مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۶. شماره ۲. تابستان ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

بهینه سازی و مقایسه سه حامل تجاری درترانسفکشن موثر به سلول‌هـای تـک هسته ای خون محیطی (PBMCs)

سپیده خطیبی[۱]، زینب زارع[۲]، سید حمید آقایی بختیاری[۱،۳*]

۱. گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه مهندسی بافت و سلولی کاربردی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) از اجزای اصلی سیستم ایمنی بوده که در اغلب مطالعات ایمونولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. ترانسفکشن این سلول‌ها به این جهت که بیشتر روشهای انتقال به سلول‌های PBMC، بازدهی مناسبی ندارند، از موضوعات کلیدی محسوب می‌شود. هدف از مطالعه حاضر مقایسه سه حامل تجاری در ترانسفکشن سلول‌های خون محیطی است.

روش‌ها: جداسازی سلول های PBMC از خون محیطی توسط فایکول انجام شد. پس از کشت سلول های مذکور، وکتور PMAX-GFP با استفاده از کیت پلی فکت، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ به سلول ها ترانسفکت شد و میزان ترانسفکشن هر کدام از روش‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: میزان ترانسفکشن سلول‌های PBMC توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ پس از گذشت۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت حدود ۲ تا ۳ ٪ و میزان ترانسفکشن این سلول‌ها توسط پلی فکت پس از گذشت ۱۲۰ ساعت حدود ۷۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی بازده ترانسفکشن سلول‌های PBMC توسط پلی‌فکت نسبت با افزایش زمان بهترین بازدهی را داشت که روش جدیدی برای انتقال ژن به این سلول می باشد. به طور کلی می‌توان گفت عامل زمان و سمیت کمتر پلی فکت برای سلول های PBMC حائز اهمیت بوده و باعث افزایش بازده ترانسفکشن این سلول‌ها نسبت به سایر حامل های تجاری استفاده شده در این مطالعه می باشد.

کلید واژه‌ها:
سلول‌های خون محیطی، ژن رسانی، حامل غیر ویروسی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

سلول های تک هسته ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) به سلول های خونی گفته می شود که دارای یک هسته بوده و شامل لنفوسیت ها و مونوسیت ها می باشند (۱). این سلول ها جزء اصلی سیستم ایمنی بدن هستند که نقش مهمی در واکنش های ایمونولوژیک ایفا می کنند. پس از عفونت، سلول های PBMC قادر به تشخیص الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن بوده و پاسخ ایمونولوژیکی انتخابی را به وجود می آورند (۲). سلول های PBMC را می توان با استفاده از فایکول (یک پلی ساکارید آبدوست که اجزای خون را به صورت لایه لایه تفکیک می کند) و سانتریفوژ با شیب چگالی از سلول های خونی دیگر جداسازی کرد. در این صورت لایه رویی پلاسمای خون، لایه دوم سلول های PBMC، لایه سوم

*آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی
آدرس پست الکترونیک: Aghaeibh@mums.ac.ir

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

سلول هایی با هسته های چندشکل مانند نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها و لایه زیرین اریتروسیت ها خواهند بود (۳). سلول های PBMC می توانند در شرایط *in vitro* کشت شوند و به منظور درک واکنش های ایمنولوژیک مورد استفاده قرار گیرند. بدین ترتیب بهینه سازی انتقال ژن به سلول های PBMC در مطالعات ایمونولوژیکی و شبیه سازی شرایط *in vivo* از اهمیت بالایی برخوردار است. انتقال ژن به این سلولها از موضوعات کلیدی می باشد و بیشتر روشهای انتقال به سلول های PBMC، بازدهی مناسبی ندارند و تلاش های بسیاری برای غلبه بر این مشکلات انجام شده است. ابداع یک روش با اثربخشی بالا می تواند کمک ارزشمندی در مطالعات مربوط به این سلولها باشد (٤).

امروزه تعداد زیادی از تکنیک های انتقال ژن برای سلول‌های پستانداران به وجود آمده است. از جمله این روش ها می توان به لیپوفکشن، الکتروپوریشن، میکروانجکشن، انتقال هسته، نوکلئوفکشن، استفاده از وکتورهای ویروسی و روش های مبتنی بر به کارگیری سیستم همانندسازی نام برد که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود بوده و هر کدام در بازده انتقال، امکان پذیری، هزینه و زمان مورد نیاز، دائمی یا موقتی بودن بیان ژن و میزان سمیت با یکدیگر متفاوت هستند (٥).

معرف پلی فکت یکی از روش های انتقال ژن می باشد که به عنوان یک انتقال دهنده فعال دندریمر است که برای انتقال ژن به سلول های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرند. برای انتقال موفقیت آمیز ژن، یک اسید نوکلئیک که در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی شارژ منفی را حمل می کند، باید با غشای سلولی تماس بگیرد که آن هم بار منفی را حمل می کند. از ویژگی های مهم پلی فکت می توان به آسان و سریع بودن، بهره وری بالا و ارزان بودن اشاره کرد. پلی فکت دارای یک ساختار کروی است و DNA به ساختارهای آن متصل شده و می تواند به سلول وارد شود. کمپلکس پلی فکت و DNA دارای بار خالص مثبت است و به آن ها اجازه می دهد تا بر روی گیرنده های دارای بار منفی بر روی سطح سلول های یوکاریوتی، قرار گیرند. پس از ورود به سلول، پلی فکت به عنوان بافر عمل کرده و موجب مهار pH و فعالیت نوکلئازهای لیزوزومی می شود. این امر موجب ثبات کمپلکس پلی فکت و DNA شده و انتقال DNA به هسته را تضمین می کند (٦).

لیپوفکتامین یک ترکیب لیپوزوم کاتیونی است که با اتصال به مولکول های اسید نوکلیک عمل می کند و به آن ها اجازه می دهد تا بر نیروی الکترواستاتیک غشاء سلولی غلبه کرده و توسط سلول جذب شوند (۷). لیپوفکتامین یک معرف انتقال ژن کارآمد برای طیف گسترده ای از سلول های پستانداران است که بازده آن در برخی از انواع سلول ها نزدیک به ۹۰٪ می باشد (۸-۱۰). همچنین مطالعات انجام شده نشان داده اند که سیتوتوکسیسیتی حاصل از انتقال ژن توسط لیپوفکتامین در سلول های مختلف بسیار ناچیز می باشد (۱۰). با این حال بازده نهایی انتقال ژن توسط معرف های لیپیدی از جمله لیپوفکتامین توسط موانع بیولوژیکی همچون جذب سلولی، نقل و انتقالات داخل سلولی، فرار اندوزومی و غشاء هسته محدود می شود (۱۱، ۱۲). به این جهت بررسی هایی جهت افزایش بیشتر بازده انتقال ژن توسط لیپوفکتامین و معرف های لیپیدی انجام شده است (۱۳). به عنوان مثال Majumdar و همکاران در سال ۲۰۱٤ نشان دادند که سانتریفوژ سلول های PBMC کشت شده با سرعت کم، میزان بازده انتقال ژن توسط لیپوفکتامین را به صورت چشمگیری افزایش می دهد (١٤). بنابراین هدف از این مطالعه بهینه سازی اثر بخشی حامل های تجاری پلی فکت، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ در ترانسفکشن سلول های PBMC می باشد.

روش‌ها

جداسازی سلول های PBMC

جهت جداسازی سلول های PBMC به ٥ سی‌سی خون محیطی مقدار ۲ میکرولیتر هپارین اضافه شد و سپس ٥ میلی لیتر از محیط RPMI (شرکت گیبکو، آلمان) اضافه شد تا خون رقیق شود. سپس در فالکون ۱٥ میلی‌لیتری مقدار ٥ میلی‌لیتر از محلول فایکول (شرکت بهار افشان) ریخته شد و خون رقیق

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

شده کم کم به دیواره لوله فالکون حاوی فایکول اضافه شد تا خون در قسمت رویی محیط فایکول قرار بگیرد. پس از آن لوله فالکون حاوی خون در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰×g و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (شرکت هتیچ، آلمان) شد. پس از سانتریفیوژ در لوله ٤ فاز تشکیل شد که از پایین به بالا شامل گلبول های قرمز، سلول هایی با هسته های چندشکل مانند نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها، سلول های PBMC و سرم می باشد. سپس با احتیاط سرم را از محیط رویی خارج می کنیم تا سلول های PBMC که به صورت یک لایه سفید رنگ می باشد برداریم. بدین ترتیب لایه سفید رنگ را به همراه کمی سرم کشیده و به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به همراه ۵ میلی‌لیتر از محیط RPMI انتقال دادیم. سپس فالکون را در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و پس از سانتریفیوژ محلول دو فاز تشکیل می دهد. فاز زیرین شامل سلول های PBMC است که به صورت یک لایه رسوب سفید رنگ انتهای لوله ته نشین شده اند و فاز رویی حاوی سلول‌ها و فایکول اضافی می باشد که لایه رویی را خارج کرده و رسوب سلولی را در ۵ میلی‌لیتر از محیط RPMI حل نموده و معلق می نماییم.

کشت سلول های PBMC

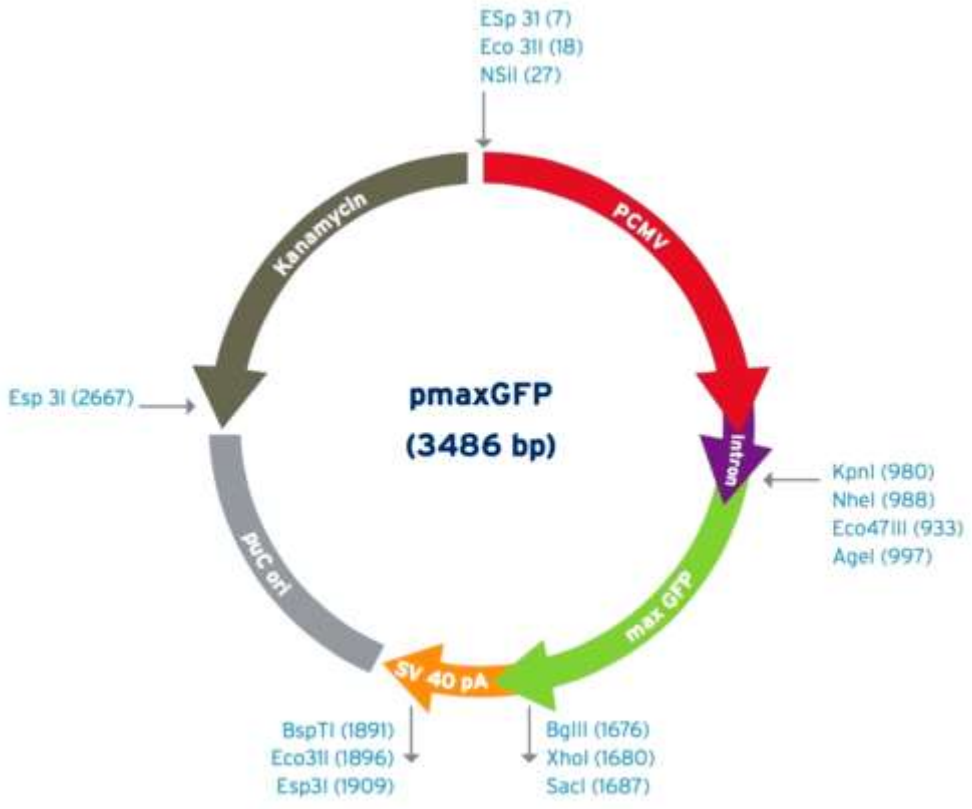
فالکون حاوی سلولها با دور ۳۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و به یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری که حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI و 10% FBS (شرکت گیبکو، آلمان) و ۲ میلی‌لیتر DMEM (شرکت گیبکو، آلمان) است انتقال می دهیم. روز بعد سلول های مونوسیت به صورت چسبنده و سلول های لنفوسیت به صورت سوسپانسون، در محیط رشد می کنند. پس از گذشت یک شب سلول ها دارای رشد زیادی شدند که بیشتر سلول های معلق بودند و برای تفکیک سلول های چسبنده از سلول های معلق، محلول سلولی را داخل یک فالکون ریخته و سانتریفیوژ نمودیم و رسوب سلولی را در ۲ میلی‌لیتر از محیط RPMI حل کرده و پیپتاژ کرده و در یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری که حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر محیط RPMI و 10% FBS کشت دادیم. سلول های چسبیده در فلاسک اول را نیز با محیط DMEM و 10% FBS کشت دادیم که تعداد سلول های چسبنده بسیار کمتر از سلول های معلق بود. سپس سلول ها به منظور ترانسفکت با کیت پلی فکت و و لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ بین دو پلیت ۲٤ خانه تقسیم شدند؛ بدین صورت که یک خانه از هر پلیت بعنوان شاهد و یک خانه برای ترانسفکشن در نظر گرفته شد.

استخراج پلاسمید

پلاسمید PMAX-GFP که کد کننده پروتئین GFP تحت پروموتور سایتومگالوویروس می باشد به باکتری اشرشیا کلی DH5α ترانسفرم گردید (شکل ۱). پس از کشت باکتری و رسیدن به رشد مناسب، با کیت تخلیص پلاسمید (شرکت اینترون، کره جنوبی) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. غلظت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده با دستگاه بیوفتومتر (شرکت اپندورف، آلمان) با ارزیابی جذب در طول موج ۲٦۰ و ۲٦۰/۲۸۰ صورت پذیرفت. بررسی پلاسمیدها از لحاظ میزان سوپرکویل و خلوص با الکتروفورز صورت گرفت.

ترانسفکشن سلول های PBMC توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰، لیپوفکتامین ۳۰۰۰ و پلی‌فکت برای ارزیابی روش ها بر یکدیگر، تمامی شرایط به جز نوع حامل مورد استفاده همانند دمای محیط، شرایط انکوباسیون و رطوبت یکسان بود. سلول های PBMC پس از گذشت ٤۸ ساعت از سانتریفیوژ، در چاهک های پلیت ۲٤ خانه با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM و 10% FBS به رسوب سلولی کشت داده شد. ۲ چاهک جهت ارزیابی هر یک از حامل های تجاری استفاده شد که یک چاهک به عنوان شاهد و دیگری به عنوان تست در نظر گرفته شد. به دو ویال ۰/۵ میلی‌لیتری، به ترتیب ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ و مقدار ٤۸ میکرولیتر از محیط اضافه گردید. به دو ویال ۰/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۸ میکروگرم وکتور PMAX-GFP با محیط به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد و ٤ لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. لوله‌های حاوی لیپوفکتامین ها و لوله های حاوی وکتور

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]



شکل ۱. پلاسمید PMAX-GFP

با هم مخلوط شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. ترانسفکشن با پلی‌فکت طبق پروتکل شرکت کیاژن، ۰/۳ میکروگرم DNA به همراه ۲۵ میکرولیتر محیط فاقد FBS و آنتی بیوتیک و ۲/۵ میکرولیتر از پلی‌فکت در یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد تا کمپلکس پلاسمید و حامل تشکیل شود. مخلوط ویال شامل کمپلکس پلاسمید و حامل ها به سلول ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۶-۱۷ ساعت تعویض محیط انجام گرفت تا حامل ها از محیط حذف شوند. در زمانهای مدنظر سلول ها به صورت کیفی با میکروسکوپ فلورسنت در حداقل ۱۰ نشان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ با میکروسکوپ با نور مرئی تعداد کلی سلولها شمارش شد و تعداد سلولهای ترانسفکت شده با نور فلورسنت شمارش شده و از تقسیم میانگین تعداد سلولهای ترانسفکت شده به کل سلولها درصد ترانسفکشن به دست آمد.

نتایج

میزان ترانسفکشن توسط لیپوفکتامین

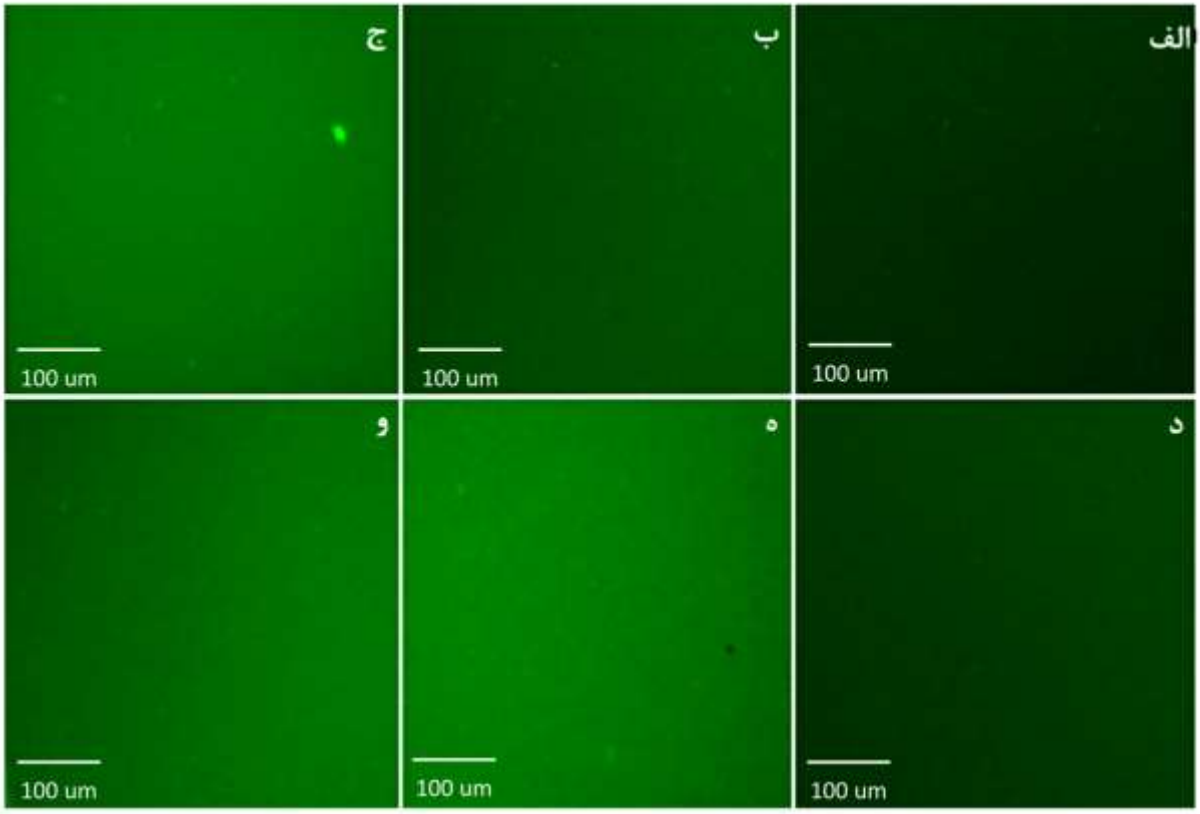
میزان ترانسفکت سلول های PBMC توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ پس از گذشت ۲۴ ، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت حدود ۲ تا ۳ ٪ بود (شکل ۲).

میزان ترانسفکشن توسط پلی‌فکت

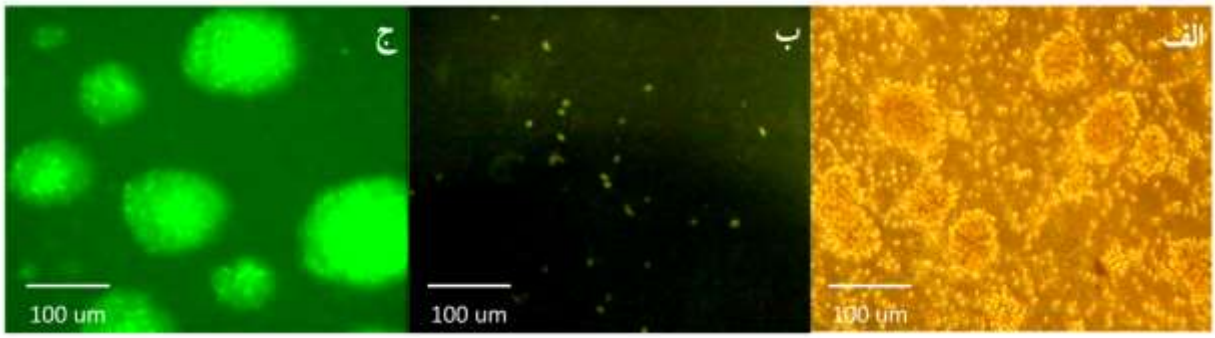
میزان ترانسفکشن سلول های PBMC پس از گذشت ۲۴ ساعت به روش پلی فکت، حدود ۲ تا ۳ ٪ بود؛ درحالی که پس از گذشت ۴۸ و۷۲ ساعت از ترانسفکشن، سلول های PBMC این میزان به ترتیب به حدود ۵ ٪ و ۳۰٪ رسید. همچنین پس از گذشت ۱۲۰ ساعت میزان ترانسفکشن این سلول ها توسط پلی فکت به حدود ۷۰٪ افزایش یافت (شکل ۳).

با توجه به نتایج بدست آمده درصد ترانسفکشن سه حامل مورد آزمون در شکل ۴ به دست آمد.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

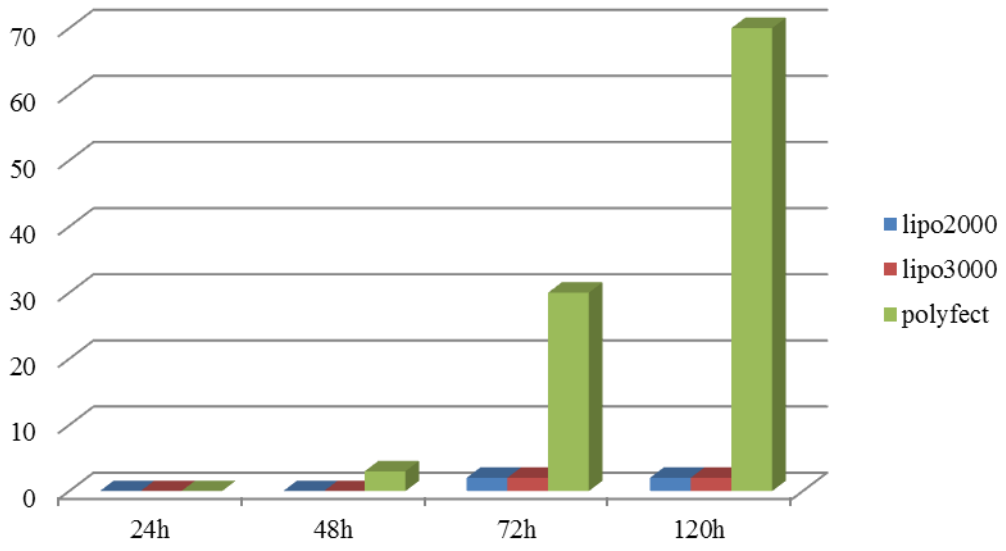


شکل ۲. ترانسفکت سلول های PBMC با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ پس از گذشت ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت. (الف) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ۲۴ ساعت؛ (ب) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ۷۲ ساعت؛ (ج) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ۱۲۰ ساعت؛ (د) لیپوفکتامین ۳۰۰۰ در ۲۴ ساعت؛ (ه) لیپوفکتامین ۳۰۰۰ در ۷۲ ساعت؛ (و) لیپوفکتامین ۳۰۰۰ در ۱۲۰ ساعت. در هر سه زمان نتایج ترانسفکشن توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ حدود ۲ تا ۳ درصد بود.



شکل ۳. ترانسفکت سلول های PBMC توسط کیت پلی‌فکت. (الف) سلول های PBMC کشت شده قبل از ترانسفکشن (ب) ترانسفکشن سلول های PBMCبعد از گذشت ۷۲ ساعت که نتایج نشان دهنده حدود ۳۰٪ ترانسفکشن بود؛ (ج) ترانسفکشن سلول های PBMC بعد از گذشت ۱۲۰ ساعت که نتایج نشان دهنده حدود ۷۰٪ ترانسفکشن بود.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]



شکل ۴. نمودار تاثیر بازده زمانی ترانسفکشن حامل های لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ و پلی فکت بر روی سلول های PBMC

بحث

سلول‌های PBMC از اجزای اصلی سیستم ایمنی بوده و از خون محیطی قابل جداسازی بوده و در مطالعه توکسیسیتی داروها یا ترکیبات شیمیایی جدید از اهمیت بالایی برخوردار هستند. همچنین دست کاری ژنتیکی این سلول ها جهت انجام مطالعات پایه در ایمونولوژی و نیز تحقیقات کاربردی در زمینه پزشکی بسیار ضروری می باشد. هدف از انتقال ژن به سلول‌های PBMC می تواند جهت القای سیستم ایمنی و ژن درمانی نام برد (۱). تاکنون روش های مختلفی برای انتقال ژن به سلول های PBMC استفاده شده است که هرکدام از این روش‌ها دارای معایب و مزایای مربوط به خود می باشند (۱۵، ۱۶). روش های غیر ویروسی انتقال ژن به دلیل داشتن ایمنی زیستی بالا اهمیت زیادی دارند هر چند که بازده پایین تری نسبت به روش های ویروسی دارند (۱۷). با توجه به اهمیت انتقال ژن در سلول های PBMC و همچنین اهمیت روش های غیر ویروسی انتقال ژن و بازده پایین این روش ها، در این مطالعه اثر بخشی حامل پلی فکت در ترانسفکشن سلول های PBMCs نسبت به لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ با استفاده از وکتور PMAX-GFP مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس نتایج این مطالعه ، میزان ترانسفکشن سلول های PBMC توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ در حدود ۲ تا ۳ درصد بود، حال آن که میزان ترانسفکشن این سلول ها به روش پلی فکت حدود ۷۰ ٪ محاسبه گردید. در یک مطالعه که بر روی ترانسفکشن سلول های بنیادی خونساز انسان انجام گرفت، نشان داده شد که میزان ترانسفکشن توسط پلی فکت بعد از یک هفته، حدود ۱۱ تا ۱۳٪ است (۱۸). در مطالعه دیگری که بر روی ترانسفکشن سلول های PBMC انجام گرفت، میزان ترانسفکشن توسط لیپوفکتامین بعد از ۱۸ ساعت، حدود ۲۸/۳ ٪ گزارش شد (۱٤). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی ترانسفکشن سلول های استرومایی مغز استخوان (BMSC) انجام گرفت، میزان ترانسفکشن بعد از ٥ ساعت توسط لیپوفکتامین حدود ۱۱٪ بود (۱۹). در یک ارزیابی دیگر میزان ترانسفکشن سلول های هپاتومای موشی، سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، سلول های بنیادی مزانشیمی سینوویوم زانوی انسان و سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش (C57) توسط پلی فکت به ترتیب ۵۰، ٤۰، ۲۱ و ۱۰ ٪ گزارش شد (۲۰). اختلاف در میزان بازده ترانسفکشن در

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

مطالعات ذکر شده می تواند به دلیل تفاوت در نوع سلول های مورد مطالعه و همچنین شرایط متفاوت انتقال ژن بسته به تفاوت شرایط آزمایش در بین مطالعات باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، می توان گفت که بازده ترانسفکشن سلول های PBMC توسط محلول پلی فکت در زمان های ۷۲ و ۱۲۰ ساعت نسبت به لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ بسیار بیشتر می باشد. همچنین بازده ترانسفکشن توسط پلی فکت با افزایش زمان به طور قابل توجهی افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان بازده ترانسفکشن در زمان ۱۲۰ ساعت حدود ۷۰ درصد مشاهده شد. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بازده ترانسفکشن سلول های PBMC توسط پلی فکت در زمان های بالا، نسبت به لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و لیپوفکتامین ۳۰۰۰ بالاتر می باشد. در مجموع این مقاله یک روش انتقال جدید بر مبنای افزایش زمان ارائه می کند که می تواند در انتقال ژن به این سلولها کمک کننده باشد. در این مطالعه به جهت اینکه با تغییر زمان به بازدهی مناسب رسیدیم سایر متغیرها را ارزیابی ننموده ایم. به طور کلی می توان گفت عامل زمان و سمیت کمتر پلی فکت برای سلول هایPBMC در مقایسه با سلولهای چسبنده مانند فیبروبلاست حائز اهمیت بوده و باعث افزایش بازده ترانسفکشن در این سلول ها نسبت به روش های معمول دیگر می باشد با این حال ممکن است نتایج متفاوتی با مطالعه بر روی سلول های دیگر، به دلیل تفاوت های فیزیولوژیک سلول های مختلف، به دست آید. این مطالعه می تواند به عنوان یک روش کاربردی جهت انتقال ژن به سلولهای خون محیطی که کاربرد های متعددی دارد استفاده شود. جهت دستیابی به بیشترین بازده ترانسفکشن سلول های PBMC، انجام مطالعات تکمیلی بر روی ترانسفکشن این سلول ها توسط سایر روش های انتقال ژن پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته جهت فراهم نمودت امکانات تحقیق سپاسگزاری می نمایند. هزینه این طرح از گرنت شماره ۹٤۰۷۵۸ دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین شده است.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

1. Pourahmad J, Salimi A. Isolated human peripheral blood mononuclear cell (pbmc), a cost effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and xenobiotics. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2015;14(4):979.

2. Camarca A, Gianfrani C, Ariemma F, Cimmino I, Bruzzese D, Scerbo R, Picascia S, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Valentino R. Human peripheral blood mononuclear cell function and dendritic cell differentiation are affected by bisphenol-a exposure. PloS one. 2016;11(8):e0161122.

3. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. Humana Press, New York, NY. 2014; pp. 53-61.

4. Van Camp K, Cools N, Stein B, Van de Velde A, Goossens H, Berneman ZN, Van Tendeloo V. Efficient mRNA electroporation of peripheral blood mononuclear cells to detect memory T cell responses for immunomonitoring purposes. Journal of immunological methods. 2010;354(1-2):1-10.

5. Phillips MI, Tang YL. Genetic modification of stem cells for transplantation. Advanced drug delivery reviews. 2008;60(2):160-72.

6. Handbook, PolyFect Transfection Reagent: For optimized transfection of COS-7, NIH/3T3, HeLa, 293 and CHO cells (09/2000). QIAGEN JP Behr. 1997; pp. 6-7.

7. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent:

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004;33(2):95-103.

8. Hawley-Nelson P. Lipofectamine reagent: a new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. Focus. 1993;15:73-9.

9. Ebadi P, Karimi MH, Pourfathollah AA, Saheb Ghadam Lotfi A, Soheili ZS, Samiee S, et al. The efficiency of CD40 down regulation by siRNA and antisense ODN: comparison of lipofectamine and FuGENE6. Iran J Immunol. 2009;6(1):1-11.

10. Wang J, Teng Z, Tian Y, Fang T, Ma J, Sun J, Zhu F, Wu J, Wang X, Yang N, Zhou X. Increasing cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles in human embryonic kidney cell line 293T cells by using lipofectamine 2000. Journal of biomedical nanotechnology. 2013;9(11):1882-90.

11. Lucas B, Remaut K, Sanders NN, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J. Towards a better understanding of the dissociation behavior of liposome-oligonucleotide complexes in the cytosol of cells. Journal of controlled release. 2005;103(2):435-50.

12. Rejman J, Bragonzi A, Conese M. Role of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo-and polyplexes. Molecular Therapy. 2005;12(3):468-74.

13. Cardarelli F, Digiacomo L, Marchini C, Amici A, Salomone F, Fiume G, Rossetta A, Gratton E, Pozzi D, Caracciolo G. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. Scientific reports. 2016;6:25879.

14. Majumdar M, Ratho R, Chawla Y, Singh MP. Evaluating the role of low-speed centrifugation towards transfecting human peripheral blood mononuclear cell culture. Indian journal of medical microbiology. 2014;32(2):164.

15. Van Camp K, Cools N, Stein B, Van de Velde A, Goossens H, Berneman ZN *et al.* Efficient mRNA electroporation of peripheral blood mononuclear cells to detect memory T cell responses for immunomonitoring purposes. J Immunol Methods 2010;354:1-10.

16. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. Hum Gene Ther 2010;21:65-74.

17. Chono H, Goto Y, Yamakawa S, Tanaka S, Tosaka Y, Nukaya I, Mineno J. Optimization of lentiviral vector transduction into peripheral blood mononuclear cells in combination with the fibronectin fragment CH-296 stimulation. The Journal of Biochemistry. 2010;149(3):285-92.

18. Shaikhpoor M, Khanahmad H, Shokrgozar M, Soleimani M, Zainali B, Kamali E, Moosavi SS, Zeinali S. Transfection of human hematopoietic stem cells by a gene targeting construct containing the β-globin gene. Yakhteh Medical Journal. 2010;12(2):199-206.

19. Clements BA, Incani V, Kucharski C, Lavasanifar A, Ritchie B, Uludağ H. A comparative evaluation of poly-l-lysine-palmitic acid and Lipofectamine™ 2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. Biomaterials. 2007;28(31):4693-704.

20. Kadivar M, Memari N, Fard-Esfahani P. Optimization and comparison of the polyfect gene delivery method in three different kinds of mesenchymal stem cell types. Yakhteh Medical Journal. 2010;12(2):191-8..

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2018, Volume 6, No.2: 1-9.

Original article

Optimization and comparison of three commercial carriers for efficient transfection into the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Sepideh Khatibi[1], Zainab Zare[2], Seyed Hamid Aghaee–Bakhtiari[*1,3]

1. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2. Department of Tissue Engineering & Applied cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Bioinformatics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding author*: Aghaeibh@mums.ac.ir**

Keywords:
PBMC cells,
Gene Delivery,
Non-viral vector

©2018 Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. All rights reserved.

Abstract

***Background & Aim**:* Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) are the main components of the immune system, including lymphocytes and monocytes. These cells are being used in most immunological studies and therefore, isolation, culture and transfection of these cells are of great importance. The transfection of these cells is currently a key concern; this is because most common methods of transfection into the PBMCs are not well suited. The purpose of this study was to compare and optimize the effects of three commercial methods (PolyFect, Lipofectamine 2000 and Lipofectamine 3000) on PBMC transfection using PMAX-GFP vector.

***Methods*:** PBMC cells were isolated from the peripheral blood by Ficole. Following the cell culture, the PMAX-GFP vector was transfected into the cells using the Polyfect, Lipopactamine 2000 and Lipopactamine 3000. After 24, 72 and 120 hours, the transfection rate for each method was evaluated by fluorescence microscope.

***Results*:** Based on the obtained results, the level of transfection for PBMCs by Lipopactamine 2000 and Lipopactamine 3000 at all times was about 2-3%. The amount of transfection of these cells by the Polyfect after 120 hours was about 70%.

***Conclusion*:** Generally, the efficiency of transfection of PBMCs s by Polyfect was probably the best in terms of increasing time, which introduces a new method for gene transfer into these cells. However, further studies are required to achieve the highest conversion efficiency of PBMC cells.

How to cite this Article: Khatibi S, Zare Z, Aghaee–Bakhtiari SH. Optimization and comparison of three commercial carriers for efficient transfection into the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2018;6(2):1-9.

[Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-04-26]