دکتر ترانه جوانبخت

tjavanbakht@yahoo.ca

http://taraneh-javanbakht.persianblog.com

این مقاله فارسی خلاصه ای از دو مقاله من است که در دو مجله بیوشیمی در امریکا چاپ و منتشر شده است. این دو مقاله انگلیسی در سایت بیو ایرات موجود است.

روش Antisense Strategy در بیوتکنولوژی (۱): مشکلات و روشهای مطالعه

درباره اولیگونوکلئوتید ها مشکلات روش Antisense Strategy و روش های آزمایشگاهی آن را توضیح می دهم. در Antisense Strategy، سه مشکل اساسی وجود دارد:

۱. تجزیه اولیگونوکلئوتیدها در سرم خارج سلول توسط آنزیم های خارج سلولی و در داخل سلول توسط آنزیم های داخل سلولی

۲. وارد کردن اولیگونوکلئوتیدها به داخل سلولها

۳. رسیدن اولیگونوکلئوتیدها به هدف یعنی RNA مورد نظر برای جلوگیری از ساخته شدن پروتئین مخرب

برای پایدار کردن اولیگونوکلئوتیدها روش های مختلفی وجود دارد. یکی از این روش ها جایگزین کردن اتمهای اکسیژن به وسیله اتمهای گوگرد در قسمتهای تجزیه شده توسط آنزیم هاست.

دو روش اساسی برای مطالعه تجزیه اولیگونوکلئوتیدها در سلول ها وجود دارد:

۱. الکتروفورز

۲. میکروسکوپی فلوئورسانس*

روش نخست یعنی الکتروفورز در ردیابی اولیگونوکلئوتیدهای رادیواکتیو به کار می رود در حالی که روش میکروسکوپی فلوئورسانس در ردیابی اولیگونوکلئوتیدهای فلوئورسنت (که نور فلوئورسانس را ساطع می کنند) مورد استفاده قرار می گیرد.

حتما از خودتان می پرسید که الکتروفورز چیست؟ در روش الکتروفورز، از یک ژل به عنوان مثال، از ژل آکریل آمید** استفاده می کنند و این ژل را بین دو صفحه شیشه ای می چکانند. کناره های این دو صفحه حتما باید با گیره های فلزی محکم به هم متصل شود تا آکریل آمید به بیرون از فضای بین دو صفحه نریزد. وقتی که آکریل آمید ریخته شده بین دو صفحه شیشه ای فضای بین دو صفحه را کاملا پر کرد، یک شانه کوچک را به داخل ژل فرو می برند تا قسمت بالایی ژل بعد از خشک شدن، شکل شانه را بگیرد. بعد از خشک شدن کامل ژل، شانه را از آن خارج می کنند. سپس می توان نمونه های حاوی اولیگونوکلئوتید رادیواکتیو تجزیه شده در مدت زمان های مختلف را در قسمت بالایی ژل که به شکل شانه درآمده، ریخت. با قرار دادن ژل در دستگاه الکتروفورز و وصل دو الکترود آن به برق می توان مهاجرت اولیگونوکلئوتید ها در داخل ژل را بررسی کرد. چون اولیگونوکلئوتیدها به دلیل داشتن گروه های فسفات دارای بار الکتریکی منفی هستند، به سمت الکترود مثبت یا آند پیش خواهند رفت. مدت زمان وصل بودن ژل به جریان برق، بستگی به طول اولیگونوکلئوتید مورد مطالعه و همین طور اندازه ژل دارد. بعد از مهاجرت اولیگونوکلئوتید در داخل ژل در مدت زمان محاسبه شده، جریان برق را قطع می کنیم و ژل را از دستگاه الکتروفورز خارج می کنیم و سپس از ژل فیلم می گیریم. در فیلم، خطوطی تیره که نشانه محل اولیگونوکلئوتیدهای تجزیه شده رادیواکتیو با طول های مختلف است، مشخص می شود و به این طریق، می توانیم تعداد بازهای نوکلئوتیدی در اولیگونوکلئوتیدها و محل شکسته شدن آنها توسط آنزیمها را ردیابی کنیم.

در روش میکروسکوپی فلوئورسانس، از یک میکروسکوپ که طبق پدیده فلوئورسانس کار می کند، استفاده می کنیم. البته برای مطالعه سلول ها هر نوع میکروسکوپ فلوئورسانس نمی تواند مناسب باشد. چرا که میکروسکوپ فلوئورسانس مورد استفاده باید از قدرت تفکیک بالایی برخوردار باشد. به این دلیل از

میکرو سکوپ فلوئور سانس هم کانو ن یا confocal ا ستفاد ه می شود . در ا ین نوع میکر وسکوپ، نور فلوئورسانس ساطع شده از نمونه، از یک صفحه محوری عمود بر نمونه به ردیاب یا detector می رسد و همه نورهایی که خارج از این صفحه قرار دارند قبل از رسیدن به ردیاب، از یک فیلتر عبور کرده و حذف می شوند. این روش باعث افزایش قدرت تفکیک میکروسکوپ به میزان قابل توجهی می شود. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس هم کانو ن یا confocal می توان طیف فلوئورسانس اولیگونوکلئوتیدهای تجزیه شده را به دست آورد.

* فلوئورسانس پدیده ای در فیزیک است که در آن فوتون ها (بسته های انرژی) نور رسیده به مولکول های نمونه مورد آزمایش باعث رفتن آن مولکول ها از سطح انرژی پایه به تراز انرژی برانگیخته و برگشت آن فوتون ها به سطح انرژی پایه می شود. از این برگشت به تراز پایه، نوری ساطع می شود که به نور فلوئورسانس موسوم است.

** آکریل آمید یک ماده شیمیایی ست که پس از مخلوط شدن با مواد اولیه دیگر و قرار گرفتن در بین دو صفحه الکتروفورز، پلیمریزه می شود و به صورت پلیمر در می آید. اسم پلیمر آکریل آمید ، پلی آکریل آمید است.

روش Antisense Strategy در بیوتکنولوژی (۲): نتایج در منوسیتها و فیبروبلاستها

برای جلوگیری از تجزیه شدن اولیگونوکلئوتیدها توسط آنزیمها باید ساختمان آنها را پایدار کرد و یکی از روش ها برای این منظور جایگزین کردن اتم های اکسیژن به وسیله اتمهای گوگرد است. برای این کار، نخست با ید م حل حمله آنزیم ها در اولیگونوکلئوتید ها را مش خص کرد . ا ین مورد از طر یق مطال عه تجز یه اولیگونوکلئوتیدها در آنزیمهای استخراج شده از سلولها صورت می گیرد.

از آنجایی که دمای بدن در حالت طبیعی ۳۷.۵ درجه سانتیگراد است باید آنزیمهای استخراج شده از سلولها را در ا ین د ما قرار داد . برای ا ین منظور، نخ ست غشاء سلولی ر ا با حرارت دادن سلولها پا ره می کن یم و اولیگونوکلئوتیدها را در آنزیمهای استخراج شده قرار می دهیم. با استفاده از تست برادفورد مقدار پروتئین های موجود در نمونه را تعیین می کنیم. سپس با استفاده از محلول بافر مناسب، غلظت نمونه را کاهش می دهیم. اولین نمو نه ر ا که فا قد اولیگونوکلئو تید ا ست و به عنوان نمو نه شا هد به کا ر می بر یم، در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار می دهیم. در نمونه های بعدی، مقدار معینی اولیگونوکلئوتید می ریزیم. در هنگام مطالعه نمونه ها آنها را در د ستگاه ۳۷ درجه سانتیگراد می گذاریم تا اولیگونوکلئوتید در نمونه ها تجزیه شود و با استفاده از روش مناسب واکنش را در زمان های دلخواه متوقف می کنیم و سپس نمونه ها را در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

لازم به ذکر است که همه این اولیگونوکلئوتیدها قبلا با استفاده از فسفر ۳۲ رادیواکتیو شده اند. سپس با ا ستفاده از روش الکترو فورز که آن را در مطلب قبلی در ا ین وبلاگ شرح دادم، از ژل الکتروفورز فیلم می گیریم. فیلم را ظاهر می کنیم و از محل خطوط تیره ای که در فیلم ظاهر می شود، تعداد بازهای نوکلئوتیدی در اولیگونوکلئوتیدها و محل شکسته شدن آنها توسط آنزیمها را مشخص می کنیم.

فیلم الکتروفورز گرف ته شده از نمو نه حاوی آنزیمهای ا ستخراج شده از منو سیتها نشان داد که منو سیتها دارای آنزیمهایی از نوع endonuclease بودند یعنی آنزیمهایی که اولیگونوکلئوتیدها را از قسمت وسط می شکن ند، در حالی که فیلم الکتروفورز گر فته شده از نم ونه حاوی آنزیمهای ا ستخراج شده از فیبروبلا ستها نشان داد که فیبرو بلاستها دارای آنزیمها یی از نوع exonuclease بود ند یع نی آنزیمها یی که اولیگونوکلئوتیدها را از قسمت سر می شکنند.

بعد از مشخص شدن محل دقیق شکستگی اولیگونوکلئوتیدها توسط آنزیمها، گروههای فسفودي استر در آن قسمتها را به گروه فسوروتیوآت تبدیل کردیم و برای این منظور، اتمهای اکسیژن را در محل های تعیین شده به وسیله اتمهای گوگرد جایگزین کردیم.

برای آنکه تجزیه اولیگونوکلئوتید ها را در داخل سلولها مطالعه و نحوه شکسته شدن آنها توسط آنزیمهای درون سلولی را بررسی کنیم، باید نخست آنها را وارد سلولها کنیم. از آنجایی که اولیگونوکلئوتید ها به تنهایی وارد سلولها نمی شوند، لازم است از مولکولهایی برای وارد کردنشان به سلول ها استفاده کنیم. من از ماده ای به نام سویرفکت superfect استفاده کردم که یک پلی آمین است . از ۱۵۰ گروه آمین که در سطح این مولکول قرار دارد، ۷۰ تای آن فعال است و دارای بار الکتریکی مثبت می باشد و چون گروه های فسفودي استر و فسوروتیوآت در اولیگونوکلئوتید مورد مطالعه دارای بار الکتریکی منفی بود، در اثر برهم کنش الکترواستاتیک بین بارهای مثبت و منفی، یک مولکول کمپلکس تشکیل شد و سویرفکت، اولیگونوکلئوتید مورد مطالعه را به داخل سلول های فیبروبلاستی برد.

لازم به ذکر است که راندمان تعداد سلولهایی که اولیگونوکلئوتید همراه سویرفکت وارد آنها شده بود باید به ۸۰٪ برسد. برای این منظور، اولیگونوکلئوتید فلوئورسنت با همان تعداد بازنوکلئوتیدی را که وارد سلولهای فیبروبلاستی شده بود با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس بررسی کردیم.

سپس از سلولهای فیبروبلاستی مورد مطالعه با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس هم کانون یا confocal از نمونه سلولهای فیبروبلاستی دارای اولیگونوکلئوتید تجزیه شده در زمانهای مختلف، با استفاده از تئوری Forster - که مربوط به برهم کنش دو فلوئوروفور* در دو سر یک مولکول است- طیف فلوئورسانس گرفتیم و نیمه عمر** اولیگونوکلئوتید مورد مطالعه در سلولهای فیبروبلاستی را محاسبه کردیم.

اولیگونوکلئوتید مورد مطالعه در کاهش مقدار پروتئین P-gp که در غشاء سلولهای فیبروبلاستی یافت می شود نقش دارد. با استفاده از روش Western Blot مقدار این پروتئین را در این سلولها تعیین کردیم.

نیمه عمر پروتئین P-gp در فیبروبلاستها یک روز بود درحالیکه نیمه عمر اولیگونوکلئوتیدی که من در مقابل آنزیمهای فیبروبلاستی پایدار کردم، ۵ روز بود. به علاوه، اولیگونوکلئوتید وارد شده در فیبروبلاست، باعث کم شدن پروتئین P-gp به مقدار قابل توجهی شد . این نتیجه نشان داد که روش Antisense Strategy در فیبروبلاستها با موفقیت عمل کرده است.

* منظور از فلوئوروفور، مولکولی ست که بتواند از خود نور فلوئورسانس ساطع کند . فلوئوروفور را در بخشهاي مورد نظر از ماده مورد مطالعه قرار می دهند تا این ماده، از خود نور فلوئورسانس ساطع کند. سپس از ماده مورد مطالعه طیف فلوئورسانس می گیرند.

** نیمه عمر مدت زمانی ست که نصف مقدار ماده مورد نظر تجزیه می شود.