کومش- جلد ۱۳، شماره ۲ (پیاپی ۴۲)، زمستان ۱۳۹۰

ساب کلونینگ ژن زیرواحد آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی بخش پیشین غده هیپوفیز در یک وکتور بیانی سلول‌های پستان‌داران

محمدرضا اکبری‌عیدگاهی (Ph.D)، رضا نصر *(M.Sc)، علی‌اکبر شعبانی (Ph.D)، مجتبی قدمیاری (M.D)
دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: هورمون‌های گلیکوپروتئینی مترشحه از هیپوفیز قدامی شامل هورمون های گلیکوپروتئینی انسانی شامل هورمون محرک تیروئید، هورمون لوتئینیزه کننده، هومون محرک فولیکولی و گونادوتروپین کوریونی هستند که هر یک از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیرواحد آلفا در همه هورمون‌های فوق مشابه است و از چهار اگزون و سه اینترون تشکیل شده است. زیر واحد بتا مسئول فعالیت اختصاصی هر یک از این هورمون‌ها است. هدف این مطالعه کلونینگ cDNA زنجیره آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی در وکتور مناسب برای سیستم یوکاریوتی بود.

مواد و روش‌ها: به منظور کلونینگ cDNA زیرواحد آلفا هورمون‌های گلیکوپروتئینی از T-vector واجد ژن آلفا، به کمک یک جفت پرایمر، cDNA مجدداً آمپلیفیه گردید و در سایت‌های Bam HI و Not I پلاسمید pcDNA3.1 کلون گردید. پلاسمید نوترکیب به سلول E.coli Top10F́ ترانسفورم شد و کلونی‌های واجد پلاسمید به‌وسیله Colony PCR انتخاب شدند. صحت پلاسمید تخلیص شده از این کلون‌ها ابتدا توسط هضم آنزیمی و نهایتاً به روش سکانسینگ بررسی شد.

یافته‌ها: آنالیز آنزیمی و سکانسینگ نشان داد که پلاسمید pcDNA3.1-F351α دارای توالی پلاسمیدی صحیح می‌باشد و تطابق کامل با ژن آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی گزارش شده در GenBank دارد.

نتیجه‌گیری: این پلاسمید به دلیل ساختار صحیح جهت انتقال به سیستم یوکاریوتی و ارزیابی بیان مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هورمون محرک فولیکولی، هورمون های غده هیپوفیز، هورمون های گلیکوپروتئینی، زیر واحد آلفا، پستانداران

مقدمه

هورمون‌های گلیکوپروتئینی انسانی شامل هورمون محرک تیروئید (TSH)، هورمون لوتئینیزه‌کننده (LH)، هومون محرک فولیکولی (FSH) و گونادوتروپین کوریونی (CG) هستند. هر یک از این هورمون‌ها از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده‌اند که این دو زیرواحد توسط پیوندهای غیر کووالان به هم متصل هستند و ساختمان سه بعدی آن‌ها توسط پیوندهای دی‌سولفیدی داخلی حفظ می‌گردد. زیرواحد بتا در این چهار هورمون از نظر اسیدهای آمینه و از لحاظ جزء کربوهیدراتی متفاوت است و عامل عمل‌کرد متفاوت و اختصاصی زیستی این هورمون‌هاست [۱].

زیرواحد آلفا در این چهار هورمون مشابه بوده و از ۹۲ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای دو زنجیره الیگو سارکاریدی از نوع N-linked در اسید آمینه‌های ASN76 و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۵۴۱۸۷-۰۲۳۱ نمابر: ۳۳۵۴۱۸۷-۰۲۳۱
Email: rnbio2536@gmail.com

www.SID.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۳

Archive of SID

ASN102 و دارای پنج پل دی‌سولفیدی (S-S) می‌باشد.

ژن زیرواحد آلفا در موقعیت کروموزومی 6p21.1-23 قرار دارد که یک قطعه پیش‌ساز واحد، نسخه‌برداری ژن آلفا را در جفت و هیپوفیز تنظیم می‌نماید. این زیرواحد شامل چهار اگزون و سه اینترون می‌باشد [۵-۲].

در حال حاضر FSH به‌صورت تخلیص شده و به‌صورت نوترکیب (Recombinant) وجود دارد که نوع نوترکیب به علت آلودگی کم‌تر و خلوص بالا ارجحیت دارد [۶]. از rFSH اگزوژن جهت IVF و درمان PCO و کیت‌های تشخیصی FSH استفاده می‌شود. LH مسئول تنظیم تولید تستسترون است و در چرخه تخم‌دانی باعث افزایش ترشح استروژن تکثیر سلول‌های تک فولیکول و ترشح پروژسترون توسط آن‌ها می‌شود و برای تخمک‌گذاری و تبدیل سلول‌های گرانولوزا به جسم زرد ضروری است. LH نوترکیب انسانی (rLH) در زنان با ناباروری که شدیداً دچار کمبود LH هستند استفاده می‌شود.

TSH در تیروئید موجب افزایش ساخت و ترشح هورمون‌های تیروئیدی و افزایش اندازه و تعداد سلول‌ها می‌شود. TSH نوترکیب در پی‌گیری عود بیماران سرطان تیروئید به‌دنبال عمل جراحی کاربرد دارد.

hCG مانع پس‌رفت جسم زرد در پایان چرخه جنسی ماهانه زن شده و باعث افزایش اندازه آن و تحریک جهت تولید پروژسترون و استروژن‌ها توسط جسم زرد می‌شود و در جنین با اثر بر بیضه و تحریک ساخت تستسترون موجب ایجاد اندام جنسی مردانه می‌شود. hCG نوترکیب در حمایت از فاز لوتئال قابل استفاده است [۷،۶].

پلاسمید pcDNA3.1+ یک پلاسمید حلقوی تجاری با ۵۴۲۸ نوکلئوتید ساخت شرکت Invitrogen است و به گونه‌ای طراحی شده که امکان کلونینگ در میزبان پروکاریوت و سپس انتقال آن به میزبان یوکاریوت را فراهم می‌کند [۸].

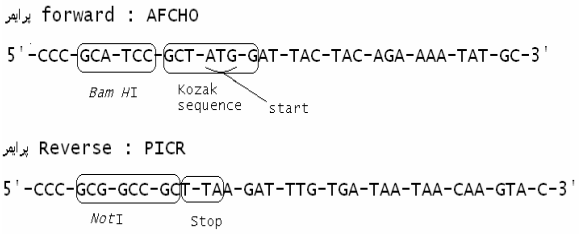
سلول Chinese hamster ovary (CHO) یک رده سلولی مشتق شده از تخم‌دان همستر چینی است که برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و پروتئین‌های نوترکیب و درمانی استفاده می‌شود [۹].

زنجیره آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی گلیکوزیله هستند و از آن‌جا که میزبان پروکاریوت قادر به گلایکوزیلایشن نمی‌باشد و هم‌چنین چون سلول‌های پروکاریوت قادر به اصلاحات پس از ترجمه نمی‌باشد می‌بایست ژن مذکور در سیستم یوکاریوت بیان شود. از این رو ژن زنجیره آلفای هورمون‌های گلایکوپروتئینی را در وکتور مناسب برای سیستم یوکاریوتی کلون می‌کنیم.

مواد و روش‌ها

در فاز اول این مطالعه از بافت جفت، کل RNA جداسازی شد و پس از ساختن cDNA، ژن زنجیره آلفا به‌وسیله PCR جداسازی و در T.vector کلون گردید. پس از تأیید صحت کلونینگ و تایید توالی ژن از طریق تعیین توالی، از این پلاسمید نوترکیب جهت ساب کلونینگ در پلاسمید بیانی استفاده گردید.

امپلیفیکاسیون: ابتدا پرایمر مناسب برای جداسازی قطعه ژنی زنجیره آلفا از وکتور طراحی شد که توالی پرایمرهای مورد استفاده بدین ترتیب بود؛



برای جداسازی و تکثیر قطعه مورد نظر، از پلاسمید نوترکیب، T.V-F1-351 به عنوان الگو استفاده شد. PCR در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر شامل TV-F351 یک میکرولیتر، بافر (بدون Mgso4) ۱۰ میکرولیتر، dNTP (0.4 mM each)، پرایمر AFCHO و Pic R هر کدام 0/5 mM، Pfu DNA polymerase مقدار 10 unit، Mgso4 (5.5 mM) انجام شد.

در داخل ترموسایکلر برنامه تنظیمی به‌صورت ۳۰ سیکل ۹۵ درجه ۶ دقیقه، ۵۸ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه یک دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه و ۲۵ درجه ۵ دقیقه بود لازم به ذکر است که دماهای مختلف اتصال پرایمر به الگو (Annealing) جهت PCR مورد آزمایش قرار گرفت و

Archive of SID
www.SID.ir

در نهایت دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای قطعه مورد نظر به عنوان بهترین دمای انجام شناخته شد.

تخلیص محصولPCR . الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز انجام و پس از جدا کردن باند محصول PCR از روی ژل با استفاده از کیت K0513 تخلیص گردید.

هضم آنزیمی وکتور. پرایمر طوری طراحی می‌شود که سایت‌های برشی که در ابتدا و انتهای ژن قرار می‌گیرند در محل تجمع سایت‌های آنزیمی پلاسمید در پایین دست پروموتر وجود داشته باشند و بر روی خود ژن وجود نداشته باشند.

در این مطالعه سایت‌های آنزیمی BamHI و NotI به ترتیب در ابتدا و انتهای ژن آلفا به صورتی قرار داده شد که بتوان ژن را در پلاسمید pcDNA3.1کلون کرد.

از آن‌جایی که دو آنزیم فوق بافر مشترکی ندارند ابتدا پلاسمید و ژن مورد نظر را با یک آنزیم و بافر مخصوصش cut می‌کنیم سپس محصول cut شده را تخلیص کرده محصول خالص شده را با آنزیم دوم و بافر مخصوص آن هضم می‌کنیم. برای این منظور مخلوط (حجم نهایی ۱۰۰ µl) شامل آنزیم ۵µl، بافر و پلاسمید هر کدام ۲۰ µl و آب دیونیزه استریل ۵۵µl تهیه و به مدت چند ثانیه میکروفیوژ کرده و به مدت ۱ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. سپس جهت اطمینان از عمل آنزیم‌ها مقدار ۳ µl از محصول عمل را بر روی ژل آگارز الکتروفورز می‌کنیم. محصول هضم شده به‌وسیله کیتK0513 ، تخلیص و در ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. مراحل فوق برای هر ۲ آنزیم BamHI و NotIجداگانه و با بافر مخصوص انجام شد سپس جهت دفسفریله کردن انتهای ' ۵ پلاسمید، فسفاتاز به محیط واکنش افزوده شد تا امکان اتصال مجدد دو سر ملکول حامل به یک‌دیگر از بین برود. پس از آن مجدداً خالص‌سازی با کیت K0513انجام شد. به‌جز مرحله دفسفوریله کردن تمامی مراحل را عیناً بر روی محصول PCR یا همان ژن آلفا که از روی ژل بریده شده و با کیت K0513 تخلیص گردیده نیز انجام می‌گیرد. در مرحله بعد برای vector و insert، که در حقیقت محصول خالص شده PCR بود با کمک آنزیم T4 DNA Ligase، Ligation انجام شد یعنی ژن زنجیره آلفا در pcDNA3.1کلون شد. سپس Ligation Mix به‌مدت یک شب در دمای۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

ترانسفورماسیون. ترانسفورماسیون با استفاده از محیط TSSدر سلول 'Top10F انجام گرفت. ۵۰ کلونی ظاهر شد که از این بین ۲۲ کلونی به همراه ۲ کلونی از کنترل ترانسفورماسیون که حاوی پلاسمید pcDNA3.1 بود کشت شطرنجی شد.

Colony PCR . از کشت شطرنجی مقداری باکتری را به‌وسیله loop برداشته در ۱۰۰ میکرولیتر آب حل کرده و پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن و سانتریفیوژ از سوپ‌رویی به عنوان الگو جهت Colony PCR استفاده گردید. تمام کلونی‌های شطرنجی شده و جوشانده شده به همراه کنترل مثبت و منفی در این PCR شرکت داده شد. کنترل منفی از کلون حاوی پلاسمید اصلی که در ترانسفورماسیون استفاده شد و کنترل مثبت پلاسمید T.V-F351 می‌باشد. در این مرحله جهت PCRاز آنزیم Taq DNA polymerase استفاده شد. از کلون‌هایColony PCR آن‌ها مثبت بود تعداد ۴ کلونی جهت تخلیص پلاسمید در محیط LB broth حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و توسط کیت High pure plasmide isolation kit شرکت آلمانی Roche تخلیص پلاسمید گردید.

آنالیز آنزیمی. آنالیز آنزیمی چهار پلاسمید نوترکیب تخلیص شده به‌وسیله دو آنزیم XhoI و HindIII به‌طور هم‌زمان و با بافر مشترک آن‌ها انجام گرفت. محل اثر این دو آنزیم بر روی پلاسمید در دو سوی قطعه گنجانده شده قرار دارند. پلاسمید+pcDNA3.1 نیز به عنوان کنترل هضم آنزیمی گردید. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه اینکوبه گردید و کل نمونه‌ها بر روی ژل ۱/۲٪ الکتروفورز شد. تمام کلونی‌ها اندازه مورد انتظار را نشان دادند پلاسمیدها نوترکیب به نام‌های pcDNA3.1+-F351α1,2,3,4 نام‌گذاری شدند.

تعیین توالی. از پلاسمیدهایی که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان دادند پس از رسوب و حل کردن در آب،

Archive of SID

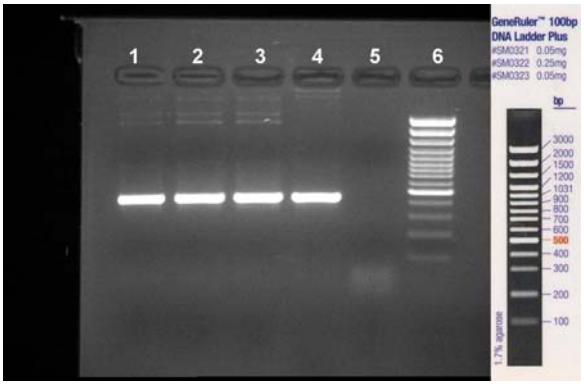
www.SID.ir

کلون‌های pCDNA3.1+-F351α3,4 جهت تعیین توالی به شرکت (MWG) ارسال گردید.

تطابق(Blast). نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه Blastسایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast جهت تطابق با ژن‌های گزارش شده در Genbank بررسی شد.

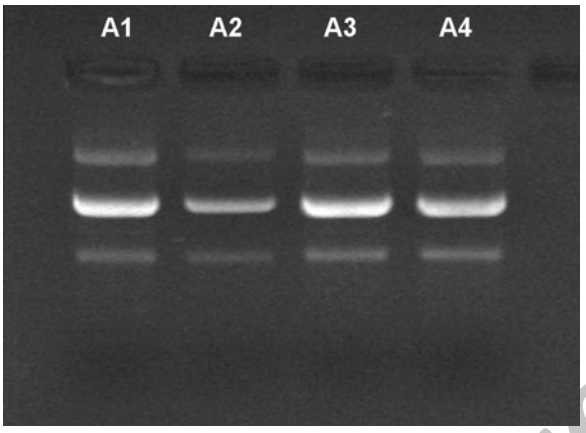
نتایج

پس از طراحی پرایمر جداسازی و تکثیر قطعه ژنی مورد نظر یعنی ژن زنجیره آلفا با استفاده از PCR انجام گرفت. محصول خالص شده پس از Digest به‌وسیله آنزیم‌های BamHI و NotI در پلاسمید cut شده به‌وسیله این دو آنزیم ciap شده ligat گردید و در سلول ´Top10F در محیط TSS ترانسفورم گردید. از کلون‌های موجود پس از کشت شطرنجی colony PCR انجام گرفت. از کلون‌هایی که Colony PCR آن‌ها مثبت بود، ۴ کلون انتخاب و در ml ۵ محیط کشت شد و در °۳۷ به مدت یک شب قرار گرفت. نمونه‌ها پس از رسوب‌گیری توسط کیت High pure plasmid تخلیص پلاسمید انجام شد و یک میکرولیتر از آن‌ها بر روی ژل ۰/۷٪ لود شد که نتیجه حاکی از صحت کار تخلیص می‌باشد. در مرحله بعد بر روی ۴ نمونه A1 و A2 و A3 و A4 با آنزیم‌های XhoI و HindIII آنالیز آنزیمی انجام شد.

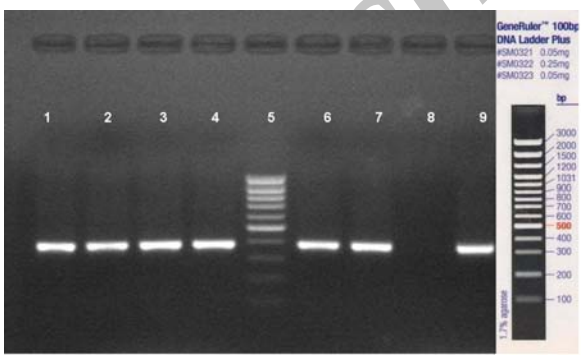


شکل ۱. PCR F1-351α with Pfu DNA Polymerase
ستون ۱: واکنش PCR برای جداسازی ژن زنجیره آلفا در غلظت ۱/۵ میلی مولار یون Mg و دمای ۵۵. ستون ۲: در غلظت ۱/۵ میلی مولار یون Mg و دمای۵۶. ستون ۳: در غلظت ۱/۵ میلی مولار یون Mg و دمای ۵۷. ستون۴: در غلظت ۱/۵ میلی مولار یون Mg و دمای ۵۸. ستون ۵ : کنترل منفی واکنش PCR. ستون۶ : مارکر 100bp (شرکت فرمنتاس)

از چهار پلاسمید نوترکیبی که با آنالیز آنزیمی بررسی شد و اندازه صحیح را نشان داد دو پلاسمید انتخاب و به نام‌های pcDNA3.1+-F351α3 و pcDNA3.1+-F351α4 نام‌گذاری گردید. این دو پلاسمید جهت تعیین توالی رسوب داده شدند و به شرکت آلمانی MWG ارسال شد. نتیجه تعیین توالی نشان‌دهنده تطابق کامل ژن مورد نظر با ژن‌های گزارش شده در GenBank می‌باشد. از آن‌جایی که تعیین توالی از روی پلاسمید قبل از ناحیه کلون شدن ژن است فریم بودن ژن با پلاسمید و صحت توالی Kozak نیز تأیید گردید.



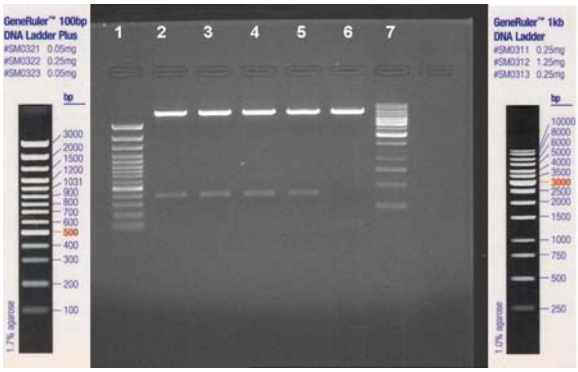
شکل۲. واکنش Colony PCR . ستونهای۷و۶،۴،۳،۲،۱ : F1-351α . ستون ۵ : مارکر 100bp (شرکت فرمنتاس). ستون۸ : کنترل منفی. ستون۹ : کنترل مثبت



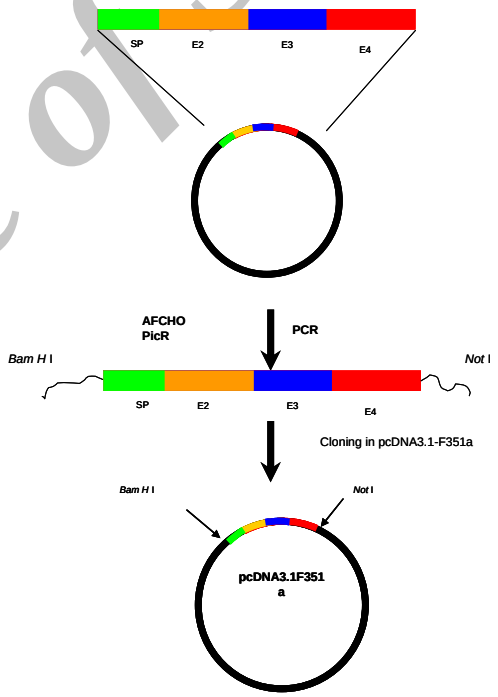
شکل ۳. تخلیص پلاسمید با کیت High pure plasmid isolation kit. ستون1A : پلاسمید تخلیص شده A1. ستون2A : پلاسمید تخلیص شده A2. ستون3A : پلاسمید تخلیص شده A3. ستون4A : پلاسمید تخلیص شده A4

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴. اثر آنزیم Xho I و HindIII بر روی پلاسمید pcDNA3.1-F351a. ستون ۱ : مارکر 100bp (شرکت فرمنتاس). ستون۲ : pcDNA3.1-F351a1. ستون۳ : pcDNA3.1-F351a2 ستون۴ : pcDNA3.1-F351a3. ستون۵ : pcDNA3.1-F351a4 ستون۶ : پلاسمید pcDNA3.1. ستون ۷ : مارکر 1kb (شرکت فرمنتاس)



شکل ۵. شماتیک مراحل ساخت پلاسمید نوترکیب ساخته شده در این مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

هورمون‌های گلیکوپروتئینی مترشحه از هیپوفیز قدامی شامل TSH، LH، FSH، CG هر یک به صورت دایمر از دو زیر واحد آلفا (α) و بتا (ß) تشکیل شده‌اند که زیر واحد آلفا در تمام هورمون‌های فوق مشابه می‌باشد [۱]. این هورمون‌ها به‌صورت اگزوژن جهت مصارف درمانی و تشخیصی کاربرد دارد. ساخت این هورمون‌ها به‌صورت نوترکیب به سبب خلوص بالا و کاهش آلودگی نسبت به نوع تخلیص شده آن ارجحیت دارد [۶].

موارد بالینی استفاده از FSH اگزوژن شامل تحریک تخمک‌گذاری جهت درمان نازایی و بیماری‌هایی نظیر تخمدان پلی‌کیستیک و همچنین در تهیه کیت‌های تشخیصی FSH و عمل‌کرد غده هیپوفیز می‌باشد. LH نوترکیب انسانی (rLH) به‌صورت ترکیب با FSH به منظور تحریک رشد فولیکول در زنان با ناباروری که شدیداً دچار کمبود LH هستند استفاده می‌شود. TSH نوترکیب انسانی در پی‌گیری عود بیماران سرطان تیروئید به‌دنبال عمل جراحی کاربرد دارد و hCG نوترکیب در حمایت از فاز لوتئال قابل استفاده است [۷،۶].

زیرواحد بتا در ۴ هورمون فوق متفاوت بوده و مسئول فعالیت اختصاصی هر یک از این هورمون‌هاست ولی بدون همراهی با زیرواحد آلفا قادر به عمل نمی‌باشد. زیرواحد آلفا که ژن آن روی کروموزوم ۶ قرار دارد در همه هورمون‌های فوق مشابه است و از چهار اگزون و سه اینترون تشکیل شده است که بخش کدشونده آن اگزون دو، سه و بخش ابتدایی اگزون چهار است که یک cDNAی ۳۵۱ نوکلئوتیدی حاوی کدون شروع (ATG) و یک کدون ختم (TAA) را شامل می‌شود. یک زنجیره ۹۲ اسید آمینه‌ای از آن ساخته می‌شود و یک سیگنال پپتید ۲۴ اسید آمینه‌ای نیز در ابتدای آن قرار دارد و دارای دو ناحیه‌ی گلیکوزیلایشن در اسیدآمینه‌های ASN76 و ASN102 و پنج پل دی‌سولفیدی (S-S) می‌باشد [۱].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط Hsieh و همکاران در چین cDNA کدکننده زیرواحد آلفا هورمون‌های گلیکوپروتئینی دو گونه اردک کلون و سکانسینگ شد [۱۰]. در سال ۱۹۹۶ توسط Nagae و همکاران در ژاپن cDNA زیرواحد آلفا و بتای گنادوتروپین II مارماهی ژاپنی کلون و سکانس نوکلئوتیدی آن با دیگر انواع ماهی استخوانی مقایسه شد [۱۱]. همچنین در سال ۱۹۹۸، Arai و همکارانش زیرواحد آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی سه گونه آبزی

Archive of SID

www.SID.ir

(غوک، وزغ بزرگ آمریکایی و سوسمار آبی) را مورد بررسی قرار دادند [۱۲].

هدف از این مطالعه که در واقع بخشی از طرح تولید آزمایشگاهی هورمون FSH نوترکیب بود ساب کلونینگ ژن زنجیره آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی در پلاسمید pcDNA3.1 برای سیستم پستانداران (CHO) است. پلاسمید نوترکیب ساخته شده پیش‌ساز همه هورمون‌های گلیکوپروتئینی مترشحه از غده هیپوفیز است و قادر است با پلاسمید نوترکیب حاوی زنجیره بتای هر یک از هورمون‌های گلیکوپروتئینی غده هیپوفیز تشکیل یک کاست αβ دهد و در تولید هورمون کامل به‌کار آید [۱۳].

پلاسمید pcDNA3.1+ که در این مطالعه استفاده شد یک پلاسمید حلقوی تجاری ساخت شرکت Invitrogen می‌باشد که حاوی ۵۴۲۸ نوکلئوتید است. پلاسمید pcDNA3.1+ به‌گونه‌ای طراحی شده که حاوی PUC ori برای تکثیر پلاسمید در پروکاریوت و پروموتر Pcmv و BGHpA برای شروع و ختم بیان ژن در سلول یوکاریوت می‌باشد. هم‌چنین حاوی ژن مقاومت به داروهای آمپی‌سیلین و نئومایسین است که به ترتیب جهت انتخاب در سلول پروکاریوت و سلول یوکاریوت می‌باشد. در حد فاصل نواحی شروع و ختم بیان ژن، ناحیه Multiple Cloning Site وجود دارد که حاوی جایگاه اثر آنزیم‌های برش‌دهنده مختلف می‌باشد و امکان گنجاندن (Insertion) ژن را در پلاسمید به‌وسیله آنزیم‌های برش‌دهنده فراهم می‌کند [۸].

در سال ۲۰۱۰ جلیلی و همکاران طی کار مشترکی در دانشگاه‌های تهران، ایران، اصفهان و انستیتو پاستور از پلاسمید pcDNA3.1 برای بیان ژن گاما اینترفرون گاوی در سلول CHO استفاده کردند [۱۴]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۰، Chaturvedi و همکاران در هند از این پلاسمید برای کلونینگ و بیان ژن GMCSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) مرغی در سلول CHO استفاده کردند [۱۵].

در سال ۲۰۰۷، Li و همکاران ژن TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer1) انسانی را با استفاده از پلاسمید pcDNA3.1 در سلول CHO بیان کردند [۱۶].

سیستم بیانی E.coli با وجود مزیت‌های زیاد از جمله سطح بالای بیان، سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم هزینه بودن، به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری و تغییرات پس از ترجمه برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی مثل این پروتئین مناسب نیست. مزایای سیستم‌های یوکاریوتی شامل اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه می‌باشد، که این سیستم برای تولید بالای پروتئین‌های یوکاریوتی منحصر به‌فرد است.

سلول CHO یک رده سلولی است که از تخمدان همستر چینی مشتق شده است. این سلول‌ها به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و اغلب در تحقیقات بیولوژیک و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر سلول CHO یک سکوی ثابت برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و پروتئین‌های نوترکیب و درمانی ایجاد کرده‌اند. سلول CHO در مطالعات ژنتیک غربال‌گری مسمومیت تغذیه و بیان ژن و به‌خصوص در بیان پروتئین‌های نوترکیب به‌کار می‌روند. امروزه سلول CHO رایج‌ترین سلول‌های میزبان پستانداران مورد استفاده برای تولید صنعتی پروتئین‌های درمانی نوترکیب می‌باشند [۱۰]. داشتن تعداد بسیار کم کروموزوم (2n=22) برای پستاندار همستر چینی را یک مدل ایده‌آل برای گسترش سیتوژنیک و کشت بافت کرده است. سلول CHO به علت رشد سریع و تولید بالای پروتئین تبدیل به یک رده سلولی انتخابی شده است [۱۷].

در برخی مطالعات جداسازی این ژن با هدف تهیه کنستراکت‌های متفاوت برای تولید هورمون نوترکیب انجام شده است [۱۸]. در اکثر این مطالعات کنستراکت جهت انتقال و بیان ژن در سلول‌های پستانداران به‌ویژه CHO ساخته شده است. کنستراکت‌هایی که با اتصال زنجیره بتا و زنجیره آلفا تشکیل شده‌اند منجر به تشکیل یک زنجیره فعال در سیستم بیانی CHO می‌گردد [۲]. به نظر می‌رسد حتی چنان‌چه با

Archive of SID
www.SID.ir

ژن‌های CG-β و FSH-β یک مجموعه ژنی ساخته شود، قادر خواهد بود هر دو فعالیت CG و FSH را حفظ کند [۱۸].

توالی Kozak، توالی نوکلئوتیدی (GCTATGG) روی مولکول mRNA سلول‌های یوکاریوت می‌باشد که نقش عمده در شروع بیان mRNA دارد. این بخش از mRNA توسط ریبوزوم به عنوان نقطه شروع بیان پروتئین شناسایی می‌شود [۱۹].

در این مطالعه با هدف جداسازی ناحیه کدکننده ژن α هورمون‌های گلیکوپروتئینی با سیگنال سکانس طبیعی ژن از ژنوم انسان این ژن را از ژنوم کامل یک زن با باروری طبیعی جدا کردیم و طی چند مرحله کلون‌سازی در وکتور pcDNA3.1 کلون شد. به دلیل نداشتن قدرت اصلاح در حین تکثیر در آنزیم Taq DNA Polymerase، امپلیفیکاسیون با آنزیم Pfu DNA Polymerase انجام شد [۲۰].

برای کلون‌سازی ژن زیرواحد آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی انسانی در وکتور pcDNA3.1 محل ورود ژن به وکتور در حد فاصل جایگاه اثر آنزیم‌های BamHI و NotI بر روی پلاسمید انتخاب شد. در دو طرف ژن نیز با استفاده از پرایمرها محل اثر برای این دو آنزیم و توالی اتصال به ریبوزوم (Kozak sequence) بازسازی شد (شکل شماره ۳). قطعات تکثیر شده با پرایمرها جهت قرار گرفتن در پلاسمید باید با آنزیم‌های BamHI و NotI هضم و ایجاد قطعاتی با انتهای چسبان نماید. با توجه به کاتالوگ شرکت سازنده آنزیم‌ها (Fermentase) نمی‌توان عمل هضم آنزیمی را به صورت هم زمان با دو آنزیم انجام داد. به همین دلیل ابتدا هضم آنزیمی با آنزیم Bam HI و بافر مربوطه انجام گرفت و پس از خارج کردن آنزیم و بافر به‌وسیله تخلیص از آنزیم NotI و بافر مخصوص آن استفاده شد. قطعات کوچکی که در این مرحله از قطعه ژنی جدا می‌شوند ممکن است در مرحله بعد با تأثیر T4 Ligase مجدداً به هم وصل شوند برای جلوگیری از این واکنش ناخواسته محصول عمل هضم را با استفاده از دانه‌های سیلیکا خالص‌سازی کردیم. در مرحله آماده‌سازی پلاسمید نیز هضم با دو آنزیم طبق مراحل فوق انجام شد و با توجه به این که دو انتهای خطی شده پلاسمید به‌صورت متفاوت می‌باشند، از لحاظ تئوری امکان اتصال مجدد آن‌ها وجود ندارد ولی در عمل این امر امکان‌پذیر است. بدین منظور عمل دفسفوریله کردن با آنزیم آلکالین فسفاتاز انجام گرفت. این آنزیم که از E.coli یا بافت روده‌ای گوساله جدا می‌شود قادر است گروه فسفات واقع در انتهای '۵ را بردارد [۲۱].

پس از کلون‌سازی در وکتور، آنالیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های XhoI و HindIII که در دو سوی ژن آلفا و بر روی پلاسمید جایگاه اثر دارند به‌طور هم‌زمان مورد استفاده قرار گرفت که طی الکتروفورز دو قطعه 5354bp و 385bp مطابق انتظار به‌دست آمد. نتایج Restriction mapping ساختار صحیح این پلاسمیدها را تأیید می‌کند (شکل ۴).

هم‌چنین تعیین توالی با استفاده از پرایمر AOX که در ناحیه ابتدایی پروموتور پلاسمید قرار دارد انجام گرفت. با این‌کار علاوه بر تعیین توالی ژن می‌توان صحت ناحیه بازسازی شده و توالی Kozak و هم‌چنین قسمت اتصال ژن با پلاسمید را نیز مورد ارزیابی قرار داد. نتیجه تعیین توالی تطابق کامل نواحی کدکننده این ژن را با ژن‌های گزارش شده در GenBank و هم‌چنین Fram بودن ژن با پلاسمید را نشان داد.

در مطالعات بعدی جهت تولید پروتئین زنجیره آلفا انتقال پلاسمید نوترکیب حاصل به سلول CHO صورت می‌پذیرد. هم‌چنین با جداسازی و کلونینگ ژن زنجیره بتای هر یک از هورمون‌های گلیکو پروتئینی، پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با پلاسمید نوترکیب درست شده در این تحقیق تشکیل کاست‌های آلفا- بتا برای هر کدام از این هورمون‌ها داده و کاست‌های ایجاد شده قادر خواهند بود در سلول CHO تولید هورمون‌های کامل نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم آموزشی و پژهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان که با حمایت‌های بی‌دریغ خود ما را یاری نمودند کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

[1] Karimzade H, Raftari A, Normohamadian M, editors. In: Harper's Biochemistry. Tehran Ab press 1380; p: 643-644. (Persian).

[2] Sugahara T, sato A, kudo M, Ben-Menahem D, pixley MR, Hsueh AJ, Boime I. Expression of biologically active fusion genes encoding the common a subunit and the follicle stimulating hormone subunit role of a linker sequence. J Biol Chem 1996; 271: 10445-10448.

[3] Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal – F). Hum Reprod update 1996; 2: 172-191.

[4] Reddy Vemuri B, Hsiung N, Beck Anton K, Berstine Edward G. FSH . United States Patent 1990; NO: 4923805

[5] palter SF, Olive DL, Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Reproductive physiology. novaks gynecology 12nd ed. Maryland: William and wilkins; 1996; p: 149-169.

[6] Mozhdehi H, Niayesh M, Musavi MF. editors. In: basic and clinical pharmacology katzung BG. 10nd ed. Tehran Argmand press 2007; p: 767-785. (Persian).

[7] Niavarani A, Rakhshan M, editors. In: companion of guyton and hall textbook of medical physiology Guyton AC and Hall JE. Tehran Samat press 2006; p: 1177-1207. (Persian).

[8] Invitrogen life technologies co [editorial]. pcDNA3.1(+), pcDNA3.1(-)Catalog nos: V790 and V 795-20. Respectively; version: 1, 081401, 28-0104.

[9] Yang J, Vizcarra J, Okimoto R, Kirby J. Genome Mapping of the Chicken Follicle Stinulating Hormone Beta Subunit gene. Plant, Animal & Microbe X Conference, san Diego; Town & Country Convention Center; Jan 2002; p: 12-16.

[10] Hsieh YL, Chatterjee A, Chien JT, Yu JY. Molecular cloning of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone alpha subunits of two species of duck and their gene regulation. J Mole Endocrinol 2001; 27: 339-347.

[11] Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone α- and gonadotropin IIβ-subunits of the Japanese eel, Anguilla japonica, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. J Mole Endocrinol 1996; 16: 171-181.

[12] Arai Y, Kubokawa K, Ishii S. Cloning of cDNas for the pituitary glycoprotein hormone alpha subunit precursor molecules in three amphibian species, bufo japonicus, rana catesbeiana, and cynops pyrrhogaster. Gen Comp Endocrinol 1998; 112: 46-53.

[13] Shoham Z, Mannaerts B Insler V, Coelingh-Bennink H. Induction of follicular growth using recombinant human follicle stimulating hormone in two volunteer women with hypogonadotropic-hypogonadism. Fertil Steril 1993; 59: 738-742.

[14] Jalali SAH, Nikbakht Brujeni Gh, Tadjbakhsh H, Koohi MK, Gholkar M, Rabbani M. Cloning and high level expression of bovine interferon gamma gene in eukaryotic cells (COS-7). Iran J Veterin Res 2010; 31: 125-133. (Persian).

[15] Chaturvedi U, Kalim S, Kumar R, Sawant P, Tiwari S, Khurana SK, et al. Cloning and expression of chicken granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GMCSF) gene. Indian J Exp Biol 2010; 48: 1175-1180.

[16] Li WT, Chuang Z, Zhao Sj, Zhang Y, Is X. The human TSLC1 gene cloning and eukaryotic expression vector. J Fourth Mil Med Univ 2007; 28:871-873.

[17] Jayapal KP, Wlaschin KF, Yap MGS, Hu WS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. Chem Eng Prog 2007; 103: 40-47.

[18] Kanda M, Jablonka-Shariff A, Sat A, Pixley MR, Bos E, Hiro'oka T, et al. Genetic fusion of an a-subunit gene to the follicle-stimulating hormone and chorionic gonadotropin-b subunit genes. Mol Endocrinol 1999; 13: 1873-1881.

[19] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell 1986; 44: 283-292.

[20] Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res 1996; 24: 3546-3551.

[21] Brown TA. Gene cloning and DNA analysis zn introduction. Blackwell Science 2001; 13: 271-292.

Archive of SID

www.SID.ir

Sub-cloning of alpha subunit of anterior pituitary glycoprotein hormone into a mammalian expression vector

Mohammad Reza Akbari Eidgahi (Ph.D), Reza Nasr (M.Sc)*, Ali Akbar Shaebani (Ph.D), Mojtaba Ghadamyari (M.D)
Biotechnology Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan Iran

(Received: 17 Jan 2011 Accepted: 04 Sep 2011)

Introduction: Anterior pituitary glycoprotein hormones include thyroid stimulating hormone, lutinizing hormone, follicule stimulating hormone, and gonadotropine hormone. Each of them contains alpha and beta subunits. The alpha subunit gene is the same in all of these hormones and contains 4 exones and 3 introns. The beta subunit is responsible for specific function of each hormone. The aim of this study was to clone alpha chain cDNA of glycoprotein hormones in a proper vector for eukaryotic system.

Material and Methods: To clone cDNA, alpha subunit of glycoprotein hormones was amplified by using one pair primers and T.vector as template and cloned in *Not* I and *Bam H*I sites of pcDNA3.1 plasmid. The recombinant plasmid transformed to *E.coli* Top10F´ cell and colonies that contain plasmid were selected by Colony PCR. The accuracy of extracted plasmid of these clones was approved by enzyme digestion and sequencing.

Results: Enzyme analysis showed that pcDNA3.1-F351α had correct structure and sequencing confirmed by 100% homology of the gene with reported alpha gene in *Gene Bank.*

Conclusion: Because of its proper structure, this plasmid is able to transform to Eukaryotic system and translation.

Keywords: Follicle stimulating hormone, Pituitary hormones, Glycoprotein hormones, Alpha subunit, Mammals

* Corresponding author: Fax: +98 231 3354187; Tel: +98 231 3354187
rnbio2536@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir