علوم و فناوری زیستی مدرس
دورهٔ ۱، شمارهٔ ۱، پاییز ۱۳۸۹

انتقال ژن به سلول‌های کبدی ردهٔ LMH جوجه به‌وسیله لنتی ویروس‌های نوترکیب

عباس رحیمی[۱]، موسی گردانه [۲*]، مسعود علی پناه[۳]، یاسین پناهی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران و دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان

۲- استادیار ژنتیک مولکولی، دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳- استادیار ژنتیک دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان

٤- کارشناس ارشد بیوشیمی، دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

***تهران، صندوق پستی ۱٤۹٦٥/۱٦۱**

mossa65@nigeb.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۵/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۱۹)

چکیده- لنتی ویروس‌ها، از جمله مؤثرترین ویروسهای نوترکیب برای انتقال ژن به سلول‌ها و بافت‌های پستانداران به‌شمار می‌رود. در این مطالعه، عملکرد لنتی ویروس‌های انسانی را در انتقال ژن خارجی به سلول‌های طیور بررسی کردیم. سه ناقل لنتی ویروسی به‌نام‌های ناقل انتقال (ناقل ترانسفر حامل ژن گزارش‌گر GFP)، ناقل بسته‌بندی و ناقل‌غشائی را هم‌زمان به سلول‌های مولد ویروس (ردهٔ HEK-293T) منتقل کردیم. سوپرناتان سلول‌های ترانسفکت شده را پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت جمع‌آوری کرده از فیلتر گذراندیم؛ سپس آن را به ستون‌های پروتئینی Amicon دارای فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی منتقل کرده و بخش اعظم سوپرناتان را از سانتریفوژ، از نمونه‌ها جدا کردیم. بدین ترتیب، استوکی در حجم 500 µl از سوپرناتان غلیظ شده و مملو از ویریون‌ها را به‌دست آوردیم. برای ترانسدوکشن سلول‌های کبدی ردهٔ LMH جوجه، رقت‌های مختلفی از این استوک ویروسی تغلیظ شده را به محیط کشت این سلول‌های در حال رشد، اضافه کردیم. ٤۸ ساعت بعد، آلودگی سلولی و بیان ترانسژن‌های گزارش‌گر را مشاهده کردیم که میزان بیان آن‌ها، ۹٦ ساعت پس از آلودگی، به ۱۰۰٪ افزایش یافت. نتایج مزبور نشان می‌دهد که سلول‌های با منشاء جوجه را نیز می‌توان با لنتی ویروس‌های با منشاء انسانی، آلوده کرد. همچنین با توجه به نیاز به تیتر بالای ویروس، برای انتقال موفقیت‌آمیز ژن‌ها، روش فیلتراسیون، تیتر بالایی از ویروس را تولید می‌کند و از نظر کارایی، قابل مقایسه با روش‌های سنتی از جمله روش اولتراساتریفوژ بوده و از نظر هزینه، حجم کار و زمانبری، بر آن‌ها ارجحیت دارد.

کلیدواژگان: لنتی ویروس، سلول‌های LMH، انتقال ژن، ترانسژن.

۱- مقدمه

امروزه انتقال ژن در زمرهٔ ضروری‌ترین تکنیک‌های مرتبط با بخش مهمی از مطالعات تکاملی و فیزیولوژیکی، تشخیص بیماری‌ها و درمان و پیشگیری از آن‌ها تبدیل شده است. ابزارهای متعدد و گونه‌گون برای انتقال ژن به‌وجود آمده است که بیش‌تر به دو دسته ناقلین ویروسی و ناقلین غیرویروسی تقسیم‌بندی می‌شوند [۱].

به‌خاطر توانایی طبیعی ویروس‌ها در انتقال ژن و الحاق به ژنوم میزبان، به‌عنوان بخش ضروری از دوره حیاتی شکل‌های تغییر یافته آن‌ها، به‌عنوان ابزاری برای انتقال ژن‌های بیگانه به‌درون سلول‌های میزبان، به‌کار می‌رود. لنتی ویروس‌ها از جمله این ناقلین ویروسی است که به‌دلیل برخورداری از ویژگی‌های برجسته، در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

لنتی ویروس‌ها از خانواده رتروویریده هستند و همانند رتروویروس‌ها، قادرند پس از ورود به سلول میزبان، ژن‌های خود را به ژنوم سلول متصل کنند. رتروویروس‌ها، تنها زمانی قادرند این تغییر را در سلول میزبان ایجاد کنند که سلول در حال تقسیم باشد، تا امکان دسترسی رتروویروس به هسته فراهم شود. اما لنتی ویروس‌ها با برخورداری از یک سازوکار پیچیده، می‌توانند بدون نیاز به تقسیم سلولی، وارد هسته میزبان شده و الحاق به ژنوم آن را پیش ببرند [۲]. بدین ترتیب، لنتی ویروس‌ها بر خلاف رتروویروس‌ها قادر به آلوده‌سازی هر دو نوع سلول تقسیم‌پذیر و تقسیم ناپذیر هستند. لنتی ویروس‌ها از لحاظ تحریک سیستم ایمنی بدن، بر آدنوویروس‌ها برتری دارند زیرا اولاً غیر از بیماران HIV^+، سایر افراد جوامع، آنتی ژن مرتبط با این ویروس‌ها را در بدن خود ندارند و بنابراین سیستم ایمنی بدن آن‌ها پیش‌تر نسبت به این ویروس‌ها تحریک نشده است در حالی‌که بیش‌تر جوامع بشری، حداقل نسبت به یکی از تیپ‌های آدنوویروس‌ها آلوده شده است [۳]. دوم آن‌که نیمه عمر RNAهایی که لنتی ویروس‌ها تولید می‌کنند خیلی کوتاه است و فرصت آن را پیدا نمی‌کنند که سیستم ایمنی میزبان را تحریک کنند.

سوم آن‌که لنتی ویروس‌ها دو برابر ویروس‌های Adeno-associated (AAV) ظرفیت پذیرش ژن خارجی دارند [٤]. مزیت دیگر لنتی ویروس‌ها در الحاق ژن‌های خارجی به بخش‌های فعال ژنوم میزبان است در حالیکه رتروویروس‌ها بیش‌تر گرایش به بخش غیرفعال یا هتروکروماتین دارند[۵، ٦]. بدین سبب امکان فعال کردن ژن‌های خطرآفرین مثل پروتوانکوژن‌ها (ژن‌های بالقوه سرطانزا) در بدن میزبان توسط لنتی ویروس‌ها به مراتب کمتر از رتروویروس‌هاست. سرانجام آنکه بیان ترانسژن‌ها به‌صورت پایدار و بدون این‌که به‌وسیله میزبان خاموش شده باشد، به اثبات رسیده است که این امر از مقاومت بالای لنتی ویروس‌ها در برابر خاموشی ژنی (Gene Silencing) نسبت به رتروویروس‌ها حکایت می‌کند [۷]. به‌خاطر برخورداری از این ویژگی‌های برجسته، لنتی ویروس‌ها در انتقال ژن به سلول‌های مختلف انسان و پستانداران و بخصوص به بافت‌هایی مثل سیستم عصبی یا بافت کبد که سلول‌های تقسیم ناپذیر دارند، اهمیت روز افزون پیدا کرده است. به این علت که پرندگان در مراحل جنینی یا در بدو تولد، کاربرد فراوانی در مطالعات فیزیولوژیکی، تهیه واکسن و تولید جوجه‌های ترانسژنیک، برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی و پزشکی، پیدا کرده‌اند، بهره‌گیری از لنتی ویروس‌ها می‌تواند در این مسیر مؤثر باشد.

بالا بودن تیتر ویروسی، در افزایش قدرت آلوده‌سازی ویروس اهمیت زیادی دارد. برای نیل به این هدف،

ذرات ویریونی را پس از تولید تغلیظ می‌کنند. برای تغلیظ لنتی ویروس‌ها، به‌طور سنتی از اولتراسانتریفوژ استفاده می‌کنند گرچه به‌تازگی از روش‌های کروماتوگرافی، به‌خصوص در مقیاس بالا نیز بهره گرفته‌اند. در مطالعه حاضر، ما برآن شدیم تا روشی ساده‌تر و کم هزینه‌تر و سریع‌تر را در پیش بگیریم. به‌علت اندازه بزرگ لنتی ویروس‌ها نسبت به بسیاری از پروتئین‌ها، ما از ستون‌های تخلیص پروتئین استفاده کردیم. در نتیجه توانستیم تیتر بالایی از لنتی ویروس‌ها را بدست آوریم؛ به‌طوری‌که با افزودن بخش کوچکی از آن به سلول‌های هدف، توانستیم سلول‌های میزبان را به‌میزان ۱۰۰٪ با ویروس آلوده کنیم.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بیولوژی مولکولی

ناقلین لنتی ویروسی، به‌نام‌های pLV-eGFP (pNL-EGFP/CMV-WPRE) (ناقل انتقال یا ترانسفر)، pCD/NL-BH*ΔΔΔ (ناقل بسته‌بندی ویروس) و LTR-G (ناقل غشائی) از آزمایشگاه Dr. J. Reiser تهیه شد [۸]. خالص‌سازی نمونه‌های پلاسمیدی، با استفاده از کیت Maxiprep از کیاژن انجام شد. کیت استخراج از ژل نیز از Rocheتهیه شد. آنزیم‌های محدودکننده از فرمنتاس و آنزیم لیگاز از پرومگا خریداری شد. تمام مراحل مربوط به خالص‌سازی DNA، برش‌های آنزیمی و واکنش لیگاسیون، مطابق دستور سازنده مواد و یا برطبق روش‌های استاندارد انجام شد [۹].

۲-۲- کشت سلول

سلول‌های مولد ویروسی از ردهٔ HEK-293T، در محیط DMEM همراه ۱۰٪ سرم FBS در شرایط ۳۷ درجه و ۵٪ CO2، کشت و پاساژ داده شدند. برای ترانسفکشن و تولید ویروس، ۲ میلیون سلول در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌گراد و مخصوص کشت سلول، ۲٤ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد حدوداً ٦۰-۵۰ درصد فضای پتری دیش را پر کنند. سلول‌های LMH (ATCC, CRL-2117) را از مؤسسه پاستور در تهران تهیه کردیم و همراه ۱۰٪ سرم FBS در شرایط ۳۷ درجه و ۵٪ CO2، کشت و پاساژ دادیم. برای آلوده‌سازی ویروسی، تعداد ۵۰ هزار سلول LMH در پلیت‌های ۲٤ خانه، ۲٤ ساعت قبل از آلوده‌سازی، کشت داده شدند.

۲-۳- تولید ویروس

برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب و فعال، سلول‌های مولد ویروس را هم‌زمان با سه ناقل لنتی ویروسی، به‌میزان ۱۵μg از ناقل ترانسفر، و ۱۰ μg از هریک از ناقلین بسته‌بندی و غشائی، با روش رسوب DNA- فسفات کلسیم ترانسفکت کردیم. برای تشکیل رسوب مذکور، DNAهای مذکور را همراه 50 μl از کلرید کلسیم 2.5 mM، با آب استریل به حجم 500 μl رساندیم و هم حجم آن 2xHEPES اضافه کردیم. محلول حاصل را ۲۰ دقیقه در دمای اطاق و زیر هود نگه داشتیم تا رسوب مطلوب به‌دست آید. سپس این رسوب را به‌صورت قطره‌ای به آرامی به سلول‌ها اضافه کردیم. پس از آن سلول‌ها به‌مدت ٦-۸ ساعت انکوبه شدند و بعد محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. بعد از این مراحل، سلول‌ها تا تولید ویروس و رهاسازی آن به محیط، در شرایط انکوباتوری مذکور نگهداری شدند.

۲-٤- تغلیظ ویروس و آلوده‌سازی سلول‌های هدف

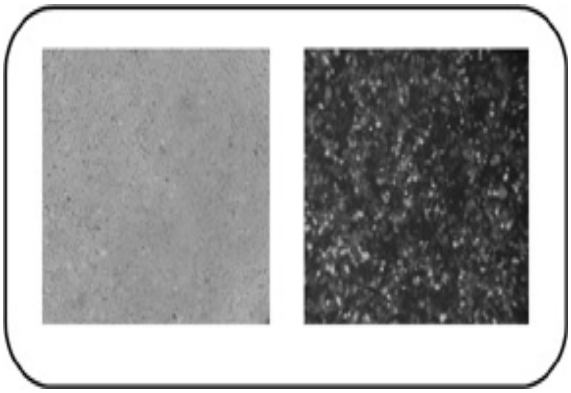
محیط سلول‌های ترانسفکت شده، در ۲٤ ساعت و ٤۸ ساعت بعد جمع‌آوری شده و از فیلتر 0.45 μm

گذرانده شد. محیط فیلتر شده را بـه درون سـتون‌هـای Amicon-100 MW (Millipore) ریخته و بـه‌مـدت ۱۰ دقیقه در دور 4500 rpm سـانتریفوژ کـردیم. ایـن مرحله منجر به عبور بخـش اعظـم سـوپرناتان از فیلتـر ستون بالا و جدا شدن آن از بقیه شد به‌طوری‌که محلول باقیمانده در ستون، با حجمی معادل 500 µl، از محلول غلیظ و تیره که پر از ذرات ویریونی بوده، پشـت فیلتـر جمع‌آوری شد. این محلول را به لولـه‌هـای میکروفیـوژ منتقل کرده و از آن به‌عنوان استوک ویروسی بلافاصـله استفاده کردیم. برای آلوده سـاختن سـلول‌هـای هـدف، حجم‌های مختلف از این استوک را به آرامی به سلول‌ها اضافه کرده و در شرایط رشد ذکر شده در بـالا انکوبـه کردیم تا بیان ترانسژن فلورسنتی دیده شود. هـم‌چنـین برای اطمینان از نبود ویروس فعـال، در محلـول عبـور داده شده از فیلتر، مراحل آلوده‌سازی ویروسـی را روی آن‌ها نیـز اجـرا کـردیم. تصـاویر سـلول‌هـا در مراحـل ترانسفکشن و آلودگی ویروسی در زیـر میکروسـکوپ فلورسنت را جمع‌آوری کردیم.

۳- نتایج

۳-۱- ترانسفکشن سلول‌ها و تولید ویروس

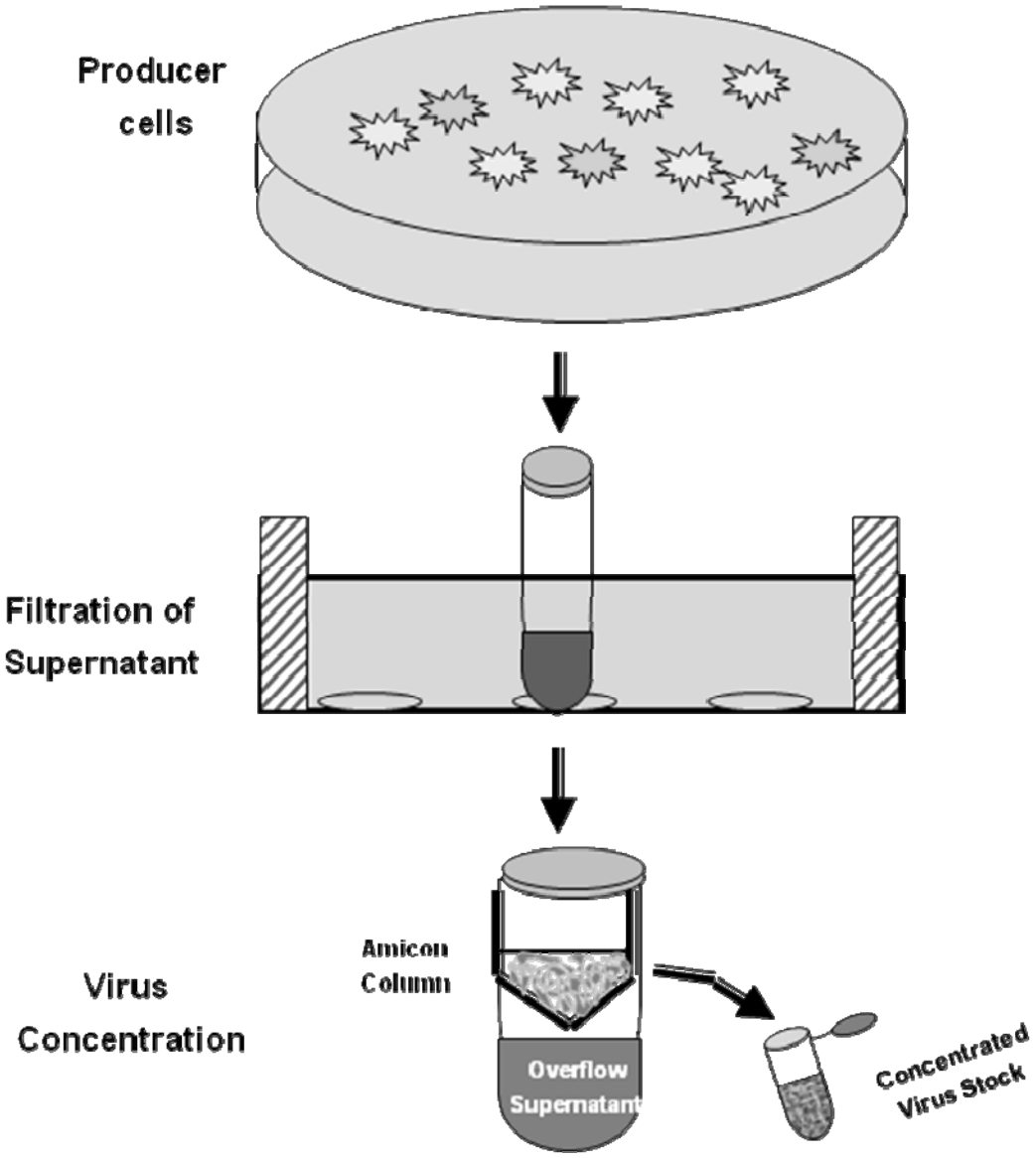
با به‌کارگیری ناقل ترانسـفر pLV-GFP در آزمایشـات ترانسفکشن، بیان پروتئین GFP را زیـر میکروسـکوپ فلورسنت حدود ٦ ساعت پس از ترانسفکشـن دیـدیم. شکل ۱ تصاویر بیان را ۲٤ ساعت بعد نشان می‌دهد که طی آن سلول‌های مولد ویروس تا ۱۰۰٪ GFP^+ هستند.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین GFP، به‌وسیله سلولهای HEK-293T ترانسفکت شـده بـا پلاسـمید pLV-.GFP این تصاویر ۲٤ ساعت پس از ترانسفکشن سـلول ها گرفته شده است.

۳-۲- جمع‌آوری و تغلیظ ویروس

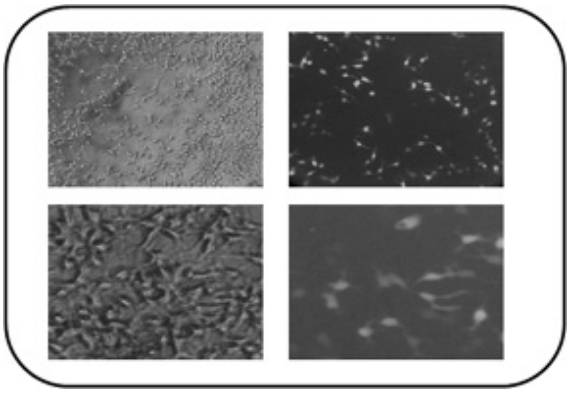
سـوپرناتان سـلول‌هـای ترانسـفکت شـده را هـم ۲٤ سـاعت و هـم ٤۸ سـاعت پـس از ترانسفکشـن جمـع‌آوری کـرده و روی هـم افـزودیم. آزمایشـات مقایسه‌ای ما نشان داده اسـت کـه چنـین ترکیبـی، از قدرت آلودگی و انتقال ژن بالاتری نسبت به هر یـک از دو محلول به‌صـورت جداگانـه، برخـوردار اسـت. ویـروس را بـا اسـتفاده از سـتون‌هـای مخصـوص پـروتئین‌هـای بـزرگ‌تـر از ۱۰۰ کیلودالتـون، تغلـیظ کردیم که بـه‌سـهولت و در کـم‌تـر از ۱۵ دقیقـه ایـن مرحله به پایان رسید (شکل ۲). برای تسـت کـارایی این روش، در مرحله بعدی، هم از بخش غلیظ شـدهٔ سوپرناتان و هم از بخـش زایـد و درظـاهر عـاری از ویروس آن استفاده کردیم.



شکل ۲ مراحل استحصال لنتی ویروس‌های نوترکیب: ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌های مولد که پر از ذرات ویریونی است، جمع‌آوری و سانتریفوژ می‌شود. با انجام یک مرحله فیلتراسیون، از وجود آلودگی باکتریایی اطمینان حاصل شده و سپس محیط فیلتر شده از ستون‌های Amicon-100 یا ستون‌های پروتئینی مشابه عبور داده می‌شود تا تغلیظ شود.مأخذ: موسی گردانه. گزارش کارگاه: کاربرد لنتی ویروس‌های نوترکیب در انتقال ژن و ژن درمانی، ۱۳۸٦، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران.

۳-۳- آلوده کردن سلول‌های هدف با ویروس

برای تست آلودگی، از سلول‌های HEK-293T استفاده کردیم و رقت‌های سریالی(1/50) 10 (1/5)،(1/20) 25 ، (1/5) 50،(1/7) 75 ،100 µl از هریک از ویروس‌های نوترکیب را به این سلول‌ها در پلیت‌های ۲٤ خانه اضافه کردیم. اولین نشانه‌های بیان ترانسژن GFP در زیر میکروسکوپ فلورسنت حدود ۳٦ ساعت پس از آلودگی ظاهر شد. در حالی‌که در رقت‌های ویروسی 10 (1/50) µl، حداکثر ٦۰ درصد سلول‌ها ۹٦ ساعت پس از آلودگی مثبت بودند، در صد سلول‌های مثبت به GFP، در کلیه رقت‌های ویروسی25 µl (1/20) به بالا به بیش از ۹۰٪ و با100 µl (1/5) ویروس، به ۱۰۰٪ در زمان ۷۲ ساعت رسید (شکل ۳).



شکل ۳ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین GFP به‌وسیله سلول‌های آلوده به لنتی ویروس نوترکیب pLV-GFP با دو بزرگنمایی مختلف.

۳-٤- کارایی ستون Amicon در نگهداری ویروس‌ها

برای اطمینان از کارایی ستون‌های Amicon در حفظ حداکثر تعداد ویروس فعال، 1 ml از سوپرناتان Overflow را به $2x10^5$ سلول 293T در پلیت‌های ٦ خانه اضافه کردیم. پس از گذشت ۹٦ ساعت، هیچ‌گونه بیان GFP را زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده نکردیم.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

لنتی ویروس‌ها در انتقال ژن از مزایای برجسته‌ای نسبت به ویروس‌های دیگر برخوردارند. این مزایا سبب شده تا از لنتی ویروس‌ها به‌عنوان ناقلین ژن برتر، برای مطالعات فیزیولوژیکی- تکاملی و نیز مطالعه بیماری‌های مختلف، به‌خصوص بیماری‌های مغز و اعصاب، بافت‌های مهم کبدی، اپیتلیالی، انواع تومورها و هم‌چنین تولید مدل‌های حیوانی این بیماری‌ها، بهره‌برداری وسیع شود. ما در این مطالعه توانستیم با استفاده از لنتی ویروس‌های نوترکیب، با منشاء HIV-1 انسانی، ترانسژن GFP را به سلول‌های کبدی جوجه، به‌طور مؤثر انجام دهیم؛ به‌طوری‌که بیان ترانسژن در آن‌ها تا ۱۰۰٪ محرز شود. این نتایج بیانگر توانایی لنتی ویروس‌های انسانی در ترانسدوکشن سلول‌ها و بافت‌های طیور است. هم‌چنین نتایج مزبور نشان می‌دهد که روش فیلتراسیون برای تهیه استوک ویروسی غلیظ با تیتر بالا موفقیت‌آمیز بوده است.

تولید ویروس نوترکیب با تیتر بالا، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است بدین دلیل که قدرت عفونی ویروس، با تیتر آن رابطه مستقیم و تنگاتنگی دارد. به‌طور سنتی، لنتی ویروس‌ها را با اولتراسانتریفوژ در دور بالای ۵۰ هزار و به‌مدت بیش از ۹۰ دقیقه رسوب می‌دهند. این روش با مشکلاتی از قبیل استفاده از لوله‌های مخصوص اولتراسانتریفوژ، احتمال شکستن لوله‌ها در دور بالا، تشکیل میزان ناچیز و برخی اوقات غیر قابل رویت رسوب ویروسی همراه است. استفاده از ستون‌های

پروتئین متناسب با اندازه ویروس، می‌تواند روش جایگزین و آسان‌تری برای رفع این مشکلات باشد. بدین منظور ما در این مطالعه از ستون‌های Amicon استفاده کردیم. با این ستون‌ها، استوک ویروسی غلیظ شده‌ای به‌دست آمد که از قدرت عفونی حداکثری برخوردار بوده و حجم کوچکی، به‌میزان یک بیستم از آن (۲۰=۲۵:۵۰۰) قادر است اکثریت سلول‌های هدف را آلوده کند. بنابراین روش ما هم از نظر مقدار حجم محصول ویروسی و هم از نظر قدرت عفونی مورد نیاز، و انتقال ژن، صرفه جویی هزینه، میزان کار و وقت لازم برای انجام آزمایش، می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش سنتی باشد.

سلول‌های LMH یک ردهٔ اپیتلیالی کارسینومای کبدی جوجه است که در ۱۹۸۱ جدا شده است [۱۰]. این سلول‌ها قبلاً با روش‌های غیرویروسی ترانسفکت شده است [۱۱، ۱۲]. این روش‌ها تا حداکثر ۵۰٪، قادر به ترانسفکشن سلول‌ها است. بدین دلیل ما از لنتی ویروس‌ها برای افزایش کارایی ترانسفکشن سلول‌های جوجه استفاده کردیم. روش ما نشان داد که سلول‌های LMH را می‌توان تا قریب به ۱۰۰٪، دچار دگرگونی ژنتیکی کرد. این موضوع در موارد متعددی اهمیت دارد. مطالعه پدیده‌های فیزیولوژیکی در طیور، به‌خصوص در مواردی که برخی از مولکول‌های حیاتی با بیان اختصاصی بافتی و ناچیز دخالت دارند، با استفاده از روش لنتی ویروسی امکان‌پذیر خواهد بود. استفاده از تخم‌مرغ و جوجه‌های ترانسژنیک به‌عنوان بیوراکتور، برای انبوه‌سازی پروتئین‌های دارویی، تولید واکسن و آنتی بادی‌های نوترکیب، امروزه بیش از پیش مطرح است. لنتی ویروس‌های نوترکیب می‌توانند ابزار مهمی در پیشبرد این اهداف باشند.

۵- سپاس‌گزاری

منابع مالی این مطالعه از طرح شماره ۳۴۸ مصوب پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین شده است.

٦- مراجع

[1] Neeltje A, Verma KM (2003) Gene therapy with viral vector. Ann Rev Toxicol. 43:413-439.

[2] Quinonez R., Sutton RE. (2002) Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA Cell Biol. 21(12):937-51. Review.

[3] Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. Gene Ther. 11 Suppl 1:S10-7. Review.

[4] Lundstrom K (2003) Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol 21(3):117-122.

[5] 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.

[6] Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show

distinct target site preferences. PLoS Biol. 2: E234.

[7] Naldini L. (1998) Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. Curr Opin Biotechnol. 9(5):457-63. Review.

[8] Pluta K, M.L. Luce, L. Bao, S. Agha-Mohammadi, J. Reiser, (2005) Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. J. Gene Med. 7: 803–817.

[9] Sambrook J., Russel D., Maniatis. Molecular cloning, third ed. CSHL Press, New York, 1989.

[10] Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T (1987) Established and charakterizaation of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. Cancer Res 47: 4460-4.

[11] Walzem RL, Hickman MA, German JB, and Hansen RJ. (1997) Transfection of Avian LMH-2A Hepatoma Cells with Cationic Lipids .Poultry Science 76:882–886.

[12] Binder R, MacDonald CC, Burch JB, Lazier CB, Williams DL. (1990) Expression of endogenous and transfected apolipoprotein II and vitellogenin II genes in an estrogen responsive chicken liver cell line. Mol Endocrinol. 4(2):201-8.