

## بیان القایی ژن گزارشگر GFP در رده سلولی LMH با استفاده از ناقلین لنتی ویروسی القا پذیر

عباس رحیمی شم آبادی<sup>۱</sup>، موسی گردانه<sup>۲</sup> Ph.D.\*، عمران اسماعیل زاده<sup>۳</sup> M.Sc.

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
- ۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، دپارتمان سلولهای بنیادی و پزشکی ترمیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [mossa65@yahoo.com](mailto:mossa65@yahoo.com) و [Mossa65@nigeb.ac.ir](mailto:Mossa65@nigeb.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

## چکیده

**هدف:** با تلفیق سیستم القایی تتراسیکلین (Tet-inducible system) و ناقلین لنتی ویروسی، القا بیان ژن گزارشگر Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) در سلولهای پرندگان مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روشها:** ژن EGFP تحت کنترل سیستم Tet-ON قرار گرفت و بیان آن در سلولهای کبدی جوجه رده LMH بررسی شد. ابتدا باکتریهای مستعد با ناقل لنتی ویروسی القایی حامل EGFP به همراه یک ناقل دوم که فعال کننده Tet (Tet-transactivator) به نام rtTA-M2 را حمل می کرد ترانسفورم شده و ذخیره ماکسی پرپ خالصی از هریک از این دو DNA پلاسمیدی فراهم شدند. سپس با روش رسوب DNA-فسفات کلسیم سلولهای LMH با ذخیره هردو پلاسمید ترانسفکت شد. در مرحله بعد، غلظت های سریالی از آنالوگ Tet یعنی داکسی سایکلین را به محیط کشت سلول اضافه نمودیم به طوری که با افزایش غلظت DOX، بیان EGFP بیشتر القا گردید.

**نتایج:** افزایش غلظت داکسی سایکلین افزایش بیان را به دنبال داشت. در ۲۴ ساعت اول بعد از ترانسفکشن بیان به ترتیب برای غلظت های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر داکسی سایکلین ۰/۴، ۰/۲، ۱/۰۳ و ۱۶ درصد در ۲۴ ساعت دوم به ترتیب ۶/۴، ۲۶، ۲۸/۳ و ۲۹/۷ بود. با این وجود، افزایش بیش از حد غلظت داکسی سایکلین باعث مرگ سلول ها گردید.

**نتیجه گیری:** تلفیق سیستم های القایی Tet با منشا باکتریایی و لنتی ویروس های نو ترکیب مرتبط با انتقال ژن به سلول های انسانی می تواند باعث القا ژن در سلول های پرندگان شود. غلظت القا کننده بر میزان القا بیان ترانسژن تاثیر مستقیم می گذارد.

**واژگان کلیدی:** سیستم القایی تتراسیکلین، القا بیان ژن، لنتی ویروس

## مقدمه

رده سلول‌های LMH در سال ۱۹۹۷ در پی تیمار سلول‌ها با دی‌اتیل نیتروزآمین تثبیت گردید (۱). این رده سلولی از سلول‌های سرطانی کبد جوجه نژاد لگهورن جدا شده‌اند. LMH-2A رده دیگری از سلول‌های کبدی جوجه می‌باشند و دارای ژن گیرنده استروژن است که با تکنیک ترانسفکت در این رده سلولی تثبیت شده است. سلول‌های کبدی جوجه مدل‌های بسیار خوبی برای مطالعه متابولیسم در کبد هم می‌باشد. همچنین سلول‌های اولیه کشت شده کبد جوجه از قابلیت سنتز و ترشح پروتئین‌های پلازما برخوردارند (۲).

برای تنظیم بیان یک ژن که عموماً تحت کنترل یک پروموتور القا شونده یا مهار شونده قرار می‌گیرد می‌توان تاثیر میزان بیان آن ژن را بر روی عمل‌کرد سلول مطالعه کرد و یا میزان بیان آن را به مقدار دلخواه افزایش داده و اثر آن را بر روی سلول مطالعه کرد. همچنین با تلفیق سیستم‌های القایی با پروموتورهای اختصاصی می‌توان زمان و مکان بیان یک ژن را کنترل کرد. سیستم‌های القایی Tet در سال ۱۹۹۲ توسعه پیدا کرد (۳). این سیستم به‌طور گسترده برای تنظیم بیان یک ژن در لاین‌های مختلف سلولی و همین‌طور تعدادی از ارگان‌ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود (۴-۷). سیستم‌های وابسته به Tet از جمله بهترین و پرکاربردترین سیستم‌های بیان کنترلی ژن می‌باشند چرا که القا کننده‌ها و یا مهار کننده‌های سیستم که می‌تواند Doxycycline و یا Tetracyclin باشد هیچ اثر سمی بر روی سلول‌ها ندارد (۸). سیستم‌های وابسته به تتراسایکلین به دو نوع روشن (Tet-On) و خاموش (Tet-Off) تقسیم می‌شوند (۳ و ۹). در این سیستم‌ها پروموتور به گونه‌ای طراحی شده است که افزودن عامل ضد باکتریایی Doxycycline و یا Tetracyclin به محیط سلول‌ها باعث القا و یا مهار بیان ژن هدف می‌شود. در این سیستم‌ها از پروتئین مهار کننده تتراسایکلین (TetR) در باکتری Ecoli استفاده می‌شود که با پروتئین فعال‌سازی رونویسی VP16 هرپس ویروس ترکیب شده و پروتئین تنظیمی TetR/VP16 (tTA) را ایجاد می‌کند (۱۰). علاوه بر tTA پروتئین‌های تنظیمی دیگری مانند rtTA که نوع جهش یافته‌ای از tTA بوده و همچنین rtTA-M2 و tTS را می‌توان نام برد (۱۱) که پروتئین تنظیم کننده آخر در واقع یک پروتئین خاموش کننده می‌باشد. برای بیان کنترل شده‌ی ژن هدف، ژن مزبور در پایین دست یک پروموتور هیبرید

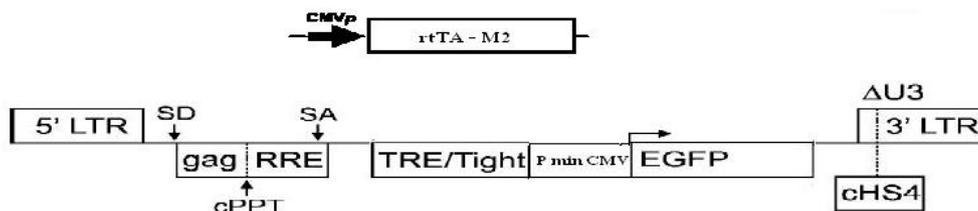
قرار می‌گیرد به طوری که این پروموتور از جایگاه اتصال برای TetR به نام تتراسایکلین اپران برخوردار است و بلافاصله بعد از آن توالی Minimal CMV قرار می‌گیرد. در سیستم Tet off افزودن Dox به محیط سلول‌ها باعث اتصال به پروتئین ترکیبی TetR/VP16 شده و در نتیجه تغییر شکل و توقف رونویسی و بیان ژن هدف می‌گردد، این در حالی است که سیستم Tet on که نوع جهش یافته سیستم Tet off می‌باشد، دقیقاً عکس این سیستم عمل می‌کند و وجود Dox در محیط باعث القا بیان ژن هدف می‌شود (۱۲).

شکل‌های دیگری از سیستم‌های تنظیمی بیان ژن پروتئین با نام tTS که یک پروتئین خاموش کننده می‌باشد، به این صورت است که در حالت عدم حضور Dox در محیط به tetO متصل شده و مانع رونویسی از ژن هدف می‌شود اما با اضافه شدن Dox به محیط این آنتی بیوتیک با اتصال به tTS باعث ایجاد تغییراتی در ساختار tTS شده و آنرا از tetO جدا می‌کند. در این لحظه پروتئین تنظیمی rtTA به tetO متصل شده و رونویسی انجام می‌گیرد. استفاده از tTS باعث بهبود در عمل‌کرد کنترلی سیستم‌های القایی شده است (۱۳). در مطالعه جاری به منظور کنترل بیان ژن گزارشگر Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) در سلول‌های رده LMH از ناقل القایی PNL-TRE-TIGHT استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

**آماده سازی ناقل‌های ویروسی:** ناقلین مورد استفاده در این بررسی شامل یک سیستم القایی Tet-on با القا پذیری به وسیله داکسی سایکلین به نام PNL-TRE-TIGHT و یک ناقل تولید کننده پروتئین ترکیبی (پروتئین تنظیمی) rtTA-M2 به نام PNL-rtTA-M2 بودند (شکل ۱). تمامی ناقلین مطابق روش استاندارد به سویه Top10 از باکتری Ecoli ترانسفورم شدند و برای انتخاب باکتری‌های ناقل پلاسمید هدف، باکتری‌ها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک مورد نظر کشت داده شدند. سپس یک تک کلون از باکتری رشد کرده برداشته شد و در ابتدا در ۲ میلی لیتر به مدت ۸ ساعت در انکوباتور شیکر کشت داده شد. سپس یک میلی لیتر از آن برای تهیه مینی پرپ استفاده شد و پس از تهیه مینی پرپ و تست آنزیمی برای اطمینان از صحت کلونی‌ها، بقیه محیط کشت به ۲۰۰ میلی لیتر محیط تلقیح شده و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکر کشت داده شد. با استفاده

از کیت QIAGEN (شرکت QIAGEN، آلمان) ماکسی پریپ پلاسمیدها تهیه شد.



شکل ۱: شمایی خطی از ناقل لنتی ویروسی Tet-ON و ناقل تولید کننده پروتئین ترکیبی rtTA-M2

مقادیر ۰/۱ / میکروگرم تهیه شد. بعد از حدود ۷ ساعت محیط سلولها تعویض شد و حدود ۱۰ میکرولیتر از استوکهای تهیه شده به محیطهای کشت سلولی اضافه شد. میزان بیان ژن گزارشگر EGFP هم در حضور و هم در غیاب DOX، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از افزودن داکسیسایکلین در زیر میکروسکوپ فلئورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

**تصویر برداری با میکروسکوپ فلوروسنس و محاسبه میزان بیان و شدت بیان EGFP** حدود ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از افزودن DOX به محیط کشت، سلولها برای بررسی میزان بیان و عکس برداری سلولها در زیر میکروسکوپ فلوروسنس بررسی شد و از بخشهای مختلف هر چاهک عکس گرفته شد تا در محاسبات و آنالیز میزان بیان EGFP استفاده گردد. تمام تصاویر با بزرگنمایی ۱۰ برابر و از بخشهای مختلف چاهکهای در نظر گرفته شده برای هر غلظت تهیه شد. تصاویر گرفته شده برای شمارش سلولها با استفاده از نرم افزار Grid cell counter و برآورد درصد سلولهای بیان کننده ژن EGFP، مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه درصد بیان ژن گزارشگر EGFP از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد بیان EGFP} = \frac{EGFP}{CV} \times 100$$

EGFP = میانگین تعداد سلولهای بیان کننده EGFP در ۵ تا ۷ میدان میکروسکوپی

CV = میانگین تعداد سلولهای موجود در ۵ تا ۷ میدان میکروسکوپی

برای آنالیز شدت بیان از دو ابزار 3D surface plot و ROI manager در نرم افزار Image J استفاده شد. قبل از آنالیز هر تصویر، ابتدا با استفاده از ابزار Subtract background از منوی Process روی تصویر ویرایش به عمل آمد تا میزان

کشت سلولهای LMH: سلولهای رده LMH به صورت کشت شده در فلاسک T25 خریداری گردید. سلولها در انکوباتور قرار داده شد و بعد از پر شدن فلاسک سلول، برای تهیه ذخیره سلولی و آماده کردن سلول برای مرحله ترانسفکشن به پلیت ۲۴ خانه و فلاسکهای T25 دیگر پاساژ داده شدند. به دلیل چسبندگی پایین سلولهای رده LMH، کف فلاسکها و پلیتهای مورد استفاده با ژلاتین ۰/۱ درصد پوشانده شد. کشت سلولهای LMH در محیط Weymouth MB 752/1 (از شرکت GIBCO) با FBS ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین انجام شد. برای آماده کردن سلول برای مرحله ترانسفکشن، سلولها در پلیت های ۲۴ خانه کشت داده شدند. تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر خانه از پلیت های ۲۴ خانه کشت داده شد و سلولها در انکوباتور CO<sub>2</sub> در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

**ترانسفکشن سلول های LMH** بعد از اینکه سلولها ۵۰ تا ۶۰ درصد پلیت را پر کردند مرحله ترانسفکشن سلولها انجام گرفت. ترانسفکشن سلولها با پلاسمیدهای ویروسی با روش رسوب DNA- فسفات-کلسیم و به کمک محلول HEPES انجام شد. در این مرحله سازه PNL-TRE-TIGHT به همراه ناقل PNL-rtTA-M2 که تولید کننده پروتئین ترکیبی rtTA می باشد ترانسفکت هم زمان شد. برای عمل ترانسفکشن بعد از ترکیب ۰/۵ میکروگرم DNA ناقل اول و ۰/۵ میکروگرم ناقل دوم با آب و CaCl<sub>2</sub> این ترکیب به صورت قطره قطره به ترکیب 2X HEPES که در حال ورتکس شدن بود اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و بعد از افزودن آن به محیط سلولهایی که ۲۴ ساعت قبل آماده شده بود سلولها برای مدت ۷ تا ۸ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> انکوبه شد. برای القای بیان ژن گزارشگر ابتدا استوکهای Doxycyclin با

انتخاب و به پنجره ROI manager اضافه شد. سپس با گزینه Measure در پنجره ROI manager میزان شدت بیان EGFP در سلول‌های EGFP+ به دست آمد. میانگین‌های Intensity جمع آوری شد و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز شد. مقایسه میانگین داده‌های Intensity با استفاده از آزمون مقایسه میانگین‌ها در نرم افزار SAS آنالیز شد

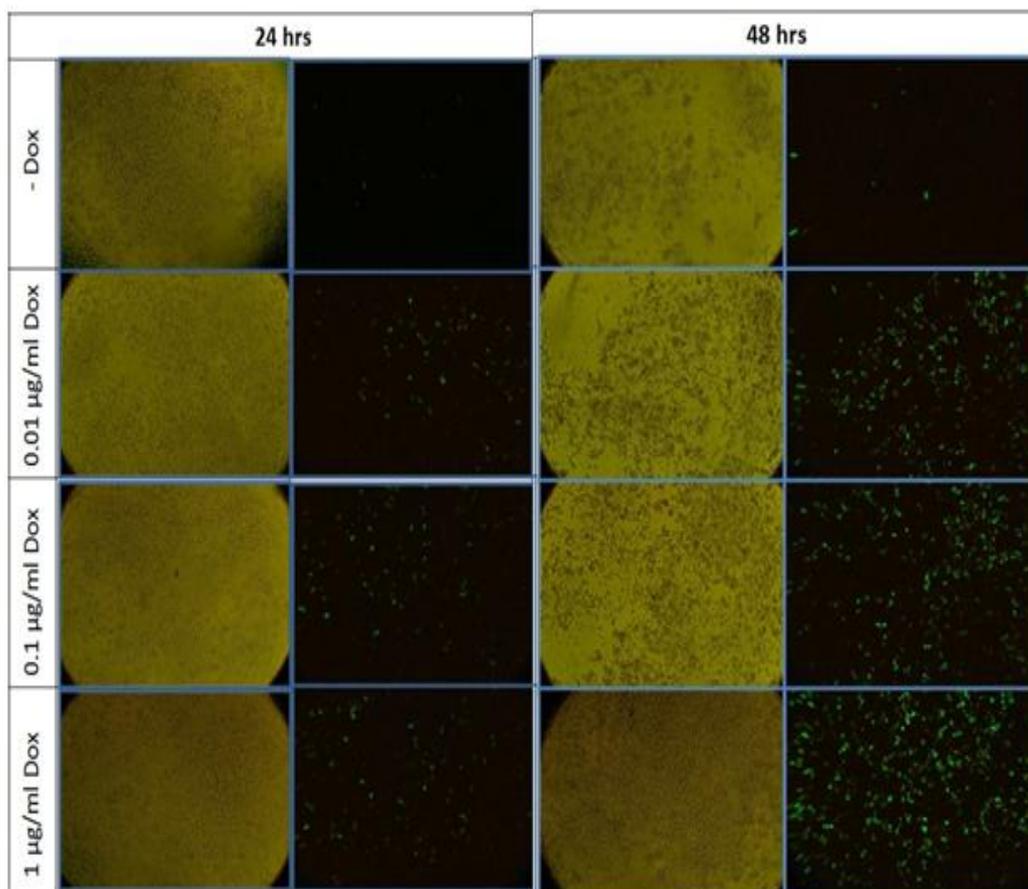
### نتایج

#### القای پذیری سیستم بیانی در حضور آنتی بیوتیک

در مقاطع زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت از سلول‌های ترانسفکت شده در زیر میکروسکوپ فلورسنتس عکس برداری به عمل آمد. مشاهده چشمی این تصاویر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و زمان حضور DOX در محیط کشت سلول درصد سلول‌های EGFP+ بیشتر می‌شود (شکل ۲). شمایی از روند افزایشی درصد سلول‌های بیان کننده EGFP و تاثیر پارامتر زمان القا و غلظت القاگر را در سلول‌های LMH نشان می‌دهد

Background به حداقل رسد و تصاویر یکنواخت‌تر حاصل شود. سپس تصاویر با استفاده از ابزار Interactive 3D surface plot آنالیز شد و میزان EGFP intensity محاسبه گردید. این ابزار با اندازه گیری ارزش پیکسلی در تمام نقاط تصویر، نقاط بیان کننده ژن و شدت بیان را می‌سنجد به طوری که به رنگ سیاه ارزش پیکسلی صفر و به رنگ سفید بیشترین ارزش پیکسلی یعنی ۲۵۵ اختصاص می‌دهد. به این ترتیب با توجه به تعداد نقاط بیان کننده و شدت بیان در نقاط بیان کننده، تصاویر به وسیله نرم افزار آنالیز شده و خروجی به صورت سه بعدی به نمایش گذاشته می‌شود. بنابراین با توجه به شدت بیان EGFP در هر سلول، رنگ فلورسنت از حالت سبز تیره تا سبز روشن متمایل به سفید متغیر بوده که این امر ارزش پیکسلی را برای هر نقطه بیان کننده ژن EGFP متفاوت می‌کند.

برای دریافت خروجی عددی از تصاویر تعریف شده برای نرم افزار Image J از ابزار ROI manager استفاده شد. برای اینکار تصویر تمام سلول‌های EGFP+ با استفاده از ابزار Point



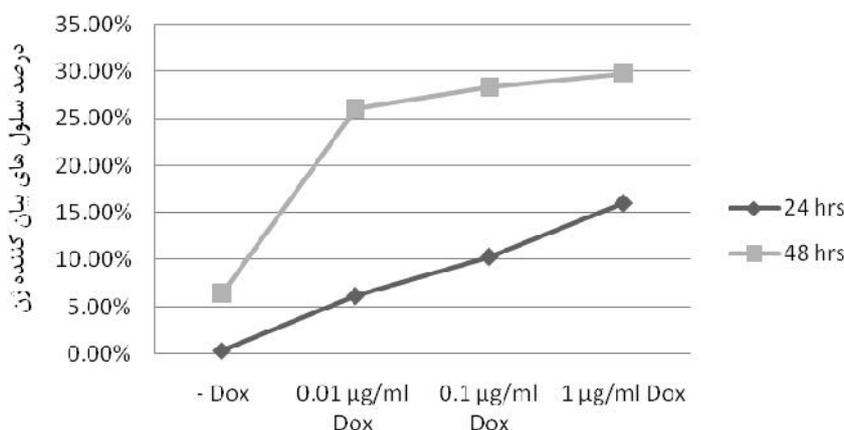
شکل ۲: تصویر میکروسکوپی سلول‌های بیان کننده EGFP مشاهده چشمی این تصاویر نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های EGFP+ با افزایش غلظت داکسی سایکلین و افزایش زمان القا بیان ژن در رده سلولی LMH رو به فزونی می‌رود. تمام تصاویر با بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر از سلول‌ها تهیه شد.

### تاثیر دو پارامتر زمان القا و غلظت DOX بر افزایش تعداد سلول‌های القا شده

نمی‌خورد. بیان ژن گزارشگر در سلول‌های کنترل ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن حدود ۰/۴ درصد و به ترتیب برای ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میکرولیتر داکسی سایکلین حدود ۶/۲، ۱۰/۳۴، ۱۶ درصد محاسبه شد. سلول‌ها برای ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور ذخیره شد تا میزان بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت بررسی شود. نتایج حاصله در ۴۸ ساعت بعد ترانسفکشن نشان داد که بیان ژن با افزایش مقدار داکسی سایکلین و مدت زمان بیشتر بالا می‌رود، به طوری که بیان در ۲۴ ساعت دوم برای گروه شاهد به ۶/۴ درصد رسید و برای گروه‌های آزمایشی ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میکرولیتر داکسی سایکلین به ترتیب به ۲۶، ۲۸/۳ و ۲۹/۷ افزایش یافت.

شمارش میدانی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنس نشان داد که به موازات افزایش غلظت داکسی سایکلین و افزایش زمان القا، تعداد سلول‌های بیان کننده ترانسژن EGFP نیز افزایش می‌یابد (شکل ۳). بر طبق این نمودار درصد سلول‌های مثبت در ۲۴ ساعت اول با یک مقدار نسبتاً ثابت در حال افزایش بوده ولی در ۲۴ ساعت دوم افزایش سریعی در این میزان ایجاد شده است. در نمونه‌های ۲۴ ساعته، درصد سلول‌های مثبت به EGFP به موازات افزایش غلظت داکسی سایکلین افزایش پیدا کرده است. ولی در ۴۸ ساعت به تدریج آهنگ افزایش کند می‌شود، به طوری که از غلظت ۰/۱ تا ۱ تغییر چندانی محسوس به چشم

نمودار درصد بیان ژن



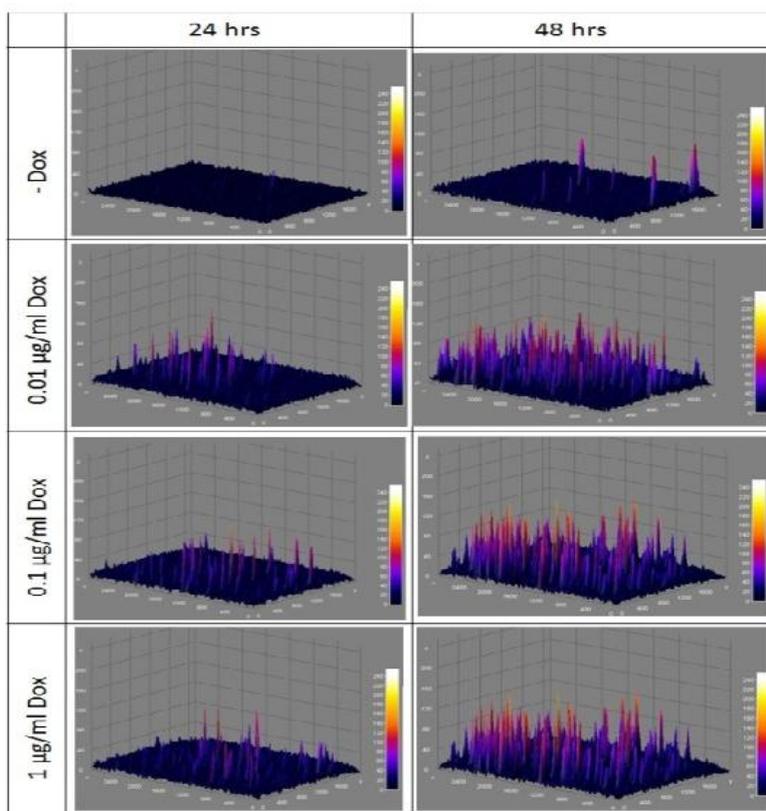
شکل ۳: افزایش درصد سلول‌های بیان کننده ژن گزارشگر EGFP با افزایش غلظت داکسی سایکلین و افزایش زمان حضور القاگر داکسی سایکلین در محیط کشت سلولی. برای محاسبه درصد سلول‌های بیان کننده ژن EGFP، تعداد سلول‌های بیان کننده EGFP در تعداد مشخصی از میادین میکروسکوپی (۵ تا ۷ میدان) به کمک نرم افزار Grid cell counter شمارش و میانگین گرفته شد. عدد حاصله بر میانگین تعداد کل سلول‌های موجود در همان میادین میکروسکوپی تقسیم و سپس در ۱۰۰ ضرب شد. بررسی‌ها به صورت جداگانه برای ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

EGFP به موازات افزایش زمان القا و دوز داکسی سایکلین می‌باشد.

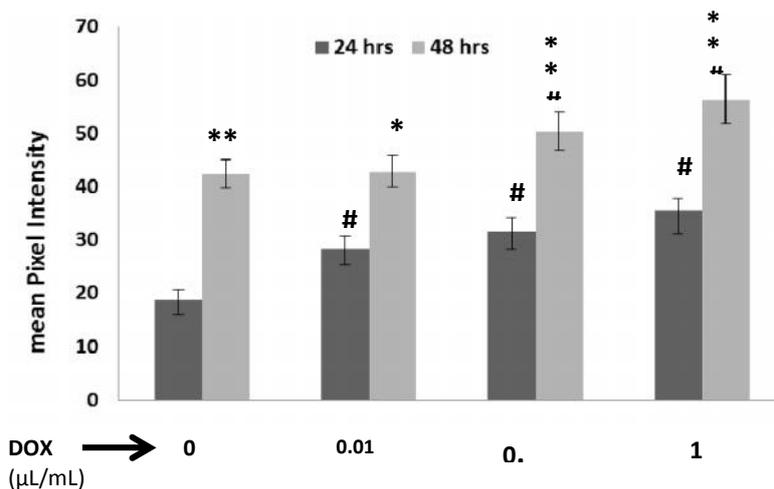
برای سنجش کمی تغییرات بیانی، تصاویر سلولی با ابزار Subtract background و ابزار Interactive 3D surface plot آنالیز شد و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS با روش مقایسه میانگین‌ها آنالیز شد. نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌دار میانگین‌های شدت بیان را در دوزهای مختلف داکسی سایکلین و مدت زمان القا بیان ژن در سطح ۰/۰۰۱ نشان می‌دهد. ( $p < 0/001$ ) (شکل ۵).

### تناسب مستقیم بین میزان بیان با میزان پیکسل‌های فلورسنت

تصاویر میکروسکوپی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بعد از ترانسفکشن و القای ژن EGFP و انکوباسیون برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القا با القاگر بیان جمع آوری شد. تصاویر حاصله بعد از ویرایش با ابزار Subtract background با ابزار Interactive 3D surface plot آنالیز شد. نتایج این آنالیز که در شکل (۴) منعکس شده است، نشان دهنده افزایش در درصد بیان EGFP و افزایش شدت بیان ژن EGFP و افزایش تعداد سلول‌های بیان کننده ژن گزارشگر



شکل ۴: آنالیز پیکسلی تصاویر سلول‌ها بعد از ترانسفکشن و القا ژن EGFP. تصاویر سلولی پس از القا بیان با دوزهای مختلف داکسی سایکلین به مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت جمع آوری شد. این تصاویر بعد از ویرایش با ابزار subtract background نرم افزار ImageJ در نهایت با ابزار Interactive 3D surface plot همان نرم افزار آنالیز شد. (ستون مدرج در کنار هر تصویر بیانگر میانگین Pixel intensity برای هر نقطه نورانی می‌باشد). برای آنالیز، تعداد مشخصی از میدان‌های میکروسکوپی (۵ تا ۷ میدان) برای هر غلظت ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القا بیان به نرم افزار Image J وارد شده تا میزان ارزش پیکسلی موجود در هر نقطه از تصویر را اندازه‌گیری و به صورت سه بعدی و به شکل تصاویر بالا به نمایش بگذارد.



شکل ۵: شدت بیان EGFP بعد از ترانسفکشن و القا بیان ژن گزارشگر در دوزهای مختلف داکسی سایکلین. برای به دست آوردن شدت بیان، از ابزار Subtract background و ابزار ROI manager استفاده شد. سپس داده‌های و اعداد خام که نشانگر شدت بیان (Pixel Intensity) به صورت کمی بود به نرم افزار SAS وارد شد و میانگین شدت بیان تمام نقاط انتخاب شده اندازه‌گیری و مقایسه میانگین‌ها برای تمام تصاویر برای غلظت‌ها مختلف انجام شد. علائم نمودار تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها را به شرح زیر نشان می‌دهد: علامت (\*) تفاوت بین دو مقطع زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت برای هر غلظت معین DOX، علامت (#) تفاوت بین هر غلظت از DOX با معادل زمانی خود در کنترل بدون DOX، علامت (X) تفاوت بین هر یک از دو غلظت DOX معادل 0.01 µL/mL با غلظت 1 µL/mL و 0.1 µL/mL.

## بحث

نشستی کمتر در بیان ژن ایجاد شده است. از جمله سیستم‌های جدید می‌توان به پروموتور هیبرید TRE3G (شرکت ClonTech) اشاره کرد که دارای نشستی بیان بسیار پایین به سیستم‌های قبلی می‌باشد. بیان پایه‌ای و یا نشستی موجود در سازه القایی لنتی و ویروسی و وجود یک فعالیت پایه در Minimal CMV Promoter می‌تواند به خاطر توالی‌های خاص و توالی‌های مسئول سیگنال دهی و افزایش نسخه برداری از ناحیه LTR در ژنوم و ویروسی باشد (۱۵).

تحمل سلول‌های پستاندار در برابر تیمار با DOX نسبتاً بالاست ولی بی‌نهایت نیست. با این وجود در مورد سلول‌های LMH، با افزایش غلظت DOX و گذشت زمان بیشتر از مرحله تیمار سلول‌ها با DOX، سلول‌ها شروع به از بین رفتن نمودند و درصد تلفات سلول رو به افزایش گذاشت. بنابراین نتایج ما نشان داد که سلول‌های LMH قادر نیستند غلظت‌هایی از DOX که برای سلول‌های پستاندار قابل تحمل بود را تحمل نمایند. در مجموع، سازه‌های القایی به همراه DOX باعث می‌شوند که سیستم‌های نسخه برداری درون سلول بیشتر به سمت مکانیسم بیان القایی هدایت شده و سلول از یک وضعیت بیان نرمال در یک شرایط غیر طبیعی قرار گیرد و سیستم‌های القایی همانند یک تله برای ماشین نسخه برداری سلول عمل می‌کند و این امر باعث مرگ سلول می‌شود.

آزمایشگاه ما یک مطالعه سیستماتیک را بر روی میزان نشستی و القای بیان در سیستم Tet آغاز کرده است که طی آن پروموتورهای القا شونده متنوعی به کار برده شده است. این پروموتورها شامل پروموتوری قدرتمند از آدنوویروس‌ها می‌باشد (۱۶). پروموتوری که در آن نمان و فواصل عناصر پاسخگو به Tet تغییر یافته است (۱۷) و پروموتوری که متحمل تغییر در توالی‌های تکراری TetO شده است (۸). نتایج مقدماتی این مطالعه نشان می‌دهد که میزان نشستی بیان ناخواسته را می‌توان به حداقل میزان ممکن رساند ولی میزان القا نیز ممکن است هم‌زمان کاهش پیدا کند. بنابراین بسته به اینکه چه ترانسژنی و برای چه منظوری القا می‌شود، یکی از این سیستم‌ها را می‌توان مورد استفاده قرار داد، ولی امکان مهار صددرصدی نشستی بیان ممکن است هیچ‌وقت حاصل نشود. بدین جهت باید در به‌کارگیری این سیستم‌ها برای ژن‌هایی که محصولات سمی را کد می‌کنند با احتیاط عمل کرد.

تنظیم بیان ژن یکی از بخش‌های مهم در تحقیقات سلولی و ژن درمانی می‌باشد، به طوری که کنترل بیان ژن و تولید سطح مشخصی از پروتئین هدف در سلول و یا بافت هدف و یا متوقف کردن بیان ژن در سلول و القا بیان آن در زمان خاص تاثیر زیادی در مطالعات بیولوژیکی و تکوینی دارد. با ترکیب این سیستم‌ها با پروموتورهای اختصاصی می‌توان زمان و مکان ژن هدف را به طور هم‌زمان کنترل نمود.

در این مطالعه، کاربرد سیستم القایی تتراسیکلین (Tet-ON) بر روی سلول‌های پرندگان رده LMH مطالعه شد و نشان داد که چنین سیستم پروکریوتی علاوه بر عمل کرد در سلول‌های پستانداران، می‌تواند در سلول‌های طیور نیز به خوبی کار کند. القاگر بیان در این سیستم‌ها داکسی سایکلین (DOX) بود که آنالوگ تتراسیکلین با سمیت کمتر بوده و در غلظت‌های مختلف باعث ایجاد سطوح بیانی مختلف برای ژن هدف می‌شود (۱۴).

نتایج حاصل شده در این بخش نشان داد که سلول‌های ترانسفکت شده LMH با ناقلین القایی بعد از افزودن DOX شروع به بیان کردند و افزایش غلظت داکسی سایکلین افزایش بیان را به دنبال داشت. به طوری که با افزایش سریالی غلظت DOX القا بیان ژن هم در ۲۴ ساعت اول بعد از ترانسفکشن و هم در ۲۴ ساعت دوم به صورت خطی افزایش پیدا کرد. این نتایج با گزارشات اولیه بر روی سیستم بیانی Tet و القا آن به وسیله DOX هم‌خوانی دارد (۳). در این پژوهش، به جای اکتیواتور اولیه (rtTA)، از نسخه جهش یافته آن به نام rtTA-M2 استفاده شد که از نظر القای بیان و خاموش سازی نشستی بیان بر نسخه اولیه برتری آشکار دارد (۱۱).

تغییر ملایم گروه‌های آزمایشی تیمار شده با غلظت‌هایی ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ داکسی سایکلین در ۴۸ ساعت دوم می‌تواند به دلیل قابلیت ترانسفکشن ۳۰ درصدی سلول‌های LMH باشد که باعث شد که در بیان القایی ژن EGFP در ۲۴ ساعت دوم یک روند روبه رشد کم و بیان حدود ۳۰ درصد مشاهده شود.

بیان ۰/۴ درصد و ۶/۴ درصد در سلول‌های شاهد، به دلیل Background و نشستی بیان ژن در زمان خاموشی سیستم و عدم حضور القاگر در محیط می‌باشد. برای حذف این بیان پایه در سازه‌های القایی سیستم‌های جدیدتر با بیان پایه‌ای و یا

## نتیجه گیری

مطالعه حاضر نوعی امکان سنجی برای کاربرد سیستم القایی Tet در رده سلولی LMH به عنوان نماینده سلول‌های مربوط به طیور محسوب می‌شود. این مطالعه نشان داد که سیستم القایی مزبور برای القای بیان ترانس‌ژن‌ها در سلول‌های فوق به خوبی عمل می‌کند و القا نیز به طور مطلوب صورت می‌گیرد به شرط آن که غلظت‌های بالای DOX مورد نیاز نباشد.

## تشکر و قدردانی

کلیه مراحل این تحقیق در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گرفت. از مسئولین پژوهشگاه پزشکی پژوهشگاه تقدیر می‌شود.

## منابع

- Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T, Establishment and Characterization of a Chicken Hepatocellular Carcinoma Cell Line, LMH1. *Cancer Res.* 1987; 47(16): 4460-4464.
- Griener G, Granick S. Synthesis and secretion of plasma proteins by embryonic chick hepatocytes: changing patterns during the first three days of culture. *J Exp Med.* 1978; 147(6):1806-23.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 1992; 89(12): 5547-5551.
- Bejar R, Yasuda R, Krugers H, Hood K, et al. Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J Neurosci.* 2002; 22(13): 5719 - 5726.
- Harding TC, Geddes, BJ, Noel JD, Murphy D, et al. Tetracycline-regulated transgene expression in hippocampal neurons following transfection with adenoviral vectors. *J Neurochem* 1997; 69(6): 2620- 2623.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, et al. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell.* 2001; 104: 675-686.
- Ralph GS, Bienemann A, Harding TC, Hopton M, et al. Targeting of tetracycline-regulatable transgene expression specifically to neuronal and glial cell populations using adenoviral.vectors. *NeuroReport.* 2000; 11(9): 2051- 2055.
- Pluta K, Luce MJ, Bao L, Agha-Mohammadi S, et al. Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med.* 2005; 7(6):803-17.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995; 268: 1766-1769.
- Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem* 1983; 53/54: 163-183, 1993.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, et al. Exploring the sequence space for tetracyclinedependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97(14): 7963-7968.
- Mark L. Conditional control of Gene expression in the mouse. *Macmillan Magazines Ltd.* 2001; 2: 743- 755.
- Zhou Z, Tao Z, Chun G, Robert J, et al. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2002; 13: 121-128.
- Haberman R, McCown T, Samulski R. Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Therapy.* 1998; 5: 1604-1611.
- Gardaneh M, O'Malley KL. Rat tyrosine hydroxylase promoter directs tetracycline-inducible foreign gene expression in dopaminergic cell types. *Mol Brain Res.* 2004; 126(2): 173-80.
- Massie B, Couture F, Lamoureux L, Mosser DD, et al. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol.* 1998; 72(3): 2289-96.
- Agha-Mohammadi S, O'Malley M, Etemad A, Wang Z, et al. Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med.* 2004; 6(7):817-28.

## Inducible Gene Expression of GFP Reporter Gene in LMH Cell Line Using Inducible Lentivirus Vectors

Rahimi-Shamabadi A, M.Sc.<sup>1</sup>, Gardaneh M, PhD.<sup>2\*</sup>, Esmailzadeh E, M.Sc.<sup>3</sup>

1. Postgraduate Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IRAN.
2. Assistant Professor in Molecular Genetics, Dept. of Stem cells and Regenerative Medicine Group, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IRAN.
3. Research Assistant, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IRAN

\* Email corresponding author: [mossa65@yahoo.com](mailto:mossa65@yahoo.com) & [Mossa65@nigeb.ac.ir](mailto:Mossa65@nigeb.ac.ir)

Received: 9 Feb. 2015

Accepted: 23 Jun. 2015

---

### Abstract

**Aim:** By combining Tet-inducible system and lentivirus vectors, we investigated the induction of Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) reporter gene in poultry cells.

**Material and Methods:** the EGFP gene was placed under Tet-ON system and its induction was studied in liver cell line LMH. First, we transformed competent bacteria separately with an inducible lentivirus vector carrying EGFP and a second vector carrying Tet transactivator rtTA-M2 and prepared a purified maxi-prep stock of either plasmid DNA. Then, we used DNA-calcium phosphate co-precipitation method to co-transfect LMH cells with both plasmid stocks. In the next step, we added different concentrations of Tet analog doxycycline (DOX) to cell growth medium.

**Results:** Increase of DOX concentration caused elevation of gene expression. Within the first 24 hours after post-transfection, the expression of EGFP for 0, 0.01, 0.1 and 1 µg/ml of DOX was 0.4, 6.2, 10.3 and 16% respectively, and in the next 24 hours the expression changed to 6.4, 26, 28.3 and 29.7% respectively. However, treatment with the overdose of DOX caused the cell death.

**Conclusions:** Combination of Tet-inducible system originating from bacteria and recombinant lentivirus vectors designed for gene transfer to human cells can jointly promote transgene expression in poultry cells. The concentration of the inducer can directly influence the level of transgene induction.

**Keywords:** Tet-inducible system, Expression induction, Lentivirus