Membrane Washing, a New Method to Isolate Membrane Phospholipids Without Cell Destruction

Horal-Sadat Bani Aqeel[1], Ismail Fatahi[1*], Roqiyeh Eskoiyan[1], Mohamad Reza Kalani[2*]

1. Department of Biology, Ayatollah Amoly Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Aim and Background: An important part of medical biology studies is devoted to the production of an efficient non-viral structure for gene transfer. The materials of these structures are expensive and impose a lot of cost on the researcher. Enveloping the DNA molecule in a closed space of a lipid bilayer membrane evokes the most similar structure to a liposome. This study is to investigate the possibility of using phospholipids taken from the membrane of a cell to make liposome and transfer genes or drugs to the same cell.

Material and Methods: Five mammalian (HEK293, Hela, SW480, expi-CHO, CHO) and one yeast (Saccharomyces cerevisiae) cells were selected and cultured in a suitable culture medium. A new membrane washing method was performed with different combinations of non-polar solvents of chloroform, methanol, ammonium hydroxide, …, without breaking and destroying the cells. Purification and separation of membrane phospholipids was done by thin layer chromatography (TLC). The mobile phase solvent was optimized for the best separation of phospholipids.

Results: By comparing six combinations of membrane washing solvents, the mixture of chloroform, methanol, ammonium hydroxide, acetic acid (65:25:5:5) had the best efficiency for separating and extracting phospholipids from the cell membrane. The main phospholipids that make up the membrane were well separated by optimized mobile phase thin layer chromatography. The results of this study showed that in CHO, Expi-CHO and SW480 cells, the amount of Membrane phospholipids from the most to the least include POPC, POPE, POPS, CHOL, SM and IMP. POPS contribution was different for Hela and HEK293 cells. Yeast cells can be an acceptable source of phospholipid for purification due to fast growth and cheap culture medium.

Conclusion: By using a special combination of non-polar solvents, the phospholipids of the cell membrane can be washed. These phospholipids can be well separated by thin layer chromatography using a special mobile phase solvent. The cost of this process is much lower than the preparation of industrial transfection compounds. It seems that gene transfer by liposomes made with natural phospholipids should have a much higher efficiency, which should be studied in future research.

Keywords: Cell membrane, phospholipid, membrane washing, transfection.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

Corresponding author:
1.Department of Biology, Ayatollah Amoly Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2.Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
Email:
1.esmail_fattahy@yahoo.com
2. kalanimr@yhoo.com

شست‌وشوی غشایی یک روش جدید برای جداسازی فسفولیپیدهای غشا بدون تخریب سلول

حورا السادات بنی عقیل[۱]، اسماعیل فتاحی[۱*]، رقیه اسکوییان[۱]،محمدرضا کلانی[۲*]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
۲. گروه پزشکی مولکولی، دانشکدهٔ فناوری نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه بخش عظیمی از مطالعات پزشکی به تولید یک ساختار غیرویروسی کارآمد برای انتقال ژن اختصاص یافته است. مواد اولیهٔ این ساختارها گران‌قیمت است و هزینهٔ زیادی بر محقق تحمیل می‌کند. محصور شدن مولکول DNA در یک فضای بسته که توسط یک غشای دولایهٔ لیپیدی از فضای بیرون متمایز شده‌است، شبیه‌ترین ساختار به یک لیپوزوم را در ذهن تداعی می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از فسفولیپیدهای برداشت‌شده از غشای یک سلول برای ساخت لیپوزوم و انتقال ژن یا دارو به همان سلول می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پنج سلول جانوری (HEK293, Hela, SW480, expi-CHO, CHO) و سلول مخمری (*ساکارومایسس سرویزیه*) انتخاب شده و در محیط‌کشت مناسب کشت داده شدند. روش جدید شست‌وشوی غشایی با ترکیبات مختلف حلّال‌های غیرقطبی شامل اتانول، متانول، کلروفرم و ...، بدون شکستن و تخریب سلول‌ها انجام شد. خالص‌سازی و تفکیک فسفولیپیدهای غشایی به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC) انجام شد. حلّال فاز متحرک برای بهترین تفکیک فسفولیپیدها نیز بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: با مقایسهٔ شش ترکیب حلّال شست‌وشو دهندهٔ غشا، مخلوط کلروفرم: متانول: هیدروکسید آمونیوم: اسید استیک (۶۵:۲۵:۵:۵) بهترین بازده را برای تفکیک و استخراج فسفولیپیدهای غشای سلول داشتند. فسفولیپیدها از غشا برداشت شده و با فاز متحرک بهینه‌سازی شده و کروماتوگرافی لایهٔ نازک فسفولیپیدهای اصلی تشکیل‌دهندهٔ غشا به‌خوبی جداسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان دادند که در سلول‌های CHO، Expi-CHO و SW480 میزان فسفولیپیدهای غشا از بیشترین به کمترین شامل، فسفاتیدیل کولین (POPC)، فسفاتیدیل اتانول آمین (POPE)، فسفاتیدیل سرین (POPS)، کلسترول (CHOL)، اسفنگومیلین (SM) و اینوزیتول مونوفسفوگلیسرید (IMP) می‌باشد. برای سلول‌های HeLa و HEK293 سهم POPS متفاوت بود. سلول مخمری با توجه به رشد سریع و محیط‌کشت ارزان، می‌تواند منبع قابل‌قبولی از فسفولیپید برای خالص‌سازی باشد.

نتیجه‌گیری: با استفاده از ترکیب خاصی از حلّال‌های غیرقطبی می‌توان فسفولیپیدهای غشای سلول را شست‌وشو داد. این فسفولیپیدها می‌توانند به روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک با استفاده از حلّال خاص فاز متحرک به‌خوبی تفکیک شوند. هزینهٔ این فرایند بسیار کمتر از تهیهٔ ترکیبات صنعتی ترانسفکشن است. به‌نظر می‌رسد انتقال ژن به‌وسیلهٔ لیپوزوم‌های ساخته‌شده با فسفولیپیدهای طبیعی باید راندمان بسیار بالاتری داشته باشد که در تحقیقات بعدی مطالعه و بررسی گردد.

واژگان کلیدی: غشای سلول، فسفولیپید، شست‌وشوی غشا، ترانسفکشن.

مقدمه

غشای سیتوپلاسمی یک ساختار دولایهٔ فسفولیپیدی با پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های مختلف است که در ورود و خروج مواد به سلول نقش کلیدی دارد. چربی‌ها و مولکول‌های هیدروفوب و غیرقطبی به راحتی از این غشا عبور می‌کنند، اما برای انتقال مولکول‌های غیرقابل انحلال در چربی به خارج سلول یک راه اثبات‌شده شناسایی شده‌است. این راه، بسته‌بندی این مولکول‌ها در وزیکول‌هایی با ساختار مشابه غشا است. با تلفیق این وزیکول با غشای سلولی، مولکول‌های بسته‌بندی شده به خارج سلول رها می‌شوند. این روش ترشح مواد از سلول به

نویسنده مسئول:
۱.گروه زیست‌شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
۲. گروه پزشکی مولکولی، دانشکدهٔ فناوری نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
پست الکترونیکی۱: esmail_fattahy@yahoo.com
پست الکترونیکی۲: kalanimr@yhoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

محیط خارج است. از این واقعیت برای انتقال دارو و ژن‌ها به داخل سلول نیز استفاده می‌شود. برای انتقال مولکول‌های غیرقابل انحلال در چربی به داخل سلول باید آن‌ها را در وزیکول‌های با ساختار قابل انحلال در چربی بسته‌بندی نمود. امروزه برای انتقال رشته‌های اسید نوکلئیک حاوی کدهای ژنتیکی، به‌صورت ساختارهای پلاسمیدی، به‌طور وسیع از بسته‌بندی آن‌ها در وزیکول‌های متشکل از مولکول‌های دِترجنت یا لیپیدهای مصنوعی و یا نانوذرات پلیمری استفاده می‌شود. از این میان می‌توان به نام‌های تجاری مانند لیپوفکتامین یا ترانسفکتین اشاره نمود. این مولکول‌ها دارای ساختار دوگانهٔ مشابه فسفولیپیدهای غشایی که در یک سمت خواص آب‌گریزی و از انتهای دیگر خواص آبدوستی دارند می‌باشند (۱). این روش انتقال سلولی که به آن ترانسفکشن می‌گویند، فرآیندی است که طی آن اسیدهای نوکلئیک خارجی به سلول یوکاریوتی تحویل داده می‌شود تا ساختار ژنتیکی سلول میزبان را اصلاح کند. در ۳۰ سال گذشته، ترانسفکشن به‌دلیل کاربرد گستردهٔ آن برای مطالعهٔ فرآیندهای سلولی و مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌ها محبوبیت فزاینده‌ای به‌دست آورده است. علاوه‌بر این، ترانسفکشن می‌تواند به‌عنوان یکی از راهبردهای ژن‌درمانی برای درمان بیماری‌های ژنتیکی صعب‌العلاج و ارثی مورداستفاده قرار گیرد. در این میان ترانسفکشن هدفمند می‌تواند در انتقال انتخاب ژن به سلول‌های هدف مؤثر باشد (۲).

از روش‌های متداول گزارش‌شده برای استخراج لیپید از غشای سلول می‌توان به استخراج با حلّال، استخراج با سیال فوق‌بحرانی، استخراج تسریع‌شده با حلّال یعنی استفاده از حلّال در دما و فشار بالاتر از نقطهٔ جوش اشاره کرد. البته از روش‌های دیگری نظیر استفاده از فشارهای مکانیکی، آنزیم، امواج اولتراسونیک یا مایکروویو و شوک اُسمزی نیز به‌طور معمول همراه با روش استخراج با حلّال به‌منظور تخریب دیوارهٔ سلولی و افزایش راندمان استخراج استفاده می‌شود که در واقع یک مرحلهٔ آماده‌سازی قبل از استخراج می‌باشد (۳، ۴).

زیرساخت‌های تحویل دارو مبتنی بر فناوری نانو و لیپیدهای مصنوعی یا دِترجنت‌ها در دو دههٔ گذشته به‌دلیل ویژگی‌های مطلوب آن‌ها از نظر فراهمیِ زیستی و پایداری دارویی توسعه یافته‌اند (۵). بااین‌حال تمام این نانوذرات و لیپیدهای مصنوعی برای سلول‌ها اثرهای سمّی (سایتوتوکسیک) دارند. به همین دلیل در فرایند ترانسفکشن، محقق باید پس از مدت زمان کوتاهی بین چهار تا دوازده ساعت این ساختارهای انتقال‌دهنده را که به محیط‌کشت سلول‌ها اضافه شده بودند، از محیط خارج نماید. بنابراین درصورتی‌که بتوان برای ساخت وزیکول‌های انتقال ژن یا دارو به سلول‌ها از مولکول‌هایی استفاده کرد که اثر سمّی بر سلول نداشته باشند، می‌توان مدت‌زمان تماس وزیکول‌های حامل را افزایش داد. افزایش زمان مجاورت وزیکول‌های حامل باعث افزایش احتمال انتقال و کارایی فرایند ترانسفکشن خواهد شد.

ازآنجایی‌که وزیکول‌های مشتق‌شده از غشای سلولی دارای عملکردهای ذاتی و شبکه‌های سیگنالیِ سلول‌های والد خود هستند، می‌توانند بر موانع مختلفی که در داخل بدن با آن‌ها مواجه می‌شوند غلبه کنند. علاوه‌بر این، ترکیبات طبیعی مختلفِ غشاها از منابع سلولی متفاوت، دامنهٔ وزیکول‌های مشتق‌شده از غشای سلولی را گسترش می‌دهند و دسته‌ای کاملاً جدید از سیستم‌های تحویل دارو را ایجاد می‌کنند. با داخل کردن مولکول‌های پروتئینی خاص که در سلول‌های ویژه‌ای دارای گیرندهٔ اختصاصی می‌باشند، می‌توان این ورزیکول‌های جدید را برای ترانسفکشن هدفمندسازی نمود (۶).

تا به امروز، تعداد زیادی از روش‌های مطمئن و کارآمد برای انتقال ژن‌های درمانگر ابداع شده‌است، اما همین تنوع در روش‌ها بیانگر عدم‌وجود یک روش مطلوب و مشخص در این عرصه است. هرکدام از روش‌های شناخته‌شده تاکنون جهت حمل و انتقال ژن شامل ناقل‌های ویروسی و ناقل‌های غیرویروسی دارای ضعف و محدودیت‌هایی بوده اند. استفاده از فسفولیپیدهای برداشت‌شده از غشای خود سلول برای انتقال ژن به همان سلول می‌تواند روشی مؤثر، کم‌هزینه و با درصد انتقال ژن بیشتری در مقایسه با سایر روش‌های موجود برای انتقال ژن باشد. استفاده از لیپوزوم ساخته‌شده از فسفولیپید مصنوعی برای ترانسفکشن انجام شده‌است و نتایج بهتری از سایر روش‌ها داشته اما به‌دلیل هزینهٔ بالای ساخت فسفولیپیدهای مصنوعی که بتوانند با غشای سلولی هم‌خوانی داشته باشند، این پژوهش روش شست‌وشوی غشای خودِ سلول هدف و برداشت فسفولیپیدهای آن را موردبررسی قرار داده است. در این روش به‌دلیل برداشت فسفولیپید از غشای سلول و تطابق کامل آن با غشای سلولی، بازده بالاتری داشته و در کنار آن هزینهٔ تأمین فسفولیپید بسیار کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر امکان برداشت فسفولیپیدهای غشای سلول به روش شست‌وشوی غشایی و تفکیک آن‌ها برای ساخت وزیکول‌های حامل بررسی گردیده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

با توجه به اینکه در این طرح سلول‌های مختلفی به‌کار گرفته شدند و هر سلول شرایط محیط‌کشت مخصوص به خود را دارد، ابتدا شرایط رشد و خصوصیات تمام سلول‌ها بررسی دقیق و بهینه‌سازی شدند.

- **سلول‌های جانوری انتخاب‌شده**

1. Human embryonic kidney cells (HEK-293)
2. Human epithelial cervical cancer cells(Hela)
3. Chinese Hamster Ovary cancer cells(CHO)
4. Human Colorectal Cancer(SW480)
5. Expi-CHO

از مؤسسهٔ انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و همچنین سلول مخمری (*ساکارومایسس سرویزیه*)، سلول‌ها در محیط‌کشت و دمای مناسب (۳۷ درجهٔ سلسیوس برای سلول‌های جانوری و ۳۴ درجهٔ سلسیوس برای سلول مخمری) و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. هر ۷۲ ساعت سلول‌ها پاساژ داده شدند تا به تعداد مناسب ($۱/۶ \times ۱۰^{۴}$) تکثیر شوند (۷، ۸).

سلول‌های HEK293t و HeLa در محیط‌کشت DMEM-G و سلول‌های SW480 در محیط‌کشت RPMI F12 (Sigma)، هر دو محیط‌کشت حاوی ۱۰ درصد FBS[1] (Gibco)وگلوتامین اِل و سدیم پایرووات و اسیدآمینه‌های غیراساسی و در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و رطوبت ۹۵ در صد کشت داده شدند. ردهٔ سلولی CHO, expi-CHO در محیط‌کشت Ham's F12 (Sigma) حاوی ۱۰ درصد FCS (Gibco)کشت داده شد. برای کشت و رشد مخمر از محیط‌کشت اختصاصی YPD Broth، در انکوباتور تکان‌دهنده با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه استفاده شد.

شست‌وشوی غشایی

به‌دلیل سرعت رشد بالاتر و ارزان‌تر بودن محیط‌کشت و سادگی شرایط رشد، سلول مخمری برای کشت اولیه و بهینه‌سازی مراحل شست‌وشو و استخراج غشای سلولی انتخاب شد. سلول‌های مخمری در شرایط استریل ۳۰۰mL در دو فلاسک مخروطی اِرلن مایر با درب‌پوش فیلتردار هرکدام به حجم دو لیتر و به‌مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. محیط‌کشت حاوی سلول‌های مخمری به‌مدت ۵ دقیقه در سرعت ۳۰۰ xg سانتریفوژ شدند. فاز رویی تخلیه شد و رسوب سلولی هر لوله در ۱ میلی‌لیتر PBS[2]استریل تعلیق گردید.

- **شست‌وشوی غشایی سلول‌های مخمری**

برای برداشت غشای سلول‌ها یک روش جدید به‌کار گرفته شد، در این روش بدون شکستن و تخریب سلول، اقدام به شست‌وشوی غشای سلول و حل کردن آن در حلّال‌های مخصوص گردید. با ترکیب خاصی از حلّال‌های آلی (جدول ۱)، چربی و فسفولیپید غشای سلول، حل شده و با روش‌های فیزیکی و شیمیایی از بقایای پروتئین‌های غشایی و نیز باقی‌ماندهٔ محتویات سیتوپلاسمی تفکیک گردیدند. در این روش باید سلول‌های رسوب‌گذاری‌شده در حلّال آلی خاص معلّق شوند و پس از مدت زمانی انکوباسیون مجدد رسوب‌گذاری گردند. ترکیبات مختلف از حلّال چربی‌ها (که در این مطالعه به‌عنوان مخلوط شست‌وشودهنده اشاره می‌شوند) به شرح جدول ۱ برای برداشت فسفولیپیدهای غشایی از سلول‌ها موردآزمایش قرار گرفته‌اند و بهترین ترکیب نیز شناسایی شد:

	متانول	کلروفرم	اتانول	HCl (6N)	H2CO3 (1N)
S1	٪۶۶	٪۳۴			
S2	٪۶۰	٪۳۰	٪۱۰		
S3	٪۶۰	٪۳۰	٪۸	٪۲	
S4	٪۶۰	٪۳۰	٪۸		٪۲

جدول ۱- مخلوط‌های شست‌وشو دهنده

[1] Fetal Bovine Serum

[2] Phosphate Buffered saline

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

هینه‌سازی مخلوط‌های شست‌وشودهنده

برای تمام چهار ترکیب جدول ۱، با استفاده از ۱ میلی‌لیتر PBS (۱×)، تعداد ۱۰ میلیون سلول به حالت سوسپانسون درآمدند و ۳ میلی‌لیتر از مخلوط شست‌وشودهنده به آن اضافه شد. نمونه‌ها گرداب شدند و به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. سپس $CHCl_3$ (۱ میلی‌لیتر) و H_2O (۱/۳ میلی‌لیتر) اضافه شد و نمونه‌ها دوباره مخلوط شدند.

- **بهینه‌سازی زمان و دمای انکوباسیون برای شست‌وشوی غشایی**

به این منظور سلول‌ها پس از تعلیق در مخلوط شست‌وشودهنده در ظروف مجزا در دمای ۳۷، ۴۵ و ۶۰ درجهٔ سلسیوس و هرکدام به‌مدت زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس مخلوط حاصل از شست‌وشو به‌وسیلهٔ سانتریفوژ رسوب داده شد تا سلول‌های کامل و یا باقی‌مانده‌های سلولی جدا شوند. با شست‌وشوی مکرر با محلول بافریِ خنثی مانند PBS مقدار مولکول‌های فسفولیپیدی بیشتری از غشا جدا و پاک‌سازی شدند. فسفولیپیدها و مولکول‌های سبک چربی مانند اسیدهای چرب، کلسترول و نیز مقادیری از پروتئین‌های بسیار کوچک سطحی غشا در فاز مایع بالایی شناور خواهند بود. فاز رویی نیز جمع‌آوری و نگهداری شد.

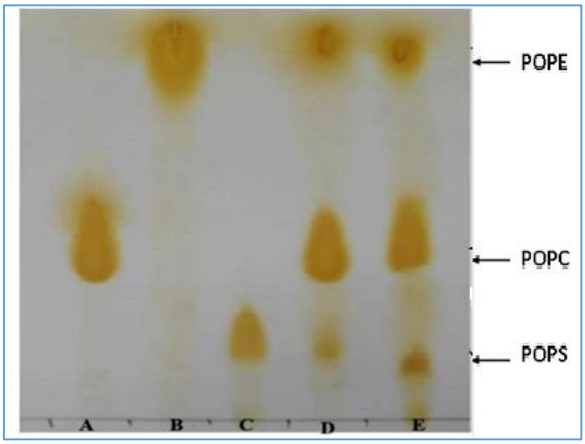
- **فسفولیپیدهای استاندارد**

لیپیدهای استاندارد، شامل POPC, POPE, POPS و کلسترول از نمایندهٔ فروش محصولات سیگما خریداری شدند.

- **خالص‌سازی و تفکیک فسفولیپیدهای غشایی**

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)[3]

در این روش مخلوط حاصل از شست‌وشوی غشایی که حاوی فسفولیپیدها، چربی‌های غشایی و البته مقداری پروتئین غشایی می‌باشد، بر روی یک صفحهٔ سیلیکاژل لکه‌گذاری شد و با قرار دادن در فاز حلّال آلی چربی‌ها، براساس خاصیّت مویینگی، حلّال از داخل سیلیکاژل به بالا حرکت کرده و مولکول‌های چربی و فسفولیپید را با خود حمل می‌کند. انواع مولکول‌های فسفولیپید و چربی بر اساس وزن مولکولی خود در ارتفاعی خاص متوقف گردیدند. با مقایسهٔ ارتفاع استقرار هریک از لکه‌ها در مقایسه با نمونه‌های استاندارد می‌توان نوع آن‌ها را تشخیص داد. سپس، لکهٔ مربوط به هریک از فسفولیپیدها از روی صفحه تراشیده‌شده و به‌وسیلهٔ کیت مخصوص پاک‌سازی سیلیکاژل، مولکول‌های فسفولیپید از مولکول‌های سیلیکاژل جدا گردیدند (شکل ۱).



شکل ۱- نمونهٔ A، B و C به‌ترتیب استانداردهای POPC ، POPE و POPS هستند و نمونه‌های D و E نمونه‌های شست‌وشوی غشایی هستند.

[3] Thin Layer Chromatography

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

ترکیب حلّال‌های آلی به‌کار رفته برای TLC

برای به‌دست آوردن بهترین نتیجه از کروماتوگرافی لایهٔ نازک، بهتر است ترکیب حلّال آلی منطبق با مادهٔ تفکیک‌شدنی تنظیم گردد. به این منظور حلّال‌های آلی ذکرشده در منابع علمی که قادر به انتقال مولکول‌های فسفولیپید هستند موردبررسی و مقایسه قرار گرفتند.

در جدول ۲ خاصیت شست‌وشودهندگی و شاخص قطبیت حلّال های آلی مختلف مقایسه شده‌اند. همان‌طورکه دیده می‌شود خاصیت شست‌وشودهندگیِ آب خالص صفر و شاخص قطبیت هگزان نیز صفر است و سایر حلّال‌ها با آن‌ها مقایسه شده‌اند

جدول ۲- خاصیت شست‌وشودهندگی و شاخص قطبیت حلّال‌های آلی

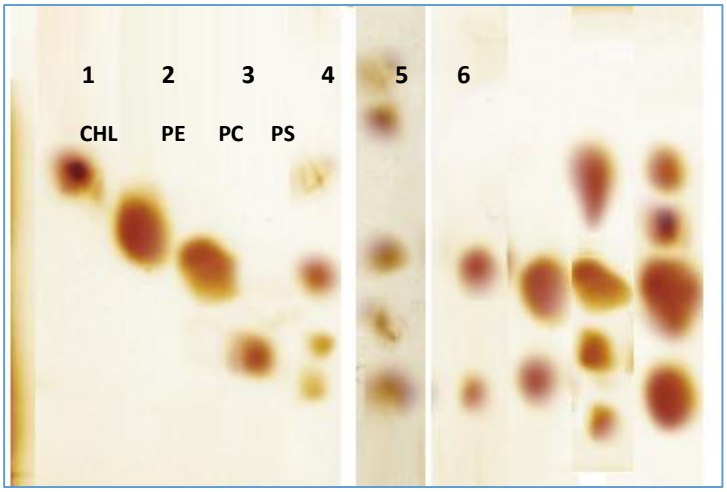
	Polarity index	Elutropic equivalent value		Polarity index	Elutropic equivalent value
N-hexane	۰/۰		**Tetrahydrofurane**	۸/۴	**۴/۲**
Di-n-butyl ether	۲۹/۴	۱/۷	**Dichlormethane**	۱۵/۰	**۳/۴**
Di-iso-butyl ether	۲۵/۰	۲/۲	**Ethylen di chloride**	۱۳/۲	**۳/۷**
Di-iso-propyl ether	۲۵/۰	۲/۲	**Acetontrile**	۷/۳	**۶/۲**
Diethyl ether	۱۵/۵	۲/۹	**Propio-nitrile**	۸/۰	**۵/۹**
N-octanol	۳۳/۸	۱/۳	**Acetone**	۴/۷	**۵/۴**
I-pentanol	۱۶/۱	۲/۶	**Methyl ethyl ketone**	۴/۷	**۴/۵**
N-butanol	۱۳/۳	۳/۰	**Dioxane**	۴/۴	**۴/۸**
I-butanol	۱۱/۰	۳/۹	**Ethylacetate**	۱۰/۷	**۴/۳**
N-propanol	۱۰/۴	۴/۱	**Tetra-chlorocarbon**	۳۲/۴	**۱/۷**
Sec-propanol	۸/۸	۴/۳	**Toluene**	۱۷/۳	**۳/۰**
Ethanol	۷/۶	۵/۲	**Nitro-methan**	۵/۶	**۶/۸**
Methanol	۵/۵	۶/۶	**Chloroform**	۱۹/۶	**۲/۷**
			Water	۰	**۰**

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

ترکیبات حلال به‌کار رفته در این طرح، هدف و کاربرد آن‌ها (۹):

۱. کلروفرم: متانول: آب (۶۵:۲۵:۴) با هدف جداسازی عمومی فسفولیپیدها توسط قطبیّت گروه سر
۲. کلروفرم: متانول: هیدروکسید آمونیوم (۶۵:۲۵:۴) با هدف جداسازی عمومی فسفولیپیدها با قطبیت و بار گروه سر
۳. کلروفرم: هگزان: متانول: اسید استیک (۵۰:۳۰:۱۰:۵) با هدف جداسازی کاردیولیپین، ترکیب فسفاتید یل گلیسرول
۴. تولوئن: پیر یدین: هیدروکسید آمونیوم (۶۰:۶۰:۱۰) با هدف جدا سازی ف سفاتیدیل کولین، ف سفاتیدیل (N، N-دی‌متیل اتانول آمین)، فسفاتیدیل (N-مونومتیل اتانول آمین)، فسفاتیدیل اتانول آمین
۵. کلروفرم: متانول: آب: اسید استیک (۶۵:۲۵:۶:۴)
۶. کلروفرم: متانول: هیدروکسید آمونیوم: اسید استیک (۶۵:۲۵:۵:۵)

ترکیب شمارهٔ یک بر طبق منابع علمی باید بیشترین موفقیت در به حرکت درآوردن لیپیدها را داشته باشد. ازطرفی با توجه به اثر اختصاصی و بالاتر ترکیب شمارهٔ ۳ و ۴ و با درنظر گرفتن خواص شست‌وشودهندگی کلروفرم و متانول، به‌نظر می‌رسد دو مخلوط شکل ۲ حاوی ترکیب شمارهٔ یک به همراه اسید استیک و یا هیدروکسید آمونیوم بتوانند به‌طور مؤثرتر و اختصاصی‌تر فسفولپیدهای غشایی را به حرکت درآورند.



شکل ۲- مقایسهٔ شش ترکیب حلّال شست‌وشودهنده

مخلوط شمارهٔ ۶ بهترین بازه را داشته و تقریباً فقط فسفولیپیدهای اصلی تشکیل‌دهندهٔ غشای سلول را در لایهٔ نازک سیلیکاژل به حرکت در آورده است و برای تفکیک و استخراج غشای سلول بهترین بازده را دارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسهٔ گروه‌ها به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند و $p < 0.50$ معنی‌دار درنظر گرفته شدند.

نتایج

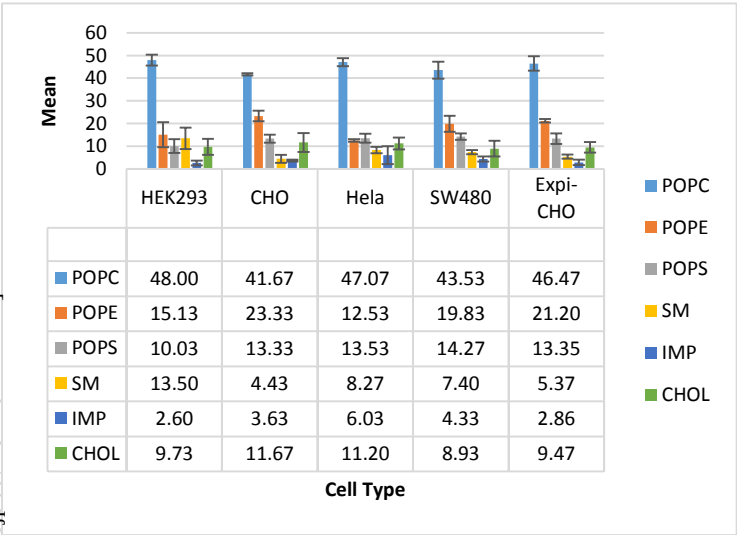
بررسی میزان درصد فسفولیپیدهای غشای سلولی در سلول‌های موردمطالعه

میانگین درصد فسفولیپیدهای غشا در سلول‌های مورد بررسی (HEK293، CHO، HeLa، SW480 و Expi-CHO) در نمودار ۱ نشان داده شده‌است. بر این اساس در رده‌های سلولی موردبررسی اختلاف معنی‌داری از نظر میزان درصد فسفولیپیدهای POPC، POPE، POPS، SM و IMP وجود دارد (p-value < ۰/۰۵). بااین‌حال اختلاف معنی‌داری از نظر میزان درصد کلسترول غشایی در سلول‌های موردبررسی وجود ندارد (p-value > ۰/۰۵). (نمودار ۱ و جدول ۳).

بر اساس داده‌های جدول ۳ می‌توان گفت که از نظر فسفولیپید POPC سلول‌های CHO و SW480 با یکدیگر (به‌ترتیب ۴۱/۶۷ و ۴۳/۵۳ درصد) و سلول‌های Expi-CHO، HeLa و HEK293 با یکدیگر شباهت دارند (به‌ترتیب ۴۶/۴۷، ۴۷/۰۷ و ۴۸ درصد) اما دو گروه ذکرشده اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان می‌دهند. از نظر میزان فسفولیپید POPE سلول‌های HeLa و HEK293 با یکدیگر (به‌ترتیب ۱۲/۵۳ و ۱۵/۱۳ درصد)، سلول‌های SW480 و Expi-CHO با یکدیگر (به‌ترتیب ۱۹/۸۳ و ۲۱/۲۰ درصد) و سلول‌های Expi-CHO و CHO نیز با یکدیگر (به‌ترتیب ۲۱/۲۰ و ۲۳/۳۳ درصد) شباهت دارند، اما هر گروه اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان این فسفولیپید با سایر گروه‌ها نشان می‌دهند. در مورد میزان فسفولیپید POPS سلول HEK293 (۱۰/۳۳ درصد) اختلاف معنی‌داری را با سایر سلول‌های موردبررسی نشان داد. میزان فسفولیپید POPS برای سلول‌های CHO برابر ۱۳/۳۳ درصد، Expi-CHO برابر ۱۳/۳۵ درصد، HeLa برابر ۱۳/۵۳ درصد و SW480 برابر ۱۴/۲۷ درصد به‌دست آمد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند. در مورد فسفولیپید SM سلول‌های CHO و Expi-CHO با یکدیگر (به‌ترتیب ۴/۴۳ و ۵/۳۷ درصد)، سلول‌های Expi-CHO و SW480 با یکدیگر (به‌ترتیب ۵/۳۷ و ۷/۴۰ درصد) و سلول‌های SW480 و HeLa با یکدیگر (به‌ترتیب ۷/۴۰ و ۸/۲۷ درصد) شباهت دارند اما هرکدام از گروه‌های ذکرشده اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان فسفولیپید SM با یکدیگر نشان می‌دهند. لازم به‌ذکر است که سلول‌های HEK293 با سایر سلول‌های بیان‌شده اختلاف معنی‌داری از نظر میزان این فسفولیپید نشان می‌دهند (برابر ۱۳/۵۰ درصد). در مورد فسفولیپید IMP نیز سلول‌های HEK293، CHO، Expi-CHO و SW480 با یکدیگر (به‌ترتیب ۲/۶۰، ۳/۶۳، ۲/۸۶ و ۴/۳۳ درصد) و سلول‌های SW480 و HeLa با یکدیگر (به‌ترتیب ۴/۳۳ و ۶/۰۳ درصد) شباهت دارند اما سلول‌های دو گروه اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان IMP با یکدیگر نشان می‌دهند.

به طور کلی نیز می‌توان گفت که در سلول‌های CHO، Expi-CHO و SW480 میزان فسفولیپیدهای غشا از بیشترین به کمترین شامل POPC، POPE، POPS، CHOL، SM و IMP می‌باشد. اما در مورد سلول های Hela و HEK293 متفاوت می‌باشد و برای سلول های Hela به ترتیب شامل POPC، POPS، POPE، CHOL، SM و IMP و در مورد سلول های HEK293 به ترتیب شامل POPC، POPE، SM، POPS، CHOL و IMP می باشد (نمودار ۱ و جدول s۳).

نمودار ۱- میانگین فسفولیپیدهای غشا در سلول‌های موردبررسی



[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

جدول۳- آنالیز **ANOVA** میانگین درصد فسفولیپیدهای غشا در رده‌های سلولیِ موردبررسی

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
POPC	Between Groups	۸/۲۹۶۴	۴	۲/۰۷۴۱	۱/۶۰۱۹	۰/۰۰۰
	Within Groups	۱/۷۵۱۰	۱۰	۱/۰۷۵		
	Total	۹/۰۴۷۵	۱۴			
POPE	Between Groups	۲/۹۶۳۳۷	۴	۵/۴۹۱۹	۳/۱۲۰۷	۰/۰۰۰
	Within Groups	۱/۰۲۷۶	۱۰	۱/۶۰۳		
	Total	۲/۹۸۹۵۳	۱۴			
POPS	Between Groups	۳/۶۳۱۲	۴	۸/۱۵۸	۱/۵۷۸۰	۰/۰۰۱
	Within Groups	۷/۷۱۲	۱۰	۰/۷۷۱		
	Total	۴/۳۴۲۰	۱۴			
SM	Between Groups	۱/۳۲۱۵۰	۴	۳/۵۸۰۷	۴/۰۰۱۰	۰/۰۰۰
	Within Groups	۹/۳۹۵	۱۰	۰/۹۳۹		
	Total	۱/۷۱۶۵۹	۱۴			
IMP	Between Groups	۲/۷۲۳۲	۴	۵/۶۸۱	۸/۸۳۲	۰/۰۰۳
	Within Groups	۶/۴۳۲	۱۰	۰/۶۴۳		
	Total	۲/۱۵۵۹	۱۴			
CHOL	Between Groups	۱/۵۳۳۶	۴	۴/۱۳۳	۲/۳۵۶	۰/۱۲۴
	Within Groups	۱/۵۴۷۷	۱۰	۱/۷۵۵		
	Total	۳/۰۸۰۴	۱۴			

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

بحث

درحال‌حاضر روش‌های متعددی برای تهیهٔ لیپوزوم‌ها وجود دارد که عموماً در مراحل اولیهٔ ساخت لیپوزوم یک یا چند حلّال آلی و یا دِترجنت به‌منظور حل نمودن مولکول‌های سازنده یعنی همان چربی‌ها و یا فسفولیپیدها به‌کار می‌رود. پیشرفت‌های اخیر که در تحقیقات اولیه و بالینی زیست‌پزشکی صورت گرفته است تا حد زیادی به توسعهٔ فناوری‌های انتقال‌ژن، از جمله ویروس‌های نوترکیب (ناقل‌های ویروسی) و سایر استراتژی‌های انتقال (ناقل‌های غیرویروسی) وابسته است. بااین‌حال، هیچ‌یک از فناوری‌های فعلی تمام الزامات لازم برای ژن‌درمانی را برآورده نمی‌کند. بیش از سه‌چهارم کارآزمایی‌های ژن‌درمانی کنونی بر ناقل‌های ویروسی مختلف تکیه دارند، عمدتاً به این دلیل که ژن‌های درمانی را بسیار مؤثرتر و ثابت‌تر از ناقل‌های غیرویروسی موجود انتقال می‌دهد. باوجوداین، توسعهٔ یک سیستم تحویل غیرویروسی جدید و کارآمد یک هدف مهم است، زیرا ویروس‌های نوترکیب هنوز تعدادی از معایب را به‌عنوان ابزارهای عملی برای کاربردهای پزشکی دارند (۱۰).

اهمیت بی‌ثباتی غشا در سیستم‌های تحویل ژن غیرویروسی برای اولین‌بار با کشف اینکه ذرات آدنوویروس تا حد زیادی تحویل ژن با واسطهٔ گیرنده را از طریق اختلال در اندوزوم تسهیل می‌کنند، مشخص شد (۱۱). از آن زمان، نقش عوامل شیمیایی و بیولوژیکی مختلف در تسهیل انتقال ژن از طریق بی‌ثبات کردن غشای اندوزوم در شرایط اسیدی موردبررسی قرار گرفته است. این عوامل شامل عوامل اندوسوموتروپیک، ذرات آدنوویروس غیرفعال، پپتیدهای آمفی‌فیل مصنوعی و طبیعی، پلیمرهای کاتیونی و فسفولیپیدهای خنثیِ مصنوعی هستند. بااین‌حال، کاربرد این عوامل به‌ویژه برای کاربردهای *in-vivo*، به‌دلیل سمیّت بالا و ناپایداری کمپلکس‌ها در حضور پروتئین‌های سرم تا حد زیادی محدود شده‌است (۱۲). بنابراین، توسعهٔ یک عامل جدید و بی‌ضرر که می‌تواند نفوذ اسیدهای نوکلئیک را در غشای پلاسما تسهیل کند، کلید تحویل موفقیت‌آمیز DNA حتی در شرایط سخت داخل بدن نیز است.

تکنیک‌های مختلفی برای خالص‌سازی فسفولیپیدها موردبررسی قرار گرفته‌اند، Tokarska و Clandinin در سال ۱۹۸۵ از روش استخراج فسفولیپید به‌وسیلهٔ انواع مختلف حلّال‌ها استفاده کرده‌اند (۱۳). در میان تمام روش‌های استخراج لیپید، استفاده از حلّال یکی از سریع‌ترین و کارآمدترین روش‌ها می‌باشد و با وجود مصرف بالای انرژی برای جداسازی روغن از حلّال توسط فرایند تقطیر و همچنین خطر آتش‌سوزی و انفجار در اثر استفاده از حلّال‌های قابل اشتعال و ایجاد مشکلات زیست‌محیطی، روش استخراج با حلّال مقرون‌به‌صرفه‌ترین روشی است که درحال‌حاضر در دسترس می‌باشد (۳، ۱۴).

لیپیدها، لیزوفسفولیپیدها و به‌طور خاص فسفولیپیدها نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی بالقوه‌ای برای بیماری‌های انسانی هستند. درحالی‌که بسیاری از روش‌های استخراج و آنالیز این مولکول‌ها توسعه داده‌شده، بیشتر آن‌ها پرزحمت و زمان‌بر هستند و قابلیت تکرارپذیری کمی دارند که مهم‌ترین مانع برای استفاده از آن‌ها است. در پژوهشی که توسط Zhao و Xu در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، یک روش بسیار ساده برای استخراج لیزوفسفولیپیدها و فسفولیپیدها از نمونه‌های پلاسمایی یا سرم انسانی ایجاد شد که تنها از یک حلّال متانول استفاده می‌شود و شامل یک مرحلهٔ سانتریفوژ می‌باشد که به آن روش استخراج فسفولیپید ساده یا MeOH می‌گویند (۱۵). Sim در سال ۱۹۹۵ از روش تبلور در دمای پایین برای حذف روغن خنثیِ جامدشده از فسفولیپیدها استفاده نمود (۱۶). ولی این روش در صورت استفاده برای سلول‌های جانوری، قادر به حذف باقیمانده‌های پروتئینی سلول‌ها نبود. در سال ۲۰۰۱، Miyata و Matsumoto امواج اولتراسونیک را برای استخراج فسفولیپیدها به‌کار بردند (۱۷). در این روش هم از نظر تئوری حداقل به‌دلیل تخریب غشای سلولی، فسفولیپیدهای داخل‌سلولی مانند غشای هسته و یا حتی غشای میتوکندری‌ها و سیستم گلژی می‌تواند با محصول نهایی مخلوط شده باشد.

روش بعدی رسوب فسفولیپید با استفاده از آستون است که در بین روش‌های جداسازی بهترین نتایج را نشان می‌دهد، Palacios و Wang به‌وسیلهٔ این روش موفق شدند که فسفولیپیدها را با خلوص ۹۵/۹ درصد جدا کنند. آن‌ها در تحقیقات خود از چندمرحلهٔ استخراج با اتانول و هگزان و در نهایت خالص‌سازی مرحلهٔ فیکاسیون و بارش با آستون سردشده برای محصول نهایی استفاده کردند (۱۸، ۱۹).

Choi و Yin در سال ۲۰۱۸ از روش HPLC-MS برای تجزیه‌وتحلیل ترکیب فسفولیپیدها در مغز موش استفاده کردند و آن را با فسفولیپیدهای قلب، کلیه و کبد مقایسه نمودند (۲۰).

در سال ۲۰۱۸ Prata و همکاران نیز پیشنهاد استفاده از فسفولیپید برای انتقال ژن در فرایند ژن‌درمانی را مطرح نمودند (۲۱). آن‌ها میزان موفقیت انتقال ژن با استفاده از لیپوزوم‌های ساخته‌شده با فسفولیپید طبیعی و پلیمرهای کاتیونی را مقایسه نمودند. البته این گروه ساخت یک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

فسفولیپید ترکیبی بر پایهٔ مولکول‌های طبیعی را پیشنهاد دادند. درصورتی‌که به‌جای استفاده از پلیمرهای کاتیونی با ساختار مشابه فسفولیپیدی بتوان از فسفولیپیدهای طبیعی برای ساخت لیپوزوم انتقال‌دهنده استفاده نمود، سمیّت سلولی به‌شدت کاهش می‌یابد. همچنین برای تلفیق لیپوزوم ناقل با غشای سلول نیازی به ایجاد بی‌ثباتیِ غشایی نیست. برای جداسازی فسفولیپیدها روش‌های زیادی پیشنهاد شده‌است که در بیشتر آن‌ها سلول‌ها ابتدا لیز می‌شوند و سپس اقدام به جداسازی فسفولیپیدها براساس پروتکل‌های استخراج چربی می‌گردد (۲۲). در برخی از تحقیقات جدید مانند گزارش دکتر ژانگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ نیز استفاده از روش‌های نانوفناوری و ساختارهای نانوگرافن و نانومولیبیدن را پیشنهاد می‌نمایند (۲۳). بدیهی است روش‌های مبتنی بر ساختارهای نانو مستلزم صرف هزینه و زمان بیشتری هستند.

در روش پیشنهادیِ جدید برای برداشت فسفولیپید بدون‌تخریب سلول و تنها از غشای خودِ سلول میزبان استفاده می‌شود. به‌نظر می‌رسد این روش مقرون‌به‌صرفه و بسیار ساده است و به‌راحتی در آزمایشگاه‌ها پیش از شروع برنامهٔ انتقال‌ژن قابل‌اجرا می‌باشد. با استفاده از ترکیب خاص حلّال شست‌وشودهندهٔ فسفولیپیدها از غشای برداشت‌شده و با فاز متحرک بهینه‌سازی می‌گردد. کروماتوگرافی لایهٔ نازک، فسفولیپیدهای اصلی تشکیل‌دهندهٔ غشا را به‌خوبی جداسازی می‌نماید. نتایج این مطالعه نشان دادند که در سلول‌های CHO، Expi-CHO و SW480 میزان فسفولیپیدهای غشا از بیشترین به کمترین شامل POPC، POPE، POPS، CHOL، SM و IMP می‌باشد. برای سلول‌های HeLa و HEK293 سهم POPS متفاوت بود. سلول‌های مخمری میزان POPS بیشتری نسبت به سلول‌های جانوری داشتند که برای ساخت لیپوزوم‌های انتقال‌ژن مهمتر هستند. بااین‌حال مقدار مناسب از POPC, POPE از شست‌وشوی غشایی سلول‌های مخمری به‌دست آمد. هزینهٔ کشت و تکثیر سلول مخمری بسیار پایین‌تر و شرایط رشد آن نیز راحت‌تر است و نیازی به CO_2 با غلظت بالا در محیط‌کشت ندارد. سلول مخمری با توجه به رشد سریع و محیط‌کشت ارزان، می‌تواند منبع قابل‌قبولی از فسفولیپید برای خالص‌سازی باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به هزینهٔ زیاد ترکیبات ترانسفکشن پلیمری، می‌توان از روش شست‌وشوی غشایی برای تهیهٔ مادهٔ تسهیل‌کنندهٔ ترانسفکشن استفاده کرد. با استفاده از ترکیب خاصی از حلّال‌های غیرقطبی می‌توان فسفولیپیدهای غشای سلول را شست‌وشو داد. این فسفولیپیدها می‌توانند به روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک با استفاده از حلّال خاص فاز متحرک به‌خوبی تفکیک شوند. هزینهٔ این فرایند بسیار کمتر از تهیهٔ ترکیبات صنعتی ترانسفکشن است. پیش‌بینی می‌شود انتقال‌ژن به‌وسیلهٔ لیپوزوم‌های ساخته‌شده با فسفولیپیدهای طبیعی باید راندمان بسیار بالاتری داشته باشد که باید در تحقیقات بعدی بررسی و مطالعه گردد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

. تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافعی ندارند.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب بخشی از رسالهٔ دکتری تخصصی زیست‌شناسی تکوین و با حمایت دانشگاه علوم پزشکی گرگان انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانیِ خویش را از حمایت و مساعدت بخش‌های مختلف این دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند ابراز می‌دارند

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

منابع

1. Drescher S, van Hoogevest P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. Pharmaceutics. 2020 Dec 18;12(12):1235. doi: 10.3390/pharmaceutics12121235. PMID: 33353254; PMCID: PMC7766331.
2. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. PeerJ. 2021 Apr 21;9:e11165. doi: 10.7717/peerj.11165. PMID: 33976969; PMCID: PMC8067914.
3. Cheng CH, Du TB, Pi HC, Jang SM, Lin YH, Lee HT. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO2. Bioresource Technology. 2011 Nov 1;102(21):10151-3.
4. Mercer P, Armenta RE. Developments in oil extraction from microalgae. European journal of lipid science and technology. 2011 May;113(5):539-47.
5. Yaman S, Chintapula U, Rodriguez E, Ramachandramoorthy H, Nguyen KT. Cell-mediated and cell membrane-coated nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. Cancer Drug Resist. 2020;3(4):879-911. doi: 10.20517/cdr.2020.55. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33796822; PMCID: PMC8011581.
6. Le QV, Lee J, Lee H, Shim G, Oh YK. Cell membrane-derived vesicles for delivery of therapeutic agents. Acta Pharm Sin B. 2021 Aug;11(8):2096-2113. doi: 10.1016/j.apsb.2021.01.020. Epub 2021 Feb 1. PMID: 34522579; PMCID: PMC8424219.
7. Gellissen G, editor. Production of recombinant proteins: Novel microbial and eukaryotic expression systems. John Wiley & Sons; 2006 Mar 6. https://doi.org/10.1002/3527603670.
8. Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. AIMS microbiology. 2020;6(1):1.https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001
9. Breil C, Abert Vian M, Zemb T, Kunz W, Chemat F. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid-Liquid-Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvatation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. Int J Mol Sci. 2017 Mar 27;18(4):708. doi: 10.3390/ijms18040708. PMID: 28346372; PMCID: PMC5412294.
10. Luo D, Saltzman WM, editors. Synthetic dna delivery systems. Springer Science & Business Media; 2003 Sep 30.
11. Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotten M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(19):8850-4.
12. Friedmann T. The development of human gene therapy. 1999.
13. Tokarska B, Clandinin MT. Extraction of egg yolk oil of reduced cholesterol content. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 1985 Sep 1;18(3):256-8.
14. Gong, Y., Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel.J. Biotechnol Lett., 33(7), 1269-84.
15. Zhao Z, Xu Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. Journal of lipid research. 2010 Mar 1;51(3):652-9.
16. Sim JS (1995) Extraction of fresh liquid egg yolk. Canadian Patent 1,335,054
17. Miyata K, Matsumoto H. Manufacture of purified egg-yolk lecithins. Japanese Patent. 2001;2(24):2-001.
18. Palacios LE, Wang T. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2005 Aug;82:571-8.
19. Palacios LE, Wang T. Extraction of egg-yolk lecithin. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2005 Aug;82(8):565-9.
20. Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, Stevens JF, Becker LB, Kim J. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. Mol Cell Biochem. 2018 May;442(1-2):187-201. doi: 10.1007/s11010-017-3203-x. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28993959; PMCID: PMC5882520.
21. Prata CA, Li Y, Luo D, McIntosh TJ, Barthelemy P, Grinstaff MW. A new helper phospholipid for gene delivery. Chemical communications. 2008(13):1566-8.
22. Yang S, Xue J, Ye C. Protocol for rapid and accurate quantification of phospholipids in yeast and mammalian systems using LC-MS. STAR protocols. 2022 Dec 16;3(4):101769.
23. Zhang PZ, Jiao FF, Xie ZX, Kong Z, Hu W, Shen JW, Liang LJ. Theoretical investigation of the mechanism of phospholipid extraction from the cell membrane using functionalized graphene quantum dots. Materials Advances. 2022;3(15):6161-70.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

ضمیمهٔ تکمیلی

جدول **S۳**- مقایسهٔ گروه‌های هموژن موردمطالعه

POPC

Tukey HSD[a]

Cell Type	Repeats	Subset for alpha = ۰/۰۵	
		۱	۲
CHO	۳	۴۱/۶۶۶۷	
SW480	۳	۴۳/۵۳۳۳	
Expi-CHO	۳		۴۶/۴۷۳۳
Hela	۳		۴۷/۰۶۶۷
HEK293	۳		۴۸/۰۰۰۰
SS-Yeast	۳		۴۷/۷۵۲
Sig.		۰/۲۵۳	۰/۴۲۲

POPE

Tukey HSD[a]

Cell Type	N	Subset for alpha = 0.05		
		۱	۲	۳
Hela	۳	۱۲/۵۳۳۳		
HEK293	۳	۱۵/۱۳۳۳		
SW480	۳		۱۹/۸۳۳۳	
Expi-CHO	۳		۲۱/۲۰۰۰	۲/۲۰۰۰ ۱
CHO	۳			۲/۳۳۳۳ ۳
SS-Yeast	۳		۲۰/۳۴۷۰	
Sig.		۰/۱۶۳	۰/۶۸۵	۰/۳۰۵

POPS

Tukey HSD[a]

Cell Type	N	Subset for alpha = ۰/۰۵	
		۱	۲
HEK293	۳	۱۰/۰۳۳۳	
CHO	۳		۱۳/۳۳۳۳
Expi-CHO	۳		۳/۳۵۰۰
HeLa	۳		۱۳/۵۳۳۳
SW480	۳		۱۴/۲۶۶۷
SS-Yeast	۳		۱۵/۸۷۲۰
Sig.		۱/۰۰۰	۰/۶۹۶

SM

Tukey HSD[a]

Cell Type	N	Subset for alpha = ۰/۰۵			
		۱	۲	۳	۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]

CHO	۳	۴/۴۳۳۳			
Expi-CHO	۳	۵/۳۷۰۰	۵/۳۷۰۰		
SW480	۳		۷/۴۰۰۰	۷/۴۰۰۰	
HeLa	۳			۸/۲۶۶۷	
HEK293	۳				۱۳/۵۰۰۰
SS-Yeast	۳			۶/۳۹۱۰	
Sig.		۰/۷۶۰	۰/۱۵۱	۰/۸۰۵	۱/۰۰۰

IMP

Tukey HSD[a]

Cell Type	N	Subset for alpha = ۰/۰۵	
		۱	۲
HEK293	۳	۲/۶۰۰۰	
Expi-CHO	۳	۲/۸۶۳۳	
CHO	۳	۳/۶۳۳۳	
SW480	۳	۴/۳۳۳۳	۴/۳۳۳۳
HeLa	۳		۶/۰۳۳۳
SS-Yeast	۳	۲/۰۱۳۱	
Sig.		۰/۱۳۴	۰/۱۴۵

CHOL

Tukey HSD[a]

Cell Type	N	Subset for alpha = ۰/۰۵
		۱
SW480	۳	۸/۹۳۳۳
Expi-CHO	۳	۹/۴۶۶۷
HEK293	۳	۹/۷۳۳۳
HeLa	۳	۱۱/۲۰۰۰
CHO	۳	۱۱/۶۶۶۷
SS-Yeast	۳	۶/۳۶۸۵
Sig.		۰/۱۶۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-12-22]