

طراحی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی نسبی برای بررسی بیان ژن CD40 در سلول‌های دندریتیک پس از مهار با آنتی‌سنس

محمدحسین کریمی^۱، زهرا سهیلا سهیلی^{۲*}، علی‌اکبر پورفتح‌اله^۳، شهرام سمیعی^۴، سید محمد مؤذنی^۳
زهرا عطائی^۵، بیتا گرامی‌زاده^۶، مهناز کواری^۵، مریم عبدالهی^۵، پدیده عبادی^۷

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- مربی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
- ۵- کارشناس، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
- ۶- استاد، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۷- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۸

چکیده

هدف: سلول‌های دندریتیک در تنظیم و کنترل پاسخ‌های ایمنی نقش مهمی به عهده دارند. امروزه نظر بر این است که از این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌توان استفاده کرد. یکی از راه‌های ایمونوتراپی ایجاد سلول‌های دندریتیک تولوژن از طریق ممانعت از بیان مولکول‌های کمک‌تحریکی است. CD40 یکی از مولکول‌های کمک‌تحریکی بوده که با ممانعت از بیان آن از طریق روش‌هایی مانند آنتی‌سنس یا siRNA می‌توان به این مهم (سلول‌های دندریتیک تولوژن) دست پیدا کرد. با تولید سلول‌های دندریتیک تولوژن می‌توان افقی روشن در درمان بسیاری از بیماری‌ها ایجاد نمود و با طراحی RT-PCR کمی برای اندازه‌گیری میزان بیان می‌توان راه را برای ایجاد این سلول‌ها هموار نمود.

در این تحقیق با طراحی آنتی‌سنس با استفاده از نرم‌افزارهای مربوط و منتقل کردن آن به سلول‌های دندریتیک با استفاده از ماده "لیپوفکتامین ۲۰۰۰" (Invitrogen) به سلول دندریتیک تولوژن رسیده‌ایم. مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های دندریتیک از طحال موش Balb/c جدا شد و میزان خلوص به وسیله فلوسیتومتری بر اساس نشانگر CD11C تعیین شد. رده سلولی BCL1 به‌عنوان گروه کنترل، بیان‌کننده CD40 در محیط کشت RPMI-1640+ ۱۰٪ FCS کشت داده شدند. با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک Beacon Designer و mfold and Blast آغازگر برای GADPH (به عنوان کنترل داخلی) و CD 40 طراحی شد، کیت Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت و با تعیین O.D. ۲۶۰/۲۸۰ و الکتروفورز در آگارز میزان خلوص تعیین شد. در ادامه کار ابتدا PCR کیفی با استفاده از آنزیم (Roche) Fast Hot Start Taq بهینه شد و سپس بعد از ساخت cDNA با استفاده از کیت IQ sybergreen (Biorad)، RT-PCR کمی برای CD40 بهینه و در نهایت با استفاده از همین کیت منحنی استاندارد پس از تهیه رقت‌های مناسب از RNA برای CD40 و کنترل داخلی محاسبه شد. پس از طراحی آنتی‌سنس با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک با استفاده از ماده "لیپوفکتامین ۲۰۰۰" انتقال، انجام و با استفاده از RT-PCR کمی میزان کاهش بیان ژن مشخص شد.

نتایج: دمای بهینه اتصال با استفاده از شیپ Real time PCR و بهترین C_T و ΔRn در ۹۵/۵ درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژن CD40 و GADPH تعیین و همچنین دمای ذوب PCR حدود ۸۴ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. شیپ و بازدهی واکنش PCR برای ژن‌های CD40 و GADPH با روش رقت سریال تعیین شد. با استفاده از غلظت نابرابر آغازگرها بازدهی و شیپ برابری این دو ژن با دمای اتصال یکسان تعیین شد. (بازده CD40: ۹۶/۵، شیپ: ۳/۴۰۸-؛ بازده GADPH: ۹۴/۱، شیپ: ۳/۴۷۱-)

میزان کاهش بیان ژن پس از انتقال با آنتی‌سنس ۱/۶۴ در سلول‌های دندریتیک و در رده سلولی BCL1 ۱/۳۲ تعیین شد.

* نشانی مکاتبه: تهران، اتوبان تهران-کرج، کیلومتر ۱۷، شهرک علم و فناوری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی

ماده منتقل شده تأثیری روی بیان ژن ندارد. بهترین زمان برای اندازه‌گیری کاهش بیان ژن CD40 ۴۸ ساعت پس از انتقال در سلول‌های دندریتیکی و رده سلولی BCL1 است.
نتیجه‌گیری: در مطالعات مختلف از روش‌های متفاوتی مانند RT-PCR نیمه کمی RT-PCR کمی مطلق و RT-PCR کمی نسبی برای تعیین میزان بیان ژن‌های مختلف از جمله CD40 استفاده شده است. بررسی‌ها در این تحقیق نشان داد که استفاده از کیت Biorad IQ-sybergreen و الیگومر دی‌اکسی تیمیدین برای سنتز cDNA برای رسم منحنی استاندارد ژن CD40 بسیار مناسب است (در این مورد *GADPH* کنترل داخلی مناسبی است) که در مقایسه با RT-PCR نیمه کمی دقیق‌تر و قابل اعتمادتر است.

کلیدواژگان: سلول‌های دندریتیکی، CD40، Real Time PCR.

۱- مقدمه

در حال حاضر روش‌های مختلفی از جمله Northern Blot، RNase Protection assay و Real time PCR برای اندازه‌گیری بیان RNA وجود دارد که از میان این روش‌ها Real time PCR به دلیل حساسیت بالا و قابلیت تکرارپذیری بر دیگر روش‌ها ارجحیت دارد. در این تحقیق با توجه به اهمیت DC_s و مولکول CD40 در ایجاد پاسخ ایمنی و حساسیت بالای Real time PCR این آزمون کمی برای اندازه‌گیری بیان CD40 راه‌اندازی شد تا امکان مطالعه و ارزیابی القای تحمل از طریق مهار ژن CD40 و نقش آن در تنظیم پاسخ ایمنی فراهم شود.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲ نوع سلول استفاده شده است: DC_s و رده سلولی BCL1 (B-cell leukemia/lymphoma 1).
- DC_s از طحال موش Balb/c به روش آنزیمی با استفاده از آنزیم کلاژناز در محیط شیب نایکودنز (Nycodenz) تخلیص شده‌اند و میزان خلوص به روش فلوسیتومتری مستقیم نشانگر (Marker) CD11C تعیین شده است.
- رده سلولی BCL1 (Mouse B Cell Leukemia Lymphoma, ATCC: TIB 197) و در محیط حاوی RPMI+ ۱۰٪ FCS + L-Glutamine (۲ میلی مولار) کشت داده شده از این رده سلولی به دلیل بیان CD40 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود.

۲-۱- استخراج RNA

از کیت Qiagen RNeasy Plus Mini Kit بر اساس دستورالعمل کیت RNA استخراج شد. خلوص و ثبات ساختمان RNA توسط روش اسپکتروفتومتری و آنالیز ژل ۱ درصد اثبات شد.

سلول‌های دندریتیکی (DC_s: Dendritic cells) از مهم‌ترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که بخش عمده و اصلی کنترل سیستم ایمنی توسط این سلول‌ها صورت می‌پذیرد. این سلول‌ها ۳ نوع علامت برای فعال شدن سلول‌های T فراهم می‌کنند. علامت ۱ آنتی‌ژن عرضه شده توسط مولکول‌های MHC (Major Histocompatibility Complex) که بیان آن افزایش یافته است و علامت ۲ که مولکول‌های کمک تحریکی نامیده می‌شود شامل مولکول‌های غشایی مانند CD40، CD80/86 و Ox-40L بوده که برای تکثیر سلول‌های T و فرار از آنرژی (Anergy) لازم است و علامت ۳ سیتوکین‌های (Cytokines) محلول بوده که باعث تمایز سلول‌های T به سمت فنوتیپ Th1 (T Helper 1) یا Th2 می‌شود. عدم بیان مولکول‌های کمک تحریکی به وسیله دندریتیکی باعث ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) آنرژی تمایز به سمت Th2 و یا تنظیمی در سلول‌های T شود [۱].

CD40 پروتئین ایستگال غشایی (Integral Membrane Protein) بوده که متعلق به خانواده گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor-Necrosis Factor Receptor: TNFR) است. به محض بلوغ DC_s بیان آن افزایش یافته و عملکرد آن به صورت دو طرفه بوده و از طریق CD40-CD40L باعث فعال شدن سلول‌های T می‌شود. واکنش CD40-CD40L باعث افزایش تولید اینترفرون گاما (IFN- γ : Interferon-gamma)، تکثیر سلول‌های T، تحریک بلوغ DC_s و تولید IL-12 (Interleukin 12) می‌شود. امروزه مهار کردن واکنش CD40-CD40L یکی از استراتژی‌های تحریک تحمل (Tolerance) است. از میان مولکول‌های کمک تحریکی شناخته شده به نظر می‌رسد که CD40 یکی از مهم‌ترین مولکول‌ها در ایجاد واکنش میان سلول‌های T و DC_s است [۲].

۲-۲. طراحی آغازگر (Primer)

از نرم افزار Beacon Designer Version 7 (Primer biosoft) برای طراحی آغازگر برای ژن های CD40 (NM_011611) و *GADPH* (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد [۱۵،۶]. پارامترهای ترمودینامیکی و ساختمان ثانویه با استفاده از نرم افزار *mfold* تعیین شد و موقعیت آغازگرها نسبت به نواحی اگزون - اگزون با استفاده از نرم افزار Spidey (www.ncbi.nlm.gov/Spidey) و اختصاصیت با استفاده از نرم افزار کاوش (Blast) (www.ncbi.nlm.gov/Blast) آنالیز شد.

جلویی-CD40

5'-ATTTTCGGGGTGTTCCTCTATATC-3'

برگشتی-CD40

5'-GGAGCAGCGGTGTTATGAC-3'

جلویی-*GADPH*

5'-GACTTCAACAGCAACTCCCAC-3'

برگشتی-*GADPH*

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

۳-۲. ساخت cDNA

با استفاده از آنزیم Superscript III (Invitrogen) و آغازگرهای اختصاصی و الیگومر دی اکسی تیمیدین (Oligo- dT)، cDNA ساخته شد. به طور خلاصه مخلوط آغازگرها و الیگومر تیمیدین، RNA و dNTP به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و بلافاصله در یخ قرار گرفت بعد از اضافه نمودن ۵ X و مخلوط آنزیم Superscript III و مطابق برنامه زیر ساخته شد:

۶۵°C ۵ Min

۵۰°C ۶۰ Min

۷۰°C ۱۵ Min

۴-۲. PCR کیفی

واکنش PCR در حضور یک مخلوط اصلی (Supermix) شامل بافر ۱۰ X آغازگرهای اختصاصی با غلظت یک میکرومولار، dNTP و آنزیم Hot start Taq (Roche) و cDNA بر طبق برنامه زیر انجام گرفت:

۹۵°C	۱۰ Min	۱X	
۹۵°C	۳۰ Sec		↓ ۳۰ X
۵۷°C	۳۰ Sec		
۷۲°C	۳۰ Sec		
۷۲°C	۵ Min	۱X	

۵-۲. PCR کمی نسبی (Relative Quantitative PCR)

از آنزیم *GADPH* به عنوان ژن کنترل داخلی (House keeping gene) استفاده شد. بعد از ساخت cDNA توسط آنزیم Superscript III با استفاده از کیت IQ-sybergreen supermix (Biorad) واکنش Real time توسط دستگاه My IQ-Cycler (Biorad) انجام گرفت.

۶-۲. طراحی آنتی سنس (Antisense)

با استفاده از نرم افزار Oligo analyzer آنتی سنس طراحی شد. پارامترهای ترمودینامیکی و ساختمان ثانویه با استفاده از نرم افزار *mfold* تعیین و اختصاصیت با استفاده از نرم افزار کاوش (Blast) (www.ncbi.nlm.gov/Blast) آنالیز شد. تشکیل Hairpin و Self dimmer از روی مقادیر ΔH و ΔG بررسی شد.

ANTISENSE 1 5'-ACTCTCTTTACCATCCTCCT-3'

SENSE 1: 5'-TGAGAGAAATGGTAGGAGGA-3'

۷-۲. انتقال

DC_s پس از تخلیص از طحاحال در محیط کشت OPTI-MEM که حاوی GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) به مقدار ۲۰۰ I.U. و فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شد ۲۴ ساعت بعد با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen) بر طبق دستورالعمل کیت انتقال انجام پذیرفت.

۳- نتایج

۱-۳. PCR کیفی

بعد از استخراج RNA از سلول های BCL1 و ارزیابی کیفی به منظور نشان دادن این مسأله که آیا سلول های فوق الذکر قادر

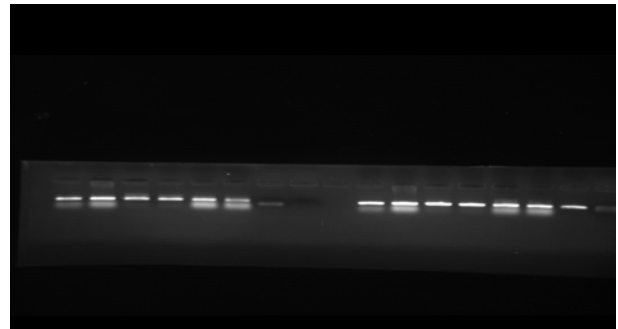
جدول ۱ نتایج C_T شیب حرارتی ژن کنترل داخلی $GADPH$

شیب دمایی	مقدار C_T CD40	
	DC	BCL1
۵۵	۲۵/۱	۱۶/۹
۵۵/۴	۲۴/۷	۱۵/۹
۵۶	۲۴/۶	۱۵/۷
۵۶/۸	۲۴/۱	۱۶/۵
۵۸/۱	۲۲/۸	۱۶/۵
۵۹/۱	۲۱/۵	۱۶/۷
۵۹/۷	۲۴/۵	۱۷/۴
۶۰	۲۴/۱	۱۸

جدول ۲ نتایج C_T شیب حرارتی ژن $CD40$

شیب دمایی	مقدار C_T $GADPH$	
	DC	BCL1
۵۷	۳۳/۱	۲۴
۵۷/۵	۳۲/۱	۲۴/۱
۵۸/۲	۳۱/۲	۲۳/۷۶
۵۹/۲	۲۸	۲۳/۸۲
۶۰/۷	۲۹/۲	۲۳/۱
۶۱/۹	۲۶/۲	۲۳/۰۸
۶۲/۶	۳۳/۵	۲۳/۳۱
۶۳	۳۰/۸	۲۳/۰۶

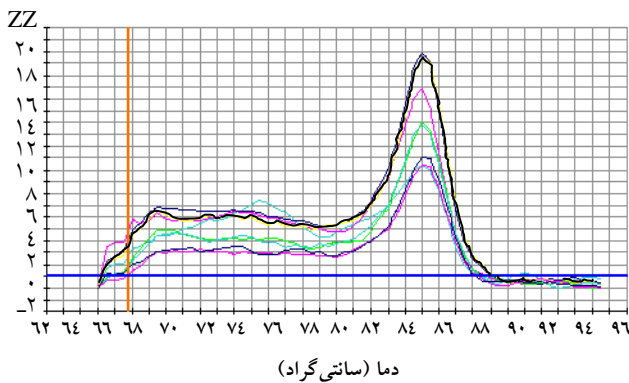
به بیان ژن CD40 هستند آزمون RT-PCR کیفی استفاده قرار گرفت. از آنجایی که نتایج تا حدودی غیر مستعارف و حاوی باندهای غیر عادی بود، در مرحله اول با آزمون توامان تعیین شیب حرارتی و $MgCl_2$ باند غیر عادی حذف شد. شکل ۱ نشان می‌دهد که این سلول‌ها به خوبی ژن CD40 را بیان می‌نمایند. DC_s نیز بعد از تحریک با لیپولی ساکارید (Lipopolysaccharide :LPSs) قابل بررسی به روش RT-PCR شدند.



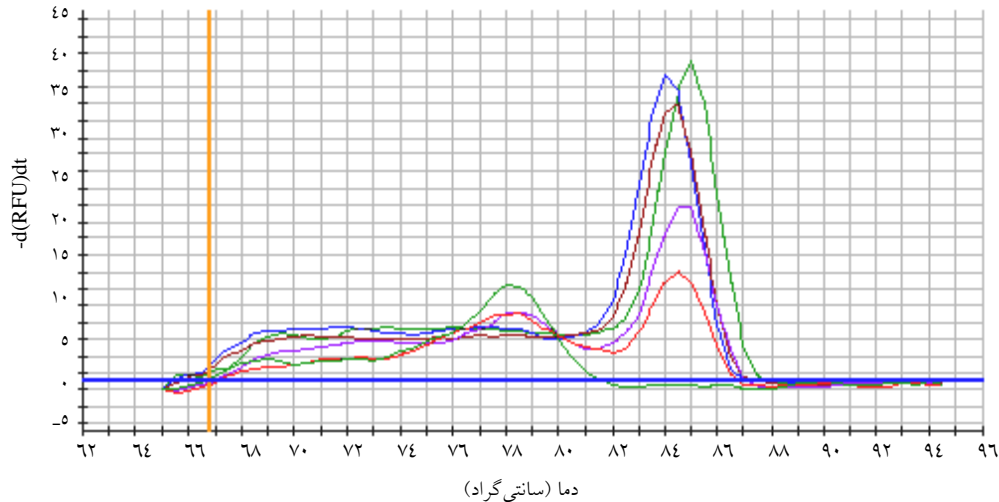
شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR ژن CD40 در آگارز ۱/۵ درصد

۲-۳. PCR کمی نسبی

با استفاده از قابلیت دستگاه Biorad My-IQ (در حضور مخلوط اصلی اقدام به یک شیب دمایی Real time PCR شد. این آزمون به ترتیب برای DC_s و رده سلولی BCL1 برای هر دو ژن CD40 و $GADPH$ در طیف حرارتی ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. بالاترین ΔRn و کمترین C_T ملاک انتخاب دمایی بهینه اتصال (Optimum Annealing Temperature) بود. بر این اساس دمایی ۵۹/۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن CD40 و ۶۰/۷ درجه سانتی‌گراد برای ژن کنترل داخلی انتخاب شد. جداول شماره ۱ و ۲ نتایج C_T این مطالعه شیب حرارتی را نشان می‌دهد. نمودار ۱ و ۲ منحنی ذوب مربوط به این دو ژن را نشان می‌دهد به طوری که ملاحظه می‌شود، نقطه ذوب (Melting point) محصول PCR ژن CD40 در هر دو سلول ۸۴ درجه سانتی‌گراد و برای ژن کنترل داخلی ۸۵ درجه سانتی‌گراد است. هیچ‌گونه شانه اضافی در آنالیز نقطه ذوب برای هیچ‌کدام از ژن‌ها مشاهده نشد.



نمودار ۱ منحنی ذوب مربوط به ژن CD40



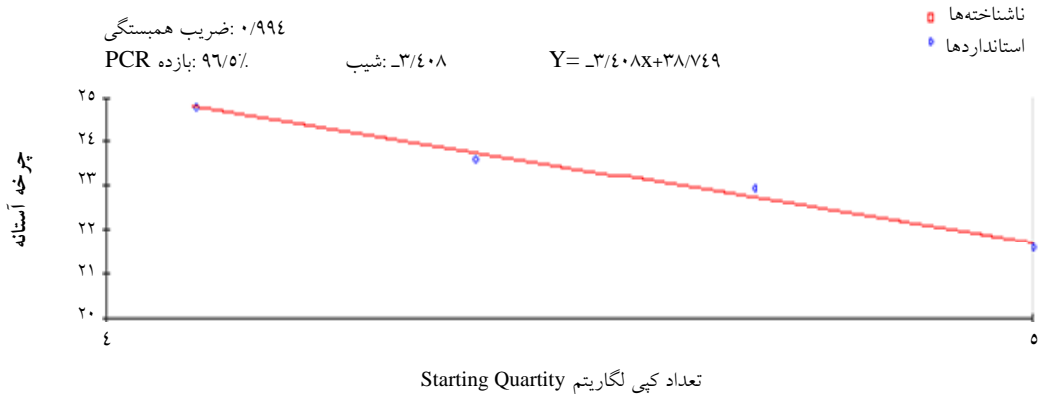
نمودار ۲ منحنی ذوب مربوط به *GADPH*

۳-۳- تعیین بازدهی و ضریب همبستگی واکنش

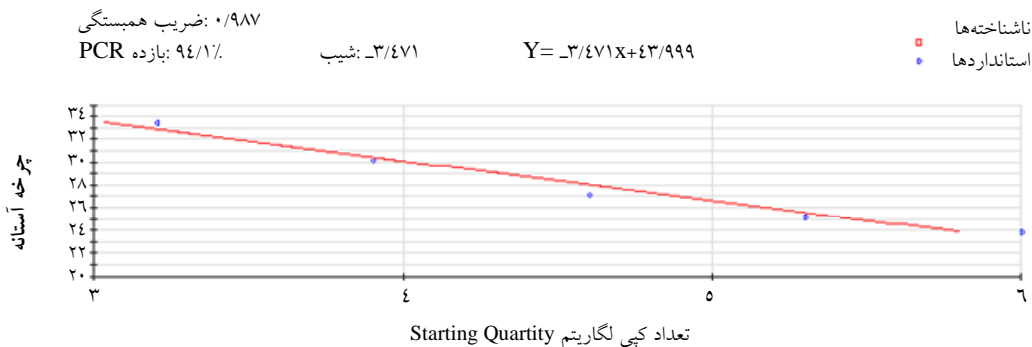
Real time PCR

برای تعیین بازدهی (Efficiency) سیستم و ضریب همبستگی (Correlation coefficient) از cDNA ژن CD40 و ژن کنترل داخلی (*GADPH*) به صورت اختیاری سریال رقت تهیه و نتایج بعد از انجام واکنش Real time PCR توسط نرم افزار دستگاه

My-IQ محاسبه شد. به طوری که در شکل ۲ و ۳ مشاهده می شود. نرم افزار قادر است r شیب و در نهایت بازده را محاسبه نماید. در ابتدا بازده این دو ژن علی رغم بهینه بودن دمای شیب یکسان نبود. ولی علی رغم عدم تقارن غلظت آغازگرها در مورد ژن CD40، بازدهی برابری نسبت به ژن *GADPH* به دست آمد.



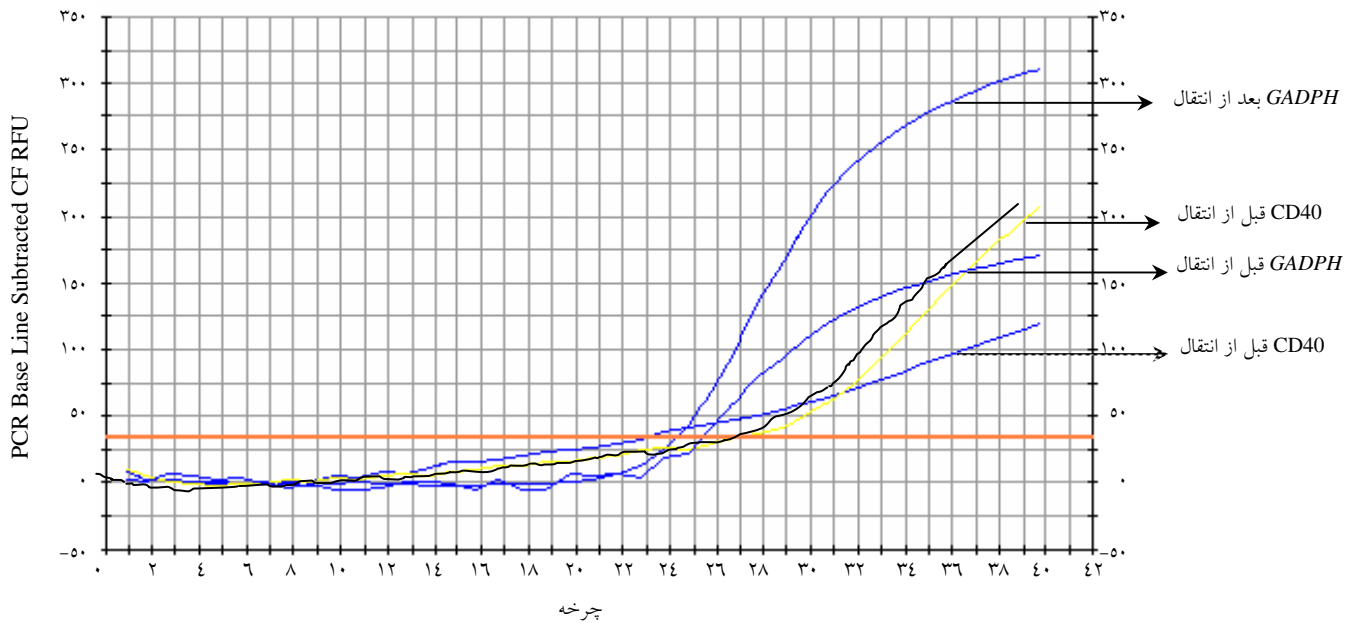
شکل ۲ منحنی استاندارد ژن CA40



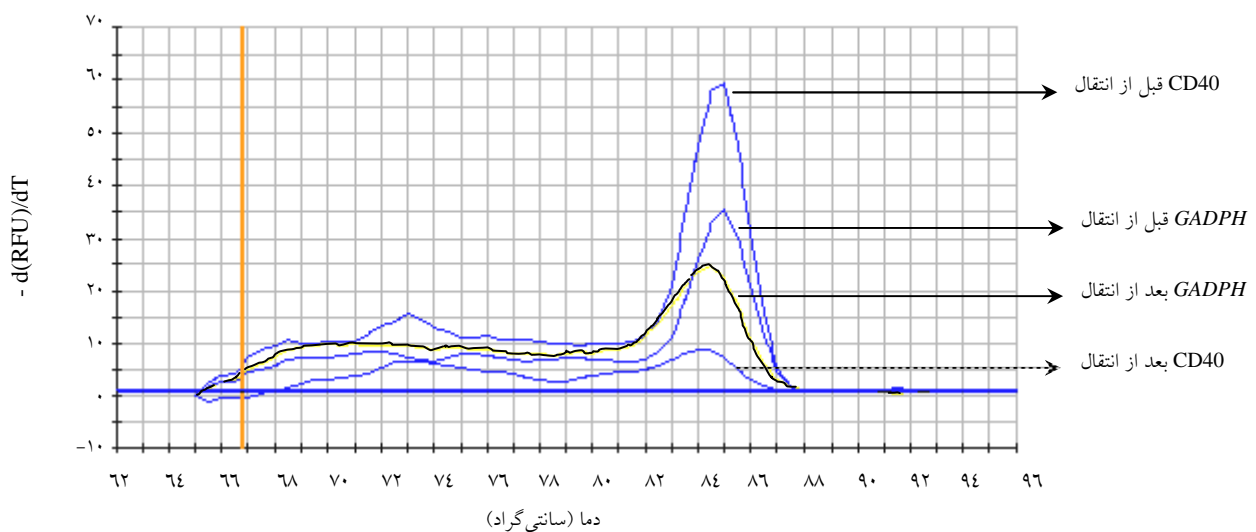
شکل ۳ منحنی استاندارد ژن *GADPH*

جدول ۳ نتایج C_T رده سلولی BCL1 قبل و بعد از انتقال

	مقدار C_T CD40	مقدار C_T GADPH
BCL1	۲۲/۹۹	۲۵/۴
BCL1 منتقل شده با آنتی سنس	۲۶/۸	۲۴/۲۵



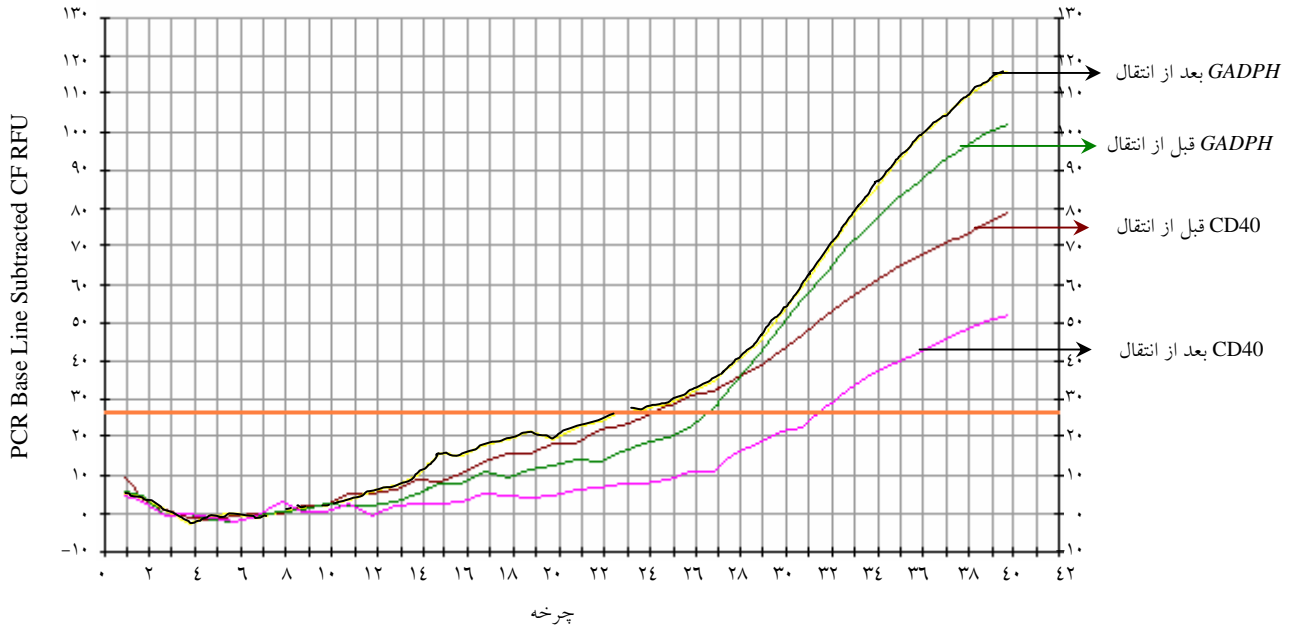
نمودار ۳ منحنی چرخه‌های ژن CD40 قبل و بعد از انتقال (رده سلولی BCL1)



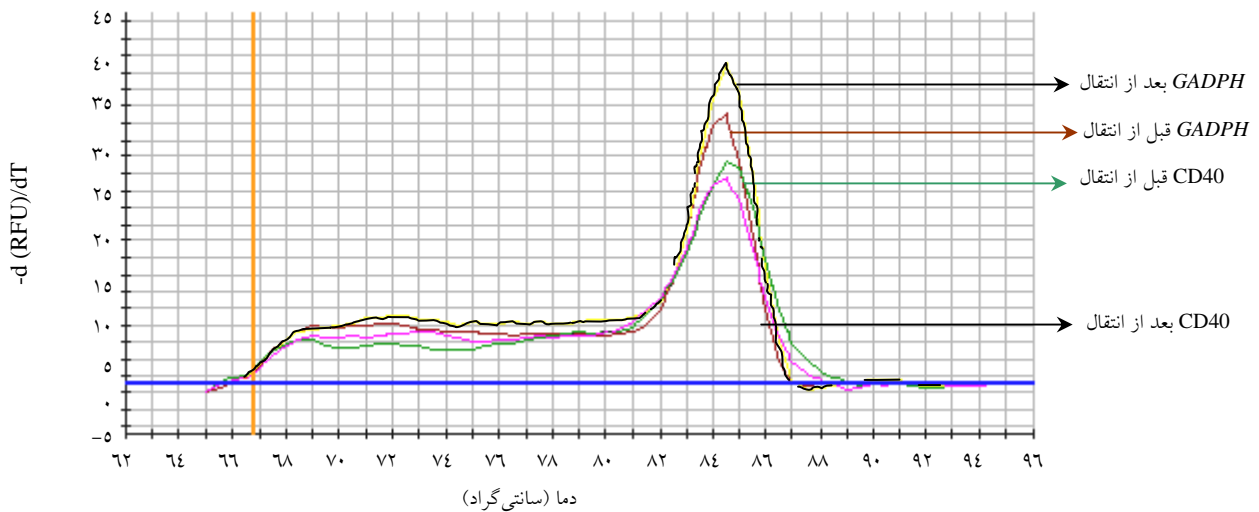
نمودار ۴ منحنی ذوب ژن CD40 قبل و بعد از انتقال (رده سلولی BCL1)

جدول ۴ نتایج $DC_s C_T$ قبل و بعد از انتقال

	مقدار C_T CD40	مقدار C_T GADPH
DC	۲۶/۵	۲۴/۱
DC منتقل شده با آنتی سنس	۳۱/۳	۲۲/۵



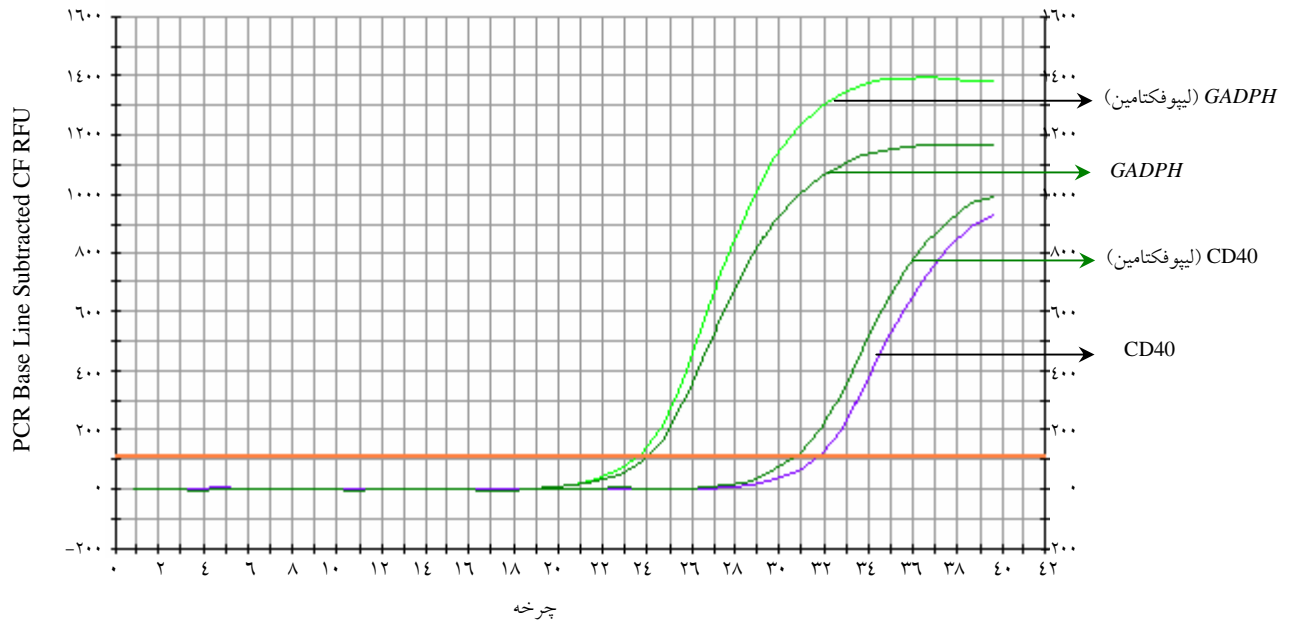
نمودار ۵ منحنی چرخه‌های ژن CD40 قبل و بعد از انتقال (DC_s)



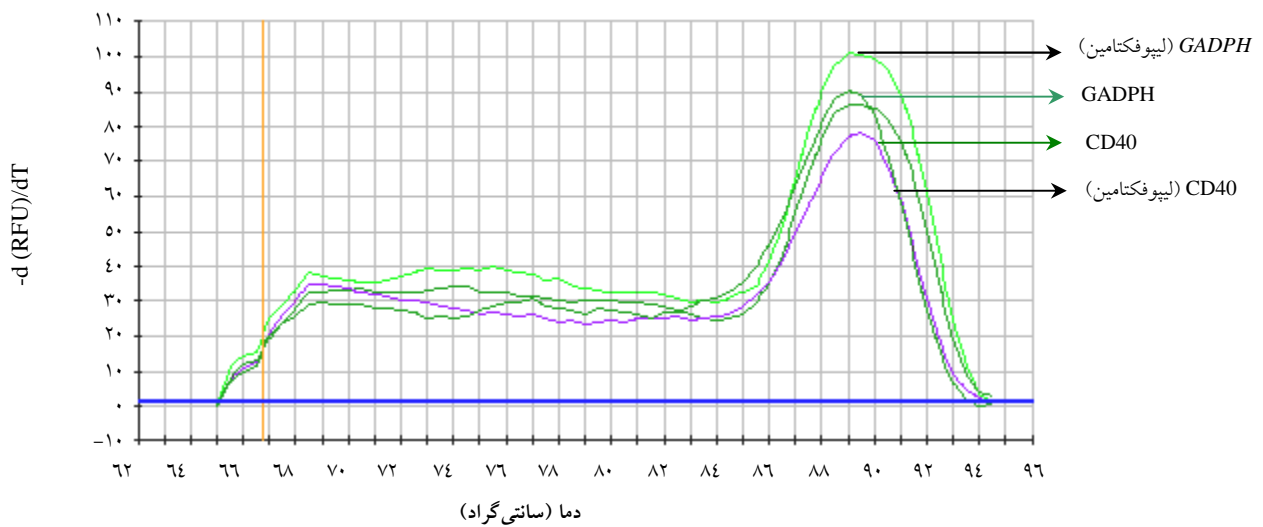
نمودار ۶ منحنی ذوب ژن CD40 قبل و بعد از انتقال (DC_s)

جدول ۵ نتایج C_T سلول‌های دندریتیکی قبل و بعد از اضافه کردن لیپوفکتامین

	مقدار C_T CD40	مقدار C_T GADPH
DC	۳۱/۷	۲۳/۹
DC (لیپوفکتامین)	۳۰/۸	۲۳/۶



نمودار ۷ منحنی چرخه‌های ژن CD40 قبل و بعد از انتقال (DC_S) چرخه



نمودار ۸ منحنی ذوب ژن CD40 قبل و بعد از لیپوفکتامین (DC_S) دما (سانتی‌گراد)

۳-۴- تعیین میزان کاهش بیان ژن CD40

برای تعیین میزان کاهش بیان ژن CD40 بعد از انتقال از روش PFAFFL استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ به منظور کاهش بیان ژن استفاده شد.

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{1}{64} = 2^{-(31/3-26/5)} - (22/5-24/1) = 2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{1}{64}$$

$$(BCL1 \text{ سلولی (رده سلولی)}) = 2^{-(26/8-22/9)} - (24/5-25/4) = 2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{1}{33}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{1}{33} = 2^{-(30/8-31/7)} - (23/6-23/9) = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

همان طوری که مشاهده می شود آنتی-سنس در سلول های دندریتیکی $1/64$ و در رده سلولی BCL1 $1/32$ باعث کاهش بیان ژن CD40 شده است و ماده منتقل کننده لیپوفکتامین ۲۰۰۰ هیچ تأثیر منفی روی کاهش بیان ژن نداشته است (نمودارهای ۳-۸ و جدول های ۳-۵).

۴- بحث

CD40 از خانواده TNFR است که روی سلول های B، DC_s و سلول های اندوتلیال بیان می شود. گیرنده آن، CD154، روی سلول های T فعال شده است. اتصال CD40 بر DC_s با گیرنده آن باعث تحریک تولید IL-12 و تمایز پاسخ به سمت Th1 و افزایش بیان مولکول های کمک تحریکی مانند CD80 و CD86 خواهد شد [۱].

امروزه شناسایی واکنش ها و علایمی که در نتیجه اتصال CD40-CD40L و دیگر مولکول های کمک تحریکی مانند CD28 رخ می دهد به یکی از موضوعات جالب تبدیل شده است که این واکنش ها نقش مهمی در بیماری های التهابی یا اتوایمن (Autoimmune) دارند. به نظر می رسد دخالت در انتقال علامت از طریق این مولکول ها باعث پیشرفت راه های درمانی شود. در تحقیقی که به منظور تولید DC_s تولوژن (Tolerogenic) از طریق کاهش بیان CD80 و CD86 شده است، پس از انتقال سلول، میزان کاهش بیان از طریق روش PCR کمی بررسی شده است [۱]. در تحقیقی در مورد بررسی میزان کاهش بیان CD40 در رده سلولی BCL1، پس از انتقال سلول، میزان کاهش بیان از طریق روش PCR کمی با سیستم ABI Prism 7700 بررسی شده است [۲].

راه اندازی روش کمی PCR ژن CD40 با توجه به نقش مهم

این مولکول به عنوان یکی از مولکول های کمک تحریکی مهم در عرضه آنتی ژن به سلول های T و نقش مهمی که سبب القای تحمل و فقدان پاسخ سلول های T به دنبال شناخت آنتی ژن می شود، می تواند نقش مهمی در مطالعات مولکولی مرتبط با مهار ژن CD40 با استفاده از روش های مختلفی همچون آنتی-سنس و SiRNA (Small interfering RNA) داشته باشد و با مهار ژن می توان DC_s تولوژن ایجاد نمود که نقش مهمی در فناوری های نوین درمانی همچون درمان سلولی و مطالعات مرتبط با ژن درمانی برای توقف پاسخ های ایمنی در بیماری های همچون اتو ایمنی، آلرژی و... خواهد داشت.

از مشخصات مهم DC تولوژن می توان به کاهش بیان مولکول های کمک تحریکی از جمله CD40، CD80 و CD86، کاهش تولید سیتوکین های مانند IL-12 و افزایش تولید سیتوکین های مانند IL-4 و IL-10 و مقاومت به بلوغ در مقابل علائم خطر (Danger signal) نام برد [۲۲]

هدف از طراحی روش RT-PCR کمی نسبی در این تحقیق نیز اندازه گیری بیان CD40 در DC پس از انتقال با آنتی-سنس و بررسی این مهم که آیا به DC تولوژن رسیده ایم، است.

همان طور که در قسمت نتایج نیز توضیح داده شده است؛ میزان کاهش بیان ژن CD40 در DC_s در حدود $1/32$ و در رده سلولی BCL1 که به عنوان گروه کنترل است، $1/64$ کاهش یافته است و ماده منتقل شده نیز هیچ اثری بر کاهش بیان ژن ندارد و این کاهش بیان ژن به طور اختصاصی ناشی از اثر آنتی-سنس است.

بنابراین همان طور که در قسمت بالا توضیح داده شد به یکی از مشخصات سلول های DC تولوژن دست پیدا کرده ایم که برای اطمینان از دسترسی به این مهم نیاز به سنجش سیتوکین و آزمایش های دیگر است تا از این سلول بتوان در ایمنی درمانی استفاده کرد.

سنجش بیان mRNA ویژه ژن یکی از مباحث اصلی در علوم زیستی و پژوهش های بالینی و پایه است. از زمان ایجاد این روش در دهه ۱۹۹۰ Real time PCR کمی به طور وسیعی به کار گرفته شد و با استفاده از آن میزان بیان mRNA نمونه ها با سرعت و حساسیت زیاد اندازه گیری شد [۱۰، ۱۱].

برای آنالیز داده ها دو راه وجود دارد:

- PCR کمی نسبی

- PCR کمی مطلق (Absolute Quantitative PCR)

(کمی سازی منحنی استاندارد)

PCR کمی نسبی یک روش تحلیلی برای بسیاری از مطالعات

PCR کمی است [۷]. در این مطالعه مقایسه نمونه با ژن کنترل است و مقدار کمی نسبت به ژن کنترل از طریق کم کردن C_T ژن کنترل از ژن مورد نظر و سپس به صورت تصاعد $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ بیان شده که بیانگر مقدار کاهش در بیان ژن است. فرض بر این است که بیان ژن کنترل داخلی انتخاب شده در تمامی حالات و نمونه‌های مورد استفاده دچار تغییر نخواهد شد. در روش نسبی باید بازده PCR تمامی ژن‌ها مشابه و ترجیحاً بالای ۹۰ درصد باشد که این موضوع به وسیله سریال رقت و رسم نمودار غلظت بر حسب C_T قابل اندازه‌گیری است [۱۲،۹]. شیب خط برابر با $3/32$ - دلالت بر بازدهی برابر با ۱۰۰ درصد دارد. انحراف از بازده ۱۰۰ درصد به وسیله قرار دادن شیب خط در معادله $1 - (10^{-1/s}) = \text{بازده PCR}$ قابل محاسبه است [۵،۴].

متغیرهای مختلفی بر بازده PCR مؤثر است که از مهم‌ترین آن‌ها، طول قطعات حاصل از آغازگر، کیفیت آغازگر، غلظت $MgCl_2$ و Sybergreen است [۱۳]. در تحقیق حاضر با وجود رعایت شرایط فوق، بازدهی واکنش PCR در حد یکسانی نبود. در این گونه موارد تغییرات دیگری پیشنهاد می‌شود؛ نخست آنکه ابتدا بازدهی هر واکنش به تنهایی بهینه شود. یکی از پارامترهای مهم در این ارتباط این است که دمای اتصال در واکنش Real time متفاوت از حالتی است که در واکنش‌های کلاسیک PCR رخ می‌دهد؛ بر این اساس بایستی مجدداً شیب دمایی خاصی منطبق بر پارامترهای فوق طراحی شود. علاوه بر آن باید آغازگر دایمر یا پیک‌های (Peaks) قبل از پیک اصلی در نظر گرفته شود. تغییرات تعریف‌های اولیه نرم‌افزار تا حدودی مناسب است اما مسأله فوق بسته به نوع نرم‌افزار فرق می‌کند. در بررسی حاضر در سیستم دستگاه بیوراد (Biorad) موقعیت اکتساب فلورسانس (Data acquisition) به گونه‌ای طراحی شد که حداقل از تأثیرات فلورسانس‌های غیر

اختصاصی در امان بماند. در مورد ژن CD40 علی‌رغم این ترندها بازدهی مشابهی نسبت به ژن $GADPH$ به دست نیامد، بنابراین لازم بود که روش دیگری مد نظر قرار گیرد. مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که عدم توازن غلظت آغازگرها می‌تواند تا حدودی بهترین ΔRn و بازدهی را به همراه داشته باشد. بر این اساس، مجدداً در یک بررسی با استفاده از یک جدول متقاطع از غلظت آغازگرها ΔRn و بازدهی، سریال رقت مورد ارزیابی قرار گرفت. به طوری که نتایج نشان می‌دهد بازدهی دو واکنش در حدی بود که می‌توان اطلاعات لازم را در معادلات معتبر محاسبات کمی‌سازی نسبی (Relative Quantification) قرار داد. به‌طور کلی روش کمی نسبی به خصوص در مواردی که تغییرات کلی مد نظر باشد، روش مناسبی است. این روش هیچ نیازی به ایجاد استاندارد مقایسه‌ای نداشته و عاری از کلیه مراحل حد واسط است؛ اما برای معنی‌دار بودن و قابل استفاده بودن نیازمند پارامترهای یکسان است.

اصلی‌ترین ملاک کار بازدهی واکنش است یعنی روند تزیاید واکنش PCR به‌طور یکسان صورت پذیرد. البته باید توجه داشت که در ژن‌های مختلف نوع بهینه‌سازی متفاوت است. قابلیت‌های نرم‌افزار و سیستم Real time نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

۵- تشکر و قدردانی

این پروژه با استفاده از پشتیبانی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور صورت گرفته است. بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و سازمان انتقال خون به خصوص بخش کیت‌سازی که امکان استفاده از دستگاه Real time PCR و انجام آزمایش‌ها را فراهم آورده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

۶- منابع

- [1] Xiaoyan L, Lina L, Zongyou C, Hong Zh. Administration of dendritic cells transduced with antisense oligodeoxynucleotides targeting CD80 or CD86 prolongs allografts survivals. *Transplantation* 2003; 76(4): 721-29.
- [2] Leila M, Martin AM, Brett PM, Anne BE. Identification and functional validation of PNA that inhibit murine CD40 expression by redirection of splicing. *Nucleic Acid Res* 2004; 23(9): 2695-706.
- [3] Soheili Z, Samiei SH. Real Time PCR: Principles and Application. *Hepatitis Monthly* 2005; 5(3): 83-7 Review Article.
- [4] Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30: 503-12.

- [5] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocol* 2006; 1(3): 1559-85.
- [6] Burpo JF. A critical review of PCR primer design algorithms and cross hybridization study. *Biochemistry* 2001; 218: 1-12.
- [7] Kirstin E, Logan J, Saunders N. *Real-time PCR: An essential guide*, horizon bioscience 2004, London UK.
- [8] Brenden OS, Ranjeny T. CD40 and Dendritic Cell Function, *Crit Rev Immun* 2003; 23(1&2): 83-107.
- [9] Kubista M, Forootan A, Zoric N, Jonak J. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 92-125.
- [10] Schecke JH, Lehmann KE, Unger T. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel gene expression C_T difference formula. *J Mol Med* 2006; 84: 901-10.
- [11] Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Edu* 2005; 29: 151-9.
- [12] Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-66.
- [13] Liu Y, Cai X, Zheng Z, Huang X. Real-time PCR using TaqMan and SYBR GREEN for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol Methods* 2005; 65: 21-31.
- [14] Dvorak Z, Pascucci J, Modriansky M. Approaches to Messenger RNA detection-Comparison of methods. *Biomed Papers* 2003; 147(2): 198-205.
- [15] Adachi T, Mori C, Ono Y, Kato M. Toxicogenomic effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol on mouse testicular gene expression in long term: a study using cDNA microarray analysis. *Mol Reprod Dev* 2002; 63(1): 17-23.
- [16] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques* 2005; 39(1): 1-11.
- [17] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 212-4.
- [18] Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochem* 2002; 302: 52-9.
- [19] Gao D, Wagner AH, Fankhaenel S, Stojanovic T, Panzner S. CD40 antisense oligonucleotides inhibition of trinitrobenzene sulphonic acid induced rat colitis. *Gut* 2005; 54: 70-7.
- [20] Hill JA, Ichim TE, Li M, Cairns E, Bell DA. Immune Modulation by silencing IL-12 production in dendritic cell using small interfering RNA. *J Immunol* 2003; 171: 691-6.
- [21] Giulietti A, Valckx D, Mathieu Ch, Bouillon R. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression, *Methods*, 2001; 25: 386-401.
- [22] Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cell and the quest for the transplant tolerance. *Nat Immunol* 2007; 3: 610-21.