مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰

بررسی میزان انتقال پذیری و سمیت شکل‌های مختلف پلاسمید در سلول HEK293 به‌عنوان میزبان

محمد هاشم‌آبادی Ph.D.[۱]، حسینعلی ساسان Ph.D.[۲*]، مژده امانداری Ph.D.[۳]، مهیار انصاری Ph.D.[۲]، آزاده ثمرغلامی Ph.D[۴]

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۲- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کرمان، ایران
۳- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی، تهران، ایران
۴- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، اهواز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hsasa@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

چکیده

هدف: در پژوهش حاضر، تاثیر شکل‌های ساختاری مختلف پلاسمید برکارایی انتقال به‌درون میزبان مورد بررسی قرار گرفت و میزان سمیت حاصل از شکل‌های مختلف پلاسمید برسلول‌های میزبان بررسی شد.

مواد و روش‌ها: فرم‌های سوپرکویل، حلقوی، نیمه‌برش خورده و خطی پلاسمید از ژل آگارز تفکیک شد. این ساختارها به‌سلول‌های HEK293 انتقال داده شد و کارایی انتقال و سمیت حاصل از هر یک از این اشکال با استفاده از تکنیک MTT مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان ورود شکل سوپرکویل پلاسمید pcDNA3.1+ به‌درون میزبان، بسیار بیش‌تر از بقیه اشکال است و میزان سمیت پلاسمیدها برای میزبان در حالت خطی بسیار بیش‌تر از سایر اشکال است. بنابراین نتایج نشان‌دهنده مناسب بودن فرم سوپرکویل برای افزایش کارایی انتقال و کاهش مرگ سلولی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: محققان می‌توانند با استفاده از فرم سوپرکویل پلاسمید در فرایندهای انتقال ژن کارایی این فرایند را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهند.

واژگان کلیدی: انتقال ژن، سمیت سلولی، حامل‌های انتقال ژن، فرم سوپرکویل پلاسمید، سلول HEK293

مقدمه

پلاسمیدها حامل‌های بسیار مهمی برای تبادل اطلاعات ژنتیکی بین باکتری‌ها هستند. طی دهه‌های اخیر تعداد زیادی از پلاسمیدها شناسایی و از میکروب‌های مختلفی مانند باکتری‌ها استخراج شده است (۱). پلاسمیدها دارای اشکال مختلف حلقوی، سوپرکویل، نیمه برش خورده و خطی هستند. علاوه بر این، در برخی موارد پلاسمیدها می‌توانند به‌شکل مونومرهایی ازجمله کانکاتمر و کاتنان باشند. برای مشاهده و تفکیک فرم‌های مختلف پلاسمید می‌توان از ژل الکتروفورز استفاده نمود (۲). به‌دلیل ویژگی‌های خاص پلاسمیدها، ازجمله تعداد بالای نسخه‌های رونوشت و پایداری ساختاری، بسیاری از دانشمندان از آن‌ها به‌منظور بیان و درنهایت تولید محصولات نوترکیب در تحقیقات خود استفاده می‌کنند (۳)، به‌طوری‌که قرار دادن ژن‌های خارجی در پلاسمیدها و انتقال آن‌ها به‌سلول‌های مختلف، یک تکنیک مهم برای دست‌کاری بیان ژن‌ها محسوب می‌شود. هم‌چنین این روش می‌تواند دریچه‌ای برای درمان بیماری‌های ژنتیکی باشد. به‌عنوان مثال، از روش ژن درمانی در بیماری‌هایی ازقبیل سرطان، هموفیلی، سیستیک فیبروزیس و بسیاری از بیماری‌های دیگر استفاده شده است. لازم به‌ذکر است که برای انجام یک ژن درمانی موفق، نیاز است که ژن مورد نظر توسط پلاسمید به‌درون سلول میزبان طی فرایند ترانس‌فکشن، منتقل شود (۴). برای استفاده از ویژگی‌های پلاسمیدها، روش انتقال آن‌ها یک فاکتور بسیار مهم محسوب می‌شود که شیوه‌های مختلفی ازجمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای انتقال این سازه‌ها به‌درون میزبان وجود دارد (۴). روش‌های انتقال باواسطه‌ی ترکیبات شیمیایی یکی از متداول‌ترین روش‌ها به‌منظور بیان ژن در سلول‌های پستانداران می‌باشد. این روش برپایه‌ی واکنش یونی بین مولکول‌های حامل بار مثبت و اسیدنوکلوئیک دارای بار منفی است. در میان حامل‌های شیمیایی، لیپیدهای کاتیونی (۵) به‌دلیل تولید آسان، قیمت پایین و کارایی انتقال بالا بیش‌ترین میزان استفاده را دارند. علاوه‌بر لیپیدهای کاتیونی، در سال‌های اخیر بسیاری از ترکیبات شیمیایی ازجمله پلی‌مرهای کاتیونیک (۶)، کلسیم فسفات و نانوحامل‌های کاتیونی شامل دندریمرها (۷)، نانوذرات مغناطیسی (۸)، نانوذرات هوشمند (۹، ۱۰) و نانوسیستم‌های هوشمند چندکاربردی (۱۱) به‌منظور انتقال ژن به‌میزبان استفاده شده است. استفاده از کلسیم فسفات با وجود کارآمدی پایین انتقال ژن، حدود چهل سال است که به‌طور گسترده برای این فرایند در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، اما به‌کارگیری ترکیبات لیپیدی هم‌چون لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ دارای کارایی بالایی در فرایند انتقال هستند و به‌راحتی قابل استفاده در بسیاری از میزبان‌های مختلف می‌باشند (۵). روش‌های فیزیکی مثل الکتروپوریشن و نوکلئوفکشن برمشکل کارآمدی پایین فرایند انتقال توسط برخی ترکیبات شیمیایی غلبه کرده است اما میزان مرگ‌ومیر سلول‌های میزبان را در طول فرایند انتقال افزایش می‌دهد. بنابراین محققان ارائه راه حلی جهت کاهش مرگ سلول‌های میزبان را در این زمینه ضروری می‌دانند.

عامل بسیار مهم دیگری که به‌شدت مورد توجه شرکت‌های سازنده‌ی سازه‌های انتقال دهنده ژن قرار گرفته است، میزان سمیت این ترکیبات برای سلول‌های میزبان است (۱۲). درمطالعه‌ای برروی میزان سمیت ترکیبات کمک‌کننده‌ی انتقال ژن‌ها، ثابت شد که بسیاری از این ترکیبات همانند لیپوزوم‌های کاتیونی توانایی بالایی در کشندگی سلول‌ها دارند، بنابراین باید وضعیت مناسبی را برای انتقال پلاسمید و ایجاد تعادل بین سمیت لیپیدی و کارآمدی فرآیند انتقال فراهم کرد (۱۳). البته، لازم به‌ذکر است که نانولیپوزوم‌های زوئیترونیک به‌نظر می‌رسد برای انتقال DNA در شرایط in vitro و in vivo خصوصا باتوجه به‌مشخصات ایمنی و اثربخشی برتر آن‌ها مفید باشند (۱۴). عوامل غیرلیپوزومی برخلاف ترکیبات لیپوزومی اجازه می‌دهند که فرآیند انتقال، درحضور سرم محیط کشت، به‌طور پایدار انجام شود. بنابراین باعث کاهش سمیت و افزایش انتقال می‌شود (۱۵). یکی از این فاکتورهای غیرلیپوزومی، توربوفکت است که یک پلی‌مر کاتیونی است. مکانیسم عمل‌کرد آن به‌این

شکل است که DNA را به‌سمت نانوذره دارای بار مثبت متراکم کرده و این کمپلکس به‌سطح گیرنده میزبان که دارای بار منفی است متصل می‌شود و پس از ادغام با اندوزوم از تاثیر pH لیزوزومال روی DNA ممانعت می‌کند (۱۶و۱۷).

علاوه بر نقش حدواسط‌های ذکر شده در فرایند انتقال، غالب بودن یک شکل ساختاری در پلاسمیدها و هم‌چنین اندازه‌ی آن‌ها نیز می‌تواند در فرایند انتقال تاثیر داشته باشد (۶). بنابراین، اگر کارایی انتقال در یک شکل خاص از پلاسمید بالا باشد، با جداسازی آن می‌توان کارایی فرایند انتقال را بدون استفاده از ترکیبات بسیار گران حدواسط افزایش داد. هم‌چنین مطالعات قبل سمیت DNA و پلاسمیدها طی فرایند انتقال را ثابت کرده است (۱۸). بنابراین، یک عامل بسیار ضروری در بهبود روش‌های متعدد انتقال‌دهنده ژن، توانایی سازگار ساختن این ترکیبات وراثتی با سلول‌های میزبان است. باتوجه اهمیت بالای میزان انتقال ژن و پایین بودن روند مرگ‌ومیر سلول طی تیمار با پلاسمیدها برای اهداف بیان ژن، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی میزان کشندگی و انتقال‌پذیری شکل‌های مختلف پلاسمید در رده‌ی سلولی HEK293 با استفاده از ماده‌ی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ انجام شد (شکل ۱).

مواد و روش‌ها

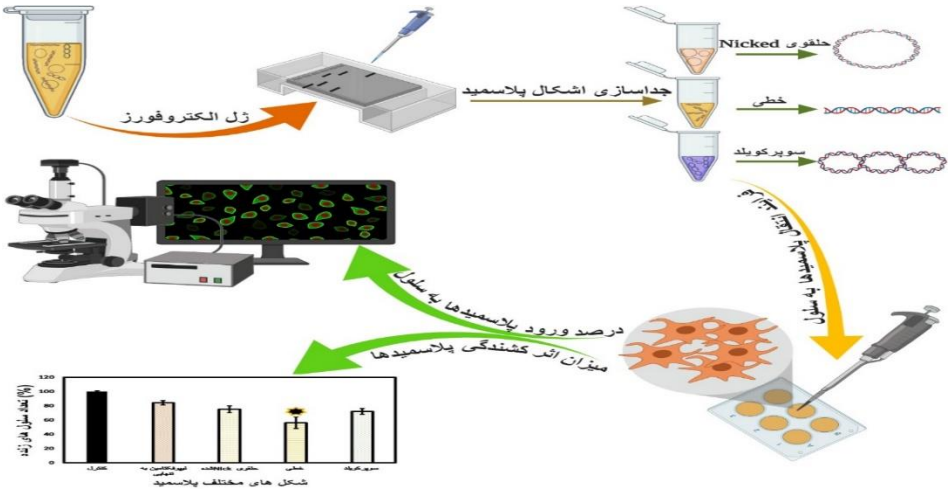
الکتروفورز به‌منظور تفکیک اشکال مختلف پلاسمید: در این مطالعه از پلاسمید pcDNA3.1+ (اهدایی دکتر کریم رحیمی-دانشگاه Aarhus-دانمارک) که حاوی ژن گزارش‌گر GFP بود استفاده شد. پلاسمید pcDNA3.1+ در باکتری *E.coli DH5α* ترانسفورم و باکتری‌ها در محیط Luria Bertani حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد داده شدند. پس از سانتریفیوژ و جداسازی رسوب باکتری، پلاسمید با استفاده از لیز قلیایی و سانتریفوژ گرادیان شیب غلظت CsCl-EtBr استخراج و خالص شد. خلوص آماده‌سازی پلاسمید بااستفاده از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری تعیین شد (۱۴). پس از آن، ۳۰ میکرو لیتر از آن‌ها با غلظت ۱ میکروگرم در میکرو لیتر در ژل آگاروز یک درصد لود و به‌مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۹۰ به‌منظور تفکیک اشکال مختلف پلاسمید، الکتروفورز انجام شد.

استخراج از ژل و تایید ثابت ماندن شکل‌های مختلف وکتور: پس از مشاهده‌ی اشکال مختلف پلاسمید برروی ژل آگاروز، باندهای ایجاد شده که نشان دهنده‌ی شکل‌های مختلف پلاسمید هستند از روی ژل بریده شد. به‌منظور ثابت ماندن اشکال مختلف پلاسمید و حفظ شرایط دمایی و pH از روش دستی جهت استخراج از ژل استفاده شد (۱۹). در این روش از یک میکروتیوب که کف آن سوراخ شده است و در انتهای آن یک لایه نازک از پنبه قرار داده شده است استفاده می‌شود. قطعه ژل حاوی DNA پلاسمید مورد نظر در میکروتیوب قرار داده شد. پس از قرار دادن این میکروتیوب در یک میکروتیوب دیگر سانتریفیوژ با دور rpm ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلولی که در ته میکروتیوب جمع شده است حاوی DNA پلاسمید مورد نظر می‌باشد. نکته بسیار مهم در ثابت ماندن اشکال مختلف پلاسمید، حفظ شرایط دمایی و pH محیط است که به‌منظور اطمینان از ثابت بودن اشکال مختلف پلاسمیدها طی شرایط آزمایشگاه، مجددا مقدار ۷۰۰ میکروگرم در میکرولیتر از هر یک از اشکال پلاسمیدی استخراج شده از ژل در کنار نمونه پلاسمید اصلی برروی ژل آگاروز لود شد و مجددا الکتروفورز انجام گرفت.

کشت سلول: از سلولHEK293 به‌عنوان میزبان انتقال پلاسمید استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Lonza Biowhittake) با میزان ۵ درصد FBS (Invitrogen) به‌همراه ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پن استرپ (Corning Cellgro) کشت داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از تکثیر سلول‌ها، تعداد۲۰۰۰۰ سلول به‌هریک از خانه‌های پلیت ۶ خانه منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

فرایند انتقال: به‌منظور انتقال سازه‌ها ، مقدار یک میکروگرم از هر یک از اشکال پلاسمید شامل سوپرکویلد، خطی و حلقوی با یک رشته برش خورده (Nicked plasmid) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حل شد. به‌طور هم‌زمان مقدار سه میکرولیتر از ترکیب لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Thermo Scientific) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم در میکروتیوب جداگانه مخلوط و پس از طی زمان ۵ دقیقه، محتوای این دو میکروتیوب مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه بدون حرکت قرار داده شد تا کمپلکس پلاسمید با لیپوفکتامین ایجاد شد. پس از آن کمپلکس ایجاد شده از هریک از شکل‌های پلاسمید با لیپوفکتامین به‌داخل خانه‌های پلیت انتقال داده شد. پلیت محتوی سلول‌های تیمار شده با کمپلکس‌های ایجاد شده به‌مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. به‌منظور بررسی سمیت حاصل از لیپوفکتامین، سلول‌های یکی از خانه‌های پلیت به‌تنهایی طبق مراحل بالا بدون استفاده از هیچ‌گونه پلاسمیدی تیمار می‌شود.

میکروسکوپ فلورسانس و انجام آزمایش کشندگی سلول: پس از طی مدت زمان ۴۸ ساعت، کارایی انتقال با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Invert fluorescent Ceti, Korea) با تنظیم در محدوده‌ی دیداری نورسبز در طول موج ۵۲۰ نانومتر بررسی شد. علاوه‌براین، از تکنیک MTT جهت بررسی میزان سمیت سلولی استفاده شد. پس از مشاهده‌ی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس، مقدار۵۰۰ میکرولیتر از ماده‌ی MTT (Invitrogen) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌هریک از خانه‌ها اضافه و به‌مدت دو ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس مایع روی سلول‌ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به‌هر خانه اضافه شد. به‌منظور حل شدن کریستال فورامازان، پلیت در شیکر قرار داده شد و نهایتا جذب در ناحیه طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.



شکل ۱: چکیده گرافیکی از مطالعه حاضر

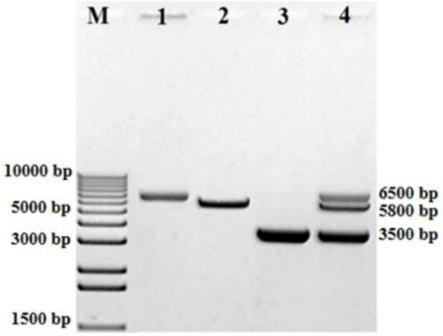
آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد و تمام داده‌ها بر اساس p-value کمتر از ۰/۰۵ محاسبه شدند.

نتایج

تایید ثابت ماندن شکل‌های مختلف وکتور

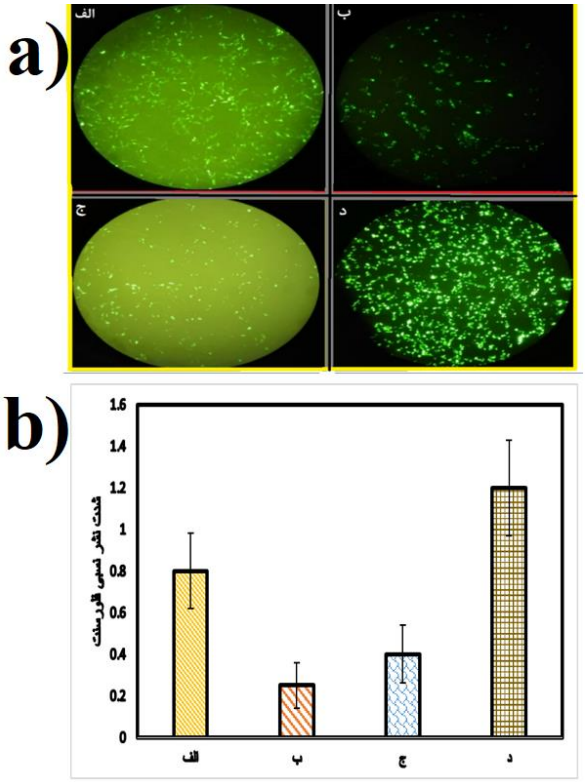
به‌منظور تفکیک اشکال مختلف پلاسمید، الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد انجام شد و هریک از این اشکال پلاسمید که به‌صورت باندهایی با تفاوت اندازه دیده می‌شوند، از ژل جدا و تخلیص شدند. در نهایت محصولات تخلیص شده با تاکید بر حفظ شرایط محیطی قبل، مجددا بر روی ژل آگاروز لود شدند که نتایج حاصل از ژل آگاروز زیر نورUV نشان دهنده‌ی ثابت ماندن اشکال مختلف پلاسمید می‌باشد (شکل ۲).



شکل۲: اشکال مختلف پلاسمید بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، چاهک M: لدر ، ۱: شکل nicked پلاسمید، ۲: شکل خطی، ۳: فرم سوپرکویلد، ۴: پلاسمید طبیعی که دارای هر سه فرم ساختاری می‌باشد.

کارایی فرایند انتقال با اشکال ساختاری مختلف وکتور

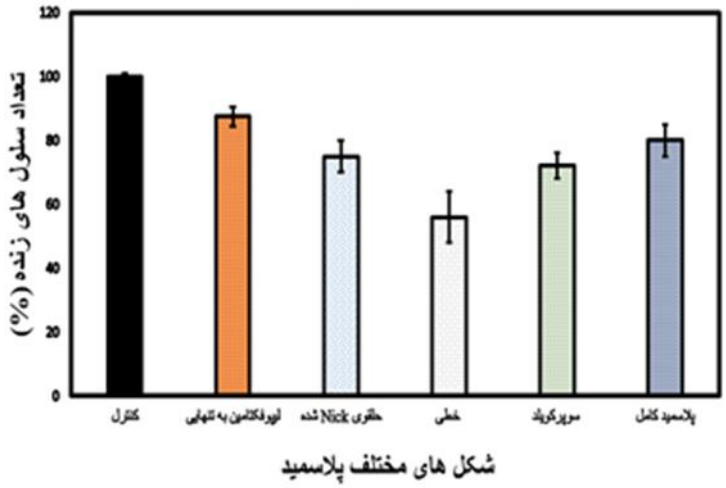
نتایج حاصل از نشر نور به‌وسیله پروتئین GFP زیر میکروسکوپ فلورسنت، میزان بالای بیان پروتئین GFP را به‌وسیله شکل سوپرکویلد پلاسمید نسبت به‌بقیه شکل‌های پلاسمید نشان داد. این نتایج نشان‌دهنده‌ی میزان بالای انتقال و بیان شکل سوپرکویلد پلاسمید نسبت به‌بقیه‌ی اشکال آن می‌باشد (شکل ۳).



شکل۳: a) مشاهده ی خاصیت فلورسنتی پروتئین GFP توسط میکروسکوپ فلورسانس با بزرگ‌نمایی۴۰۰ که نشان دهنده ی میزان انتقال و بیان اشکال مختلف پلاسمید است. الف: پلاسمید کامل، ب: شکل خطی پلاسمید، ج: شکل nicked پلاسمید، د: شکل سوپرکویلد پلاسمید. b) شدت نشر فلورسانس مربوط به‌هر چاهک.

میزان سمیت شکل‌های مختلف پلاسمید برای سلول میزبان

برای تعیین میزان کشندگی سلول‌ها از تست MTT استفاده شد و جذب حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصل از این آزمایش به‌طور معنی‌داری نشان‌دهنده میزان سمیت بالای فرم خطی پلاسمید نسبت به‌بقیه اشکال پلاسمید بود، که این ساختار پلاسمید، میزان زنده‌مانی سلول‌های میزبان را به‌میزان ۵۶ درصد کاهش داد. تعداد سلول‌های زنده حاصل از تیمار به‌وسیله اشکال سوپرکویلد و حلقوی دارای Nick تفاوت معنی‌داری با سلول‌های که به‌تنهایی توسط لیپوفکتامین تیمار شده بودند، نداشت (شکل ۴).



شکل۴: میزان کشندگی اشکال مختلف پلاسمید طی گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت.

بحث

انتقال DNA یک ابزار مهم در زیست‌شناسی مولکولی است که در مطالعات ژن‌درمانی نیز کاربرد دارد. در این زمینه، شرکت‌های بزرگ دنیا برای بالاتر بردن کارایی انتقال، حدواسط‌های کاتیونی و لیپیدی که تاحد زیادی با میزبان و سلول‌ها سازگار باشند را تولید کرده‌اند. این مواد محدودیت‌هایی ازجمله یکسان نبودن احتمال انتقال در سلول‌های مختلف و سمیت برای سلول‌ها را دارند. تاکنون هیچ ماده تجاری غیرسمی برای انتقال DNA تولید نشده است. کارایی انتقال به‌عواملی مثل انتخاب روش انتقال، سلامت و زنده بودن رده‌ی سلولی و کیفیت و کمیت نوکلئیک اسیدهای مورد استفاده بستگی دارد (۲۰). هرچه کارایی انتقال بالاتر باشد، شرایط تولید دارو و پروتئین‌های نوترکیب و هم‌چنین مطالعات عملی یک فاکتور در سلول را می‌توان بادقت بیش‌تری مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه اهمیت اشکال مختلف پلاسمیدها در فرایند انتقال مورد بررسی قرار گرفت، که مشاهده شد میزان بیان و کارایی انتقال پلاسمیدها در شکل سوپرکویل از شکل‌های دیگر پلاسمید بالاتر بود که این شواهد با اطلاعات مطالعات قبل در توافق می‌باشد. به‌عنوان مثال، *Chreng* و همکاران (۲۱) تاثیر توپولوژی DNA پلاسمید را برروی ویژگی‌های اتصالی آن به‌کاتیون poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate در دو رده سلولی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که فرایند انتقال‌پذیری وابسته به‌توپولوژی DNA پلاسمیدها می‌باشد، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان انتقال‌پذیری مربوط به شکل سوپرکویل و کم‌ترین میزان انتقال‌پذیری مربوط به‌شکل خطی می‌باشد. علاوه‌براین، *Lehner* و همکاران (۲۲) با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و PEI (polyethylenimine) انتقال‌پذیری DNA پلاسمید حلقوی و خطی شده را در سلوهای یوکاریوتی مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها نیز

انتقال‌پذیری بهتر شکل حلقوی پلاسمید نسبت به فرم خطی آن را در حضور لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و PEI نشان داد. باتوجه به‌اهمیت میزان کشندگی پلاسمیدها برروی سلول میزبان، میزان سمیت شکل‌های مختلف پلاسمید برروی رده‌ی سلولی HEK293 بااستفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت و میزان جذب در ناحیه ۵۴۰ نانومتر خوانده شد، که نتایج حاصل با p-Value کم‌تر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده‌ی کشنده‌تر بودن فرم خطی پلاسمید نسبت به‌بقیه فرم‌های آن بود. این نتایج نیز با مطالعات قبلی گروه‌های *Chreng* و *Lehner* که سمیت بالاتر فرم خطی نسبت به فرم حلقوی را نشان داده اند نیز هم‌راستا می‌باشد (۲۱، ۲۲). مطالعات گذشته محدود به‌بررسی انتقال‌پذیری فرم‌های خطی و حلقوی پلاسمید و میزان سمیت همین دو فرم در رده‌های سلولی بوده‌اند. در مطالعه حاضر برای اولین‌بار نشان داده شد که استفاده از فرم سوپرکویل پلاسمید در فرایندهای انتقال ژن کارایی این فرایند را به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌دهد به‌طوری‌که نتیجه تست MTT مشخص کرد که تعداد سلول‌های زنده حاصل از تیمار به‌وسیله اشکال سوپرکویل و حلقوی دارای Nick تفاوت معنی‌داری با سلول‌های که به‌تنهایی توسط لیپوفکتامین تیمار شده بودند، نداشت. براساس نتایج حاصل از تست MTT در این پژوهش می‌توان بیان کرد که هر چه ساختار وکتور فشرده‌تر باشد، میزان سمیت در سلول میزبان پایین‌تراست.

نتیجه‌گیری

اهمیت انتقال مواد ژنتیکی به‌سلول با کارایی بالا و پایین بودن احتمال سمیت سلولی جهت تولید پروتئین‌ها و داروهای نوترکیب انگیزه‌ای برای انجام مطالعه حاضر بود. مطالعه حاضر نشان داد که میزان ورود شکل سوپرکویلد پلاسمید به‌درون میزبان، بسیار بیش‌تر از بقیه‌ی اشکال پلاسمید است. از طرفی میزان کشندگی پلاسمیدها برای میزبان در حالت خطی بسیار بیش‌تر از مابقی اشکال پلاسمید است. این دو فاکتور بیان‌گر مناسب بودن فرم سوپرکویلد برای افزایش کارایی و کاهش مرگ سلول‌ها می‌باشد. بنابراین محققان می‌توانند با استفاده از این فرم پلاسمیدی در فرایندهای انتقال ژن کارایی این فرایند را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهند.

منابع

1. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Frontiers in Microbiology. 2015; 6(242):1-16.
2. Schmidt T, Friehs K, Schleef M, Voss C, et al. Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. Analytical Biochemistry. 1999; 274(2): 235-240.
3. Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. In New Trends and Developments in Biochemical Engineering. 2004; 86: 47-82.
4. Mortazavi SM, Mohammadabadi MR, Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. Journal of biotechnology. 2007; 129(4): 604-13.
5. Ramesh R, Saeki T, Templeton NS, Ji L, et al. Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. Molecular Therapy. 2001; 3(3): 337-350.
6. Kuo CN, Yang LC, Wu PC, Kuo HK, et al. Dehydrated form of plasmid expressing basic fibroblast growth factor–polyethylenimine complex is a novel and accurate method for gene transfer to the cornea. Current Eye Research. 2005; 30(11): 1015-1024.
7. Qin L, Pahud DR, Ding Y, Bielinska AU, et al. Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst polyamidoamine dendrimers. Human Gene Therapy. 1998; 9: 553-560.
8. Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. Gene Therapy. 2006; 13(4): 283-287.

9. Lehner R, Wang X, Marsch S, Hunziker P. Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013; 9(6): 742-757.
10. Lehner R, Wang X, Wolf M, Hunziker P. Designing switchable nanosystems for medical application. Journal of Controlled Release. 2012; 161(2): 307-316.
11. Ben-Haim N, Broz P, Marsch S, Meier W, et al. Cell-specific integration of artificial organelles based on functionalized polymer vesicles. Nano Letters. 2008; 8(5): 1368-1373.
12. Schreier H, Gagné L, Bock T, Erdos GW, et al. Physicochemical properties and in vitro toxicity of cationic liposome cDNA complexes. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 1997; 72(4): 215-23.
13. Romøren K, Thu BJ, Bols NC, Evensen Ø. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2004; 1663(1-2): 127-134.
14. Mohammadabadi MR, El-Tamimy M, Gianello R, Mozafari MR. Supramolecular assemblies of zwitterionic nanoliposome-polynucleotide complexes as gene transfer vectors: Nanolipoplex formulation and in vitro characterisation. Journal of liposome research. 2009; 19(2):105-15.
15. Gharaati-Far N, Tohidkia MR, Dehnad A, Omidi Y. Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells. Artificial Cells Nanomedicine, and Biotechnology. 2018; 46(5): 1001-1008.
16. Cordeiro RA, Santo D, Farinha D, Serra A, et al. High transfection efficiency promoted by tailor-made cationic tri-block copolymer-based nanoparticles. Acta Biomaterialia. 2017; 47: 113-123.
17. Guo P, Yu C, Wang Q, Zhang R, et al. Liposome lipid-based formulation has the least influence on rAAV transduction compared to other transfection agents. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development. 2018; 9: 367-375.
18. Lesueur LL, Mir LM, André FM. Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells in vitro. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2016; 5(3): e291.
19. Sun Y, Sriramajayam K, Luo D, Liao DJ. A quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. Journal of Cancer. 2012; 3: 93-95.
20. Homann S, Hofmann C, Gorin AM, Nguyen HCX, et al. A novel rapid and reproducible flow cytometric method for optimization of transfection efficiency in cells. PloS One. 2017; 12(9): e0182941.
21. Cherng JY, Schuurmans-Nieuwenbroek NME, Jiskoot W, Talsma H, et al. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate)–plasmid complexes. Journal of Controlled Release. 1999; 60(2-3): 343-353.
22. Lehner R, Wang X, Hunziker P. Plasmid linearization changes shape and efficiency of transfection complexes. European Journal of Nanomedicine. 2013; 5(4): 205-212.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2021; 12(2)

Original Article

Investigating the transferability and toxicity of various forms of the plasmid in HEK293 cells as hosts

Hashem Abadi M[1] Ph.D., Sasan HA[2*] Ph.D., Amandadi M[3] Ph.D., Ansari M[2] Ph.D., Samareh-Gholami A[4] Ph.D.

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
4. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* Email corresponding author: hsasa@uk.ac.ir

Received: 1 Dec.2020 Accepted: 11 Jul. 2021

Abstract

Aim: In the present study, the effect of different structural forms of plasmids on the efficiency of their transfer into the host was investigated. The toxicity effects of various forms of plasmids on host cells were also investigated.

Material and Methods: Supercoiled, circular, nicked, and linear plasmid forms were separated from agarose gel. These structural forms were transfected to HEK293 cells and the transfection efficiency and toxicity of each of these forms was evaluated using the MTT technique.

Results: The results showed that transferring the supercoiled form of pcDNA3.1+ plasmid into the host is much higher than other forms. Moreover, the toxicity effects of the linear form on the host are much higher than in other forms. Therefore, the results indicate that the supercoiled form of the plasmid is suitable for increasing the transfect efficiency and reducing cell death.

Conclusion: Researchers can use the supercoiled plasmid form in gene transfer processes to dramatically increase the efficiency of this process.

Keywords: Gene transfection, Cytotoxicity, Gene transfection carriers, Supercoiled plasmid form, HEK293 cell