ساخت ناقل لنتی ویروسی بر پایه ویروس *HIV-1* با کاربری انتقال ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده

المیرا محمدی[۱]، فایزه خزیمه[۲]، ماندانا بهبهانی[۳]، زهرا گلستان‌نژاد[۴]، محمدرضا گلستان‌نژاد[۵]، شاهین گوانجی[*]

*. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان(خوراسگان)، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران (مؤلف مسؤول)
Shahin.gavanji@khuisf.ac.ir

۱. کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات دندانپزشکی ترابی نژاد ، گروه بیماری های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات دندانپزشکی ترابی‌نژاد ، گروه بیماری های دهان فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵. استادیار، گروه ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

این مقاله در تاریخ ۹۳/۱۲/۰۶ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۴/۴/۲۸ اصلاح شده و در تاریخ ۹۴/۵/۲۷ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۹۴؛ ۱۱(۵)؛ ۳۸۷-۳۹۶

چکیده

مقدمه: روش‌های زیستی انتقال ژن یا استفاده از ناقل‌های ویروسی، کاربرد گسترده‌ای در اهداف درمانی دارد. استفاده از ناقل های لنتی ویروسی با داشتن مزایایی چون توانایی آلوده‌سازی سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده، توان حمل قطعه ژنی بزرگ و بیان پایدار ژن خارجی، ابزاری مناسب برای انتقال ژن در کاربردهای تحقیقاتی و درمانی به شمار می‌آیند. هدف از این پژوهش تولید یک ناقل لنتی ویروسی بر مبنای (Human HIV-1 Immunodeficiency virus) با پوششی از ویروس وزیکولار استوماتیس (vesicular stomatitis virus glycoprotein-G: VSVG) بود. این ناقل می‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای انتقال ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده، در انواع مطالعات تحقیقاتی و درمانی، مورد استفاده قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها: روش کلسیم فسفات برای ترنسفکشن همزمان سه پلاسمید شامل پلاسمید بیان کننده ژن خارجی به همراه گزارشگر بیانی(pWPXL-GFP)، پلاسمید بیان کننده پروتئین‌های gag و psPAX2 pol و پلاسمید بیان کننده گلیکوپروتئین پوشش (pMD2.G)، بر روی رده سلولی کلیه جنین انسان، انجام گرفت. تایید ترانسفکشن با استفاده از فلوسیتومتری انجام گرفت و پس از تغلیظ ویروس‌ها، ترانسداکشن بر رده سلولی هدف انجام شد.

یافته‌ها: نتایج فلوسیتومتری بیان ۳۷/ ۵۱ درصد از ژن گزارشگر پروتئین سبز فلورسانت (Green Fluorescent Protein:GFP) را در سلول‌های ترانسفکت شده نشان داد. پس از تغلیظ ویروس و انجام ترانسداکشن؛ دخول پروویروس به ژنوم سلول هدف و بیان طولانی مدت GFP در این سلول‌ها با مشاهده به وسیله میکروسکوپ فلورسانت، ۱۵روز پس از ترانسداکشن ارزیابی شد و نتایج مثبت گزارش شد.

نتیجه‌گیری: بیان ژن گزارشگر در سلول‌ها، پس از ترانسداکشن، صحت ورود ناقل ویروسی را به سلول‌ها نشان داد و به این ترتیب ناقل تولید شده در این پژوهش علاوه بر کارایی انتقال ژن به دلیل ماهیت لنتی ویروسی آن، توانایی انتقال ژن به سلول‌های غیر تقسیم شونده را نیز علاوه بر سلول‌های تقسیم شونده دارا می‌باشد که موجب کاربرد گسترده تر آن، نسبت به سایر ناقل‌های ویروسی، در مطالعات انتقال ژن می‌شود.

کلید واژه‌ها: انتقال ژن، ناقل لنتی ویروسی، ترانسفکشن، کلسیم فسفات، ترانسداکشن

مقدمه

انتقال ژن به سلول ها معمولا برای برطرف کردن کمبودهای محصولات ژنی و یا کم کردن تولید اضافی این محصولات، انجام می‌گیرد. هدف از انتقال ژن تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب درمانی_تشخیصی و آنزیم‌های صنعتی، مطالعات زیستی و فیزیولوژیک، تولید جانوران تراریخت و ژن درمانی است. ژن درمانی به معنی انتقال توالی‌های نوکلئوتیدی مورد نظر به سلول‌ها، با اهداف درمانی می‌باشد [۱]. ناقل‌های ویروسی به ویژه ناقل‌های لنتی ویروسی کاربرد گسترده ای برای ژن درمانی دارند. ناقل‌های لنتی ویروسی بر پایه جنس لنتی ویروس از خانواده رتروویریده تولید می‌شوند و ناقل-های برپایهHIV-1 از پرکاربردترین آن‌ها برای ژن درمانی هستند. علت توجه به این ناقل‌ها توانایی بالقوه آن‌ها برای تحویل ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیرتقسیم شونده در شرایط برون تنی(in vitro) می‌باشد[۲].

ژنوم و تکثیر HIV-1

ویروس HIV از خانواده رتروویریده و مربوط به جنس لنتی ویروس است. این جنس شامل رتروویروس‌های غیر سرطان‌زا می‌باشد. ژنوم این ویروس شامل توالی‌های عملگر سیس و توالی‌های عملگر ترانس است. توالی‌های سیس برای اثر گذاری نیازی به بیان شدن ندارند و تاثیر خود را به صورت موضعی در مراحلی مثل ورود ژنوم ویروس به ژنوم میزبان(پرووویروس)، همانندسازی و رونویسی اعمال می‌کنند این توالی ها شامل (5`LTR, Long terminal repeat) 3`LTR (splice Acceptor) SA, (splice donor) SD, ((Encapsidation sequence), (REV response ,(element)RRE, INT (integrase binding site polypurin tract)3`PPT,(central polypurine tract) cPPT) می‌باشند. توالی‌های ترانس شامل ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های ویروسی است که شامل ژن‌های پروتئین‌های ساختاری (env Envelop و pol gag , Polymerase) پروتئین‌های فرعی VIF (Viral infectivity factor) NEF(Negative factor)وVPU(Viral protein unique), VPR(Viral protein regulatory) و پروتئین‌های تنظیمیrev (Regulator of Virion) و tat(Transcriptional activator) می‌باشند [۴،۳].

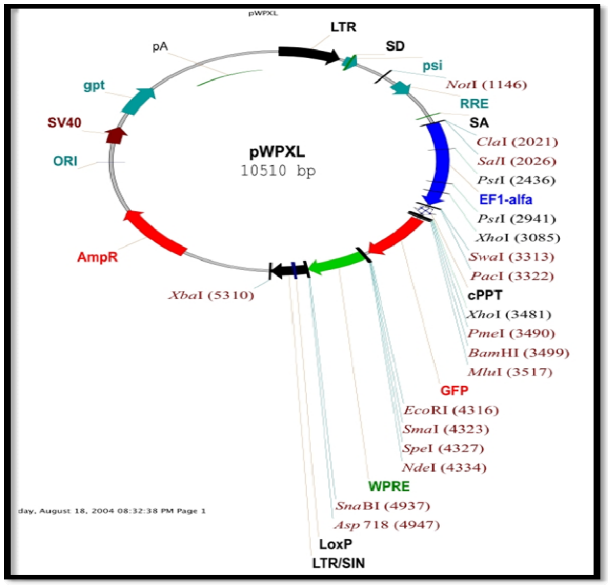
ناقل‌های لنتی ویروسی به گونه‌ای طراحی می‌شوند که ایمن بوده و بیماری‌زایی نداشته باشند. به این منظور یک پلاسمید برای انتقال ژن مورد نظر تعبیه می‌شود که شامل توالی‌های سیس مورد نیاز برای همانندسازی و بیان ژن مورد نظر باشد در حالی توالی‌های ترانس رمزکننده‌ی پروتئین‌های ویروسی از این پلاسمید حذف شده و در واحدهای بیانی متمایز از ژنوم ویروس(ساختارهای کمکی) قرار می‌گیرند. ساختارهای کمکی می‌توانند در قالب رده سلولی کمکی یا قالب پلاسمیدهای جداگانه طراحی شده که رمزگردان پروتئین‌های ویروسی می‌باشند. در این روش پلاسمیدی که شامل ژن مورد نظر است و پلاسمیدهای کمکی همزمان با هم به رده سلولی بسته بندی کننده ترنسفکت می‌شوند و باعث تولید گذرای ناقل ویروسی می‌شوند. از آنجایی که ژن آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویروسی در این پرووویروس رمز نمی‌شوند، امکان بسته بندی ویروس جدید وجود نداشته و تنها بیان ژن مورد نظر را امکان پذیر می‌باشد [۵].

اولین پژوهش در زمینه تولید ناقل‌های لنتی ویروسی در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت [۶]. پلاسمید بیانی پژوهش مذکور دارای ۳۵۰ جفت باز از پروتئین gag و ساختارهای سیس برای همانندسازی و رونویسی از پرووویروس بود این توالی‌ها همراه با توالی ژن لوسیفراز به عنوان گزارشگر تحت پروموتر سیتومگالوویروس قرار داشتند. در نسل‌های بعدی طراحی این ناقل‌ها تغییراتی مثل حذف پروتئین‌های فرعی برای افزایش ایمنی ویروس انجام گرفت [۷] با ایجاد جهش حذف در`۳ ناحیه تکرارهای بلند انتهایی (`LTR3) ناقل خود محدود شونده (Self inactivating vector(SIN)) حاصل شد. تلاش‌هایی نیز برای برای بهبود کارایی ترانسداکسیون صورت گرفت مثل افزودن توالی غنی از پورین مرکزی (central polypurine tract:cPPT) [۸] و توالی تنظیمی پس از رونویسی مربوط به ویروس هپاتیت موش کوهی (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element:WPRE) [۹] به پلاسمید بیانی (برای مثال در پلاسمید pWPXL که در پژوهش حاضر نیز مورد

استفاده قرار گرفته است). همچنین جدا بودن پروتئین‌های ویروسی از پروویروس و قرار گرفتن در ساختارهای متفاوت موجب عدم توانایی ناقل‌های تولید شده برای تکثیر گشته و امکان نوترکیبی و تولید تیپ وحشی ویروس در آن‌ها کاهش می‌یابد. توانایی آلوده سازی سلول‌های تقسیم نشونده و بیان طولانی مدت و پایدار ژن هدف، این ناقل‌ها را به ابزارهای مناسبی برای انتقال ژن دردرون تن(In vivo) با اهداف بالینی و تحقیقاتی مبدل کرده است [۱۳-۱۰]. ناقل‌های لنتی ویروسی توانایی خود را برای ترانسداکسیون بافت‌هایی از قبیل سیستم عصبی مرکزی، کبد، چشم، قلب، پانکراس و سلول‌های بنیادی خونساز، را در درون تن نشان داده‌اند [۱۶-۱۴]. استفاده از پوشش‌هایی مانند گلیکوپروتئین ویروس وزیکولار استوماتیس ورود ذره ویروسی را به انواعی از سلول‌ها با اندوسیتوز ممکن می‌کند و به این ترتیب دامنه عفونت‌زایی ناقل ویروسی را گسترده می‌کند [۱۷] (به دلیل دارا بودن پوششی غیر از ویروس مادری، نام ویروس کاذب نیز به ناقل تولید شده اتلاق می‌گردد). هدف از این مطالعه تولید یک ناقل لنتی ویروسی بر مبنای ویروس HIV-1 بود که برای کاربردهای انتقال ژن در مطالعات تحقیقاتی و بالینی قابل استفاده می باشد.

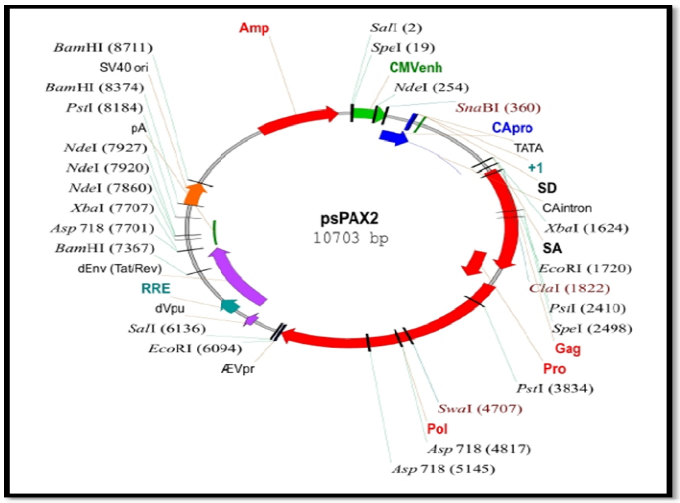
مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک پژوهش کاربردی بوده و برای انجام آن، سه پلاسمید pWPXL، psPAX2 و pMD2.G به صورت اپی زوم در باکتری‌های Escherichia coli DH5α خریداری شدند (Addgene, Cambridge, England) , pWPXL فاقد توالی‌های رمزگردان پروتئین‌های ویروس بوده اما دارای توالی‌های سیس برای همانندسازی و رونویسی ژن خارجی است. همچنین این پلاسمید حامل ژن پروتئین سبز فلورسانت (GFP) به عنوان گزارشگر است که نزدیک جایگاه برشی آنزیم‌های محدود کننده (برای قرار دادن ژن خارجی) تحت پروموتر فاکتور طویل‌سازی ۱ آلفا (elongation factor-1 alpha) قرار دارد. پلاسمید psPAX2 حامل ژن‌های gag و pol تحت کنترل پروموتر(SV40 (Simian vacuolating virus 40 است که به ترتیب پروتئین‌های کپسید و آنزیم‌های مورد نیاز برای تولید و بسته‌بندی ناقل ویروسی را بعد از ترنسفکشن در رده سلولی بسته بندی کننده، تولید می‌کنند و پلاسمید pMD2.G حامل ژن رمزکننده VSV-G تحت کنترل پروموتر سیتومگالو ویروس است (شکل‌های ۱، ۲، ۳).

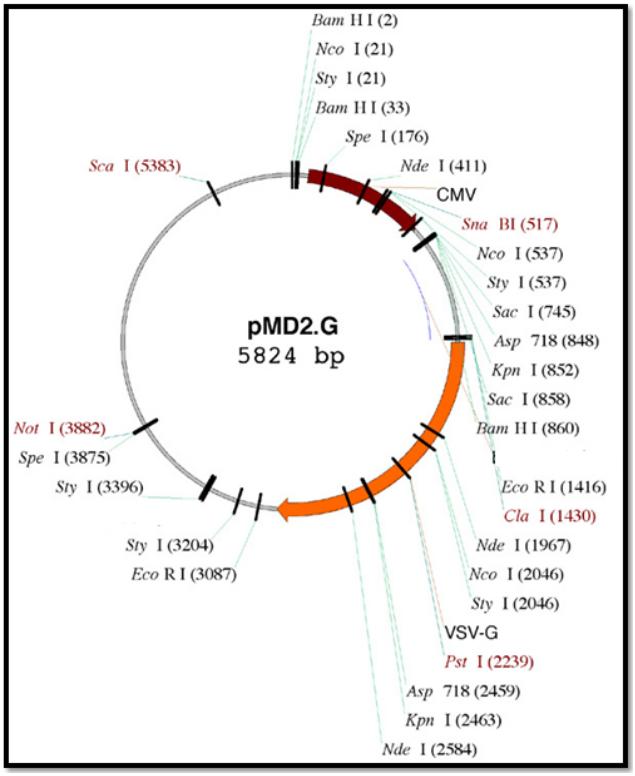


شکل ۱: تصویر شماتیک پلاسمید pWPXL

www.mui.ac.ir



شکل۲: تصویر شماتیک پلاسمید psPAX2



شکل۳: تصویر شماتیک پلاسمید pMD2.G

استخراج پلاسمید: باکتری‌های حاوی پلاسمیدها ۲۴ ساعت در محیط مایع لوریابرتانی (LB)(Luria Bertani, Merck Darmstadt, Germany) کشت داده شد پس از گذشت ۲۴ ساعت استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, UAS) و روش لیز قلیایی انجام گرفت. در روش لیز قلیایی کشت مایع باکتری‌ها در محیط لوریابرتانی استفاده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته پس از ۱ دقیقه سانتریفوژ در سرعت ۸۰۰۰

دور در دقیقه و تخلیه محلول رویی، به مدت ۵ دقیقه به ترتیب با ۱۰۰ میکرولیتر محلول گلوکز تریس EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ، ۲۰۰ میکرولیتر محلول SDS-NaOH (Sodium dodecyl sulfate-Sodum hydroxide) خنک به مدت ۵ دقیقه و ۱۵۰ میکرولیتر محلول پتاسیم استات (pH=۴/۸) به مدت ۵ دقیقه تیمار شد، سپس سانتریفوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محلول رویی تخلیه شد، به هر لوله ۱ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه شده و ۲دقیقه در دمای اتاق نگه داری شد سپس سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از تخلیه محلول رویی به هر لوله ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه شد و ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت پس از تخلیه محلول رویی رسوب در دمای اتاق خشک شد و ۵۰ میکرولیتر بافرتریس EDTA به هر ویال اضافه گردید (تمامی محلول‌ها و مواد اولیه استفاده شده در این پروتوکل از شرکت Merck خریداری شدند (Merck, Darmstadt, Germany).

کشت سلول: رده سلولی کلیه جنین انسانی۲۹۳ (Human embryonic kidney 293T:HEK293T)، از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM1X (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱درصد مخلوط آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین، کشت داده شدند (L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Penicillin-streptomycin mixtures, Gibco, USA). کشت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد کربن دی اکسید نگهداری شدند.

ترانسفکشن، تولید و تغلیظ ناقل ویروسی: تعداد ۵×۱۰۵ سلول در ظرف ۶ خانه کشت داده شد. زمانی که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد در سطح چاهک رسید، ترنسفکشن همزمان سه پلاسمید با روش کلسیم فسفات انجام گرفت. به منظور ایجاد شرایط مناسب برای سلول و بهبود ترانسفکشن دو ساعت قبل از ترانسفکشن محیط کشت با محیط تازه بدون آنتی‌بیوتیک تعویض شد. مقدارهای ۶ و۱۴ و ۲۰ میکروگرم به ترتیب از پلاسمیدهای pWPXL وpsPAX2 و pMD2.G همراه با ۱۱۰میکرولیتر محلول کلسیم کلرید ۲/۵ مولار مخلوط شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافر (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) HEPES (Merck, Darmstadt, Germany)، به صورت قطره قطره به مخلوط فوق اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط به هر چاهک کشت اضافه شد. در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترنسفکشن محیط روی چاهک‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود جمع آوری شد. برای جدا کردن ضایعات سلولی، این محیط از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. سپس بخشی از این سوپ ویروسی به صورت تغلیظ نشده در دمای ۴ درجه سانتریگراد نگهداری شد وبخشی با اولتراسانتریفوژ با سرعت ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۹۰ دقیقه تغلیظ شد و بخش دیگر با پلی اتیلن تغلیظ شد. به این منظور از محلول پلی اتیلن گلیکول (وزن ملکولی ۶۰۰۰) (Merck, Darmstadt, Germany) با غلظت نهایی ۸/۵ درصد و محلول سدیم کلرید با غلظت نهایی ۰/۴ مولار به سوپ ویروس اضافه شد. مخلوط به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد سپس ۳۵ دقیقه در با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفوژ شد. رسوب ویروسی به دست آمده در هر دو روش تغلیظ، پس از تخلیه محیط رویی در ۳۰ میکرولیتر محیط DMEM تازه بدون سرم حل شد.

ترانسداکشن و تیتر ویروس: برای تعیین تیتر ویروسی ۴۰۰۰۰ سلول HEK293T در ظروف ۲۴ خانه کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد ۶ رقت پی در پی از ویروس غلیظ با نسبت‌های ۱۰ برابرتهیه شد. رقت‌های پی در پی به چاهک‌های جداگانه اضافه شد (ترانسداکشن) و به یک چاهک ویروس تغلیظ نشده اضافه گردید. پس از ۷۲ ساعت درصد سلول‌های بیان کننده GFP تعیین و تیتر ویروسی بر حسب واحد عفونی/میلی لیتر محاسبه شد.

یافته‌ها

صحت تخلیص پلاسمیدهای استخراج شده با الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز مشاهده گردید، نتایج الکتروفورز

www.mui.ac.ir

پلاسمیدهای استخراج شده با روش لیز قلیایی و کیت درشکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد.

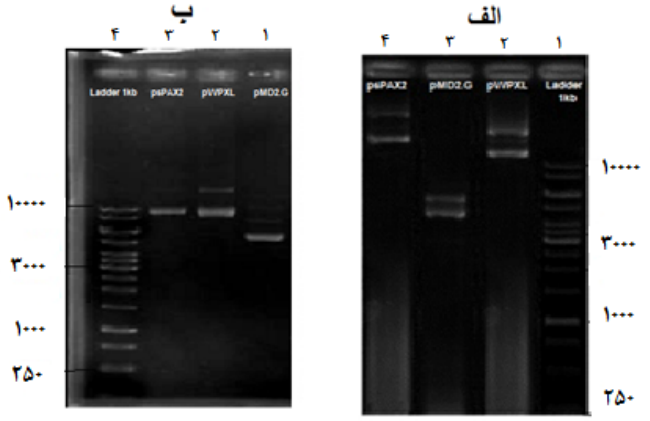
۷۲ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، بعد از جمع آوری محیط رویی که حاوی ناقل ویروسی بود، سلول‌ها با تیمار محلول تریپسین–EDTA به مدت ۳ دقیقه از سطح جدا شده و با بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو داده شد. به منظور تعیین درصد سلول‌های بیان کننده GFP از فلوسیتومتری کانال FL1 استفاده گردید. کنترل منفی(سلول ترنسفکت نشده) و سلول‌های ترنسفکت شده با روش کلسیم فسفات به ترتیب مقادیر ۰/۰۳و ۵۱/۳۷ درصد بیان GFP را نشان دادند (نمودار۱).

برای افزایش تیتر ویروسی و بالا بردن میزان ترانسداکشن، ویروس‌های تولید شده با استفاده از اولتراسانتریفیوژو پلی اتیلن گلیکول تغلیظ شدند. برای محاسبه تیترویروسی از ویروس غلیظ شده ۶ رقت پی در پی با نسبت‌های ۱۰ برابر تهیه شده و بر روی رده سلولی هدف ترانسداکشن و پس از ۷۲ ساعت فلوسیتومتری انجام شد.. فرمول زیر برای محاسبه تعداد واحد عفونی کننده بر میلی لیتر استفاده شد.

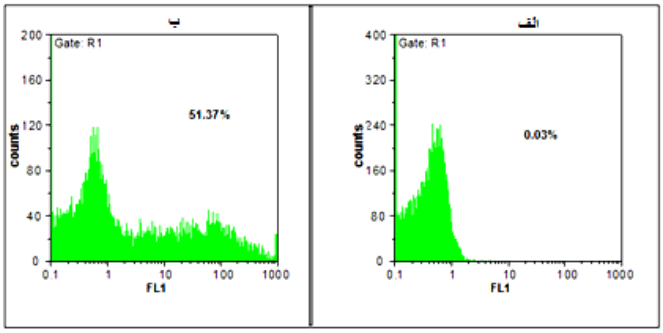
$$\text{واحدعفونی / میلی لیتر} = \frac{\text{تعداد سلول‌های ترانسداکت شده} \times 100/\text{درصد سلول‌های } GFP \text{ مثبت}}{\text{حجم ویروس (میلی لیتر)}}$$

مقادیر به دست آمده تیتر از ویروس‌های غلیظ شده با هر دو روش اولتراسانتریفوژ و پلی اتیلن گلیکول نزدیک به هم و تقریبا برابر با ۲۱×۱۰^{۶} بود. تیتر ویروسی برای ویروس تغلیظ نشده برابر با ۲۹۰۰۰۰حاصل شد (نمودار۲).

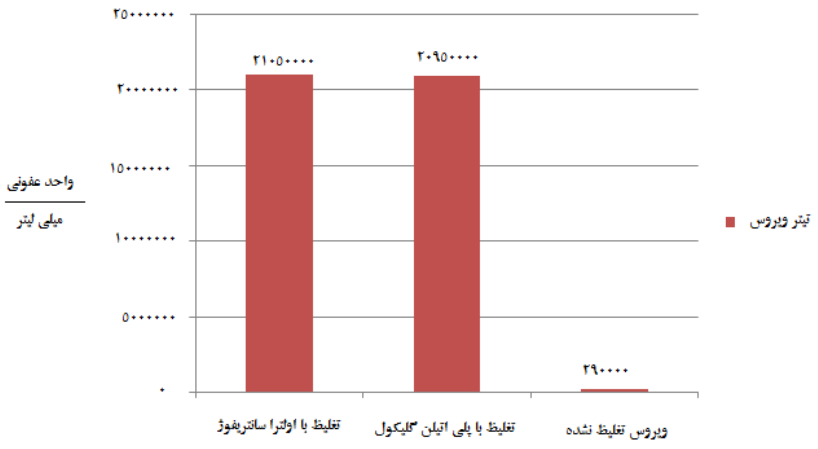
عمل ترانسداکشن با افزودن ۱۵میکرولیتر ویروس تغلیظ شده برای بررسی بیان GFP در رده سلولی HEK293 انجام گرفت. به منظور تایید بیان طولانی مدت ژن گزارشگر، سلول‌ها پس از ترانسداکشن پاساژ داده شدند و ۱۵ روز بعد با میکروسکوپ فلورسانت ,بررسی شدند و بیان GFP در سلول‌ها تایید شد (شکل ۵).



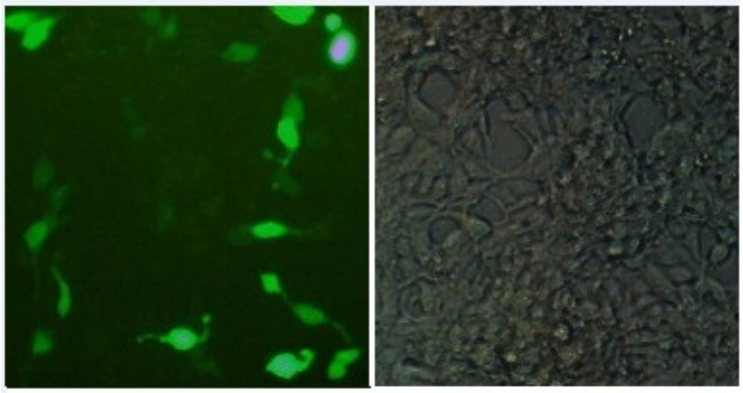
شکل ۴: الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده به روش لیز قلیایی(الف) با استفاده از کیت(ب)



نمودار ۱: بررسی درصد بیان GFP پس از ترنسفکشن. کنترل منفی(الف) روش کلسیم فسفات(ب)



نمودار ۲: تیتراسیون ویروسی



شکل۵: بیان GFP ۱۵ روز پس از ترانسداکشن سلول‌های HEK293(۴۰×)

بحث

در این پژوهش یک ناقل لنتی ویروسی بر مبنای HIV-1 با استفاده از سه پلاسمید تولید شد. پلاسمید انتقال دهنده ژن خارجی یا پلاسمید بیانی که در این پژوهش استفاده شد (pWPXL)، ایمن بوده و فاقد ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های ویروسی و نیز فاقد توانایی تکثیر و بسته بندی و آلوده سازی سلول‌های غیر از میزبان اولیه است. همچنین دارای توالی‌های cPPTو WPRE می‌باشد که باعث کارایی ترانسداکشن در آن می‌شوند [۹، ۸] در یک مطالعه در سال ۲۰۱۴، Shityakov و همکاران [۱۸] قدرت ترانسداکشن پلاسمید pWPXL را با برخی پلاسمیدهای بیانی دیگر مقایسه کرده و قدرت ترانسداکشن این پلاسمید را هم برای سلول‌های در حال تقسیم و هم در سلول‌های خاموش به میزان بالاتری از سایر پلاسمیدها نشان داده‌اند. مشاهده بیان مناسب GFP در سلول‌هایی که با ویروس‌های تولیدی ترانسداکشن شده بودند، پس از ۱۵ روز، بیان ممتد این ژن گزارشگر را اثبات کرده و در نتیجه نشان می‌دهد این ناقل قادر به بیان ژن خارجی را به صورت پایدار در رده سلولی هدف، می‌باشد. برای ترانسفکشن

از روش کلسیم فسفات استفاده شد. رده سلولی HEK293T برای ترانسفکشن پلاسمیدها و تولید ناقل لنتی ویروسی یا ویروس کاذب، استفاده شد. این سلول‌ها قابلیت خوبی برای ترنسفکشن داشته و دارای آنتی ژن بزرگ SV40 (Large T antigen) هستند که باعث تکثیر پرقدرت پلاسمیدهای ترنسفکت شده با منشا همانندسازیSV40 ، به صورت اپی زومال می‌گردد. روش کلسیم فسفات روی این رده سلولی کارایی بسیار مناسبی در ترانسفکشن دارد [۲،۱۹]. بنابراین روش کلسیم فسفات به عنوان یک روش ارزان قیمت و در دسترس با کارایی خوب برای ترنسفکشن و تولید ناقل‌های لنتی ویروسی، روشی مناسب است. برای تغلیظ ویروس از دو روش اولتراسانتریفوژ و پلی اتیلن گلیکول استفاده شد. ناقل لنتی ویروسی تولید شده در این پژوهش با دارا بودن پوشش از جنس VSV-G امکان استفاده از اولتراسانتریفوژ را برای تغلیظ فراهم می‌کند چرا که این پوشش در برابر نیروی اعمال شده توسط اولتراسانتریفوژ(Shear force) مقاوم بوده و آسیب نمی‌بیند [۱۷]. از معایب این پوشش غیر فعال شدن آن با سرم خون می‌باشد [۲۰]. این موضوع استفاده ناقل‌های دارای این پوشش را برای مطالعاتin vivo دچار مشکل می‌کند. از آنجاییکه ناقل‌های لنتی ویروسی ابزارهای مناسبی برای انتقال ژن و ژن درمانی در in vivo هستند [۱۳-۱۰]، ترکیب این پوشش با پلی اتیلن گلیکول به حل مشکل کمک کرده است. پلی اتلین گلیکول تاثیر قابل توجهی را در حفظ VSV-G در سرم خون و مقاومت آن در برابر سیستم کمپلمان و آنتی‌بادی‌های خنثی‌گر، اعمال می‌کند [۲]. توانایی چندین ناقل لنتی ویروسی در ترانسداکشن بافت‌هایی از قبیل سیستم عصبی مرکزی، کبد، چشم، قلب، پانکراس و سلول‌های بنیادی خونساز، را در In vivo گزارش شده است [۱۶-۱۴]. لذا از جمله کاربردهای ناقل‌های لنتی ویروسی استفاده از آن‌ها جهت انتقال ژن به سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده می‌باشد. Shiau و همکاران [۲۱] در ۲۰۱۰ یک ناقل لنتی ویروسی با استفاده از پلاسمید pWPXL و پوشش VSVG تولید کردند. پلاسمید بیانی این ناقل، دارای ژن کالیستاتین بود. پروتئین کالیستاتین دارای خاصیت ضد رگ‌زایی و ضد التهاب است. این ناقل به موش‌های مبتلا به تومور ریه تزریق شد و نتایج درمانی سودمندی به دست آمد. پلاسمید بیانی ناقل ویروسی تولید شده در پژوهش حاضر pWPXL بود و ناقل تولید شده یک ناقل خود محدود شونده بوده که از ایمنی کافی برای انتقال ژن برخوردار است. به علاوه پوشش این ناقل VSVG بوده و ویروس‌های دارای VSVG از طریق برهمکنش با لیپیدهای غشایی وارد سلول میزبان می‌شوند. به همین دلیل گستره میزبانی وسیعی دارند و قادر به آلوده کردن انواع مختلفی از سلول‌های هدف می‌باشند [۲۲]. در این پژوهش ناقل لنتی ویروسی به تنهایی تولید شد و در مطالعات تحقیقاتی آزمایشگاهی و بالینی آینده می‌توان از ژن های کلون شده در پلاسمید بیانی استفاده کرده و ناقل را همراه با ژن برای هدف تحقیقی یا درمانی مورد نظر، تهیه کرد. می‌توان از پلاسمیدهای بیانی دیگر نیز برای تهیه ناقل لنتی ویروسی استفاده کرد و تاثیر انواع پروموتر را بر بیان ژن ورودی به ناقل بررسی نمود.

نتیجه‌گیری

ناقل لنتی ویروسی تولید شده در این پژوهش با ایمنی و توانایی بالا برای ترانسداکشن، کاربرد مناسبی برای انتقال ژن به انواعی از سلول‌های تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده دارد. از این ناقل می‌توان برای انتقال ژن به سلول‌های هدف در کاربردهای تحقیقاتی و بالینی مختلف بهره گرفت.

References

1. Kim T, Skelding K, Nabel E, Simari R. What can cardiovascular gene transfer learn from genomics: and vice versa? Physiol Genomics 2002; 11 (3):179-82.
2. Cockrell A, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. Mol biotechnol 2007; 36 (3):184-204.
3. Cann A, Karn J. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. Aids 1989; 3 (1):S19-34.
4. Freed E. HIV-1 replication. Somat Cell Molec Gen 2001; 26 (1-6):13-33.
5. Dornburg R. The History and Principles of Retroviral Vectors. Front Biosci 2003; 8:d818-35.
6. Naldini L, U Blo¨mer P, Gallay D, Ory R, Mulligan F, Gage I, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 1996; 272 (5259):263–7.

7. Srinivasakumar N, Schuening F. Novel Tat-encoding bicistronic human immunodeficiency virus type 1-based gene transfer vectors for high-level transgene expression. J Virol 2000; 74 (14):6659-68.
8. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap . Cell 2000; 101 (2):173-85.
9. Zufferey R, Donello J, Trono D, Hope T. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. J Virol 1999; 73 (4):2886-92.
10. Kafri T, Blömer U, Peterson D, Gage F, Verma I. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors .Nat Genet 1997; 17 (3):314-17.
11. Zufferey R, Nagy D, Mandel R, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo .Nat Biotechnol 1997; 15 (9):871-875.
12. Naldini L, Blömer U, Gage F, Trono D, Verma I. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. P Natl A Sci 1996; 93 (21):11382-8.
13. Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma I, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. J Virol 1997; 71 (9):6641-9.
14. Wiznerowicz M, Trono D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. Trends Biotechnol 2005; 23 (1):42-7.
15. Cockrell A, Kafri T.HIV-1 vectors: fulfillment of expectations, further advancements, and still a way to go. Curr HIV Res 2003; 1 (4): 419-39.
16. Balaggan K, Ali R. Ocular gene delivery using lentiviral vectors. Gene Ther 2011; 19 (2):145-53.
17. Aiken C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. J Virol 1997; 71 (8):5871-7.
18. Shityakov S, Förster C, Rethwilm A, Dandekar T. Evaluation and Prediction of the HIV-1 Central Polypurine Tract Influence on Foamy Viral Vectors to Transduce Dividing and Growth-Arrested Cells. Sci World J 2014; 487969:1-11.
19. Jordan M, Köhne C, Wurm F. Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media. Transfection and protein expression in mammalian cells .Cytotechnology 1998; 26 (1):39-47.
20. DePolo N, Reed J, Sheridan P, Townsend K, Sauter S, Jolly D, et al. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum . Mol Ther 2000; 2 (3):218-22.
21. Shiau A, Teo M, Chen S, Wang C, Hsieh J, Chang M, et al. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin. BMC Cancer 2010; 10: 245-55.
22. Coil D, Miller A. Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus. J Virol 2004; 78: 10920-6.

Construction of lentiviral vector based on HIV-1 virus for gene transfer to dividing and non-dividing cells

Elmira Mohammadi, Faezeh khozeimeh, Mandana Behbahani, Zahra Golestan nejad, Mohamad Reza Golestan nejad, Shahin Gavanji*

Abstract

Introduction: *Biological methods or viral vectors are used extensively for gene transfer for therapeutic aims. Lentivial vectors, with advantages such as the capacity of transducing dividing and non-dividing cells, carrying large genetic payloads and stable long-term transgene expression, are considered suitable tools for gene transfer for research and therapeutic purposes. The aim of this study was to produce a lentiviral vector based on HIV-1, with vesicular stomatitis virus glycoprotein-G: VSVG. This vector can be used as a tool for gene transfer to dividing and non-dividing cells for research and therapeutic purposes.*

Materials and methods: *Calcium phosphate method was used for co-transfection of three plasmids pWPXL-GFP (expression vector with reporter gene), psPAX2 consisting of gag, pol gene of HIV-1 virus and pMD2.G (Envelope vector) on HEK293T human embryo cell line. Flow cytometry technique was used for assessment of green fluorescent protein (GFP) expression as a reporter gene. Viruses were concentrated and used for transduction on the target cell line.*

Results: *GFP expression was observed in 51.37% of transfected HEK293T cell line. After concentrating the viruses and transduction, pro-virus penetration into the target cell genome was observed with long-term green positive expression in transduced cells using fluorescent microscopy 15 days after transduction.*

Conclusion: *The ability of constructed viruses to enter host cells was confirmed by GFP expression in these cells. The lentivirus (and therefore the vector) produced in this study proved effective in transducing dividing and non-dividing cells, making it more efficient than other viral vectors in gene transfer investigations.*

Key words: *Calcium phosphate, Gene transfer, Lentiviral vectors, Transduction, Transfection.*

Received: 25 Feb, 2015 Accepted: 18 Agu, 2015

Address: Phytopathologist, Young Researchers and Elite Club, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Email: Shahin.gavanji@khuisf.ac.ir

Citation: Mohammadi E, khozeimeh F, Behbahani M, Golestan nejad Z, Golestan nejad MR, Gavanji Sh. **Construction of lentiviral vector based on HIV-1 virus for gene transfer to dividing and non-dividing cells**. J Isfahan Dent Sch 2015; 11(5):387-396.