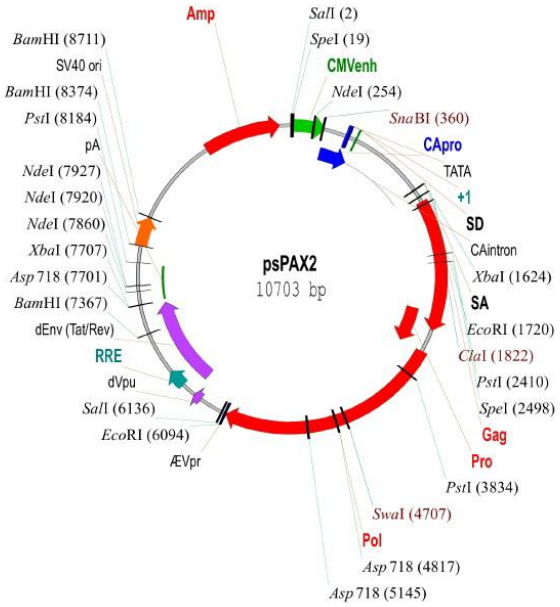


شکل ۱: وکتور SOX2 pLEX-MCS (۱۴)



شکل۲: وکتور pMD2G (۱۴)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]



شکل ۳- وکتور psPAX2 (۱۴)

واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *XhoI* و *BamHI* صورت گرفت.

تولید ذرات لنتی ویروس حاوی ژن *SOX2* :

سازه نوترکیب pLEX-*SOX2*-pur به همراه دو ناقل کمکی pMD2G و psPAX2 به صورت انتقال هم زمان و با روش کلسیم فسفات به سلول‌های HEK293T منتقل شدند(شکل‌های ۳-۱). ذرات لنتی ویروس در سلول‌های HEK293T تولید شد و سپس سلول‌های HEK293T توسط ذرات ویروسی آلوده گردیدند. سلول‌های آلوده شده توسط مقاومت به آنتی‌بیوتیک پورومایسین انتخاب شدند.

مراحل ترنسفکشن بدین شرح صورت گرفت: کشت سلول‌های HEK293T ۲۴ ساعت قبل از ترنسفکشن انجام شد و سپس ۲ mL از ۴ mL محیط کشت با ۲ mL محیط تازه بدون سرم تعویض گردید. برای ترانسفکشن ابتدا در یک ویال استریل DNA ، $CaCl_2$ و آب تزریقی استریل کاملاً با هم مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس این محلول به لوله فالکون حاوی ۴۳۵ µL محلول از HBS (۱۰ X) و بافر فسفات و کلسیم کلراید ۲ مولار و سود یک نرمال اضافه گردید. اضافه شدن محلول DNA به محلول فوق به صورت قطره قطره و هم زمان همراه با حباب‌سازی توسط پیپت و پیپتور بود. محلول فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و پس از آن به صورت قطره قطره به پلیت حاوی سلول اضافه گردید.

تایید بیان سازه نوترکیب در سلول‌های HEK293T :

جهت تایید قدرت بیان سازه نوترکیب pLEX-*SOX2*-pur، این سازه به تنهایی و بدون ناقل‌های کمکی با استفاده از روش کلسیم فسفات به سلول‌های HEK293T ترنسفکت گردید. ۲۴ ساعت بعد از ترنسفکت، استخراج RNA از سلول‌های HEK293T صورت گرفت. پس از ساخت cDNA و انجام واکنش PCR ، بیان ژن *SOX2* روی ژل آگارز بررسی گردید.

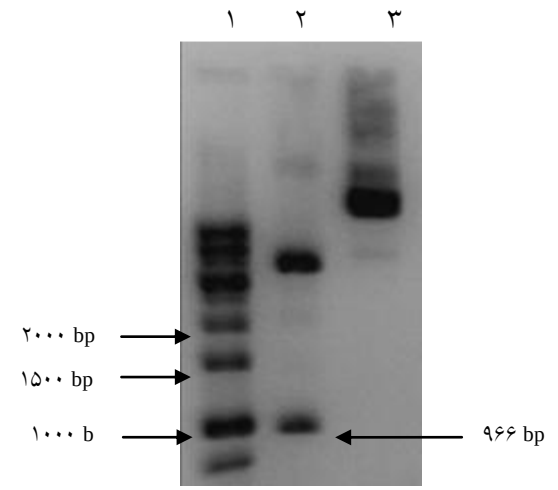
یافته‌ها

برای تخلیص ژن *SOX2* ، واکنش هضم آنزیمی از سازه pCR2.1-*SOX2* صورت گرفته و باند مربوط به ژن *SOX2* از روی ژل تخلیص گردید (شکل ۴).

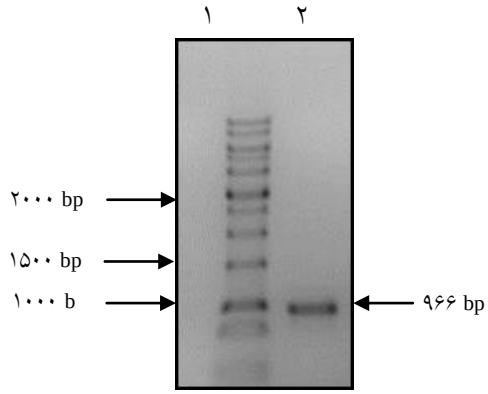
بعد از همسانه‌سازی، سازه نوترکیب pLEX- *SOX2*-pur، آزمایش‌های تاییدی برای اطمینان از صحت همسانه‌سازی صورت گرفت. با استفاده از PCR با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

آغازگرهای اختصاصی دو سر ژن، باند مربوط به *SOX2* (۹۶۶ جفت باز) روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد(شکل ۵).



شکل ۴: الکتروفورز مربوط به استخراج miniprep و هضم آنزیمی از pCR2.1-*SOX2* ،۱- 1Kb DNA Ladder BiORON ، ۲- محصول هضم آنزیمی، ۳- محصول استخراج



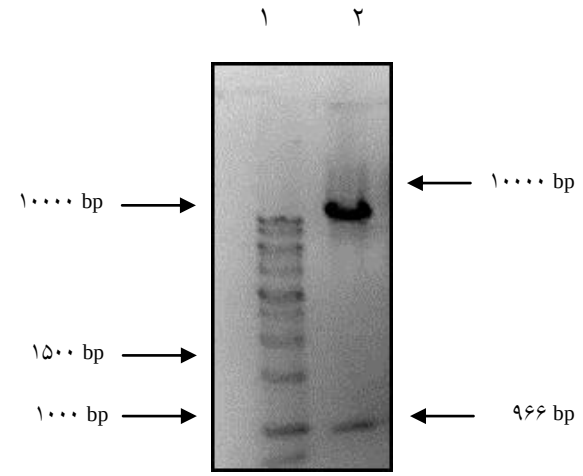
شکل ۵ : الکتروفورز مربوط به انجام PCR از pLEX- *SOX2*-pur برای ژن *SOX-2* ۱- 1Kb DNA ladder Bioron ۲- محصول PCR

ترادف آغازگرهای SOX2:

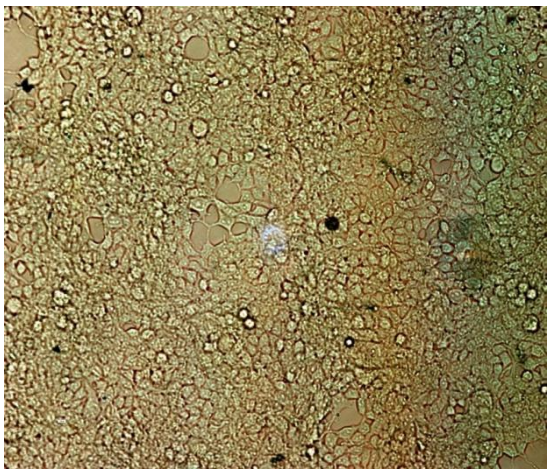
آغازگر جلوبرنده:(ATGTATAATATGATGGAGACTGAG)

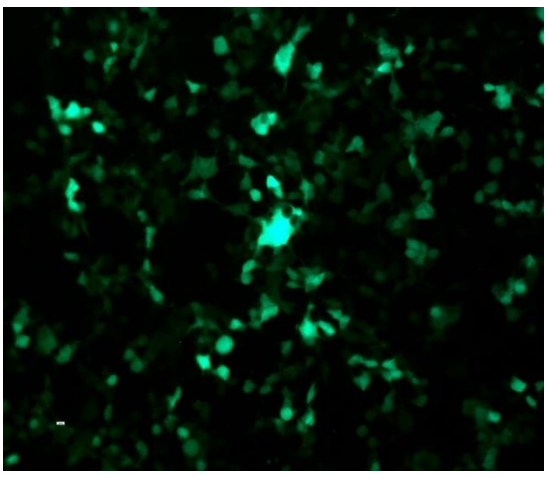
آغازگر معکوس:(TCGCATGTAGAGGGGCAG)

به منظور اطمینان بیشتر، هضم آنزیمی روی پلاسمید استخراج شده حاکی از همسانه‌سازی صحیح ژن *SOX2* در ناقل مورد نظر بود(شکل ۶). هم چنین، تعیین توالی سازه نوترکیب با آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو انجام شد. توالی فرستاده شده با استفاده از نرم‌افزارهای Edit Seq



شکل ۶: الکتروفورز مربوط به هضم آنزیمی از سازه نوترکیب pLEX-*SOX2*-pur ۱- DNA ، Kb ladder BiORON ، ۲- محصول هضم آنزیمی





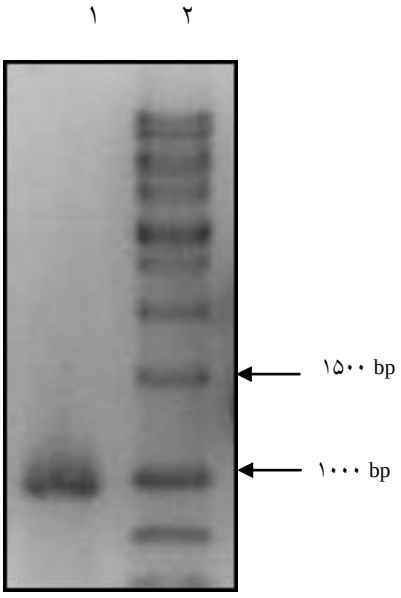
شکل ۷- بیان *GFP* در سلول‌های HEK293T (۱۰۰ X)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

و Seq Man مورد بررسی قرار گرفت و پس از هم ردیفی توالی با داده‌های بانک ژنی، صحت توالی کلون شده تایید گردید.

به عنوان کنترل از ناقل لنتی ویروس حاوی ژن *GFP* جهت ترنسفکت سلول‌های HEK293T استفاده گردید. بعد از ترنسفکت سازه حاوی *GFP* به سلول‌های HEK293T ، محیط رویی این سلول‌ها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع‌آوری گردید. سپس سلول‌های HEK293T توسط رقت ۲×۱۰^{-۳} از نمونه ویروس‌های جمع‌آوری شده آلوده گردیدند و مشاهده شد که پس از ۲۴ ساعت، بیش از ۹۰٪ سلول‌های HEK293T بیان GFP (Green Fluorescent protein) را نشان دادند(شکل ۷).

۲۴ ساعت بعد از ترنسفکت، استخراج RNA از سلول‌های HEK293T صورت گرفت. نتایج RT-PCR بیان ژن *SOX2* در سلول‌های HEK293T را تایید نمود(شکل ۸).



شکل ۸: الکتروفورز مربوط به تایید بیان وکتور pLEX-MCS *SOX2* در سلول‌های HEK293T ترنسفکت شده. ۱- محصول PCR، ۲- 1 Kb ladder DNA ، BiORON

بحث

سلول درمانی یک روش در پزشکی ترمیمی می‌باشد که در آن سلول‌های سالم با سلول‌هایی که مرده‌اند و یا در عملکرد آن‌ها اختلال به وجود آمده جایگزین می‌شوند (۱۶، ۱۵). برای مثال، در رتینیتیس پیگمنتوزا سلول‌های فوتورسپتور از بین می‌روند. جایگزین درمانی برای این مورد شامل ترنسپلنت سلول‌هایی است که با شبکیه میزبان همراه شده و به عنوان فوتورسپتور عمل می‌کنند(۱۸، ۱۷). در کنار اهمیت انتخاب منبع سلولی مناسب، یکی دیگر از مباحث بسیار با اهمیت در سلول درمانی و ژن درمانی انتخاب یک ناقل مناسب می‌باشد(۲۰، ۱۹). لنتی ویروس‌ها به عنوان ناقل، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند توانایی انتقال ژن به صورت کارآمد و با بازدهی بالا به انواع سلول‌های پستانداران، بیان طولانی مدت ژن نوترکیب، توانایی انتقال ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده و عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته، می‌باشند که سبب استفاده گسترده از این ناقل‌ها برای ژن درمانی در محیط *in vivo* و *in vitro* گردیده است(۲۲، ۲۱).

یکی از راه‌های ایجاد تمایز هدفمند در سلول‌های بنیادی، استفاده از بیان فاکتورهای رونویسی جهت تمایز سلول‌ها در محیط *in vitro* و سپس استفاده از این سلول‌های تمایز یافته و یا نیمه تمایز یافته جهت سلول درمانی می‌باشد. با توجه به مزیت‌های ذکر شده برای استفاده از سیستم‌های لنتی ویروسی، در این تحقیق، از سیستم سه ناقلی لنتی ویروسی pLEX-MCS استفاده گردید. در ناقل ترانسفر مورد استفاده در این پژوهش، ژن *SOX2* به همراه ژن مقاومت به پوروماسین به صورت هم زمان بیان می‌شوند. در نتیجه می‌توان گفت که در سلول‌هایی که مقاومت به پوروماسین را نشان می‌دهند، ژن *SOX2* نیز به صورت هم زمان بیان گردیده است که البته این موضوع توسط Real-Time PCR بررسی و تایید شد. یکی از راه‌های ایجاد تمایز هدفمند در سلول‌های بنیادی، استفاده از بیان فاکتورهای رونویسی جهت تمایز سلول‌ها در محیط *in vitro* و سپس استفاده از این سلول‌های تمایز یافته و یا نیمه تمایز یافته جهت سلول درمانی می‌باشد. برای جایگزین سلول درمانی سلول‌های آسیب دیده از طریق بهره‌مندی از سلول‌های بنیادی، وجود یک ژن تنظیم‌گر بنیادی که تمامی نیازهای تمایزی را برآورده سازد، مهم‌ترین عامل است. در این تحقیق با توجه به ویژگی‌های ژن *SOX2* و نقش مهم آن در پایداری

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

ویژگی‌های خود تکثیری و بنیادی بودن، از این فاکتور کلونینگ استفاده گردید تا در پژوهش‌های آتی برای تمایز زدایی از سلول‌های تمایز یافته و مطالعه‌های مربوط به ایجاد سلول‌های خونی، از سلول‌های تمایز زدایی شده استفاده شود. بنابر مطالعه‌های صورت گرفته، به نظر می‌رسد که تهیه ذرات ویروسی حاوی این فاکتور رونویسی می‌تواند برای مطالعه‌های بیشتر جهت بررسی تمایز هدفمند انواع سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های مختلف استفاده گردد. به همین دلیل ژن بسیار مهم *SOX2* در مطالعه‌های آتی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انتقال یافته و در محیط‌های مناسب تمایزی امکان تمایز به رده‌های خونساز نیز بررسی خواهد شد.

در این تحقیق، بعد از همسانه‌سازی ژن *SOX2* و تایید سازه نوترکیب pLEX-*SOX2*-pur توسط روش‌های مولکولی، سازه تایید شده به تنهایی به سلول‌های HEK293T ترانسفکت گردید و توانایی بیان این ژن توسط RT-PCR در سلول‌های HEK293T بررسی شد. این موضوع در آزمایش‌هایی که با بیان یک سازه نوترکیب مربوط است حایز اهمیت می‌باشد. چون این احتمال وجود دارد که در حین انجام مراحل همسانه‌سازی به علت جهش‌های احتمالی در سازه نوترکیب، این سازه قدرت بیان ژن مورد نظر را از دست بدهد، بنابراین می‌توان بعد از همسانه‌سازی ژن مورد نظر، بیان آن را بررسی و از صحت سازه نوترکیب مطمئن گردید.

بررسی‌های ما نشان داد که ژن *SOX2* به خوبی و با صحت ترادف در ناقل لنتی ویروسی مورد نظر کلون گردید و ناقل بیانی حاصل به همراه دو ناقل کمکی توانستند سلول‌های HEK293T را در یک ترانسفکشن سه‌تایی آلوده کنند و پارتیکل‌های ویروسی را تولید نمایند. این ذرات ویروسی قادر بودند سلول‌های HEK293T را آلوده ساخته و بیان ژن *SOX2* و GFP را نشان دهند. نتایج و محصولات این مطالعه برای مطالعه‌های باز برنامه‌نویسی سلولی و یا القای تمایز در سلول‌های بنیادی با دیدگاه تمایز به سمت سلول‌های خونساز مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعه‌های مشابه انجام شده دو جنبه از عملکرد *SOX2*، که تمایز و تکثیر hMSCs (Human Mesenchymal Stem Cells) است مورد توجه قرار گرفته است. مکانیسم مولکولی که در هنگام از دست دادن *SOX2* باعث تمایز می‌شود، در این مطالعه‌ها بررسی شده‌اند. بیان *SOX2* در بقای توانایی چند قوه‌ای بودن hMSCs بسیارمهم است. این وظایف عملکرد *SOX2* تا حد زیادی از طریق تنظیم بیان *c-Myc* انجام می‌شود که کاملاً متفاوت از نقش آن در ESCs (Embryonic Stem Cells) است. این نتایج یک مکانیزم و نقش جدید را برای بیان *SOX2* در تمایز سلول‌های بنیادی بالغ مطرح ساخته و یک راهنمای مهم برای تحقیقات بالینی بیشتر در hMSCs و مطالعه‌های رشد و تکوین سلول‌های بنیادی بالغ ارایه می‌کنند(۲۳).

نتیجه‌گیری

بررسی‌های ما نشان داد که ژن *SOX2* به خوبی و با صحت ترادف در ناقل لنتی ویروسی مورد نظر کلون گردید و ناقل بیانی حاصل به همراه دو ناقل کمکی توانستند سلول‌های HEK293T را در یک ترانسفکشن سه‌تایی آلوده کنند و پارتیکل‌های ویروسی را تولید نمایند. این ذرات ویروسی قادر بودند سلول‌های HEK293T را آلوده ساخته و بیان ژن *SOX2* و GFP را نشان دهند. نتایج و محصولات این مطالعه برای مطالعه‌های باز برنامه‌نویسی سلولی و یا القای تمایز در سلول‌های بنیادی با دیدگاه تمایز به سمت سلول‌های خونساز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تشکر و قدردانی

تحقیق ارایه شده با کمک حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. نویسندگان مقاله صمیمانه از حمایت‌های مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تشکر می‌کنند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

References :

1- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by define factors. Cell 2006; 126(4): 663-76.
2- Ebben JD, Zorniak M, Clark PA, Kuo JS. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for. World Neurosurg 2011; 76(3-4): 270-5.
3- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, *et al* . Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(8): 2883-8.
4- Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2011, 366(1575): 2198-207.
5- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al*. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(8): 101-6.
6- Ranzani M, Cesana D, Bartholomae CC, Sanvito F, Pala M, Benedicenti F, *et al*. Lentiviral vector-based insertional mutagenesis identifies genes associated with liver cancer. Nat Methods 2013; 10(2): 155-61.
7- Ebben JD, Zorniak M, Clark PA, Kuo JS. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for. World Neurosurg 2011; 76(3-4): 270-5.
8- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev 2003; 17(1): 126-40.
9- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, *et al*. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 2005; 280(26): 24731-7.
10- Razi Soofiyani S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. Adv Pharm Bull 2013; 3(2): 249-55.
11- Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. Nat Rev Genet 2014; 15(8): 541-5.
12- Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. New Microbiol 2013; 36(1): 1-22.
13- Guy HM, McCloskey L, Lye GJ, Mitrophanous KA, Mukhopadhyay TK. Characterization of lentiviral vector production using microwell suspension cultures of HEK293T-derived producer cells. Hum Gene Ther Methods 2013; 24(2): 125-39.
14- Didier Trono Lab. Trono Lab Packaging and Envelope Plasmids. Available from: http://www.addgene.org.
15- Jorgensen C, Deschaseaux F, Planat-Benard V, Gabison E. Mesenchymal stem cells: A therapeutic update. Med Sci (Paris) 2011; 27(3): 275-84. [Article in French]
16- Machalinska A, Lubinski W, Penkala K, Kawa M, Baumert B, Wiszniewska B, *et al*. Functional improvement of injured retina following the adjuvant stem cell-based therapy. Preliminary report. Klin Oczna 2011; 113(4-6): 117-21. [Article in Polish]
17- Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(34): 12769-74.
18- Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, *et al*. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. J Cell Sci 2009; 122(Pt 17): 3169-79.
19- Amado RG, Chen IS. Lentiviral vectors the promise of gene therapy within reach? Science 1999; 285(5428): 674-6.
20- Mátrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. Mol Ther 2010; 18(3): 477-90.
21- Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. Mol Ther 2002; 5(5 Pt 1): 555-65.
22- Naldini L. In vivo gene delivery by lentiviral vectors. Thromb Haemost 1999; 82(2): 552-4.
23- Park SB, Seo KW, So AY, Seo MS, Yu KR, Kang SK, Kang KS. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. Cell Death Differ 2012; 19(3): 534-45.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(2): 101-110

Original Article

Cloning of human *SOX2* in lentiviral vector and transduction of HEK293T cell line

Darbari E.[1], Soheili Z.S.[2]

[1]College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Recently the regenerative stem cell-based therapy has held great promise in treating severe degenerative diseases. *SOX2* gene is highly conserved among species and plays an important role in maintenance of self renewal capacity in stem cells. *SOX2* concomitant with OCT4, cMYC, and KLF4 is recruited to reprogram somatic cells towards stem cells. Today *SOX2* is frequently being used in induced pluripotent stem cells generation and desired cell based therapies. The aim of this study was to clone *SOX2* gene in lentiviral vector and evaluate HEK293T transduction.

Materials and Methods

In the present experimental study, the coding sequence of human *SOX2* gene was synthesized and received in pUC57 cloning vector. The synthesized cDNA was sub-cloned into pLEX-MCS Lentiviral vector. Lentiviral particles were produced in HEK293T cells and subsequently the HEK293T were transducted and infected cells were selected by their resistance to puromycin in the culture. Expression of *SOX2* was evaluated in infected HEK293 cells by using Real-Time PCR.

Results

Constructs expressing *SOX2* gene were produced and confirmed. HEK293T was successfully transducted by lentiviral particles and after 24 hours more than 90% of HEK293T represented the expression of GFP. Real-Time PCR confirmed *SOX2* expression in infected HEK293 cells.

Conclusions

HEK293T wase transducted and expressed GFP and *SOX2* successfully.

Key words: *SOX2* Transcription Factor, Cloning Vectors, Green Fluorescent Proteins

Received: 1 Feb 2015
Accepted: 20 May 2015

Correspondence: Soheili ZS., PhD of Biochemistry. Assistant Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.
P.O.Box: 14956-161, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 44787379; Fax: (+9821) 44787399
E-mail: *soheili@nigeb.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]