

طراحی نانوحامل‌ژنی فاژی و ارزیابی توانایی آن در انتقال و بیان ژن در رده سلولی انسانی

محمد خلیج‌کندری، مجید صادقی‌زاده* و مهرداد بهمنش

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۳

چکیده

وجود یک سری مزایای کلیدی در باکتروفاژ لامبدا باعث شده است که این فاژ به عنوان یک حامل ژنی ایده‌آل به سلولهای یوکاریوتی مطرح شود. این مزیتها هم در ساختار و هم در بیولوژی آن نهفته است از جمله اینکه مطالعات اخیر داشتن اجداد مشترک با ویروسهای یوکاریوتی DNA دار را نشان داده‌اند. با توجه به این واقعیات و نیز دورشته‌ای بودن ژنوم آن، فاژ لامبدا می‌تواند مزیت بزرگی در انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی داشته باشد. لذا با وارد کردن توالی یک ژن گزارشگر (GFP)، فاژ لامبدا نوترکیبی طراحی و برای انتقال ژن به سلولهای رده AGS مورد استفاده قرار گرفت. بیان ژن GFP در پی انتقال با ذرات λ-GFP و همین‌طور کارآیی ورود این ذرات به سلولهای رده AGS ارزیابی شد.

واژه‌های کلیدی: باکتروفاژ لامبدا، λ-GFP، انتقال ژن با واسطه فاژ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۰۹، پست الکترونیکی: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

هستند. پوشش پروتئینی آنها از تخریب ژن مورد انتقال در لحظه ورود به سلولهای هدف ممانعت می‌کند. این ویژگی در سامانه‌های غیر ویروسی کم‌رنگ می‌باشد و به همین علت DNA مورد انتقال آنها در معرض تخریب توسط آنزیمهای برشگر قرار می‌گیرد (۱۵، ۱۶). از مزایای دیگر فاژها می‌توان به مواردی از قبیل ارزانی تولید در حجم بالا، پایداری فیزیکی در محیطهای نامساعد، قابلیت تحمل و حمل توالیهای بزرگ، امکان هدف‌گیری با استفاده از فناوری فاژنمایی (phage display) (۱۶) و نیز روشهای اتصال شیمیایی (۱۲)، عدم ورود به ژنوم سلولهای میزبان و در نتیجه عدم خطر از کاراندازی ژنهای دیگر (۱۵) اشاره کرد.

به طور کلی ویروسها سامانه‌های زیستی پیچیده‌ای هستند که در آنها ژنوم درون یک ساختار نانو مقیاس (میانگین ۱۰-۵۰۰ نانومتر) به نام کپسید قرار گرفته‌اند (۳) و (۱۱). فاژها ویروسهایی هستند که منحصراً باکتریها را آلوده

حاملینی که در حال حاضر برای ژن‌درمانی به کار می‌روند در دو گروه اصلی حاملین ویروسی و حاملین غیر ویروسی قرار می‌گیرند. به طور کلی حاملین ویروسی کارآیی انتقال و بیان بالا حتی تا ۱۰۰ درصد را دارند با این حال آنها نه تنها کاملاً بی‌خطر و ایمن نیستند، بلکه تولید انبوه آنها هزینه بالایی می‌طلبد (۱۵). این عوامل باعث شده است علی‌رغم قابلیت‌های خوب آنها در انتقال و بیان ترانس‌ژن، جستجو برای یافتن حاملین ژنی مناسب بیش از پیش ادامه یابد. از طرف دیگر حاملین غیر ویروسی نسبتاً بی‌خطر و ارزان می‌باشند، با این حال کارآیی ورود و انتقال آنها به سلولهای هدف بسیار پایین است. (۲، ۶، ۱۷ و ۱۸) فاژها مزایای زیادی دارند که باعث شده است به عنوان حاملین ژنی به سلولهای پستانداران مطرح و به عنوان جایگزینی برای حاملین ویروسی و حاملین غیر ویروسی در نظر گرفته شوند. به طور کلی این ذرات گرایشی برای ورود به سلولهای یوکاریوتی ندارند و لذا تا حد زیادی بی‌خطر

هدفمند به دست آورد. برای مثال هم‌اکنون اتصال مولکول هدف‌گیری ترانسفرین به سطح این نانوزیست ذرات و استفاده از آنها برای بررسی کارایی انتقال ژن GFP به سلولهای پستانداران تحت بررسی است. در این نوشتار طراحی و ساخت نانوحامل ژنی فاژی (λ -GFP) و کارایی آن در انتقال و بیان ژن GFP و نیز ورود این نانوحامل به سلولهای رده AGS انسانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روشها

مواد: در این پژوهش از ناقل لامبدا ZAP-CMV شرکت استراتاژن (Stratagene, USA) برای ساخت سازه نوترکیب استفاده شد. این ناقل حاوی توالی فاژمیدی pCMV-Script EX می‌باشد که با دارا بودن توالی آغازگر رونویسی ویروس سیتومگال (CMV) امکان رونویسی و بیان ژن کلون شده را در سلولهای پستانداران مهیا می‌کند. همچنین برای تکثیر ذرات فاژی نوترکیب از باکتری *XLI-Blue MRF'* استفاده شد. این سویه RecA^- و حاوی اپی‌زوم F['] است که تولید پیلای را رمزدهی می‌کند. با توجه به اینکه ناقل فاژمیدی pCMV-Script EX به ژنوتیپ *supF* نیازی ندارد، لذا با کارایی بالایی در سویه *XLI-Blue MRF'* تکثیر می‌یابد. پلاسمید pEGFP-N1 محصول شرکت Clontech آمریکا به عنوان الگو در واکنش PCR برای تکثیر توالی ژن GFP استفاده شد. آنزیمهای برشگر *XhoI* و *EcoRI* از شرکت Fermentas لیتوانی تهیه شدند. بقیه مواد همراه با شرکت سازنده آنها در قسمت روشها و در مرحله مورد استفاده در این پژوهش ذکر شده‌اند.

طراحی و ساخت سازه λ -GFP: برای رسیدن به سازه λ -GFP از ناقل فاژی لامبدای ZAP-CMV محصول شرکت استراتاژن استفاده شد. بدین منظور توالی ژن EGFP با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی با توالی رفت؛ 5'-GTAGAATTCGCCACCATGGTGAGCA-3' و برگشت؛ GACCTCGAGTTACTTGTACAGTTCGTCCATG

می‌کنند. از جمله فازهایی که برای انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی به کار رفته‌اند می‌توان به *M13*، *T4*، *T7* و لامبدا اشاره کرد. بیشتر محققان *M13* را برای انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی مورد استفاده قرار داده‌اند در صورتی- که بعضی دیگر فاژ لامبدا را ترجیح می‌دهند (۲۰). فاژ لامبدا یک ذره با ساختار نانومقیاس با ژنومی حدود ۴۸ کیلوباز است. این فاژ یک کپسید بیست‌وجهی با قطر تقریبی ۵۵ نانومتر دارد که ژنوم را احاطه کرده- است (۲۰ و ۱۳). گزارش شده است که فاژ لامبدا مزایایی نسبت به *M13* دارد که می‌توان به مواردی از قبیل اندازه و ویژگیهای فیزیکی ژنوم و نیز اندازه و ابعاد خود ذرات فاژ لامبدا اشاره کرد. ذرات فاژ لامبدا ابعادی مشابه با ویروسهای یوکاریوتی دارند، به گونه‌ای که مطالعات ساختاری اخیر نشان داده‌اند باکتروفازهای دم‌دار و ویروسهای یوکاریوتی که ژنوم آنها DNA است دارای اجداد مشترک هستند (۱). این ویژگیها می‌تواند بیان ژن مورد انتقال را در مقایسه با *M13* که ژنومی کوچک و تک- رشته‌ای دارد و لازم است پس از ورود به سلولها به حالت دورشته‌ای تبدیل شود، تسهیل کنند. روی هم‌رفته، این اطلاعات بیانگر آن هستند که فاژ لامبدا می‌تواند یک حامل ژنی کارآ به سلولهای یوکاریوت در مقایسه با فاژ *M13* باشد (۲۰، ۲۱).

در مطالعه حاضر توالی رمزکننده پروتئین سبز فلورسانس (GFP) تحت کنترل آغازگر رونویسی ویروس سیتومگال (CMV) در ژنوم فاژ لامبدا به منظور دستیابی به سازه پایه‌ای از لامبدا که حاوی کاست بیانی GFP (λ -GFP) باشد، وارد شد. این سازه دارای قابلیت بیان GFP در سلولهای پستانداران می‌باشد و به عنوان چارچوب پایه- ای ارزشمندی است که می‌تواند با استفاده از اتصال مولکولهای هدف‌گیری مختلف با روشهای شیمیایی و فیزیکی موجود به سمت سلولهای مورد نظر هدف‌گیری و ارسال شود. می‌توان با اتصال لیگاندهای هدف‌گیری مختلف به سطح ذرات فاژی λ -GFP نانوحامل ژنی

۵۰۰ میکرولیتر بافر SM (5.8g NaCl, 2.0g MgSO₄ . 7H₂O, 50.0 ml of 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 5.0 ml of 2% (w/v) gelatin, dH₂O up to 1 lit تا واکنش متوقف شود. سپس ۲۰ میکرولیتر به آن کلروفرم اضافه و پس ورتکس آرام محتویات ویال در ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی ذرات فازی است که برای تعیین تیتراژ آماده هستند.

تکثیر و تیتراسیون ذرات فازی بسته‌بندی شده: رقت‌های ۱:۱۰ و ۱:۱ از محصول بسته‌بندی شده در بافر SM تهیه و با ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اشرشیاکلی سویه *XLI-Blue* با *MRF'* با OD₆₀₀ = 0.5 رقیق شد و در دو ویال جداگانه در محلول 10 mM MgSO₄ مخلوط شدند. مخلوط فاز-باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه بدون تکان انکوبه شد تا فازها به باکتریها متصل شوند. سپس محتویات آنها با ۳ ml آگار NZY رویی مذاب اما خنک شده تا دمای ۴۸ درجه مخلوط و بلافاصله روی پلیتهای NZY آگار از پیش گرم شده پخش گردید. پلیتهای پس از ۱۰ دقیقه به صورت وارونه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و تا ظاهر شدن پلاکها (۸-۱۲ ساعت) انکوبه شدند.

تایید وجود توالی GFP در سازه λ-GFP: برای تأیید کلون شدن GFP در ناقل لامبدا ZAP-CMV و دستیابی به سازه λ-GFP از روش Plaque-PCR استفاده شد. بدین منظور مخلوط PCR حاوی تمام اجزا به جز DNA الگو آماده و در حجم کل ۲۵ میکرولیتر در ویالهای PCR توزیع شد. در این واکنش به جای DNA الگو نوک تیپهای استریل آغشته به پلاکهای ظاهر شده در سطح پلیت با مخلوطهای PCR تماس و پینناژ شد تا ذرات فازی موجود در پلاک در مخلوط حل شود. تکثیر توالی GFP با استفاده از پرایمرهای GFP انجام شد. شرایط انجام PCR مشابه با شرایط قبل بود، به جز اینکه مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۷ دقیقه در ۹۴ درجه به منظور اطمینان از متلاشی شدن ذرات فازی انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱

C-3' که دارای جایگاههای شناسایی و برش با آنزیمهای *EcoRI* در پرایمر رفت و *XhoI* در پرایمر برگشت (توالی خط کشیده شده) می‌باشند و نیز پلاسمید pEGFP-N1 به عنوان الگو توسط PCR تکثیر شد. برای اجتناب از خطای احتمالی تکثیر، از پرایمر LA Taq شرکت تاکارا که دارای خاصیت تصحیح اشتباهات است استفاده شد. شرایط انجام PCR عبارت است از: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، تکرار ۳۰ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و بالاخره گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR پس از هضم با آنزیمهای *EcoRI* و *XhoI* به وسیله کیت استخراج از ژل Gene JET™ Gel Extraction kit شرکت Fermentas از ژل خالص‌سازی شدند. این قطعات سپس به محل مناسب خود در ناقل فاز لامبدا ZAP-CMV ساب‌کلون شدند.

اتصال قطعات حاصل از PCR با ناقل لامبدا ZAP-CMV: نسبت‌های مولی یکسان از قطعات حاصل از PCR و ناقل لامبدا ZAP-CMV با ۲ واحد آنزیم T4 DNA لیگاز ، 10 mM rATP و بافر در حجم نهایی ۵ میکرولیتر با هم مخلوط و به مدت ۱۶ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش اتصال در نهایت منجر به تشکیل سازه λ-GFP می‌گردد که در آن توالی GFP تحت کنترل آغازگر CMV قرار دارد و بنابراین قابلیت رونویسی و بیان در سلولهای پستانداران را خواهد داشت.

بسته‌بندی برون‌سلولی سازه λ-GFP: ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال که حاوی تقریباً یک میکروگرم سازه λ-GFP است به یک ویال حاوی عصاره بسته‌بندی (پروتئینهای بسته‌بندی کننده فاز لامبدا) اضافه و پس از مخلوط کردن آرام محتویات به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا سازه حاصل درون پروتئینهای پوشش فاز بسته‌بندی و ذرات فازی تشکیل شوند. پس از ۲ ساعت

درصد الکتروفورز و پس رنگ آمیزی با اتیدیم‌برومید باندهای حاصل مشاهده شدند.

قبل انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و آشکارسازی شدند.

نتایج

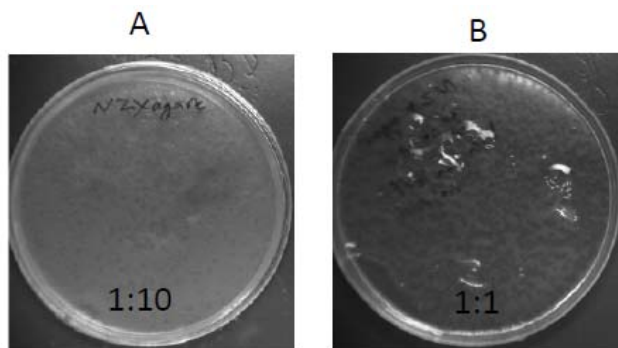
ساخت سازه λ -GFP : توالی ژن GFP با روش PCR تکثیر و پس از هضم و تخلیص تحت کنترل آغازگر رونویسی CMV در توالی ناقل لامبدای ZAP-CMV کلون شد. سازه به دست آمده برای تولید ذرات فاژی نو ترکیب λ -GFP به روش بسته‌بندی برون‌سلولی (*In vitro packaging*) بسته‌بندی شد. آلوده کردن سلولهای باکتری '*XLI-Blue MRF*' توسط محصول بسته‌بندی نشان داد که ذرات فاژی λ -GFP تولید شده است. تشکیل پلاکهای متعدد (شکل ۱) در سطح کشت چمنی باکتری '*XLI-Blue MRF*' نشان دهنده دستیابی به ذرات فاژی نو ترکیب است.

وجود توالی GFP در سازه λ -GFP و نانوحامل فاژی: وجود توالی GFP در سازه λ -GFP با روش Plaque-PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن GFP مورد بررسی قرار گرفت. محصولات حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. وجود باند ۷۰۰ جفت بازی نشان دهنده وجود توالی GFP در سازه می‌باشد (شکل ۲).

آلوده کردن سلولهای رده AGS انسانی با نانوحامل ژنی فاژی : سلولهای رده AGS انسانی پس از کشت در پلیتهای شش‌خانه توسط ذرات λ -GFP با ضریب عفونت 10^6 به مدت ۱۲ ساعت تیمار شدند. سلولها پس از تعویض محیط، ۳۶ ساعت دیگر نیز انکوبه و در نهایت با میکروسکوپ فلورسانس معکوس برای بررسی بیان GFP مشاهده شدند (شکل ۳). شمارش سلولهای بیان کننده GFP نشان داد که در حدود 0.02% از سلولها در اثر تیمار با ذرات فاژی GFP مثبت هستند. این آزمایش همچنین تأیید کرد که سازه حاصل فعال بوده و فرآیند ساخت سازه با موفقیت انجام شده است.

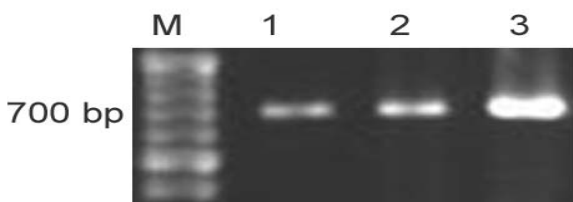
آلوده کردن سلولهای رده AGS انسانی با نانوحامل ژنی فاژی : سلولهای رده AGS به تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک پلیت شش‌خانه در محیط RPMI همراه با ۱۰ درصد سرم و $10 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و شرایط 5% CO_2 انکوبه شد. سلولها با ضریب عفونت یا MOI (MOI; Multiplicity of Infection) برابر با 10^6 از ذرات فاژی λ -GFP به مدت ۱۲ ساعت تیمار و پس از تعویض محیط با محیط تازه تا ۳۶ ساعت دیگر انکوبه شدند. به عنوان کنترل مثبت DNA استخراج و تخلیص شده از ذرات فاژی λ -GFP توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ شرکت Invitrogen به سلولهای AGS ترانسفکت شد. در نهایت سلولها برای مشاهده بیان GFP توسط میکروسکوپ معکوس فلورسانس بررسی شدند.

بررسی ورود نانوحامل ژنی فاژی به سلولهای AGS : سلولهای رده AGS به تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک پلیت شش‌خانه در محیط RPMI همراه با ۱۰ درصد سرم و $10 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و شرایط 5% CO_2 انکوبه شدند. ذرات فاژی λ -GFP در دو MOI 10^5 و 10^6 به چاهکها اضافه و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس محیط کشت تعویض و چاهکها با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند. ذرات فاژی چسبیده به سلولها توسط شستشو با بفر گلیسین (50 mM Glycine pH 2.8) توسط شستشو با بفر NaCl (500mM) آزاد و از محیط حذف شدند. سلولها پس از تیمار با تریپسین از چاهکها جمع آوری و DNA نام آنها توسط کیت Gene JET™ Genomic DNA Purification Kit ساخت شرکت Fermentas استخراج شد. DNA حاصل به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر و آشکارسازی توالی GFP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR مانند



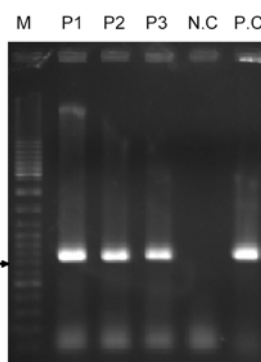
شکل ۱- تیتراسیون محصول بسته‌بندی. پلاک‌های ظاهر شده در کشت چمنی باکتری *XLI-Blue MRF'* در اثر آلوده سازی با رقت (A) ۱:۱۰ و (B) ۱:۱ از محصول بسته‌بندی

شده با ۵۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده از ذرات فاژی λ -GFP با کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (C) کنترل منفی

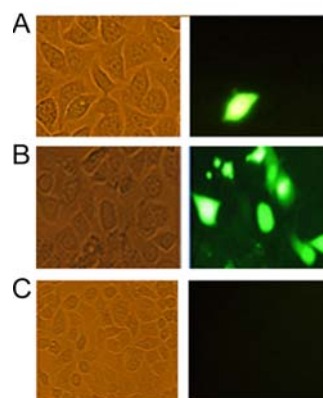


شکل ۲- بررسی ورود نانوحامل‌زنی فاژی به سلول‌های AGS. سلول‌های AGS پس از ۱۲ ساعت تیمار با ذرات فاژی λ -GFP در ضریب عفونت‌های 10^5 (ستون ۱) و 10^6 (ستون ۲) با PBS شستشو و ذرات فاژی چسبیده به سطح سلولها با بافر گلیسین جدا شده و حذف شدند. DNA تام از سلولها استخراج و به عنوان الگو در PCR جهت تکثیر توالی GFP با پرایمرهای اختصاصی به کار رفت. همچنین از ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده از ذرات فاژی به عنوان کنترل مثبت PCR و جهت مقایسه استفاده شد (ستون ۳).

ورود نانوحامل‌زنی فاژی به سلول‌های AGS : توانایی ورود ذرات نانوحامل فاژی به سلول‌های AGS با تیمار سلولها توسط دو MOI متفاوت از ذرات فاژی و متعاقب آن استخراج DNA از سلولهای تیمار شده و آشکارسازی وجود DNA ترانسژن در سلولها با استفاده از PCR بررسی شد. نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA استخراج شده از سلولهای تیمار شده با ذرات فاژی λ -GFP در شکل ۴ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که ورود ذرات فاژی به سلولها وابسته به دُز می‌باشد.



شکل ۳- انتقال ژن با نانوحامل‌زنی فاژی. سلول‌های رده AGS انسانی توسط نانوحامل فاژی با ضریب عفونت 10^6 تیمار شده و پس از ۴۸ ساعت سلولها به وسیله میکروسکوپ فلورسانس معکوس بررسی شدند. (A) سلولهای تیمار شده با نانوحامل فاژی (B) سلولهای آلوده



شکل ۴- نتایج PCR از سلول‌های تیمار شده با ذرات فاژی λ -GFP. نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA استخراج شده از سلولهای تیمار شده با ذرات فاژی λ -GFP در شکل ۴ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که ورود ذرات فاژی به سلولها وابسته به دُز می‌باشد.

بحث

نتیجه دلیل دیگری برای بی‌خطر بودن و عدم گرایش ذرات فاژی به ورود به سلولهای یوکاریوتی می‌باشد. با این حال این بررسیها نشان داد که سازه طراحی شده فعال می‌باشد و قابلیت انتقال و بیان ژن به سلولهای یوکاریوتی را دارد. این یافته‌ها با گزارشهای قبلی توسط گروههای مختلف مطابقت دارد. Poul و Marks (۱۶) در مطالعه خود علی-رغم استفاده از تعداد بسیار بالایی (4×10^{13} cfu/ml) از ذرات فاژی *M13* دارای توالی GFP با بررسی میکروسکوپی تعداد سلولهای بیان کننده GFP را به قدر کافی ندیدند، با این حال آنها تعداد سلولهای GFP مثبت را با بررسی FACS (Fluorescence activated cell sorting) حدود 0.04% گزارش کردند. آنها وقتی که از ذرات فاژی نمایش دهنده آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای anti-ErbB2 در سطح پروتئین PIII استفاده کردند کارآیی انتقال و بیان را حدود ۲ درصد گزارش کردند. مطالعات دیگر نشان دهنده کارآیی بسیار پایین انتقال و بیان ژن با فاژهای طبیعی بوده است، در صورتی که این گروهها با نمایش مولکولهای هدف‌گیری در سطح ذرات فاژی توانستند کارآیی انتقال و بیان ژن را به مقدار زیادی افزایش دهند (۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۲۰ و ۲۱).

بررسی ورود نانوحامل به سلولهای AGS با استفاده از MOI های مختلف نشان داد که ورود ذرات به سلولها وابسته به دُز می‌باشد (شکل ۴). مقایسه ساده باندهای حاصل از تکثیر ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده از ذرات فاژی که معادل با مقدار DNA موجود در 2×10^8 ذره از آن فاژ است (۱۶) با باندهای حاصل از DNA تام سلولهای تیمار شده با نانوحامل حاکی از ورود تعداد بالایی از ذرات به سلولها در مقایسه با تعداد سلولهای GFP مثبت مشاهده شده با بررسی میکروسکوپی است. با این حال باید توجه داشت که سلولهای GFP مثبت مشاهده شده با میکروسکوپ ناشی از تعداد اندک کپیه‌های ژنوم ترانس‌ژن است که توانسته‌اند از سدهای مختلف داخل سلول عبور و به هسته وارد شوند. انتقال و بیان ژن با واسطه فاژ می‌تواند

اخیراً باکتیوفاژها - به ویژه فاژ لامبدا - به علت مزایایی که دارند به عنوان حاملی بالقوه مناسب برای انتقال ژنها به سلولهای پستاندار مورد توجه قرار گرفته‌اند. استفاده از باکتیوفاژ نه تنها در مطالعات انتقال ژن با اهداف ژن-درمانی (۵، ۷، ۸ و ۱۵) بلکه با اهداف دیگری از قبیل واکسینه کردن (۴ و ۱۴) به صورت روزافزون در حال افزایش است. با توجه به این واقعیتها و برای دستیابی به یک حامل پایه‌ای مبتنی بر فاژ لامبدا که شایستگی لازم را برای مطالعات انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی را داشته باشد، ابتدا توالی ژن GFP در ناقلی از فاژ لامبدا به نام λ ZAP-CMV تحت کنترل آغازگر CMV وارد شد تا سازه λ -GFP به دست آید. بسته‌بندی برون‌سلولی سازه حاصل توسط عصاره بسته‌بندی منجر به تولید ذرات فاژی حاوی توالی ژن گزارشگر GFP شد. برای تأیید تولید ذرات فاژی λ -GFP سلولهای باکتری *XLI-Blue MRF'* توسط محصول بسته‌بندی آلوده شدند و تشکیل پلاکهای متعدد (شکل ۱) در سطح کشت چمنی باکتریایی، به وجود آمدن ذرات فاژی λ -GFP را نشان داد. همچنین برای تأیید حضور توالی GFP در ذرات فاژی حاصل تعدادی از پلاکهای فاژی ظاهر شده در سطح کشت چمنی به وسیله Plaque-PCR بررسی شدند. نتایج حاصل از Plaque-PCR (شکل ۲) نشان دهنده کلون شدن توالی GFP در ناقل فاژی می‌باشد و بدین ترتیب حاکی از دستیابی به نانوحامل ژنی λ -GFP است. در ادامه برای بررسی توانایی نانوحامل حاصل در انتقال و بیان ژن GFP، سلولهای AGS توسط این ذرات تیمار و بیان GFP در سلولها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس معکوس ارزیابی شدند. شمارش سلولهای بیان کننده GFP نشان داد که علی‌رغم استفاده از تعداد بالایی (2×10^{11} ذره) از ذرات فاژی برای آلوده کردن سلولهای AGS کارآیی انتقال و بیان به کمک نانوحامل ژنی حاصل پایین و در حدود 0.02% می‌باشد (شکل ۳). این

اتصال شیمیایی لیگاند هدف‌گیری به سطح ذرات فاژی طبیعی قابل حصول است (۱۲). گفتنی است که راهکار دوم به عنوان یک روش نوین توسط گروه پژوهشی تحقیق حاضر برای اتصال ترانسفرین به عنوان مولکول هدف‌گیری به سطح ذرات فاژی λ -GFP در حال اجراست.

تشکر و قدردانی

هزینه اجرای این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و هم‌منطور بخشی از آن توسط ستاد توسعه فناوری نانو تأمین شده است.

به وسیله یک یا چند رخداد پس از ورود به داخل سلول از قبیل تخریب فاژ برای آزاد شدن DNA، فرار از اندوزوم، انتقال به هسته و رونویسی محدود شود (۱۹). برای افزایش کارایی انتقال و بیان ژن با کمک فاژ می‌توان از دو راهبرد استفاده کرد: راهبرد اول استفاده از مولکولهای هدف‌گیری مسیرهای داخل سلولی از قبیل اتصال پپتیدهای دارای نشانه انتقال به هسته یا فرار از اندوزوم و دوم راهبردهایی که هدف آنها رخدادهای خارج سلولی از قبیل افزایش احتمال برهمکنش بین فاژ و سلول است. افزایش برهمکنش‌های سلول و فاژ هم با روش فاژنمایی (phage display) (۲۱،۲۰،۱۵،۱۰،۹،۷،۵) و هم با روشهای مختلف

منابع

- Baker, M. L., Jiang, W., Rixon, F. J., Chiu, W. (2005), Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophage. *J. Virol.* 79, 14967–14970
- Chen, D., Murphy, B., Sung, R., Bromberg, I. (2003), Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. *Gene Ther.* 10, 991–998
- Chiu, W., Burnett, R. M., Garcea, R. L. (1997), *Structural Biology of Viruses*. University Press, Oxford,
- Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R., Galfre, G. (1997), Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, 15, 1276-1285.
- Eguchi, A., Akuta, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M., Nakanishi, M. (2001), Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 276, 26204–26210
- Herweijer, H., Wolff, J. (2003), Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* 10, 453–458
- Ivanenkov, V.V., Felici, F., Menon, A.G. (1999), Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1448, 463–472
- Ivanenkov, V.V., Felici, F., Menon, A.G. (1999), Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1448, 450-462
- Jane, D., Samoylova, M., Tatiana, I., Morrison N. E., Nancy R. C. (2004), Cell targeted phagemid rescued by preselected landscape phage. *Gene*, 341, b59–65
- Lankes, H.A., Zanghi, C.N., Santos, K., Capella, C., Duke, C.M.P., Dewhurst, S. (2007), In vivo gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1337–1349
- Kaiser, A. D., (1966), On the internal structure of bacteriophage lambda. *J. Gen. Physiol.* 49, 171-178
- Li, k., Chen, Y., Li, S., Nguyen, H.G., Niu, Z., You, S., Mello, M., Lu, X., Wang, Q. (2010), Chemical Modification of M13 Bacteriophage and Its Application in Cancer Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.* 21, 1369–1377
- Liu, C., Chung, S-H., Jin, Q., Sutton, A., Yan, F., Hoffmann, A., Kay, B.K., Bader, S.D., Makowski, L., Chen, L. (2006), Magnetic viruses via nano-capsid templates. *J. Magn. Mater.* 302, 47–51
- March, J., Clark, J. (2004), Genetic immunization against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles. *Vaccine*, 22, 1666-1671
- Piersanti, S., Cherubini, G., Martina, Y., Salone, B., Avitabile, D., Grosso, F., Cundari, E., Di

- Zenzo, G., and Saggio, I. (2004), Mammalian cell transduction and internalization properties of lambda phage displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain. *J. Mol. Med.* 82, 467–476
16. Poul, M. A., Marks, J. D. (1999), Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous Bacteriophage. *J. Mol. Biol.* 288, 203-211
 17. Schmidt-Wolf, G., Schmidt-Wolf, I. (2003), Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol. Med.* 9, 67–72
 18. Thomas, C., Ehrhardt, A., Kay, M. (2003), Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4, 346–358
 19. Volcy, K., Dewhurst, S. (2009), Proteasome inhibitors enhance bacteriophage lambda (λ) mediated gene transfer in mammalian cells. *Virology*, 384, 77–87
 20. Zanghi, C. N., Lankes, H. A., Bradel-Tretheway, B., Wegman, J., Dewhurst, S. (2005), A simple method for displaying recalcitrant proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Nucleic Acids Res*, 33, No. 18
 21. Zanghi, C. N., Sapinoro, R., Bradel-Tretheway, B., Dewhurst, S. (2007), A tractable method for simultaneous modifications to the head and tail of bacteriophage lambda and its application to enhancing phage-mediated gene delivery. *Nucleic Acids Res*, Vol. 35, No. 8

Designing a phage-derived gene nanocarrier and examination of its capacity for delivering and expression of transgene in human cell line

Khalaj-kondori M., Sadeghizadeh M. and Behmanesh M.

Genetics Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Bacteriophage *lambda* comprises critical advantages that have made it as an ideal gene delivery vehicle into the eukaryotic cells. These advantages reside in both the structure and biology of the lambda phage, for example, recent investigations have revealed common ancestry for the tailed phages and eukaryotic DNA viruses. Considering these features as well as the double-stranded nature of its genome, bacteriophage *lambda* might comprise a great advantage for phage-mediated gene delivery into eukaryotic cells. A phage *lambda*-derived gene nanocarrier bearing reporter gene GFP (λ -GFP) was constructed and utilized to transfect AGS cell line. λ -GFP particle-mediated gene delivery and expression as well as its internalization by AGS cell line was investigated.

Key words: Bacteriophage *lambda*, λ -GFP, phage-mediated gene transfer