مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۷
صفحات: ۱۹۶- ۱۸۵

بررسی القاء آپوپتوزیز بوسیله وکتور بیان کننده SiRNA در رده سلولی K562 در محیط کشت

محمدرضا جوادی[۱]، علی زارعی محمودآبادی[*]، مهدی کمالی[۲]، زهرا حجتی[۳]، علی نجفی[۴]

چکیده

اهداف. طراحی SiRNA مناسب بر علیه ژن Bcr/Abl وبه کار گیری وکتور بیان کننده مناسب (pRNA-H1.1/Neo)، به منظور بیان آن در رده سلولی سرطان لوکمیK562 وبررسی میزان تاثیر آن از طریق بررسی القاء آپوپتوزیز پس از انتقال وکتور به داخل سلول .

روش‌ها. براساس توالی mRNA مولکول کایمرای Bcr-Abl، توالی مناسب انتخاب و پس از طراحی آن به صورت ShRNA به DNA بیان کننده ShRNA تبدیل و بداخل وکتور بیان pRNA-H1.1/Neo منتقل شد .سپس صحت عمل کلونینگ ، با استفاده از PCR و تعیین سکانس مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تکثیر وکتور کلون شده با استفاده از لیپوفکتامین بداخل سلول K562 منتقل گردید و کارآیی روش انتقال با استفاده وکتور بیان کننده GFP مورد ارزیابی قرار گرفت. از وکتور اولیه کلون نشده و SiRNA با توالی غیر اختصاصی نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد.پس از انتقال وکتور بداخل سلول بررسی القاء آپوپتوزیز و وابستگی آپوپتوزیز به زمان از طریق سنجش میزان آپوپتوزیز در زمان های مختلف با کمک کیت تشخیص آپوپتوزیز و با استفاده از روش الایزا مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها. با استفاده از نتایج حاصل از PCR و هم چنین تعیین سکانس صحت عمل کلونینگ مورد تاییدقرار گرفت .با بیان پروتئین GFP و ظهور رنگ سبز فلورسانس در سلولهای حاوی وکتور ، عمل انتقال وکتور میزان کارآیی روش انتقال و بیان وکتور در سلول مورد تائید قرار گرفت کارآیی روش لیپوفکتامین معادل ۴۴٪ بود. میزان القاء آپوپتوزیز در سلولهای K562 آلوده به وکتور کلون شده در مقایسه با سلول های کنترل به میزان قابل توجهی در۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت پس از انتقال وکتور افزایش یافت . این افزایش وابسته به زمان بود بطوری که میزان آپوپتوزیز حاصل از غلظت۸/. میکرومولار در سلولهای حاوی وکتور کلون شده پس از ۷۲ ساعت معادل (۳/۲±۳۶)٪ ($P<0.0$) بود در حالیکه این میزان در سلولهای حاوی وکتور کنترل، سلول های حاوی کنترل منفی و سلول های نرمال به ترتیب معادل(۰/۶±۴/۸)٪ ،(۰/۸۶±۵/۲)٪ و (۰/۲۳±۵/۰۵)٪ بود. در میزان آپوپتوزیز در سلولهای کنترل با گذشت زمان تغییری مشاهده نشد. در حالیکه در سلول های آلوده با وکتور کلون شده متناسب با زمان میزان آپوپتوزیز نیز بطور معنی داری افزایش نشان می دهد.افزایش آپوپتوز با کاهش میزان mRNA ژن Bcr/Abl همراه بود که بیانگر تخریب mRNA توسط SiRNA داخل سلولی و ارتباط آن با آپوپتوزیز است.

نتیجه‌گیری. وکتور بیان کننده SiRNA بر علیه BCR/ABL بطور موفقیت آمیز کلون شده ونتایج حاصل از مطالعه نشان دهنده بیان داخل سلولی SiRNA توسط این وکتور بود که از طریق کاهش میزان mRNA ژن Bcr/Abl به طور موثری آپوپتوزیز را در سلولهای K562 القاء نمود. لذا استفاده از وکتور بیان کننده SiRNA می تواند بعنوان یک روش مولکولی جدید به منظور خاموش کردن ژن در درمان سرطان های مختلف بویژه CML مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: SiRNA، CML، pRNA-H1.1/Neo، bcr/abl، آپوپتوزیز

دریافت مقاله: ۳/۲۹/، پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۶/۶

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) ، تهران ، ایران
۱ گروه بیوشیمی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
۲ مرکز تحقیقات فن آوری نوین زیستی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۳ گروه زیست شناسی . دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران
۴ مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)