ساب کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موش سوری در وکتور لنتی ویرال و انتقال آن به رده سلولی HEK

همایون نادریان [1*]، بهرام کاظمی [2]، آنتوان دو وریس [3]

خلاصه

سابقه و هدف: ژن‌درمانی یکی از مهم‌ترین شیوه‌های تحقیقات بالینی است که ارایه‌دهنده‌ی روش‌های جدیدی برای درمان نقص‌های ژنتیکی می‌باشد. نقص ژنتیکی آنزیم گلوکوسربروزیداز (Gba) عامل بیماری گوشه بیش از بقیه‌ی بیماری‌ها در ژن‌درمانی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این پروژه کلونینگ و انتقال ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز توسط لنتی ویرال وکتور ارتقایافته به رده‌ی سلول‌های HEK می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه به روش تجربی و به منظور تولید و تکثیر cDNA ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز به کمک پرایمرهای اختصاصی به روش PCR انجام گرفت و در وکتور غیر بیان‌کننده، کلون و ترادف‌یابی گردید. سپس ژن نوترکیب را در لنتی ویرال وکتور ارتقایافته دارای ژن گزارش‌گر GFP ساب کلون شد. پس از کشت سلول‌های HEK وکتور نوترکیب لنتی ویرال به آنها منتقل شد و انتقال ژن Gba با استفاده از ژن گزارش‌گر GFP بررسی گردید.

نتایج: تکثیر و کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز با استفاده از آنزیم‌های محدودگر تایید گردید. ترادف‌های ژن Gba با ترادف‌های گزارش شده‌ی آن کاملا تطبیق داشت. ساب کلونینگ ژن Gba در وکتور لنتی ویرال با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده‌ی مختلف تایید شد. انتقال ژن نوترکیب Gba توسط بیان ژن گزارش‌گر با استفاده از پروتئین‌های فلورسنتی تایید گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق بخشی از فرآیند پروتکل ژن‌درمانی با انتقال ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موش به سلول‌های HEK توسط وکتور لنتی ویرال انجام گرفت.

واژگان کلیدی: ژن‌درمانی، انتقال ژن، گلوکوسربروزیداز

۱- استادیار گروه علوم تشریح دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شبکه پزشکی مولکولی کشور، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۳- استاد بخش ژن‌درمانی دپارتمان بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه لیدن هلند

* نویسنده مسوول: همایون نادریان

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Naderian_H@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۶۶۱ ۳۶۱ ۰۹۱۳

دورنویس: ۵۵۵۱۱۱۲ ۰۳۶۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲

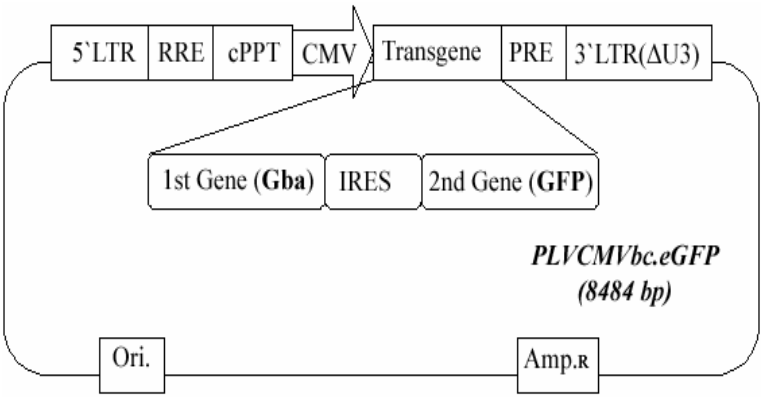
تاریخ پذیش نهایی: ۸۶/۲/۲۷

مقدمه

ژن‌درمانی، انتقال مواد ژنتیکی نوترکیب به سلول‌های هدف به منظور تغییر در بیان ژن و دست‌یابی به اثرات درمانی آنها می‌باشد. استراتژی اولیه‌ی ژن‌درمانی برای درمان بیماری‌های تک-ژنی نظیر بیماری گوشه بوده است [۱]. بیماری گوشه به دلیل جهش در ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز (Gba) ایجاد می‌شود [۲]. این آنزیم، مسوول هیدرولیز گلوکوسربروزید است که در صورت نقص ژنتیکی آنزیم گلوکوسربروزیداز، ماکروفاژهای بافت‌های کبد، طحال و مغز استخوان گلوکوسربروزید را فاگوسیته می‌کنند و سبب بزرگی کبد، بزرگی طحال و نشانه‌های نوروپاتیک می‌گردد [۳]. بیماری گوشه یکی از بهترین انتخاب‌ها برای ژن‌درمانی می‌باشد [٤]. پس از تکثیر و کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در وکتور بیان‌کننده با انتقال و سپس بیان آن در سلول‌های خونی می‌توان بیماری را درمان نمود. وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن وجود دارند، یکی از مناسب‌ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن‌های نوترکیب وکتور لنتی ویرال است. وکتورهای لنتی ویرال مشتق از HIV-1 قابلیت انتقال ژن‌های نوترکیب را به سلول‌های قابل تقسیم و غیرقابل تقسیم دارند. سلول‌های هدف وکتور لنتی ویرال انواع سلول‌های تمایزیافته تخصصی نظیر سلول‌های دستگاه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

اعصاب مرکزی، شبکیه، حلزون گوش میانی، سلول‌های عضلات اسکلتی و قلبی، سلول‌های غدد درون‌ریز، کبدی و سلول‌های خونی می‌باشند [۵]. با حذف ژن‌های اصلی، فرعی و تنظیمی و حذف بخشی از ترادف ناحیه نسخه‌برداری لنتی ویروس نسل سوم وکتور لنتی ویرال انتقالی تولید می‌شوند که ایمن و مناسب انتقال ژن‌های نوترکیب می‌باشند. حذف ژن‌ها از وکتور سبب کاهش کارایی و توانایی القای آن می‌شود [٦، ۷]. به همین منظور ترادف ژن‌هایی را در وکتور قرار می‌دهند تا قابلیت القای سلول‌های هدف را داشته باشد. ترادف cPPT[1] در وکتور لنتی ویرال سبب تسهیل عبور وکتور از سیتوپلاسم به هسته‌ی سلول‌های هدف در سلول‌های غیر قابل تقسیم می‌باشد [۸]. ترادف PRE[2] باعث انتقال RNA از هسته به سیتوپلاسم می‌گردد [۹]. ترادف RRE[3] نیز سبب تسهیل خروج mRNA و تنظیمات پس از نسخه‌برداری آن می‌شود [۱۰]. سه ژن فوق، قابلیت القای وکتور و بیان ژن نوترکیب را در سلول‌های هدف افزایش می‌دهند. پروموتورهای ویروسی به عنوان یکی از بهترین عناصر تنظیمی بیان ژن در انواع سلول‌های پستانداران می‌باشد. CMV[4] پروموتوری بسیار مناسب برای رده‌های سلولی نظیر رده سلولی HEK[5] و رده‌های سلولی HeLa است [۱۱]. ساب کلونینگ ژن‌های نوترکیب در ناحیه ترانس ژنیک لنتی ویروس به جای ژن‌های اصلی آن قرار می‌گیرد. در لنتی ویرال وکتور با استفاده از ترادف IRES می‌توان دو ژن را با یک پروموتور مناسب بیان نمود [۱۲]. به همین منظور ژن اول، ژن نوترکیب هدف و ژن دوم ژن گزارش‌گر eGFP[6] است که پس از ترادف IRES[7] کلون می‌شود (شکل شماره‌ی ۱). سلول‌های HEK (293T) یکی از رده‌های سلولی می‌باشند، این سلول‌ها مورفولوژی سلول‌های اپی‌تلیال را دارند و به عنوان یکی از بهترین رده‌های سلولی برای بیان ژن‌های نوترکیب و تولید انواع ویروس‌ها هستند [۱۳]. تقریبا تمام وکتورهای ویروسی قادر به اتصال، انتقال، و یکی نمودن ژنوم خود در این سلول‌ها می‌باشند، که پس از یکی شدن در ژنوم سلول هدف به عنوان بخشی از ژنوم آن درآمده و همانند بقیه‌ی ژن‌های سلول بیان می‌شوند و تولید پروتئین می‌کنند. هدف از این مطالعه انتقال ژن Gba در سلول‌های HEK می‌باشد تا در آینده با استفاده از ویروس‌های نوترکیب تولید شده از این رده‌ی سلولی، آنها را به انواع سلول‌های قابل تقسیم و غیرقابل تقسیم انتقال دهیم. این مطالعه در سه مرحله انجام می‌پذیرد. در مرحله‌ی اول تکثیر ژن Gba در وکتور غیر بیان‌کننده و ترادف‌یابی آن می‌باشد. در مرحله‌ی دوم ساب کلونینگ ژن ترادف‌یابی شده در وکتور انتقالی لنتی ویرال است. در صورت موفقیت در ساب کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در مرحله‌ی سوم انتقال آن به رده‌ی سلولی HEK می‌باشد.



شکل ۱- ساختار وکتور لنتی ویرال انتقالی با ۸٤۸٤ جفت باز، جایگاه ترادف‌های ارتقای وکتور جهت افزایش کارایی آن مشخص می‌باشد. در ناحیه‌ی کلونینگ، ژن اول محل کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز (Gba) و ژن دوم محل کلونینگ ژن گزارش‌گر (GFP) است. پروموتور CMV قبل از ژن اول (ژن نوترکیب هدف) قرار دارد، ترادف IRES بین دو ژن نوترکیب واقع شده است.

1- central polypurine tract
2- Posttranscriptional regulatory element
3- Reveres transcriptase response element
4- Cytomegalovirus
5- Human embryonic kidney

6- enhance green flurecent protein
7- Internal ribosomal entry sites

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

مواد و روش‌ها

تکثیر، کلونینگ و ترادف‌یابی: ترادف ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز از بانک ژن جستجو گردید [۱۴]. سه پرایمر نسخه‌برداری معکوس، رفت و برگشت طراحی و (توسط شرکت Invitrogen) تولید و تهیه گردید.

RT- primer: 5`-CCTTTAATGTCCATGCTAAGC-3`
F- primer: 5`-GGGTCTACGGGCACTGTCTA-3`
R- primer: 5`-CTGCTCAGGTGTCAGTTCCA-3`

پس از استخراج RNA از طحال موش[8] بر اساس پروتکل TRIzol (محصول شرکت Invitrogen)، cDNA ژن Gba را با استفاده از روش RT-PCR تولید و در دمای آنیلینگ ۵۵/۵°c با ۳۵ سیکل به روش PCR تکثیر شد. پس از الکتروفورز در کنار نشانگر، محصول PCR از روی ژل آگارز تخلیص گردید. وکتور غیر بیان‌کننده PUCBM21[9] دارای ۲۷۲۵ جفت باز در جایگاه کلونینگ با آنزیم HincII خطی شد و پس از دیفسفوریله کردن وکتور با آلکالین فسفاتاز (از شرکت Frementase)، ژن تکثیر شده mGba را با وکتور فوق با استفاده از آنزیم لیگاز در دمای ۲۲°c به مدت یک شب انکوبه گردید. پس از لیگاند وکتور و ژن تکثیر شده، وکتورهای نوترکیب در سلول پذیرای DH10B کلون گردید [۱۵]. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های محدودگر غربال شدند و توسط بخش ژن‌درمانی دانشگاه لیدن هلند ترادف‌یابی گردیدند. از پلاسمیدهای نوترکیب PUCBM21mGba ترادف‌یابی شده محلول ذخیره گلیسیرول تهیه و در ۸۰°c- نگهداری گردید.

ساب کلونینگ در لنتی ویرال وکتور: با استفاده از نرم‌افزار Gc2[10] جایگاه‌های آنزیم‌های محدودگر در وکتور شناسایی و ۱ میکروگرم وکتور PLVCMVbc.eGFP[11] دارای ۸۴۸۴ جفت باز (هدیه دکتر آنتوان دو وریس از دانشگاه لیدن هلند) در جایگاه کلونینگ ابتدا توسط آنزیم SmaI در دمای ۳۰°c و سپس آنزیم XbaI (همه‌ی آنزیم‌ها از شرکت Frementase) در دمای ۳۷°c هر کدام به مدت ۱۲۰ دقیقه هضم و انکوبه گردیدند. پس از الکتروفورز قطعه ۸۴۶۱ جفت باز آن از روی ژل آگارز تخلیص شد. ۵ میکروگرم از پلاسمیدهای نوترکیب PUCBM21mGba با استفاده از نرم‌افزار Gc2 پس از تعیین جایگاه‌های آنزیمی با آنزیم‌های HpaI و XbaI در دمای ۳۷°c به مدت ۱۲۰ دقیقه هضم و انکوبه گردید. جایگاه آنزیم XbaI در وکتور و قطعه mGba مشترک انتخاب گردید تا کدون آغازی ATG پس از پروموتور قرار گیرد. پس از الکتروفورز قطعه ۱۶۷۰ جفت باز از روی ژل تخلیص گردید. سپس لنتی ویرال وکتور و نیز قطعه تخلیص شده با حضور آنزیم لیگاز در دمای ۲۲°c به مدت یک شب آنکوبه گردید. لنتی ویرال وکتور نوترکیب را به سلول پذیرای DH10B انتقال داده شد و سپس پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم StuI غربال گردیدند. لنتی ویرال وکتورهای نوترکیب PLVCMVmGbaeGFP دارای ۱۰۱۳۱ جفت باز پس از انتقال به سلول‌های پذیرا به روش استخراج پلاسمید به مقدار زیاد تکثیر و با دو آنزیم BsmAI و AvaI که دارای جایگاه‌های آنزیمی متعددی در روی وکتور لنتی ویرال بودند هضم گردید. پس از تعیین مقدار DNA وکتور نوترکیب با اسپکتروفوتومتر، از وکتور محلول ذخیره گلیسیرول تهیه و در ۸۰°c- نگهداری گردید.

انتقال و بیان در HEK: رده‌ی سلولی HEK تهیه شده از بخش بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه لیدن با استفاده از PBS شستشو گردید. با اضافه نمودن ۰/۱ تریپسین (رقیق شده در PBS) به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°c انکوبه گردید تا سلول‌ها شناور شدند. با استفاده از ۸ میلی‌لیتر محیط کشت و FBS تریپسین غیر فعال گردید. پس از شمارش سلول‌ها مقدار ۱۱/۵×۱۰^۶ سلول در فلاسک T175 با ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMED (محصول شرکت Gibco) حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شد. هنگامی که بیش از ۶۰٪ سطح فلاسک از سلول پوشیده شد. ۳۵ میکروگرم از DNA وکتور، ۱۱۵۰ میکرولیتر بافر HeBs و هم حجم بافر (۵۷۵ میکرولیتر کلرورکلسیم ۰/۵ مولار و ۵۷۵ میکرولیتر آب دی یونیزه) اضافه شد به منظور جلوگیری از تشکیل کریستال به آرامی DNA، آب و کلرور کلسیم را با استفاده از میکروپیپت و همراه با تشکیل حباب به یکدیگر اضافه شد. سپس به محلول فوق محیط کشت DMED تا حجم ۲۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. فلاسک سلول حاوی محیط کشت و وکتور را در انکوباتور با ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷°c به مدت یک تا دو روز قرار داده شد. پس از آن در زیر میکروسکوپ فلورسنت سلول‌ها مشاهده گردیدند.

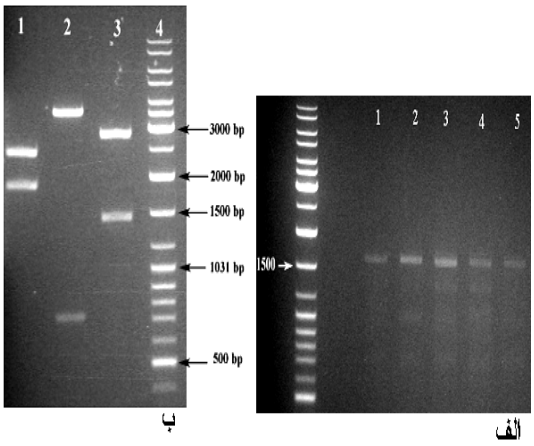
نتایج

کلونینگ و ترادف‌یابی: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی cDNA ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز (mGba) با ۱۶۱۶ جفت باز تولید، تکثیر و تخلیص گردید (شکل شماره‌ی ۲، الف). وکتور خطی شده دارای ۲۷۲۵ جفت باز نیز از ژل آگارز تخلیص شد. از اتصال وکتور با ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز ساختار پلاسمید نوترکیب PUCBM21mGba جدیدی با ۴۳۴۱

8- Mus musculus
9- Plasmid universal cloning
10- Gene Constriction Kit 2 (version 2.0.17)
11- Plasmid lentiviral cytomegalovirus bicisternic enhance green flurecent protein

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

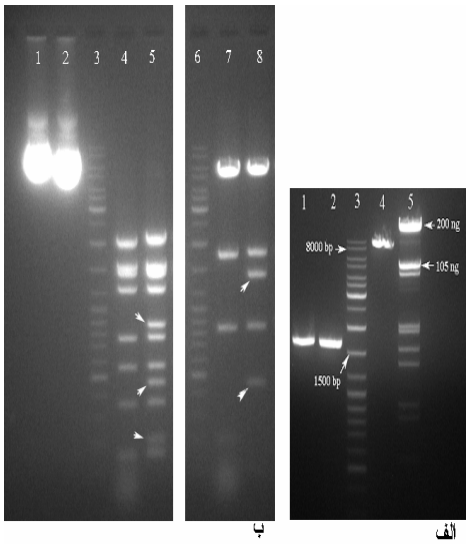
جفت باز به سلول‌های پذیرا انتقال داده شد. استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم‌های محدودگر غربال گردیدند. پلاسمیدهای غربال شده به مقدار زیاد استخراج و به منظور اطمینان با استفاده از سه آنزیم محدودگر کلونینگ آنها تایید گردید (شکل شماره‌ی ۲ ب).



شکل ۲- الف: cDNA تکثیر شده ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز ۱٦۱٦ جفت باز به روش PCR با دمای گرادیان روی ژل آگارز ۱٪ ، هر ستون $1/5^{\circ}c$ افزایش دما را نشان می‌دهد. ستون ۳ دمای آنیلینگ $55/5^{\circ}c$. ب: آنالیز آنزیمی ساختار پلاسمیدی PUCBM21mGba با ٤۳٤۱ جفت باز روی ژل آگارز ۱٪، ستون ۱ هضم با آنزیم AtaII دو قطعه ۲٤٥۳ و ۱۸۸۸ جفت باز، ستون ۲ هضم با آنزیم EcoRV دو قطعه ۳٦۰۰ و ۷٤۱ جفت باز، ستون ۳ هضم با آنزیم PstI دو قطعه ۲۸٥۸ و ۱٤۸۳ جفت باز مشاهده می شود

هر کدام از آنزیم‌های مورد استفاده حداقل دارای یک جایگاه شناسایی آنزیمی بر روی ترادف ژن نوترکیب Gba هستند. ترادف‌یابی ژن کلون شده mGba (ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز) با ۱٦۱٦ جفت باز به صورت کامل بدون هیچ جهشی با استفاده از نرم‌افزارهای Multialin و Chromas تایید گردید.

ساب کلونینگ در وکتور لنتی ویرال: هضم وکتور لنتی ویرال با آنزیم‌های محدودگر تایید و ۸٤٦۱ جفت باز آن از روی ژل آگارز تخلیص شد. وکتور نوترکیب حاوی mGba نیز پس از هضم آنزیمی و الکتروفورز، قطعه mGba ۱۷٦۰ جفت باز آن از روی ژل تخلیص گردید. تخلیص وکتور هضم شده لنتی ویرال با ۸٤٦۱ جفت باز و قطعه ژن نوترکیب Gba با ۱٦۷۰ جفت باز را در کنار نشانگرهای وزنی و طولی الکتروفورز گردید (شکل شماره‌ی ۳ الف). پس اتصال قطعات ژن نوترکیب آنزیم گلوکوسربروزیداز و وکتور لنتی ویرال و کلونینگ آنها، ساختار پلاسمیدهای نوترکیب PLVCMVmGbaeGFP با ۱۰۱۳۱ جفت باز پس از غربالگری با آنزیم محدودگر تایید شد. الکتروفورز پلاسمیدهای لنتی ویرال نوترکیب هضم شده و نیز پلاسمیدهای لنتی ویرال غیر نوترکیب در کنار نشانگر تایید گردید. ساب کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در لنتی ویرال وکتور قبل از انتقال به سلول‌های HEK با استفاده از آنزیم‌های محدودگر BsmAI و AvaI که دارای جایگاه‌های آنزیمی متعددی بر روی ترادف‌های مختلف وکتور لنتی ویرال و نیز ژن نوترکیب می‌باشند، در کنار نشانگر با استفاده از نرم‌افزار آنالیز آنزیمی همراه با وکتور غیر نوترکیب به عنوان کنترل به طور کامل تایید گردید (شکل شماره‌ی ۳ ب).

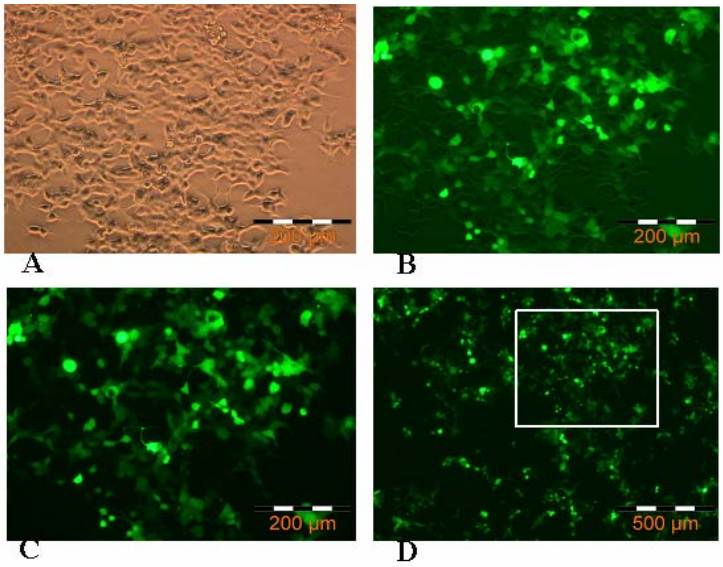


شکل ۳- الف: الکتروفورز وکتور لنتی ویرال و قطعه ژن Gba پس از هضم و تخلیص در کنار نشانگر طولی (ستون ۳) و نشانگر وزنی (ستون ٥)، ستون‌های ۱ و ۲ قطعه ژن Gba با ۱٦۷۰ جفت باز و حدود ۲۰۰ نانوگرم DNA، ستون ٤ وکتور لنتی ویرال با ۸٤٦۱ جفت باز و حدود ۲۰۰ نانوگرم DNA. ب: آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب و غیر نوترکیب ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در لنتی ویرال وکتور روی ژل آگارز ۱٪، ستون ۱ و ۲ به ترتیب پلاسمید نوترکیب و غیر نوترکیب بدون هضم آنزیمی ٤ و ۷ هضم پلاسمیدهای غیر نوترکیب لنتی ویرال (کنترل) به ترتیب با آنزیم‌های BsmAI و AvaI، ستون‌های ٥ و ۸ هضم پلاسمیدهای نوترکیب با همان آنزیم‌ها، پیکان‌ها قطعات هضم شده مربوط به پلاسمید نوترکیب Gba می‌باشند که در پلاسمید غیر نوترکیب ستون‌های ٤ و ۷ دیده نمی‌شوند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

مقدار DNA استخراج شده پلاسمید نوترکیب لنتی ویرال ۲ میکروگرم در میکرولیتر بود.

انتقال به سلول‌های HEK: وکتور لنتی ویرال دارای دو ژن نوترکیب mGba و نیز ژن گزارش‌گر GFP می‌باشد. پروموتور CMV وکتور لنتی ویرال سبب بیان ژن گزارش‌گر GFP می‌گردد. بیان ژن گزارش‌گر نشان‌دهنده انتقال ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز به سلول‌های HEK و انجام نسخه‌برداری از ژن Gba می‌باشد. سلول‌های HEK پس از کشت بیش از ۸۰٪ سطح فلاسک را پوشانده‌اند، که حداقل ۷۰٪ سلول‌های کشت داده شده ژن گزارش‌گر GFP بیان نمودند. بیان ژن گزارش‌گر در سلول‌های تولیدکننده پروتئین‌های فلورسنتی در زیر میکروسکوپ فلورسنتی دیده می‌شوند (شکل شماره‌ی ٤).



شکل ٤- انتقال ژن‌های نوترکیب Gba و GFP در سلول‌های HEK کشت داده شده در زیر میکروسکوپ فلورسنت. A: سلول های HEK زمینه روشن با نور عادی، B: همان سلول‌ها زمینه روشن با نور عادی و نور فلورسنت، C: همان سلول‌ها با نور فلورسنت، D: سلول‌های فلورسنتی با بزرگ‌نمایی کمتر، مربع ناحیه مربوط به تصویر C با بزرگنمایی بیشتر می‌باشد. در تصاویر C و D سلول‌های فلورسنتی مشاهده می‌شوند.

بحث

در این پژوهش در مرحله‌ی اول موفق شدیم ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز را به صورت کامل تکثیر و در وکتور غیر بیان‌کننده، کلون و ترادف‌یابی نماییم و سپس همراه با ژن GFP با استفاده از وکتور لنتی ویرال به بیش از ۷۰٪ از سلول‌های HEK انتقال دهیم. هدف از ژن‌درمانی انتقال و بیان موثر ژن هدف در سلول‌های مختلف است تا اثرات درمانی آن به دست آید. وکتورهای لنتی ویرال به دلیل قابلیت یکی شدن ژنوم آنها در ژنوم سلول هدف قادر خواهند بود برای زمان‌های طولانی ژن نوترکیب را بیان نمایند. بیشترین تحقیقات ژن‌درمانی و انتقال ژن تا کنون بر روی بیماری‌های تک ژنی نظیر بیماری گوشه بوده است. Carstea ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز را در وکتور PUC19 کلون نمود [١٦]. O`Neill پس از کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موقعیت همه اگزون‌های آن را در موش و انسان یکسان مشخص نمودند [١٧]. در این مطالعه ترادف‌یابی انجام شده از ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز با ١٦١٦ جفت باز با ترادف‌های گزارش شده توسط محققین فوق کاملا مطابقت داشت. Kim ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز را از طریق لنتی ویرال وکتور دارای ژن GFP به سلول‌های مغز استخوان در محیط کشت انتقال داد و سپس این سلول‌ها را به موش تزریق نمود و پس از ۲، ۳ و ٦ ماه سلول‌های بیان‌کننده‌ی پروتئین‌های فلورسنتی را در بافت‌های کبد، طحال و مغز استخوان در زیر میکروسکوپ مشاهده نمود [١٨]. Havenga نیز ژن گلوکوسربروزیداز را از طریق دیگر وکتورهای رتروویرال به سلول‌های هماتوپویتیک منتقل نمود و اظهار داشت حدود ٦٠٪ از این سلول‌ها ژن را بیان نموده‌اند [١٩]. در مطالعه ما از سلول‌های HEK به منظور انتقال ژن استفاده گردید و مشاهده شد در بیش از ۷۰٪ از این سلول‌ها ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز و نیز ژن فلورسنتی منتقل گردیدند، که با مطالعات محققین فوق منطبق بود. بیان طولانی مدت ژن‌های نوترکیب منتقل شده در مطالعات مختلف نشان‌دهنده‌ی قابلیت القای بسیار بالای لنتی ویروس‌ها از نظر طول زمان بیان و درصد سلول‌های القا شده است. در این پژوهش استفاده از سلول‌های HEK به دلیل قابلیت القاپذیری و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

تولید ویروس‌های نوترکیب بوده است تا در آینده در شرایط Ex vivo و In vivo سلول‌های مختلف القا گردد. استفاده از پروموتور CMV در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. Logann و Harms آن را در مطالعات ژن‌درمانی و سلول‌های مختلف یوکاریوتی موثر دانستند [۱۱، ۲۰]. بیان ژن نوترکیب در بیش از ۷۰٪ از سلول‌ها در مطالعه ما نشان‌دهنده تاثیر پروموتور فوق در القای سلول‌ها به ویژه رده سلولی HEK می‌باشد. ترادف‌های لنتی ویرال وکتور برای افزایش کارایی وکتور در عبور از سیتوپلاسم به هسته و از هسته به سیتوپلاسم و نسخه‌برداری به ویژه برای القای سلول‌های غیر قابل تقسیم ضروری هستند. بدون استفاده از وکتورهای ارتقایافته بیان موثر ژن مورد نظر تقریبا امکان‌پذیر نیست و امکان دست‌یابی به اثرات درمانی آن بسیار ناچیز است. لنتی ویرال وکتور مورد استفاده در مطالعه‌ی ما دارای تمام ترادف‌های ضروری برای القای ژن نوترکیب است (شکل شماره‌ی ۱). در مورد کارایی القای لنتی ویروس، یکی شدن ژنوم آن با ژنوم سلول‌های هدف پس از انتقال و قابلیت القای تعداد بیشتر سلول دارای اهمیت است که بیان ژن GFP در ۷۰٪ سلول‌ها قابلیت القای آن را مشخص می‌کند. استفاده از ترادف IRES برای بیان هم‌زمان بیش از یک ژن می‌باشد. IRES در هنگام نسخه‌برداری سبب می‌شود تا mRNA پس از رسیدن به کدون پایانی ژن اول همواره اتصال خود را با rRNA حفظ و سبب پایداری آن گردد تا با رسیدن به کدون آغازی ژن دوم آن را نسخه‌برداری نماید. Martine اظهار داشت بیان ژن دوم توسط یک پروموتور در وکتورهای bc نشان‌دهنده بیان قطعی ژن اول می‌باشد [۲۱]. در مطالعه ما ژن اول Gba و ژن دوم GFP بود. مشاهده‌ی سلول‌های فلورسنتی در بیش از ۷۰٪ آنها نشان‌دهنده انتقال و نسخه‌برداری از ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز حداقل در بیش از ۷۰٪ سلول‌ها بوده است. Kafri هدف ژن‌درمانی را بیان طولانی مدت ژن نوترکیب در سلول بدون افزایش میزان خطر آلودگی دانست. او با استفاده از وکتور لنتی ویرال انتقالی در In vivo پس از ۵ ماه در کبد و ۸ ماه در عضله ژن گزارش‌گر را بررسی نمود و هیچ واکنش التهابی را پس از این مدت مشاهده ننمود [۲۲]. در مطالعه وی بیان ژن پس از چند ماه بدون هیچ واکنش پاتولوژیک دارای اهمیت بود. لنتی ویرال مورد استفاده در مطالعه‌ی ما مشابه وکتور مورد استفاده Kafri بود که با حذف ژن‌های پاتولوژیک ایمن شده بود و استفاده از آن در مطالعات آینده برای انتقال ژن امکان‌پذیر است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی شد تا با استفاده از جدیدترین پروتکل‌ها مهمترین مرحله‌ی یک پروژه‌ی ژن‌درمانی که ساب کلونینگ و انتقال یک ژن نوترکیب در سلول می‌باشد، انجام گیرد تا در آینده بتوان با تحقیقات بیشتر شاهد انجام ژن‌درمانی در کشور باشیم.

تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و کاشان و از پژوهش‌گران بخش ژن‌درمانی دانشگاه لیدن هلند که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Biceroglu S. Memis A. Gene therapy: applications in interventional radiology. ***Diagn Interv Radiol*** 2005; 11: 113-118.
[2] Mizukami H. Mi Y. Wada R. Kono M. Yamashita T. Liu Y. et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. ***J Clini Invest*** 2002; 109: 1215-1221.
[3] de Fost M. Aerts JM. Hollak CE. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. ***Neth J Med*** 2003; 61: 3-8.
[4] Grabowski GA. Clinical and basic studies of enzyme and gene therapy in Gaucher disease type I. ***Japan J Inheri Met Dise*** 1997; 13: 283-292.
[5] Reiser J. Lai Z. Zhang XY. Brady RO. Development of multigene and regulated lentivirus vectors. ***J Virol*** 2000; 74: 10589-10599.
[6] Delenada C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. ***J Gene Med*** 2004; 6: 125-138.
[7] Van Damme A. Chuah MK. Collen D. VandenDriessche T. Oncoretroviral and lentiviral vector-base gene therapy for hemophilia: preclinical studies. ***Semin Thromb and Hemost*** 2004; 30: 185-195.
[8] Zennou V. Petit C. Guetard D. Nerhbass U. Montagnier L. Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. ***Cell*** 2000; 101: 173-185.
[9] Zufferey R. Donello JE. Trono D. Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. ***J Virol*** 1999; 73: 2886-2892.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

[10] Farson D. Witt R. McGuinness R. Dull T. Kelly M. Song J. et al. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. ***Hum Gene Ther*** 2001; 12: 981-997.
[11] Logan AC. Lutzko C. Kohn DB. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. ***Cur opin Biothechnol*** 2002; 13: 429-436.
[12] Sokolic RA. Sekhsaria S. Sugimoto Y. Whiting-Theobald N. Linton GF. Li F. et al. A bicistronic retrovirus vector containing a picornavirus internal ribosome entry site allows for correction of X-linked CGD by selection for MDR1 expression. ***Blood*** 1996; 87: 42-50.
[13] Shaw G. Mores S. Ararat M. Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. ***FASEB J*** 2002; 16: 869-871.
[14] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=118130967 (NM_008094)
[۱۵] نادریان همایون، کاظمی بهرام، حسینی احمد، صادقی یوسف، دو وریس آنتوان. کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز موش و ایجـاد جهـش در آن. ***مجله علوم تشریحی ایران*** ۱۳۸٤: سال ۳، شماره ۳: صفحات ۱۸۵تا۱۹۰.
[16] Carstea ED. Murray GJ. O`Neill RR. Molecular and functional characterization of the murine glucocerebrosidase gene. ***Biochem Biophs Res commun*** 1992; 184: 1477-1483.
[17] O`Neill RR. Tokoro T. Kozak CA. Brady RO. Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. ***PNAS*** 1989; 86: 5049-5053.
[18] Kim EY. Hong YB. Lai Z. Kim HJ. Cho YH. Brady RO. et al. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: implications for gene therapy of Gaucher disease. ***Biochem Biophys Res commun*** 2004; 318: 381-390.
[19] Havenga M. Fisher R. Hoogerbrugge P. Roberts B. Valerio D. Van Es HH. Development of safe and efficient retroviral vectors for Gaucher disease. ***Gene Ther*** 1997; 4: 1393-1400.
[20] Harms JS. Eakle KA. Kuo LS. Bremel RD. Splitter GS. Comparison of bovine leukemia virus (BLV) and CMV promoter-driven reporter gene expression in BLV-infected and non-infected cells. ***Genet Vaccines Ther*** 2004; 2: 11.
[21] Martin P. Albagli O. Poggi MC. Boulukos KE. Pognonec P. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. ***BMC Biotechnol*** 2006; 6: 4.
[22] Kafri T. Blomer U. Peterson DA. Gage FH. Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. ***Nat Genetic*** 1997; 17: 314-317.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]