

جداسازی، کلونینگ و بیان FVII نو ترکیب انسانی در سیستم بیانی باکولوویروس

ناصر مسروری^۱، احمد رضا کامیاب^۱، راحله حلبیان^۲، دکتر محمد علی شکرگزار^۳، دکتر کاظم پریور^۴،

مهشید محمدی پور^۵، دکتر مهریار حبیبی رودکنار^۶

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، سازمان انتقال خون ایران

^۳ دانشیار بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

^۴ استاد زیست سلولی و تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

^۵ کارشناس ارشد ژنتیک، سازمان انتقال خون ایران

^۶ استادیار بیوتکنولوژی، سازمان انتقال خون

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات، دکتر مهریار حبیبی رودکنار

E-mail: roudkenar@ibto.ir

وصول: ۸۷/۵/۱۴، اصلاح: ۸۷/۶/۱۹، پذیرش: ۸۷/۹/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور VII یکی از عوامل انعقادی مهم در مسیر خارجی انعقاد خون است که می‌تواند با فعال کردن FX نیاز بیماران هموفیل را به فاکتورهای VIII و IX رفع نماید. بیان نو ترکیب این فاکتور مشکلات موجود در تهیه فاکتورهای مذکور از پلاسما (با توجه به میزان اندک آن‌ها) و همچنین خطر انتقال بیماری‌های خونی را برطرف می‌سازد. لذا هدف از این پژوهش بیان فاکتور مذکور به صورت نو ترکیب و در سطح بالا با استفاده از فناوری Gateway و TOPO cloning می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، cDNA فاکتور VII از رده سلولی کبدی HepG2 به کمک PCR جدا شد و سپس با تکنیک TOPO Cloning ژن مورد نظر در ساختمان ناقل پروکاریوتی قرار گرفت. ناقل نو ترکیب پس از غربالگری برای کلونی‌های باکتریایی استخراج و از آن برای انجام واکنش نو ترکیبی LR با ناقل بیانی باکولوویروس در فناوری Gateway استفاده شد. ویروس نو ترکیب به میزان حشره انتقال و پس از غربالگری‌های لازم بیان پروتئین بررسی گردید. نتایج آنالیز بیان پروتئین با الایزا به صورت تکرار سه تایی (انحراف معیار میانگین) ارائه و تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری تی استیودنت تحت نرم افزار SPSS مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست PCR برای واکنش‌های کلونینگ و نو ترکیبی همگی حاکی از کلونینگ ژن فاکتور VII با بازدهی بیش از ۹۰ درصد در ساختار ناقل‌های مورد استفاده بودند. آنالیزهای انجام شده برای بیان پروتئین توسط الایزا، SDS-PAGE و وسترن بلات بیان بالای این فاکتور را (۳۰ µg/mL) تأیید نمودند. نتایج حاصل از آنالیز الایزای نمونه‌های کشت آلوده تفاوت معناداری را با کنترل منفی نشان می‌دادند (P < ۰/۰۰۱) و بیشترین سطح بیان در روز هفتم (۱/۹۶۰ ± ۰/۰۷۶) به دست آمد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از آنالیز بیان پروتئین نو ترکیب به کمک سیستم بیانی باکولوویروس نمایانگر تولید آن در مقیاس بسیار وسیع‌تر نسبت به سیستم‌های بیانی مشابه یوکاریوتی و پروکاریوتی است. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۵/شماره ۳/صص ۱۵۷-۱۵۲).

واژه‌های کلیدی: هموفیلی؛ فاکتور VII؛ Gateway؛ TOPO Cloning؛ باکولوویروس.

مقدمه

بیماری هموفیلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انعقادی ژنتیکی و وابسته به جنس بوده که احتمال وقوع آن در مردان بیش از زنان است. یکی از چالش‌های عمده در درمان بیماران هموفیلی نیاز به فاکتور VIII و IX پلاسمایی و یا نوترکیب در دوز بالا می‌باشد. البته این مشکل در ۲۵ درصد از بیماران که به طور طبیعی دارای آنتی‌بادی بر علیه فاکتور از دست رفته هستند، چند برابر می‌شود و تزریق فاکتورهای جایگزین تنها در صورتی قابل استفاده است که تیتراژ آنتی‌بادی در خون این افراد پایین باشد. علاوه بر این، تهیه فاکتورهای فوق از پلاسما در مقیاس بالا با توجه به میزان اندک آن‌ها، هزینه تولید را سنگین و خطر سرایت بیماری‌های خونی را نیز به دلیل مشکلات موجود در ویروس‌زدایی افزایش می‌دهد. با توجه به نقش فاکتور VII در آبشار انعقادی و مسیر خارجی انعقاد می‌توان آن را به عنوان یک فاکتور جایگزین در بیماران هموفیل که فاقد فاکتورهای انعقادی VIII و IX با کارکرد صحیح در مسیر داخلی آبشار هستند، به صورت دارو مورد استفاده قرارداد. در حال حاضر، فناوری تولید rFVIIa تنها در اختیار شرکت NOVO SEVEN بوده و سالانه دولت را متحمل هزینه‌های سنگین برای واردات این محصول می‌کند (۴-۱).

فاکتور VII انسانی یک پروتئین ۵۰ کیلودالتونی با تغییرات پس از ترجمه فراوان، خاص سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به گلیکوزیلاسیون، تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و گاما‌کرَبوکسیلاسیون اشاره کرد (۶، ۵). علاوه بر کاربردهای فاکتور VII در هموفیلی و سایر بیماری‌های انعقادی، اطلاعات موجود از چندین مورد گزارش و تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که فاکتور VII نوترکیب می‌تواند به عنوان یک عامل هموستاتیک ارزشمند در خونریزی‌های غیرهموفیلیک نیز در نظر گرفته شود (۷-۹). لذا در تحقیق حاضر، کلونینگ و بیان

فاکتور FVII نوترکیب در سیستم بیانی باکولوویروس با استفاده از فناوری‌های Gateway و TOPO Cloning به دلیل سرعت و بازدهی بسیار بالا در تولید پروتئین نوترکیب، به عنوان هدف اساسی مدنظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی به منظور جداسازی cDNA فاکتور VII، RNA کل رده سلولی HepG₂ با استفاده از کیت استخراج RNA (RNX- سیناژن) تهیه گردید. سپس با کمک RT-PCR از RNA به دست آمده در مرحله قبل cDNA کل سنتز شد. برای این منظور از کیت cDNA synthesis (invitrogen) استفاده و طبق پروتکل عمل گردید.

با استفاده از توالی CDS واریانت ۲ فاکتور VII در بانک ژن، پرایمرهای اختصاصی طراحی و ژن مورد نظر جدا شد. پس از جداسازی cDNA فاکتور VII به منظور انجام واکنش TOPO کلونینگ چهار نوکلئوتید CACC با طراحی پرایمر forward جدید و انجام مجدد PCR، به انتهای ۵ ژن افزوده شد. از تکنیک TOPO کلونینگ و کیت pENTR Directional TOPO Cloning (invitrogen) به منظور کلونینگ ژن فاکتور VII در ناقل pENTR/D-TOPO استفاده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، واکنش تکمیل و سازه نوترکیب آماده انتقال به میزبان پروکاریوتی گردید.

جهت تهیه باکتری مستعد به روش CaCl₂ سرد عمل گردید. سازه نوترکیب به باکتری مستعد E.coli شوش TOP10 انتقال و باکتری در پلیت LB آگار حاوی کانامایسین، به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

پس از استخراج ناقل نوترکیب از کلونی‌های رشد یافته و آنالیزهای مربوطه، از آن برای انجام واکنش نوترکیبی با ناقل بیانی باکولوویروسی در فناوری Gateway استفاده شد. برای این منظور از کیت Baculovirus Expression System (invitrogen) استفاده

استفاده شد. غشای مورد استفاده (Roche-آلمان) PVDF بود. پس از انتقال باندهای پروتئینی، غشاء به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی FVII انسانی و سپس با آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشو، سوبسترای آنزیم فوق 3,3'- Diaminobenzidine tetrahydrochloride برای انجام واکنش رنگی به غشاء افزوده شد. پس از ظهور باند مورد نظر، غشاء با آب معمولی شستشو داده شد.

نتایج الایزا به صورت تکرار سه تایی (میانگین \pm انحراف معیار) ارائه گردید. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری تی‌استیودنت مورد مطالعه قرار گرفت و مقدار $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جداسازی cDNA فاکتور VII: پس از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی فاکتور VII و توپوشارژ شده (حاوی تترانوکلئوتید CACC) محصول برای آنالیز، بر روی ژل ۲ درصد الکتروفورز شد. ایجاد باند تقریباً ۱/۳ Kb بیانگر فاکتور VII بود که با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژن با واریانت ۲ این ژن (NM_019616) مطابقت داشت (شکل ۱).

واکنش TOPO Cloning: در پایان واکنش

کلونینگ و رشد کلونی‌های نوترکیب لازم بود تا صحت آن بررسی گردد. در تست PCR با پرایمرهای فاکتور VII نتیجه تشکیل باند ۱/۳ Kb بود (شکل ۲). همچنین با پرایمر M13 از ۵ کلونی رشد یافته نیز آنالیز به عمل آمد. ایجاد باند تقریباً ۱/۵ Kb مؤید حضور فاکتور VII در ساختار ناقل نوترکیب بود. در پایان برای تأیید نهایی، ناقل توالی‌یابی شد که حضور ژن FVII را در ساختار ناقل pENTR/D-TOPO اثبات کرد.

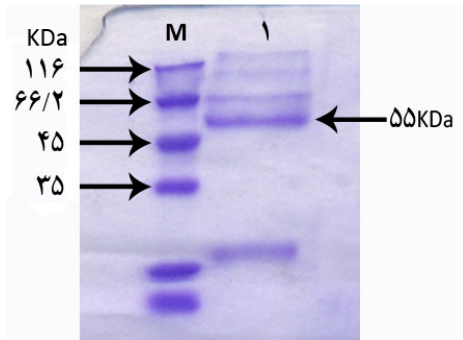
واکنش LR نوترکیبی و ترآلودگی: نتیجه مثبت آنالیز PCR واکنش نوترکیبی حاکی از انجام صحیح آن بود. ویروس نوترکیب به میزبان حشره، ترآلوده شد.

شد و مراحل نوترکیبی طبق پروتکل انجام گرفت. پس از انجام نوترکیبی نتیجه با PCR آنالیزگردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مرحله شامل پرایمر forward پلی هدرین از ویروس و reverse فاکتور VII بودند. ویروس نوترکیب حاوی FVII، به کمک معرف Cellfectin و طبق دستورالعمل کیت به میزبان حشره (Sf9) ترآلوده شد (۱۰،۱۱). غربالگری ویروس‌های نوترکیب به کمک ترکیب Ganciclovir انجام گرفت. ترآلودگی سه مرتبه تکرار شد و از استوک ویروسی P3 به منظور بیان پروتئین ۱۰ میکرولیتر به کشت سلولی حاوی 8×10^6 سلول Sf9 افزوده شد. در روزهای سوم، پنجم، هفتم و نهم جهت بررسی بیان، از محیط کشت نمونه‌برداری گردید.

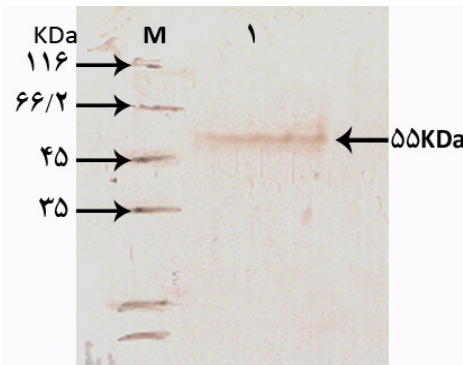
آنالیز بیان پروتئین به کمک الایزا و با استفاده از کیت Asserachrom VII:Ag (دیاگنوستیکا- فرانسه) به صورت تکرار سه‌تایی برای هر نمونه انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گرفته شده در روزهای مختلف پس از آلودگی جهت بررسی به چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌بادی اولیه FVII افزوده و سایر مراحل طبق پروتکل انجام شد. در نهایت جذب در ۴۹۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر تعیین گردید. از معرف حاوی FVII کیت و محیط کشت سلولی سالم به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

برای حذف پس‌زمینه‌های حاصل از پروتئین‌های FBS در مراحل بعدی آنالیز، از تکنیک ایمونوسوب و آنتی‌بادی فاکتور VII انسانی (R&D - آمریکا) جدا شده از Goat IgG) و گلوله‌های سفاروزی متصل به پروتئین G استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل از مرحله قبل برای آنالیز SDS-PAGE مورد استفاده قرارگرفت. ژل مورد استفاده برای فاز جداکننده ۱۲ درصد و فاز متراکم-کننده ۵ درصد در نظرگرفته شد و طبق دستورالعمل دستگاه (PeQLab- کره جنوبی) تهیه گردید. پس از بارگزاری نمونه و مارکر در ژل، الکتروفورز اجرا گردید.

از ژل به دست آمده طی مرحله قبل برای آنالیز وسترن نیز



شکل ۳: آنالیز SDS-PAGE از نمونه محیط کشت آورده در روز هفتم (ستون ۱). (M= مارکر پروتئینی)



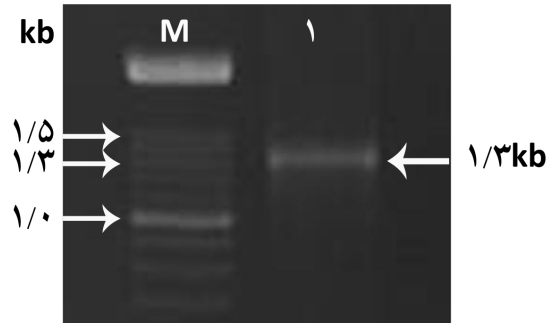
شکل ۴: آنالیز وسترن بلات FVII (ستون ۱) (M= مارکر پروتئینی)

استفاده دارای برجسب هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا به وزن مولکولی FVII ۵ KDa افزوده می‌شود (شکل ۳). برای بررسی دقیق‌تر، ژل به دست آمده از آنالیز SDS-PAGE برای وسترن بلائینگ نیز مورد استفاده قرار گرفت. در طی واکنش سوبسترا با آنزیم متصل به آنتی‌بادی فاکتور VII باند ۵۵ KDa بر روی غشاء نیز به دست آمد (شکل ۴).

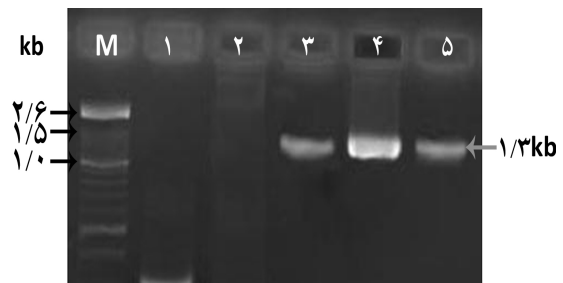
بحث

با توجه به غلظت کم فاکتورهای انعقادی در خون و احتمال سرایت بیماری‌های خونی به دلیل مشکلات موجود در آلودگی‌زدایی، امروزه تولید نوترکیب فاکتورهای مذکور مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. یافتن راهی برای بیان در سطح بالا همراه با عملکرد صحیح این فاکتور می‌تواند راه حل اساسی در درمان هموفیلی با هزینه بسیار کمتر از گذشته باشد. نتایج

یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی β -Gal پلاک‌های ویروسی بیانگر انجام نوترکیبی و ترآلودگی با بازدهی بیش از ۹۵ درصد بودند.



کل رده سلولی cDNA از شکل VII: ۱: جداسازی ژن فاکتور HepG₂. M= شاخص وزن مولکولی (100bp)



شکل ۲: نتیجه PCR از کلونی رشد کرده در محیط کشت انتخابی با پرایمرهای FVII. (M= شاخص وزن مولکولی 100bp)

آنالیزهایی که برای بیان پروتئین نوترکیب از نمونه برداشت شده از محیط کشت سلولی به عمل آمد، همگی نشان‌دهنده بیان فاکتور VII توسط این سیستم بیانی بودند. از نمونه‌های محیط کشت آورده در طی روزهای سوم، پنجم، هفتم و نهم تست الایزا به صورت تکرار سه تایی انجام شد که نتایج زیر به دست آمد: جذب در نمونه کنترل مثبت $2/105 \pm 0/113$ ، نمونه روز سوم آلودگی $1/591 \pm 0/186$ ، نمونه روز پنجم $1/952 \pm 0/129$ ، نمونه روز هفتم $1/960 \pm 0/076$ ، نمونه روز نهم $1/785 \pm 0/085$ و جذب در نمونه کنترل منفی $0/050 \pm 0/010$ ، در مقایسه با کنترل منفی، نمونه‌های روزهای سوم، پنجم، هفتم و نهم تفاوت معناداری را نشان دادند ($P < 0/001$).

از نمونه روز هفتم آنالیز SDS-PAGE انجام شد. نتیجه حاصل وجود باند ۵۵ KDa بود که می‌توانست مؤید فاکتور VII باشد. با توجه به این که ناقل بیانی مورد

نیز ثبت گردید (EU557239).

در غربالگری ویروس‌های نوترکیب از ترکیب Ganciclovir استفاده شد که یک آنالوگ بازی است و تنها در صورت فسفریله شدن توسط ژن تیمیدین کیناز ویروس‌های غیرنوترکیب، فعال و مانع از ادامه همانندسازی DNA می‌شود. بدین ترتیب انجام فرآیند آزمون پلاک به منظور جداسازی پلاک‌های نوترکیب ویروسی، غیرضروری و با حذف آنتی‌بیوتیک در مرحله غربالگری اثرات زیانبار آن بر کشت سلول‌ها نیز منتفی گردید.

در حال حاضر درمورد فاکتور VIIa انسانی و تولید نوترکیب آن، مطالعات قابل توجهی وجود ندارد و یک شرکت دانمارکی به نام NOVO SEVEN تنها تولیدکننده این فاکتور به صورت نوترکیب و گسترده از طریق بیان آن در سلول‌های بافت کلیه همستر نوزاد (baby hamster kidney cell line) است (۲).

در مطالعه انجام شده توسط رودکنار و همکاران، پس از ترآلودگی همزمان ژن فاکتور VII و Hepsin به سلول‌های CHO، فاکتور VII فعال تولید گردید. در این مطالعه از ناقل pCDNA3.1 و میزبان پستاندار استفاده شد و غلظت نهایی پروتئین نوترکیب 200 ng/ml تعیین شد (۱۲).

همچنین سی‌تارام همکاران، از کتابخانه cDNA کبد Rat برای بیان فاکتور VII در رده سلولی HEK293 استفاده کردند (۱۳) و در مطالعه انجام شده توسط رویز و همکاران، cDNA کدکننده فاکتور VII خرگوش از فاژ لامبدا gt11 تخلیص و برای کلونینگ از آنزیم‌های تحدیدی و ناقل pCMV استفاده شده است. ژن مذکور پس از کلونینگ در ناقل pCMV در سلول‌های HEK293 بیان گردید و در نهایت پروتئین نوترکیب به کمک تکنیک رسوب باریوم سترات تخلیص و غلظت پروتئین به دست آمده در مدت یک هفته $10 - 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد (۱۴). در پایان، می‌توان گفت که سیستم بیانی

به دست آمده در SDS-PAGE و تست الایزا و مقایسه آن‌ها با یافته‌های تحقیقات مشابه در زمینه تولید فاکتور VII نوترکیب انسانی در پستانداران، به روشنی بیانگر این واقعیت می‌باشد که در این تحقیق بخشی از این راه یعنی بیان در سطح بالای پروتئین با موفقیت پیموده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در SDS-PAGE و الایزا، پروتئین تولید شده توسط سیستم را $30 \text{ } \mu\text{g/ml}$ می‌توان برآورد کرد. این در حالی است که غلظت مذکور تنها از کشت تعداد 8×10^6 سلول و در مدت یک هفته به دست آمد. همچنین با طراحی برجسب هیستیدینی در انتهای آمین، امکان تخلیص پروتئین نوترکیب نیز فراهم شد.

بررسی‌های به عمل آمده با الایزا نشان می‌دهند که بیشترین سطح بیان پروتئین در روز هفتم پس از آلودگی صورت می‌پذیرد و در روزهای بعد به دلیل لیز شدن سلول‌های میزبان و در نتیجه توقف روند بیان و همچنین با رها شدن پروتئین‌های سلولی به مرور از میزان پروتئین به دست آمده کاسته می‌شود. از آن جا که کبد یک بافت فعال در تولید فاکتور VII شناخته شده است، لذا در این تحقیق رده سلولی HepG₂ به عنوان منبعی جهت استخراج mRNA ژن مورد مطالعه برگزیده شد. رده سلولی مذکور از بافت سرطانی کبد (Hepatocellular carcinoma) منشأ می‌گیرد و در دسترس بودن و سهولت کشت از جمله نکات مثبت آن می‌باشد. همچنین از آنزیم pfu پلیمر از جهت تکثیر ژن فاکتور VII استفاده شد تا با توجه به امکان ویرایش فرآیند (proofreading) توسط آنزیم مذکور، صحت توالی پروتئین نیز تا حد زیادی تضمین گردد.

به منظور انجام کلونینگ کارآمد و سریع، تکنیک جدید TOPO cloning در نظر گرفته شد و با توجه به حضور توالی تک رشته‌ای (Overhang) در ساختار ناقل پلاسمیدی pENTR/D-TOPO، ناقل مذکور برای کلونینگ ژن فاکتور VII برگزیده شد. در نهایت ژن کلون شده FVII پس از توالی یابی و تأیید نهایی در بانک ژن

سلولی مشتق شده از پستانداران قرار دارند، از این رو می-توانند همراه با باکولوویروس به عنوان یک سیستم کارآمد در بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی مورد استفاده قرار گیرند.

باکولوویروس و میزبان حشره با بهره‌مندی از پروموتر قوی پلی هدرین ویروسی در بیان پروتئین نوترکیب قادر به تولید آن تا ۵۰ درصد از کل محتوای پروتئینی محیط کشت است و از آنجا که حشرات در انجام تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های انسانی در مقام دوم پس از رده‌های

References

1. Bray G, Gomperts ED, Courter S, Gruppo R, Gordon EM, et al. A multicenter study of recombinant factor VIII: safety, efficacy and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. *Blood*. 1994; 83: 2428-35.
2. NovoSeven. recombinant factor VIIa. Novo Nordisk's EU Package Insert. 2008.
3. Shapiro AD, Gilchrist GS, Hoots WK, Cooper HA, Gastineau DA. Prospective randomized trial of two doses of r-FVIIa in Hemophilia patients with inhibitors undergoing surgery. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 773-78.
4. Roberts H. Safety of treatment with NovoSeven. *Blood Line Reviews*. 2001;1:18-9.
5. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3355-62.
6. Furie B, Furie BC: Molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 1988; 53:505-18.
7. Maick BG. Treatment of factor VII inhibitors: products and strategies. *Semin Thromb Hemost*. 1993; 19: 13-24.
8. Nillson IM, Berntop E, Freiburghas C. Treatment of patients with Factor VII and IX inhibitors. *Thromb Haemost*. 1993; 70: 56-9.
9. Hay CR, Lozier JN, Lee CA, Lafan M, Tradati H, Santagostino E, et al. Porcine factor VIII therapy in patients with congenital hemophilia and inhibitors: efficacy, patient selection, and side effects. *Semin Hematol*. 1994;31(2 Suppl 4): 20-5.
10. Shao-Hua C, Hong-Liang S, Zuo-Hu L. Effect of temperature oscillation on insect cell growth and baculovirus replication. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(6): 2237-9.
11. Lynn Dwight E. Methods for Maintaining Insect Cell Cultures. *Journal of Insect Science*. 2002; 2(9): 1-6.
12. Roudkenar HM, Halabian R, Edalati FM. Establishment a cell line expressing recombinant factor VIIa by genetic engineering methods Iranian Genetics Congress; 2008; Tehran, Iranian Genetics Society; 2008.
13. Seetharam S, Murphy K, Atkins C, Feuerstein G. Cloning and expression of rat coagulation factor VII. *Thromb Res*. 2003;109(4): 225-31.
14. Ruiz SM, Sridhara S, Blajchman MA, Clarke BJ. Expression and purification of recombinant rabbit factor VII. *Thromb Res*. 2000; 98(2): 203-11.