خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۶ شماره ۱ بهار ۹۸ (۴۳-۳۲)

مقاله پژوهشی

تولید رده سلولی K562 بیان کننده اندونوکلئاز Cas9 (CRISPR-associated9)

فائزه انصاری[۱]، مهین نیکوگفتار ظریف[۲]، امیر علی حمیدیه[۳]، مهدی شمس‌آرا[۴]

چکیده

سابقه و هدف

امروزه ژنوم رده‌های سلولی به منظور ایجاد مدل‌های بیماری و درمان آن‌ها ویرایش می‌شود. البته بزرگی ژن *Cas9* موجب مشکلاتی از جمله پایین بودن کارآیی سیستم CRISPR شده است. برای حل این مشکل، رده‌های سلولی بیان‌کننده Cas9 تولید شده‌اند که در آن‌ها تنها باید بخش RNA راهنمای CRISPR به سلول ترانسفکت شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، قطعه PGK-PURO/CMV (PPC) با PCR از وکتور pAAVS1-puro-DNR تکثیر شده و در وکتور pTG19-T همسانه‌سازی شد. سپس قطعه PPC از این وکتور با آنزیم‌های KpnI و EcoRI خارج شد. وکتور pCas-Guide-AAVS1 نیز تحت برش آنزیمی مشابه قرار گرفت و اتصال آن با قطعه PPC منجر به ساخت وکتور pPPC-Cas گردید. پس از بهینه کردن شرایط الکتروپوریشن، وکتور pPPC-Cas به درون سلول‌های K562 الکتروپوریت شد و سلول‌های مقاوم به پرومایسین انتخاب شدند و میزان بیان Cas9 در آن‌ها با Real-time PCR بررسی شد.

یافته‌ها

با PCR قطعه‌ای به طول ۲۵۱۴ جفت باز تکثیر شد. وکتور pPPC-Cas طی دو مرحله همسانه‌سازی ساخته شد. سلول‌های ترانسفکت شده مقاوم به پرومایسین انتخاب شدند. انتخاب کلونی در ادامه انجام شد و سه کلونی که نسبت به هم بیان‌های بالا، متوسط و پایین داشتند، انتخاب شدند.

نتیجه گیری

در این مطالعه سلول‌های K562 بیان‌کننده Cas9 به دست آمدند که از آن‌ها می‌توان در مطالعه‌های آتی‌ژنومیک عملکردی و نیز تولید مدل‌های سلولی بیماری‌های انسانی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: رده سلولی، الکتروپوریشن، ویرایش ژنی

تاریخ دریافت: ۹۷/ ۶/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

۱- کارشناس ارشد زیست فن آوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دکترای خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- فوق تخصص هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی ـ مرکز طبی کودکان ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: دکترای ژنتیک ـ استادیار پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی ـ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ـ همت غرب ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

مقدمه

امروزه سیستم‌های ویرایش ژن برای مقاصدی چون شناسایی نقش ژن‌ها، تولید موجودات مدل، تولید رده‌های سلولی دست‌کاری شده، واکسن و درمان بیماری‌ها بسیار مورد توجه می‌باشند(۵-۱). در این میان سیستم CRISPR/Cas به علت سادگی، ارزان‌تر بودن و محدودیت‌های کمتر در استفاده، گوی سبقت را از فناوری‌های رقیب نظیر ZFN (Zinc finger nuclease) و TALEN (Transcription activator-like effector) ربوده است(۶). برای نمونه، با ظهور روش‌های ویرایش ژنوم، گزارش‌هایی مبنی بر ویرایش ژن بتا-گلوبین و یا فعال نمودن هموگلوبین جنینی با این روش‌ها وجود دارد(۷). سیستم CRISPR در واقع بخشی از سیستم ایمنی اکتسابی پروکاریوت‌ها است. انواع مختلفی از سیستم‌های CRISPR در باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. اما پرکاربردترین سیستم به منظور ویرایش ژنوم، سیستم CRISPR/Cas9 است که از دو جزء آندونوکلئاز Cas9 و RNA راهنما (sgRNA) تشکیل شده است. به منظور ویرایش ژنی، ابزار CRISPR به اشکال مختلف در قالب پلاسمید، RNA و کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین قابل استفاده است. پلاسمیدهای بیان‌کننده نوکلئاز Cas9 و RNA راهنما، ساده‌ترین و ارزان‌ترین شکل استفاده از CRISPR هستند که در آن پلاسمید به تنهایی به داخل سلول هدف وارد می‌شود. اما به دلیل بزرگ‌بودن ژن رمزکننده *Cas9* (حدود ۴ کیلو جفت باز) کارآیی ترانسفکشن این دست پلاسمیدها معمولاً پایین است. برای حل این مشکل امروزه رده‌های سلولی بیان‌کننده Cas9 را توسعه داده‌اند. مزیت استفاده از این رده‌های سلولی آن است که لازم نیست به همراه sgRNA ، ژن *Cas9* هم وارد سلول شود و بدین ترتیب قابلیت و کارآیی سیستم CRISPR/Cas در ویرایش ژنوم افزایش می‌یابد. لذا این دست سلول‌ها، تبدیل به ابزار مفیدی در شناسایی اهداف دارویی و درمانی و نیز مطالعه عملکرد ژن‌ها شده‌اند.

با توجه به تمام مزیت‌هایی که فناوری CRISPR/Cas9 دارد، در این مطالعه سعی شده است تا به منظور اثر بخشی بهتر آن، یک رده سلولی K562 بیان‌کننده ژن *Cas9* تولید شود تا در مطالعه‌های آینده مرتبط مورد استفاده قرار بگیرد. رده سلولی K562 یک رده سلولی است که از بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن(CML) گرفته می‌شود و برای مطالعه‌های مربوط به بیماری‌های خونی یک رده سلولی مناسب می‌باشد(۸). نشان داده شده است که استفاده از این رده‌های سلولی موجب می‌شود تا کل فرآیند اصلاح ژنی سریعتر با صرف هزینه کمتر و با تاثیرگذاری بیشتر صورت بگیرد(۹).

با توجه به همه موارد مطرح شده، هدف از مطالعه حاضر تولید رده سلولی K562 بیان‌کننده اندونوکلئاز Cas9 (CRISPR-associated9) با هدف انجام مطالعه‌های مرتبط با بیماری‌های خونی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بوده و بر روی رده سلولی K562 انجام گردیده است و دارای دو بخش مولکولی و سلولی می‌باشد.

بخش مولکولی

کشت باکتری:

برای کشت باکتری در محیط LB (Luria- Bertani) ، مایع حاوی سدیم کلراید، تریپتون، عصاره مخمر، آب، ساخته شده در محیط آزمایشگاه تحت شرایط استریل یک کلنی از باکتری *E.coli* در لوله آزمایش دارای ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب تلقیح شد. سپس فالکون به مدت ۱۷ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰ rpm شیک گردید.

استخراج پلاسمید در مقیاس کوچک(Mini-prep):

DNA پلاسمید به روش لیز قلیایی(Mini-Prep Plasmid DNA extraction) با استفاده از کیت استخراج پلاسمید و بر اساس دستورالعمل شرکت یکتا تجهیز آزما، استخراج گردید.

وکتورهای استفاده شده:

در این مطالعه وکتورهای pAAVS1-Puro-DNR به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

سکانس هدف	جلوبرنده('5-'3)	معکوس('5-'3)	سایز آمپلیکون
PPC	CCGGAATTCCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAAC*	GCAGATCTCCTCGGTACCGGATCCA GTCGACAAATTC*	۲۵۱۴ bp
B2M	CGCTACTCTCTCTTTCTGG	GTCAACTTCAATGTCGGATGGAT	۱۴۳ bp
Cas9 trans	CCCCAAGAAAAAACGCAAGGTG	GTTCAGGAAACAGCTATGACCG	۱۸۱ bp

*خط زیر نشان‌دهنده جایگاه برش آنزیمی EcoRI در آغازگر بالادست(جلوبرنده) و KpnI در آغازگر پایین‌دست(معکوس) است.

عنوان DNA الگو برای تکثیر قطعه PGK-Puro-CMV (پروموتر ژن فسفوگلیسرات کیناز، ژن مقاومت به پرومایسین و پروموتر ویروس سیتومگالو)، وکتور pTG19-T برای همسانه‌سازی محصول PCR قطعه PGK-Puro-CMV، وکتور pCas-Guide-AAVS1 برای زیر همسانه‌سازی(Subcloning) قطعه PGK-Puro-CMV و وکتور pEGFP-C1 به منظور بهینه‌کردن شرایط الکتروپوریشن مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی آغازگر:

طراحی آغازگر برای تکثیر قطعه PPC از پلاسمید هدف و نیز سنجش کمی بیان ژن *Cas9* منتقل شده به سلول‌های K562 استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار OLIGO7 طراحی شدند و از لحاظ ساختارهای ثانویه، تشکیل دایمر و نقطه ذوب(Tm) بررسی گردیدند. اختصاصی بودن آغازگرها نیز در سایت NCBI (Primer-BLAST) مورد ارزیابی قرار گرفت(جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR):

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور تکثیر قطعه PGK-Puro-CMV (به اختصار PPC) از وکتور pAAVS1-puro-DNR با استفاده از کیت Taq DNA Pol. 2X Master Mix از شرکت آمپلیکون طبق برنامه زمانی دمایی(یک چرخه دناتوره شدن اولیه ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه دناتوره شدن ثانویه ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در۵۸ درجه سانتی گراد، پلی‌مریزه شدن رشته DNA دو دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه پلی‌مریزه شدن نهایی ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) در ترمال سایکلر انجام شد و به منظور تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از کیت استخراج از ژل Gel and PCR Product Purification Mini Kit ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد.

واکنش اتصال(Ligation):

در این مطالعه واکنش اتصال یک بار به منظور همسانه‌سازی محصول PCR (قطعه PPC) در وکتور pTG19-T و بار دیگر برای زیر همسانه‌سازی قطعه PPC از وکتور pTG19-T به درون وکتور pCas-Guide-AAVS1 مورد استفاده قرار گرفت. در واکنش اتصال از آنزیم T4 DNA ligase استفاده شد و نسبت مولی vector:insert به صورت ۱:۳ در نظر گرفته شد. پس از آماده‌سازی واکنش اتصال در یک لوله، به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

محصول PCR در جایگاه کلونینگ پلاسمید pTG19-T همسانه‌سازی شد. محصول واکنش اتصال، به باکتری *E.coli* سویه *DH5α* ترانسفورم شد. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از واکنش اتصال به باکتری مستعد اضافه و به آرامی با هم مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گذاشته شد. به مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید. برای تایید حضور قطعه مورد نظر در وکتور pTG19-T از کلونی‌های به دست آمده، پلاسمید

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

استخراج شد و با آنزیم‌های KpnI و EcoRI برش داده شد. خروج قطعه PPC نشانه موفقیت در همسانه‌سازی ژن بود. هم چنین وکتور نوترکیب با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 وT7 به روش سنگر توالی‌یابی شد. نتایج تعیین توالی با نرم‌افزار Fich TV بررسی شدند.

در ادامه به منظور زیر همسانه‌سازی قطعه PPC در وکتور بیانی، هضم آنزیمی EcoRI و KpnI روی پلاسمید حامل قطعه PPC و وکتور pCas-Guide-AAVS1 انجام شد. واکنش اتصال بین قطعات PPC و وکتور بیانی خطی انجام شده و پس از ترانسفورماسیون باکتری مستعد، پلاسمیدهای نوترکیب با هضم آنزیمی و خروج قطعه هدف شناسایی شدند.

استخراج پلاسمید در مقیاس زیاد(Maxi-Prep) :

پس از تایید همسانه‌سازی ژن در وکتور پستاندار، برای الکتروپوریت کردن وکتور pPPC-Cas به سلول‌های K562 ، استخراج پلاسمید در مقیاس زیاد توسط کیت Plasmid DNA Extraction Maxi kit ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد.

بخش سلولی:

در این مطالعه رده سلولی K562 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. محیط کشت مناسب استفاده شده برای رشد این سلول‌های معلق(جیبکو) RPMI Medium 1640 به همراه ۱۰٪ FBS (سرم جنین گاوی) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین بوده و طبق دستور ATCC شرایط محیطی کشت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت می‌باشد.

ترانسفکشن سلول‌های K562 :

یکی از روش‌های انتقال وکتورهای پلاسمیدی یا یک DNA خارجی به درون سلول، الکتروپوریشن (Electroporation) می‌باشد. برای الکتروپوریشن تعداد ۵ تا ۶ میلیون سلول K562 استفاده شد. شمارش سلول‌ها به کمک لام نئوبار(هموسایتومتر) انجام و برای بررسی درصد سلول‌های زنده از رنگ تریپان‌بلو استفاده گردید. الکتروپوریشن با دستگاه بیوراد با ولتاژها و ظرفیت‌های خازنی متفاوت انجام شد تا شرایط بهینه الکتروپوریشن مشخص شود. به منظور بهینه کردن شرایط الکتروپوریشن، از وکتور تجاری pEGFP-C1 ساخت شرکت کلون‌تک استفاده شد. سپس سلول‌ها با وکتور ساخته شده در این مطالعه تحت شرایط بهینه شده الکتروپوریشن ترانسفکت شدند و سلول‌های مقاوم به پرومایسین به مدت دو هفته در حضور آنتی‌بیوتیک انتخاب شدند. با توجه به تصادفی بودن ورود وکتور به داخل ژنوم سلول، به منظور دستیابی به یک جمعیت سلولی هموژن(همگن)، انتخاب کلونی (clonal selection) انجام شد.

استخراج RNA :

RNA کل سلول‌های K562 با استفاده از کیت ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما، طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای تعیین غلظت و خلوص RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها به وسیله نانو دراپ در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. خلوص نمونه‌ها از طریق نسبت جذب اسپکتروفتومتری ۲۸۰:۲۶۰ تعیین شد. هم‌چنین تمامیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی S ۲۸ و ۱۸S بررسی شد.

Real-time PCR :

رشته اول cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و آغازگرهای پایین دست ژن‌های *Cas9* و *B2M* مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد. در ادامه، برای بررسی کمی بیان ژن *Cas9* در سلول‌هایی که به روش انتخاب کلونی جدا شده بودند، Real-time PCR با کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و در دستگاه Mic qPCR ساخت شرکت بیو مولکولار سیستم انجام شد. برنامه زمانی دمایی دستگاه به صورت یک چرخه برای دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت. در ادامه، ۴۰ چرخه برای دناتوره شدن با دمای ۹۴

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

درجه سانتی‌گراد(۲۵ ثانیه) و اتصال آغازگرها و پلی‌مریزه شدن رشته DNA در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) تنظیم شد. واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از Real-time PCR 2X Master mix، ۲ پیکو مول از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر از cDNA الگو و آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰میکرولیتر آماده شد. ژن بتا ۲-میکروگلوبولین (B2M) به عنوان ژن خانه‌دار مورد استفاده قرار گرفت. میزان بیان نسبی کلون‌ها نسبت به هم با محاسبه چرخه‌های آستانه(Ct) مطابق فرمول $\Delta Ct=Ct_{casq}-Ct_{\beta 2m}$ تعیین شد.

نحوه جمع‌آوری اطلاعات و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR با نرم افزار GraphPad و با استفاده از آزمون t-test بررسی شدند. سطح معنادار بودن نتایج به صورت $p\leq$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

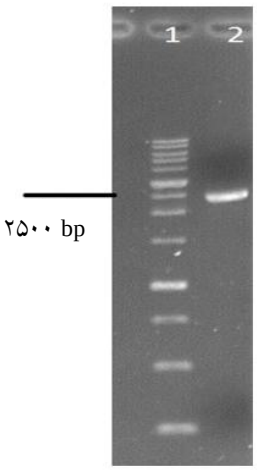
بخش مولکولی:

تکثیر قطعه PGK-Puro-CMV از وکتور pAAVS1-puro-DNR:

قطعه PGK–Puro-CMV (PPC) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از وکتور pAAVS1-puro-DNR به وسیله PCR تکثیر شد. محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و قطعه تکثیر شده به طول ۲۵۱۴ جفت باز روی ژل آگارز مشاهده شد(شکل ۱).

همسانه‌سازی قطعه PPC در ناقل‌های کلونینگ و بیانی:

طی دو مرحله همسانه‌سازی، ابتدا محصول PCR قطعه PPC در وکتور کلونینگ و سپس در وکتور بیانی پستاندار وارد شد. همسانه‌سازی در وکتور کلونینگ pTG19-T بدون هضم آنزیمی و استفاده از وجود آدنین اضافه در انتهای محصول PCR ، به واسطه تکثیر با آنزیم Taq پلی‌مراز انجام شد. نتیجه همسانه‌سازی در وکتور کلونینگ، ابتدا با PCR از روی پلاسمید استخراج شده با آغازگرهای اختصاصی قطعه PPC تایید شد. نتیجه PCR از روی پلاسمید نوترکیب مشاهده باندی ۲۵۱۴ جفت باز معادل همان قطعه PPC روی ژل آگارز بود. در صورتی که در PCR از روی وکتور pTG19 به عنوان کنترل منفی، باندی مشاهده نشد(شکل ۲). در ادامه وکتور نوترکیب با آنزیم‌های تعبیه شده در طرفین قطعه KpnI و EcoRI برش خورده و خروج قطعه PPC به طول ۲۵۱۴ جفت باز از بدنه ناقل، به طول ۲۸۸۰ جفت باز، بر روی ژل آگارز مشاهده شد(شکل ۳). در سطح مولکولی، عدم وجود جهش احتمالی در حین تکثیر قطعه PPC با روش توالی‌یابی سنگر و مقایسه آن با توالی وکتور pAAVS1-puro-DNR بررسی شد. توالی‌یابی با آغازگرهای عمومی M13 و T7 نشان داد که جهشی در قطعه تکثیر شده PPC رخ نداده است.

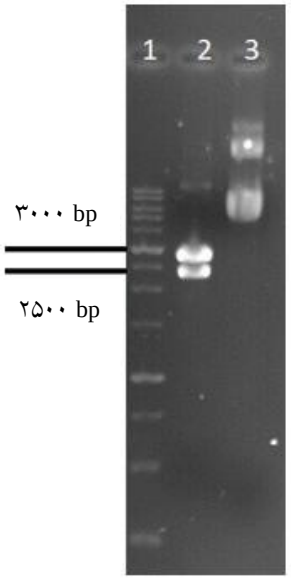


شکل ۱: نتیجه تکثیر قطعه PPC به طول ۲۵۱۴ جفت باز به روش PCR. چاهک۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی Thermo Scientific. چاهک۲: قطعه تکثیر شده PPC

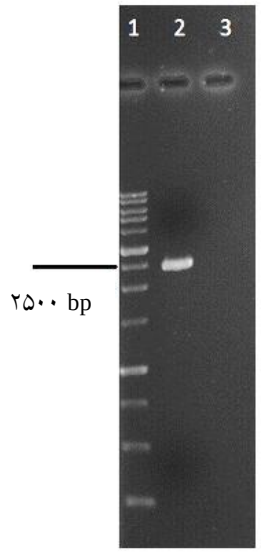
زیر همسانه‌سازی قطعه PPC در ناقل pCas-Guide-AAVS1:

در ادامه، زیر همسانه‌سازی قطعه PPC از وکتور کلونینگ به درون وکتور بیانی پستاندار انجام شد. وکتور pCas-Guide-AAVS1 با آنزیم‌های EcoRI و KpnI برش خورد. در نتیجه این برش آنزیمی قطعه‌ای به طول ۱۱۴۶ جفت باز از وکتور خارج شد. باند سنگین‌تر به طول

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



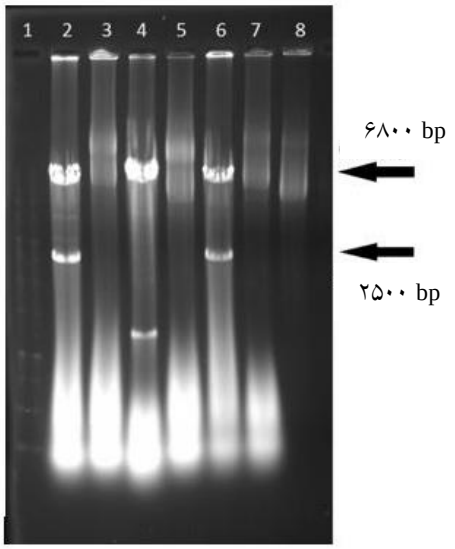
شکل ۲: تایید همسانه‌سازی قطعهPPC در ناقل pTG19-T با روش هضم آنزیمی. چاهک۱: نشانگر وزن مولکولی ۱کیلو جفت بازی. چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب (pTG19-PPC) پس از برش با آنزیم‌هایKpnI و EcoRI .چاهک ۳: پلاسمید برش نخورده وکتور pTG19-PPC



شکل ۳: تایید همسانه‌سازی قطعه PPC در ناقل pTG19-T با روش PCR . چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی. چاهک ۲: محصول PCR از روی پلاسمید سنگین تر (نوترکیب). چاهک ۳: محصول PCR از روی پلاسمید سبک تر(پلاسمید غیرنوترکیب pTG19).

تقریبی ۶/۸ کیلو جفت باز از روی ژل استخراج شد. وکتور کلونینگ حامل PPC نیز با این دو آنزیم برش داده شد. واکنش اتصال بین قطعات برش خورده PPC و ناقل گذاشته شده و بعد از ترانسفورماسیون، کلونی‌های نوترکیب انتخاب شدند. موفقیت‌آمیز بودن کلونینگ ابتدا به روی کلونی PCR بررسی و مورد تایید قرار گرفت. تکثیر قطعه ۲۵۱۴ جفت بازی در برخی از کلونی‌ها مشاهده شد(نتایج نشان داده نشده است).

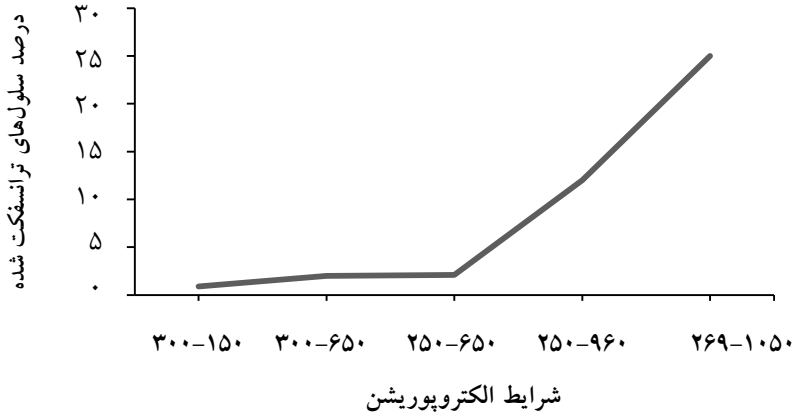
کلون‌های دارای نتیجه مثبت و برخی از کلون‌های منفی برای استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی کشت شدند. هضم آنزیمی با KpnI و EcoRI منجر به خروج قطعه PPC در کلون‌هایی شد که نتیجه کلونی PCR آن‌ها مثبت بود(شکل ۴). پلاسمید نوترکیب حاصل به اختصار pPPC-Cas نام‌گذاری گردید.



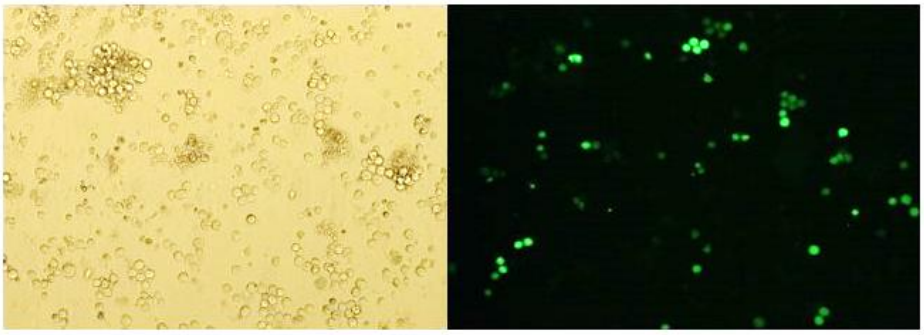
شکل۴: برش آنزیمی پلاسمیدهای مشکوک به نوترکیبی. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی. چاهک ۲: برش پلاسمید استخراجی ازکلونی ۱. چاهک ۳: پلاسمید استخراجی از کلونی ۱برش نخورده (uncut). چاهک ۴: برش پلاسمید از کلونی ۲. چاهک ۵: پلاسمید برش نخورده از کلونی۲. چاهک ۶ : برش پلاسمید از کلونی ۳. چاهک ۷ : پلاسمید برش نخورده از کلونی ۳. چاهک ۸: وکتور pCas-Guide-AAVS1

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

الف



ب



شکل ۵ : الف) درصد ترانسفکت شدن سلول‌های K562 با شرایط مختلف الکتروپوریشن(Voltage-µF). اعداد نشان‌دهنده ولتاژ و ظرفیت خازنی مورد استفاده در روش الکتروپوریشن می‌باشند. بهترین شرایط ولتاژ ۲۶۹ ولت و ظرفیت خازنی ۱۰۵۰ میکروفاراد است. ب) بررسی میزان ترانسفکشن سلول‌های K562 به وسیله وکتور pEGFP-C1 زیر میکروسکوپ فلئورسنت. الف) تصویر سلول‌های K562 ترانسفکت شده در نور فلورسانس ب) تصویر سلول‌های ترانسفکت شده K562 در نور معمولی.(تصاویر فلورسانس در طول موج ۴۹۰ نانومتر و دو روز بعد از الکتروپوریشن تهیه شده است. بازدهی الکتروپوریشن در ولتاژ ۲۶۹ ولت و ظرفیت خازنی ۱۰۵۰ میکروفاراد ۲۵٪ می‌باشد).

بخش سلولی:

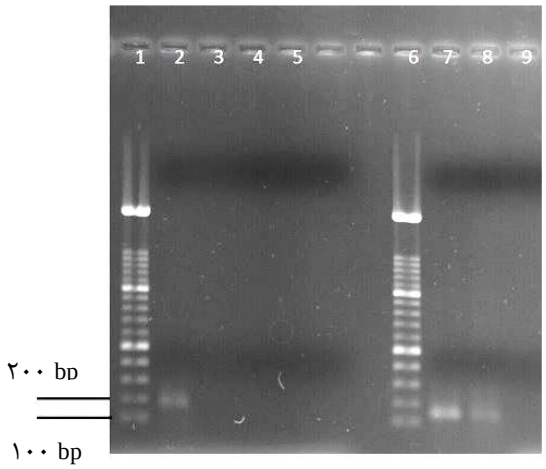
ترانسفکشن سلول‌های K562 به روش الکتروپوریشن:

به منظور بهینه‌سازی پارامترهای الکتروپوریشن سلول‌های K562 ، پلاسمید pEGFP-C1 تحت شرایط مختلف به درون سلول‌ها الکتروپوریت شد(شکل ۵ الف). دو روز بعد از ترانسفکشن، سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلئورسنت مشاهده و میزان ترانسفکت شدن آن‌ها بررسی شد. بهترین کارآیی الکتروپوریشن در ولتاژ ۲۶۹ ولت و ظرفیت خازنی ۱۰۵۰ میکروفاراد به دست آمد که در این حالت درصد سلول‌های ترانسفکت شده حدود ۲۵٪ بود (شکل ۵ ب).

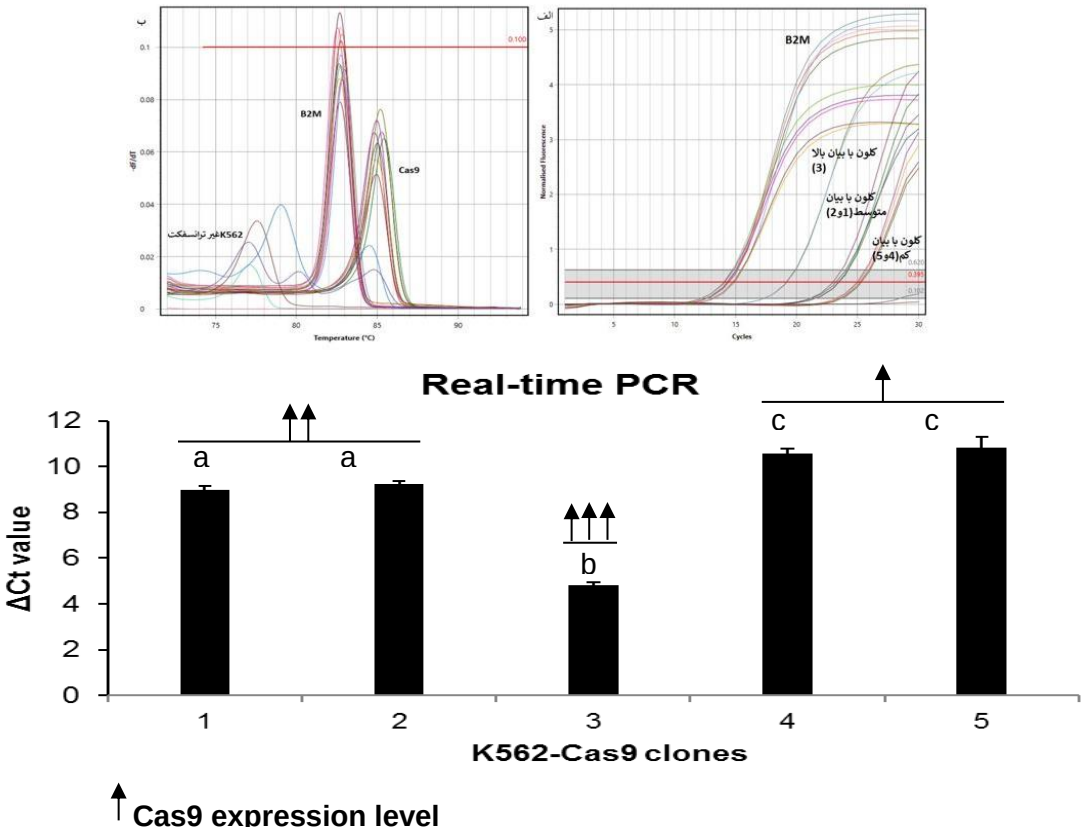
تعیین حداقل دوز کشندگی پرومایسین:

با توجه به این که نشانگر انتخابی روی وکتور ساخته شده، مقاوم به پرومایسین بود، ابتدا کمترین غلظت از آنتی‌بیوتیک که سلول‌های K562 غیرترانسفکت را ظرف دو هفته از بین می‌برد، تعیین شد. بر این اساس پرومایسین در غلظت‌های ۰ تا ۶ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت هر یک روز در میان به محیط کشت سلول اضافه شد و در هر بار تعویض محیط کشت، زنده‌مانی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بررسی گردید. پس از مدت دو هفته، غلظت µg/mL ۱ به عنوان حداقل غلظت کشندگی پرومایسین طی دو هفته تعیین شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



شکل ۶: نتیجه RT-PCR ژن *Cas9*.چاهک۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک۲: تکثیر رونوشت *Cas9* از نمونه سلول K562 ترانسفکت شده، چاهک۳: نمونه سلول K562 ترانسفکت نشده، چاهک۴: محصول PCR بدون اضافه کردن cDNA (کنترل منفی)، چاهک ۵ : نمونه RTminus (بررسی عدم وجود آلودگی DNA) از سلول ترانسفکت شده. چاهک ۶: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۷ : تکثیر قطعه B2m از نمونه سلول K562 ترانسفکت شده. چاهک ۸: تکثیر قطعه B2m از نمونه سلول K562 ترانسفکت نشده، چاهک ۹: محصول PCR بدون cDNA الگو (کنترل منفی)



شکل ۷ : نمایش منحنی‌های تکثیر و ذوب در واکنش Real-time PCR. (الف) منحنی‌های تکثیر رونوشت ژن‌های *B2M* وکلون‌های بیان‌کننده *Cas9* ، (ب) منحنی‌های ذوب رونوشت ژن‌های *B2M* و*Cas9*. (ج) مقایسه بیان ژن *Cas9* در ۵ کلون مختلف جدا شده سلول K562-Cas9 . کلون‌های آنالیز شده از لحاظ میزان بیان *Cas9* به سه گروه با بیان کم(۴ و ۵)، متوسط(۱ و ۲) و بالا(۳) تقسیم شدند. a ، b و c معنادار بودن آماری داده‌ها را نشان می‌دهند($p < ۰/۰۰۰۱$).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

بررسی بیان ژن Cas9 با RT-PCR:

در ادامه، RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Cas9* روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 ترانسفکت شده و غیرترانسفکت انجام شد. برای اطمینان از صحت کار در هنگام ساخت cDNA و نیز PCR، آزمایش RT-PCR بر روی ژن خانه‌دار *B2M* نیز هم‌زمان انجام شد، قطعه مربوط به ژن *B2M* از سلول‌های ترانسفکت شده و غیرترانسفکت تکثیر شد. اما تکثیر قطعه متعلق به ژن *Cas9* تنها از سلول‌های ترانسفکت اتفاق افتاد که حکایت از بیان این ژن در این سلول‌ها دارد (شکل ۶).

مقایسه میزان بیان Cas9 بین کلون‌های مختلف سلول K562-Cas9:

کیفیت تکثیر ژن‌های *B2M* و *Cas9* با بررسی منحنی‌های تکثیر و ذوب ژن‌های مورد نظر بررسی شد (شکل ۷). اختلاف چرخه آستانه(Ct) بین ژن هدف (*Cas9*) و رفرانس (*B2M*) به صورت ΔCt=CtTarget - CtReference محاسبه شد. از آن جایی که میزان ΔCt با میزان بیان ژن هدف نسبت عکس دارد، مقادیر پایین‌تر ΔCt نشان از بیان بالاتر ژن هدف داشت(۱۰). در این میان، ۵ کلون آنالیز شده از سلول‌های K562-Cas9 از لحاظ میزان بیان *Cas9* به سه گروه با بیان کم(کلون‌های ۴ و ۵)، متوسط(کلون‌های ۱ و ۲) و بالا(کلون ۳) تقسیم شدند. در این میان به نظر می‌رسد، با توجه به این که میزان بیان *Cas9* در کلونی‌های ۴ و ۵ و نیز ۱ و ۲ دو به دو با هم تقریباً برابر است، این احتمال وجود دارد که کلون‌ها از سلول اولیه یکسانی مشتق شده باشند.

بحث

امروزه با پیشرفت و گسترش ابزارهای مهندسی ژنتیک، یافتن راه‌های درمانی برای بیماری‌های انسان با زمینه جهش‌های ژنتیکی قابل دستیابی شده است. سیستم CRISPR/Cas9 از معروف‌ترین ابزارهای اصلاح ژنی برای جهش‌های مورد هدف می‌باشد. ساده، دقیق و ارزان‌تر بودن این روش اصلاح ژنی آن را بر سایر ابزارهای ویرایش ژنی از جمله ZFN و TALEN برتری داده است. البته شایان ذکر است که این روش نیز دارای جنبه‌ها و آثار نامطلوب و چالش‌هایی در انتقال وکتورها به داخل سلول است که باید مورد توجه قرار بگیرد(۱۱). از جمله این چالش‌ها می‌توان به اندازه وکتورهای مهندسی شده، تعداد وکتورها، روش انتقال آن‌ها و نوع سلول میزبان (چسبنده یا معلق بودن آن‌ها) اشاره نمود(۱۲). در این مطالعه برای رفع این مشکل تصمیم گرفتیم تا ژن *Cas9* را در سلول‌های هدف که در اینجا سلول‌های رده خونی K562 بودند، وارد کنیم تا در مطالعه‌های بعدی دیگر نیازی به وجود این ژن بر روی سازه ژنی نباشد. در پلاسمیدهای حامل اجزای CRISPR، بخش عمده‌ای از اندازه پلاسمید توسط کاست ژنی رمزکننده Cas9 (حدود ۵ کیلو جفت باز) اشغال می‌شود. مزیت دیگری که تولید این چنین رده سلولی دارد این است که مشکل انتقال چندین وکتور به طور هم‌زمان را حل می‌کند زیرا این چالش کارآیی این سیستم را کاهش می‌دهد(۱۳، ۱۲). در صورتی که سلولی ژن *Cas9* را در خود بیان کند، مانند آن چه که در این مطالعه صورت گرفته، دیگر نیازی به وجود آن بر روی پلاسمید نیست و تنها وجود کاست رمزکننده sgRNA به همراه توالی‌های پروکاریوتی روی وکتور کفایت می‌کند.

لازمه ساخت رده سلولی K562 بیان‌کننده Cas9، ساخت وکتوری بود که از طرفی حامل کاست بیانی Cas9 بوده و از سوی دیگر دارای یک نشانگر انتخابی که در اینجا ژن مقاومت به پرومایسین بود، باشد. با توجه به این که چنین پلاسمیدی در داخل در دسترس نبود، ابتدا ساخت آن در دستور کار قرار گرفت. بدین منظور، از وکتور pCas-Guide-AAVS1 که حامل کاست بیانی Cas9 بود به عنوان وکتور مبنا استفاده شد. با بررسی این وکتور مشخص گردید که هضم آنزیمی آن با دو آندونوکلئاز KpnI و EcoRI امکان وارد کردن کاست بیانی مقاومت به پرومایسین را فراهم می‌کند. کاست ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیز با PCR از وکتور pAAVS1-puro-DNR با تعبیه دو جایگاه برشی مدنظر در طرفین آن تکثیر شد. همسانه‌سازی قطعه PCR در وکتور مبنا منجر به ساخت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

پلاسمیدی به نام pPPC-Cas به طول ۹ کیلو جفت باز شد.

از دیگر چالش‌های این مطالعه می‌توان به سخت بودن ترانسفکت کردن سلول‌های K562 اشاره نمود. مطالعه‌های گذشته حاکی از آن است که به طور کلی ترانسفکت کردن سلول‌های معلق کار دشوارتری نسبت به ترانسفکت سلول‌های چسبنده می‌باشد(۱۴). در این مطالعه از روش الکتروپوریشن برای ترانسفکت کردن سلول‌های K562 استفاده گردید. میزان مرگ و میر در این روش بالا است(۱۳). اما از طرفی با استفاده از این روش می‌توان در مدت زمان کوتاهی تعداد زیادی از سلول‌ها را با سمیت کم به سادگی ترانسفکت کرد(۱۵، ۱۴). برای بهینه کردن شرایط الکتروپوریشن سلول‌های K562 از وکتور pEGFP-C1 که حامل *EGFP* است، استفاده شد. وجود ژن *EGFP* باعث شد تا درصد سلول‌های ترانسفکت شده به وسیله میکروسکپ فلئورسنت قابل پیگیری و تعیین باشد. الکتروپوریشن به صورت تصاعدی در ولتاژها و ظرفیت‌های خازنی متفاوت بررسی شد که در نهایت بهترین شرایط الکتروپوریشن به صورت ۲۶۹ ولت و µF ۱۰۵۰(میکروفاراد) انتخاب گردید که در آن حدود ۲۵٪ از سلول‌ها ترانسفکت می‌شدند. در مرحله بعد، برای ساخت سلول‌های K562 بیان‌کننده *Cas9* وکتور ساخته شده در این پژوهش به درون سلول‌ها با شرایط بهینه شده الکتروپوریشن منتقل شد. با توجه به وجود ژن مقاومت به پرومایسین در وکتور ساخته شده، سلول‌های دریافت‌کننده پلاسمید با این آنتی‌بیوتیک در غلظت µg/mL ۱ جدا شدند. زیرا قبلاً حداقل دوز کشندگی پرومایسین که سلول‌های K562 غیرترانسفکت را طی دو هفته از بین می‌برد به میزان g/mL ۱ تعیین شده بود. انتخاب سلول‌ها با پرومایسین دو هفته به طول انجامید و این مدت زمان برای این در نظر گرفته شد تا تنها سلول‌هایی جدا شوند که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک وارد ژنوم آن‌ها شده است و پلاسمید را به صورت اپی‌زومال در خود حمل نمی‌کنند. به علت عدم وجود منشا همانندسازی پستاندار در وکتور ساخته شده pPPC-Cas، در صورتی که پلاسمید به داخل ژنوم سلول میزبان وارد نشود، طی دو هفته تقسیم و تکثیر سلولی، پلاسمیدهای اپی زومی از بین رفته و تنها سلول‌هایی که به صورت پایدار ترانسفکت شده‌اند، قادر به رشد در محیط انتخابی(حاوی پرومایسین) خواهند بود.

ورود وکتور pPPC-Cas به داخل ژنوم رده سلولی K562 بعد از الکتروپوریشن به صورت تصادفی می‌باشد. این نوع ورود به ژنوم می‌تواند مشکلاتی را در پی داشته باشد. اول این که ورود تصادفی ممکن است منجر به تخریب کاست بیانی *Cas9* گردد. چرا که در این حالت وکتور می‌تواند از هر بخش خود به صورت شانسی نوترکیبی داده و وارد ژنوم شود. بنابراین با توجه به این که بخش عمده‌ای از وکتور ساخته شده در برگیرنده کاست بیانی *Cas9* است، این امر محتمل می‌باشد که وارد شدن به داخل ژنوم به کاست ژن *Cas9* آسیب وارد کند. مسئله دوم این که ورود تصادفی پلاسمید به داخل ژنوم می‌تواند باعث شود تا میزان بیان ژن *Cas9* در سلول‌های مختلف متفاوت باشد. حتی ممکن است در برخی از سلول‌ها، بیان ژن *Cas9* خاموش شود. دلیل این موضوع آن است که محل ورود ژن به داخل ژنوم می‌تواند روی بیان آن تاثیرگذار باشد که به آن اثر جایگاه کروموزومی (Chromosomal position effect) می‌گویند. تمامی نقاط ژنوم به لحاظ فعالیت رونوشت برداری یکسان نیستند. برای مثال ژن ممکن است وارد یک نقطه‌ای از DNA ژنومی شود که در آن رونویسی از ژن‌ها بسیار فعال است. این موضوع می‌تواند باعث کاهش بیان و حتی خاموش شدن بیان ژن انتقال یافته شود و مشکل آخر این که در ورود تصادفی، تعداد نسخه‌های ژن وارد شده به داخل ژنوم قابل کنترل نیست و تعداد نسخه‌های ژن بین سلول‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تعدد ورود ترانس ژن به داخل ژنوم اثر قابل پیش‌بینی ندارد. در مواردی مشاهده شده است تعدد نسخه‌ها می‌تواند اثر افزایشی روی بیان ژن هدف بگذارد، اما گاهی نیز اثر منفی روی بیان ژن و حتی رشد سلول گزارش شده است(۱۶). همه این مشکلات می‌تواند منجر به بیان هتروژن ژن هدف در میان سلول‌های ترانسفکت شود. بنابراین برای رفع این مشکلات انتخاب کلونی انجام شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

۵ کلونی از سلول‌های K562 مقاوم به پرومایسین انتخاب شده و پس از رشد و تکثیر، RNA آن‌ها به طور جداگانه استخراج و بیان ژن *Cas9* در آن‌ها با Real-time PCR بررسی شد. برای اطمینان از سالم بودن کاست بیانی *Cas9* و این که رونوشت‌های کامل و سالم از ژن *Cas9* وجود دارد، آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که انتهای ۳′ رونوشت *Cas9* را شناسایی و تکثیر می‌کردند. نتیجه آنالیز بیان *Cas9* در ۵ کلونی جدا شده نشان داد که بیان *Cas9* در بین آن‌ها متفاوت است. از میان ۵ کلونی آنالیز شده به نظر می‌رسید منشا برخی از کلون‌ها یکسان می‌باشد و در واقع از سلول ترانسفکت شده مشترک مشتق شده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتیجه تحقیق حاضر تولید سلول K562-Cas9 است که ژن *Cas9* را به صورت دائم بیان می‌کند. سلول‌های K562 سلول‌های اریترولوکمیای انسانی هستند که در تحقیقات بیماری‌های خونی از جمله هموگلوبینوپاتی‌ها مانند β-تالاسمی بسیار استفاده می‌شوند. لذا دست آورد این پژوهش می‌تواند ابزاری برای کمک به این دسته از پژوهش‌ها در کشور باشد. از سویی دیگر تجربه حاصل از این کار می‌تواند در توسعه سایر رده‌های سلولی بیان‌کننده *Cas9* نیز مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. مراتب قدردانی خود را از تمام کسانی که در این کار پژوهشی همکاری نموده‌اند به ویژه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری اعلام می‌دارم.

References:

1- Lu C, Yang Y, Zhao R, Hua B, Xu C, Yan Z, *et al*. Role of circadian gene Clock during differentiation of mouse pluripotent stem cells. Protein Cell 2016; 7(11): 820-32.
2- Wang F, Qi LS. Applications of CRISPR genome engineering in cell biology. Trends Cell Biol 2016; 26(11): 875-88.
3- Port F, Bullock SL. Creating heritable mutations in Drosophila with CRISPR-Cas9. Methods Mol Biol 2016; 1478: 145-60.
4- Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in Trypanosoma cruzi. MBio 2015; 6(1): e02097-14.
5- Im W, Moon J, Kim M. Applications of CRISPR/Cas9 for gene editing in hereditary movement disorders. J Mov Disord 2016; 9(3): 136-43.
6- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. Nat Methods 2011; 8(9): 765-70.
7- Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, Sankaran VG. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with β-thalassemia. Blood 2013; 121(12): 2199-21.
8- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012: 337(6096): 816-21.
9- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol 2014; 32(4): 347-55.
10- Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. Real-time PCR and statistical analyses of acrAB and ramA expression in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3430-2.
11- Ou Z, Niu X, He W, Chen Y, Song B, Xian Y, *et al*. The combination of CRISPR/Cas ۹and iPSC technologies in the gene therapy of human β-thalassemia in mice. Sci Rep 2016; 6: 32463.
12- Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas ۹vector system. Sci Rep 2014; 4: 5400.
13- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. Anal Bioanal Chem 2010; 397(8): 3173-8.
14- Schakowski F, Buttgereit P, Mazur M, Märten A, Schöttker B, Gorschlüter M, *et al*. Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. Genet Vaccines Ther 2004; 2(1): 1.
15- Kotnik T, Frey W, Sack M, Meglič SH, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. Trends Biotechnol 2015; 33(8): 480-8.
16- Varshney GK, Pei W, LaFave MC, Idol J, Xu L, Gallardo V, *et al*. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. Genome Res 2015; 25(7): 1030-42.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 16(4): 32-43

Original Article

Generation of K562 cell line expressing Cas9 endonuclease (CRISPR-associated9)

Ansari F.[1], Nikougoftar Zarif M.[1], Hamidieh A.A.[2], Shamsara M.[3]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Pediatric Stem Cell Transplantation Department, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
[3]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The genome of cell lines is nowadays edited to create disease models and treat them. Of course, the size of the cas9 gene has caused problems like the low efficiency of the CRISPR system. To solve this problem, Cas9 expressing cell lines have been generated in which CRISPR RNA should only be transfected to the cell.

Materials and Methods

This article is experimental. PGK-PURO / CMV (PPC) fragment was amplified with PCR from pAAVS1-puro-DNR vector and cloned in pTG19-T vector. The PPC fragment from this vector was removed by KpnI and EcoRI enzymes. Also the pCas-Guide-AAVS1 vector was subjected to the same enzymatic cutting and its attachment to the PPC fragment resulted in the production of the pPPC-Cas vector. After optimizing the electroporation conditions, the pPPC-Cas vector was electroporated into K562 cells and puromycin -resistant cells were selected and Cas9 expression level was evaluated by Real-time PCR.

Results

A PCR fragment of 2514 bp was amplified. The vector pPPC-Cas was cloned in two steps. puromycin -resistant transfected cells were selected. Clonal selection was carried out and three colonies with high, medium and low expression level of Cas9 were isolated.

Conclusions

The Cas9-expressing K562 cells derived in this study can be applied both for functional genomic researches and design cellular models of human diseases in future.

Key words: Cell Line, Electroporation, Gene Editing

Received: 3 Sep 2018
Accepted: 15 Jan 2019

Correspondence: Shamsara M., PhD in Genetics. Assistant Professor of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.
P.O.Box: 14965-161, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 44787414; Fax: (+9821) 44787399
E-mail: *shamsa@nigeb.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]