

ترنسداکشن پایدار ترنس ژن GFP در سلول سخت ترنسفکت ماکروفاژ موشی RAW264.7 با استفاده از وکتورهای نسل دوم لتی ویروس

منیر سلاطی^۱، منصور عباچی^۲، مجید صادقی زاده^۳، حمیدرضا سلیمانپور لیچایی^{۴*}

۱-دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-دانشجوی دکتری، گروه زیست فناوری سامانه‌ای، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳-استاد گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴-استادیار گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱، تهران، ایران

hrs@nigeb.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱

چکیده

سلول‌های ماکروفاژی، دسته‌ای از سلول‌های سخت ترنسفکت می‌باشند که به دلیل اهمیت هدف‌گیری آنها در استراتژی‌های درمانی، پیاده‌سازی یک روش موفق ترنسفکشن در آنها همواره مدنظر می‌باشد. کارایی وکتورهای لتی ویروسی در مقایسه با سه ترکیب تجاری Xfect™ Transfection Reagent، FuGENE® HD و Lipofectamine™ 3000 در ترنسفکشن سلول ماکروفاژی RAW264.7 بررسی شد. پس از بهینه‌سازی و تولید ذرات ویروسی در سلول HEK 293T، آلوده‌سازی سلولی با MOIهای متفاوت صورت گرفت و میزان کارایی ترنسداکشن، زنده‌مانی و فعالیت متابولیک سلول‌ها اندازه‌گیری و با روش‌های شیمیایی مقایسه شد. هیچیک از سه ترکیب شیمیایی تجاری قادر به ترنسفکت موفق RAW264.7 نشدند در حالی که، روش ویروسی در کمترین غلظت نیز قادر به ترنسداکشن سلول‌ها و ایجاد سیگنال سبز رنگ در زیر میکروسکوپ فلورسنت شد. تغلیظ استوک ویروسی و به کارگیری MOIهای بیشتر تا ۳۰ به طور معنی‌داری ($p \leq 0.0001$) باعث افزایش راندمان ترنسداکشن شد. روش ترنسفکشن لتی ویروسی علی‌رغم کار زیاد و زمان طولانی‌تر در مقایسه با روش‌های شیمیایی جهت ترنسفکشن سلول‌های سخت ترنسفکت کارایی بالاتری دارد که در این پژوهش انجام برخی اصلاحات نظیر تغلیظ ویروس، عدم فریز ویروس‌ها، استفاده از پلی‌برن و انکوباسیون شبانه سلول‌ها با ذرات ویروسی کارایی آن را افزایش داد. از آنجا که پارامترهای مهم دیگری مانند استفاده از رتروکتین و سانتریفوژ چند

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

ساعته ویروس و سلول در کنار هم (اسپینوکولیشن)، بر روی فرایند آلوده سازی ویروس ها بسیار موثر هستند، پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی مدنظر قرار گرفته و با توجه به داده های امیدوارکننده این پژوهش، از این روش تکمیلی برای ترنسداکشن دیگر سلول های سخت ترنسفکت مانند سلول های بنیادی یا سلول های اولیه نیز استفاده شود.

کلید واژگان: ترنسفکشن، ترنسداکشن، RAW264.7، سلول سخت ترنسفکت، وکتور لنتی ویروس، MOI

۱-مقدمه

انتقال ژن به درون سلول ها، کاربردهای گسترده ای در مطالعات علمی و پژوهشی دارد [۱]. به گونه ای که در حال حاضر ترنسفکشن سازه های ژنی به داخل سلول های حیوانی، از جمله سلول های موشی به عنوان پرکاربردترین مدل حیوانی، نقش گسترده ای در درک مکانیسم های مختلف مرتبط با بیماری ها و روش های درمانی پیدا کرده است [۲]. در حال حاضر استراتژی های متفاوتی برای ترنسفکشن مواد ژنتیکی به داخل سلول ها بهینه سازی شده است که از جمله می توان روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی را نام برد. از روش های شیمیایی می توان به استفاده از پلی کاتیون ها (لیپوزومی و غیر لیپوزومی)، دندریمرها، DEAE-Dextran و رسوب کلسیم فسفات، اشاره کرد که قادر به انتقال ماده ژنتیکی از داخل غشای سلولی می باشند. الکتروپوریشن، میکرواینجکشن، ترنسفکشن نوری و ترنسفکشن بیولیستیک از جمله روش های پرکاربرد در استراتژی های فیزیکی می باشند. در روش های بیولوژیکی نیز از ویروس های مهندسی ژنتیک شده از جمله آدنوویروس ها و لنتی ویروس ها استفاده می شود که به روش ترانسداکشن معروف است. لنتی ویروس ها به عنوان دسته ای از رتروویروس های RNA دار قادر هستند به صورت طبیعی پس از ورود به سلول، ژنوم خود را در داخل ژنوم میزبان تلفیق کنند [۳، ۴]. به طور کلی، می توان گفت انتخاب روش بهینه ترانسفکشن سلولی به عوامل مختلفی از جمله نوع و منشأ سلول ها و نوع اسیدهای نوکلئیک معرفی شده بستگی دارد [۵].

سلول های ماکروفاژی به عنوان فراوان ترین سلول های فعال در سیستم ایمنی بدن موجودات زنده، در پاتوژن بسیاری از بیماری ها از جمله رشد و گسترش تومورهای بدخیم، التهاب، عفونت HIV، بیماری های ذخیره لیپوزومی، آترواسکلروز، دیابت، آرتریت روماتوئید و غیره نقش دارند [۸-۶]. در این میان رده سلولی ماکروفاژ موشی RAW264.7 به عنوان یک مدل پر کاربرد در شرایط آزمایشگاهی در حوزه تحقیقات ایمونولوژیکی و مطالعه برهم کنش های میزبان و پاتوژن مطرح است [۹]. سلول RAW264.7 به عنوان یک سل لاین سرطانی نامیرا، از یک موش BALB/c نر که توسط ویروس لوسمی آبلسون القا شده، جداسازی شده و از نظر الگوی رشدی جزو دسته سلول های نیمه چسبنده طبقه بندی می شود که در حین رشد، علاوه بر سلول های چسبنده دوکی شکل، متمایل به تشکیل سلول های زنده شناور کروی، با قطر سلولی ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر می باشد [۱۰]. این سلول ها، به عنوان ماکروفاژهای M0 در حالت پایه خود، ظرفیت قابل توجهی برای پلاریزه شدن به فنوتیپ M1 پیش التهابی یا M2 ضد التهابی دارند [۱۱]. این قابلیت پلاریزیشن، مدلی را در اختیار محققان قرار می دهد تا تأثیرات و اثرات سیتوکین ها، داروها و عوامل محیطی مختلف را بر عملکرد ماکروفاژها و پاسخ های ایمنی مطالعه کنند [۱۲]. در واقع ماهیت چندشکلی و سازگاری این سلول ها در شرایط مختلف کشت از یک سو و توانایی تشخیص، خنثی سازی و تجزیه مولکول های خارجی به عنوان یک سلول ماکروفاژ حرفه ای از سوی دیگر، آنها را به ابزاری همه کاره برای دستکاری

و مشاهده تجربی تبدیل کرده است. این موضوع یک شمشیر دو لبه محسوب می‌شود؛ زیرا سطوح بالای فعالیت های آنزیمی در این سلول‌ها احتمالاً منجر به غیرفعال شدن DNA و کارایی پایین ترنسفکشن می‌شود. نتایج مختلف نشان داده است ترنسفکشن ژنی به سلول‌های ماکروفاژی با چالش‌های زیادی روبه‌رو است [۱۳و۸] و این سلول‌ها به بسیاری از روش‌های ترنسفکشن از جمله بافرهای شیمیایی معمول مانند کلسیم فسفات مقاوم هستند یا کارایی ترنسفکشن آنها بسیار پایین است [۱۴]. از این رو، محققان همواره در تلاش هستند سیستم‌های انتقال ژن موثرتر با سمیت پایین‌تری توسعه دهند، به‌عنوان مثال، شرکت Biontex آلمان چند بافر ترنسفکشن برای سلول‌های سخت ترنسفکت معرفی کرده است که از آن جمله می‌توان metafectene pro که یک مخلوط لیپوزومی متشکل از لیپیدهای خنثی و پلی‌کاتیونی است [۱۵] یا سیستم ترنسفکشن K2 که مخلوط بافر کاتیونی K2 و K2 multiplier برای بلاک کردن فاکتورهای دخیل در شناسایی و تجزیه DNA خارجی ترنس ژن است [۱۶] را نام برد که هر دو بافر با موفقیت در ترنسفکت سلول‌های RAW264.7 تجاری سازی شده‌اند. Dokka و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ بافرهای مختلفی را برای ترنسفکشن سلول RAW264.7 مورد استفاده قرار دادند که نتایج نشان داد لیپوفکتامین در غیاب لیپوزوم فاقد بازدهی و در حضور لیپوزوم دارای بازدهی پایینی در حدود ۱۲ درصد است، همچنین بالاترین بازدهی در حضور پروتامین سولفات به‌عنوان عامل متراکم کننده DNA به‌دست آمد که ورود آن را به داخل سلول تسهیل می‌کند [۱۷]. Walia نیز در سال ۲۰۱۱ از ترکیب معرف Targefect-Raw به همراه تقویت کننده Virofect، جهت بهینه‌سازی ترنسفکشن سلول RAW264.7 استفاده کرد. این معرف از طریق جلوگیری از تخریب لیپوزومی کمپلکس‌های ترنسفکشن، بازده انتقال ژن را افزایش می‌دهد. تقویت کننده Virofect نیز

یک فرمول منحصر به فرد مشتق شده از آدنوویروس است که با بهره‌برداری از گیرنده‌های آدنوویروس روی سلول برای تحویل کارآمد DNA به درون سلول، عمل می‌کند. بازده انتقال ژن به سلول‌های RAW264.7 با این روش حدود ۵۰-۶۰ درصد بوده است [۱۸]. به‌دلیل راندمان پایین ترنسفکشن به روش‌های شیمیایی، محققان گاهی به روش‌های گران‌تر و زمان‌بر مانند الکتروپوریشن متوسل می‌شوند [۱۹] از آن جمله شرکت Nepagene ژاپن که با استفاده از دستگاه‌های مختلف الکتروپوریشن خود، با حفظ زنده‌مانی ۷۰ درصدی، موفق به ترنسفکشن ۷۰ درصدی سلول RAW264.7 شده است. در سالیان اخیر به دلیل مزایای فراوان و کتورهای لتی ویروس از جمله آلوده کردن طیف وسیعی از سلول‌ها با سمیت بسیار کم [۲۰]، ظرفیت بالای پذیرش ژن خارجی [۲۱]، الحاق ژن خارجی در بخش‌های فعال ژنوم میزبان و بیان پایدار ژن خارجی بدون خاموشی آن [۲۲، ۲۳]، استفاده از آنها در برای انتقال ژن به درون سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های سخت ترنسفکت گسترش بسیاری پیدا کرده است. بنابراین، در مطالعه حاضر تلاش شده است تا با استفاده از وکتورهای لتی ویروسی، ژن گزارشگر GFP به‌صورت پایدار به داخل سلول RAW264.7 منتقل و به‌صورت پایدار بیان شود و کارایی این روش با بافرهای شیمیایی موجود در آزمایشگاه شامل FuGENE® HD، Xfect™ Transfection Reagent و Lipofectamine™ 3000 مقایسه شود. از سوی دیگر، از آنجا که برای ترنسداکشن ویروسی لازم است ویروس‌ها در یکی از ساب‌تایپ‌های سلول HEK293 تولید شوند، در این مطالعه مهمترین فاکتورهای موثر بر تولید ویروس در سلول HEK 293T از جمله نوع بافر ترنسفکشن انتخابی، زمان انکوباسیون و غلظت بافر مورد استفاده بهینه سازی شدند. همچنین، سعی بر آن شد در روش ویروسی، با بهینه‌سازی مواردی مانند غلظت استوک ویروسی، مدت زمان انکوباسیون ویروس و سلول و استفاده از بافرهای

شیمیایی موثر در آلوده سازی ویروس مانند پلی برن، کارایی روش ترنسداکشن بررسی و بهبود یابد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱ رده های سلولی

در این مطالعه، رده سلولی ماکروفاژ موشی RAW264.7 و رده سلولی کلیه جنین انسانی HEK 293T خریداری شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی به ترتیب در محیط کشت های DMEM/F12 و RPMI 1640 به اضافه ۱۰ درصد از FBS و ۲ درصد آنتی بیوتیک penicillin/streptomycin در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

۲-۲ استخراج پلاسمید

در پژوهش حاضر، در بخش ترنسفکشن ویروسی، از ترنسفر وکتور لنتی ویروسی -pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A حاوی GFP و مارکر انتخابی puromycin، پلاسمید بسته بندی psPAX2 و پلاسمید کدکننده گلیکوپروتئین غشایی pMD2.G خریداری شده از بانک وکتورهای بیانی پستانداران مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران استفاده شد. در بخش ترنسفکشن شیمیایی نیز وکتور PEGFP-N1 استفاده شد. برای استخراج پلاسمید از کیت استخراج برند favorgen استفاده شد. همچنین، برای افزایش کیفیت پلاسمید استحصال از کیت Thermo PureLink HiPure Plasmid Midiprep برند

Fisher Scientific که قادر به حذف اندوتوکسین ها بوده و پلاسمیدی با غلظت بالا و کیفیت خلوص مناسب ترنسفکشن استخراج می کند استفاده شد. برای تغلیظ پلاسمید استخراج شده نیز کیت GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit استفاده شد.

۲-۳ ترنسفکشن سلول HEK293T

برای تولید ذرات ویروسی، از عامل ترنسفکشن PEI شرکت Molekula (خطی، وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون و غلظت ۱ ستوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) برای ترنسفکشن رده سلولی HEK 293T استفاده شد. ابتدا سه فاکتور زمان، غلظت و نسبت PEI:DNA که در مطالعات و تحقیقات پیشین نیز بر اهمیت آنها تاکید شده است [۲۴-۲۶] در پلیت ۶ خانه بهینه سازی شد (جدول ۱) و در نهایت سه پلاسمید لنتی ویروس psPAX2 (۱۰ میکروگرم)، pMD2.G (۷ میکروگرم) و -pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A (۲۰ میکروگرم) به صورت همزمان در سلول HEK 293T که از روز قبل در یک پلیت 10 سانتی متری کوت شده بودند ترنسفکشن شدند.

۲-۴ ساخت ذرات ویروسی و تغلیظ

پس از ترنسفکشن، محیط رویی که حاوی ذرات ویروسی تولید شده بود در ساعت های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ جمع آوری شد و سپس، برای حذف بقایای سلولی به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد.

جدول ۱ مقادیر DNA، PEI و زمان مورد استفاده جهت ترنسفکشن سلول HEK 293T

نسبت DNA:PEI	μg of DNA	μL of 1mg/mL PEI	زمان انکوباسیون
1:1	37	37	4h/1h
1:2	37	74	4h/1h
1:3	37	111	O/N
1:4	37	148	O/N
1:6	37	222	O/N

را نمی‌کنند. در این روش، بسته به غلظت سو سپانسیون سلولی و نیاز به رقت‌سازی، سو سپانسیون سلولی با رنگ تریپان بلو مخلوط می‌شود. سپس، به صورت چشمی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی و شمارش قرار می‌گیرد تا مشخص شود که چند درصد از سلول‌ها رنگ را جذب می‌کنند (سلول‌های آبی، مرده) و چند درصد رنگ را جذب نمی‌کنند (سلول‌های سفید، زنده).

۲-۷ آنالیز تکثیر سلولی (ارزیابی سیتوتوکسیسیته)

برای ارزیابی اثر سیتوتوکسیک PEI، پلی‌برن و آنالیز تکثیر سلولی در MOIهای مختلف در ترنسداکشن ویروسی از کیت MTT شرکت ایده زیست نو ترکیب استفاده شد که اساس این روش بر مبنای احیای نمک زرد MTT به کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فرمازان است که خود متأثر از فعالیت متابولیکی سلول‌های فعال در نتیجه حضور آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز وابسته به NAD(P)H است. در سلول‌های مرده، احیای MTT به دلیل کاهش فعالیت متابولیکی سلول کم می‌شود و شدت رنگ کاهش می‌یابد.

۲-۸ تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شدند. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از GraphPad Prism نسخه ۹.۰ انجام شد. تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار در $p \leq 0.05$ و بسیار معنی‌دار در $p < 0.01$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

بالا ترین ترنسفاکشن شدگی سلول HEK 293T در نسبت PEI:DNA یک به یک در زمان یک ساعت و غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر PEI به دست آمد.

از آنجا که، کارایی ترنسفاکشن بر روی انتقال موفق DNA پلاسمیدی به داخل سلول‌ها اثر مستقیم دارد، بهینه‌سازی مقدار DNA مورد استفاده و نسبت آن با عامل ترنسفاکشن حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه برای تولید ذرات ویروسی در سلول HEK 293T از عامل ترنسفاکشن PEI

در ادامه محیط رویی با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد تا کاملاً عاری از هر نوع بقایای سلولی کوچک شود و در نهایت با استفاده از روش اولترافیلتراسیون در سیستم آمیکون ۱۰۰ کیلودالتون، تغلیظ و پس از فیلتر مجدد ۰/۴۵ میکرومتری و تعیین تیترا نهایی، بلافاصله بدون نگهداری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای آلوده‌سازی سلول RAW264.7 استفاده شد.

۲-۵ تیتراسیون ویروس تغلیظ شده و آلوده‌سازی سلول RAW264.7 (ترنسداکشن)

برای تعیین تیترا ویروسی، میزان آنتی ژن p24 ویروس‌های تشکیل شده با استفاده از کیت الایزای HIV 1&2 Ag-Ab شرکت پیش‌تاز طب ارزیابی شد. محاسبه تیترا بر مبنای ۲۰۰۰ مولکول پروتئین p24 به ازای هر پارسیکل ویروسی انجام گرفت. با استفاده از فرمول‌های a و b میزان استوک ویروسی مورد نیاز جهت ترنسداکشن بر حسب میلی‌لیتر محاسبه شد.

a: total TU needed =
(total number of cells per well) $\times$ (desired MOI)

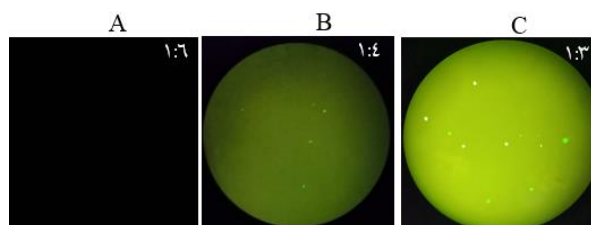
b: total mL of lentiviral particles to add to each well
= (total TU needed) / (TU/mL functional titer)

ترنسداکشن در پلیت ۶ خانه در محیط کشت DMEM/F12 و در حضور ۲ درصد در MOIهای مختلف انجام شد. برای بهبود ترنسداکشن ژن از طریق وکتورهای ویروسی به داخل سلول نیز از پلی‌برن با غلظت نهایی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. پس از آلوده سازی، سلول در انکوباتور در شرایط رشدی ذکر شده قرار گرفت و متعاقباً با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بیان ژن GFP بررسی شد.

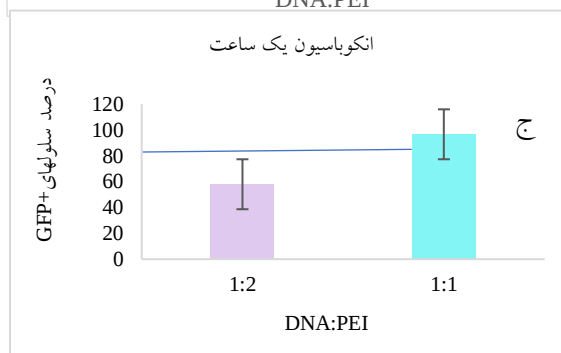
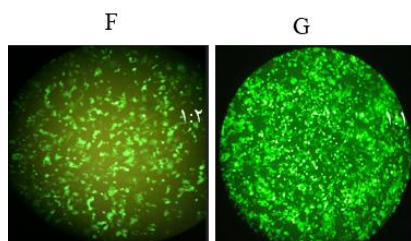
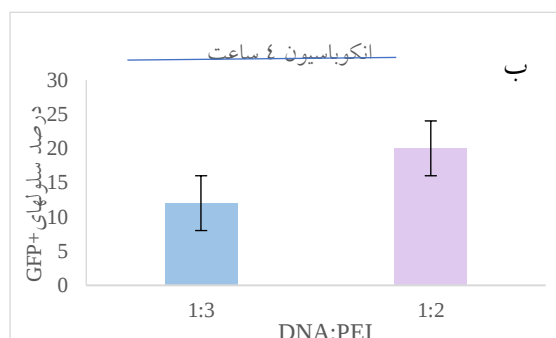
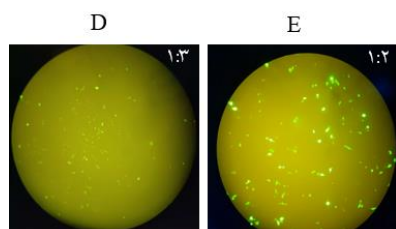
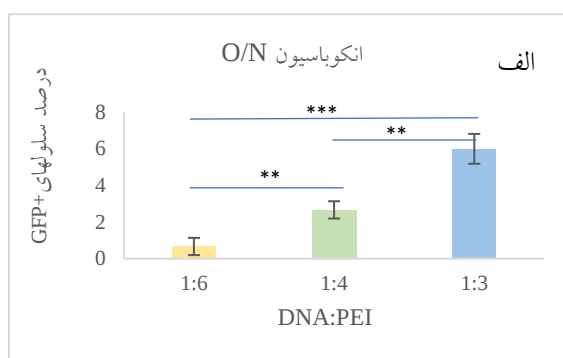
۲-۶ بررسی زنده ماندن به روش تریپان بلو

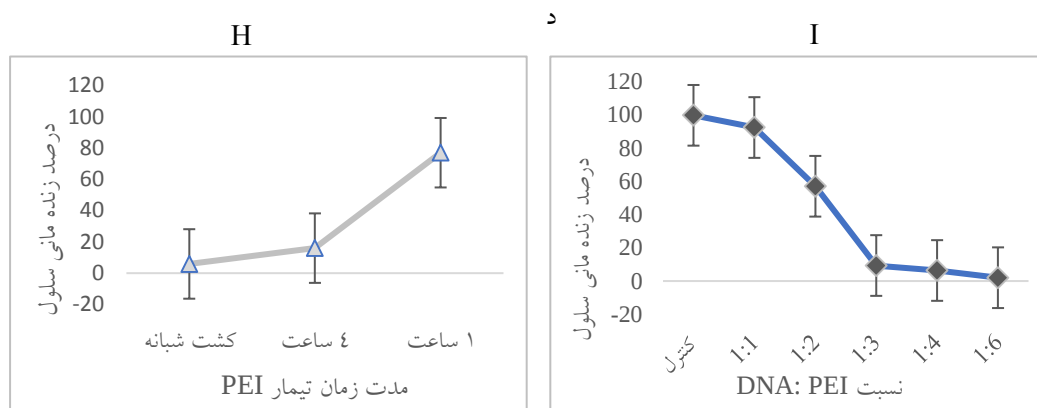
این سنجش بر این اصل استوار است که سلول‌های زنده دارای غشاهای سلولی سالم و دست نخورده هستند که می‌توانند به رنگ‌های خاصی مانند تریپان بلو اجازه داخل شدن به سلول را ندهند، برعکس، سلول‌های مرده این کار

رساندن میزان سمیت و افزایش کارایی ترنسفکشن، بهترین نسبت DNA:PEI، زمان انکوباسیون و غلظت PEI و زنده مانی سلول‌ها پس از ترانسفکشن بررسی شد. همانگونه که در شکل و نمودار ۱-الف نشان داده شده است انکوباسیون O/N در تمامی نسبت‌های مورد استفاده ۱:۶، ۱:۴ و ۱:۳ باعث مرگ و میر بالا و لیز سلول‌ها شده است و از این بین نسبت ۱:۳ به دلیل سمیت کمتر، بیان بسیار پایینی از فلورسنت سبز رنگ (حدود ۶ درصد) نشان داد.



استفاده شد که با تشکیل کمپلکس بار مثبت با انواع مختلف اسیدهای نوکلئیک دارای مزایایی مانند کارایی ترنسفکشن بالا، سرعت عمل و مقرون به صرفه بودن در مقایسه با دیگر عوامل ترنسفکشن است [۲۷ و ۲۸]. اما از آنجا که PEI دارای اثر سمیت شناخته شده بر روی سلول‌های یوکاریوتی است [۲۹ و ۳۰] و بهترین غلظت مورد استفاده و نسبت DNA:PEI از یک lot به دیگر lot متفاوت است لازم است بهینه‌سازی‌های مورد نیاز در این خصوص انجام شود. برای این هدف و برای به حداقل





شکل ۱ بهینه‌سازی راندمان ترنسفکشن سلول HEK293T بر اساس نسبت DNA:PEI و زمان انکوباسیون. تصاویر و نمودار گروه ۱-الف نشان داد انکوباسیون O/N در هیچیک از نسبت‌های مورد استفاده منجر به ترنسفکشن بهینه و بیان اثربخش پروتئین GFP نشده است. در اشکال و نمودار گروه ۱-ب، میزان کمی بیان فلورسینس سبز رنگ در هر دو نسبت ۱:۲ و ۱:۳ دیده شد که در نسبت ۱:۲ به طور معنی‌داری بیشتر بود. اشکال و نمودار گروه ۱-ج نشان داد که کاهش نسبت DNA:PEI و مدت زمان انکوباسیون به یک ساعت، منجر به بیان مناسب GFP در هر دو نسبت ۱:۱ و ۱:۲ شد که در نسبت ۱:۱ به طور معنی‌داری بالاتر بود و حداکثر سطح فلورسانس GFP در زمان انکوباسیون یک ساعته مشاهده شد. (د) نمودار در صد سلول‌های زنده پس از ترنسفکشن مبتنی بر PEI در زمان‌های مختلف (H) و نسبت‌های متفاوت DNA: PEI (I) نشان داد که زمان انکوباسیون O/N در هر نسبتی از DNA:PEI دارای سمیت سلولی است. میله‌های خطا نشان دهنده انحراف معیار حاصل از ۳ نمونه است. ($p \leq 0.0001$ ****, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.05$ *) از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد).

است (۵۸ درصد در مقابل ۹۶ درصد). در مجموع بالاترین سطح فلورسانس در نسبت ۱:۱ و زمان یک ساعت مشاهده شد (به طور میانگین ۹۶ درصد). در مرحله بعد برای تعیین غلظت اپتیمم PEI، ۴ غلظت مختلف PEI ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) شامل ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ برای ترنسفکشن استفاده شد که روی زنده‌مانی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. اما بیشترین میزان سطح بیان GFP در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از PEI وجود داشت. به طور کلی، نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی و کارایی ترنسفکشن با غلظت PEI، نسبت DNA:PEI و زمان تیمار رابطه مستقیم دارد به گونه‌ای که نسبت ۱:۱، زمان انکوباسیون یک ساعت و غلظت PEI برابر با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با کمترین میزان سمیت و بیشترین بیان فلور سنت GFP برای مرحله اصلی تولید ویروس در نظر

میزان زنده‌مانی در نسبت‌های ۱:۶، ۱:۴ و ۱:۳ به ترتیب ۲، ۶ و ۹ درصد بود. در زمان انکوباسیون ۴ ساعته (شکل و نمودار ۱-ب) هر دو نسبت ۱:۲ و ۱:۳، تابش کمی از فلورسنت سبز داشتند که میزان مرگ‌ومیر و لیز سلولی در مقایسه با تیمار O/N کاهش و در نتیجه سطح بیان GFP در نسبت ۱:۲ به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p < 0.01$). در آزمایش سوم (شکل و نمودار ۱-ج) زمان انکوباسیون یک ساعت در نسبت‌های ۱:۱ و ۱:۲ نشان داد که میزان ترنسفکشن در مقایسه با زمان O/N و ۴ ساعت، افزایش معنی‌داری پیدا کرده است ($p < 0.001$) با این وجود حتی یک ساعت پس از ترنسفکشن در چاهک‌های ۱:۲ مرگ‌ومیر سلولی افزایش (۵۷ درصد زنده‌مانی در نسبت ۱:۲ و ۹۲ درصد در نسبت ۱:۱) و میزان بیان GFP در مقایسه با نسبت ۱:۱ به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرده

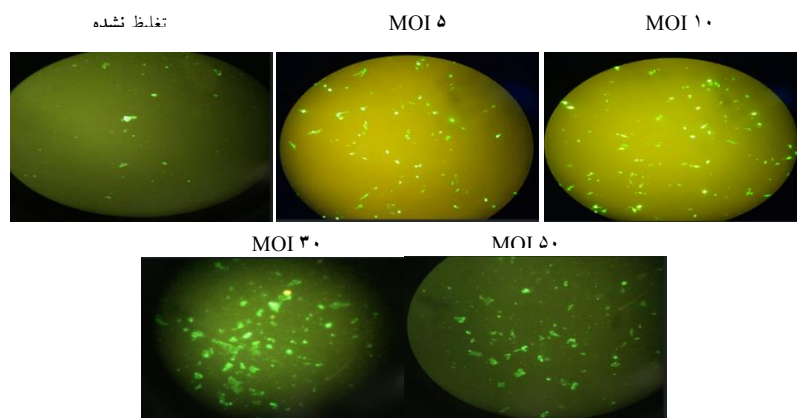
۲-۳ استخراج پلاسمید خالص و عاری از اندوتوکسین نیز منجر به ترنسفکشن شیمیایی موفق سلول RAW264.7 نشد.

به هنگام استخراج پلاسمید، اندوتوکسین‌ها در طول مرحله لیز سلولی آزاد می‌شوند و اغلب به همراه DNA پلاسمیدی خالص می‌شوند [۳۱]. از آنجا که اندوتوکسین‌ها از طریق رقابت با DNA برای اتصال به معرف ترانسفکشن آزاد، به شدت بازده انتقال ژن را کاهش می‌دهند و از سویی سلول‌های ماکروفاژی حساسیت بالایی به تحریک اندوتوکسین دارند [۳۲]، بنابراین پلاسمید مورد استفاده برای ترنسفکشن باید دارای کیفیت بالا و ترجیحاً عاری از اندوتوکسین، RNA و آلودگی‌های شیمیایی باشد. اغلب کیت‌های استاندارد miniprep موجود در بازار پلاسمیدهایی با سطح اندوتوکسین 10-100 EU/ μ g استحصال می‌کنند و از این طریق می‌توانند بر جذب DNA پلاسمیدی توسط سلول تأثیر بگذارند، بنابراین، پیشنهاد می‌شود از کیت‌های low-endotoxin استفاده شود که قادر هستند پلاسمیدهای با سطوح اندوتوکسینی <1 EU/ μ g استخراج کنند. در این مطالعه به دلیل عدم موفقیت روش ترنسفکشن شیمیایی، برای استخراج پلاسمید با کیفیت بالا از کیت PureLink™ HiPure Plasmid Purification DNA استفاده شد که از یک رزین تبادل آنیونی پتنت شده برای خالص‌سازی DNA پلاسمیدی بهره می‌برد که معادل دو راند استفاده از گرادیان‌های CsCl است. رزین مورد استفاده در کیت علاوه بر دارا بودن ظرفیت بالای استخراج، دارای سرعت جریان سریع، رزولوشن و بازدهی بالا به همراه حذف موثر اندوتوکسین می‌باشد. پس از استخراج پلاسمید عاری از اندوتوکسین، با استفاده از کیت GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit، پلاسمید استحصال‌ی تا حد ۱-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغلیظ شد تا بتوان با کاربرد حجم کمتری از پلاسمید به هنگام انجام تست، میزان

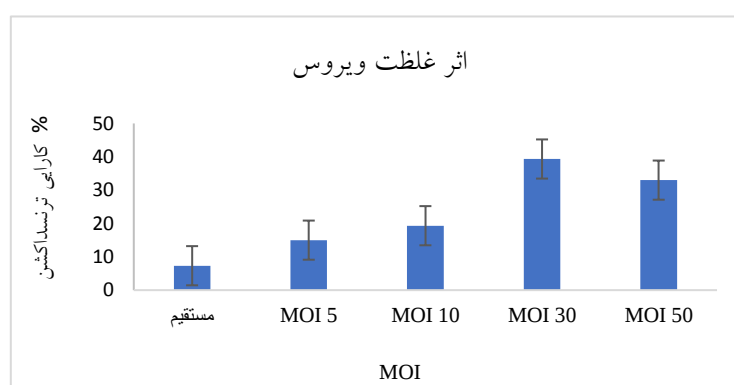
گرفته شد. کارایی ترانسفکشن برای وکتور لنتی ویروسی با استفاده از میکرو سکوپ فلور سنت و شمارش سلول‌هایی که فلورسانس ساطع می‌کردند محاسبه شد.

۱-۳ هیچیک از سه بافر شیمیایی مورد استفاده باعث تولید سلول‌های RAW264.7 سبز رنگ ترنسفکت شده نشد

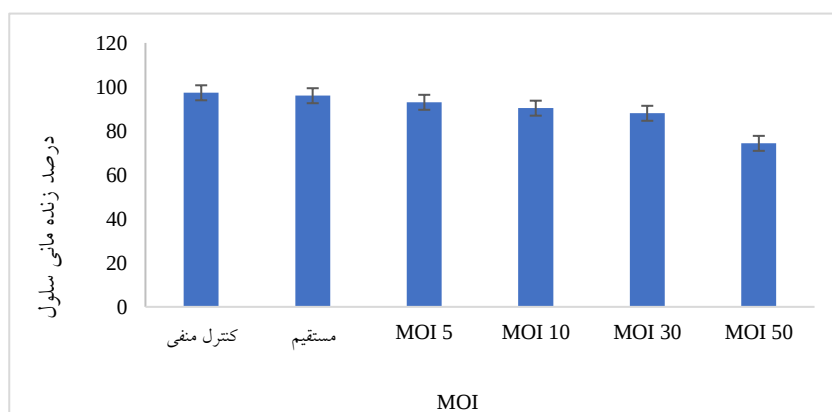
علی‌رغم آنکه Xfect™ Transfection Reagent و FuGENE® HD, Reagent به دلیل در دسترس بودن و سهولت استفاده، برای ترنسفکت اکثر سلول‌ها و حتی سلول‌های سخت ترنسفکت توصیه شده‌اند، اما در این مطالعه به کارگیری هر سه بافر به مدت ۶ ساعت منجر به ترنسفکت موفق سلول‌های RAW264.7 نشد. جستجوی منابع مختلف نشان داد که سلول‌های RAW264.7 به دلیل پاسخ طبیعی و ذاتی در برابر مواد ژنتیکی خارجی جزو سلول‌های سخت ترنسفکت شناخته می‌شوند که انتقال مواد ژنتیکی به آنها ممکن است نیاز به بهینه‌سازی بیشتر و استفاده از روش‌های کارآمدتری داشته باشد. با این وجود و علی‌رغم اجرای شرایط بهبود دهنده ترنسفکشن، مانند کاهش تعداد پاساژ سلول به زیر ۵ پاساژ، افزایش مدت زمان انکوباسیون ترنسفکشن به O/N، بهینه‌سازی نسبت DNA به عامل ترنسفکشن، حذف کامل آنتی‌بیوتیک و سرم از محیط کشت و ایجاد تراکم سلولی مناسب (۷۰-۸۰ درصد) که همگی منجر به افزایش نرخ ترنسفکشن می‌شوند، تغییری در روند انتقال ترنسژن GFP حاصل نشد. از آنجا که علاوه بر کمیت، کیفیت پلاسمید مورد استفاده نیز به میزان زیادی بر روی موفقیت ترنسفکشن اثرگذار است، در مرحله بعد خلوص بالای پلاسمید به عنوان یک عامل تاثیرگذار در جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته سلولی نظیر سیتوتوکسیسیتی و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی مدنظر قرار گرفت.



شکل ۲ بهینه‌سازی راندمان ترنسداکشن سلول RAW264.7 در MOIهای مختلف. (الف): تصاویر میکروسکوپ فلورسنت تفاوت میزان ترنسداکشن ویروسی را در MOIهای متفاوت نشان داد.



نمودار ۲ کارایی ترنسداکشن در MOIهای مختلف بیانگر کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) تعداد سلول‌های ترنسداکت شده در MOI 50 در مقایسه با MOI 30 است.



نمودار ۳ میزان زنده‌مانی سلول RAW264.7 در MOIهای مختلف ویروسی پس از ترنسداکشن با استفاده از روش MTT

نتایج حاکی از آن بود که با افزایش MOI، راندمان انتقال نیز به طور معنی داری تا 30 MOI افزایش و پس از آن کاهش می یابد که این کاهش می تواند به دلیل سمیت غلظت های بالاتر ویروس بر روی سلول باشد. در واقع به نظر می رسد تا 30 MOI هر چه غلظت ویروس بالاتر رفته در اثر افزایش تماس های سلول به سلول، انتقال لتی ویروس به صورت کارآمدتری رخ داده است (نمودار ۲). آنالیز تکثیر سلولی (ارزیابی سیتوتوکسیسیته) در MOI های مختلف با استفاده از کیت MTT نیز تایید کرد که دوزهای بالای ویروس سبب کاهش زندهمانی سلول شده است (نمودار ۳). به گونه ای که در 50 MOI، زندهمانی به طور میانگین ۷۴ درصد بوده است که در مقایسه با 30 MOI به طور معنی داری کاهش یافته است ($p \leq 0.01$).

۴- بحث و نتیجه گیری

در حالی که، تا به امروز روش های متعددی برای ترنسفکشن بسط داده شده است، لیکن انواع خاصی از سلول ها به بسیاری از این روش ها مقاوم هستند یا راندمان انتقال پایینی دارند، به نحوی که اصطلاحاً گفته می شود ترنسفکشن ژنی فرایندی وابسته به نوع سلول است. محققان همواره در تلاش هستند برای انتقال ژن ها به درون سلول های سخت ترنسفکت، بافرهای نسل جدیدتری را توسعه دهند تا بتوانند بر موانع موجود در ترنسفکشن سلول ها غلبه کنند. با این وجود، انتقال ژن به داخل برخی سلول ها مانند، سلول های پرایمری و سلول های خونی مانند ماکروفاژها، اغلب مشکل و گاهی به صورت تلاشی ناموفق است و پیش بینی اینکه کدام روش ترنسفکشن بهترین نتایج را با یک رده سلولی خاص ایجاد می کند دشوار است [۴۲]. سلول های ماکروفاژی RAW264.7 که به دلیل ثبات عملکردی و توانایی ذاتی آنها برای انجام فاگوسیتوز و پینوسیتوز برای مطالعه برهم کنش های میزبان و پاتوژن ضروری هستند و سنگ بنای بسیاری از تلاش های تحقیقاتی ایمنی شناسی را تشکیل می دهند از

دسته سلول های سخت ترنسفکت محسوب می شوند که دستکاری ژنتیکی آنها را دشوار می کند. نتایج ترنسفکشن سلول RAW264.7 حاصل از این مطالعه نشان داد که هیچیک از بافرهای شیمیایی منجر به انتقال ترنس ژن GFP به درون سلول نشدند. این در حالی است که در دستورالعمل کار با بافر FuGENE® HD به ترنسفکشن موفق سلول RAW264.7 اشاره شده است و یکی از ویژگی های شاخص بافر Lipofectamine TM3000 شرکت thermofisher، افزایش تا ده برابری کارایی بافر حتی برای سلول های سخت ترنسفکت می باشد. از آنجا که نوع بافر مورد استفاده، تنها یکی از موارد متعدد دخیل در بازدهی انتقال ژن می باشد، این عدم موفقیت می تواند به دلایل زیادی رخ دهد که از آن جمله می توان نحوه اجرای پروتکل ترنسفکشن، مدت زمان انکوباسیون، تراکم سلولی در زمان ترنسفکشن، نسبت بین DNA و بافر ترنسفکشن، کیفیت پلاسمید استحصالی و حتی نوع بافر رها سازی مورد استفاده در پایان مرحله استخراج پلاسمید را نام برد. در این پژوهش سعی شد تا حد امکان مطابق با دستورالعمل کار با هر سه بافر، تمامی این موارد در محدوده شرایط مناسب قرار گیرند که نتایج نشان داد تغییری در بازدهی انتقال ژن به داخل سلول رخ نداد. از آنجا که کیفیت پلاسمید استحصالی بسیار بالا بود به نظر نمی رسد که عامل بازدارنده ترنسفکشن بوده باشد. از سویی ترنسفکشن با هیچیک از سه بافر شیمیایی موفقیت آمیز نبود که این موضوع ممکن است به دلیل عدم ورود کافی پلاسمید به داخل سلول و یا همضم نوکلئازی DNA وارد شده بخاطر واکنش های ایمنی ناشی از عملکرد فیزیولوژیک سلول به عنوان یک سلول ماکروفاژی بوده باشد. از سوی دیگر، سلول RAW264.7 یک سلول تقسیم شونده است و چنانچه در فاز رشد لگاریتمی ترنسفکت شود در حالت معمول نباید با مشکل عدم ورود ژن به داخل هسته مواجه شود، با این حال، می توان در مطالعات

بعدی از بافرهای تقویت کننده ورود DNA به داخل هسته مانند بافر nucleofector در ترکیب با روش‌های شیمیایی و الکتروپوریشن استفاده کرد.

محققین و شرکت‌های تجاری مختلف در چند سال اخیر انواع متفاوتی از بافرهای نسل جدید برای ترنسفکشن سلول‌های پرایمری و سلول‌های خونی توسعه داده اند که با موفقیت در پروتکل‌های مختلف مورد آزمون و تایید قرار گرفته‌اند. متأسفانه از آنجا که بسیاری از این بافرهای غیر ویروسی نسل جدید در دسترس محققین کشور ما نیستند یا استفاده از آنها برای ترنسفکشن هر سل لایینی ممکن است مستلزم بهینه سازی موارد مختلفی باشد، در این مطالعه از وکتورهای لنتی ویروسی که به عنوان یک ابزار قدرتمند انتقال ژن که طیف وسیعی از سلول‌ها را هدف قرار داده و بیان پایدار ژن‌ها را ممکن می‌سازند برای افزایش کارایی ترنسفکشن سلول RAW264.7 استفاده شد. یافته‌های حاصل از این مطالعه حاکی از ورود موفق ذرات ویروسی به داخل سلول و بیان پروتئین GFP بود که این موضوع هم‌سو با نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی بر روی سلول‌های مختلف، بیانگر بازدهی بالای وکتورهای ویروسی در انتقال ترنس ژن به داخل ژنوم سلول می‌باشد. همچنین، فیلتراسیون استوک ویروسی و تغلیظ آن برای رسیدن به تیترا بالا، منجر به بهبود معنی‌دار بازدهی ترنسداکشن و افزایش بیان ژن هدف شد که این موضوع بیانگر کارایی روش فیلتراسیون در افزایش تیترا ویروسی و عفونت‌زایی آن در مقیاس کوچک آزمایشگاهی است.

تحقیقات متعدد نشان داده است انجام برخی اصلاحات نظیر اسپینوکولیشن برای در معرض قرارگیری بیشتر ویروس و سلول [۴۳]، ترنسداکشن سلولی بر روی چاهک‌های کوت شده با رترونکتین [۴۴-۴۶]، ترنسداکشن مگنتی [۴۷ و ۴۸] و استفاده از پپتید vectofusin-1 [۴۹ و ۵۰] می‌تواند سبب تسهیل اتصال پوشش ویروس به سلول

هدف و بهبود شرایط انتقال در سلول‌های مقاوم به ترنسداکشن ویروسی شوند. بنابراین، در مطالعات بعدی می‌توان از این روش‌ها استفاده کرد و کارایی آنها را به صورت جداگانه در مقایسه با تغلیظ ویروسی و بافر پلی برون بکار رفته در این پژوهش ارزیابی کرد. علاوه بر این، از آنجا که در مطالعات پیشین بر خلاف ماکروفاژهای پرایمری، ترنسفکشن سل لاین RAW264.7 به کمک الکتروپوریشن با موفقیت انجام شده است [۲۲] می‌توان با به کارگیری این روش و مقایسه آن با روش ویروسی، کارایی دو روش را با هم مقایسه کرد.

همچنین، با توجه به تفاوت راندمان تولید ذرات ویروسی در سل لاین‌های مختلف HEK با یکدیگر، پیشنهاد می‌شود از سلول Lenti-X HEK 293T استفاده کرد که ۳۰ برابر بیشتر از سل لاین والدی HEK293 و ۶ برابر بیشتر از سل لاین 293FT ذرات ویروسی تولید می‌کند. علاوه بر این، برای کاهش سمیت و بهبود زنده ماندن سلول می‌توان از بافر PEI MAX® در مقایسه با PEI و دیگر بافرهای ترنسفکشن لیپوزومی برای ترنسفکشن سلول تولید کننده ویروس بهره برد.

۵- منابع

- [1] Chong, Z. X., Yeap, S. K. and Ho, W. Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 9: e11165.
- [2] Kim, T. K., and Eberwine, J. H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 13;397(8):3173–3178.
- [3] Jamour, P., Jamali, A., Ghalyanchi Langeroudi, A., Ebadi Sharafabad, B., and Abdoli, A. (2024) Comparing chemical transfection, electroporation, and lentiviral vector transduction to achieve optimal transfection conditions in the Vero cell line. *BMC. Mol. Cell. Biol.* 25:15.
- [4] Zhao, N., Qi, J., Zeng, Z., Parekh, P., Chang, C. C., Tung, C. H., and Zu, Y. (2012) Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex. *Control Release*. 10; 159(1): 104–110.

- [14] Cheung, S. T., Shakibakho, S., So, E. Y. and Mui, A. L-F. (2015) Transfecting RAW264.7 Cells with a Luciferase Reporter Gene. *J Vis Exp.* 18;(100):52807.
- [15] Aluigi, M. G., Hofreiter, S., Falugi, C., Pestarino, M. and Candiani, S., (2007) Efficiency of two different transfection reagents for use with human NTERA2 cells. *Eur J Histochem.* 51(4):301-4.
- [16] Dumitrescu, M., Vacaru, A. M., Trusca, V. G., Fenyo, I. M., Ionita, R. and Gafencu, A. V. (2021) K2 Transfection System Boosts the Adenoviral Transduction of Murine Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 9;22(2):598.
- [17] Dokka, S., Toledo, D., Wang, L., Shi, X., Huang, C., Leonard, S. and Rojanasakul, Y. (2000) Free radical-mediated transgene inactivation of macrophages by endotoxin, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(5): L878-83.
- [18] Walia, R., (2011) Transfection Protocol for Raw 264.7 (Mouse Leukaemic Monocyte Macrophage Cell Line) in Targefect Handbook of Transfection Protocols. *Bio-Protocol.* DOI:10.1038/PROTEX.2011.227.
- [19] Kalidasan, V., Ng, W. H., Ishola, O. A., Ravichantar, N., Tan, J. J. and Theva Das, K. (2021) A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. *Sci Rep.* 11, 19265.
- [20] Quinonez, R., Sutton, R. E. (2002) Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol.* 21(12):937-51. Review.
- [21] Lundstrom, K. (2003) Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 21(3):117-122.
- [22] Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 110: 521-529.
- [23] Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J.R., and Bushman, F. D. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* 2: E234.
- [24] Fang, Q., and Shen B. (2010) Optimization of polyethylenimine-mediated transient transfection using response surface
- [5] Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., and Sieron, A. L. (2021) An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front Bioeng Biotechnol.* 20:9:701031.
- [6] Suguru, K., Kouji, I. and Atsushi, M. (2022) Macrophage Polarity and Disease Control, *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 23;23(1):144.
- [7] Chen, S., Saeed, Abdullah, F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L. and Duo, Y. (2023) Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 22;8(1):207.
- [8] Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Ye, J. and Rojanasakul, Y. (2000) High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. *Int J Pharm.* 206 97–104.
- [9] Wang, C., Du, J., Chen, X., Zhu, Y., and Sun, H. (2019) Activation of RAW264.7 macrophages by active fraction of Albizia julibrissin saponin via Ca²⁺-ERK1/2-CREB-lncRNA pathways. *Int Immunopharmacol.* 77:105955.
- [10] Harker, Quinn. (2022) Functional Comparison of RAW 264.7 Cells and Murine Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM), Undergraduate Theses and Capstone Projects. 238, University of Lynchburg.
- [11] Pireaux, V., Sauvage, A., Bihin, B., Van Steenbrugge, M., Rousseau, A., Van Antwerpen, P., Zouaoui Boudjeltia, K., and Raes, M. (2016) Myeloperoxidase-Oxidized LDLs Enhance an Anti-Inflammatory M2 and Antioxidant Phenotype in Murine Macrophages, *Mediators Inflamm,* 30;2016:8249476.
- [12] Lee, S. Y. , Fierro Jr, J., Dipasquale, J., Bastian, A., Tran, A. M., Hong, D., Chin, B., Nguyen-Lee, P. J., Mazal, S., Espinal, J., Thomas, T. and Dou, H. (2022) Engineering Human Circulating Monocytes/Macrophages by Systemic Deliverable Gene Editing. *Front Immunol,* 18:13:754557.
- [13] Lopukhov, A. V., Yang, Z., Haney, M. J., Bronich, T. K., Sokolsky-Papkov, M., V. Batrakova, E., Klyachko, N. L., and Kabanov, A. V. (2021) Mannosylated Cationic Copolymers for Gene Delivery to Macrophages. *Macromol Biosci.* 21(4): e2000371.

- [34] Stacey, K. J., Sweet, M. J. and Hume, D. A. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol.* 157(5):2116-22.
- [35] Sester, D. P., Stacey, K. J., Sweet, M. J., Beasley, S. J., Cronau, S. L. and Hume, D. A. (1999) The actions of bacterial DNA on murine macrophages. *J Leukoc Biol*, 66(4):542-8.
- [36] Jiang, W., Reich, C. F. and Pisetsky, D. S. (2006) In vitro assay of immunostimulatory activities of plasmid vectors. *Methods Mol Med.* 127:55-70.
- [37] Pan, H., Mostoslavsky, G., Eruslanov, E., Kotton, D.N. and Kramnik, Igor. (2008) Dual-promoter lentiviral system allows inducible expression of noxious proteins in macrophages. *J Immunol Methods.* 1;329(1-2):31-44.
- [38] Soheili, T., Bellier, F., Durand, A., Denis, A., Lagresle-Peyrou, C., Cavazzana, M., Andre-Schmutz, I. and Six, E. (2018) A Nontoxic Transduction Enhancer Enables Highly Efficient Lentiviral Transduction of Primary Murine T Cells and Hematopoietic Stem Cells, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 10 :341-347.
- [39] Kim, Y., Lee, D. Y., Choi, J. U., Park, J. S., Lee, S. M., Kang, C. H. and Park, C. H. (2023) Optimized conditions for gene transduction into primary immune cells using viral vectors. *Sci Rep.* 31;13:12365.
- [40] Nanba, D., Matsushita, N., Toki, F. and Higashiyama, (2013) Efficient expansion of human keratinocytstem/progenitor cells carrying a transgene with lentiviral vector. *Stem Cell Res Ther.* 18; 4(5):127.
- [41] Davis, H. E., Morgan, J. R., Yarmush, M. L. (2002) Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes *Biophysical Chemistry, Biophys Chem.* ;97(2-3):159-72.
- [42] Smale, S. T. (2010) Transfection by electroporation of RAW 264.7 macrophages. *Cold Spring Harb Protoc.* (2):pdb.prot 5374.
- [43] Anastasov, N., Höfig, I., Mall, S., Krackhardt, A. M. and Thirion, C. (2016) Optimized Lentiviral Transduction Protocols by Use of a Poloxamer Enhancer, Spinoculation, and scFv-Antibody Fusions to VSV-G. *Methods Mol Biol.* 1448:49-61.
- [44] Lee, H-J., Lee, Y-S., Kim, H-S., Kim, Y-K., Kim, J-H., Jeon, S-H., Lee, H-W, Kim, S., methodology design. *Electron. J. Biotechnol.* 13:5.
- [25] Yang, S., Shi, H., Chu, X., Zhou, Xiaoling., and Sun, P. (2016) A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biotechnol Let.* 38:(9):1631–1641.
- [26] Toledo, J.R., Prieto, Y., Oramas, N., and Sánchez, O. (2009) Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. *Appl Biochem Biotechnol.* 57(3):538-44.
- [27] Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S. and Leahy, D. J. (2013) Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 529:227–240.
- [28] González-Domínguez, I., Puente-Massaguer, E., Lavado-García J., Cervera L. and Gòdia, F. (2022) Micrometric DNA/PEI polyplexes correlate with higher transient gene expression yields in HEK 293 cells. *N Biotechnol.* 68: 87-96.
- [29] Taranejoo, S., Liu, Jun., Verma, P. J. and Hourigan, Kerry. (2015) A review of the developments of characteristics of PEI derivatives for gene delivery applications, *J. APPL POLYM. SCI.* 42096 :132(25).
- [30] Khansarizadeh, M., Mokhtarzadeh, A., Rashedinia, M., Taghdisi, S. M., Lari, P., Abnous, K. H. and Ramezani, M. (2016) Identification of possible cytotoxicity mechanism of polyethylenimine by proteomics analysis. *Hum Exp Toxicol.* 35(4):377-87.
- [31] White, D., Creswell, D., Schenborn, E. and Krueger, S. (2003) Automated Purification of Transfection-Grade Plasmid DNA Using Wizard MagneSil Tfx System. *SLAS Technol*, 8(4): 50-53.
- [32] Kiesewetter, A., Gupta, A., Heinen-Kreuzig, A., Greenhalgh, T., and Stein, A. (2023) Improved endotoxin removal using ecofriendly detergents for intensified plasmid capture. *Biotechnol Prog.* 39(6):e3375.
- [33] Stacey, K. J., Ross, I. L. and Hume, D. A. (1993) Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. *Immunol Cell Biol.* 71(2):75-85.

- applications: An update, *Biomaterials Advances*, 154: 213657.
- [48] Castellani, S., Orlando, C., Carbone, A., Di Gioia, S. and Conese, Massimo (2016) Magnetofection Enhances Lentiviral-Mediated Transduction of Airway Epithelial Cells through Extracellular and Cellular Barriers. *Genes*. 7(11), 103.
- [49] Vermeer, L. S., Hamon, L., Schirer, A., Schoup, M., Cosette, J., Majdoul, S., Pastré, D., Stockholm, D., Holic, N., Hellwig, P., Galy, A., Fenard, D. and Bechinger, B. (2017) Vectofusin-1, a potent peptidic enhancer of viral gene transfer forms pH-dependent α -helical nanofibrils, concentrating viral particles. *Acta Biomater.* 64:259-268.
- [50] Fenard, D., Ingrao, D., Seye, A., Buisset, Julien., Genries, S., Martin, S., Kichler, A. and Galy, A. (2013) Vectofusin-1, a New Viral Entry Enhancer, Strongly Promotes Lentiviral Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 7;2(5):e90.
- Miyoshi, H., Chung, H-M. and Kim, D-K. (2009) Retronectin enhances lentivirus-mediated gene delivery into hematopoietic progenitor cells. *Biologicals*. 37 (4) 203-209.
- [45] Lamers, C.H.J., Elzakker, P. v., van Steenbergen, Sleijfer, S.C.L., Debets, R. Gratama, J.W. (2008), Retronectin[®]-assisted retroviral transduction of primary human T lymphocytes under good manufacturing practice conditions: tissue culture bag critically determines cell yield. *CYTOTHERAPY*. 10;4:406-416.
- [46] Gibson, J. and Kramer, J. (2007) RetroNectin[®] Reagent: A novel method to increase gene transduction efficiency. *Cell. Mol. Biol.* 67:1194.
- [47] Azadpour, B., Aharipour, N, Paryab, A, Omid, H., Abdollahi, S., Madaah Hosseini, H, Malek Khachatourian, A., Toprak, M. S. and Seifalian, M. A. (2023) Magnetically-assisted viral transduction (magnetofection) medical

Stable GFP transduction of hard-to-transfect mouse macrophage RAW264.7 cells by a second-generation lentiviral vector

Monir Salati¹, Mansour Abachi², Majid Sadeghizadeh³, Hamid Reza Soleimanpour-lichai^{4*}

1. PhD Student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. PhD Student, Systems Biotechnology Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

3. Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Stem Cells and Regenerative Medicine Group, Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

hrs@nigeb.ac.ir

Receipt: 2024/10/12

Accepted: 2025/03/09

Abstract

Macrophages are considered a particularly challenging cell type to transfect. Given their importance as therapeutic targets, developing a successful transfection method for these cells is highly desirable. The efficiency of lentiviral transfection was compared to three commercially transfection reagents (Xfect™ Transfection Reagent, FuGENE® HD, and Lipofectamine TM 3000) in RAW264.7 macrophage cells. Following optimization and production of lentiviral particles in 293T cells, RAW264.7 cells were infected with varying MOI. Transduction efficiency, cell viability, and metabolic activity were measured and compared to the transfection efficiency of the chemical methods. None of the three chemical transfection reagents successfully transfected RAW264.7 cells. In contrast, the lentiviral method achieved transduction even at the lowest concentration of viral stock, with a green fluorescent signal observable under a fluorescence microscope. Increasing the viral stock concentration and using higher MOIs (up to 30) significantly ($p \leq 0.0001$) increased transduction efficiency. Despite requiring more time and effort than chemical methods, lentiviral transduction exhibited superior efficiency in transfecting hard-to-transfect cells and further improvements were achieved through some modifications such as virus concentration, the use of polybrene, no viral freezing and O/N incubation with concentrated viral particles. Since other parameters, especially the use of retronectin and spinoculation, are effective on the efficiency of the virus infection process, it is suggested that they be considered in future studies and

given the encouraging data of this research, this completed method can also be applied to other difficult-to-transfect cells, such as different types of stem cells or primary cells.

Keywords: Transfection, Transduction, RAW264.7, Difficult-to-transfect cells, Lentiviral vector, MOI