مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره نوزدهم / تابستان ۱۳۹۳/۱۲۳-۱۱۴

ساخت حامل ژنی مبتنی بر باکتریوفاژ M13 و ارزیابی توانایی آن در انتقال و بیان ترانسژن در رده سلولی یوکاریوتی AGS

محمد خلج کندری[۱]، **سیده الهام عابدحیدری**[۲]، **محمدعلی حسینپور فیضی**[۳]

۱. استادیار گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن ثابت:۳۳۹۲۶۷۴-۰۴۱۱، khalaj@tabrizu.ac.ir

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. استاد گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

مقدمه: نقایص مرتبط با عملکرد ناقل‌های ژنی اعم از ناقل‌های ویروسی و غیر ویروسی باعث شده است محققان برای دستیابی به ناقل یا ناقل‌های ژنی ایده‌آل به تحقیقات خود ادامه دهند. فاژها به خاطر داشتن یکسری مزیت‌ها همچون حفاظت از ژن خارجی، عدم ایمنی‌زایی و پایداری در شرایط مختلف، به عنوان گزینه‌ای مطلوب برای انتقال ژن مطرح شده‌اند. هدف از این پژوهش، دستیابی به یک سازه فاژی و ارزیابی پتانسیل آن جهت انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی بوده است.

روش بررسی: با برش درون سلولی ناقل فاژی Lambda-Zap CMV XR که دارای ژن GFP بوده است، سازه فاژمیدی pCMV-Script Ex بدست آمد و پس از بسته‌بندی توسط فاژ کمکی، ذرات فاژی M13-GFP حاصل شدند. ذرات فاژی حاصل جهت آلوده‌سازی رده سلولی انسانی AGS مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت به کمک روش‌های PCR و میکروسکوپ فلورسانس میزان ورود ذرات فاژی M13-GFP به رده سلولی انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی سلول‌های تیمار شده با میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که ذرات فاژی M13-GFP توانایی ورود و بیان ترانسژن در سلول‌های یوکاریوتی را دارند با این وجود کارآیی انتقال بسیار ناچیز است. همچنین نتایج حاصل از PCR گویای این مطلب است که میزان ورود حامل ژنی M13-GFP به رده سلول‌های یوکاریوتی وابسته به دوز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج گویای آن است که فاژ M13 می‌تواند به عنوان یک سیستم مناسب برای انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی در نظر گرفته شود، چراکه تمایل ورود آنها به سلول‌های یوکاریوتی بسیار کم است و می‌توان با اتصال و یا نمایش مولکول‌های هدفگیری بر سطح ذرات فاژی، ترانسژن را به شکل مؤثری به سلول هدف منتقل کرد.

واژه‌های کلیدی: ژن‌درمانی، انتقال ژن، فاژ M13.

وصول مقاله:۹۲/۷/۷ اصلاحیه نهایی:۹۲/۹/۱۶ پذیرش:۹۲/۱۰/۳۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

مقدمه

یکی از شاخص‌های ژن درمانی کارآمد آن است که سیستم‌های حامل باید توانایی تحویل ژن‌های درمان‌کننده به سلول‌های هدف را داشته، در عین حال سمیت و بیان در بافت‌های دیگر را به حداقل برسانند (۱). حامل‌هایی که در حال حاضر برای ژن‌درمانی بکار می‌روند در دو گروه اصلی حامل‌های ویروسی و حامل‌های غیر ویروسی قرار می‌گیرند (۲). بطور کلی حامل‌های ویروسی کارایی انتقال و بیان بالا حتی تا ۱۰۰ درصد دارند با اینحال آنها نه تنها کاملاً بی‌خطر و ایمن نیستند، بلکه تولید انبوه آنها هزینه بالایی می‌طلبد. این عوامل باعث شده است علیرغم قابلیت‌های خوب آنها در انتقال و بیان ترانسژن، جستجو برای یافتن حامل‌های ژنی مناسب بیش از پیش ادامه یابد. از طرف دیگر حامل‌های غیر ویروسی نسبتاً بی‌خطر و ارزان بوده، با اینحال کارایی ورود و انتقال آنها به سلول‌های هدف بسیار پائین است (۶-۳).

فاژها، مزایای زیادی دارند که باعث شده است به عنوان حامل‌های ژنی به پستانداران مطرح و به عنوان جایگزینی برای حامل‌های ویروسی و حامل‌های غیر ویروسی در نظر گرفته شوند (۱۰-۷). فاژها، حامل‌های تحویل‌دهندهٔ جذابی هستند، زیرا ذرات فاژی عملاً هیچ تمایلی به سلول‌های پستانداران نداشته، لذا حامل‌های ایمن و بی‌خطر به حساب می‌آیند (۸). به علاوه ذرات فاژی تغییر داده شده نه تنها براحتی قابل حصول از کشت باکتریایی هستند، بلکه در شرایط محیطی بسیار متنوع (مثلاً در pHهای بالا و پائین) پایدار هستند. از مزیت‌های مهم دیگر فاژها حفاظت از ژن مورد انتقال به دلیل محصور بودن در درون پروتئین‌های پوششی است (۸ و ۲). این ویژگی در سیستم‌های غیر ویروسی کمرنگ بوده و DNA مورد انتقال آنها در معرض تخریب توسط آنزیم‌های برشگر می‌باشند (۲). علاوه بر این حضور گسترده فاژها در محیط زیست و ورود آنها به بدن انسان سبب شده است که سیستم ایمنی تا حدی با این ذرات سازگار شود. در نتیجه کاربرد فاژها در انواع روش‌های درمانی در مقایسه با ویروس‌های جانوری مشکلات ایمنی بسیار اندکی را برای بیمار به دنبال خواهد داشت (۱۱).

استفاده از فاژها به عنوان حامل‌های ملکولی با اهداف مختلفی از قبیل انتقال دارو (۱۵-۱۲)، انتقال واکسن‌های DNA (۱۷و ۱۶)، انتقال فلوروفورها برای تصویربرداری و تشخیص سلول‌های سرطانی (۱۹و۱۸)، انتقال ژن‌های درمان کننده به بافت‌های توموری و بررسی توانایی این ذرات در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی انجام می‌گیرد. استفاده از فناوری فاژنمایی (Phage display) جهت هدفگیری این ذرات، دامنه کاربرد و شایستگی آنها را دو چندان کرده است (۲۱و ۲۰ و ۱۸). علاوه براین تحمل بی‌نظیر شرایط نامساعد از قبیل pHهای بالا و پائین توسط این ذرات (۱۶)، امکان استفاده از روش‌های شیمیایی را در هدف‌گیری و نمایش لیگاندهای هدف‌گیری مختلف مهیا کرده است.

این مطالعه با هدف دستیابی به یک حامل‌ژنی مبتنی بر باکتریوفاژ M13 و ارزیابی توانایی آن در انتقال و بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی انجام گرفت. بدین منظور ابتدا سازه فاژمیدی pCMV-Script EX حاوی ژن GFP به روش برش درون سلولی (in vivo excision) به دست آمد. سپس سازه حاصل با کمک فاژ کمکی بسته بندی و ذرات فاژی نو ترکیب M13-GFP بدست آمدند. در نهایت ذرات حاصل برای آلوده کردن سلول‌های AGS مورد استفاده قرار گرفته، کارایی انتقال و بیان GFP ارزیابی شد.

روش بررسی

پژوهش حاضر نوعی مطالعه تجربی و آزمایشگاهی برای دستیابی به یک سازه ژنی حاوی GFP با قابلیت بیان در سیستم یوکاریوتی است که هریک از مراحل آن در ادامه تشریح شده است:

مستعد سازی باکتری برای آلوده کردن با فاژ

باکتری XL1-Blue MRF' (Stratagene, USA) در ۵۰ ml محیط LB مایع غنی شده با مکمل‌های 0.2%

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

maltose (w/v) و $MgSO_4$ ۱۰ mM تا رسیدن به $OD_{۶۰۰}$ کمتر از ۱، کشت داده شدند. باید توجه داشت که در این مراحل به محیط کشت آنتی‌بیوتیک اضافه نشود زیرا آنتی‌بیوتیک با اتصال به دیواره باکتری مانع آلوده شدن با فاژ می‌گردد. کشت حاصل در g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده، رسوب باکتری حاصل در ml ۲۵ محلول $MgSO_4$ ۱۰ mM حل می‌شود. باکتری‌های حاصل مستعد عفونت با فاژ بوده و قابل نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای استفاده‌های بعدی تا دو هفته می‌باشند.

تهیه پلاک از ذرات فاژی λ-GFP

برای بدست آوردن پلاک‌های خوب جداشده از این ناقل فاژی، باکتری‌های مستعدشده درست قبل از استفاده تا $OD_{۶۰۰}$ برابر با ۰/۵ توسط محلول $MgSO_4$ ۱۰ mM رقیق شد. سپس حجم‌های ۲۰۰ میکرولیتری از آن تهیه و با رقت‌های متوالی از فاژ λ-GFP در بافر SM مخلوط و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد بدون تکان انکوبه شدند تا ذرات فاژی به باکتری‌ها متصل شوند. سپس به هر کدام ۳ میلی‌لیتر محلول آگارورویی ذوب شده و خنک شده تا ۴۸ درجه سانتیگراد اضافه و پس از مخلوط کردن آرام، در پلیت حاوی محیط کشت NZY آگار تخلیه و پخش شدند. پس از ۱۰ دقیقه پلیتها به صورت وارونه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شده و پلاک‌ها پس از ۸ تا ۱۲ ساعت ظاهر شدند.

برداشت پلاک از پلیت

یک پلاک نسبتاً بزرگ و خوب‌جداشده از بین پلاک‌ها انتخاب و توسط یک پیپت متصل به مکنده از پلیت برداشته شد. پلاک برداشته شده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر SM قرار داده شد و به آن µl ۲۰ کلروفورم افزوده شد. پس از چند لحظه ورتکس آرام مخلوط حاصل بمدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا ذرات فاژی از آگار جدا شده، وارد بافر شوند. محلول فاژی حاصل تا ۶ ماه در ۴ درجه سانتیگراد پایدار خواهد بود.

ساخت ذرات فاژ M13 حاوی توالی GFP (M13-GFP)

طراحی و ساخت ذرات فاژی لامبدای حاوی توالی GFP (λ-GFP) قبلاً توسط گروه مطالعاتی ما گزارش شده است (۲۲). سازه λ-GFP از الحاق توالی رمزکننده GFP با ناقلی مبتنی بر فاژ لامبدا بنام Lambda ZAP®-CMV XR (Stratagene, USA) تشکیل شده و شیره سلولی Gigapack® III Gold Packaging Extract (Stratagene, USA)، جهت بسته‌بندی ذرات فاژی حاصل به کار برده شد. ناقل Lambda ZAP®-CMVXR به شکلی طراحی شده است که امکان برش و جداسازی توالی DNA کلون شده را به همراه پلاسمید pCMV-Script EX با یک مکانیسم درون سلولی برآورده سازد. برای بدست آوردن ذرات فاژ M13 حاوی توالی GFP از روش برش و خارج‌سازی درون سلولی[1] ذرات فاژی λ-GFP استفاده شد. بدین منظور در دو ارلن حاوی ml ۵۰ محیط LB همراه با مکمل، باکتری‌های XL1-Blue MRF' و نیز XLOLR (Stratagene, USA) در ۳۰ درجه سانتیگراد کشت شبانه داده شدند. باکتری‌ها در g ۱۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل در ml ۲۵ از $MgSO_4$ ۱۰ mM بطور جداگانه حل شدند. $OD_{۶۰۰}$ آنها توسط $MgSO_4$ ۱۰ mM برابر با ۱ تنظیم شد. تعداد سلول‌های باکتری در $OD_{۶۰۰}$ برابر ۱، تقریبا ۸×۱۰^{۸} سلول به ازای هر میلی‌لیتر می‌باشد. µl ۲۰۰ باکتری با µl ۲۵۰ از محلول فاژی λ-GFP حاوی بیش از ۱×۱۰^{۵} ذره فاژی و µl ۱ فاژ کمکی ExAssist (Stratagene, USA) حاوی بیش از ۱×۱۰^{۶} ذره فاژی در یک فالکون مخلوط شده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد بدون تکان انکوبه شدند تا فاژها به باکتری‌ها متصل شوند. سپس ml ۳ محیط LB به آن اضافه و ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با تکان انکوبه شد. پس از آن فالکون در حمام آب‌گرم ۷۰ درجه

[1] In vivo excision

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد تا ذرات فاژ لامبدا و سلول‌های باکتری لیز شوند. اضافات سلولی با سانتریفوژ در g ۱۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. محلول رویی حاوی ذرات فاژی M13 است که از برش و خارج‌سازی فاژمید pCMV-Script EX دارای توالی GFP و بسته‌بندی آنها بدست آمده‌اند. محلول فاژی حاصل به یک فالکون استریل منتقل و در ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

تهیه تک‌کلونی باکتری حاوی فاژمید از ذرات فاژی حاصل

حجم‌های µl ۲۰۰ از باکتری XLOLR تازه تهیه شده با $OD_{۶۰۰}$ برابر ۱، در ویال‌های ml ۱.۵ توزیع و بترتیب با ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فاژی حاصل از فرآیند برش و خارج‌سازی تلقیح شدند. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد بدون تکان، به هر ویال µl ۳۰۰ محیط NZY مایع افزوده و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد برای بیان کافی ژن مقاومت به کانامیسین انکوبه شدند. سپس µl ۲۰۰ از هر ویال بر روی پلیت‌های LB حاوی کانامایسین (۵۰µg/ml) پخش شده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب انکوبه شدند. به این ترتیب کلونی‌های باکتریایی که ظاهر می‌شوند دارای فاژمید حاوی GFP خواهند بود.

تأیید کلونی‌های حاوی GFP

برای تأیید کلونی‌های مثبت از روش کلونی-PCR استفاده شد. بدین منظور مخلوط PCR حاوی تمام اجزاء بجز DNA الگو در حجم کل ۲۵ میکرولیتر آماده شد و به جای DNA الگو کمی از کلونی مربوطه با نوک تیپ برداشته شده و در مخلوط آماده شده PCR حل شد.

پرایمرهای forward : 5'-**GTAGAATTCCGCCACCATGGTGAGCA -3'** و reverse; 5'-**GACCTCGAGTTACTTGTACAGTTCGTCCA TGC-3'** (۲۲) برای تکثیر توالی GFP با طول ۷۰۰ جفت باز بکار رفتند. شرایط انجام PCR عبارت است از؛ واسرشت‌سازی اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد و سپس ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتیگراد، تکثیر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت تکثیر نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شده، پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید باندهای حاصل مشاهده شدند. کلونی‌های تأیید شده برای تکثیر ذرات فاژی M13 حاوی GFP (M13-GFP) بکار رفتند.

تکثیر ذرات فاژی M13-GFP

برای تکثیر ذرات فاژی M13-GFP یک کلونی از باکتری XLOLR حاوی فاژمید به ml ۵ از محیط 2xYT مایع حاوی µg/ml ۵۰ کانامیسین اضافه شد. سپس محیط توسط $۱۰^{۸}$ pfu/ml از فاژ کمکی R408 [(Multiplicity Of Infection) ۱۰] ~MOI تلقیح شد. محیط حاصل تا رسیدن به اشباع کامل (اغلب ۱۸ تا ۲۴ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با تکان‌های شدید انکوبه شد. محیط در ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد تا باکتری‌ها از بین بروند. سپس باکتری‌ها و اضافات سلولی با سانتریفوژ در g ۹۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد. محلول رویی که حاوی ذرات فاژی M13-GFP است به فالکون استریل منتقل شده و مراحل حرارت دادن و سانتریفوژ یک بار دیگر تکرار شد تا خلوص کافی بدست آید. محلول فاژی حاصل پس از تعیین تیتر در ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

تیتراسیون

ml ۵ محیط LB مایع توسط یک کلونی از باکتری XLOLR تلقیح و تا رسیدن به $OD_{۶۰۰}$ برابر با نیم در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری از آن در ویال‌های ۱/۵ توزیع شد. پس از تهیه رقت‌های متوالی از ذرات فاژی در بافر SM، ۱۰ میکرولیتر از هر رقت با هر ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مخلوط و یک ساعت همراه با تکان در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا باکتری‌ها توسط ذرات فاژی آلوده و ژن مقاومت به کانامایسین به اندازه کافی بیان

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

گردد. سپس محتویات هر ویال بر روی یک پلیت LB حاوی کانامایسین تخلیه و پخش شد. پلیت‌ها بمدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگرد انکوبه و کلونی‌های حاوی فاژمید تشکیل شدند. در نهایت تعداد کلونی‌ها شمارش و تیتر فاژ بر حسب cfu/ml (Colony Forming Unit) گزارش شد.

استخراج DNA فاژمیدی

۵ ml محیط LB حاوی کانامایسین را با یک کلونی از باکتری XLOLR حاوی فاژمید تلقیح کرده، کشت شبانه داده شد. باکتری‌ها با سانتریفوژ رسوب داده شدند و DNA فاژمیدی که به صورت پلاسمید در باکتری‌ها تکثیر یافته است با کیت استخراج پلاسمید شرکت Fermentas تخلیص شد. خلوص و غلظت DNA حاصل با اسپکتروفتومتر تعیین شد.

آلوده کردن سلول‌های رده AGS انسانی

سلول‌های رده AGS به تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک پلیت شش‌خانه در محیط RPMI همراه با ۱۰ درصد سرم FBS و ۱۰μg/ml آنتی‌بیوتیک کشت شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و C02 ۵٪ انکوبه شد. سپس چاهک‌ها با ضریب عفونت‌های (MOI) $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ یا $۱۰^{۸}$ از ذرات فاژی M13-GFP به مدت ۱۲ ساعت تیمار و پس از تعویض محیط با محیط تازه تا ۳۶ ساعت دیگر انکوبه شدند. همچنین DNA فاژمیدی استخراج و تخلیص شده، به عنوان کنترل مثبت توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ شرکت Invitrogene به سلول‌های AGS ترانسفکت شد. در نهایت سلولها برای مشاهده بیان GFP توسط میکروسکوپ معکوس فلورسانس بررسی شدند.

بررسی ورود حامل‌ژنی M13-GFP به سلول‌های AGS

سلول‌های رده AGS به تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک پلیت شش‌خانه در محیط RPMI همراه با ۱۰ درصد سرم و ۱۰μg/ml آنتی‌بیوتیک کشت و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و C02 ۵٪ انکوبه شدند. سلول‌ها با cfu/ml ۲×۱۰^{۱۲}، ۲×۱۰^{۱۱} و ۲×۱۰^{۱۰} از ذرات فاژی M13-GFP به مدت ۱۲ ساعت تیمار شدند. سپس محیط کشت تعویض و با PBS شستشو داده شدند. ذرات فاژی چسبیده به سلول توسط شستشو با بافر گلیسین (50mM Glycine pH 2.8, 500mM Nacl) آزاد و از محیط حذف شدند. سلول‌ها پس از تیمار با تریپسین از چاهک‌ها جمع‌آوری و DNA تام آنها توسط کیت Gene JET™ Genomic DNA Purification Kit شرکت Fermentas استخراج شد. DNA حاصل به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر و آشکارسازی توالی GFP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (مذکور در بخش تایید کلونی‌های حاوی GFP) مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و آشکارسازی شدند.

تحلیل داده ها

در تحلیل داده ها و رسم نمودار از برنامه Microsoft office Excel 2007 استفاده شد.

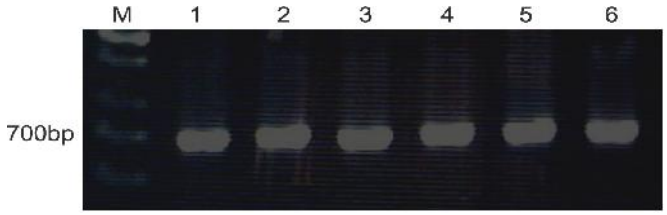
یافته‌ها

ساخت و تأیید سازه فاژمیدی M13-GFP

سازه فاژمیدی حاوی توالی GFP با مکانیسم برش و استخراج درون سلولی از سازه λ-GFP بدست آمد. برای تأیید سازه حاصل، باکتری XLOLR توسط ذرات فاژی M13-GFP آلوده شده و سپس کلونی‌های نوترکیب توسط روش کلونی-PCR تأیید شدند. کلونی‌های مثبت که نشان‌دهنده وجود سازه فاژمیدی M13-GFP هستند جهت تکثیر، تعیین تیتر و استفاده در مراحل بعدی بکار رفتند. بالاترین تیتر حاصل از تکثیر ذرات فاژی M13-GFP برابر با cfu/ml ۵×۱۰^{۱۳} بود(شکل ۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

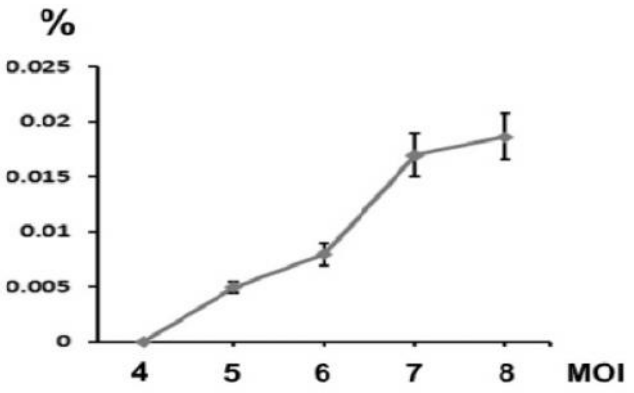
[DOI: 10.22102/19.2.114]



شکل۱. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات کلونی-PCR: شماره‌های ۱-۶ نشاندهنده محصولات PCR کلونی‌های مختلف،M؛ اندازه‌نما

انتقال و بیان ژن GFP توسط ذرات فاژی M13-GFP

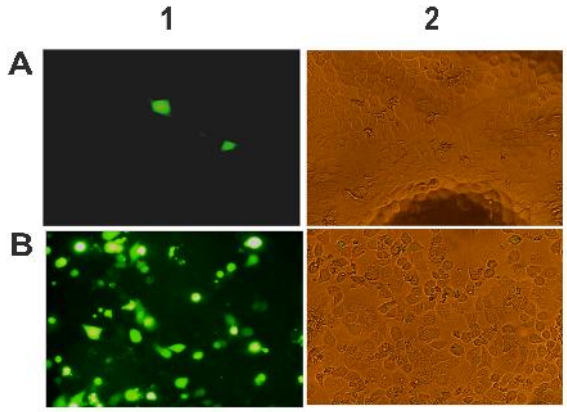
سلول‌های رده AGS انسانی در چاهک‌های پلیت شش‌خانه کشت و با MOI مختلف از ذرات M13-GFP بمدت ۱۲ ساعت تیمار شدند. پس از تعویض محیط سلول‌ها، ۳۶ ساعت دیگر نیز انکوباسیون ادامه پیدا کرد. در نهایت سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس فلورسانس برای بررسی بیان GFP مشاهده شدند (شکل۲). در دوز ۲×۱۰^{۱۳}cfu/ml سیگنال‌های سبز رنگ حاصل از بیان ژن GFP قابل مشاهده می‌باشد، در حالیکه در دوزهایی پایین‌تر از این مقدار این دوز سیگنال‌های سبز رنگ مربوط به پروتئین GFP قابل مشاهده نمی‌باشد. این بررسی‌ها نشان دادند که ذرات فاژی M13-GFP می‌توانند وارد سلول‌های AGS شده و باعث بیان ترانسژن GFP در آن سلول‌ها شوند. با این وجود تعداد سلول‌های GFP مثبت بسیار کم بوده و در حدود ۰/۰۲٪ در MOI برابر با $۱۰^{۸}$بوده است. شمارش تعداد سلول‌های GFP مثبت حاصل از تیمار با MOI های مختلف نشان داد که کارآیی انتقال و بیان ژن GFP توسط ذرات فاژی M13-GFP وابسته به دوز می‌باشد (نمودار۱).



نمودار ۱: کارآیی انتقال و بیان GFP توسط ذرات فاژی M13-GFP: محور افقی بیانگر ضریب عفونت‌های (MOI) مورد استفاده برای تیمار است و در آنها MOI به صورت لگاریتمی نشان داده شده است. محور عمودی درصد سلول‌های GFP مثبت می‌باشد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

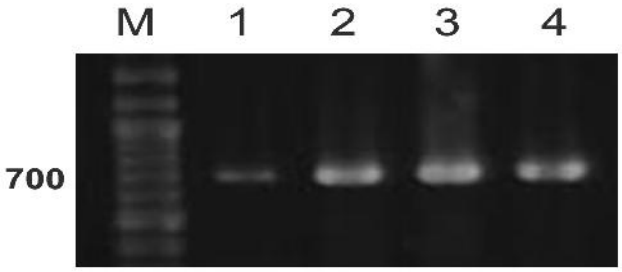


شکل۲. سلولهای GFP مثبت حاصل از تیمار سلولهای AGS با 2×10^{13}cfu/ml A) ذره فاژی M13-GFP و B) ترانسفکشن DNA استخراج شده از ذرات فاژی M13-GFP با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰

بررسی ورود نانوحامل‌ژنی M13-GFP به سلول‌های رده AGS

AGS رده سلولی است که از خانمی ۵۴ ساله با نژاد قفقازی و مبتلا به آدنوکارسینومای معده مشتق شده است و چون برای مطالعات انتقال ژن مناسب می باشد، در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. توانایی ورود ذرات فاژی به سلول‌های AGS با استخراج DNA از سلول‌های تیمار شده با ذرات فاژی و آشکارسازی وجود DNA ترانسژن به کمک تکثیر با PCR بررسی شد.

نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده با ذرات فاژی M13-GFP در (شکل۳) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش دوز آلوده سازی فاژ باندهای مربوطه بر روی ژل آگاروز تقویت شده که نشان‌دهنده افزایش ورود فاژ به سلول AGS می‌باشد. این نتایج وابسته به دوز بودن ورود ذرات فاژی به سلول‌ها را تأیید می‌کند.



شکل۳. بررسی ورود ذرات M13-GFP به سلول‌های AGS: ۱ تا ۳ محصولات PCR حاصل از تکثیر DNA تام استخراج شده از سلول‌های AGS تیمار شده بترتیب با cfu/ml 2×10^{10}، 2×10^{11} و 2×10^{12} از ذرات M13-GFP، ۴؛ کنترل مثبت PCR با ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده از ذرات M13-GFP، اندازه‌نما با M نشان داده شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

بحث

انتقال ژن و ژن‌درمانی با استفاده از حامل‌های مبتنی بر ویروس‌های یوکاریوتی به علت مشکلات ناشی از پاسخ‌های ایمنی، ورود نابجای آنها به سلول‌های غیرهدف و نیز ورود نابجای آنها به ژنوم دچار چالش است (۴و ۳). علیرغم تلاش‌های فراوان صورت گرفته برای برطرف کردن این مشکلات، هنوز اطمینان لازم برای استفاده بالینی این حامل‌ها دچار تردید است. از طرف دیگر حامل‌های غیر ویروسی کارایی کافی برای انتقال و بیان ژن را ندارند (۶ و ۲). لذا تلاش برای یافتن گزینه‌های دیگر هم‌چنان با قدرت انجام می‌گیرد. باکتریوفاژها به علت مزایایی که دارند به عنوان گزینه‌ای بالقوه مناسب برای انتقال ژن مطرح شده‌اند و روز به روز استفاده از آنها نه تنها در مطالعات انتقال ژن با اهداف ژن‌درمانی (۲۱و۱۰-۷) بلکه با اهداف دیگری از قبیل انتقال دارو (۱۵-۱۲) و واکسینه کردن (۱۷و ۱۶) نیز افزایش می‌یابد.

در این مطالعه ابتدا ذرات فاژی M13 حاوی توالی ژن GFP ساخته شدند که با داشتن آغازگر CMV توانایی بیان ترانسژن در سلول‌های پستانداران را پیدا کرده‌اند. در بررسی میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با ذرات فاژی M13-GFP، سلولهای GFP مثبت مشاهده شدند که این مشاهده مؤید صحت ساخت، فعال بودن و نیز دستیابی به یک سازه پایه‌ای فاژی M13 می‌باشد که قابل استفاده در آزمایشات انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی پس از اتصال ملکول‌های هدفگیری خواهد بود. بررسی انتقال و بیان ژن GFP توسط حامل بدست آمده نشان داد که در دوزهای آلوده‌سازی (MOI) پایین‌تر از 1×10^{5} cfu/ml انتقال و بیان ژن مشاهده نمی‌شود. با اینحال با افزایش دوز آلوده‌سازی، کارآیی انتقال و بیان ژن نیز افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهند که انتقال ژن با واسطه فاژ وابسته به دوز بوده و در دوزهای پایین مشاهده نمی‌شود. این یافته مهر تأیید دیگری بر بی‌خطر بودن نسبی فاژها (۱۱) می‌باشد. در واقع عدم آلوده‌سازی در دوزهای پایین می‌تواند یک مزیت بزرگ محسوب شود، چراکه می‌توان این ذرات را با اتصال لیگاندهای خاص هدفمند کرده (۲۲و۱۹و۱۸و۱۵و۱۲و۱۰و۷و۲) و به سلول مورد هدف درمان ارسال کرد بدون اینکه به سایر سلول‌ها و بافت‌ها وارد شوند و آنها را تحت تأثیر قرار دهند. در سال ۱۹۹۹ Poul و Marks ذرات فاژی M13 که آنتی بادی علیه گیرنده سطح سلولی ErbB2 را به صورت متصل به پروتئین P III خود داشتند از غربالگری کتابخانه فاژی بدست آورده و پس از مهندسی و وارد کردن ژن GFP به ژنوم فاژ، آنها را برای انتقال ترانسژن به سلول‌هایی که گیرنده ErbB2 را در سطح خود بیش بیان می‌کردند بکار بردند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که ۴ درصد از سلولها GFP مثبت هستند. این مطالعه نشان می دهد که هدفگیری فاژها می تواند به بهبود کارآیی انتقال و بیان ترانسژن بیانجامد (۸). مطالعات دیگری در همین راستا با استفاده از فاژ M13 انجام گرفته است که همگی گواه افزایش کارآیی انتقال و بیان ترانسژن در صورت هدفگیری می باشند. اما چون تعداد ملکول‌های هدفگیری متصل به سطح آنها کم بود (حداکثر ۵ ملکول) کارآیی انتقال نیز پایین بوده است (۱۰و۹و۷).

با در نظر داشتن مزیت‌های دیگر ذرات فاژی از قبیل حفاظت از ترانسژن توسط پوشش پروتئینی و توانایی تحمل محیط‌های نامساعد از قبیل pH های بالا و پایین که در اندام‌های مختلف بدن می‌توان با چنین شرایطی برخورد کرد، اهمیت استفاده از آنها در صورت هدفمندسازی بیشتر جلوه می‌کند. علاوه بر این در دسترس بودن فناوریهای قوی مثل فاژنمایی (۲۳)، امکان هدفگیری و جستجوی لیگاندهای اختصاصی اهداف مختلف را با فاژ صدچندان کرده و آنها را به عنوان گزینه مناسبی برای مطالعات انتقال ژن مطرح کرده است. مضاف بر این، ذرات فاژی با روش‌های اتصال شیمیایی نیز قابل هدفمندسازی می‌باشند. به طوری که Li و همکاران (۱۹) با اتصال شیمیایی فولیک اسید و فلورسین(fluorescein) به سطح ذرات فاژی M13 انتقال هدفمند آنها را به سلول‌های سرطانی KB با هدف کاربردی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

تصویربرداری گزارش کرده‌اند. همچنین گروه ما ذرات فاژی λ-GFP را به عنوان یک چارچوب اساسی در مطالعه انتقال ژن بکارگرفته و با اتصال شیمیایی ترانسفرین به سطح آنها، آلوده‌سازی هدفمند سلول‌های رده 293 T انسانی را با نانوحامل هدفمندشده حاصل، اخیراً گزارش کرده‌اند (۲۴و۲۲). در ادامه آن مطالعات و در پژوهش حاضر، ذرات فاژی M13 حاوی GFP تولید و توانایی آنها در انتقال و بیان ژن به سلول‌های AGS انسانی مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که با طراحی حامل‌هایی بر پایه فاژ M13، می‌توان از آنها به عنوان حامل ژنی برای انتقال ژن به سلول‌های یوکایوتی از جمله انسان استفاده کرد. با این وجود کارآیی ورود و انتقال ترانسژن توسط حامل ساخته شده در این پژوهش بسیار پایین می‌باشد چراکه حامل مذکور هیچ ملکول هدفگیری در سطح خود ندارد. کارآیی پایین نشان می دهد که حامل ساخته شده گرایشی برای ورود به سلول‌های یوکاریوتی ندارد که حاکی از ایمن و بی خطر بودن آن است. بدین ترتیب می توان گفت در صورت اتصال ملکول‌های هدفگیری به سطح حامل ساخته شده، انتقال هدفمند ژن به بافت یا سلول‌های مورد نظر بدون ورود به بافت‌ها و سلول‌های غیر هدف می‌تواند عملی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز و صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری به انجام رسیده است که از آنها قدردانی می‌شود.

Reference

1. Michael SI, Curiel DT. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptormediated endocytosis pathway. Gene Ther 1994;1:223- 32.
2. Piersanti S, Cherubini G, Martina Y, Salone B, Avitabile D, Grosso Fand et al. Mammalian cell transduction and internalization properties of lambda phage displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain. Mol Med 2004;82:467–76.
3. Thomas C, Ehrhardt A, Kay M. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. NatRev Genet 2003;4:346–58.
4. Chen D, Murphy B, Sung R IB. Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. Gene Ther 2003;10:991–8.
5. Herweijer H, Wolff J. Progress and prospects :naked DNA gene transfer and therapy. Gene Ther 2003;10:453–8.
6. Schmidt-Wolf G, Schmidt-Wolf I. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. Trends Mol Med 2003;9:67–72.
7. Larocca D, Witte A, Johnson W, Pierce GF, Baird A. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. Hum Gene Ther 1998;9:2393–9.
8. Poul MA, Marks JD. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. Mol Biol 1999;288:203-11.
9. Larocca D, Kassner P, Witte A, Ladner R, Pierce G, Baird A. Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophages. FASEB J 1999;6:727–34.
10. Larocca D, Jensen-Pergakes K, Burg M, Baird A. Receptor-targeted gene delivery using multivalent phagemid particles .Mol Ther 2001;3:476–84.
11. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and applications. Florida: Boca Raton FL CRC Press; 2005.p.15-17.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]

12. Stephanopoulos N, Tong GJ, Hsiao SC, Francis MB. Dual-surface modified virus capsids for targeted delivery of photodynamic agents to cancer cells. ACS Nano 2010;4:6014-20.
13. Wu W, Hsiao SC, Carrico ZM, Francis MB. Genome-free viral capsids as multivalent carriers for taxol delivery. Angew Chem Int Ed 2009;48:9493–7.
14. Yacoby I, Bar H, Benhar I. Targeted drug-carryingbacteriophage as antibacterial nanomedicines. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2156-63.
15. Yacoby I, Shamis M, Bar H, Shabat D, Benhar I. Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophage. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2087-97.
16. Catherine D, Clark J, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. Vaccine 2004;22:2413-9.
17. March J, Clark J. Genetic immunization against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles .Vaccine 2004;22:1666-71.
18. Huan RK, Steinmetz NF, Fu CY, Manchester M, Johnson JE. Transferrin-mediated targeting of bacteriophage HK97 nanoparticles into tumor cells. Nanomedicine 2011;6:55-68.
19. Li K, Chen Y, Li S, Nguyen HG, Niu Z, You Sandet al. Chemical modification of M13 bacteriophage and its application in cancer cell imaging. Bioconjug Chem 2010;21:1369–77.
20. Kim A, Shin TH, Shin SM, Pham CD, Choi D-K, Kwon MH, and et al. Cellular internalization mechanism and intracellular trafficking of filamentous M13 phages displaying a cell-penetrating transbody and tat peptide. PloS One 2012;7(12):e51813.
21. Rangel R, Guzman-Rojas L, Le Roux LG, Staquicini FI, Hosoya H, Barbu EMandet al. Combinatorial targeting and discovery of ligand-receptors in organelles of mammalian cells. Nat Commun 2012;3:788.
22. Khalaj-Kondori M, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, Saggio I, Monaci P. Chemical coupling as a potent strategy for preparation of targeted bacteriophage-derived gene nanocarriers into eukaryotic cells. Gene Med 2011;13:622–31.
23. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985;228:1315-7.
24. Khalaj-kondori M, Sadeghizadeh M, Behmanesh M. Bacteriophage lambda-mediated gene transfer into human AGS cell line. Chemical, Biological and Environmental Engineering (ICBEE), 2010 2nd International Conference on, 2-4 Nov. 2010 Cairo;176-9.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06]

[DOI: 10.22102/19.2.114]