مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۲، ۳۸۸-۳۸۱

ساخت لنتی‌ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن DJ-1 و انتقال آن‌ها به سلول‌های انسانی

عمران اسماعیل زاده M.Sc.[1]، موسی گردانه Ph.D. [1*]

- گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mossa65@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۹

چکیده

هدف: اهداف این مطالعه ساب‌کلونینگ ژن DJ-1 (PARK7) به درون وکتور انتقال لنتی‌ویروسی، تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب و آلوده سازی سلول‌های هدف با این ویروس‌ها می‌باشند.

مواد وروش‌ها: ژن DJ1 با استفاده از آنزیم های محدود کننده EcoR1 و Xho1 از وکتور pcDNA-DJ1 به دست آمد. وکتور انتقالی لنتی ویروس به صورت همزمان توسط آنزیم های محدود کننده EcoR1 و Sal1 بریده شد. ژن DJ1 توسط آنزیم DNA لیگاز T4 به داخل وکتور ترانسفر و بالادست ژن DJ1 وارد شد، به طوریکه توالی DJ1-IRES-Jred در پایین دست و تحت کنترل پروموتر CMV قرار گرفت. برای تولید لنتی ویروس های نوترکیب، وکتور ساخته شده به همراه دو وکتور بسته بندی و پوشش ویروس به طور همزمان به درون سلول های HEK (Human Embryonic Kidney) انتقال داده شدند. ویروس های ساخته شده برای آلوده سازی سلول های هدف استفاده شدند.

نتایج: برای اطمینان از درستی ساب‌کلونینگ از تست‌های آنزیمی و PCR استفاده شد. همچنین برای مشاهده بیان ژن Jred که نشان دهنده موفقیت ما در انتقال ژن می باشد، از میکروسکوپ فلورسانس استفاده شد. سپس برای مشاهده افزایش بیان ژن DJ1 در سلول های آلوده شده نسبت به سلول های طبیعی، از تست RT-PCR استفاده شد.

نتیجه گیری: این مطالعه کاربرد موفقیت آمیز ناقل‌های لنتی‌ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی را نشان می‌دهد و روشن می‌سازد که این ناقل‌ها می‌توانند در درمان بیماری‌های سیستم عصبی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: کلونینگ، DJ1، لنتی ویروس.

مقدمه

بیماری پارکینسون در زمره بیماری‌های زوال نورونی است که با وجود ناشناخته بودن علت یا علل آن، بسیاری از زوایای تاریک مرتبط با زیست شناسی مولکولی این بیماری اکنون آشکار شده و پشتوانه قابل اطمینانی برای درمان‌های نوین پارکینسون به‌وجود آورده است. مطالعه روی برخی بیماران که شیوع خانوادگی پارکینسون در آن‌ها برجسته بوده است باعث شناسایی تعدادی از ژن‌های مهم و دخیل در شکل گیری این بیماری شده است. ژن PARK7 یا DJ1 سومین ژن شناخته شده مرتبط با بیماری پارکینسون می‌باشد که جهش در آن باعث فرم آتوزومال مغلوب از بیماری پارکینسون می‌شود و در ابتدا به‌عنوان یک انکوژن شناخته شد (۱). همگام با آن مشخص شد که این ژن پروتئینی می‌سازد که در باروری رت‌های نر و دیگر پستانداران نقش دارد (۲و۳). با مشخص شدن نقش این ژن در نوعی از بیماری خانوادگی پارکینسون که به‌صورت اتوزومی مغلوب انتقال می‌یابد، مطالعه بر روی آن افزایش یافت (۴). در بیماری پارکینسون، این ژن در پاسخ به استرس اکسیداتیو نقش دارد و جهش هایی که باعث از دست رفتن عمل‌کرد این ژن می‌شوند، باعث افزایش میزان این استرس اکسیداتیو می‌گردند (۵،۶ و ۷). چندین مکانیسم برای عمل‌کرد این ژن در پاسخ به استرس اکسیداتیو گزارش شده است. از جمله اینکه محصول این ژن یک چپرون وابسته به حالت احیا می‌باشد(۸). احتمالا نقش چپرونی محصول این ژن از تراکم آلفاسینوکلئین در سلول‌ها جلوگیری می‌کند (۸ و۹). این خصوصیت ژن می‌تواند بسیار مهم باشد. زیرا آلفا سینوکلئین و یوبی‌کوئیتین از فراوان‌ترین پروتئین‌هایی هستند که در سیتوپلاسم سلول‌های افراد پارکینسونی وجود دارند (۱۰). از دیگر شیوه‌های فعالیت این ژن می‌توان به نقش این ژن در تنظیم منفی آپوپتوزیس در حالت احیا سلول‌ها اشاره کرد، که احتمالا از طریق فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K/Aktعمل می‌کند (۱۱ و۱۲). همچنین نقش‌های محافظتی بیشتری نیز برای این ژن گزارش شده است (۱۳).

نقش DJ-1 در پیشگیری از بروز علائم پارکینسون به‌خصوص از نظر حفاظت نورون‌های دوپامین ساز در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته است. برای آنکه عمل‌کرد DJ-1 در مقابله با سیگنال‌های مرگ در این دسته نورون‌ها بهتر و بیشتر روشن شود، در مطالعه جاری و به‌عنوان گام نخست، یک سازه لنتی ویروسی ساخته شده که حامل توالی کد کننده DJ-1 بود. با انتقال این سازه به سلول‌های مولد ویروس، لنتی ویروس‌های نوترکیب ساخته شد که پس از آلوده کردن سلول‌های هدف قادر به هدایت بیان چشمگیر DJ-1 در این سلول‌ها بود. این سازه لنتی‌ویروسی اکنون می‌تواند به‌عنوان ابزاری مهم برای مطالعات عمل‌کردی DJ-1 به‌کار گرفته شود.

مواد و روشها

تهیه پلاسمیدهای ویروسی: ناقل‌های ویروسی شامل ناقل بسته بندی (ΔΔΔpCD/NL-BH*) ناقل پوششی (LTR-G) و ناقل ترانسفر (PLV-Jred) با استفاده از کیت Maxiprep از کیاژن خالص سازی شدند (۱۴).

برش ناقل انتقالی برای وارد سازی قطعه هدف (Digestion): برای وارد کردن ژن DJ-1 به‌درون ناقل انتقالی و بالادست ژن Jred، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های EcoR1 و Sal1، پلاسمید ترانسفر لنتی‌ویروس را برش داده شد تا با از دست دادن قطعات اضافی به‌صورت یک پلاسمید خطی درآید. به این صورت که طبق دستورالعمل، پلاسمید مورد نظر همراه با آنزیم های مذکور و بافرهای مخصوص آنها به مدت دوساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه کردیم. محصول هضم آنزیمی را با استفاده از ژل آگاروز، الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج از ژل (سیناژن) بازیابی گردید. به‌طور همزمان ژن DJ-1 با استفاده از دو آنزیم EcoR1 و Xho1 از داخل پلاسمیدpCDNA-DJ1 خارج و به‌طرز مشابه از روی ژل آگاروز استخراج شد.

وارد سازی ژن DJ-1 به درون ناقل انتقالی (Ligation): با توجه به سازگار بودن انتهاهای چسبنده حاصل از برش با آنزیم‌های Sal1 وXho1 ، محصول این دو هضم آنزیمی به‌طور مستقیم و با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز و طی یک واکنش لیگاسیون بهم پیوند شد. محصول واکنش با ترانسفورماسیون به‌روش شوک حرارتی به باکتری‌های Eschrichia coli Top10 مستعد شده منتقل گردید. کولونی‌های حاصل از رشد این باکتری‌ها به‌طور تصادفی مورد غربالگری به‌روش Cracking قرار گرفت. به این‌صورت که باکتری‌ها طبق پروتکل به‌صورت نسبی هضم شده و محلول رویی حاوی DNA روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و سپس از نمونه‌های مشکوک DNA پلاسمیدی استخراج شده و روی آن‌ها تست آنزیمی و PCR انجام شد و سرانجام نمونه مورد نظر شناسایی و انتخاب گردید.

کشت سلول: سلول‌های HEK-293T به‌عنوان مولد ویروس در محیط DMEM+10% FBS شرکت Gibco در دمای ۳۷ درجه و CO_2 ۵ درصد کشت و پاساژ داده شدند. دو میلیون سلول در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تادر روز بعد ۵۰ تا ۶۰ درصد پتری دیش را پر کنند. برای آلوده سازی ویروسی تعداد ۵۰ هزار سلول HEK-293T در پلیت ۲۴ خانه، ۲۴ ساعت قبل از آلوده سازی کشت داده شدند.

تولید ویروس: برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب وفعال، سلول‌های مولد ویروس را همزمان با سه ناقل لنتی‌ویروسی به مقدار ۱۵ میکروگرم از ناقل ترانسفر و ۱۰ میکروگرم از هریک از ناقلین بسته بندی و غشایی، با روش رسوب DNA -فسفات کلسیم ترانسفکت شد. برای تشکیل این رسوب، DNAهای مذکور همراه با ۵۰ میکرولیتر از کلرید کلسیم ۲/۵ میلی مولار، با آب استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسید و به این محلول در حالی‌که روی شیکر در حال چرخان بود هم حجم آن HEPES به آرامی اضافه شد. محلول حاصل را ۲۰ دقیقه در زیر هود انکوبه شد تا رسوب مطلوب به‌دست آید. سپس این رسوب به آرامی و قطره قطره به محیط سلول‌های هدف اضافه گشت. سلول‌ها به‌مدت ۸ ساعت انکوبه شدند و سپس محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. پس از این مراحل سلول‌ها تا زمان تولید ویروس و رها سازی آن به محیط کشت، در شرایط انکوباتوری ذکر شده نگهداری شدند.

تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلول‌های هدف: محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس محیط فیلتر شده به‌درون ستون‌های آمیکون MW ۱۰۰(شرکت کیاژن) ریخته و مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm 4000 سانتریفیوژ گشت. محلول باقیمانده پشت فیلتر که تغلیظ شده و پر از ذرات ویریونی بود جمع آوری شد. حجم های مختلف از این محلول برای آلوده سازی سلول‌های هدف استفاده شد. سپس سلول‌ها در شرایط انکوباتوری ذکر شده قرار داده شدند تا بیان ژن Jred موجود در ناقل انتقالی، در زیر میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شود. پس از این مرحله با استفاده از تکنیک RT-PCR از افزایش بیان ترانسژن DJ-1 اطمینان حاصل گردید.

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR : همان‌طور که قبلا گزارش کرده ایم، ۹۶ ساعت پس از ترانسدوکشن سلولی، کل RNA سلولی با استفاده از کیت مربوطه (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) استخراج شده و پس از اطمینان از سلامت کامل آن در روی ژل، دو میکروگرم از آن برای سنتز cDNA تحت شرایط گزارش شده به‌کار برده شد (۱۵). ساخت cDNA به کمک ترانسکریپتاز معکوس از (Fermentas, Lithuania) و در حضور هگزامرهای راندوم و RNase Inhibitor صورت گرفت. برای تکثیر یک قطعه ۱۸۵ جفت بازی از cDNA مربوط به DJ-1 انسانی، جفت پرایمر زیر بر اساس توالی کد کننده آن به‌شرح زیر طراحی و سنتز شد.

(NM_007262.4 GenBank accession no.):

Forward: 5'- CGGGGTGCAGGCTTGTAAA -3',

Reverse: 5'- ACCACATCACGGCTACACTG -3'.

مقادیر یکسان از هر نمونه cDNA برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲ دقیقه دناتوراسیون نمونه‌ها در در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واکنش PCR با ۳۰ سیکل دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ دقیقه Annealing در ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و مرحله Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه) به انجام رسید. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۲ درصد آنالیز و تصویر برداری شد. شدت باندهای این تصاویر با استفاده از نرم افزار (Skill US-Scan-It Gel Analysis Software Scientific Inc. Orem, Utah) اندازه گیری گردید.

نتایج

بازیابی قطعات DNA مورد نظر:

واکنش Digestion روی ناقل لنتی‌ویروسی (شکل۱) و همچنین روی ناقل حاوی ژن DJ-1 (شکل ۲) با موفقیت انجام شد.

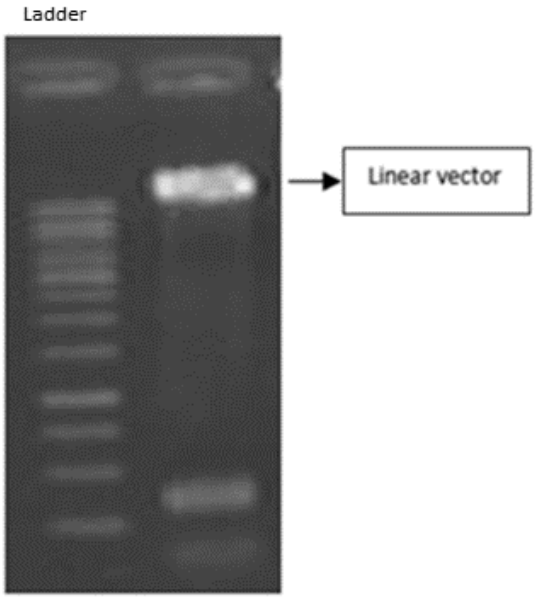
استخراج قطعات مورد نظر از روی ژل آگاروز:

قطعه‌ی حدود۱۲کیلو بازی وکتور خطی شده و قطعه ی ۸۵۰ جفت بازی DJ-1 با استفاده از کیت استخراج از ژل، از روی ژل آگاروز استخراج شده و به‌منظور تعیین غلظت، به‌طور همزمان روی ژل آگاروز، الکتروفورز گردیدند (شکل۳).

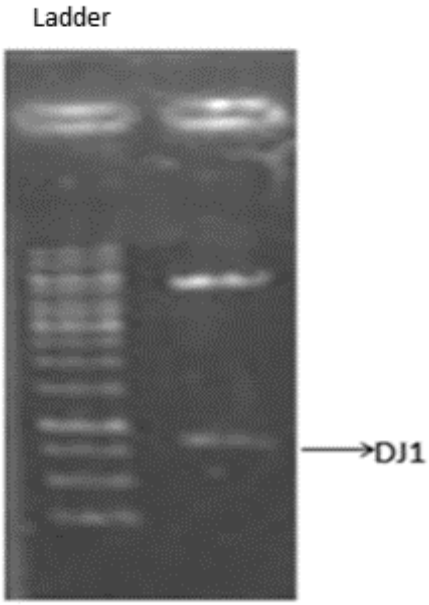
تست کرکینگ:

پس از انجام واکنش Ligation تعدادی از کلونی‌ها به صورت اتفاقی انتخاب شده و روی آن‌ها تست کرکینگ انجام شد و

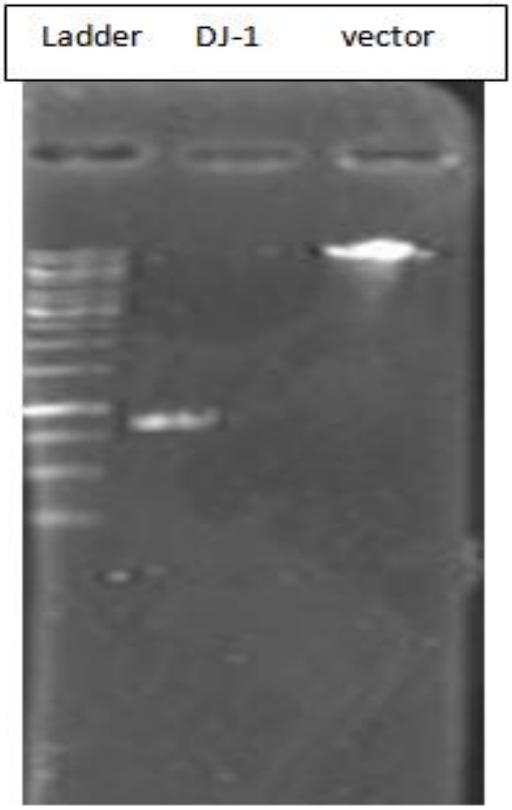
نمونه‌هایی که روی ژل کمتر از بقیه حرکت کرده بودند انتخاب گردید (شکل۴).



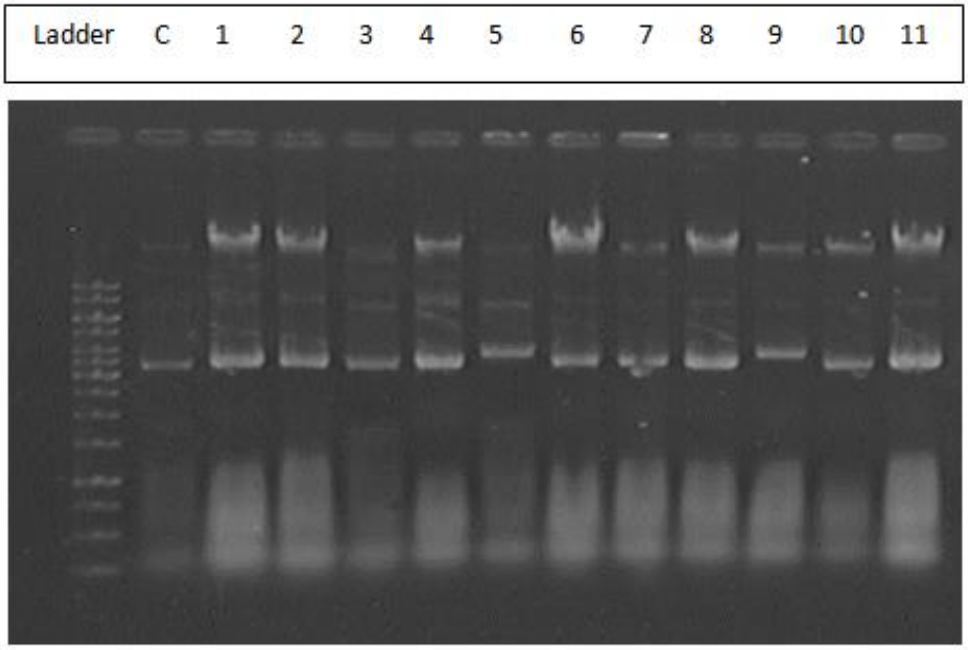
شکل ۱: خطی شدن ناقل لنتی ویروسی pLV-Jred



شکل ۲: برش ناقل pcDNA-DJ1 و خروج ژن DJ1



شکل۳: بازیابی قطعات از ژل



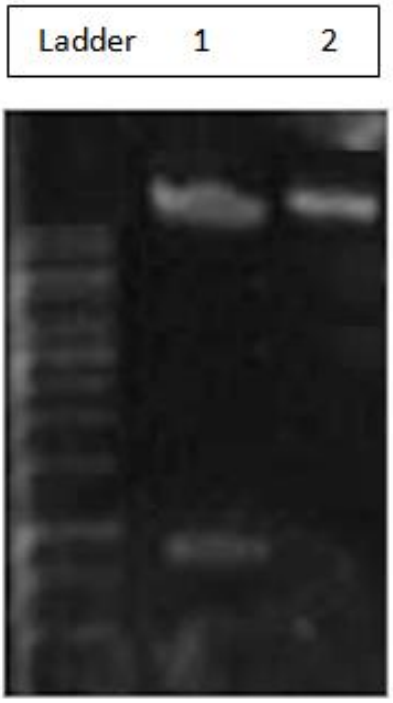
شکل۴: تست کرکینگ

تست Digestion:

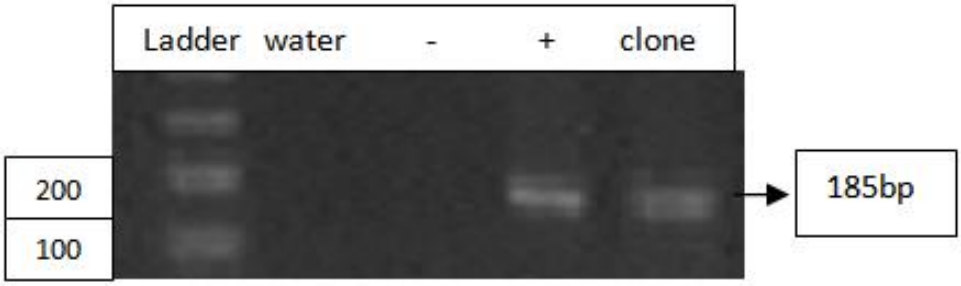
به‌منظور اطمینان از صحت نمونه‌های انتخاب شده، این نمونه‌ها با آنزیم های EcoR1 و Sal1 بریده شدند که در یکی از دو نمونه، قطعات به‌دست آمده نشان از صحت کلنی‌ها در این مرحله داشت (شکل ۵).

تست PCR:

برای اطمینان کامل از درستی کلون به‌دست آمده، با استفاده از پرایمرهای موجود، برای نمونه مثبت واکنش PCR انجام گردید و نتیجه‌ی آن نشان دهنده صحت این کلونی بود (شکل۶).



شکل۵: تست آنزیمی کلون مورد نظر و به‌دست آمدن قطعات مورد انتظار



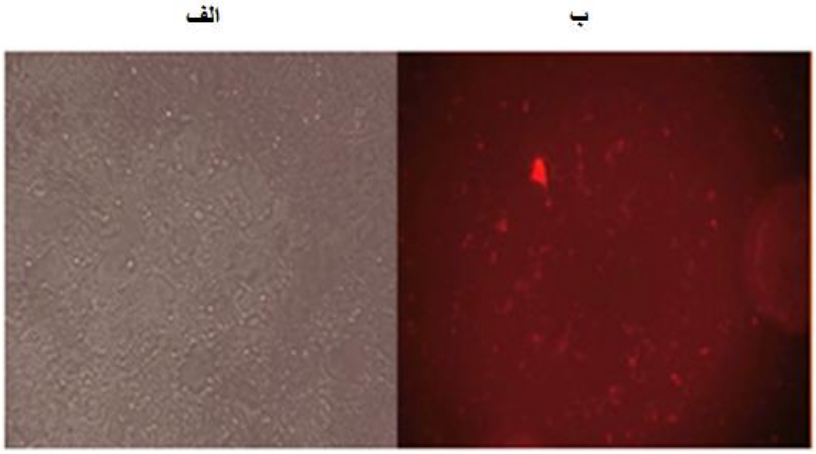
شکل۶: واکنش PCR بر روی نمونه مثبت و نمونه مورد نظر برای ژن DJ1

موفقیت مرحله ترانسفکشن:

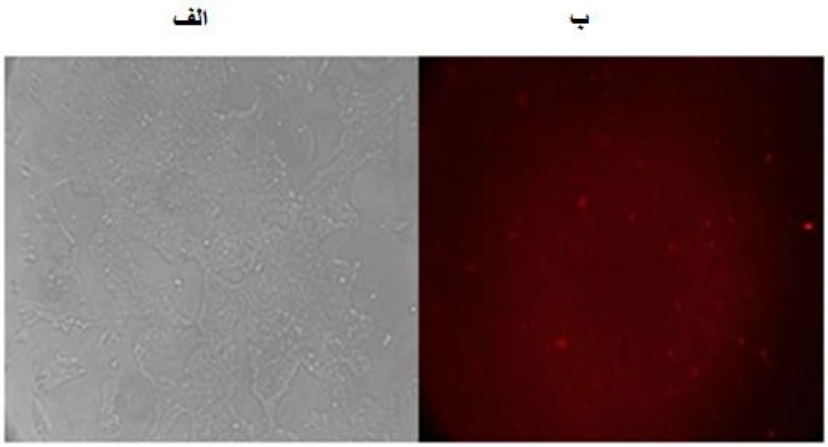
مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس در فواصل زمانی متوالی پس از ترانسفکشن، آغاز بیان ژن Jred را در سلول‌های HEK-293T، ۹ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داند و در ساعات بعدی بیان این ژن تشدید گردید (شکل۷).

ترانسداکشن سلول‌های هدف و بیان ژن گزارشگر:

حدود ۳۶ ساعت پس از افزودن استوک ویروسی به سلول‌های هدف اولین نشانه های بیان Jred با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شد و موفقیت آمیز بودن ترانسدوکشن را به اثبات رساند. بیان Jred در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر خود رسید (شکل ۸).



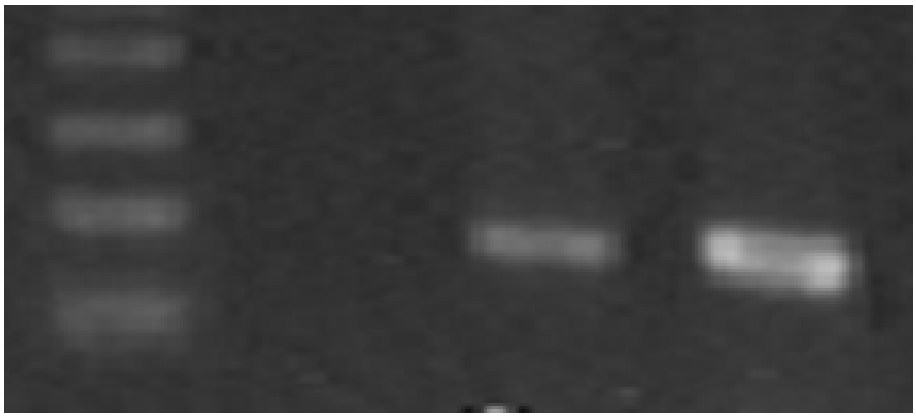
شکل۷: بیان ژن Jred در زیر میکروسکوپ فلورسنس. الف) سلول های HEK-293T قبل از ترانسفکشن، ب) سلول های HEK-293T ، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن. (بزرگنمائی: ×۱۰۰)



شکل۸: بیان ژن Jred در زیر میکروسکوپ فلورسنس. الف)سلول های HEK-293T قبل از ترانسدوکشن، ب) سلول های HEK293T، ۷۲ ساعت پس از ترانسدوکشن. (بزرگنمائی: ×۲۰۰)

افزایش بیان ژن DJ-1:

یک هفته پس از آلوده شدن سلول‌های HEK-293T با ویروس‌های هدف و اطمینان از بیان ترانسژن گزارشگر، RNA این سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از تکنیک RT-PCR میزان بیان ژن DJ-1 قبل و بعد از ترانسداکسیون مشاهده گردید (شکل۹). این آزمایشات نشان داد که میزان بیان DJ-1 در سلول‌های آلوده شده به ویروس pLV-DJ-1 نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافته است.



شکل۹: تصویر ژل الکتروفورز از واکنش RT-PCR بر روی ژن DJ-1.

بحث

امروزه انتقال ژن یکی از مهم ترین تکنیک‌ها در رابطه با تشخیص، پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری پارکینسون تحت عنوان ژن درمانی به‌شمار می‌رود. ناقلین مختلف و متعددی برای انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند که می‌توان آن‌ها را به دو گروه ناقلین ویروسی و ناقلین غیر ویروسی دسته بندی کرد (۱۶). از بین ناقلین ویروسی، لنتی ویروس‌ها به‌دلیل داشتن خصوصیات برجسته در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ویروس‌ها متعلق به خانواده رترو ویریده بوده و همانند رترو ویروس‌ها قادرند پس از ورود به سلول میزبان ژنوم خود را به داخل ژنوم میزبان وارد سازند. رترو ویروس‌ها زمانی قادرند این کار را انجام دهند که سلول در حال تقسیم باشد ولی لنتی‌ویروس ها می‌توانند بدون نیاز به تقسیم سلولی وارد هسته سلول میزبان شده و ژنوم خود را به‌داخل ژنوم میزبان متصل کنند (۱۷). حذف برخی از ژن‌های اصلی، فرعی و تنظیمی و همچنین جهش‌های حذفی (حذف ۴۰۰ نوکلئوتید از ناحیه U3) در نواحی ضروری LTR'۳ که مربوط به افزاینده (Enhancer) و پروموتر (Promoter) می‌باشد، منجر به غیر فعال سازی نسخه برداری از پرویروس شده و ناقلین حاصل از این جهش‌ها تحت عنوان ناقلین SIN (Self inactivating vectors) نامیده می‌شوند (۱۸).

در این حامل‌ها به منظور افزایش ایمنی زیستی، تعداد زیادی از ژن‌های غیر ضروری و بیماریزای ویروسی حذف شده و دارای نقص در سیستم همانند سازی می‌باشند. حاملین لنتی ویروسی نسل سوم از ۴ حامل مجزای لنتی‌ویروسی تشکیل شده‌اند که یکی از آن‌ها حامل انتقال و بقیه حاملین کمکی برای بسته بندی لنتی‌ویروس‌ها می باشند. به دلیل عدم وجود همولوژی بین این ۴ حامل، امکان نوترکیبی و قرار گرفتن ژن های لنتی‌ویروسی در مجاور هم کاهش یافته و ایمنی آن‌ها افزایش پیدا کرده است (۱۹). یکی از مهم‌ترین معایب حاملین لنتی‌ویروسی، ورود اتفاقی آن‌ها به داخل ژنوم میزبان و احتمال ایجاد جهش زایی دخولی آن هاست (۲۰). در این مطالعه ما توانستیم لنتی‌ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن DJ1 را با موفقیت تولید کنیم که می‌توانند در مطالعات بعدی به‌منظور بررسی افزایش بیان این ژن در مقابله با عوامل گوناگون از جمله رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه گیری

نتیجه این مطالعه کاربرد موفقیت آمیز ناقل‌های لنتی‌ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی را نشان می‌دهد و روشن می‌سازد که این ناقل‌ها می‌توانند در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از قبیل پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار گیرند، همان گونه که امروزه به طور وسیعی از آن‌ها در سراسر دنیا استفاده می‌شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری تکنیکی آقای عباس رحیمی در تهیه این مقاله سپاسگزاری می‌شود. هزینه انجام این پژوهش از طریق طرح شماره ۴۲۰ مصوب پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تامین شده است.

منابع

1. Nagakubo D, Taira T, Kiatura H, Ikeda M, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 231(2): 509–513.

2. Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 251(2): 545–549.

3. Welch JE, Barbee RR, Roberts NL, Suarez JD, et al. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. J Andrology. 1998; 19(4): 385–393.

4. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. (18 co-authors). Mutation in the Dj-1 gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. Science. 2003; 299(4): 256–259.

5. Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 312(4): 1342–1348.

6. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(24): 9103–9108.

7. Martinat C, Shendelman S, Jonason A, Leete T, et al. Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES-derived cell model of primary Parkinsonism. PLoS Biol. 2004; 2(4): 1754–1763.

8. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, et al. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits a-synuclein aggregate formation. PLoS Biol. 2004; 2(4): 1764–1773.

9. Zhou W, Freed CR. DJ-1 up-regulates glutathioine synthesis during oxidative stress and inhibits A53T a-synuclein toxicity. J Biol Chem. 2005; 280(52): 43150–43158.

10. Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci. 2006; 7(3): 207–219.

11. Kim RH, Peters M, Jang YJ, et al. (16 co-authors). Dj-1, a novel regulator of the tumor supressor PTEN. Cancer Cell. 2005; 7(3): 263–273.

12. Yang Y, Gehrke S, Haque ME, et al. (12 co-authors). Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(3): 13670–13675.

13. Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, et al. The Parkinson's diseaseassociated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. Hum Mol Genet. 2005; 14(9): 1231–1241.

14. Esmaeilzadeh E, Gardaneh M, Vaziri HR. The Concomitant Effect of Shikonin and Glutathione Peroxidase-1 on Enhanced Survival of Dopaminergic Neurons against Parkinsonian Toxicity. JCT. 2012; 3(2): 153-160.

15. Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA Cell Biol. 2002; 21(12): 937-51. Review.

16. Neeltje A, Verma KM. Gene therapy with viral vector. Ann Rev Toxicol. 2003; 43(7): 413-439.

17. Esmaeilzadeh E, Gardaneh M, Gharib E, Sabouni F. Shikonin Protects Dopaminergic Cell Line PC12 Against 6-Hydroxydopamine-Mediated Neurotoxicity Via Both Glutathione-Dependent and Independent Pathways and by Inhibiting Apoptosis. Neurochem res. 2013; 38(8): 1590-604.

18. Lever AML, Strappe PM, Zhao J. Lentiviral vectors, J Biomed Sci. 2004; 11(3): 439-449.

19. Pawliuk R, Bachelot T, Raftopoulos MH, et al. Retroviral vectors aimed at gene therapy of human a-globin gene disorders. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 850: 151-162.

20. Kalberer PC, Pawliuk R, Imren S, et al. Preselection of retrovirally transduced bone marrow avoid subsequent stem cell gene silencing and age-dependent extinction of expression of human a-globin in engrafted mice. PNAS. 2000; 97(10): 5411-5415.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2014; 4(4): 381-388

Original Article

Production of Carrying DJ-1 Gene Recombinant Lentiviruses and Their Transition to Human Cells

Esmaeilzadeh E, M.Sc.[1], Gardaneh M, Ph.D[1*]

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

* Email corresponding author: mossa65@nigeb.ac.ir

Received: 22 Mar. 2013 Accepted: 20 Aug. 2013

Abstract

Aim: The aims of this study were subcloning of Dj-1(PARK7) gene to lentiviral transfer vector, recombinant lentiviruses production and target cells infection with these viruses .

Material and methods: DJ1 gene obtained from pcDNA-DJ1 vector using restriction enzymes EcoR1 and Xho1. Lentiviral transfer vector was coincidental digested using EcoR1 and Sall enzymes. DJ-1 gene was interred into the lentiviral transfer and upstream of Jred gene using T4-DNA ligase. As DJ1-IRES-Jred sequence was placed in downstream and control of CMV promoter. To production of recombinant lentivruses, the made vector is coincidental transferred into the HEK-293T (Human Embryonic Kidney) cells with two packaging and envelope lentiviral vectors. Produced virus was used for target cells infection.

Results: For integrity of subcloning, enzymatic tests and PCR were used.

Fluorescent microscopy also used to show expression of Jred reporter gene that showed the success of our gene transferring .Then RT-PCR was done for showing overexpression of DJ1 gene in transduced cells compare with normal cells.

Conclusion: This study show the lentiviral vectors success in gene transferring to eukaryotic cells and clear that this vectors can be used in treatment of nervous system diseases.

Keywords: Cloning, DJ1, lentivirus