Original Article

Creation of Tenecteplase-Producing CHO Cell Line Using Site-Specific Integrase from the Phage φC31

Kianoush Dormiani, Pharm.D.[1, 2], Yahya Khazaie, Pharm.D.[1], Mahboobeh Forouzanfar, B.Sc.[1], Kamran Ghaedi, Ph.D.[1, 3]*, Mohammad Reza Mofid, Ph.D.[4], Khadijeh Karbalaie, M.Sc.[5], Fereshteh Karamali, M.Sc.[5], Michele P. Calos, Ph.D.[6], Mohammad Hossain Nasr Esfahani, Ph.D.[1]*

1. Molecular Biotechnology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Pharmaceutical Biotechnology Department, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Biology Department, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Biochemistry Department, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5. Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
6. Genetics Department, Stanford University, School of Medicine, Stanford, California, USA

** Corresponding Addresses: P.O.Box: 19395-4644, Molecular Biotechnology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran*
Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 2/Sep/2009, Accepted: 23/Feb/2010

Abstract

Objective: The aim of this study was to produce a stable CHO cell line expressing tenecteplase.

Materials and Methods: In the first step, the tenecteplase coding sequence was cloned in a pDB2 vector containing attB recognition sites for the phage φC31 integrase. Then, using lipofection, the CHO cells were co-transfected with constructed recombinant plasmid encoding tenecteplase and attB recognition sites and the integrase coding sequence containing pCMV-Int plasmid. As the recombinant plasmid contained the neomycin resistance gene (neo), stable cells were then selected using G418 as an antibiotic. Stable transformed cells were assessed using genomic PCR and RT-PCR. Finally, the functionality of tenecteplase was evaluated on the cell culture media.

Results: our results indicated that tenecteplase coding sequence was inserted into the CHO cell genome and was successfully expressed. Moreover, tenecteplase activity assessment indicated the presence of our functional tenecteplase in the cell culture medium.

Conclusion: Considering the data obtained from this study, φC31 integrase can be used for the production of a stable cell line and it be used to introduce ectopic genes into mammalian cells.

Keywords: Tenecteplase, Integrase, Pubmed, CHO

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 207-214

Archive of SID

www.SID.ir

تولید رده سلولی CHO مولد Tenecteplase با استفاده از اینتگراز اختصاصی فاژ φC31

کیانوش درمیانی .Pharm.D[۲،۱]، یحیی خزائی .Pharm.D[۱]، محبوبه فروزانفر .B.Sc[۱]، کامران قائدی .Ph.D[۳،۱*]، محمد رضا مفید .Ph.D[۴]، خدیجه کربلایی .M.Sc[۵]، فرشته کرمعلی .M.Sc[۵]، میشله کالوس .Ph.D[۶]، محمد حسین نصر اصفهانی .Ph.D[۱*]

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه بیوتکنولوژی مولکولی، اصفهان، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، اصفهان ، ایران
۳. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان ، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوشیمی، اصفهان ، ایران
۵. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، اصفهان، ایران
۶. دانشگاه استانفورد، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک، استانفورد، آمریکا

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، اصفهان، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی
پست الکترونیک: **Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org**
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۸/۶/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۴

چکیده

* **هدف:** تولید پایدار پروتئین Tenecteplase توسط رده سلولی CHO

* **مواد و روش‌ها:** توالی کدکننده Tenecteplase - که قبلا تهیه شده است - در یک حامل بیانی به نام pDB2 دارای توالی قابل شناسایی توسط آنزیم اینتگراز فاژ φC31 موسوم به attB کلون گردید. این حامل نوترکیب به همراه یک پلاسمید کدکننده اینتگراز φC31 به نام pCMV-Int به طور هم‌زمان طی یک فرایند لیپوفکشن به یک رده سلولی CHO منتقل گردید. با توجه به ساختار پلاسمید pDB2 که دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین (Neo^r) می‌باشد، سلول‌ها با آنتی‌بیوتیک G418 غربالگری گردیدند تا رده‌های سلولی نوترکیب به دست آید. سپس نوترکیب بودن رده‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا الحاق پایدار توالی کدکننده Tenecteplase ژنوم میزبان با آزمون PCR ژنومی و بیان پروتئین با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت آزمون بررسی فعالیت Tenecteplase نوترکیب ترشح شده در محیط کشت سلولی مورد نظر انجام گردید.

* **یافته‌ها:** آزمون PCR ژنومی الحاق قطعه مورد نظر را به ژنوم میزبان نشان داد و همین طور آزمون RT-PCR بیان پروتئین Tenecteplase را ثابت نمود. آزمون بررسی فعالیت وجود مقادیر قابل توجه پروتئین را در محیط کشت نشان داد.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به دست آوردن رده پایدار مولد پروتئین نوترکیب Tenecteplase می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سامانه اینتگراز فاژ φC31 می‌تواند به صورت هدفمند، یک قطعه DNA خارجی را در مکان‌های مشخصی از ژنوم سلول میزبان الحاق نماید و بنابراین جهت تهیه رده‌های نوترکیب سلول‌های پستانداران می‌تواند بسیار مناسب باشد.

* **کلیدواژگان:** Tenecteplase، اینتگراز، CHO

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۱۴-۲۰۷

مقدمه

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) یک آنزیم دارای چندین دامنه (Domain) از خانواده سرین پروتئازها می‌باشد که نقش فیزیولوژیک آن تبدیل پلاسمینوژن به شکل فعال آن یعنی پلاسمین است (۱). این آنزیم جهت آغاز یا تسهیل فرایند انحلال لخته (فیبرینولیز) ضروری است. با توجه به این ویژگی، t-PA به عنوان یک دارو در کلینیک در درمان نارسایی‌های ترومبوتیک حاد مثل انفارکتوس میوکارد مورد استفاده قرار گرفته است (۴-۲).

موتاسیون‌های هدفمند زیادی بر روی مولکول فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انجام شده است که هدف از آن، افزایش درجه اختصاصی بودن آن نسبت به فیبرین و همچنین بهبود خصوصیات فارماکوکینتیک آن بوده است. از میان تمام مطالعات انجام شده، یک مولکول به نام Tenecteplase دارای ویژگی‌های برتری نسبت به مولکول t-PA بوده است که فراورده دارویی حاصل از آن به بازار راه پیدا نمود. در مولکول Tenecteplase موتاسیون بر ر وی دامنه پروتئازی با جانشین کردن چهار آلانین به جای اسیدآمینه های ۲۹۶ تا ۲۹۹ ایجاد گردید که باعث شد درجه اختصاصی بودن نسبت به فیبرین افزایش یابد. همچنین ترئونین ۱۰۳ با آسپاراژین جایگزین شد تا پروتئین در خون از کلیرانس آهسته‌تر و در نتیجه از نیمه عمر طولانی‌تری برخوردار گردد. موتاسیون آخر در موقعیت اسیدآمینه ۱۱۷ انجام گرفت که در آن گلوتامین به جای آسپاراژین جایگزین گردید. این موتاسیون، کاهش فعالیت فیبرینولیتیک ایجاد شده توسط

Archive of SID
www.SID.ir

دو موتاسیون قبلی را جبران نمود (۵).

در این مطالعه توالی کدکننده Tenecteplase – که قبلا تهیه شده بود – با استفاده از سامانه اینتگراز فاژ φC31 به ژنوم رده سلولی CHO الحاق گردید. اینتگراز φC31 – که یک سرین رکامبیناز است – توسط باکتریو فاژ استرپتومایسس موجود در خاک کد می‌گردد (۶، ۷). این اینتگراز قادر است توالی‌های مشخصی موسوم به جایگاه‌های att با طولی حدود ۳۰ جفت باز را شناسایی و الحاق را در جایگاه‌های یاد شده انجام دهد. این اینتگراز، att فاژ (موسوم به attP) را شناسایی نموده و آن را به طور اختصاصی به جایگاه att در ژنوم باکتری استرپتومایسس (با نام attB) الحاق می‌کند. این دو توالی با یکدیگر متفاوتند و تنها در ۵۰ درصد ردیف نوکلئوتیدی خود شبیه هستند. بعد از پایان واکنش، هیبریدهای ایجاد شده در طرفین قطعه الحاق شده (موسوم به attL و attR) توسط آنزیم، قابل برش نیستند. بنابراین در این واکنش، الحاق یک طرفه و پایدار است (۸). این اینتگراز می‌تواند جایگاه‌هایی شبیه به att در ژنوم سایر موجودات مثل پستانداران را شناسایی نماید. از آنجایی که این جایگاه‌ها att کاذب (Pseudo att site) نام گرفتند، کارا بودن این سامانه در رده‌های سلولی پستانداران نیز مورد آزمون و تایید قرار گرفت. بنا براین جهت استفاده از این آنزیم، باید توالی attB مورد شناسایی اینتگراز φC31 را در یک پلاسمید در کنار توالی DNA مورد نظر قرار داده و این پلاسمید را به همراه پلاسمید دیگری – که بیان کننده آنزیم اینتگراز φC31 تحت عملکرد یک پروموتر یوکاریوتی باشد – به صورت هم‌زمان به درون سلول‌های رده مورد نظر انتقال داد (Co-Transfection). وقتی در داخل سلول اینتگراز بیان شود، می‌تواند جایگاه‌های شبه attP (pseudo attP) را در ژنوم میزبان شناسایی نموده و پلاسمید حاوی توالی کلون شده را در محل توالی attB بریده و به جایگاه pseudo attP الحاق نماید (۹).

ابتدا در این مطالعه توالی کدکننده Tenecteplase در پلاسمیدی موسوم به pDB2 دارای توالی attB کلون گردید. سپس این پلاسمید که در عین حال دارای توالی ایجاد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک G418 نیز می‌باشد، به همراه پلاسمید دیگری – که بیان کننده اینتگراز φC31 است – به صورت توامان در سلول‌های CHO با روش لیپوفکشن ترانسفکت شد. غربال‌گری سلول‌های ترانسفکت شده بر مبنای مقاومت به آنتی‌بیوتیک انجام و سایر بررسی‌ها بر روی رده‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase در حامل از نوع T

از قبل توالی کدکننده Tenecteplase طی چندین مرحله واکنش‌های ایجاد موتاسیون هدفمند با روش Site Directed Mutations by Means of Mutagenic Mega-Primers در پژوهشکده رویان ساخته شد (۱۰) و صحت توالی آن مورد تایید قرار گرفت. سپس در یک حامل از نوع T تحت عنوان pTZ57R (Fermentas) طی فرایند T/A کلونینگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده کلون گردید. از این حامل به عنوان الگو برای تکثیر توالی کدکننده Tenecteplase با واکنش PCR استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

Forward primer: 5'cgaggctagcatggatgcaatgaagagagggc 3'

Reverse primer: 5' ggcctcgagtcacggtcgcatgttgtcacg 3'

پرایمرهای این واکنش به گونه‌ای طراحی شدند که محل برش آنزیم محدود کننده *Xho*I را در پایین دست و محل برش آنزیم محدودکننده *Nhe*I را در بالا دست توالی محصول قرار دادند.

همچنین شرایط انجام PCR به شرح زیر بود: ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۴ درجه و متعاقب آن ۳۰ سیکل تکثیر (۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۲ دقیقه) و در پایان ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۷۲ درجه.

محصول PCR توسط کیت Qiagen (Germany) از روی ژل، استخراج و خالص‌سازی شد و طبق دستورالعمل مربوطه به کیت T/A Cloning (Fermentas) در حامل pTZ57R کلون گردید. واکنش الحاق با استفاده از کیت (Takara) DNA Ligation Kit انجام شد. محصول واکنش کلونینگ در باکتری *E.coli* پذیرا از نوع شیمیایی به نام One Shot (Invitrogen) Top10 ترانسفورم گردید. کلونی‌های صحیح با فرایند غربال‌گری سفید/آبی بر روی پلیت LB آگار انتخاب گردیدند و چند کلونی به صورت خالص تکثیر و پلاسمید آنها استخراج و جهت تعیین توالی ارسال گردید. پلاسمید نوترکیب تحت تیمار دوگانه با آنزیم‌های *Xho*I و *Nhe*I قرار گرفت که با برش این حامل نوترکیب، قطعه کدکننده Tenecteplase بریده شده بر روی ژل، مشاهده و از روی ژل با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) خالص‌سازی گردید.

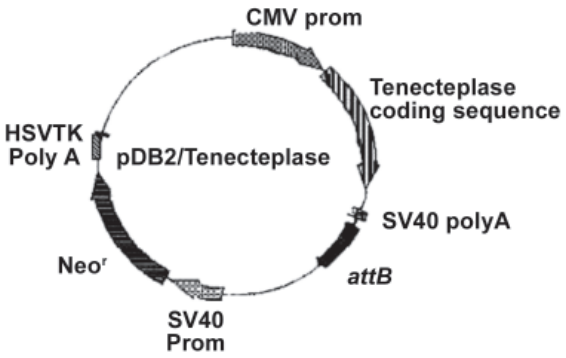
کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase در حامل بیانی pDB2

در این مطالعه پلاسمید pDB2 جهت کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید که از طرف پروفسور کالوس از دانشگاه استانفورد اهدا شده بود، حاوی یک محل برش برای هر یک از آنزیم‌های *Xho*I و *Nhe*I بوده است (۱۱). در ابتدا این پلاسمید با این دو آنزیم به طور هم‌زمان تیمار گردید. جایگاه برش هر دو آنزیم در پایین دست پروموتر سایتومگالوویروس (CMV) و در بالادست توالی attB موجود می‌باشد به گونه‌ای که قطعه الحاق شونده می‌تواند بین پروموتر و جایگاه attB قرار گیرد (شکل ۱).

پلاسمید بریده شده که دارای دو انتهای چسبناک بود، توسط کیت تخلیص از ژل از روی ژل استخراج و خالص‌سازی گردید. سپس Tenecteplase خالص شده در مرحله قبل با انجام واکنش الحاق (Ligation) در پلاسمید pDB2 خالص شده کلون گردید. محصول واکنش الحاق در باکتری *E.coli* پذیرا ترانسفورم گردید سپس کلونی‌های صحیح با فرایند کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر توالی کامل Tenecteplase غربال‌گری شدند. چند کلونی باکتریایی صحیح، انتخاب و تکثیر شدند و پلاسمید نوترکیب pDB2/Tenecteplase جهت مطالعات بعدی توسط کیت QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) خالص‌سازی گردید.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: پلاسمید بیانی pDB2 که توالی کدکننده Tenecteplase که در پایین دست پروموتر CMV الحاق گردیده است.

کشت سلولی و لیپوفکشن سلول‌های CHO با پلاسمید نوترکیب

رده سلولی CHO از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌های CHO در محیط کشت Ham's F12 (Sigma) حاوی ۱۰درصد FCS (Gibco) در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵درصد کشت داده شد. پس از مفروش شدن کف فلاسک، سلول‌ها به کمک Trypsin/EDTA (Gibco) از کف پلیت جدا شده و پس از شمارش سلولی، تعداد $۱/۶\times۱۰^۴$ سلول در چند خانه پلیت ۲۴ خانه که از قبل لامل‌گذاری شده بودند، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد کف دیش را پر کردند، جهت آزمایش ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش از دو پلاسمید pDB2/Tenecteplase و pCMV-Int حاوی cDNA کدکننده آنزیم اینتگراز (دانشگاه استانفورد) استفاده گردید. جهت انجام ترانسفکشن ابتدا ۵۰ میکرولیتر محیط کشت Opti-MEM I (Gibco) حاوی ۰/۴ میکروگرم پلاسمید pDB2/Tenect-eplase (محلول پلاسمید) به همراه ۴۰۰ میکروگرم پلاسمید pCMV-Int و ۵۰ میکرولیتر محلول Opti-MEM I حاوی ۲۰۰۰میکرولیتر Lipofectamine(Invitrogen) تهیه گردید. پس از انکوباسیون دو محلول در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، این دو محلول با یکدیگر مخلوط شدند (محلول ترانسفکشن) و این محلول به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محیط کشت سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها به آرامی با استفاده از محیط کشت Opti-MEM I فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک شست‌وشو داده شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محیط Opti-MEM I به هر خانه اضافه شدو در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محلول ترانسفکشن به آرامی به هر خانه اضافه گردید. سلول‌های مذکور به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵درصد رطوبت و ۵درصد CO_2 کشت داده شدند. پس از آن محیط ترانسفکشن حذف و محیط کشت Ham'sF12 حاوی ۱۰درصد FCS به هرخانه اضافه و سلول‌ها برای ادامه کشت به انکوباتور منتقل گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکت شده با Trypsin/EDTA تیمارگردیده و از کف پلیت جدا گردیدند و پس از شست‌وشو و شمارش، تعداد ۵۰۰۰ عدد سلول به یک پتری‌دیش ۱۰ میلی‌لیتری (Falcon, USA) منتقل شدند. جهت غربال‌گری و به دست آوردن سلول‌های پایدار آنتی‌بیوتیک G418 (Sigma) با غلظت نهایی ۶۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌های مذکور افزوده شد. در نهایت پس از ۱۱ روز، ۱۲ کلونی سلولی مقاوم انتخاب و جدا شدند (Colony Pick Up) و هر کدام به یک چاهک از پلیت ۱۲ خانه منتقل گردیدند. پس از حدود ۷ روز که سلول‌های هر چاهک تکثیر شده و به تراکم نزدیک به ۱۰۰ درصد رسیدند، سلول‌های هرچاهک پاساژ داده شد تا آزمون‌های بعدی روی آنها انجام گیرد.

تایید کلونی‌های ترانسفکت شده پایدار از نظر دارا بودن توالی بیان کننده Tenecteplase

جهت بررسی کلونی‌های رشد یافته در حضور آنتی بیوتیک از دو آزمایش جداگانه بهره گرفته شد:

۱. PCR ژنومی: از فلاسک مفروش به سلول‌های غربال‌گری شده، سلول‌ها با تیمار به وسیله تریپسین جدا شده و پس از شست‌وشو، ژنوم حدود ۶×۱۰^۵ سلول توسط کیت (Qiagen) Dneasy® Blood & Tissue Kit استخراج گردید و با پرایمرهای مخصوص تکثیر Tenecteplase (با شرایط ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد که متعاقب آن ۳۵ سیکل تکثیر (۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه) و در پایان ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی پرایمرهای واکنش فوق به شکل زیر می‌باشد:

Forward primer: 5´ggcctcgagatggatgcaatgaagagagggct 3´

Reverse primer: 5´ggcctcgagtcacggtcgcatgttgtcacg 3´

۲. RT-PCR: ۲ میکروگرم RNA Total استخراج شده از ۲×۱۰^۶ سلول نوترکیب جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی با آنزیم DNase I به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار و از آن برای سنتز cDNA استفاده گردید. برای سنتز cDNA ازکیت و پرایمرهای تصادفی شش نوکلئوتیدی Random Hexamer (primer) شرکت Fermentas استفاده شد و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت فوق صورت گرفت. پس از آن واکنش PCR با ۵ میکرولیتر از cDNA سنتزشده، ۱۰ پیکومول پرایمرهای مربوطه و ۱/۲۵ واحد آنزیم پلیمراز *Smartaq* (Cinnagen) با برنامه دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام مرحله پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Thermal Cycler Eppendorf انجام شد. توالی پرایمرهای واکنش فوق عبارتند از:

Forward primer: 5´tgcaccaactggcagagcagcgcgttg 3´

Reverse primer: 5´gctctccgggcgaggcggcggcggcaaa-gatggca 3´

آزمون‌های مورد استفاده جهت بررسی پروتئین نوترکیب ترشح شده در محیط کشت

۱. مشاهده باند پروتئین بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید

جهت بررسی وجود پروتئین Tenecteplase در محیط کشت و اثبات ترشح این پروتئین، آزمون الکتروفورز عمودی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام شد. جهت این کار از ژلResolving ۱۲درصد استفاده گردید و نمونه‌ها (جدول ۲) بر روی ژل قرار داده شدند و در نهایت پس از انجام الکتروفورز، ژل مذکور با نیترات نقره

Archive of SID
www.SID.ir

رنگ‌آمیزی گردید.

۲. آزمون Western Blot

آزمون Western Blot با آنتی‌بادی اولیه از نوع Sheep IgG موسوم به TPA Tissue Plasminogen Activator Antibody [2A153] (ab21049) از شرکت Abcam با غلظت اولیه ۱۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. پس از انجام آزمون Dot blot و مشاهده نتیجه، تصمیم گرفته شد تا این آنتی‌بادی یک‌بار به نسبت ۱ به ۱۶۰۰۰ و یک‌بار به نسبت ۱ به ۲۵۶۰۰۰ رقیق شده و در آزمون Western Blot به کارگرفته شود. آنتی‌بادی ثانویه تحت عنوان Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobolins/HRP با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از شرکت DAKO با غلظت ۱ به ۵۰۰۰ در آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

۳. بررسی فعالیت Tenecteplase ترشح شده در محیط کشت

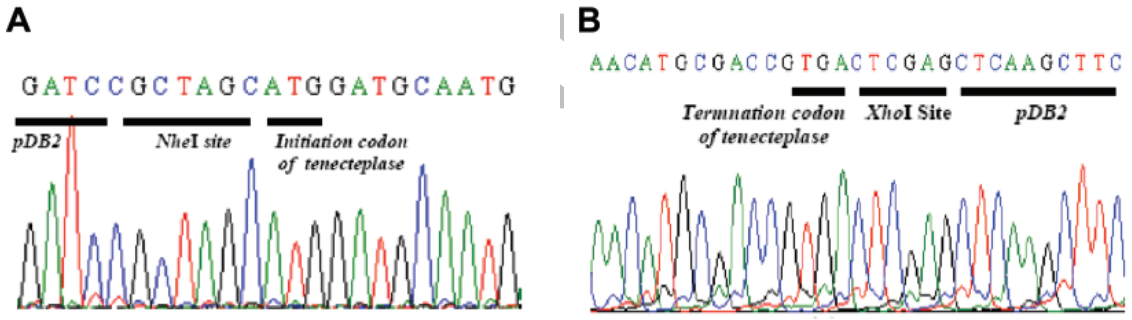
برای بررسی فعالیت پروتئین ترشح شده در محیط کشت، ازیک سوبسترا به نام H-D-Isoleucyl-L-propyl-L-arginine-p-ni-troaniline dehydrate با نام تجاری S-2288 (Chromogenix) استفاده گردید. این سوبسترا اگر در معرض یک آنزیم پروتئولیتیک قرار گیرد، هیدرولیز شده و پارانیتروآنیلین زرد رنگ آزاد می‌کند. میزان جذب نوری رنگ زرد حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر با میزان فعالیت آنزیم در محیط نسبت مستقیم دارد.

سوبسترا با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بر لیتر، بافر با ترکیب ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر تریس و ۱/۶ میلی‌مولار بر لیتر کلرید سدیم و محیط کشت رویی پلیت مفروش به سلول‌های نوترکیب با تراکم حدود ۹۰ درصد تهیه و با نسبت حجمی مساوی با یکدیگر به خوبی مخلوط شدند. از مخلوط فوق به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر به یک چاهک پلیت ۹۶ خانه مخصوص خوانش با دستگاه الایزا منتقل شد. عین همین مخلوط نیز با محیط کشت رویی پلیت مفروش به سلول‌های CHO غیر ترانسفکت با تراکم حدود ۹۰ درصد به عنوان کنترل منفی تهیه شده و ۱۰۰ ماکرولیتر به چاهک پلیت مذکور منتقل گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شده و سپس پلیت به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

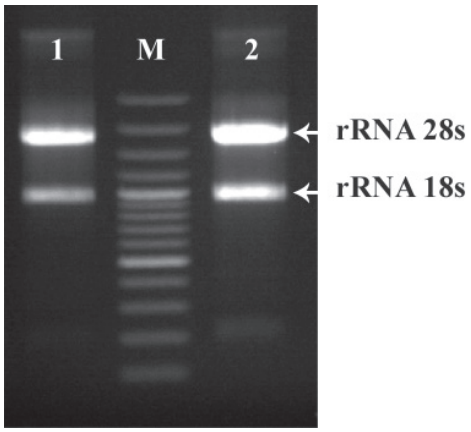
یافته ها

بررسی حامل نوترکیب pDB2 کدکننده Tenecteplase

به دنبال کلونینگ cDNA کدکننده Tenecteplase در داخل حامل بیانی pDB2 ترادف‌یابی این حامل نشان داد که توالی کدکننده Tenecteplase در جایگاه مورد انتظار و بدون هر گونه جهش ناخواسته وارد شده است (شکل ۲).



شکل ۲: جایگاه‌های الحاق توالی Tenecteplase در حامل pDB2
A, B) نمایش قطعاتی از ترادف‌های وکتور نوترکیب pDB2 که محل الحاق توالی کدکننده Tenecteplase را در حامل pDB2 نشان می‌دهد. در شکل محل برش *Nhe*I (gctagc) (شکل ۲A) قبل از کدون آغازین atg و همین‌طور *Nhe*I محل برش *Xho*I (ctcgag) (شکل ۲B) بعد از کدون خاتمه tga مشخص شده است.



شکل ۳: 1,2) RNA استخراج شده از سلول‌های CHO نوترکیب پس از ۵ پاساژ. پیکان در این شکل نشان دهنده باندهای RNA ریبوزومی 18S، 28S می‌باشد. M) نشانگر DNA. وجود این نشانگر جنبه مقایسه‌ای نداشته و تنها نمایانگر کیفیت بالای ژل مورد آزمایش است.

Archive of SID
www.SID.ir

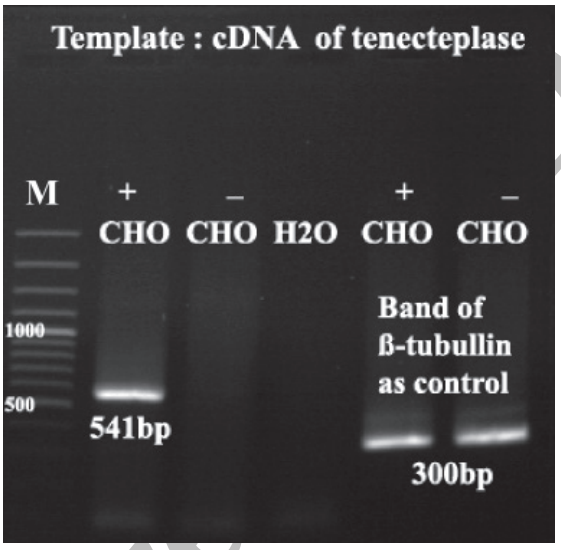
جدا نمودن Total RNA سلول و انجام آزمون RT-PCR

پس از استخراج total RNA از سلول‌های CHO نوترکیب توسط کیت، یک نمونه از آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید که نتیجه در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد. در این شکل باندهای RNA ریبوزومی 18S، 28S به وضوح دیده می‌شود و عدم وجود باندهای دیگر نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده می‌باشد (شکل ۳).

به دنبال تخلیص RNA، و سنتز RT-PCR، cDNA و تکثیر قسمتی از cDNA مربوط به Tenecteplase بیان آن در سلول‌های CHO نوترکیب به اثبات رسید (شکل ۴).

بررسی ژنومی سلول‌های CHO نوترکیب

به منظور اطمینان از ورود cDNA Tenecteplase به داخل ژنوم سلول‌های CHO ترانسفکت شده، PCR بر روی ژنوم سلول‌های ترانسفکت شده (CHO نوترکیب) و ترانسفکت نشده صورت گرفت که به وضوح تایید کننده آزمایشات قبلی بود (شکل ۵).



شکل ۴: باند با اندازه bp541 مربوط به بیان Tenecteplase cDNA را در سلول‌های CHO نوترکیب (CHO^+) نشان می‌دهد. PCR انجام شده بر روی CHO ترانسفکت نشده (CHO^-) به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه حاوی آب نیز به عنوان کنترل منفی جهت بررسی آلودگی احتمالی در PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱: نوع و مقدار نمونه‌های قرارداده شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در شکل ۶

شماره در تصویر	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
نام نمونه	نمونه پروتئین استخراج شده از حدود ۲×۱۰^{۶} عدد سلول نوترکیب	نمونه پروتئین استخراج شده از حدود ۲×۱۰^{۶} عدد سلول غیرنوترکیب	Ladder (Fermentas)	t-PA استاندارد ۴۰IU/ml	نمونه خالص شده با دستگاه FPLC از محیط کشت سلول نوترکیب	محیط کشت HAMS-F12 با FCS ۵درصد از سلول‌های نوترکیب	محیط کشت HAMS-F12 با FCS ۵درصد از سلول‌های غیرنوترکیب
مقدار قرارداده شده بر روی ژل	۱۰ میکرولیتر محتوی ۲۹/۵ میکروگرم پروتئین	۱۰ میکرولیتر محتوی ۲۹/۵ میکروگرم پروتئین	۲ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر

جدول ۲: میزان جذب نمونه‌های برداشت شده از محیط کشت CHO در ۴۰۵ نانومتر

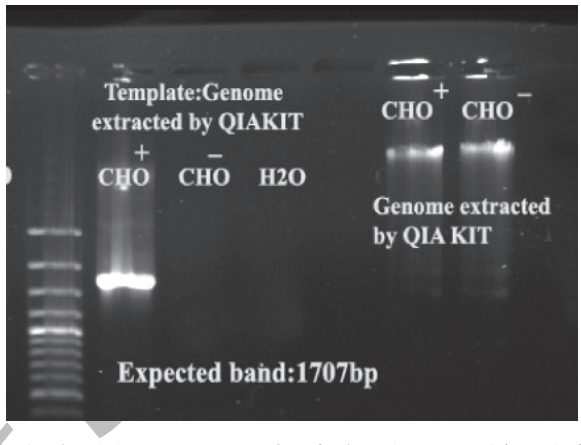
زمان اندازه‌گیری جذب	میزان جذب	
	محیط کشت CHO غیرنوترکیب	محیط کشت CHO نوترکیب
در زمان صفر	۰/۳۳۷	۰/۴۹۳
پس از یک ساعت	۰/۶۳۶	۲/۸۱۹
پس از دو ساعت	۰/۸۸	۳/۱۴۹

Archive of SID

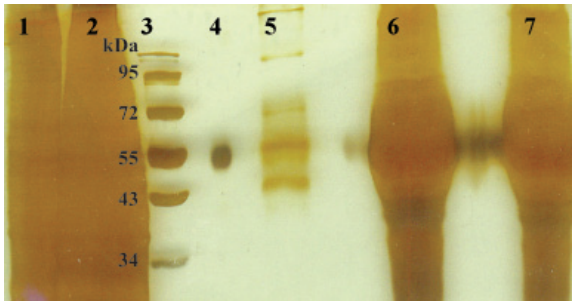
www.SID.ir

بررسی فعالیت آنزیم ترشح شده توسط سلول‌های CHO نوترکیب در محیط کشت

جهت بررسی و اثبات تولید و ترشح پروتئین Tenecteplase در محیط کشت، آزمون الکتروفورز عمودی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام گرفت و از ژل Resolving ۱۲درصد استفاده گردید (شکل ۶). جزئیات این الکتروفورز در جدول ۱ نشان داده شده است.



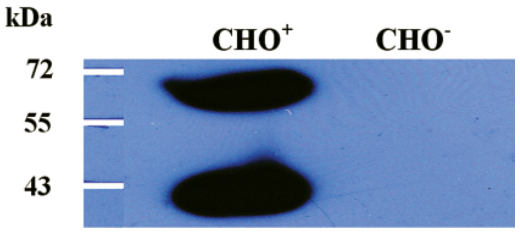
شکل ۵: نشان دهنده نتایج واکنش PCR بر روی ژنوم سلول ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده است. با توجه به مشاهده قطعه تکثیر شده با اندازه مورد نظر و عدم وجود آن در نمونه کنترل منفی، حاکی از الحاق این قطعه درون ژنوم سلول‌های CHO به صورت پایدار می‌باشد.



شکل ۶: ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی نمونه‌های مورد آزمایش (جدول ۱) رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره است. ستون 3 molecular size mark-er و ستون ۵ نشان دهنده نمونه خالص شده توسط FPLC است.

در ضمن با استفاده از آزمون Western Blot با آنتی‌بادی TPA Tissue Plasminogen Activator antibody و با توجه به اندازه پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب که در حدود ۶۲ تا ۶۵ کیلودالتون می‌باشد، اندازه باند مشاهده شده صحیح به نظر می‌رسد. با توجه اطلاعات موجود مبنی بر برش Tenecteplase در محیط کشت توسط پروتئازهای ترشح از سلول‌های CHO، قطعه بریده شده با اندازه حدود ۳۹ کیلودالتون که حاوی اپی توپ اختصاصی آنتی‌بادی اولیه می‌باشد نیز در تصویر مشاهده می‌گردد (شکل ۷).

فعالیت Tenecteplase مترشحه از سلول‌های CHO نوترکیب نیز بررسی گردید و همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، تفاوت جذب مربوط به محیط کشت سلول‌های CHO ترانسفکت نشده و ترانسفکت شده را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه این سوبسترا توسط هر سرین پروتئازی که در سرم وجود داشته باشد، هیدرولیز شده و در ۴۰۵ نانومتر جذب نشان می‌دهد در نتیجه در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده هم فعالیت قابل مشاهده می‌باشد. با این وجود در عمل سلول‌های ترانسفکت شده تفاوت جذب مشخصی را نشان می‌دهند.



شکل ۷: آزمون‌های Western Blot بر روی نمونه‌های محیط کشت حاوی سلول‌های CHO نوترکیب (CHO^+) و غیرنوترکیب (CHO^-) است.

بحث

پروتئین‌های نوترکیب در تحقیقات پایه، کاربردی و نیز درمان، کاربردهای متعددی دارند. تاکنون حامل‌های متعددی توسعه یافته‌اند تا بتوان پروتئین‌ها را در مقادیر زیاد تولید نمود. کارآمدترین حامل‌ها، آنهایی هستند که باعث بیان حداکثری پروتئین‌ها در باکتری‌ها می‌شوند؛ زیرا باکتری‌ها می‌توانند به راحتی و در کوتاه‌ترین زمان با بالاترین دانسیته سلولی تکثیر شوند. با این وجود نیاز به حداکثر بیان در سلول‌های یوکاریوتی نیز از اهمیت خاص خود برخوردار می‌باشد زیرا بسیاری از پروتئین‌ها باید به طرز صحیحی تاخوردگی یافته و تغییرات پس از ترجمه‌ای ویژه یوکاریوت‌ها را به دست آورند تا از نظر بیولوژیکی فعال باشند. برای حداکثر بیان پروتئین نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتی می‌توان از کاست‌های بیان ژن که در جایگاه‌های خاصی از ژنوم سلول‌های هدف الحاق می‌گردد، استفاده نمود تا بدین ترتیب امکان بیان پایدار و بلند مدت ژن مورد نظر را خواهد داشت. به همین منظور سامانه‌های الحاق هدفمند به ژنوم، بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (۱۱). در این تحقیق جهت الحاق حامل نوترکیب pDB2/Tenecteplase به ژنوم از آنزیم اینتگراز فاژ φC31 که یک رکامبیناز با جایگاه اثر اختصاصی می‌باشد و در سلول‌های پستانداران به شکل موثری عمل می‌نماید استفاده گردید. این اینتگراز می‌تواند حامل حاوی جایگاه attB را به شکل یک طرفه و برگشت‌ناپذیر در تعداد مشخصی از جایگاه‌های Pseudo attP موجود در ژنوم سلول میزبان الحاق نماید. باید توجه داشت که عملکرد اینتگراز در الحاق حامل مذکور در ژنوم نه تنها به وجود جایگاه‌های Pseudo attP بستگی دارد بلکه به ویژگی‌های کروماتین در محل الحاق نیز وابسته است به طوری که الحاق در جایگاه‌هایی در ژنوم صورت می‌پذیرد که کروماتین دارای یک کانفورماسیون باز باشد و ژنوم جهت الحاق در دسترس قرار دارد؛ یعنی در نواحی Euchromatin که برای بیان ژن از مزیت بیشتری نسبت به مناطق Heterochromatin برخوردار می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود بیان ژن مورد نظر در این حالت به میزان قابل توجه و به شکل مداوم صورت پذیرد (۱۲).

سال‌هاست که فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) در کلینیک به عنوان یک داروی مؤثر مورد استفاده قرار

Archive of SID
www.SID.ir

می‌گیرد. این آنزیم برای آغاز یا تسهیل فرایند انحلال لخته (فیبرینولیز) ضروری است. با توجه به تجربیات به دست آمده در مورد الحاق هدف‌مند با استفاده از سامانه اینتگراز فاژ φC31 تصمیم گرفته شد تا به کمک این سامانه توالی بیان کننده Tenecteplase به ژنوم سلول‌های CHO الحاق شود که این مساله برای اولین بار محقق گردید و رده‌های خالص به دست آمده از طریق غربال‌گری با آنتی‌بیوتیک، بیان قابل توجهی را در مقایسه با سلول ترانسفکت نشده نشان دادند. Tenecteplase یک داروی موثر در درمان نارسایی‌های انسداد عروق با منشای ترومبوتیک می‌باشد (۴-۲). ابتدا توالی کدکننده Tenecteplase تولید گردید و پس از تایید توالی قطعه کدکننده مذکور با کلون کردن آن در حامل بیانی pDB2، این حامل نوترکیب به همراه حامل pCMV-Int – که بیان کننده آنزیم اینتگراز می‌باشد – برای ترانسفکت کردن سلول‌های CHO مورد استفاده قرار گرفت. پس از انتخاب کلون‌های نوترکیب به کمک آنتی‌بیوتیک G418، میزان فعالیت کلون‌های مذکورمورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی محل دقیق الحاق سامانه اینتگراز فاژ φC31 به ژنوم با تعیین توالی ژنوم مشخص شود تا از نظر مولکولی نیز صحت عملکرد سامانه الحاق اینتگراز فاژ φC31 مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

سامانه اینتگراز فاژ φC31 جهت بیان Tenecteplase به شکل مداوم در سلول‌های CHO قابل استفاده می‌باشد که در مطالعه حاضر رده پایدار سلولی تولید کننده Tenecteplase برای اولین بار در ایران تهیه گردید.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های این مطالعه توسط پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

References

1. Patthy L, Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. Cell. 1985; 41(3): 657-663.
2.Collen D, Topol EJ, Tiefenbrunn AJ, Gold HK, Weisfeldt M L, Sobel BE, et al. Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. Circulation. 1984; 70: 1012-1017.
3. Bennett WF, Paoni NF, Keyt BA, Botstein D, Jones A, Presta L, et al. High resolution analysis of functional determinants on human tissue- type plasminogen activator. J. Biol. Chem. 1991; 266: 5191-5201.
4. Topol EJ, Califf RM, George BS, Kereiakes DJ, Lee KL.Insights derived from the thrombolysis and angioplasty in myocardial infarction (TAMI) trials. J Am Coll Cardiol. 1988; 12(6 Suppl A): 24A-31A.
5. Keyt BA, Paoni NF, Refino CJ, Berleau L, Nguyen H, Chow A, et al. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(9): 3670-3674.
6. Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP.Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. Mol Cell Biol. 2001; 21(12): 3926-3934.
7. Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(11): 5995-6000.
8. Calos MP. The phiC31 integrase system for gene therapy. Curr Gene Ther. 2006; 6(6): 633-645.
9.Hollis RP, Stoll1SM, Sclimenti1CR, Lin J, Chen-Tsai Y and Calos MP. Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1: 79.
10. Keravala A, Portlock JL, Nash JA, Vitrant DG, Robbins PD, Calos MP. PhiC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. J Gene Med. 2006; 8(8): 1008-1017.
11. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol. 2004; 22(11): 1393-1398.
12. Thyagarajan B, Calos MP. Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. In: Smales CM, James DC, (eds). Methods in Molecular Biology, Totowa: Humana Press Inc; 2005; 308.

Archive of SID
www.SID.ir