

تولید رده سلولی K562 بیان کننده اندونوکلاز (CRISPR-associated) Cas9

فائزه انصاری^۱، مهین نیکوگفتار ظریف^۲، امیر علی حمیدیه^۳، مهدی شمس آرا^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 کارایی 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.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سلول‌های K562 بیان‌کننده Cas9 به دست آمدند که از آن‌ها می‌توان در مطالعه‌های آتی ژنومیک 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 - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- دکترای خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- فوق تخصص هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی - مرکز طبی کودکان - دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۴- مؤلف مسئول: دکترای ژنتیک - استادیار پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - همت غرب - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱

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 آندونوکلاز Cas9 و RNA راهنما (sgRNA) تشکیل شده است. به منظور ویرایش ژنی، ابزار CRISPR به اشکال مختلف در قالب پلاسمید، RNA و کمپلکس ریونوکلوپروتئین 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 بزرگ بودن ژن رمزکننده Cas9 (حدود ۴ کیلو جفت باز) کارایی 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 کارایی 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 آندونوکلاز 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 فالكون 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

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

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

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

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

عنوان DNA الگو برای تکثیر قطعه PGK-Puro-CMV (پروموتور ژن فسفوگلیسرات کیناز، ژن مقاومت به پرومایسین و پروموتور 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 در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، پلی‌مریزه شدن رشته DNA دو دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲

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 هموزن (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 ۲۶۰:۲۸۰ تعیین شد. هم‌چنین تمامیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی ۲۸ S 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 qPCR Mic ساخت شرکت بيو مولکولار سیستم انجام شد. برنامه زمانی دمایی دستگاه به صورت یک چرخه برای دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت. در ادامه، ۴۰ چرخه برای دناتوره شدن با ۹۴

استخراج شد و با آنزیم‌های KpnI و EcoRI برش داده شد. خروج قطعه PPC نشانه موفقیت در همسانه‌سازی ژن بود. هم‌چنین وکتور نو ترکیب با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 و T7 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 نو ترکیب 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 (جی‌یکو) 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٪ CO₂ 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

درجه سانتی‌گراد (۲۵ ثانیه) و اتصال آگارگرها 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 ۱۰ میکرولیتر 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 $\Delta Ct = Ct_{\text{casq}} - Ct_{\beta 2m}$ 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 $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بخش مولکولی:

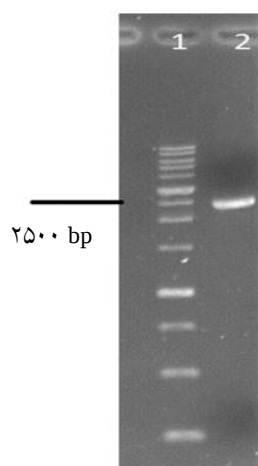
تکثیر قطعه PGK-Puro-CMV از وکتور pAAVS1-puro-DNR:

قطعه (PPC) PGK-Puro-CMV 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.



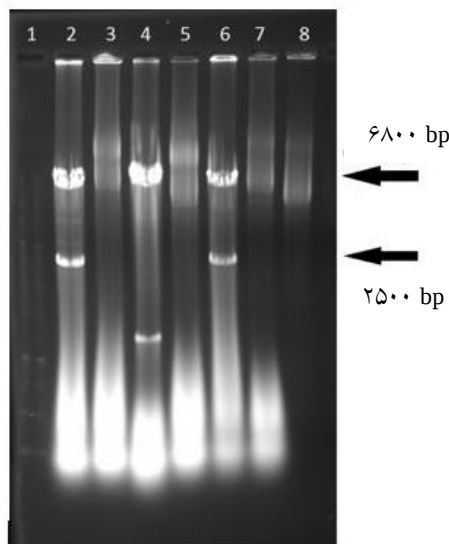
شکل ۱: نتیجه تکثیر قطعه PPC به طول ۲۵۱۴ جفت باز به روش PCR. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی Thermo Scientific. چاهک ۲: قطعه تکثیر شده PPC

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

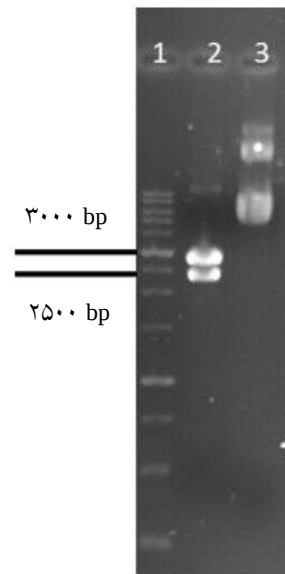
در ادامه، زیر همسانه‌سازی قطعه PPC از وکتور کلونینگ به درون وکتور بیانی پستاندار انجام شد. وکتور pCas-Guide-AAVS1 با آنزیم‌های EcoRI و KpnI برش خورد. در نتیجه این برش آنزیمی قطعه‌ای به طول ۱۱۴۶ جفت باز از وکتور خارج شد. باند سنگین‌تر به طول

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. موفقیت آمیز 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).

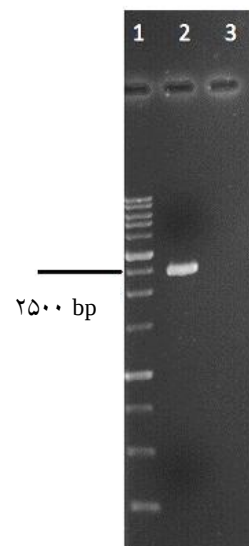
کلون‌های دارای نتیجه مثبت و برخی از کلون‌های منفی برای استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی کشت شدند. هضم آنزیمی با KpnI و EcoRI منجر به خروج قطعه PPC در کلون‌هایی شد که نتیجه کلونی PCR آن‌ها مثبت بود (شکل ۴). پلاسمید نوترکیب حاصل به اختصار pPPC-Cas نام گذاری گردید.



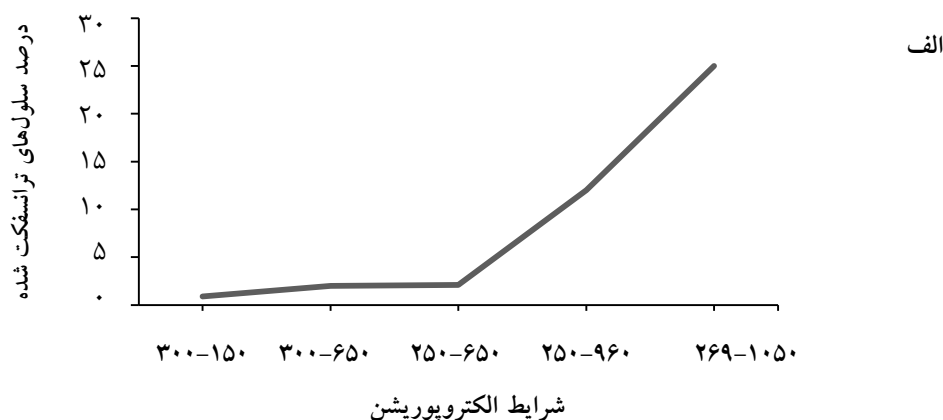
شکل ۴: برش آنزیمی پلاسمیدهای مشکوک به نوترکیبی. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی. چاهک ۲: برش پلاسمید استخراجی از کلونی ۱. چاهک ۳: پلاسمید استخراجی از کلونی ۱ برش نخورده (uncut). چاهک ۴: برش پلاسمید از کلونی ۲. چاهک ۵: پلاسمید برش نخورده از کلونی ۲. چاهک ۶: برش پلاسمید از کلونی ۳. چاهک ۷: پلاسمید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



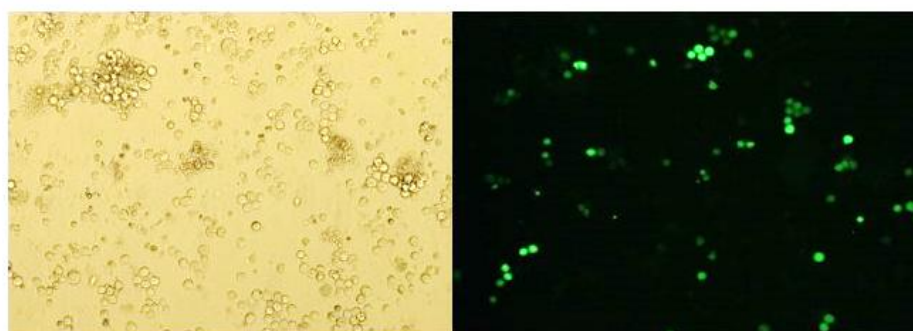
شکل ۲: تایید همسانه سازی قطعه PPC در ناقل pTG19-T با روش هضم آنزیمی. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی. چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب (pTG19-PPC) پس از برش با آنزیم‌های KpnI و EcoRI. چاهک ۳: پلاسمید برش نخورده وکتور pTG19-PPC



شکل ۳: تایید همسانه سازی 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).



ب



شکل ۵: الف) درصد ترانسفکت شدن سلول‌های K562 با شرایط مختلف الکتروپوریشن (Voltage- μ F). 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).

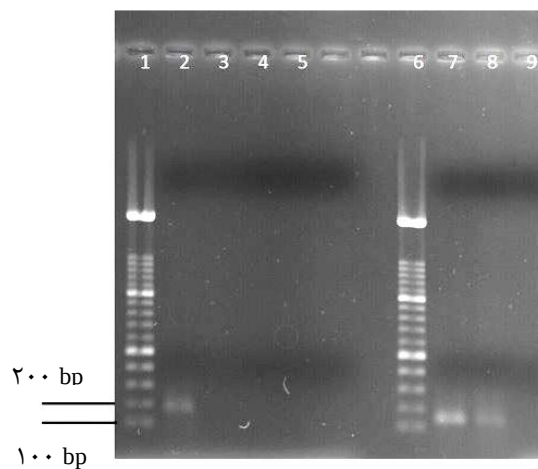
بخش سلولی:

ترانسفکشن سلول‌های K562 به روش الکتروپوریشن:

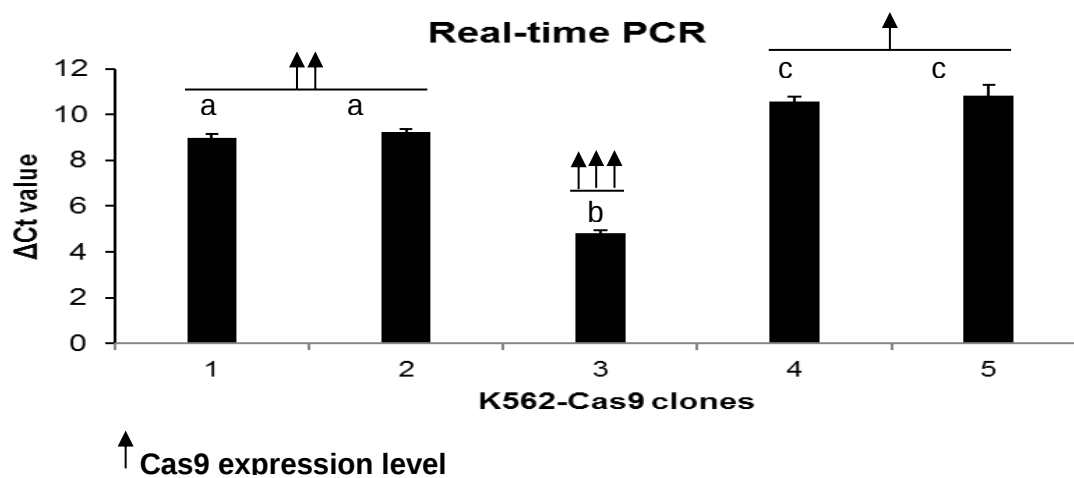
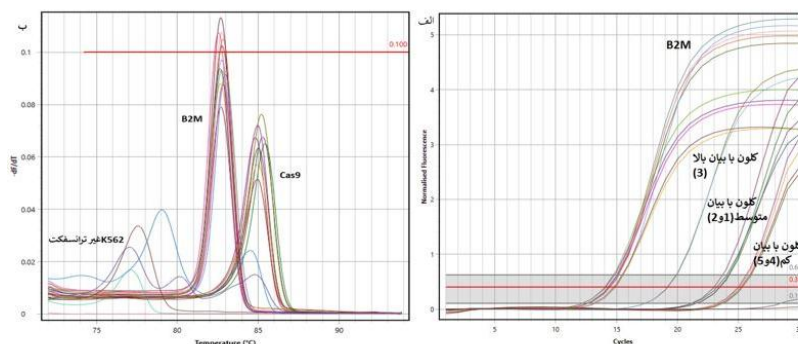
به منظور بهینه‌سازی پارامترهای الکتروپوریشن سلول‌های K562، پلاسمید pEGFP-C1 تحت شرایط مختلف به درون سلول‌ها الکتروپوریت شد (شکل ۵ الف). دو روز بعد از ترانسفکشن، سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلئورسنت مشاهده و میزان ترانسفکت شدن آن‌ها بررسی شد. بهترین کارایی الکتروپوریشن در ولتاژ ۲۶۹ ولت و ظرفیت خازنی ۱۰۵۰ میکروفاراد 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 ۱ μ g/mL به عنوان حداقل غلظت کشندگی پرومایسین طی دو هفته تعیین شد.



شکل ۶: نتیجه RT-PCR ژن *Cas9*. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲: تکثیر رونوشت *Cas9* از نمونه سلول K562 ترانسفکت شده، چاهک ۳: نمونه سلول K562 ترانسفکت نشده، چاهک ۴: 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* و کلون‌های 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 ($p < 0.0001$).

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 $\Delta Ct = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{Reference}}$ 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 پرومیسین 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 پرومیسین را فراهم می‌کند. کاست ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیز با PCR از وکتور pAAVS1-puro-DNR تعیبه دو جایگاه برشی مدنظر در طرفین آن تکثیر شد. همسازسازی قطعه PCR در وکتور مبنا منجر به ساخت

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 پرومیسین) 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.

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 (۱۴، ۱۵). 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 پرومیسین در وکتور ساخته شده، سلول‌های دریافت‌کننده پلاسمید با این آنتی‌بیوتیک در غلظت $1 \mu g/mL$ جدا شدند. زیرا قبلاً حداقل دوز کشندگی پرومیسین که سلول‌های K562 غیرترانسفکت را طی دو هفته از بین می‌برد به میزان $1 g/mL$ تعیین شده بود. انتخاب سلول‌ها با پرومیسین 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

ژن *Cas9* را به صورت دائم بیان می‌کند. سلول‌های K562 سلول‌های اریترولوکمیی 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.

۵ کلونی از سلول‌های K562 مقاوم به پرومیسین 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

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/Cas⁹ and 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/Cas⁹ vector 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, Buttgerit 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.

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

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

²Pediatric Stem Cell Transplantation Department, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

³National 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