جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خون
دوره ۶ شماره ۱ بهار ۸۸ (۱۱-۱)

جداسازی، کلونینگ و بیان ژن فاکتور VII انعقادی نوترکیب انسانی در رده سلولی CHO

راحله حلبیان[۱]، ناصر شاگردی اسماعیلی[۲]، آرزو اوودی[۲]، ناصر مسروری[۳]، دکتر ناصر امیری‌زاده[۴]، دکتر کامران موسوی حسینی[۵]، دکتر احمد قره‌باغیان[۶]، دکتر حوری رضوان[۷]، دکتر محمد علی جلیلی[۸]، دکتر مهریار حبیبی رودکنار[۹]

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور VII ، یک گلیکوپروتئین پلاسمایی است که در آبشار انعقادی تشکیل فیبرین، شرکت دارد. فاکتور VII در مسیر انعقادی نقش مهمی داشته و آغازگر مسیر خارجی انعقاد است. هدف اساسی این مطالعه جداسازی و کلونینگ فاکتور VII نوترکیب انسانی و بیان آن در رده سلولی یوکاریوتی CHO جهت بیان فاکتور VII نوترکیب(FVII) بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. ابتدا cDNA ژن فاکتور VII از رده سلولی کبد انسان(HepG2) جدا شده و در وکتور(+) pcDNA ۳/۱ کلون شده سپس وکتور نوترکیب به داخل سلول‌های CHO ترانسفکت شد. در نهایت، یک کلون سلولی که به طور پیوسته فاکتور VII را بیان می‌کند تثبیت شد. بیان فاکتور VII نوترکیب توسط روش‌های RT-PCR ، الایزا، SDS-PAGE و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین تایید فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب توسط آزمایش PT و ایجاد لخته در پلاسمای فاقد فاکتور VII صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کلونینگ و بیان موفقیت‌آمیز ژن فاکتور VII بود. پس از ۳ هفته کشت سلول‌های CHO در حضور جنتیسین، کلون سلول‌های پایدار به دست آمد. نتایج آزمایش‌های RT-PCR ، الایزا، SDS-PAGE و وسترن بلات حاصل از کلون‌ها، نشان‌دهنده بیان این پروتئین در رده سلولی CHO بود. کاهش ۳ الی ۴ برابری در زمان انعقاد نشان‌دهنده وجود فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب بیان شده بود.

نتیجه گیری

سالانه حدود ۴۰۰۰ الی ۶۰۰۰ ویال(۳۳۶۰۰ تا ۵۰۴۰۰ میلی گرم) از این فرآورده وارد کشور می‌شود که دولت را متحمل هزینه بسیار بالایی می‌کند. بنابراین تولید فاکتور VII نوترکیب با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در سطح آزمایشگاهی، می‌تواند اولین گام در راه فایق آمدن بر مشکلات فوق باشد.

کلمات کلیدی: هموفیلی، فاکتور VII نوترکیب، CHO ، ترانسفکشن

تاریخ دریافت : ۸۷/ ۷/۳۰
تاریخ پذیرش : ۸۸/ ۲/۳۱

۱ـ کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- کارشناسی ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴ـ PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵ـ PhD شیمی دارویی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷ـ PhD بیوشیمی ـ استاد مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۸ـ PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۹ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

یکی از چالش‌های عمده در درمان بیماران هموفیلی، نیاز به فاکتور IX و VIII پلاسمایی و یا نوترکیب در دوز بالا می‌باشد(۱). البته این مشکل در ۲۵٪ از بیماران که به طور طبیعی دارای آنتی‌بادی بر علیه فاکتور از دست رفته هستند، چندین برابر می‌شود(۳، ۲). راه حل این دسته از بیماران، استفاده از FVIII است. اما میزان بسیار کم آن در پلاسما، تخلیص این فاکتور را دچار مشکل می‌کند و از طرف دیگر ویروس‌زدایی مانع دیگری در راه به دست آوردن این محصول از اهداکنندگان خون است. بنابراین تولید فاکتور FVII به روش نوترکیب، می‌تواند با توجه به نقش این فاکتور در مسیر انعقاد خارجی، روش مناسب و ایمنی برای حل مشکلات موجود در درمان هموفیلی باشد. در حال حاضر فن‌آوری تولید rFVII تنها در اختیار شرکت Novoseven بوده و سالانه دولت را متحمل هزینه‌های سنگین برای واردات این محصول می‌کند.

فاکتور VII به طور طبیعی یک گلیکوپروتئین زیموژن به وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون و به شکل تک زنجیره‌ای با ۴۰۶ اسید آمینه است که توسط سلول‌های کبدی ساخته شده و برای فرآیند انعقاد ضروری است. این پروتئین وابسته به ویتامین K بوده و توسط فاکتورهای XIIa ، Xa ، IXa یا ترومبین، فعال شده و در این صورت دارای یک شکست پپتیدی در آمینو اسید ۱۵۲ در پایانه N- ترمینال خود می‌باشد.

هم چنین حاوی یک پیوند دی سولفید بین دو زنجیره حاصل و نیز دو جایگاه گلیکوزیلاسیون است(۴). تولید فاکتور VII نوترکیب با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در سطح آزمایشگاهی و سپس تبدیل آن به فرم فعال، روشی مطمئن و ارزان با کارآیی درمانی بالا و مناسب است. به دلیل عدم وجود مکانیسم‌های تغییرات پس از ترجمه در پروکاریوت‌ها، در این مطالعه برای بیان FVII نوترکیب، از Chinese Hamster Ovary (CHO) که یک رده سلولی یوکاریوتی است و دارای فرآیندهای پس از ترجمه می‌باشد استفاده شد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

پلاسمیدوسویه باکتری

پلاسمید(+)pcDNA3.1 (اینویتروژن ـ آمریکا) به عنوان وکتور کلونینگ و بیانی و سویه باکتری *E. coli* DH5α (سیناژن ـ ایران)، به عنوان میزبان پروکاریوتی انتخاب شد. وکتور(+) pcDNA3.1 ، شاتل وکتور است و دارای قابلیت کلون کردن ژن مورد نظر درون سلول و بیان آن ژن درون رده سلولی پستانداران می‌باشد. هم چنین حاوی ژن مقاومت به نئومایسین است که به منظور غربالگری کلون‌های پایدار ترانسفکت شده در رده سلول یوکاریوتی استفاده گردید.

کشت رده سلولی کبد انسان(HepG2) و تخمدان هامستر چینی(CHO)

رده‌های سلولی کبد انسان(HepG2) و تخمدان هامستر چینی(CHO)(بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت سلولی RPMI حاوی ۱۰٪ FBS ، ۱٪ پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 کشت داده شد.

استخراج RNA

RNA رده سلولی(HepG2) با استفاده از تریزول (اینویتروژن ـ آمریکا) بر طبق دستورالعمل، استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بر روی ژل ۱٪ آگارز بررسی گردید و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nano drop) تعیین مقدار شد.

جداسازی ژن فاکتور FVII

cDNA از روی 500ng RNA استخراج شده از رده سلولی(HepG2) با استفاده از آنزیم SuperScript III ، سنتز گردید(اینویتروژن، کیت سنتتاز cDNA).

در این مرحله ابتدا آغازگرهای مربوط به ژن‌های مورد نظر طراحی شد و سپس با روش RT-PCR ، کل ژن فاکتور VII با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و آنزیم تک DNA پلی‌مراز و دستگاه (PerkinElmer Life and analytical sciences, Inc., Wellesley, MA, USA Genen Amp PCR system 9600) جداسازی شد. صحت توالی سنتز شده با توالی‌یابی DNA (DNA Sequencing)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تایید گردید. به منظور استاندارد بودن آزمایش‌ها، ژن β- actin TCA به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد.

جدول ۱: آغازگر«۱ و ۲» جهت ایجاد قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی از ژن FVII و آغازگر «۳ و ۴» بتا اکتین جهت ایجاد قطعه ۱۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین

شماره	نام آغازگر	توالی
۱	Forward FVII	5'-ACG AAT TCA CCA TGGT GGG TCT CCC AGG CCC TCA GGC TC-3'
۲	Reverse FVII	5'-TAG CGG CCG CCT AGG GAA ATG GGG CTC GCA G-3'
۳	Forward B-actin	5'-TTC TAC AAT GAG CGT GTG G-3
۴	Reverse B-actin	5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'

کلونینگ فاکتور FVII درون وکتور(+) pCDNA3.1

محصول PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز ران و باند مورد نظر(FVII) از روی ژل استخراج گردید. FVII cDNA حاوی سایت‌های اختصاصی آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *Not1* ، درون وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1 دارای پروموتور سیتومگالو ویروس و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و نئومایسین وارد و سپس درون سلول پروکاریوتی *E.coli* DH5α کلون گردید. جهت انتخاب کلون‌های حاوی وکتور، از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استفاده شد و صحت انجام کلونینگ با توالی‌یابی DNA و آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *Not1* تایید شد.

ایجاد رده سلولی CHO پایدار تولید کننده FVII نوترکیب(rFVII)

ترانسفکت در رده سلولی CHO با مقادیر متفاوت وکتور و فیوژن – ۶ ، (رُوش ـ آلمان) انجام شد. 6×10^5 سلول در پلیت ۶ خانه‌ای درحضور RPMI بدون FBS ، کشت داده شد و با بهینه کردن شرایط، مقدار ۱ µg از DNA خطی pcDNA3.1-FVII (بریده شده با آنزیم *PvuI*) و ۳µl فیوژن ـ۶ ، به درون رده سلولی CHO ترانسفکت گردید. به منظور کنترل آزمایش، وکتور بدون ژن pcDNA3.1(+) انتخاب شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت تازه حاوی (G۴۱۸) ۸۰۰µg/ml جنتیسین (رُوش ـ آلمان) جایگزین محیط بدون آنتی‌بیوتیک شد.

کلون‌های مقاوم به نئومایسین(G ۴۱۸) پس از ۲ تا ۳ هفته رشد، در حضور این آنتی‌بیوتیک ایجاد گردید. کلون‌های مقاوم غربالگری و با روش سری رقت(dilution of the cells) و کشت در پلیت ۹۶ خانه‌ای، چندین تک کلون پایدار ایجاد شد.

تعیین غلظت FVII نوترکیب تولید شده با آزمایش الایزا

به منظور بررسی میزان بیان پروتئین فاکتور VII انسانی موجود در محیط کشت، از کیت الایزای مخصوص به پروتئین فاکتور VII(آسراکروم، فرانسه) استفاده شد. 3×10^5 سلول CHO در حضور G۴۱۸ کشت داده شد. بعد از ۴ روز، بر روی محیط کشت رده سلولی پایدار CHO حاوی rFVII ، آزمایش الایزا طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

کیت الایزا فاکتور VII برای اندازه‌گیری فاکتور VII موجود در سرم، پلاسما و محیط کشت سلول طراحی شده است. کیت حاوی استاندارد برای سنجش و بررسی فاکتور VII نمونه‌ها(آزمایش‌ها) می‌باشد. آنتی‌بادی‌های ثانویه قادر به اتصال به فاکتور VII متصل شده به آنتی‌بادی وصل به ته چاهک‌های مخصوص الایزا می‌باشد و به فاکتور VII آزاد در محیط متصل نمی‌شود.

ایمونوپرسیپیتاسیون برای جداسازی FVII موجود در محیط کشت

از محیط کشت، سلول‌های CHO-FVII را برداشته و مقدار ۱ میکروگرم آنتی‌بادی IgG (Anti human R & D) به مدت یک و نیم ساعت اضافه نمودیم و هر پنج دقیقه تکان دادیم. سپس محلول Bead آماده به محیط کشت اضافه شد. محلول را سانتریفوژ کرده و مایع‌رویی رادور ریخته و سپس به محیط باقی مانده PBS اضافه نمودیم. در مرحله آخر به رسوب ته تیوب، Loading Buffer 2X اضافه کرده و در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ نمودیم تا Bead ها از پروتئین جدا شود. محیط رویی حاوی پروتئین مورد نظر است.

پلی‌اکریلامید ژل الکتروفورز SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

به منظور تایید بیان FVII در رده سلولی CHO حاوی ژن FVII ، ابتدا ژن FVII موجود در محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ایمنو پرسیپیتاسیون با آنتی‌بادی اختصاصی ژن FVII تخلیص شد و سپس نمونه بر روی ژل الکتروفورز، SDS گردید.

وسترن بلات(Western Blot)

به منظور تایید وجود پروتئین FVII ، نمونه محیط کشت پس از تخلیص، با آزمایش ایمنوپرسیپیتاسیون بر روی ژل پلی‌اکریلامید ران گردید و سپس با روش وسترن بلات به غشا PVDF(آلمان ـ رُوش) منتقل شد و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

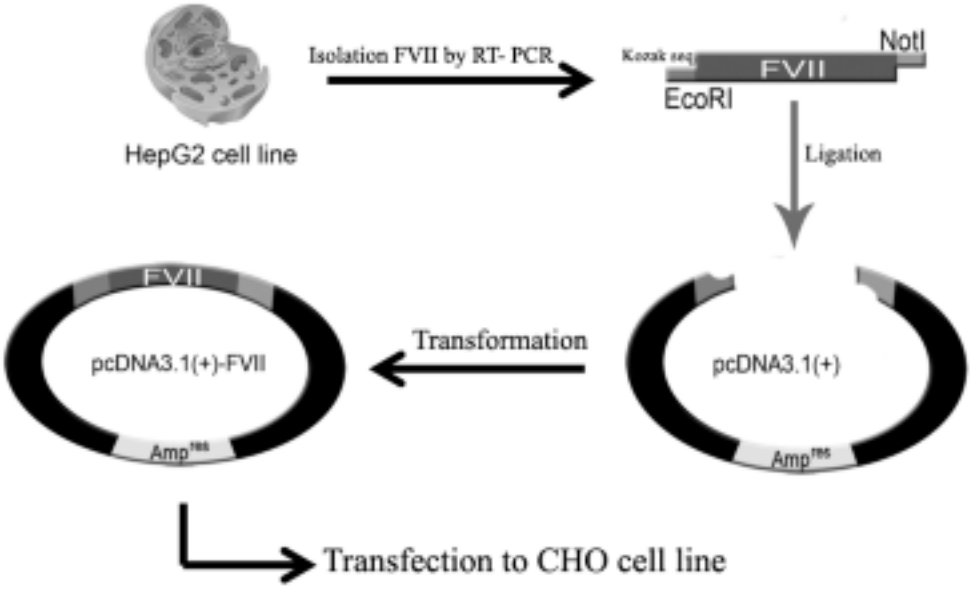
بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب با آزمایش انعقادی PT (Prothrombin Time assay)

فاکتور VII فعال می‌تواند در فرآیند انعقادی شرکت نماید. به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب، آزمایش PT انجام شد. تک کلون‌های پایدار CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب، در فلاسک حاوی RPMI ، FBS ۱۰ درصد و جنتیسین کشت داده شد و سپس با استفاده از محیط کشت و کیت PT (Prothrombin Time assay)(نئوبیوتین)، آزمایش انعقاد انجام شد.

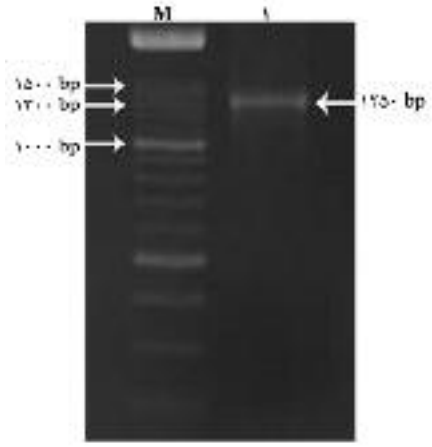
یافته ها

جداسازی و کلونینگ ژن FVII درون وکتور

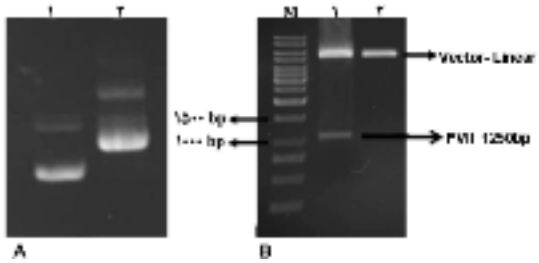
کل قطعه ژن فاکتور FVII از cDNA رده سلولی کبد انسانی HepG2 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن مذکور، با استفاده از PCR جداسازی شد(شکل ۱). محصول نهایی PCR ، قطعه‌ای به طول bp ۱۲۵۰ به دست آمد(شکل ۲). سپس ژن FVII پس از برش با آنزیم‌های محدودالاثر اختصاصی به درون وکتور pcDNA3.1 (+) وارد و وکتور pcDNA3.1-FVII و وکتور بدون ژن(کنترل) به درون باکتری *E.coli* DH5α انتقال یافت. کلون‌های باکتریایی با رشد در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غربالگری شد و پس از استخراج پلاسمید، وکتورهای نوترکیب حاوی ژن FVII با برش آنزیمی و هم چنین PCR جداسازی و انتخاب گردید و در نهایت صحت وجود ژن، توالی آن و قالب صحیح قرارگیری نوکلئوتیدها با روش توالی یابی DNA (DNA sequencing) تایید شد(شکل ۳).



شکل ۱: مراحل جداسازی، کلونینگ درون وکتور، ترانسفکشن وکتور نوترکیب به درون سلول یوکاریوتی و بیان فاکتور FVII نوترکیب



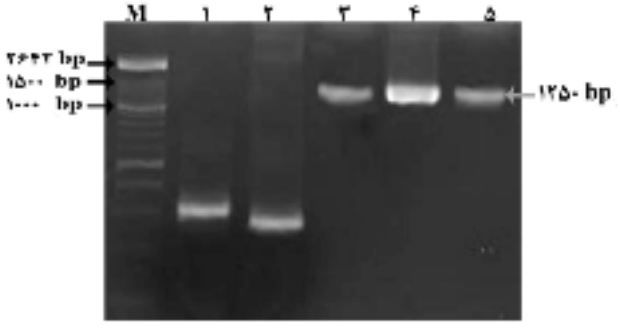
شکل ۲: PCR ژن FVII با آغازگرهای اختصاصی FVII. ستون شماره ۱ قطعه ژنی FVII را با bp ۱۲۵۰ نشان می‌دهد. همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، قطعه ژنی مربوط به فاکتور VII انسانی از رده سلولی HepG2 در مقابل مارکر bp ۱۲۵۰ قرار گرفته است.



شکل ۳- الف): A : الکتروفورز وکتور نوترکیب و pcDNA خالی. ستون شماره ۱ وکتور خالی را نشان می‌دهد که به علت وزن کم حرکت بیشتری در الکتروفورز دارد. ستون شماره ۲ وکتور حاوی ژن FVII است که به علت دارا بودن ژن FVII سنگین‌تر بوده و در الکتروفورز حرکت کمتری دارد. B: هضم pcDNA خالی و وکتور نوترکیب با آنزیم‌های *EcoRI* و *Not I* و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون شماره ۱ وکتور حاوی ژن FVII برش خورده توسط آنزیم‌های مذکور را نشان می‌دهد که به علت این که وکتور حاوی ژن FVII است حرکت کمتری داشته و بالاتر ایستاده است. ستون شماره ۲ وکتور خالی را نشان می‌دهد که به علت سبک بودن در الکتروفورز حرکت بیشتری دارد.

بیان FVII نوترکیب در رده سلولی CHO

به منظور بیان FVII ، رده سلولی CHO با وکتور pcDNA3.1-FVII که توسط آنزیم محدود کننده *PvuI* برش خورده بود ، ترانسفکت گردید. پس از دو هفته



شکل ۳-ب): محصول PCR مربوط به کلون‌های رشد یافته بر روی محیط آگار حاوی آمپی‌سیلین با استفاده از آغازگر اختصاصی M.FVII مارکر bp ۱۰۰ . ستون شماره ۱ و ۲ نشان‌دهنده کلون‌های حاوی وکتور خالی. ستون شماره ۳ و ۴ و ۵ کلون حاوی وکتور دارای ژن FVII می‌باشد. باند ۱۲۵۰ جفت بازی، باند اختصاصی مربوط به ژن فاکتور VII است و چاهک ۱ و ۲ به دلیل عدم حضور باند مورد نظر منفی می‌باشند. باندهای پایین شکل نشان‌دهنده باندهای غیر اختصاصی است.

کشت سلول در حضور آنتی‌بیوتیک G418، کلون‌های پایدار ایجاد شد.

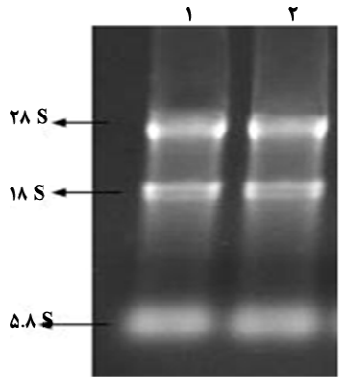
استخراج RNA از سلول‌های CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب

به منظور بررسی بیان ژن در سلول‌های پایدار ترانسفکت شده، RNA رده سلولی CHO که ژن فاکتور VII نوترکیب و رده سلولی حاوی وکتور خالی(کنترل) درون آن ترانسفکت و سپس کلون‌های پایدار ایجاد شده بود، استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد(شکل ۴ - الف). وجود سه باند اختصاصی مربوط به(۲۸ sRNA ریبوزومی)، (۱۸ sRNA ریبوزومی) و (۵/۸ sRNA ریبوزومی) حاکی از عدم حضور باندهای غیر اختصاصی و تداخل DNA در RNA استخراج شده بود. وجود ژن فاکتور VII با آزمایش‌های متعدد دیگری تایید شده است که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد.

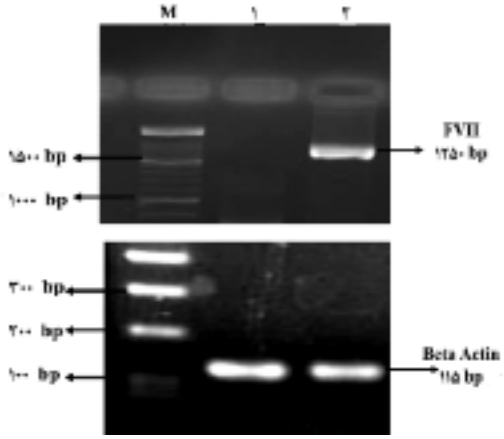
سنتز cDNA و بررسی بیان ژن فاکتور VII نوترکیب با استفاده از RT-PCR

از نمونه‌های RNA استخراج شده ، cDNA ساخته و با

آغازگرهای اختصاصی فاکتور VII انسانی و بتااکتین، PCR انجام شد. به منظور بررسی و مقایسه میزان بیان ژن فاکتور VII انسانی، از روی رده‌های سلولی CHO حاوی سازه ژنی نوترکیب و فاقد سازه ژنی نوترکیب، RT-PCR انجام شد.



شکل ۴- الف): الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک شماره ۱، مربوط به RNA استخراج شده از رده سلولی CHO و چاهک شماره ۲ رده سلولی حاوی وکتور خالی(کنترل) می‌باشد.



شکل ۴ ـ ب): الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M : مارکر ۱۰۰ bp (۵۰ ng/µl)، چاهک ۱ نشان‌دهنده RT-PCR رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب و چاهک ۲ محصول RT-PCR ژن فاکتور VII انسانی در رده سلولی CHO است. شکل پایین بتااکتین رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب و رده سلولی حاوی ژن فاکتور VII انسانی می‌باشد.

آغازگر طراحی شده برای ژن فاکتور VII انسانی، توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۱۲۵۰ جفت باز را داشت.

هم زمان با انجام PCR برای ژن فاکتور VII انسانی، از آغازگرهای ژن بتااکتین(ژنی که به صورت عمومی در تمام سلول‌ها وجود دارد و جزو ژن‌های خانه‌دار می‌باشد) نیز که قطعه‌ای به طول ۱۱۵ جفت باز را سنتز می‌کردند، استفاده شد(شکل ۴ - ب). وجود باند در ناحیه ۱۲۵۰ جفت بازی در رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و عدم حضور این باند در رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب، نشان‌دهنده بیان ژن فاکتور VII در سطح ژن در رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ژن فاکتور VII انسانی می‌باشد.

بررسی بیان FVII در سطح پروتئین

بررسی بیان فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از الایزا

پروتئین فاکتور VII نوترکیب، بعد از بیان به فضای خارج سلول ترشح می‌شود. بنابراین میزان بیان این پروتئین در محیط کشت قابل اندازه‌گیری می‌باشد. به این منظور الایزا روی محیط کشت رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و کنترل انجام شد. بر اساس دستورالعمل کیت، مقدار OD مربوط به FVII استاندارد بدون رقیق شدن بیانگر غلظتی معادل ۵۰۰ ng/ml و ۱۰۵ ng/ml درصد فعالیت می‌باشد. بر این اساس میزان بیان پروتئین فاکتور VII در کلون پایدار ۱ در حدود ۲۱ ng/ml ± ۴۸۰ و ۶۰ درصد فعالیت و در کلون پایدار ۲ در حدود ۱۸ ng/ml ± ۴۹۰ و ۹۰ درصد فعالیت است (جدول ۲).

بررسی بیان پروتئین فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از SDS PAGE

به منظور تایید بیان FVII در رده سلولی CHO حاوی ژن FVII ، ابتدا پروتئین FVII موجود در محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ایمنوپرسیپیتاسیون، با آنتی‌بادی اختصاصی FVII تخلیص شد و سپس نمونه بر روی ژل الکتروفورز SDS گردید(شکل ۵).

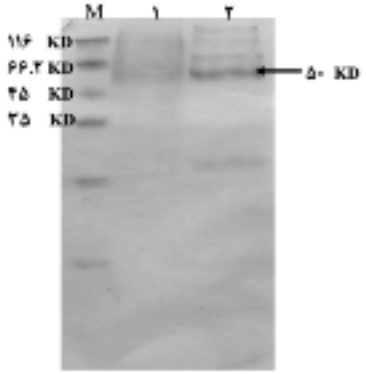
عدم حضور باند ۵۰KD در نمونه رده سلولی CHO حاوی وکتور خالی و حضور باند ۵۰ KD سلول CHO حاوی ژن فاکتور FVII ، نشان‌دهنده وجود پروتئین فاکتور

هفت در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده بود.

جدول ۲: نتایج الایزا فاکتور FVII نوترکیب

نمونه	۴۹۲ OD
FVII a*	۱/۷۵۲ ± ۰/۱۲۳
FVII a*, 1.4 dilution	۰/۶۱۲ ± ۰/۱۶۵
FVIIa*, 1.8 dilution	۰/۱۹۷ ± ۰/۱۱۶
FVIIa*, 1.10 dilution	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۹۴
CHO-pcDNA3.1/ FVII (clone 1)	۱/۰۲۳ ± ۰/۱۲۱
CHO-pcDNA3.1/ FVII (clone 2)	۱/۶۵۲ ± ۰/۱۱۸
CHO (negative control)	۰/۰۴۸ ± ۰/۰۳۲
CHO- pcDNA3.1	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۳۲

* a : غلظت‌های استاندارد ژن فاکتور FVII نوترکیب کیت الایزا

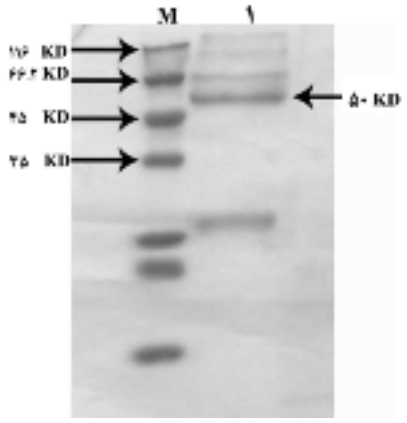


شکل ۵: M مارکر. ستون ۱ محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور خالی و ستون ۲ محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن فاکتور VII است.

بررسی بیان پروتئین فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از وسترن بلات

روش دیگر برای تایید وجود پروتئین FVII در محیط کشت، آشکارسازی پروتئین با آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به پروتئین فاکتور VII با انجام آزمایش وسترن بلات بود.

ابتدا محیط کشت حاوی سلول ترانسفکت شده با FVII و محیط کشت حاوی سلول ترانسفکت شده با وکتور خالی، SDS PAGE شد و سپس بر روی غشای PVDF منتقل گردید و غشا تحت تاثیر آنتی‌بادی اختصاصی FVII ، قرار گرفت. حضور باند KD ۵۰ رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII (FVII)، نشان‌دهنده حضور پروتئین فاکتور VII (FVII) و واکنش اختصاصی بین فاکتور VII و آنتی‌بادی اختصاصی آن بود. وجود کنترل مثبت در روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت و هدف از انجام وسترن بلات، تایید نتیجه مربوط به SDS-PAGE بود. به علت عدم وجود فاکتور VII تجاری که بتوان در وسترن بلات به عنوان کنترل مثبت استفاده نمود، در شکل ۶ کنترل مثبت وجود ندارد. لازم به ذکر است در حال حاضر FVII در بازار موجود می‌باشد که باندهای آن با باند فاکتور VII متفاوت است.



شکل ۶: نتیجه حاصل از وسترن بلات رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن فاکتور VII . وجود باند KD ۵۰ نشان‌دهنده وجود پروتئین FVII و واکنش اختصاصی آنتی‌بادی فاکتور FVII با پروتئین مذکور می‌باشد.

بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور FVII نوترکیب با استفاده از آزمایش PT

در آزمایش PT ، نمونه‌های حاوی فاکتور FVII زمان انعقاد کوتاه‌تری نسبت به نمونه‌های فاقد فاکتور FVII دارند. در جدول ۳ غلظت‌های استاندارد کیت فاکتور FVII به ترتیب رقت نشان داده شده است. ۴ سری رقت از استاندارد کیت نشان داده شده است. در سمت راست جدول زمان‌های انعقاد ارایه شده است. زمان انعقاد در رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و در کلون‌های پایدار در محدوده غلظت‌های استاندارد ۱/۸ و ۱/۴ کیت PT می‌باشد. زمان انعقاد در CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب در حد کنترل منفی آزمایش است. نتایج نشان‌دهنده حضور فاکتور VII در رده سلولی CHO می‌باشد.

جدول ۳: نتایج آزمایش PT

زمان	نمونه
۱۶ sec.	FVII[a]
۲۰ sec.	FVII[a], 1.2 dilution
۲۶ sec.	FVII[a], 1.4 dilution
۳۳ sec.	FVII[a], 1.8 dilution
۳۰ sec.	CHO- pc DNA3.1/ FVII (clone 1)
۲۹ sec.	CHO- pc DNA3.1/ FVII (clone 2)
۱ min	CHO (negative control)
more than ۶۰ sec.	CHO – pcDNA3.1

بحث

کنسانتره فاکتورهای انعقادی متعددی به وسیله روش‌های نوترکیبی تولید می‌شوند. برخی از آن‌ها هم اکنون جهت استفاده درمانی بیماری‌های خونریزی دهنده در دسترس هستند و بعضی از آن‌ها در مرحله مطالعه‌های بالینی قرار دارند. کنسانتره فاکتور VIII نوترکیب در بسیاری از کشورها دارای تاییدیه است و یک نوع از آن که دومن B حذف شده دارد، در آینده نزدیک جهت استفاده درمانی در دسترس قرار خواهد گرفت. کنسانتره فاکتور VIIa نوترکیب در مرحله نهایی انجام آزمایش‌ها جهت استفاده برای بیماران هموفیلی دارای آنتی‌بادی بازدارنده قرار دارد. فاکتور IX نوترکیب به طور موفقیت‌آمیزی در حیوانات آزمایش شده است و به میزان اندکی در انسان نیز مورد استفاده قرار گرفته است(۵).

برن تاپ در سال ۱۹۹۷ به معرفی نسل دوم فاکتور VIII نوترکیب فاقد ناحیه B پرداخت که در آن اسید آمینه سرین ۷۴۷ به گلوتامین ۱۶۳۸ متصل شده است و به همین علت rVIII SQ نام دارد و آن را با توجه به بررسی‌های مختلف برای درمان مناسب معرفی کرد. این فاکتور در سلول‌های CHO تولید و پس از خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی، ایمونو افینیتی و با روش حلال ـ دترجنت(تری ـ ان ـ بوتیل فسفات و تریتون X ۱۰۰) ویروس‌زدایی گردید. در محصول نهایی نیز برای پایداری آن به جای آلبومین و VWF، از پلی‌سوربات ۸۰ همراه با L-histidine و Sugar به همراه کلرید سدیم و کلسیم استفاده شد(۶). در مطالعه‌ای که سیتارام و همکاران انجام داده‌اند، به جای استفاده از سلول و استخراج RNA و سپس ساخت cDNA ، از کتابخانه cDNA کبد Rat استفاده کردند(۷). هم چنین در مطالعه انجام شده توسط رویز و همکاران، cDNA کد کننده فاکتور VII خرگوش را از فاژ لامبدا gtl1 تخلیص کردند(۸). در این مطالعه ژن فاکتور VII حاصل از مرحله فوق را به منظور ورود به وکتور یوکاریوتی pcDNA ، توسط آنزیم‌های محدود کننده *Not*I و *EcoR*I در دمای مناسب ۳۷ درجه سانتی‌گراد Overnight برش داده و در راستای آن وکتور pcDNA هم با همان آنزیم‌ها برش داده شد. وکتور pcDNA حاوی ژن مقاوم به نئومایسین است که جهت غربالگری کلون‌های سلول‌های پایدار مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۰، ۹).

در مطالعه‌های انجام شده توسط سیتارام و همکاران، از آنزیم‌های محدود کننده *Nhe*I و *Bamh*I استفاده گردید و هم چنین جهت کلونینگ فاکتور VII Rat از وکتور pIRES2-Neo (اینویتروژن) بهره بردند(۷).

رویز و همکاران در مطالعه دیگری، جهت سنجش توانایی cDNA جداسازی شده از فاکتور VII نوترکیب برای کد کردن سنتز پروتئین نوترکیب فاکتور VII خرگوش، cDNA فاکتور VII خرگوش را به طور مستقیم در محل‌های اختصاصی برش آنزیم‌های محدود اثر *Hind* III و *Sal* I وکتور بیانی p CMV s ، ساب کلون نمودند(۸).

در هر دو مطالعه انجام شده توسط سیتارام و رویز جهت بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، از معرف لیپوفکشن(جیبکو ـ کانادا) استفاده کردند(۸، ۷).

در مطالعه‌های مشابه سیتارام و رویز از سلول ۲/۳ HEK (Human Embryonic Kidney) جهت بیان فاکتور VII نوترکیب استفاده شد. این سلول دارای چسبندگی نسبتاً خوب بوده و جهت نوترکیبی مناسب می‌باشد(۱۱).

شرکت Novoseven که فعلاً فناوری تولید فاکتور VII نوترکیب فعال (rFVIIa) را در دست دارد، فاکتور VII نوترکیب را در رده سلولی BHK (Baby Hamster Kidney) بیان کرده و سپس آن را در طی تخلیص با مکانیسم ناشناخته‌ای فعال نمودند و از آن جایی که این

محصول به صورت تجاری است جزئیات بیشتری در بانک اطلاعات PubMed موجود نمی‌باشد(۱۲).

سیتارام و همکارانش جهت غربالگری سلول‌های ۲/۳ HEK دارای ژن فاکتور Rat VII و وکتور p IRES2-Neo از آنتی‌بیوتیک جنتیسین استفاده کردند. ولی رویبز و همکاران در مطالعه جهت بیان و خالص‌سازی فاکتور VII نوترکیب خرگوش در وکتور بیانی p CMVs ، از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین استفاده نمودند(۸، ۷).

سیتارام محیط فلاسک‌های کشت سلول را پس از ۴۸ الی ۷۲ ساعت بعد از افزودن ویتامین K و فنل رد به عنوان نمونه جمع‌آوری کرده و بیان فاکتور VII را به وسیله آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی‌هیومن توسط روش وسترن بلات تایید کرد(۷).

رویبز و همکاران در مطالعه دیگری پس از گذشت ۴ روز از زمان ترانسفکشن برای بررسی بیان FVII نوترکیب خرگوشی، از کیت الایزا استفاده نمودند و میزان بیان را در حدود ۵۰ ng/dl ردیابی کردند. آن‌ها در نهایت پروتئین نوترکیب را به کمک روش رسوب باریوم سیترات تخلیص کردند و غلظت پروتئین به دست آمده در مدت یک هفته ۱۰-۵ mg/L محاسبه شد. در این پژوهش با توجه به غلظت مارکر پروتئینی مورد استفاده در SDS-PAGE(۰/۱۵ mg/ml) و مقایسه آن با باند پروتئین نوترکیب و هم چنین نتایج حاصل از آزمایش الایزا، حداقل پروتئین تولید شده ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن را ۲۱ ± ۴۹۰ ng/ml می‌توان برآورد کرد.

پس از این مرحله، فاکتور VII نوترکیب خرگوش را از محیط کشت توسط روش‌های پرسیپیتاسیون باریم سیترات، کروماتوگرافی DEAE سفارز FF ، هم چنین آمین آگارز و کروماتوگرافی گرایشی با استفاده از شیب غلظت آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه فاکتور VII خرگوش جداسازی کردند.

خالص بودن و صحت فاکتور VII نوترکیب خرگوش به وسیله الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید و وسترن بلات تایید شد(۸).

سیتارام و همکاران در آخرین مرحله تحقیق خود برای تایید فعالیت فاکتور VII نوترکیب Rat از آزمایش تشکیل لخته به وسیله اتو آنالایزر انعقادی CA -۶۰۰۰ سیس‌مکس درحضور پلاسمای FVII deficient استفاده کردند و تشکیل لخته، فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب Rat را تایید کرد(۷).

رویبز و همکارانش نیز در مرحله آخر، فاکتور VII نوترکیب هموژن خرگوش را که از لحاظ بیولوژیکی فعال بود، با استفاده از آزمایش PT و به وسیله پلاسمای فاقد فاکتور VII سنجش کردند. زمان آزمایش PT پلاسمای فاقد فاکتور VII به کمک مایع‌رویی فلاسک کشت، ۷۵ درصد کاهش داده شد(۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش فاکتور VII در آبشار انعقادی و مسیر خارجی، می‌توان آن را به عنوان دارو در درمان بیماران هموفیل دارای آنتی‌بادی بازدارنده بر علیه فاکتورهای معیوب، مورد استفاده قرار داد. با توجه به این که سالانه رقم بسیار بالایی برای وارد کردن فاکتور VII نوترکیب به دولت تحمیل می‌گردد، بومی‌سازی تولید این محصول در داخل کشور می‌تواند یک راه‌کار کارآمد برای حل مشکلات فوق باشد و مطالعه ما اولین مرحله در راستای رسیدن به سوی هدف مذکور می‌باشد. به طور حتم یافتن راهی برای بیان در سطح بالا همراه با عملکرد صحیح این فاکتور می‌تواند راه حل اساسی در درمان هموفیلی با هزینه بسیار کمتر باشد.

References :

1- Bray GL, Gomperts ED, Courter S, Gruppo R, Gordon EM, Manco-Johnson M, *et al.* A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group. Blood 1994; 83(9): 2428-35.

2- Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Wermes C, *et al.* Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. Hum Mutat 2005; 26(3): 249-54.

3- Bowen DJ. Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol 2002; 55(2):127-44.

4- Rodgers GM, Greenbergs CS: Inherited coagulation disorders. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, *et al.* Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1999: p. 1682-1732.

5- Doreen B. Brettler: Recombinant coagulation factor product. New England Hemophilia center 1999; 1: 155-8.

6- Berntrop E. Second generation , B - domain deleted recombinant factor VIII. Thromb Haemost 1997; 78(1): 256-60.

7- Seetharam S, Murphy K, Atkins C, Feuerstein G.Cloning and expression of rat coagulation factor VII. Thromb Res 2003; 109(4): 225-31.

8- Ruize SM, Sridhara S, Blajchman MA, Clarke BJ. Expression and purification of recombinant Rabbit Factor VII. Thromb res 2000; 98(2): 203-11.

9- Southern PJ, Berg P.Transformation of mammalian cells to Antibiotic Resistance with bacterial Gene under control of the SV40 early region promoter. J Mol Appl Genet 1982; 1(4): 327-41.

10- Invitrogen. Available from: URL: http://www.Invitrogen.com/Catalog Nos 2001; 20: 790-5.

11- Berkner KL. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: Factor IX and VII. Methods Enzymol. 1993; 222: 450-77.

12- The internet Drug Index. Nordisck data. rFVIIa 2001; Available From: URL: http://www.rxlist.com/cgi/generic/Novoseven.htm ovo

Isolation, cloning and expression of recombinant human factor VII in CHO cell line

Halabian R.[1](MS), Shagerdi Esmaili N.[1](MS), Oodi A.[1](MS), Masroori N.[1](MS), Amirizadeh N.[1](PhD), Mousavi Hosseini K.[1](PhD), Gharehbaghian A.[1](PhD), Rezvan H.[1](PhD), Jalili M.A.[1](PhD), Habibi Rudkenar M.[1](PhD)

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Factor VII is a plasma glycoprotein that participates in the coagulation process leading to the generation of fibrin. Factor VII plays an important role in the cascade of coagulation. The aim of this study was to clone and express human recombinant factor VII in CHO cell line as an eukaryotic host cell.

Materials and Methods

In this descriptive study, FVII cDNA was isolated from HepG2 cell line and cloned to pcDNA 30.1(+) vector. The constructs were transfected to CHO cell line. A cell line that permanently expressed recombinant factor VII was established. The expression of recombinant FVII was determined by RT-PCR, ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis. Biological activity of recombinant factor VII was determined by prothrombin time assay in factor FVII-depleted plasma.

Results

The results showed that FVII was successfully cloned and expressed. After 3 weeks stable cell lines were generated in the culture of the CHO cell line in the presence of geneticin. RT-PCR, ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis results indicate the expression of FVII in the stable clones. A three- to four-fold decrease of the specific coagulant activity of rFVII was observed that indicates of rFVII being biologically active.

Conclusions

Four thousands to Six thousands vials of rFVII were imported to our country having high cost for the government. Therefore, production of rFVII through recombinant DNA technology within lab scale is the first step to overcome the problems.

Key words: Hemophilia, rFVIIa, CHO, Transfection
SJIBTO 2009; 6(1): 1-11

Received: 21 Oct 2008
Accepted:21 May 2009

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Assistant professor of Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax: (+9821)88601599
E-mail: *roudkenar@ibto.ir*