GAPDH به عنوان ژن مرجع مناسب برای مطالعات real-time PCR در نوتروفیل های کشت توامان با سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان اسب

فاطمه سلامی[۱]،عباس پرهام[۱،۳*] ،جلیل مهرزاد[۲]

۱) بخش فیزیولوژی ،گروه علوم پایه ، دانشکده ی دامپزشکی ، دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد ، ایران

۲) گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده ی دامپزشکی ، دانشگاه فردوسی مشهد و گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی دانشگاه تهران ، مشهد ، تهران ، ایران

۳) گروه تحقیقاتی بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ، ایران

Email: Parham@um.ac.ir

چکیده مقاله

زمینه مطالعه: گرچه روش Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) به علت دقت، اختصاصی بودن، حساسیت و توان عملیاتی بالا یک روش استاندارد برای تجزیه و تحلیل بیان ژن می باشد، اما اگر نادرست به کار گرفته شود، نتایج آن می تواند گمراه کننده باشد. بنابراین توجه ویژه در مراحل مختلف آماده سازی و پردازش نمونه ضروری است. **هدف:** یکی از نکات مهم در این مقوله انتخاب ژن مرجع مناسب برای کنترل خطای آزمایش بین نمونه ها است.

مواد و روش کار: RNA نوتروفیل ها با استفاده از کیت ستونی استخراج شد، سپس نمونه ها تا زمانی که واکنش qPCR انجام شود، در $-80^{o}C$ نگهداری شدند. سطوح بیان ژن کنترل داخلی GAPDH توسط واکنش qPCR تعیین شد. درابتدا، رشته ی complementary DNA (cDNA) از total RNA هر نمونه با استفاده ازکیت ویژه سنتزشد. سپس واکنش qPCR بااستفاده از مسترمیکس سایبرگرین درحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. بعد از رسم منحنی استاندارد برای ژن GAPDH با بازده ٪ ۹۲، بیان ژن GAPDH در گروه های آزمایشی شامل:۱- نوتروفیل های خون محیطی اسب به تنهایی، به عنوان گروه شاهد۲ - نوتروفیل های کشت توام با سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب۳- نوتروفیل های کشت توام با سوپرناتانت سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان اسب و ۴- نوتروفیل های تحریک شده با آب اکسیژنه سنجیده شد.

نتایج: ژن GAPDH در تیمارهای مختلف آزمایش بیان نسبتا ثابتی را نشان داد.

نتیجه گیری نهایی : باتوجه به نتایج، ژن GAPDH به علت بیان ثابت در تیمارهای مختلف می تواند ژن کنترل داخلی مطلوبی برای مطالعات بیان کمی ژن ها در نوتروفیل های اسبی باشد که تیمارهایی از قبیل هم کشتی با سلول های مزانشیمی، سوپرناتانت سلول های مزانشیمی و آب اکسیژنه، و سایر پژوهش های سلولی- مولکولی که میزان بیان ژن های هدف را تغییر داده است مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: ژن مرجع، ریل تایم پی سی آر، سلول های بنیادی مزانشیمی ، نوتروفیل ها.

GAPDH as an appropriate reference gene for real-time PCR studies in co-culture of equine neutrophils-bone marrow mesenchymal stem cells

Fatemeh Salami[1] , Abbas Parham[1,3], Jalil Mehrzad[2]*

1. Division of Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, and department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Stem Cell Biology Research Group, Biotechnology Institute, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding author's email:: Parham@um.ac.ir

BACKGROUNDS:Although the Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) method is a standard method for analysis of gene expression due to its accuracy, specificity, sensitivity and power, it can be delusive if used incorrectly. Therefore, special attention is required in the various stages of preparation and sample processing.

OBJECTIVES: One of the important points in this category is the selection of the appropriate reference gene for controlling the error test between the specimens.

METHODS: neutrophils RNA was extracted using a column kit and then kept at 80 °C until the qPCR reaction was performed. The levels of GAPDH internal control gene expression were determined by qPCR reaction. Initially, the complementary DNA (cDNA) sequence of the total RNA of each sample was synthesized using a special kit. Then, the qPCR reaction was performed using SYBR Green Master Mix in a final volume of 25 µL. After drawing the standard curve for GAPDH gene with 92% efficiency, the expression of GAPDH gene were measured in experimental groups included: 1) equine peripheral blood neutrophils, as a control group 2) neutrophils co-cultured with equine bone marrow mesenchymal stem cells 3) neutrophils co-cultures with supernatant of equine bone marrow mesenchymal stem cells and 4) H_2o_2-stimulated neutrophils.

RESULTS: The GAPDH gene showed relatively stable expression in different treatments.

CONCLUSIONS: According to the results, the GAPDH gene due to constant expression in different treatments can be a good internal control gene for qPCR studies in equine neutrophils with various treatments such as mesenchymal cells,

supernatant of mesenchymal cells, and H_2O_2, and other cellular-molecular studies that have altered expression for any genes of target.

Key words: reference gene, qPCR, mesenchymal stem cells, neutrophils.

مقدمه

واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی یک روش بسیار قدرتمند برای مقایسه پروفایل های بیان ژن در شرایط مختلف بیولوژیکی ا ست. هنگام مقایسه پروفایل بیان ژن قبل و بعد از تیمار، ضرورت دارد که فاکتورهایی را که سطوح بیان را مختل می کنند، مانند مقادیر مختلف و کیفیت مواد اولیه، استخراج RNA و کارآیی رونویسی معکوس، مورد توجه قرارگیرند.

در میان چندین رویکرد نرمال سازی پیشنهاد شده (Vandesompele et al in 2002 ,Huggett et al in 2005)، ژن های خانه دار به عنوان RG یا ژن های مرجع پذیرفته شده و اغلب برای نرمالایزکردن qPCRا ستفاده می شوند. بنابراین، خطاهای احتمالی ایجاد شده در طول کمی سازی بیان ژن را کاهش می دهند. ژن مرجع ایده آل باید در سلول ها و بافت های مورد نظر بدون تغییر در اثر شرایط آزمایش یا وضعیت بیماری بیان شود. با این وجود چنین ژن مرجع ایده آل جهانی وجود ندارد Vandesompele et al in 2002).

معمولا ژن های مرجع مورداستفاده دارای تغییرات در سطوح بیان در بافت های مختلف و یا بیماری ها هستند (Selvey et al in 2001, Ohl et al in 2005) درحالی که qPCR یک روش بسیار حساس است که اجازه می دهد تغییرات پویای کوچک در بیان ژن تشخیص داده شود.

ضروری است که هر مرحله از تهیه و پردازش نمونه مورد توجه قرار گیرد. درصورتی که این روش به درستی به کار گرفته شود، نرمال بودن داده ها به ا صلاح تغییرات آزمایشی اجتناب ناپذیر کمک می کند، که شایع ترین آنها تفاوت در مقدار مواد اولیه (Nestorov et al in 2013) و یا لود شدن نمونه (VanGuilder et al in 2008) است.

در مطالعات مهره داران، گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) ، بتا اکتین (ACTB) و 18S rRNA ریبوزومی (18R rRNA) جزو انتخاب های متداول بوده است (Suzuki et al in 2000).

با این حال، به طور فزاینده ای آشکار می شود که کاربرد این ژن ها در بسیاری از موارد به دلیل بیان متفاوت در بین گونه ها، انواع بافت ها، رده های سلولی، مراحل تکاملی و یا در پا سخ به آزمایش های تجربی محدود شده است (Vandesompele et al in 2002 ,Selvey et al in 2001).

بررسی الگوهای بیان ژن در سلول های ایمنی یک رویکرد امیدوار کننده برای به دست آوردن دیدگاهی به

مکانیسم های پیچیده ی تنظیمی مرتبط با بیماری های تعدیل ایمنی است (Chaussabel in 2010).

RT-qPCR اغلب برای آنالیز بیان ژن در گلبول های سفید به کار برده می شود، اما تاکنون تایید دقیق و کاملی برای ثبات ژن مرجع صورت نگرفته است (Maeß et al in 2010 , Zhang et al in 2005).

هدف از مطالعه ی حاضر، ارزیابی ثبات و پایداری بیان ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع مناسب برای نرمال سازی داده های بیان ژن های هدف در شرایط هم کشتی سلول های بنیادی مزانشیمی و نوتروفیل ها می باشد.

مواد وروش کار:

سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان فریز شده ی اسب در پاساژ دوم بعد از خارج کردن از تانک ازت ذوب شدند. به منظور افزایش تعداد سلول ها پا ساژهای متوالی درفلا سک های کشت سلول انجام شد. به منظور ایجاد شرایط هم کشتی، سلول های بنیادی مزانشیمی در پا ساژ چهارم، در پلیت های ۱۲خانه ی کشت سلول کشت داده شدند. نوتروفیل های خون محیطی اسب به روش لیز هیپوتونیک استخراج شد و پس از شمارش با لام نئوبار، هم کشتی سلول ها با رعایت نسبت ۱:۴۰ به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. همچنین در یک گروه از سوپرناتانت سلول های بنیادی مزانشیمی برای تیمار با نوتروفیل ها استفاده شد. گروه های آزمایشی این مطالعه با ۴ تکرار و شامل: ۱- نوتروفیل های خون محیطی اسب به تنهایی، به عنوان گروه شاهد ۲- نوتروفیل های کشت توام با سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان اسب (نسبت۱:۴۰) ۳- نوتروفیل های کشت توام با سوپرناتانت سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان اسب و ۴- نوتروفیل های تحریک شده با آب اکسیژنه (با غلظت نهایی۰,۰۰۱) به عنوان القاگر آپاپتوز بودند.

بعد از جمع آوری نوتروفیل ها، استخراج RNA توسط کیت ستونی Qiagen انجام شد. سپس نمونه ها برای نگهداری به فریزر منفی۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. به منظور بررسی کیفی، RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ رانده شد.

آغازگرهای اختصاصی ژن GAPDH با استفاده از نرم افزارهای beacon designer 8 و CLC mian workbench 5 طراحی شدند. سپس سطوح بیان ژن کنترل داخلی GAPDH توسط واکنش qPCR تعیین شد.

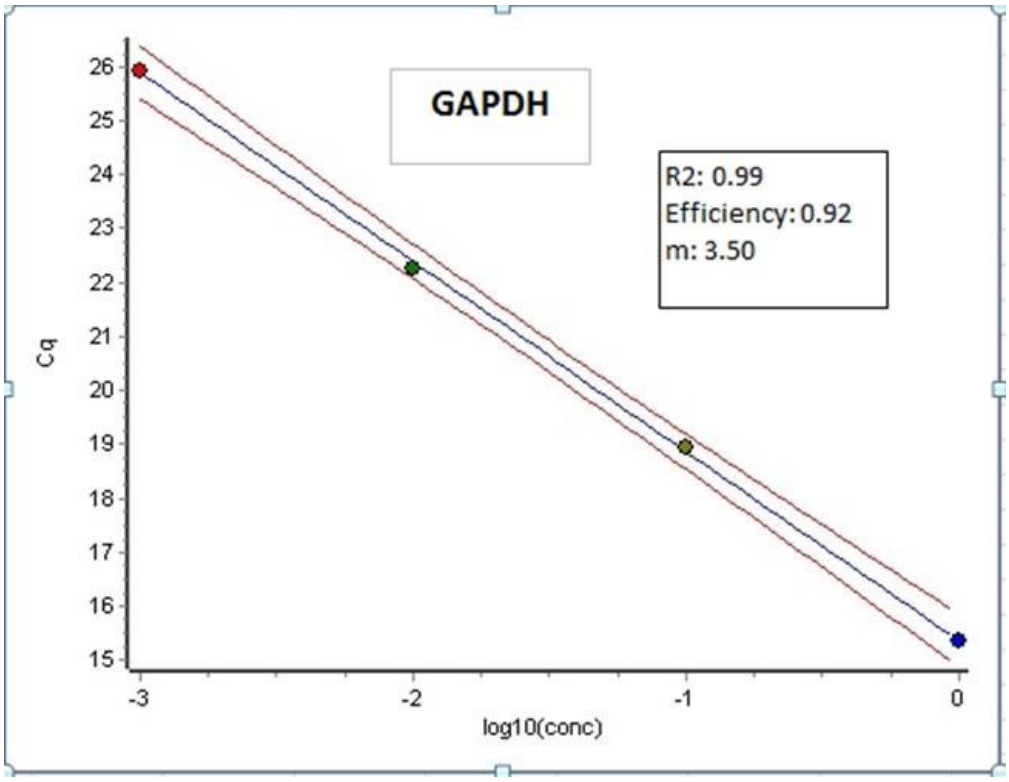
در ابتدا، رشته ی complementary DNA (cDNA) از total RNA هر نمونه با استفاده ازکیت bioneer سنتز شد. به منظور انجام واکنش qPCR، ۱۲,۵ماکرولیتر سایبرگرین و ۰,۵ ماکرولیتر از هریک از آغازگرها، با ۹,۵ ماکرولیتر آب دپسی به حجم ۲۴ ماکرولیتر رسانده شد. در انتها ۱ میکرولیتر cDNA ساخته شده در مرحله ی قبل به آن ها اضافه شد. جهت رسم منحنی استاندارد برای ژن GAPDH، رقت

سازی سریال از cDNA صورت گرفت، به این ترتیب که نمونه cDNA ا صلی به عنوان رقت ۱، و ۶ رقت بعدی به نسبت یک پنجم رقیق شدند (شامل رقت های۰,۲،۰,۰۴،۰,۰۰۸،۰,۰۰۱۶،۰,۰۰۰۳۲،۰,۰۰۰۰۶۴). سپس نمونه ها در دستگاه Real-Time PCR (Qiagen, Germany) قرار گرفت.

. واکنش مطابق با شرایط دمایی- زمانی ذیل انجام شد: وا سر شت سازی cDNA در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۵دقیقه و سپس برنامه ی دمایی ۶۱,۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه،۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت۳۰ ثانیه و۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت۱۰ ثانیه در ۴۰ چرخه انجام شد.

نتایج:

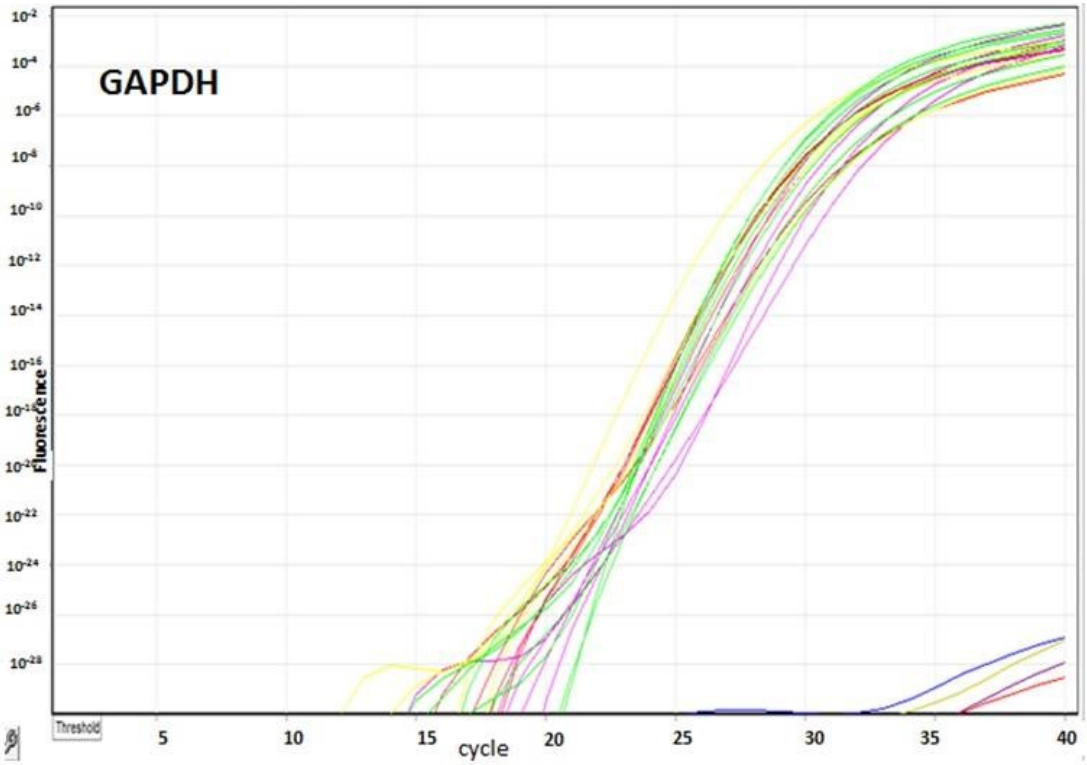
به منظور تعیین کارآیی واکنش qPCR، رقت های سریال تهیه شده از نمونه ی cDNA وارد واکنش Real time PCR شدند. سپس با ا ستفاده از نتایج بد ست آمده، منحنی ا ستاندارد برای ژن GAPDH توسط نرم افزارExcel رسم گردید. میزان کارآیی بدست آمده واکنش برای این ژن ۹۲٪ بود. در ادامه، منحنی های چرخه های بد ست آمده حا صل از واکنش qPCR در گروه شاهد و تیمارها در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: منحنی استاندارد ژن GAPDH

لگاریتم در مبنای ۱۰ هر غلظت در رقت سازی سریال تمپلیت در محور افقی، و مقادیر Cq در محور عمودی نمایش داده شده است.از منحنی استاندارد می توان اطلاعاتی در مورد عملکرد واکنش بر اساس پارمتر های مختلف (شیب؛ R^2 و...) بدست آورد.

R^2: coefficient of determination نشان دهنده تعدیل به یک مدل خطی است ، m؛ شیب منحنی کالیبراسیون که نشان دهنده کیفیت مسترمیکس است .Cq: quantification cycle



شکل ۲: منحنی چرخه های تکثیر حاصل از Real time PCR ژن مرجع GAPDH درتیمارهای مختلف. محور افقی تعداد چرخه های تکثیر و محور عمودی فلوئورسانس ساطع شده رانشان می دهد.

باتوجه به نتایج بد ست آمده از واکنش qPCR، ژن GAPDH در گروه شاهد، گروه نوتروفیل های کشت توام با سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب،گروه نوتروفیل های کشت توام با سوپرناتانت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب و گروه نوتروفیل های تحریک شده با آب اکسیژنه میزان بیان ثابتی را نشان داد.

بحث:

ژن GAPDH به علت بیان ثابت در تیمارهای مختلف می تواند ژن کنترل داخلی مطلوبی برای مطالعات بیان کمی ژن ها در نوتروفیل های اسبی باشد که تیمارهایی از قبیل هم کشتی با سلول های مزانشیمی،

سوپرناتانت سلول های مزانشیمی و آب اکسیژنه، و سایر پژوهش های سلولی- مولکولی که در آن میزان بیان ژن های هدف تغییر کند مورد استفاده قرار گیرد.

References:

1. Chaussabel, D., Pascual, V., & Banchereau, J. (2010) Assessing the human immune system through blood transcriptomics. BMC Biol. *8*: 84.
2. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun. 6:279.
3. Maeß, M. B., Sendelbach, S., & Lorkowski, S. (2010) Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. BMC Mol. Biol. 11: 90
4. Nestorov, J., Matić, G., Elaković, I., & Tanić, N. (2013) Gene Expression Studies: How to Obtain Accurate and Reliable Data by Quantitative Real-Time RT PCR/ Izučavanje ekspresije gena : kako dobiti tačne i pouzdane podatke kvantitativnim RT PCR-om u realnom vremenu. Med. Biochem.32: 325-338.
5. Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., ... & Jung, K. (2005) Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?. Mol. Med. 83: 1014-1024.
6. Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G., & Griffiths, L. R. (2001). β-Actin—an unsuitable internal control for RT-PCR. Mol. Cell. Probes 15: 307-311.
7. Suzuki, T., Higgins, P. J., & Crawford, D. R. (2000) Control selection for RNA quantitation. BioTechniques. 29: 332-337.
8. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3: 0034-1.
9. VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques. 44: 619.
10. Zhang, X., Ding, L., & Sandford, A. J. (2005) Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. BMC Mol. Biol. 6: 4.