Subcloning of NGF Gene into pSecTag2/Hygro Secretory Vector and Expression in PC12 Cell Line

Bahman Jalali Kondori[1*], Mohammad Hossein Asadi[1], Fateme Azemati[2]

[1]Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Article Info:

Received: **15 Sep 2014** ***Accepted:*** **30 Dec 2014**

ABSTRACT

Introduction: Subcloning of specific genes in plasmids and transfecting them into target cells for producing therapeutic proteins or cell differentiation, is suggested as one of the most effective treatment methods for different diseases. Nerve growth factor (NGF) is one of the members of the neurotrophin family. Neurotrophins are a family of proteins that regulate the survival, differentiation, and function of different types of neurons. Studies showed that NGF gene expression in stem cells induces differentiation toward neuron-like cells as well as the growth of axons and its branching. ***Materials and Methods:*** In this research, enzymatic digestion on a plasmid carrying NGF gene was performed and extracted. NGF gene was subcloned into pSecTag2/Hygro secretory plasmid. The subcloned plasmid was precipitated and concentrated. It was then transfected by Lipofectamine into PC12 cell line. NGF gene expression and protein production were evaluated using RT-PCR and western blot methods. ***Results:*** Sequence determination indicated that secretory plasmid subcloning process has been correct. Expression of NGF gene in transfected PC12 cells was shown by RT-PCR method and production of its protein was proved by the results from western blots. ***Conclusion:*** Subcloning of NGF gene in pSecTag2 secretory vector is a suitable technique for transfer to eukaryotic cells.

Key words:

1. Transfection
2. Genetic Vectors
3. Nerve Growth Factors
4. PC12 Cells

**** Corresponding Author:*** Bahman Jalali Kondori

E-mail: *Bahmanjalali2010@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

ساب کلونینگ ژن NGF در وکتور ترشحی pSecTag2/Hygro و بیان آن در سلول‌های ردهٔ PC12

بهمن جلالی کندری[۱*]، محمد حسین اسدی[۱]، فاطمه عظمتی[۲]

[۱] گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
[۲] گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۴ شهریور ۱۳۹۳
تاریخ پذیرش: ۹ دی ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: ساب کلونینگ ژن‌های اختصاصی در پلاسمیدها و انتقال آن‌ها به سلول‌های هدف به منظور تولید پروتئین‌های درمانی یا تمایز سلول به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌های درمان برای بیماری‌های مختلف پیشنهاد می‌شود. فاکتور رشد عصب (NGF) یکی از اعضای خانواده نوروتروفین‌ها است. نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقاء، تمایز و عملکرد انواع مختلف نورون‌ها را تنظیم می‌کنند. مطالعات نشان دادندکه بیان ژن NGF در سلول‌های بنیادی موجب القای تمایز به سمت سلول‌های شبه نورون و رشد آکسون و شاخه‌های آن می‌گردد. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق هضم آنزیمی بر روی یک پلاسمید حامل ژن NGF انجام گردید و این ژن استخراج شد. ژن NGF در پلاسمید ترشحی pSecTag2 ساب کلون گردید. پلاسمید ساب کلون شده رسوب‌گیری و تغلیظ گردید. سپس با استفاده از لیپوفکتامین به داخل سلول‌های ردهٔ PC12 ترانسفکت شد. بیان ژن NGF و تولید پروتئین آن با استفاده از روش‌های RT-PCR و وسترن بلات ارزیابی گردید. **یافته‌ها:** تعیین توالی نشان داد که فرایند ساب کلونینگ پلاسمید ترشحی درست بوده است. بیان ژن NGF در سلول‌های ترانسفکت شده PC12 به وسیلهٔ روش RT-PCR نشان داده شد و تولید پروتئین آن در نتایج وسترن بلات اثبات شد. **نتیجه گیری:** ساب کلونینگ ژن NGF بر روی وکتور ترشحی pSecTag2 یک روش مناسب جهت انتقال به سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد.

کلید واژه‌ها:
۱. ترانسفکشن
۲. ناقلین ژنتیکی
۳. فاکتورهای رشد عصبی
۴. سلول‌های PC12

* **نویسنده مسئول:** بهمن جلالی کندری
آدرس الکترونیکی: *Bahmanjalali2010@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

مقدمه

ژن درمانی یکی از روش‌های با ارزش در درمان بیماری‌ها و تولید سلول‌های تمایز یافتهٔ ویژه می‌باشد. امروزه با استفاده از روش ساب کلونینگ، ژن‌های خاصی با هدف تشخیصی و حتی درمانی به کار برده می‌شوند. مطالعات گسترده‌ای در زمینهٔ انتقال ژن جهت برطرف کردن نقص ژنی یا درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است (۴-۱). یکی از جنبه‌های با ارزش ژن درمانی، انتقال ژن‌های خاص به درون سلول‌های بنیادی یوکاریوتی جهت القای تمایز آن‌ها به سلول‌های بالغ ویژه می‌باشد. برای انتقال ژن درمان کننده از پلاسمیدها که مولکول‌های کوچکی از مارپیچ دولایه DNA می‌باشند، استفاده می‌شود.

در تحقیقات مختلف از روش‌های مختلفی برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های بنیادی استفاده شده است. از جملهٔ این روش‌ها می‌توان به لیپوفکشن[1]، میکرواینجکشن[2]، الکتروپوریشن[3] و استفاده از وکتورهای ویروسی اشاره کرد که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود می‌باشند. روش انتقال غیرویروسی، کم هزینه تر، آسان تر و نسبت به روش‌های ویروسی ایمن تر می‌باشد (۵). از سال ۱۹۸۰ از لیپوزوم‌های مصنوعی نیز برای انتقال اسید نوکلئیک‌ها به درون سلول استفاده شد. ترانسفکت سلول‌ها با واسطهٔ لیپوزوم، هم برای ترانسفکت گذرا و هم ترانسفکت پایدار امکان‌پذیر است. در روش لیپوفکشن جهت انتقال ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتی از لیپیدهای کاتیونی استفاده می‌شود. از میان لیپیدهای کاتیونی، لیپوفکتامین بیشترین بازده انتقال را دارد (۶).

نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که میزان بقاء، تمایز و مرگ انواع مختلف سلول‌های عصبی را تنظیم می‌کنند (۱۰-۷). در تحقیقات مختلف از انتقال ژن نوروتروفین‌ها به داخل سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌ها استفاده شده است. برای مثال Masao و همکاران در سال ۲۰۰۷، سلول‌های بنیادی ترانسفکت شده با ژن BDNF[4] را به ناحیهٔ آسیب دیدهٔ نخاع پیوند زدند و نتایج گزارش شده بسیار قابل توجه بوده است (۱۱). Jie Ding و همکاران در سال ۲۰۱۱ سلول‌های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژن NGF[5] و Noggin را برای درمان ضایعات نخاعی به کار بردند (۱۲). همچنین در یک تحقیق انجام شده توسط Li-Yan Li و همکاران، نشان داده شد که سلول‌های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده به وسیلهٔ NGF در بهبود بیماری آلزایمر مؤثر می‌باشد (۱۳). NGF جهت فعالیت بیولوژیکی خود به گیرندهٔ اختصاصی خود بر روی غشای سلولی به نام Trk A[6] اتصال می‌یابد (۱۵، ۱۴).

در اکثر تحقیقات از پلاسمیدهای حامل استفاده شده است که ژن مورد نظر را به سیتوپلاسم سلول میزبان منتقل کرده و بیان می‌گردد و همان سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این مطالعه از پلاسمید ترشحی pSecTag2/Hygro استفاده گردید. زمانی که از پلاسمید ترشحی استفاده می‌شود، پروتئین حاصل از بیان ژن، به دلیل دارا بودن سیگنال پپتید Murine Ig kappa قادر می‌باشد از سیتوپلاسم آن سلول خارج گشته و در محیط بین سلولی قرار بگیرد. ترشح پروتئین در محیط بین سلولی این امکان را به آن پروتئین می‌دهد تا سلول‌های مجاور و خود آن سلول را تحت تأثیر قرار دهد. لذا کارایی روش درمانی بیشتر می‌شود. همچنین این پلاسمید به دلیل داشتن ژن مقاوم به هیگرومایسین، امکان جدا کردن سلول‌های یوکاریوتی ترانسفکت شده از سلول‌های ترانسفکت نشده را فراهم می‌کند. داشتن محل‌های مختلف جهت فعالیت آنزیم‌های محدود کننده از دیگر مزایای این پلاسمید ترشحی می‌باشد.

ردهٔ سلولی PC12 از فئوکروموسیتومای[7] فوق کلیهٔ موش صحرایی به دست می‌آید. تحقیقات مختلف نشان داده است که این رده سلولی در حضور NGF شروع به گسترش نوریت‌های[8] سلولی کرده و فنوتیپ آن به سمت سلول‌های شبه عصبی پیش می‌رود (۱۶).

مواد و روش‌ها

ترانسفورم و تکثیر پلاسمیدها

پلاسمید pCMV-SPORT6 محتوی ژن NGF و پلاسمید ترشحی pSecTag2/Hygro خریداری شده با استفاده از محلول کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی مولار و شوک گرمایی ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد به درون باکتری مستعد E.coli سویه Top10 ترانسفورم گردید. باکتری ترانسفورم شده در محیط کشت لوریا برتانی[9] (LB) جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شده و در شرایط استریل، تک کلون تهیه و در محیط کشت لوریا برتانی مایع به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید. پلاسمید حامل ژن NGF و پلاسمید ترشحی به صورت جداگانه کشت و تکثیر داده شد و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (High pure plasmid isolation kit-Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید. جهت ارزیابی میزان خلوص و ساختار پلاسمیدها الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد انجام شد.

ساب کلونینگ ژن NGF در پلاسمید ترشحی

پلاسمید pCMV-SPORT6 (Invitrogen) و پلاسمید ترشحی pSecTag2 (Invitrogen) به وسیلهٔ آنزیم‌های محدود کنندهٔ Kpn1 (Fermentas) و Xho1 (Fermentas) به طور جداگانه هضم دو مرحله‌ای[10] گردیدند. عمل برش آنزیمی به مدت ۲ ساعت در دمای محیط ادامه یافت. سپس آنزیم‌ها با قرار گرفتن در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، غیرفعال شدند. محصول واکنش هضم آنزیمی پلاسمید حامل ژن NGF و پلاسمید ترشحی به طور جداگانه بر روی ژل الکتروفورز برده

[1] Lipofection
[2] Microinjection
[3] Electroporation
[4] Brain-derived neurotrophic factor
[5] Nerve growth factor
[6] Tyrosine kinase receptor
[7] Pheochromocytoma
[8] Neurites
[9] Luria Bertani
[10] Double digest

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

شدند و صحت برش آنزیمی بررسی گردید.

باند مربوط به ژن NGF بر روی محصول الکتروفورز به وسیلهٔ کیت استخراج DNA از ژل (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit- Fermentas) جدا شد. پلاسمید ترشحی pSecTag2 هم که به دلیل هضم آنزیمی خطی شده بود به طور جداگانه با استفاده از همان کیت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداگردید. مقدار ۳۰۰ نانوگرم از NGF خطی و ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید ترشحی pSecTag2 خطی شده، به وسیلهٔ آنزیم T4 DNA ligase (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به همدیگر اتصال پیدا کردند. پلاسمید ترشحی pSecTag2 حاوی ژن NGF به داخل باکتری ترانسفورم شده و باکتری به مدت یک شب در انکوباتور کشت داده شد. پلاسمید ساب کلون شده استخراج و بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. پلاسمید ترشحی ساب کلون شده دوباره به وسیلهٔ همان آنزیم‌های محدود کننده هضم دومرحله‌ای و سپس بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. باند مربوط به ژن NGF شناسایی و از بقیهٔ ژل جدا شده و با استفاده از کیت (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit- Fermentas) از ژل استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت اثبات وجود ژن NGF به کار برده شد. پلاسمید ساب کلون شده جهت تعیین توالی به شرکت TAG Copenhagen ارسال شد. نتایج تعیین توالی ژن NGF جهت تطابق با ژن‌های موجود (Gene ID: 4803) در بانک ژنی در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast بلاست گردید.

ترانسفکت سلول‌های PC12 با پلاسمید ساب کلون شده

در ادامه جهت بررسی بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی، پلاسمید ساب کلون شده به داخل سلول‌های ردهٔ PC12 ترانسفکت شد. از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ جهت انتقال پلاسمید به داخل سلول‌ها استفاده گردید. برای این منظور سلول‌های ردهٔ PC12 در داخل یک فلاسک کشت داده شدند تا به تراکم سلولی بالای ۸۰ درصد برسند. محیط کشت سلول‌ها تعویض و از محیط کشت بدون سرم استفاده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ۷۵۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم در یک میکروتیوب ریخته و ۲۵ میکرولیتر از لیپوفکتامین به آن افزوده شد. در یک میکروتیوب دیگر نیز ۷۵۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم ریخته و به آن ۱۰ میکروگرم از پلاسمید ساب کلون شده افزوده گردید. هر دو میکروتیوب به خوبی پیپتاژ شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردیدند. سپس میکروتیوب حاوی لیپوفکتامین بر روی میکروتیوب دیگر اضافه شد و به مدت ۲۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس به آرامی بر روی سلول‌ها افزوده شد. سلول‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت یک شب انکوبه شدند و سپس محیط کشت تعویض گردید.

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

۴۸ ساعت بعد از ترانسفکت، حدود ۸×۱۰^{۵} سلول، تریپسینه شده و با استفاده از کیت استخراج RNA (High PureRNA Isolation Kit-Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل استخراج شد. سپس از آنزیم DNase I به منظور از بین بردن DNA و افزایش خلوص RNA استفاده گردید. cDNA مربوط به mRNA سلول‌های ترانسفکت شده به وسیلهٔ آنزیم Reverse Transcriptase طی مرحلهٔ رونویسی معکوس سنتز گردید. با بررسی توالی مربوط به ژن NGF پرایمرهای مناسب جهت انجام RT-PCR طراحی و سفارش داده شدند.

F-Primer: 5′-CAACAGGACTCACAGGAGCA-3′
R-Primer: 5′-GTCTGTGGCGGTGGTCTTAT-3′

محصول تولید شده از این پرایمرها دارای ۱۱۶ جفت باز خواهد بود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۲ میکرولیتر از cDNA، ۲۵ میکرولیتر از Master mix 2X (Fermentas) در داخل میکروتیوب ریخته شد. ۵۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها به میکروتیوب افزوده شده و حجم نهایی با آب Nuclease free به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب بعد از مخلوط شدن در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و برنامه مناسب طبق جدول ۱ تعریف گردید.

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

جهت بررسی سنتز پروتئین NGF در سلول‌های ترانسفکت شده از این روش استفاده شد. ابتدا حدود یک میلیون سلول تریپسینه شده و بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ rpm مایع رویی تخلیه و سلول‌ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. رسوب سلولی با بافر لیز کننده (Protein Extraction kit-ProteoJET™ Membrane Fermentas) پیپتاژ شده و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر در دمای محیط قرار داده شد. سپس میکروتیوب سانتریفیوژ شده و مایع شفاف رویی که محتوی پروتئین سلول‌ها است جدا گردید. نمونهٔ پروتئینی به همراه نشانگر[11] پروتئینی در چاهک ژل پلی اکریل آمید قرار داده شد.

جدول ۱- مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر.

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵°C	۴۵ ثانیه	۳۵
Annealing	۶۰°C	۴۵ ثانیه	
Extension	۷۲°C	۴۵ ثانیه	
Final Extension	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

[11] Marker

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

در این تحقیق از ژل جداکنندهٔ ۱۲ درصد و ژل متراکم کنندهٔ ۴ درصد جهت الکتروفورز پروتئین‌ها استفاده شد. باندهای پروتئینی روی ژل پلی اکریل آمید بر روی کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شد. از آلبومین سرم گاوی ۳ درصد جهت مرحلهٔ مسدودسازی استفاده گردید. سپس کاغذ نیتروسلولز شستشو داده شده و آنتی بادی اختصاصی اولیه افزوده شد. در ادامه بعد از شستشوی مجدد، آنتی بادی ثانویه افزوده شد. کاغذ بلات شده بعد از شستشو در محلول سوبسترای TMB[12] قرار داده شد تا باندهای پروتئینی قابل مشاهده گردد.

یافته‌ها

نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده نشان داد فرایند ترانسفورم پلاسمیدها با استفاده از محلول کلسیم کلراید و شوک گرمایی، کشت باکتری و تخلیص پلاسمیدها به خوبی انجام شده و در نمونه‌های به دست آمده هیچ‌گونه اسمیر ناشی از DNA باکتریایی وجود ندارد. میزان خلوص پلاسمیدها هم با توجه به نسبت جذب A260/280 برابر با ۱/۸ و در حد استاندارد بود.

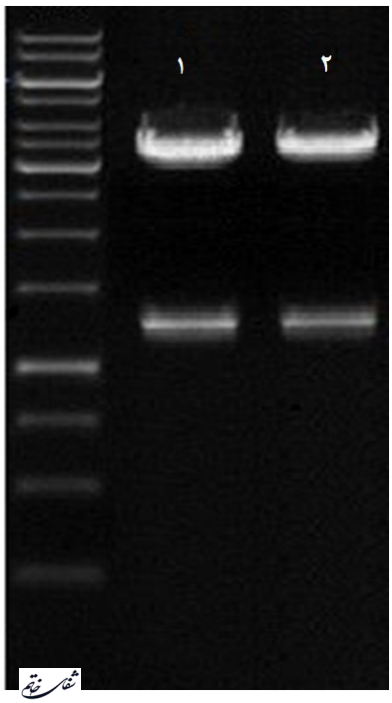
تصویر ۱ مربوط به نتایج الکتروفورز پلاسمید حامل، بعد از مرحلهٔ هضم آنزیمی است. در الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید pCMV-SPORT6 یک باند با وزن حدود ۱۲۰۰ جفت باز مشاهده می‌شود. این باند نشانگر ژن NGF می‌باشد که در اثر هضم دو مرحله‌ای از پلاسمید حامل جدا شده است.

همان‌طور که در تصویر ۲ دیده می‌شود وزن پلاسمید ساب کلون شدهٔ pSecTag2- NGF نسبت به خود پلاسمید pSecTag2 حدود ۱۲۰۰ جفت باز سنگین تر شده است.

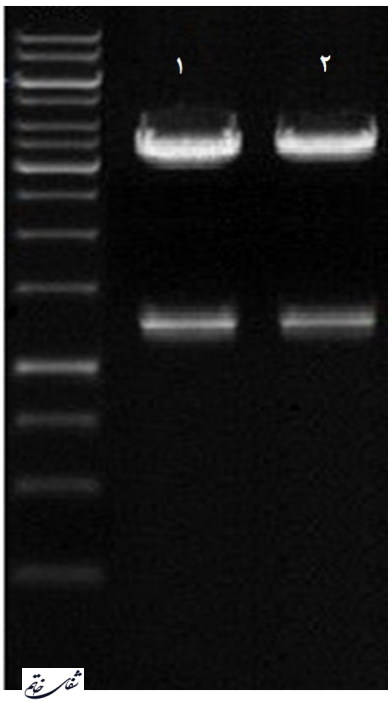
هضم آنزیمی مجدد بر روی پلاسمید ساب کلون شده، انجام شد. نتایج مطابق انتظار نشان داد یک باند با وزن حدود ۱۲۰۰ جفت باز از آن جدا گردید (تصویر ۳).

نتایج بلاست توالی ژن NGF در بانک ژنی در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast نشان دهندهٔ مشابهت ۹۹ درصدی توالی بود. این نتایج درستی فرایند ساب کلونینگ ژن NGF بر روی پلاسمید ترشحی را نشان می‌دهد.

نتایج RT-PCR نشان می‌دهد ژن NGF ساب کلون شده در داخل سلول‌های PC12 بیان گردیده و محصولی با وزن حدود ۱۱۶ جفت باز ایجاد کرده است. باند پروتئینی مربوط به پروتئین NGF در محصول ایمنوبلاتینگ[13] با وزن مولکولی حدود ۱۳ کیلو دالتون نیز بیانگر تولید پروتئین NGF در داخل سلول‌های ترانسفکت شده PC12 می‌باشد (تصویر ۴، ۵).



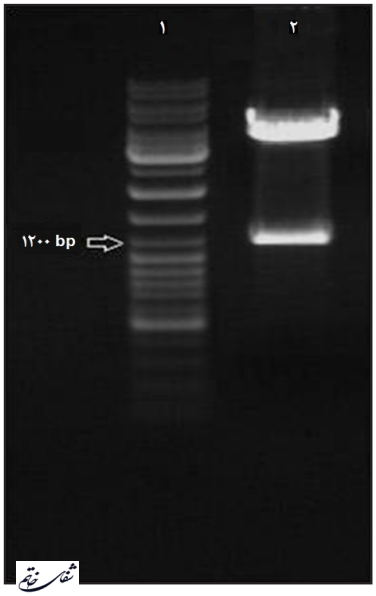
تصویر ۱- الکتروفورز پلاسمید حامل، بعد از مرحلهٔ هضم آنزیمی. ستون سمت چپ) GeneRuler 1 kb DNA Ladder ۱ و ۲) پلاسمید pCMV-SPORT6 هضم آنزیمی شده و باند مربوط به NGF از آن جدا شده است.



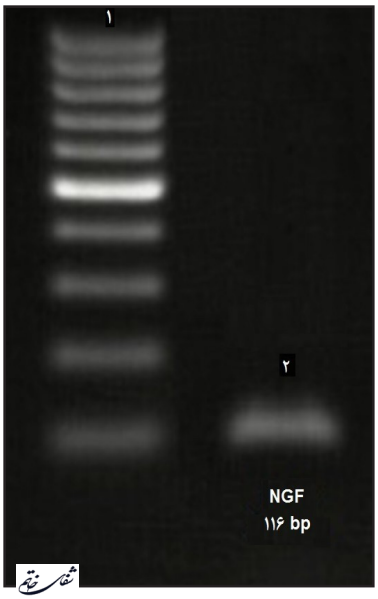
تصویر ۲- الکتروفورز پلاسمید ساب کلون شدهٔ pSecTag2- NGF به همراه پلاسمید pSecTag2. ستون سمت چپ) GeneRuler DNA Ladder Mix ۱) پلاسمید pSecTag2/Hygro با وزن حدود bp ۵۷۰۰ ۲) پلاسمید ساب کلون شدهٔ pSecTag2- NGF با وزن حدود bp ۷۰۰۰. پلاسمید ساب کلون شده به اندازهٔ وزن ژن NGF افزایش وزن نشان می‌دهد.

[12] Tetramethylbenzidine
[13] Immunoblotting

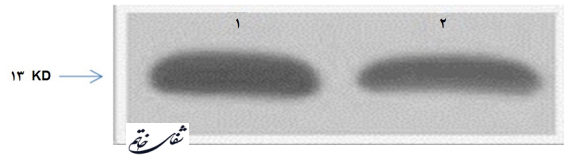
[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]



تصویر ۳- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید ساب کلون شدهٔ pSecTag2-NGF ۱) GeneRuler DNA Ladder ۲) Mix هضم آنزیمی پلاسمید ساب کلون شدهٔ pSecTag2-NGF. به دنبال هضم آنزیمی پلاسمید ساب کلون شده با دو آنزیم KpnI و XhoI ژن NGF از پلاسمید ساب کلون شده، جدا گردید.



تصویر ۴- بررسی بیان ژن NGF در سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از روش RT-PCR ۱) DNA Ladder 100 bp ۲) ژن NGF با وزن حدود ۱۱۶ جفت باز.



تصویر ۵- تصویر وسترن بلات مربوط به تولید پروتئین NGF در سلول‌های ترانسفکت شده. ۱) کنترل مثبت: شامل ۲۰ نانوگرم پروتئین NGF خالص ۲) پروتئین NGF تولید شده در سلول‌های ترانسفکت شده PC12.

بحث و نتیجه گیری

برای سال‌های متمادی درمان بسیاری از بیماری‌ها با استفاده از سلول درمانی، صورت گرفته است. در این روش سلول‌ها با به کار بردن مواد القاءکننده در محیط کشت به سمت سلول‌های هدف تمایز داده می‌شوند (۱۸، ۱۷). در سال‌های اخیر، بسیاری از محققین به ژن درمانی بر پایهٔ سلولی روی آورده‌اند. در این روش ژن مورد نظر به وسیلهٔ پلاسمیدهای حامل به داخل سلول وارد می‌شود. این سلول‌ها، ژن‌ها و فاکتورهای درمانی خاصی را بیان می‌کنند. ترشح طولانی مدت این فاکتورهای درمانی در این روش، باعث موفقیت درمان می‌شود زیرا ژن وارد شده به سلول، به طور مداوم بیان شده و سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. لذا فرایند تمایز سلول مقطعی و گذرا نخواهد بود.

یکی از نوآوری‌های تحقیق حاضر، استفاده از پلاسمید ترشحی pSecTag2 بود. در بیشتر تحقیقاتی که در گذشته انجام شده، سلول‌ها به وسیلهٔ پلاسمید حامل ترانسفکت شده‌اند. این پلاسمیدها بعد از ورود به سیتوپلاسم سلول ترانسفکت شده، داخل همان سلول بیان شده و فقط همان سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

در این تحقیق چندین عامل جهت افزایش کارایی ترانسفکت سلول‌های PC12 و افزایش بازدهی اثر پروتئین تولید شده در نظر گرفته شده است. استفاده از پلاسمید ترشحی pSecTag2 حاوی ژن NGF در تحقیقات آتی موجب می‌شود که ژن مورد نظر وارد سلول شده و در داخل آن سلول بیان شود. پروتئین حاصل به دلیل دارا بودن سیگنال پپتید از سیتوپلاسم آن سلول خارج گشته و در محیط بین سلولی قرار می‌گیرد. ترشح پروتئین در محیط بین سلولی این امکان را به آن پروتئین می‌دهد تا خود سلول و سلول‌های مجاور را تحت تأثیر قرار دهد. لذا کارایی و اثر پروتئین حاصل بیشتر می‌شود.

به منظور کاهش میزان مرگ و میر سلولی در اثر ترانسفکت پلاسمید ساب کلون شده، پلاسمید مورد نظر قبل از افزوده شدن به محیط کشت سلول‌ها با روش رسوب گیری پلاسمید با استفاده از ایزوپروپانول تغلیظ گردید. طی این فرایند حجم کمتری از پلاسمید با خلوص و غلظت بیشتر جهت ترانسفکت سلول‌ها به کار برده شد.

در مطالعهٔ ما از روش لیپوفکشن جهت ترانسفکت سلول‌ها

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

استفاده گردید. ترانسفکت سلول‌ها با واسطهٔ لیپوزوم نسبت به سایر روش‌های مشابه که به واسطهٔ مواد شیمیایی صورت می‌گیرد، مزیت‌هایی دارد. یکی از بزرگترین مزیت‌های این روش امکان ترانسفکت در هر دو محیط In vivo و In vitro می باشد. از دیگر مزایای آن امکان ترانسفکت پلاسمیدهایی با اندازه بزرگ، کارایی بالا در انتقال DNA و امکان ترانسفکت انواع خاصی از سلول‌ها که به کلسیم فسفات یا روش‌های دیگر مقاومت نشان می‌دهند، می‌باشد. در تحقیقات مختلف، از روش لیپوفکشن جهت انتقال پلاسمید حامل ژن‌های نوروتروفین استفاده شده است (۱۹).

در این تحقیق پروتئین تولید شده از ژن ترانسفکت شده در سلول‌های PC12 با استفاده از روش وسترن بلات قابل مشاهده بود. در بیشتر مطالعات قبلی پروتئین حاصل از ژن ترانسفکت شده به میزان کمتری تولید شده و به طور عموم با روش وسترن بلات قابل مشاهده نبوده است (۲۰). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با کنترل چند عامل مهم طی فرایند ساب کلونینگ و ترانسفکت سلول‌ها، میزان بیان ژن و تولید پروتئین می‌تواند افزایش یابد.

با توجه به هدف این تحقیق که تولید پلاسمید ساب کلون شده با ژن NGF جهت بهبود کارایی اثر ژن بر روی سلول‌ها بوده است، نتایج حاصل نشان می‌دهد ساب کلونینگ این ژن به درستی انجام شده است. تصاویر RT-PCR نشان دهندهٔ بیان ژن NGF در سلول‌ها و نتایج وسترن بلات هم بیانگر تولید پروتئین NGF در سلول‌های ترانسفکت شده می‌باشد. پلاسمید ساب کلون شده آماده به کارگیری در تحقیقات مختلف جهت افزایش کارایی اثر ژن NGF می‌باشد.

منابع

1. Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003; 43: 413-39.

2. Biçeroğlu S, Memiş A. Gene therapy: applications in interventional radiology. Diagn Interv Radiol. 2005; 11: 113-8.

3. Park S, Kim HT, Yun S, Kim IS, Lee J, Lee IS, et al. Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. Exp Mol Med. 2009; 41(7): 487-500.

4. Zhang ZH, Wang RZ, Wang RZ, Li GL, Wei JJ, Li ZJ, et al. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. Neurosci Lett. 2008; 444(3): 227-30.

5. Menuel S, Fontanay S, Clarot I, Duval RE, Diez L, Marsura A. Synthesis and complexation ability of a novel bis-(guanidinium)-tetrakis-(beta-cyclodextrin) dendrimeric tetrapod as a potential gene delivery (DNA and siRNA) system. Study of cellular siRNA transfection. Bioconjug Chem. 2008; 19(12): 2357-62.

6. Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, Zeinali S. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. Cytotherapy. 2008; 10(8): 815-23.

7. Heese K, Low JW, Inoue N. Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. Neurosignals. 2006-2007; 15(1): 1-12.

8. Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1996; 351(1338): 365-73.

9. Memberg SP, Hall AK. Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. Mol Cell Neurosci. 1995; 6(4): 323-35.

10. Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. J Neurobiol. 1994; 25(11): 1334-48.

11. Koda M, Kamada T, Hashimoto M, Murakami M, Shirasawa H, Sakao S, et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain derived neurotrophic factor to bone marrow stromal cells promotes axonal regeneration after transplantation in completely transected adult rat spinal cord. Eur Spine J. 2007; 16: 2206-14.

12. Ding J, Cheng Y, Gao S, Chen J. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats. J Neurosci Res. 2011; 89(2): 222-30.

13. Li LY, Li JT, Wu QY, Li J, Feng ZT, Liu S, et al. Transplantation of ngf-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of alzheimer' disease. J Mol Neuroscience. 2007; 34(2): 157-63.

14. Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA, et al. NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? Prog Brain Res. 2004; 146:111-26 .

15. Madduri S, Papaloïzos M, Gander B. Synergistic

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]

effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. Neurosci Res. 2009; 65 (1): 88-97.

16. Cao X, Shoichet MS. Defining the concentration gradient of nerve growth factor for guided neurite outgrowth. Neuroscience. 2001; 103(3):831-40 .

17. Zhang H, Wang JZ, Sun HY, Zhang JN, Yang SY. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation. Chin J Traumatol. 2004; 7(1):3-6 .

18. Naghdi M, Tiraihi T, Namin SA, Arabkheradmand J. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. Cytotherapy. 2009; 11(2):137-52 .

19. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. Neurobiol Dis. 2005; 18 (1): 184-192.

20. Triaca V, Tirassa P. Circulating NGF antibody alters the distribution of NG2 and CD56 positive cells in the brain of an animal model of inflammatory disorder. Arch Ital Biol. 2003; 141(2-3): 127-39.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.21]