Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 3, Aug. – Sep. 2016, Pages: 50-57

Original Article

Site Directed Mutagenesis in *Ifnβ* Gene in Order to Increasing Its mRNA Stability and Translation Level Using Megaprimer PCR Method

Maryam Heidari, Zohreh Hojati*, Maryam Kay

Division of Genetics, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 16 Jan, 2014 **Accepted: 20 Apr, 2014**

Abstract

Background and Objectives: Beta interferon (IFNβ) protein is produced as a recombinant drug and used in treatment of some diseases like Multiple Sclerosis. In eukaryotic cells, IFNβ mRNA is rapidly degraded and its half-life is too short. One of the contributing factors to this short half-life is presence of the AU rich element (ARE) in 3´UTR of this mRNA. This region has an inhibitory effect on translation too. Our aim in this research was to delete ARE from IFNβ gene in order to increase its mRNA stability and translational level.

Materials and Methods: In order to delete an 18 nucleotide sequence from ARE, the Megaprimer PCR technique was used. The PCR product was digested with EcoRI and BglII enzymes. The vector was partially digested with the same enzymes. The digested PCR product was purified and cloned into the vector. Then, the recombinant vectors were transfected into CHO cell line.

Results: The first PCR reaction product contained a deletion mutation and was used as megaprimer in the second reaction. Partial digestion of the vector yielded a variety of fragments with different weights. The sufficient fragment was purified from the gel and used as a cloning vector. Final product of PCR was cloned into the vector. The accuracy of the cloning reaction was confirmed and the recombinant vector was transfected into CHO cell line.

Conclusion: An 18 nucleotide region of IFNβ mRNA was deleted. The influence of this microdeletion on mRNA stability and translational efficiency needs to be surveyed in future.

Keywords: Beta Interferon (Ifnβ), AU Rich Element, Megaprimer PCR

*Corresponding author:
Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

Archive of SID

Citation: Heidari M, Hojati Z, Kay M. Site Directed Mutagenesis in Ifnβ Gene in Order to Increasing Its Mrna Stability and Translation Level Using Megaprimer PCR Method. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(3):50-57.

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

ایجاد جهش هدفدار در ژن *IFNβ* به منظور افزایش پایداری mRNA و سطح ترجمه آن با روش Megaprimer PCR

مریم حیدری، زهره حجتی*، مریم کی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۲۶ **پذیرش:** ۹۳/۱/۳۱

چکیده

زمینه و اهداف: پروتئین اینترفرون‌بتا (IFNβ) به عنوان یک داروی نوترکیب تولید شده و در درمان برخی بیماری‌ها مثل مالتیپل اسکلروزیس استفاده می‌شود. در سلول‌های یوکاریوتی IFNβ mRNA به سرعت تجزیه می‌شود و نیمه‌عمر آن بسیار کوتاه است. یکی از عواملی که باعث این امر می‌شود وجود توالی غنی از AU (ARE) در ۳´UTR این mRNA می‌باشد. این ناحیه اثر مهاری بر ترجمه نیز دارد. هدف این تحقیق حذف ARE از ژن اینترفرون‌بتا جهت افزایش پایداری mRNA و سطح ترجمه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به منظور حذف یک توالی ۱۸ نوکلئوتید از ARE از روش Megaprimer PCR استفاده شد. محصول PCR با آنزیم‌های *Eco*RI و *Bgl*II برش داده شد. وکتور نیز توسط همین آنزیم‌ها اما به صورت نسبی برش داده شد. محصول برش یافته PCR خالص‌سازی شد و داخل وکتور کلون شد. در ادامه وکتور نوترکیب حاصل به رده سلولی CHO ترانسفکت شدند.

یافته‌ها: محصول مرحله اول واکنش PCR حاوی جهش حذفی بود و به عنوان مگاپرایمر در واکنش دوم استفاده شد. هضم نسبی وکتور، قطعاتی با وزن‌های مختلف ایجاد کرد. قطعه مورد نظر ما از ژل استخراج و به عنوان وکتور کلونینگ استفاده شد. محصول نهایی PCR داخل وکتور کلون شد. صحت واکنش کلونینگ تایید شد و وکتور نوترکیب حاصل، به رده سلولی CHO ترانسفکت شد.

نتیجه‌گیری: منطقه‌ای ۱۸ نوکلئوتیدی از IFNβ mRNA حذف شد. اثر این میکروحذف بر پایداری mRNA و بازدهی ترجمه درآینده بررسی خواهد شد.

کلید واژه‌ها: اینترفرون بتا، توالی غنی از آدنین–یوراسیل، Megaprimer PCR.

*ایمیل نویسنده رابط: **Email:**z.hojati@sci.ui.ac.ir

مقدمه

اینترفرون بتا (IFNβ) از اعضای گروه یک اینترفرون‌ها گلیکوپروتئینی تنظیمی است که توسط بیشتر سلول‌های بدن، به‌ویژه فیبروبلاست‌ها، در پاسخ به عفونت ویروسی یا مواجهه با دیگر بیولوژیک‌ها، تولید می‌گردد و از این‌رو تحت عنوان اینترفرون فیبروبلاستی نیز شناخته می‌شود (۱و۲). پروتئین اینترفرون بتا از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول‌ها، منجر به فعال‌سازی ژن‌های متعدد شده و در نتیجه اثرات ضد ویروسی، ضدتکثیری و فعالیت‌های زیستی دیگر را در سلول‌های هدف القا می‌کند و بدین جهت از نظر درمانی مورد توجه ویژه می‌باشد (۳). IFNβ نخستین عامل درمانی می‌باشد که نقش آن در به تاخیر انداختن پیشرفت بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS)، نشان داده شده است. این دارو باعث کاهش تعداد حملات و کاهش سرعت تشدید بیماری و ایجاد ناتوانی می‌شود (۴). به علاوه IFNβ احتمالا می‌تواند در درمان استئوسارکوما، دیسپلازی سرویکس، گلیوما و برخی عفونت‌های ویروسی مثل عفونت ویروس پاپیلوما، هرپس، آنسفالیت و نیز هپاتیت B و C هم مورد استفاده قرار گیرد (۵). امروزه سلول‌های *E. coli* و رده سلولی CHO، به عنوان سیستم‌های بیانی شایع جهت تولید IFNβ برای

Archive of SID

www.SID.ir

مصارف درمانی و در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. Betaseron و Extavia تحت نام کلی IFNβ1b در سلول های *E. coli* و Avonex و Rebif و همچنین Cinnovex(در ایران) تحت نام کلی IFNβla در رده سلولی CHO به تولید می رسد (۶و۷). مشابه هر پروتئین درمانی دیگر، به دست آوردن مقادیر بالای IFNβ برای اهداف تجاری مهم می‌باشد.

بررسی ها نشان می‌دهد که IFNβ mRNA ناپایدار است و به سرعت تجزیه می شود. پایداری بعد از رونویسی IFNβ mRNA، متاثر از توالی غنی از آدنین و یوراسیل (ARE, Adenine uracil Rich Element) می‌باشد (۸). AREها، یک سری از عناصر توالی هستند که توانایی کنترل نیمه عمر یک mRNA را از طریق تحریک یا مهار تجزیه آن دارا می‌باشند (۹). این عناصر در نواحی ترجمه‌نشدنی انتهای ´۳ (´۳UTR)، از شناخته شده‌ترین شاخص‌های ناپایداری mRNA می‌باشند. ARE ها هم‌چنین در کنترل ترجمه mRNA های خاص، شامل mRNA های پروتئین‌های مرتبط با رشد توموری و پروتئین‌های پیش التهابی نقش دارند و به عنوان توالی‌های مسئول مهار ترجمه هم معرفی می‌گردند (۱۰). ARE ها، توالی‌هایی با طول حدود ۱۵۰–۵۰ نوکلئوتید (۹) و متشکل از تعداد متغیری کپی از پنتامر AUUUA و نونامر یا UUAUUUAUU می‌باشند (۸) که بر اساس تعداد و انتشار پنتامر AUUUA، به سه گروه تقسیم می‌شوند (۱۱و۱۲).

تنوع توالی AREها، به آن‌ها این امکان را می‌دهد مجموعه‌ای از فاکتورهای ترانس را در اختیار بگیرند که تصور می‌شود در تنظیم پایداری mRNA و ترجمه، نقش دارند. تصور می‌شود که پروتئین‌های اتصالی به ARE، قادر به برهمکنش با ماشین ترجمه می‌باشند و از این طریق ترجمه را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۰و۱۱). هم‌چنین پروتئین‌های متصل شونده به ARE قادر به برهمکنش با کمپلکس چند پروتئینی به نام اگزوزوم بوده که قادر به تجزیه mRNA در جهت ´۳ به ´۵ می‌باشد (۱۳).

مشابه دیگر mRNA های با بیان موقت، IFNβ mRNA هم حاوی یک موتیف غنی از AU در ´۳UTR خود می‌باشد که مربوط به گروه IIAREها می‌باشد و در منطقه ۷۸۰+ تا ۸۰۷+ از ´۳UTR IFNβ mRNA قرار گرفته است. این توالی یکی از شاخص‌های ناپایداری IFNβ mRNA معرفی شد. بررسی توالی‌های دخیل در ناپایداری IFNβ mRNA، مشخص کرد که علاوه بر ناحیه ترجمه نشدنی انتهای ´۳، شاخص ناپایداری دیگری در ´۵کدون خاتمه ترجمه نیز وجود دارد. جز ناپایدارکننده دوم، تحت عنوان شاخص ناپایداری ناحیه کد کننده (CRID, Coding Region Instability Determinant) نامیده می‌شود و بین نوکلئوتیدهای ۵۴۵–۵۱۳ ناحیه کدکننده قرار گرفته است (۱۴و۱۵). حذف مستقل ARE یا CRID به تنهایی، منجر به پایداری ملایمی در mRNA می شود و جایگزینی هر دو عنصر با توالی‌های کنترل، به میزان زیادی نیمه عمر IFNβ mRNA را افزایش می‌دهد (۱۰).

توالی AU حاضر در ´۳UTR IFNβ mRNA ، نه تنها بر روی پایداری mRNA، بلکه بر روی قابلیت ترجمه آن نیز اثر دارد (۸).

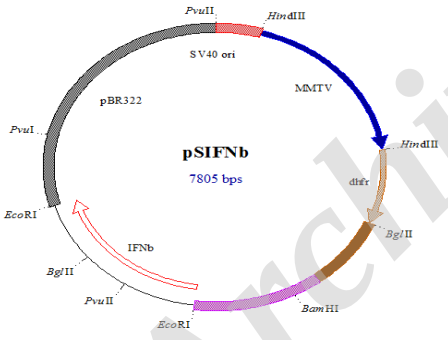
بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که ناحیه ´۳UTR IFNβ mRNA، اثر مهاری بر روی ترجمه دارد (۱۶).

هدف از طرح حاضر، تغییر ژن *IFNβ* می‌باشد به گونه‌ای که بازده ترجمه و هم‌چنین پایداری mRNA آن افزایش یابد. برای رسیدن به این هدف با توجه به نقش ARE در کاهش پایداری mRNA IFNβ و کارایی ترجمه، توالی هجده نوکلئوتیدی از این منطقه، با روش Megaprimer PCR حذف شد.

مواد و روش‌ها

وکتوری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت وکتور pS-IFN Kozak بود. منشا اصلی این وکتور، پلاسمید pSVM dhfr بوده که یک وکتور قابل تکثیر در سلول‌های CHO *dhfr*¯می‌باشد. این وکتور حاوی قطعه‌ای از پلاسمید pBR322 است که ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و مبدا همانندسازی را دارا می‌باشد. وکتور pS-IFN Kozak با وارد کردن ژن *IFNβ* حاوی جهش نقطه‌ای در منطقه کزاک، در جایگاه *Eco*RI وکتور pSVM dhfr به دست آمد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

در این تحقیق از سویه باکتریایی استاندارد *E. coli* XL1-Blue استفاده شد که نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاوم می‌باشد. باکتری موردنظر از شرکت سیناژن تهیه شد. برای کشت باکتری *E. coli*، از محیط LB استفاده شد که از شرکت Merck تهیه شد.



شکل ۱: وکتور pS-IFN Kozak

به منظور القای جهش هدفمند در ژن اینترفرون بتا،پرایمرهای ویژه با استفاده از نرم‌افزار Oligo (Version۵) طراحی گردید و در واکنش Megaprimer PCR مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر می‌باشد:

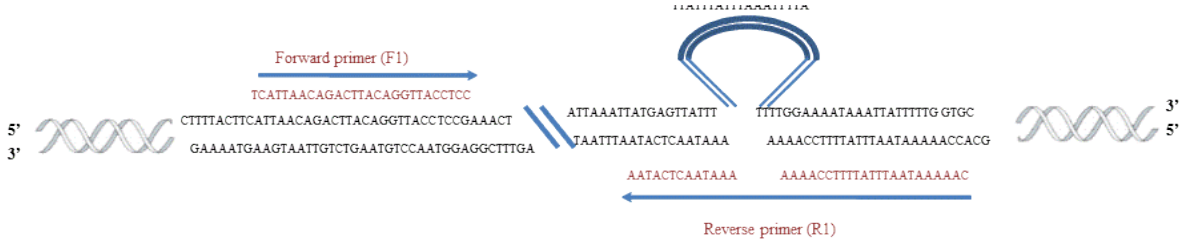
پرایمر F۱ با توالی ´۳ TCA TTA ACA GAC TTA CAG GTT ACC TCC ´۵،

پرایمر R۱ با توالی ´۳ CAA AAA TAA TTT ATT TTC CAA AAA AAT AAC TCA TAA ´۵.

پرایمر R۲ با توالی ´۳ AGC TGA ATT CTA ACT TTA TGA TGA GAG ´۵

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲: نحوه‌ی اتصال پرایمر حاوی جهش به منطقه مورد نظر در ژن *IFNβ*

این واکنش نیازمند ۳ پرایمر است که طی دو مرحله واکنش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. محصول نهایی که دارای یک حذف ۱۸ نوکلئوتیدی می‌باشد باید جایگزین همین قطعه فاقد حذف در وکتور شود که در دو انتها دارای جایگاه‌های برش *Eco*RI و *Bgl*II است. پرایمر F۱ بالادست جایگاه برش *Bgl*II و پرایمر R۱،که حاوی جهش بود در دو طرف منطقه مورد نظر برای حذف، طراحی شد. محصول مرحله اول به طول ۲۰۶ نوکلئوتید به عنوان Megaprimer به همراه پرایمر R۲ برای مرحله دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی پرایمر R۲ با ایجاد یک تغییر نوکلئوتیدی جایگاه برش *Eco*RI ایجاد شد.

تکنیک Megaprimer PCR یکی از روش‌های ایجاد جهش هدفدار (Site directed mutagenesis) می‌باشد که نخستین بار توسط Sarkar و Sommer توصیف و استفاده شد. این تکنیک جهش‌زایی با استفاده از سه پرایمر و در طی دو مرحله PCR صورت می‌گیرد (۱۷). در این روش یکی از پرایمرها حاوی جهش می‌باشد. نخستین واکنش PCR با استفاده از پرایمر حاوی جهش و یکی از پرایمرهای بیرونی صورت می‌گیرد. محصول دورشته‌ای خالص‌سازی شده و به عنوان پرایمر (مگا پرایمر) در PCR دوم به همراه پرایمر بیرونی دیگر استفاده می‌شود (۱۸و۱۹).

در این تحقیق، مرحله اول واکنش Megaprimer PCR برای به دست آوردن قطعه ابتدایی ژن حاوی حذف ۱۸ نوکلئوتیدی، با استفاده از پرایمر R۱ و F۱ و با ترکیب مواد شامل بافر PCR فاقد $MgSO_4$به حجم ۲/۵ میکرولیتر، DNA الگو (پلاسمید pS-IFN Kozak، حاوی ژن جهش یافته *IFNβ* در منطقه کزاک و با غلظت ۱۵ng/µl) به حجم ۳میکرولیتر، پرایمرهای R۱ و F۱ (با غلظت ۲۰ پیکومولار)هر کدام به حجم ۱/۵ میکرولیتر، مخلوط انواع dNTP ۰/۷۵ میکرولیتر، $MgSO_4$به حجم ۴ میکرولیتر، آنزیم پلیمراز *Pfu* به مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر و آب مقطر به میزان ۱۰/۵ میکرولیتر وطبق برنامه زیر صورت گرفت:

تقلیب اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۷ دقیقه، و سپس ۱۵ سیکل با دمای تقلیب ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل‌سازی ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه.

مرحله دوم واکنش، نیاز به محصول PCR مرحله اول به عنوان مگاپرایمر داشت که بعد از استخراج از ژل و تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. طول مگاپرایمر ۲۰۶ نوکلئوتید بود. مواد مورد استفاده در این مرحله شامل بافر PCR فاقد $MgSO_4$به حجم ۲/۵ میکرولیتر، DNA الگو (پلاسمید pS-IFN Kozak، حاوی ژن جهش یافته *IFNβ* در منطقه کزاک و با غلظت ۱۵ng/µl) به حجم ۳ میکرولیتر، پرایمر R۲ به میزان ۲ میکرولیتر و مگاپرایمر با غلظت حدود ۸۹ پیکو مولار به حجم ۰/۵میکرولیتر، مخلوط انواع dNTP ۱ میکرولیتر، $MgSO_4$ به حجم ۵ میکرولیتر، آنزیم پلیمراز *Pfu* به مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر و آب مقطر به میزان ۱۰/۷۵ میکرولیتر می‌باشد. با ترکیب مواد، واکنش PCR با برنامه تقلیب اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۷ دقیقه، و سپس ۱۵ سیکل با دمای تقلیب ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل‌سازی ۷۲ °C به مدت یک دقیقه، انجام شد و در پایان تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

محصول نهایی PCR حاوی جهش حذفی، در دو انتها حاوی جایگاه برش آنزیم‌های *Eco*RI و *Bgl*II بود. لذا از روش هضم آنزیمی دوگانه برای برش دو انتهای این قطعه استفاده شد. از طرفی پلاسمید pS-IFN Kozak که وکتور کلونینگ این قطعه بود دارای دو جایگاه برش برای هر کدام از آنزیم‌های فوق بود (شکل۱)، و بنابراین برای نادیده گرفته شدن یکی از جایگاه‌های برش هر کدام از آنزیم‌ها، از روش هضم دوگانه نسبی استفاده شد. آنزیم محدود کننده *Eco*RI و بافر همراه آن از شرکت MBI fermentas و آنزیم *Bgl*II به همراه بافر از شرکت Metabion خریداری شد.

برای انجام هضم آنزیمی دوگانه بافر Tango™ مربوط به شرکت FermentasMBI بعد از بررسی، به عنوان بافر مشترک انتخاب شد و از آنجایی که دمای عملکرد هر دو آنزیم مشابه بود، هضم آنزیمی دوگانه همزمان انجام شد. مدت انجام واکنش ۳ ساعت بود و مواد به نسبت زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

بافر Tango™ ۲X به مقدار ۲ میکرولیتر، آنزیم های محدود کننده *Eco*RI و*Bgl*II با غلظت ۱۰ u/µl به میزان ۱ میکرولیتر، نمونه DNA (محصول PCR یا پلاسمید) ۰/۵ تا ۱ میکروگرم و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر.

همان طور که ذکر شد هضم آنزیمی پلاسمید باید به صورت نسبی انجام می‌گرفت تا فقط یکی از جایگاه‌های برش هر کدام از آنزیم‌ها برش پیدا کند. بدین منظور علاوه بر کاهش زمان انکوباسیون، از غلظت کاهش یافته آنزیم نیز استفاده شد. ترکیب این عوامل شرایطی را فراهم کرد که دسترسی آنزیم‌ها به هر دو جایگاه برش محدود شد. در نتیجه عملکرد متفاوت هر آنزیم بر روی پلاسمیدهای موجود در محلول واکنش، انواع قطعات با

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌های مختلف به دست آمد که جداسازی قطعه مورد نظر از با استفاده از کیت استخراج از ژل Qiagen استفاده شد. مواد لازم برای انجام هضم آنزیمی دوگانه نسبی مانند واکنش قبل بود، با این تفاوت که از آنزیم ها به مقدار ۰/۲ میکرولیتر استفاده شد و واکنش در زمان ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

برای انجام تکنیک الحاق از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد که به همراه بافر مربوطه از شرکت MBI Fermentas خریداری شد. به همراه ویال در حدود ۲۰۰–۱۰۰ نانوگرم از وکتور، مقدار ۸۰ نانوگرم از قطعه ورودی، µl ۲ بافر ۱۰X و µl۱ آنزیم لیگاز اضافه شد و حجم نهایی محلول با اضافه کردن آب مقطر دوبار استریل به µl۲۰ رسانده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد تا عمل الحاق وکتور و قطعه ورودی توسط آنزیم لیگاز کامل شود.

جهت تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* برای انجام ترانسفورماسیون از روش کلرید کلسیم استفاده شد و سپس با روش شوک حرارتی ترانسفورماسیون انجام گرفت.

استخراج پلاسمید: استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری‌های ترانسفورم شده *E. coli* با روش جوشاندن هلمز–کویجلی صورت گرفت.

برای ترانسفکت کردن پلاسمیدها به رده سلولی CHO *dftr*$^-$ استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج گردیده با استفاده از کیت فرمنتاز که فاقد هر گونه آلودگی احتمالی به RNA و پروتئین می‌باشند به منظور ترانسفکت نمودن به رده سلولی CHO مورد استفاده قرار گرفت.

رده‌ی سلولی (CHO *dftr*$^-$ NCBI Code: C590) تهیه شده از انستیتوپاستور مورد استفاده قرار گرفت. این رده‌ی سلولی فاقد ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز می‌باشد. به منظور کشت سلول‌های CHO *dhfr*$^-$ از محیط DMEM, High Glucose, GlutaMAX شرکت Gibco استفاده شد. با توجه به فقدان ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز در رده‌ی سلولی مورد استفاده ترکیبات تکمیلی شامل هیپوگزانتین، تیمیدین و متوتروکسات خریداری شده از شرکت Gibco به محیط DMEM اضافه گردید. با توجه به پروتکل پیشنهادی انستیتوپاستور مقادیر مناسب از مواد، ترکیب شد تا محیط کامل و غنی ساخته شود. ترکیب مواد به شرح زیر است.

DMEM, High Glucose, GlutaMAX + ۰/۱ mM hypoxanthine, ۰/۰۱۶ mM thymidine ۰/۰۰۲ mM Methotrexate+۱۰% FBS+P/S ۱%

به منظور ترانسفکت نمودن پلاسمید نوترکیب کیت لیپوفکتامین خریداری شده از شرکت Invitrogen حاوی دو ترکیب Lipofectamine® LTX و PLUS™ Reagent مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله، محیط کشت فاقد سرم و پلاسمید نوترکیب استخراج شده با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز نیاز است. پس از مشاهده سلول‌ها و بررسی میزان رشد آن‌ها، در صورتی که به رشد معادل ۸۰–۵۰ ٪ رسیده باشند می‌توان ترانسفکشن را انجام داد به این منظور، به ازای هر خانه از پلیت µl ۱۰۰ محیط فاقد سرم برداشته (برای تراتسفکشن ۱۲ خانه از پلیت به µl ۱۲۰۰ محیط فاقد سرم نیاز است) و ng ۵۰۰ از DNA پلاسمیدی به ازای هر خانه از پلیت افزوده شد. سپس µl ۱۲ از بافر PLUS™ Reagent (µl۱ به ازای هر خانه) به مخلوط DNA پلاسمیدی+محیط فاقد سرم اضافه شد. مخلوط DNA پلاسمیدی+ محیط فاقد سرم+ بافر PLUS™ Reagent به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داه شد. در این مرحله، به مخلوط فوق µl ۳۰ از Lipofectamine® LTX (µl۲/۵ به ازای هر خانه) اضافه شد و مخلوط نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله آخر، µl ۱۰۰ از مخلوط نهایی به هر خانه از پلیت اضافه شد. با چند بار عقب و جلو کردن پلیت مخلوط حاصل در هر خانه از پلیت مخلوط گردید. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ نگهداری شد.

یافته ها

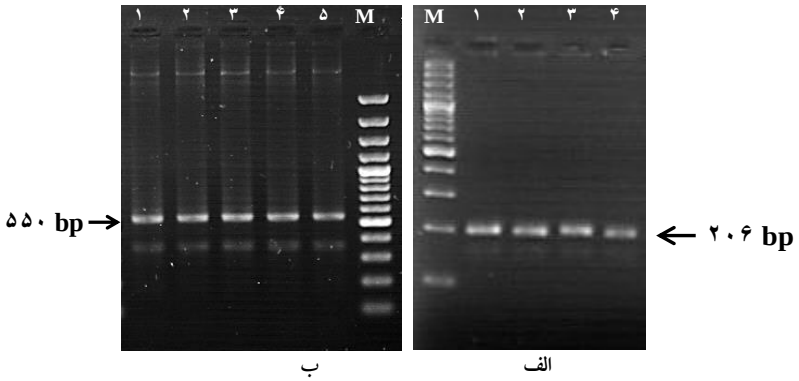
اولین مرحله از واکنش Megaprimer PCR با استفاده از پرایمرهای F۱ و R۱صورت گرفت. قطعه حاصل به طول ۲۰۶ نوکلئوتید در منطقه ۳′UTR ARE حاوی حذف ۱۸ نوکلئوتیدی بود. محصول این مرحله بعد از استخراج از ژل، به عنوان پرایمر به همراه R۲برای تکثیر قطعه‌ای ۵۵۰ جفت بازی از انتهای ژن *IFNβ* مورد استفاده قرار گرفت (شکل۳).

پلاسمید pS-IFN Kozak بعد از هضم نسبی بر روی ژل ۰/۵٪ برده شد. با توجه به اندازه قطعات، قطعه پلاسمید مورد نظر ما انتخاب و با استفاده از کیت از ژل استخراج شد.

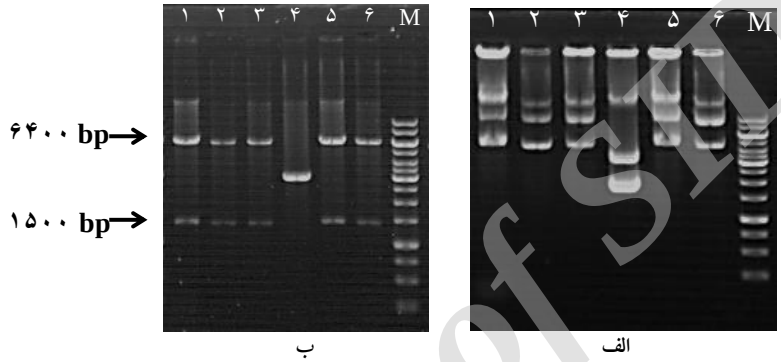
محصول واکنش Megaprimer PCR بعد از هضم آنزیمی دوگانه برای الحاق به قطعه حاصل از هضم آنزیمی دوگانه نسبی وکتور pS-IFN Kozak مورد استفاده قرار گرفت. محصول این مرحله وکتور حاوی ژن *IFNβ* بود که در نقطه کزاک حاوی دو جهش نقطه‌ای و در منطقه ۳′UTR ARE حاوی یک جهش حذفی ۱۸ نوکلئوتیدی بود. وکتور حاصل pS-IFNΔARE نام گرفت. سلول‌های مستعد *E. coli* به روش گفته شده آماده شدند. وکتور نوترکیب حاصل از مرحله الحاق برای ترانسفورماسیون به داخل سلول‌های مستعد *E. coli* مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها بعد از اتمام فرایند ترانسفورماسیون بر روی محیط انتخابی LBA حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کشت داده شدند. تنها باکتری‌های ترانسفورم شده که حامل وکتور بودند قادر به رشد بر روی این محیط بودند. پلیت حاوی باکتری‌ها به مدت ۱ شبانه روز در دمای ۳۷ °C انکوبه شد تا باکتری‌های ترانسفورم شده رشد کنند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳ : الف: ستون ۱ تا ۴ محصول مرحله اول واکنش Megaprimer PCR به طول ۲۰۶ نوکلئوتید. M: مارکر ۱۰۰DNAbp ب: ستون ۱تا ۵ محصول مرحله دوم واکنش با طول ۵۵۰ نوکلئوتید. M: مارکر ۱DNAkbp.



شکل۴ : الف: وکتورهای نوترکیب استخراج شده از باکتری *E. coli* ، اندازه متفاوت وکتورهای نوترکیب در عکس ژل مشخص است.
ب: هضم آنزیمی وکتورهای نوترکیب با آنزیم *Eco*RI طبق انتظار دو قطعه ۱۵۰۰ و ۶۴۰۰ جفت بازی حاصل شد. ستون ۴ محصول مورد نظر ما نیست و حذف شد M: مارکر ۱DNAkbp

بعد از انجام ترانسفورماسیون، باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی به محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین انتقال داده شدند تا استخراج پلاسمید انجام شود. استخراج پلاسمید با استفاده از روش هولمز-کویجلی صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ برده شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی حذف در منطقه ARE ´۳UTR بعد از استخراج، در اندازه‌های مختلفی دیده شدند (شکل۳). اندازه پلاسمید مورد نظر ما حدود ۷۸۰۰ جفت باز بود. وجود پلاسمیدهای نوترکیب با اندازه‌های متفاوت به دلیل جدا نشدن دقیق قطعات پلاسمیدی حاصل از هضم آنزیمی نسبی، بر روی ژل بود. بدین معنا که طی فرایند استخراج از ژل، قطعاتی با اندازه‌های غیر دلخواه نیز با باند مورد نظر ما جداسازی و طی تکنیک الحاق منجر به ایجاد این محصولات شده بود. برای تایید کلونینگ ژن جهش یافته *IFNβ* انسانی به داخل وکتورهای مورد نظر بعد از استخراج پلاسمید، PCR با پرایمرهای مربوطه و هم‌چنین واکنش‌های هضم آنزیمی انجام گرفت. با توجه به اندازه قطعات حاصل، پلاسمید مناسب و صحیح برای مراحل بعدی انتخاب شد. شکل (۴) هضم آنزیمی وکتور نوترکیب و قطعات حاصل را نشان می دهد.

پلاسمیدهای مورد نظر در مرحله‌ی بعدی به منظور ترانسفکت نمودن در سلول‌های یوکاریوتی با استفاده از کیت فرمنتاز استخراج گردیده و به منظور تأیید نهایی هضم آنزیمی مجدداً انجام شد.

حضور باندهایی با اندازه‌های مورد نظر بر روی ژل ۱٪ سبب تأیید پلاسمیدها به منظور ترانسفکشن گردید. سلول‌های CHO *dhfr*⁻ مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها به صورت دوکی شکل و چسبنده بوده و در شرایط مناسب کشت داده شده و پاساژهای متعدد صورت گرفت. استوک‌های مناسب از سلول‌ها تهیه شده و در نیتروژن مایع نگهداری گردید. سلول‌های آماده با شرایط ۵۰۰ng DNA پلاسمیدی، ۱µlمحلولPlus و ۲/۵ µl محلول لیپوفکتامین ترانسفکت گردیدند. لازم به ذکر است در ادامه‌ی روند تحقیقات بیان ژن نوترکیب با استفاده از روش Real Time PCR و تولید پروتئین با استفاده از روش ELISA مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

بحث

IFNβ انسانی، متعلق به گروه یک اینترفرون‌ها، یک گلیکوپروتئین تنظیمی می‌باشد که توسط بیشتر سلول‌های بدن، به ویژه فیبروبلاست‌ها، در پاسخ به عفونت ویروسی یا مواجهه با دیگر عوامل بیولوژیک تولید می‌شود. IFNβ از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول، منجر به فعال‌سازی یک سری از ژن‌ها می‌شود که در نهایت باعث ایجاد اثرات ضدویروسی، ضد تکثیری و بسیاری فعالیت‌های دیگر در سلول شده و بدین سبب از نظر درمانی مورد توجه ویژه می‌باشد (۳و۵). امروزه IFNβ

Archive of SID

www.SID.ir

نوترکیب در مقیاس تجاری در سلول‌های *E. coli* و رده سلولی CHO تولید می‌شود و محصولات آن به ترتیب تحت عنوان IFNβ1b (Extavia و Betaseron)و IFNβ1a (Avonex و Rebif و داروی Cinnovex تولید شده در ایران) نامیده می‌شود و در درمان بیماری‌های ویروسی، رشدهای توموری و سرطان و هم‌چنین بیماری MS مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). بدین منظور تولید مقادیر بالای این پروتئین جهت مصارف درمانی همواره مد نظر قرار داشته است.

اما نکته حائز اهمیت این است که IFNβ همانند mRNA بسیاری از سایتوکاین‌ها و پروتوانکوژن‌ها، به سرعت در سلول‌های یوکاریوتی تجزیه می‌شود و نیمه‌عمر آن کاملا کوتاه می‌باشد. یکی از عناصر توالی که در کوتاهی نیمه‌عمر IFNβ mRNA تاثیرگذار است توالی غنی از AU می‌باشد که در ۳´UTR IFNβ mRNA قرار گرفته است (۸).

نخستین نمونه عملکردی از تجزیه mRNA وابسته به ARE، در نتیجه بررسی‌های صورت گرفته توسط Shaw و Kamen به دست آمد. آن‌ها نشان دادند که یک توالی ۵۱ نوکلئوتیدی غنی از AU در ۳´UTR mRNA فاکتور تحریک کننده کلونی ماکروفاژ گرانولوسیتی (GM-CSF) به عنوان توالی یک عمل کننده سیس، در ناپایدارکردن mRNA مربوطه نقش دارد. وارد کردن ARE GM-CSF به داخل ۳´UTR mRNA β گلوبین، نیمه عمر این mRNA را از ۱۷ ساعت به کمتر از ۳۰ دقیقه کاهش می دهد (۲۰و۲۱). Barreaue و همکاران از طریق ایجاد جهش در موتیف GM-CSF UUAUUUAUUARE، نشان دادند که دآدنیلاسیون و تجزیه mRNA حاوی دو یا چهار کپی نونامری، موثرتر از دآدنیلاسیون mRNA حاوی یک کپی منفرد پیش می‌رود (۲۱). در بررسی دیگر که توسط Zubiaga و همکاران انجام گرفت مشخص شد که حذف یکی از ریشه‌های U از انتهای موتیف UUAUUUAUU، باعث کاهش قدرت این توالی و کاهش چشمگیر در فعالیت ناپایدارکنندگی mRNA می شود (۲۲).

ARE موجود در ۳´UTR mRNAهایی از قبیل mRNAهای c-fos، IFNα همانند IFNβ mRNA، نه تنها بر روی پایداری، بلکه بر روی قابلیت ترجمه آن‌ها نیز اثر مهاری دارد (۲۳). حذف این منطقه از انتهای این mRNAها، اثر مهار ترجمه را معکوس می‌کند (۸).

Kruys و همکاران با بررسی اثر توالی‌های غنی از AU در مولکول های مختلف mRNA، بیان کردند که حذف توالی غنی از AU از mRNA سطح ترجمه از مولکول را به شدت بالا می برد. از طرف دیگر اضافه کردن ۳´UTR mRNA IFNβ به انتهای ۳´ mRNAهای مختلف، منجر به کاهش زیادی در قابلیت ترجمه می‌شود (۲۴و۲۵). آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که مهار ترجمه همانند پایداری mRNA، با افزایش تعداد کپی موتیف‌های غنی از AU حاضر در انتهای ۳´ mRNA افزایش می یابد (۱۶و۲۶).

تنوع توالی AREها به آن‌ها این امکان را می‌دهد که مجموعه‌ای از فاکتورهای ترانس را در خدمت بگیرند که تصور می‌شود با دم پلیA و ماشین ترجمه برهمکنش دارند (۱۰و۱۱). هم‌چنین پروتئین‌های متصل شونده به ARE قادر به برهمکنش با کمپلکس چند پروتئینی به نام اگزوزوم بوده که باعث تجزیه mRNA در جهت ۳´ به ۵´ می گردد. مطالعات بر روی اتصالات بین ARE و پروتئین‌های اتصالی به آن نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها علاوه بر اتصال به توالی ARE مرکزی، قادر به شناسایی نواحی مجاور نیز می‌باشد. در واقع کنفیگوراسیون ARE تعیین کننده دسترسی آن به فاکتورهای عمل‌کننده ترانس می‌باشد (۱۳).

نتیجه‌گیری

پروتئین IFNβ نوترکیب با نام تجاری Cinnovex در داخل کشور تولید می شود. قیمت بالای دارو از جمله عواملی است که برای برخی بیماران مشکل ساز می باشد. به همین جهت یافتن راهی برای افزایش بازدهی و کاهش قیمت تولید دارو می تواند بسیار ارزشمند باشد. تحقیق حاضر با بررسی مقالات و تحقیقات معتبر راهکاری جهت افزایش بهره‌وری و سطح تولید ارائه می‌دهد که امید است مفید واقع شود.

در این تحقیق با توجه به اهمیت نقش توالی‌های غنی از AU در کاهش سطح ترجمه و نیز ناپایداری IFNβ mRNA، ناحیه‌ای ۱۸ نوکلئوتیدی از این منطقه حذف شد. این منطقه ۱۸ نوکلئوتیدی حاوی موتیفی می‌باشد که مشخصه AREهای نوع II می‌باشد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تعداد موتیف‌های نونامری حاضر در منطقه ARE، بر پایداری mRNA و نیز میزان ترجمه اثر دارد. از طرفی بررسی‌هایی که توسط نرم افزار آنلاین mfold صورت گرفت نشان داد که حذف این منطقه بر کنفیگوراسیون ناحیه ARE اثر گذاشته و ساختار آن را به هم می‌ریزد. این تغییر احتمالا بر شناسایی این منطقه توسط پروتئین‌های اتصال یابنده به ARE تاثیر گذاشته و می‌تواند سطح ترجمه و نیز پایداری mRNA را تحت تاثیر قرار دهد و میزان تولید پروتئین را بالا ببرد. تاثیر این جهش حذفی در روند ترجمه و پایداری mRNA در آینده با روش های Real time PCR و ELIZA مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

References

1. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferon's: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; **81**(10): 2341-2364.
2. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008; **89**(Pt 1): 1-47.
3. McCormick FP, Innis MA, Ringold GM. Human interferon β (IFN-β) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells. US 5795779. 1998; Available from: http://www.freepatentsonline.com/5795779.pdf.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Dorin G, McAlary PJ, Wong KM. Production of Interferon-β (IFN-β) in E.coli. US 5814485. 1998; Available from: http://www.freepatentsonline.com/5814485.pdf.
5. Bentzien J, Inc X. Recombinant interferon-beta mutinies. US 6514729. 2003; Available from http://www.freepatentsonline.com/6514729 pdf.
6. Mark DF, Lin LS, Yu Lu SD. Structural genes, plasmids and transformed cells for producing Cysteine depleted muteins of Interferon-β. US 4737462. 1988; Available from: http://www.Freepatentsonline.com/4737462.pdf.
7. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, *et al*. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human Interferon-beta(IFN-beta). *Pharm Res*1998; **15**(4): 641-649.
8. Raj NB, Pitha PM. 65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3' UTR. *FASEB J* 1993; **7**(8): 702-710.
9. Peppel K, Baglioni C. Deadenylation and turnover of interferon-beta mRNA. *J Biol Chem* 1991; **266**(11): 6663-6666.
10. Pasté M, Huez G, Kruys V. Deadenylation of interferon-beta mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3'-untranslated region and an instability sequence in the coding region. *Eur J Biochem* 2003; **270**(7): 1590-1597.
11. Espel E. The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Sem Cell Devel Biol* 2005; **16**(1): 59-67.
12. Zhang T, Kruys V, Huez G, Gueydan C. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**(Pt 6): 952-958.
13. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, et.al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 2001; **107**(4): 451-464.
14. Whittemore L, Maniatis T. Postinduction turnoff of beta-interferon gene expression. *Mol Cell Biol* 1990; **10**(4): 1329-1337.
15. Whittemore L, Maniatis T. Postinduction repression of the beta-interferon gene is mediated through two positive regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; **87**(20): 7799-7803.
16. Kruys V, Marinx O, Shaw G, Deschamps J, Huez G. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 1989; **245**(4920): 852-255.
17. Sarkar G, Sommer SS. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Bio techniques* 1990; **8**(4): 404-407.
18. Kanoksilapatham W, Gonzalez JM, Robb FT. Directed-Mutagenesis and Deletion Generated through an Improved Overlapping-Extension PCR Based Procedure. *Silpakorn U Science & Tech J* 2007; **1**(2): 7-12.
19. Söderberg M, Lang MA. Megaprimer-based methodology for deletion of a large fragment within a repetitive polypyrimidine -rich DNA. *Mol Biotechnol* 2006; **32**(1): 65-71.
20. Winstall E, Gamache M, Raymond V. Rapid mRNA Degradation Mediated by the c-*fos*3´ AU-Rich Element and That Mediated by the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor 3´ AU-Rich Element Occur through Similar Polysome-Associated Mechanisms. *Mol Cell Biol*1995; **15**(7): 3796-3804.
21. Barreau C, Paillard L, Osborne H. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(22): 7138-7150
22. Zubiaga A, Belasco J, Greenberg M. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(4): 2219-2230.
23. Khabar K, Young H. Post-Transcriptional Control of the Interferon System. *Biochimi* 2007; **89**(6-7): 761-769.
24. Grafi G, Sela I, Galili G. Translational regulation of human beta interferon mRNA: association of the 3' AU-rich sequence with the poly (A) tail reduces translation efficiency in vitro. *Mol Cell Biol* 1993; **13**(6): 3487-3493.
25. Kruys V, Beutler B, Huez G. Translational control mediated by UA-rich sequences. *Enzyme* 1990; **44**(1-4): 193-202.
26. Kruys V, Wathelet M, Poupart, Huez G. The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; **84**(17): 6030-6034.

Archive of SID

www.SID.ir