Arshive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤٥/هفته‌ی اول آبان ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۳

بیان پروتئین فاکتور ۷ انعقادی عملکردی نوترکیب انسانی در سلول‌های پستاندار

امیر مشایخی[۱]، شیرین شهبازی[۲]، میرداوود عمرانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فاکتور ۷ انعقادی (Factor VII یا FVII) یک سرین پروتئاز وابسته به ویتامین K است که نقش محوری در شروع مسیر خارجی آبشار انعقادی دارد. مسیر خارجی آبشار انعقادی، مکانیسم اصلی تشکیل لخته در شرایط فیزیولوژیک بود. نقص مادرزادی فاکتور ۷، بیماری خونریزی دهنده‌ی مغلوبی است که به علت جهش‌های ژن F7 ایجاد می‌شود. مصرف فاکتور ۷ نوترکیب، به عنوان درمانی برای نقص فاکتور ۷ و بیماری‌های هموفیلی می‌باشد. اولین قدم در تولید فاکتور ۷ نوترکیب، کلون کردن ژن فاکتور ۷ در وکتور بیانی مناسب و در سلول‌هایی است که بتوانند پردازش‌های کارآمدی را بر روی پروتئین بیان شده اعمال کنند.

روش‌ها: Complementary DNA (cDNA) کامل ژن F7 انسان به کمک روش Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) از سلول‌های Liver hepatocellular cells ($HepG_2$) به دست آمد و وارد وکتور بیانی pcDNA3.1/neo گردید. سازه‌ی به دست آمده، در سلول‌های Chinese hamster ovary ($CHO\text{-}K_1$) ترانسفکت گردید. پس از ترانسفکشن، به منظور بررسی بیان فاکتور ۷، میزان آنتی‌ژن فاکتور ۷ به کمک Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و میزان فعالیت انعقادی به روش One stage PT based در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده‌ی موقت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که فاکتور ۷ با موفقیت در سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ بیان شده و دارای فعالیت انعقادی است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، فاکتور ۷ نوترکیب با فعالیت انعقادی تولید گردید که حاکی از آن است که وکتور بیانی pcDNA3.1/neo برای بیان این پروتئین در سلول‌های پستانداران مناسب است و علاوه بر این، سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ پردازش‌های پس از ترجمه را به درستی بر روی فاکتور ۷ انجام می‌دهند و می‌توانند برای تولید فاکتور ۷ نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: فاکتور ۷ انعقادی، پروتئین نوترکیب، سلول‌های $HepG_2$، کلون کردن

ارجاع: مشایخی امیر، شهبازی شیرین، عمرانی میرداوود. **بیان پروتئین فاکتور ۷ انعقادی عملکردی نوترکیب انسانی در سلول‌های پستاندار.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۵): ۱۱۵۰-۱۱۴۵

مقدمه

پروتئین فاکتور ۷ انسان، گلیکوپروتئین وابسته به ویتامین K است که از خانواده‌ی سرین پروتئازها می‌باشد. این پروتئین، توسط کبد سنتز می‌شود و در خون ترشح می‌گردد و با غلظت طبیعی ۵۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر در پلاسما گردش می‌کند. مولکول فاکتور ۷ بالغ، پروتئینی تک زنجیره با ۴۰۶ اسید آمینه و وزنی حدود ۵۰ کیلودالتون می‌باشد. این مولکول، دارای چندین دمین مجزا شامل دمین GLA، دو دمین شبه فاکتور رشد اپیدرمی و یک دمین کاتالیتیک می‌باشد. در هنگام ایجاد آسیب عروقی، فاکتور ۷ به فاکتور بافتی Transfer actor (TF) در حضور یون کلسیم متصل می‌شود. فاکتور ۷ متصل به TF، بلافاصله به شکل فعال و دو زنجیره‌ای خود (Factor VIIa یا FVIIa) برش می‌خورد. سپس، FVIIa فاکتورهای انعقادی ۹ و ۱۰ را که به شکل غیر فعال هستند، برش می‌دهد و فعال می‌کند (۲-۱).

Complementary DNA (cDNA) کامل ژن فاکتور ۷ توسط O'Hara و همکاران در سال ۱۹۸۷ کلون و تعیین توالی گردید. موقعیت این ژن در 13q34 تعیین شده و با طولی حدود ۱۳ کیلوباز دارای ۹ اگزون می‌باشد (۳). نقص ارثی فاکتور ۷، بیماری خونریزی

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: شیرین شهبازی
Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir

www.SID.ir

Arshive of SID

دهنده‌ی اتوزومی مغلوب و نادری می‌باشد. علایم این بیماری از خونریزی‌های بسیار خفیف تا خونریزی‌های درون جمجمه‌ای تهدید کننده‌ی حیات متغیر می‌باشند (۴). تعداد زیادی نقایص مولکولی که بیوسنتز یا عملکرد فاکتور ۷ را تخریب می‌کنند، در بیماران مبتلا به نقص این فاکتور شناسایی شده‌اند (۶-۵).

راهبردهای درمانی نقص فاکتور ۷ در حال حاضر بر اساس مصرف پلاسمای تازه‌ی منجمد (Fresh frozen plasma یا FFP)، کنسانتره‌های کمپلکس پروترومبین (Prothrombin complex concentrate یا PCC)، کنسانتره‌های فاکتور ۷ مشتق از پلاسما یا مصرف فاکتور ۷ فعال نوترکیب می‌باشد (۷). علاوه بر این، بیماران مبتلا به هموفیلی‌های A و B نیز می‌توانند از فاکتور ۷ نوترکیب برای جلوگیری از خونریزی استفاده نمایند. در بیماران مبتلا به هموفیلی، از درمان‌های دیگری نظیر مصرف کنسانتره‌های کمپلکس پروترومبین فعال شده یا فعال نشده و استفاده از فاکتور ۸ خوکی بهره گرفته می‌شود که همگی دارای مضراتی می‌باشند (۹-۸).

در چنین بیمارانی، آنتی‌بادی‌های خنثی کننده‌ای بر علیه فاکتورهای ۸ و ۹ تولید می‌شود که درمان‌های مرسوم برای هموفیلی را با اختلال مواجه می‌کند (۱۰). با توجه به این موضوع، فاکتور ۷ نوترکیب به یکی از مهم‌ترین عوامل درمانی در درمان نقص فاکتور ۷ و هموفیلی‌های A و B تبدیل شده است.

اولین قدم در ساخت فاکتور ۷ نوترکیب، تولید پروتئین نوترکیب به میزان بالا و با الگوی گلیکوزیلاسیون و تغییرات پس از ترجمه مشابه پروتئین انسانی می‌باشد. بدین منظور، در مطالعه‌ی حاضر از وکتور بیانی pcDNA3.1/neo که با دارا بودن پروموتر سایتومگالوویروسی (Cytomegalovirus) بیان زیاد پروتئین نوترکیب را تضمین می‌کند در سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ استفاده شد (۱۲-۱۱).

روش‌ها

سلول‌های $HepG_2$، به عنوان منبع بیان فاکتور ۷ طبیعی (۱۱)، در محیط Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM high glucose) (Gibco) با Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد و CO_2 ۵ درصد کشت شدند تا به تراکم کافی رسیدند. RNA این سلول‌ها، به کمک Trizol (Life technologies) استخراج گردید و غلظت و کیفیت آن به کمک دستگاه نانودراپ بررسی شد و سپس، cDNA آن به کمک کیت Revert aid first strand cDNA synthesis (Thermo scientific) سنتز گردید. به منظور به دست آوردن ژن فاکتور ۷ طبیعی، از جفت پرایمر زیر که جایگاه برش آنزیم‌های XhoI و EcoRI در آن‌ها تعبیه شده بود، استفاده گردید:

Forward primer:
AGAATTCTTCATCATGGTCTCCCAGG
Reverse primer:
TCTCGAGGCTAGGGAAATGGGGCTCG

به کمک پرایمرهای پیش‌گفته، یک واکنش Polymerase chain reaction (PCR) انجام گرفت. به منظور انجام این PCR، مقدار ۲ میکرولیتر از cDNA سلول‌های $HepG_2$ به مخلوط واکنش حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR mastermix (Ampliqon)، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر و ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ اضافه شد و حجم نهایی به کمک آب به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. از برنامه‌ی دمایی زیر جهت انجام این واکنش استفاده گردید:

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه‌ی دمایی شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ یک مرحله‌ی ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور تکمیل رشته‌های ناتمام. محصول این PCR و وکتور بیانی pcDNA3.1/neo توسط آنزیم‌های XhoI و EcoRI بر اساس دستور شرکت سازنده (Thermo scientific) برش داده شد و آن گاه، به کمک GENJET PCR purification kit (Thermo scientific) تخلیص و غلظت آن‌ها اندازه‌گیری گردید. وکتور خطی شده و محصول PCR برش داده شده با نسبت وزنی ۳:۱ با هم ترکیب شدند و ژن فاکتور ۷ به کمک آنزیم لیگاز (Biobasic) وارد وکتور گردید.

سازه‌ی نوترکیب به دست آمده (pcDNA/FVII) در سلول‌های باکتریایی DH5α تکثیر شد. بدین منظور، ابتدا سلول‌های DH5α به کمک روش $CaCl_2$، مستعد و توسط وکتور نوترکیب ترانسفکت شدند. سلول‌های ترانسفکت شده، ابتدا بر روی محیط Lysogeny broth agar (LB agar) (Merck) حاوی ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب کشت شدند. پس از طی این زمان، تعدادی از کلنی‌های تک از روی محیط جامد برداشته و به منظور تکثیر، هر کدام به صورت جداگانه به مدت یک شب در ۵ میلی‌لیتر محیط Luria-Bertani broth (LB broth) (Liofilchem) حاوی ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در انکوباتور شیکردار کشت شدند. پس از تکثیر، پلاسمید نوترکیب با استفاده از GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo scientific)، از این سلول‌ها استخراج و تعیین توالی گردید تا از ورود ژن فاکتور ۷ به

www.SID.ir

Arshive of SID

وکتور و همچنین، صحت توالی ژن و وکتور، اطمینان حاصل شود.

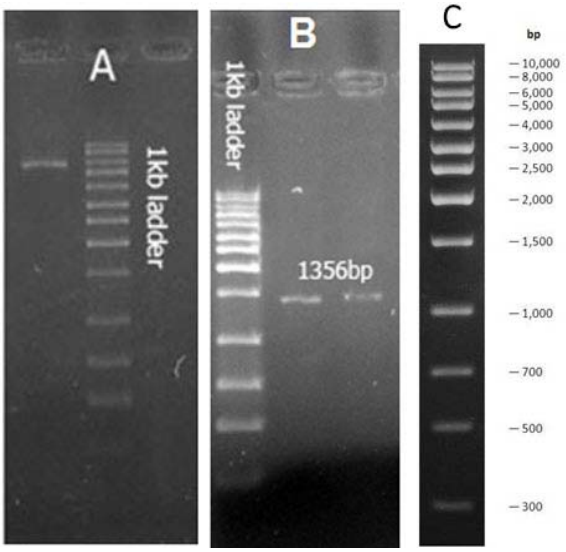
در این مطالعه، از سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ برای بیان ژن فاکتور ۷ نوترکیب استفاده شد. این سلول‌ها، پروتئین‌های انعقادی را بیان نمی‌کنند، اما می‌توانند پردازش‌ها و تغییرات پس از ترجمه را به درستی بر روی فاکتور ۷ بیان شده اعمال کنند (۱۱). سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ در محیط DMEM-F12 (Gibco) همراه با FBS ۱۰ درصد و CO_2 ۵ درصد کشت و تکثیر شدند. تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول شمارش شدند و در پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری کشت گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، هنگامی که سلول‌ها به تراکم حدود ۸۰ درصد رسیدند، توسط وکتور نوترکیب حاوی ژن وحشی ترانسفکت شدند. ترانسفکشن به کمک Turbofect transfection reagent (Thermo scientific) و بر اساس شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده انجام شد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌ها(سوپرناتان سلولی) جمع‌آوری شد و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

از آن جایی که فاکتور ۷ پروتئینی ترشحی می‌باشد، پس از تولید شدن توسط سلول‌ها، وارد محیط کشت می‌گردد. بنابراین، میزان تولید و بیان FVII به کمک اندازه‌گیری آنتی‌ژن FVII در سوپرناتان ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته‌ی سلول‌های ترانسفکت شده مطالعه گردید. جهت اندازه‌گیری آنتی‌ژن، از Factor VII human ELISA kit (Abcam) استفاده شد. در این مطالعه، ابتدا به کمک رقت‌های سریالی از فاکتور ۷ نوترکیب استاندارد (رقت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر)، یک منحنی استاندارد رسم شد و سپس، غلظت فاکتور ۷ در سوپرناتان ترانسفکت شده به کمک آن محاسبه گردید. جهت افزایش دقت در محاسبات، نمونه‌های رقت‌های سریالی و نمونه‌های سوپرناتان سلولی، هر کدام دو بار به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) اندازه‌گیری شدند. در این آزمایش، از سوپرناتان سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ ترانسفکت نشده به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

در ادامه، میزان فعالیت انعقادی فاکتور ۷ به کمک روش One-stage PT based بر روی نمونه‌های سوپرناتان ۴۸ ساعته‌ی جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده انجام شد. این آزمایش، به کمک دستگاه Sysmex CA-1500 coagulation analyzer system انجام گرفت. در این آزمایش، نمونه‌های سوپرناتان و همچنین، رقت‌های سریالی از یک پلاسمای طبیعی استاندارد به پلاسمای فاقد فاکتور ۷ اضافه شد و سپس، میزان Prothrombin time (PT) سوپرناتان با PT پلاسمای استاندارد مقایسه گردید و فعالیت انعقادی سوپرناتان به دست آمد. سوپرناتان سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ ترانسفکت نشده نیز به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

یافته‌ها

با استفاده از واکنش Real time-PCR (RT-PCR)، توالی کد کننده‌ی ژن فاکتور ۷ به دست آمد (شکل ۱). این واکنش PCR منجر به تولید محصولی با طول ۱۳۵۶ جفت باز شد که در انتهای ۵، دارای جایگاه برش آنزیم EcoRI و در انتهای دیگر، دارای جایگاه برش XhoI بود. محصول PCR و وکتور pcDNA3.1/neo با طول ۵۴۲۸ جفت باز توسط آنزیم‌های EcoRI و XhoI دابل دایجست شد و نتیجه‌ی واکنش توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تأیید گردید (شکل ۱).



شکل ۱. A: الکتروفورز وکتور pCDNA3.1/neo برش خورده توسط آنزیم‌های EcoRI و XhoI بر روی ژل آگارز ۲ درصد. B: تکثیر complementary DNA (cDNA) ژن فاکتور ۷ به روش Real time-Polymerase chain reaction (RT-PCR). C: راهنمای اندازه‌ی قطعات خط‌کش ملکولی یک کیلوبازی

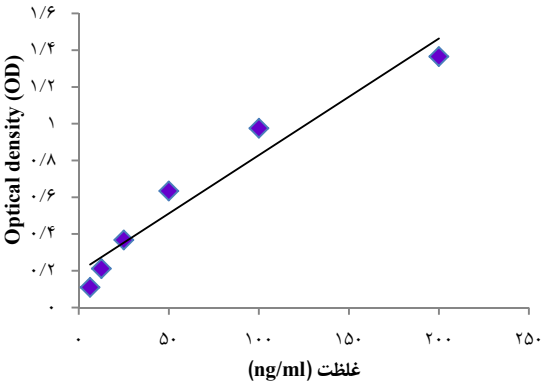
ژن فاکتور ۷ وارد وکتور خطی شده گردید و در سلول‌های باکتریایی تکثیر شد. تعیین توالی وکتور نوترکیب استخراج شده از باکتری‌ها نشان داد که ژن در جهت صحیح وارد وکتور شده و هیچ تغییر ناخواسته‌ای در توالی ژن و وکتور به وجود نیامده است.

در این تحقیق، میزان تولید فاکتور ۷ توسط سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ به کمک روش ELISA بررسی شد. پس از رسم نمودار استاندارد (شکل ۲)، اندازه‌گیری غلظت فاکتور ۷ در سوپرناتان‌های جمع‌آوری شده نشان داد که میزان پروتئین فاکتور ۷ نوترکیب در سوپرناتان ۲۴ساعته معادل ۱۳/۶ نانوگرم/میلی‌لیتر و در سوپرناتان ۴۸ ساعته معادل ۲۳/۸۴ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. این نتایج حاکی از افزایش میزان تولید و تجمع پروتئین نوترکیب طی گذر زمان می‌باشد. در ادامه، به

www.SID.ir

Arshive of SID

منظور بررسی فعالیت بیولوژیک فاکتور ۷ نوترکیب، میزان فعالیت انعقادی فاکتور ۷ در سوپرناتان جمع‌آوری شده‌ی ۴۸ ساعته، اندازه‌گیری و با پلاسمای طبیعی استاندارد دارای فعالیت ۱۰۰ درصد فاکتور ۷ مقایسه شد. در این بررسی، مشخص شد که در مقایسه با پلاسمای استاندارد (با غلظت فاکتور ۷ حدود ۵۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر)، فاکتور ۷ تولید شده در این آزمایش فعالیت ۴/۵ درصدی دارد و از آن جایی که فاکتور ۷ تولید شده به طور مستقیم و بدون خالص‌سازی برای سنجش میزان فعالیت مورد استفاده قرار گرفت، با مقایسه‌ی غلظت آن (۲۳/۸۴ نانوگرم/میلی‌لیتر) با پلاسمای استاندارد (۵۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) می‌توان به این نتیجه رسید که فاکتور ۷ نوترکیب تولید شده در مطالعه‌ی حاضر، از نظر انعقادی بسیار فعال می‌باشد.



شکل ۲. نمودار استاندارد تهیه شده جهت اندازه‌گیری غلظت فاکتور ۷ در سوپرناتان‌های سلولی

بحث

نقص ارثی فاکتور ۷ اولین بار در سال ۱۹۵۱ توصیف شد (۱۳). این بیماری، شایع‌ترین بیماری انعقادی مادرزادی نادر می‌باشد (۶) که به شکل اتوزومی مغلوب انتقال می‌یابد و هتروژنیتی ملکولی و فنوتیپی قابل ملاحظه‌ای دارد (۱۴، ۷). تمایل به خونریزی در این بیماری از نظر شدت متغیر است و دارای دامنه‌ای از خونریزی‌های کشنده تا خفیف و یا حتی بدون علامت می‌باشد. درمان بیماران مبتلا به نقص فاکتور ۷ به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد. یکی از قابل اطمینان‌ترین روش‌های درمانی که امروزه در دسترس می‌باشد، استفاده از فاکتور ۷ نوترکیب است (۷).

در روش‌های درمانی دیگر، غلظت فاکتورهای انعقادی در پلاسما پایین است و احتمال انتقال عفونت از طریق پلاسما وجود دارد. به علاوه، از آن جایی که در بیماران مبتلا به هموفیلی‌های A و B پس از استفاده از درمان‌های مرسوم، پس از مدتی آنتی‌بادی‌های ضد فاکتورهای ۸ و ۹ تولید می‌شود، فاکتور ۷ نوترکیب برای درمان این بیماران به گزینه‌ای مناسب تبدیل شده است (۱۰). درمان توسط فاکتور ۷ نوترکیب در بیماران هموفیلی با یا بدون آنتی‌بادی‌های مهار کننده، درمانی مؤثر و مطمئن می‌باشد (۱۵). همچنین، استفاده از فاکتور ۷ نوترکیب به عنوان روشی درمانی برای بیماران مبتلا به هموفیلی‌های اکتسابی نیز در نظر گرفته می‌شود (۱۶). با توجه به این موضوع، تولید فاکتور ۷ نوترکیب از اهمیت ویژه‌ای در درمان انواع بیماری‌های خونریزی دهنده برخوردار است.

مطالعات مختلفی در زمینه تولید و بیان فاکتور ۷ نوترکیب صورت گرفته است که در هرکدام، از وکتورهای متفاوت، روش‌های مختلف برای کلون کردن ژن و همچنین روش‌های مختلف ترانسفکشن استفاده شده است. به عنوان مثال، Kemball-Cook و همکاران در مطالعه‌ای فاکتور ۷ نوترکیب عملکردی را در سلول‌های CHO و با استفاده از وکتور pNeoIG502 بیان کردند (۱۷). سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ بار دیگر در مطالعه‌ی Xiao برای تولید فاکتور ۷ نوترکیب صورت گرفت مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱). در حال حاضر نیز نوعی فاکتور ۷ نوترکیب به صورت تجاری در دسترس می‌باشد (NovoSeven) که توسط سلول های BHK تولید می‌گردد (۱۸). مطالعات مشابهی نیز در ایران برای تولید فاکتور ۷ نوترکیب صورت گرفته است که با روش‌های مختلف و در سلول‌های مختلف نظیر سلول حشرات و پستانداران اقدام به تولید فاکتور ۷ نوترکیب کرده‌اند (۱۹-۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر نیز cDNA ژن فاکتور ۷ از سلول‌های $HepG_2$ در وکتور pcDNA3.1/neo که برای بیان ژن‌های خارجی در سلول‌های پستانداران طراحی شده است، استفاده شد. سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه، سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ بودند که فاکتور ۷ نوترکیب را مشابه با هپاتوسیت‌های انسانی بیان می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر، به کمک روش‌های پیش‌گفته، فاکتور ۷ نوترکیب در سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ تولید شد. میزان فاکتور ۷ تولید شده در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن موقت سلول‌ها اندازه‌گیری شد. بیان پروتئین نوترکیب در مقاطع زمانی مختلف، نشان دهنده‌ی افزایش مداوم غلظت پروتئین نوترکیب ترشح شده بود. داشتن فعالیت زیستی، مهم‌ترین موضوع در تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، اندازه‌گیری فعالیت انعقادی فاکتور ۷ تولید شده به کمک روش One stage PT-base، حاکی از عملکردی بودن فاکتور ۷ تولید شده بود.

در انتها، با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان به این استنباط رسید که وکتور pcDNA3.1/neo برای بیان ژن فاکتور ۷ در سلول‌های $CHO\text{-}K_1$ مناسب است و سلول‌های پیش‌گفته، قادر به تولید پروتئین‌های انسانی با عملکرد طبیعی می‌باشند و علاوه بر

www.SID.ir

Arshive of SID

این، روش‌های مورد استفاده برای کلون کردن ژن فاکتور ۷ و ترانسفکشن سلول‌ها، روش‌های کارآمدی است. بنابراین، در صورتی که با استفاده از روش‌های پیش‌گفته، رده‌های سلولی دایمی ترشح کننده‌ی فاکتور ۷ تهیه شود، منبعی برای تولید فاکتور ۷ نوترکیب به دست خواهد آمد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی مصوب دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی با شماره‌ی ۵۲/۶۰۲۶ د است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References

1. Hunault M, Arbini AA, Carew JA, Peyvandi F, Bauer KA. Characterization of two naturally occurring mutations in the second epidermal growth factor-like domain of factor VII. Blood 1999; 93(4): 1237-44.
2. Tanaka R, Nakashima D, Suzuki A, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, et al. Impaired secretion of carboxyl-terminal truncated factor VII due to an F7 nonsense mutation associated with FVII deficiency. Thromb Res 2010; 125(3): 262-6.
3. O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(15): 5158-62.
4. Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Banner DW, Tuddenham EG. Inherited factor VII deficiency: Molecular genetics and pathophysiology. Thromb Haemost 1997; 78(1): 151-60.
5. Peyvandi F, Duga S, Akhavan S, Mannucci PM. Rare coagulation deficiencies. Haemophilia 2002; 8(3): 308-21.
6. Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. Blood 2015; 125(13): 2052-61.
7. McVey JH, Boswell E, Mumford AD, Kemball-Cook G, Tuddenham EG. Factor VII deficiency and the FVII mutation database. Hum Mutat 2001; 17(1): 3-17.
8. 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.
9. Bray GL, Gomperts ED, Courter S, Gruppo R, Gordon EM, Manco-Johnson M, et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): Safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group. Blood 1994; 83(9): 2428-35.
10. Shapiro AD, Gilchrist GS, Hoots WK, Cooper HA, Gastineau DA. Prospective, randomised trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery. Thromb Haemost 1998; 80(5): 773-8.
11. Xiao W, Li CQ, Xiao XP, Lin FZ. Expression and fast preparation of biologically active recombinant human coagulation factor VII in CHO-K1 cells. Genet Mol Res 2013; 12(4): 6813-24.
12. Sutkeviciute I, Mistiniene E, Sereikaite J, Bumelis VA. The influence of different glycosylation patterns on factor VII biological activity. Biochimie 2009; 91(9): 1123-30.
13. Alexander B, Goldstein R, Landwehr G, Cook CD. Congenital SPCA deficiency: A hitherto unrecognized coagulation defect with hemorrhage rectified by serum and serum fractions. J Clin Invest 1951; 30(6): 596-608.
14. Mariani G, Herrmann FH, Bernardi F, Schved JF, Auerswald G, Ingerslev J. Clinical manifestations, management, and molecular genetics in congenital factor VII deficiency: the International Registry on Congenital Factor VII Deficiency (IRF7). Blood 2000; 96(1): 374.
15. Hay CR, Brown S, Collins PW, Keeling DM, Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation. Br J Haematol 2006; 133(6): 591-605.
16. Sumner MJ, Geldziler BD, Pedersen M, Seremetis S. Treatment of acquired haemophilia with recombinant activated FVII: A critical appraisal. Haemophilia 2007; 13(5): 451-61.
17. Kemball-Cook G, Garner I, Imanaka Y, Nishimura T, O'Brien DP, Tuddenham EG, et al. High-level production of human blood coagulation factors VII and XI using a new mammalian expression vector. Gene 1994; 139(2): 275-9.
18. Halabian R, Fathabad ME, Masroori N, Roushandeh AM, Saki S, Amirizadeh N, et al. Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology. Blood Transfus 2009; 7(4): 305-12.
19. Masroori N, Halabian R, Mohammadipour M, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Najafabadi AJ, et al. High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells. Biotechnol Lett 2010; 32(6): 803-9.

www.SID.ir

Arshive of SID

Journal of Isfahan Medical School Received: 23.04.2017

Vol. 35, No. 445, 1st Week, November 2017 Accepted: 25.07.2017

Expression of Functional Recombinant Human Coagulation Factor VII Protein in Mammalian Cells

Amir Mashayekhi[1], Shirin Shahbazi[2], Mirdavood Omrani[3]

Original Article

Abstract

Background: Coagulation factor 7 (FVII) is a vitamin-k-dependent serine protease with an essential role in initiation of extrinsic pathway of coagulation cascade. Extrinsic pathway is the major mechanism of clot formation in physiologic conditions. Congenital deficiency of FVII is a recessively inherited bleeding disorder caused by F7 gene mutations. The use of recombinant FVII is a therapeutic intervention for treatment of FVII deficiency and hemophilia diseases. The first step of production of recombinant FVII is cloning of F7 gene in an appropriate expression vector and transfection of the vector into cells capable of efficient processing of the expressed protein.

Methods: Complete human F7 cDNA was isolated from HepG2 cell using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The cDNA was inserted into pcDNA3.1/neo expression vector and CHO-K1 cells were transiently transfected with the resulting construct. After transfection, in order to study the expression of recombinant FVII, conditioned medium of the cells was collected and coagulant activity and antigen level of FVII was assessed using one-stage PT-based and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods, respectively.

Findings: The recombinant FVII was expressed in CHO-K1 cells successfully and had appropriate coagulant activity.

Conclusion: In this study, we produced functional recombinant coagulation factor 7 with coagulant activity. This suggests that the pcDNA3.1/neo is a suitable vector for expression of FVII protein in mammalian cells and CHO-K_1 cells exert correct and efficient post-translational processes on FVII protein and can be used to produce recombinant FVII protein.

Keywords: Coagulation factor VII, Recombinant proteins, $HepG_2$ cells, Cloning

Citation: Mashayekhi A, Shahbazi S, Omrani M. **Expression of Functional Recombinant Human Coagulation Factor VII Protein in Mammalian Cells.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(445): 1145-50.

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shirin Shahbazi, Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir

www.SID.ir