

## تأثیر اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی بر روی بیان موقت فاکتور ۹ انعقادی فعال انسانی در رده‌های از سلول‌های پستانداران

علی اکبر حداد مشهدریزه<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا زمردی پور<sup>۲</sup>، دکتر سید جواد حسینی<sup>۳</sup>، دکتر فرزانه صابونی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

تأثیر حضور اینترون‌ها در افزایش بیان ژن‌ها در سلول‌های پستانداران نشان داده شده است. در این مطالعه کارایی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی بر بیان موقت cDNA فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی تخمدان هامستر چینی (CHO) تحت کنترل پروموتور سیتومگالوویروس نشان داده شد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این پژوهش اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی بین آگزون‌های ۱ و ۲ cDNA فاکتور ۹ انسانی وارد شد. cDNA فاکتور ۹ واجد اینترون و cDNA طبیعی فاکتور ۹ به صورت جداگانه، در پایین دست پروموتور سیتومگالو ویروس در دو پلاسمید بیانی pcDNA3 همسانه‌سازی شدند. پس از تایید ساختار مولکولی، سازه‌های نو ترکیب ساخته شده برای ترانسفکشن سلول‌های CHO مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده به منظور آشکار سازی بیان پروتئین نو ترکیب فاکتور ۹ انسانی، جمع آوری و مورد آزمون یک مرحله‌ای انعقاد بر روی پلاسمای فاقد فاکتور ۹ قرار گرفت. سپس به منظور تایید صحت بیان cDNA فاکتور ۹ در سلول‌های نو ترکیب، حضور آن با آزمون رونوشت برداری معکوس تایید شد.

#### یافته‌ها

مقایسه اولیه زمان‌های انعقاد به دست آمده از محیط‌های کشت سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو پلاسمید نو ترکیب در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی، بیانگر فاکتور ۹ به میزان ۱۶ تا ۶۲ درصد توسط هر دو گروه سلول‌های دگرگون شده بود. هم چنین مقایسه نتایج حاصل از فعالیت انعقادی سلول‌های واجد سازه‌های نو ترکیب، نشانگر افزایش فعالیت فاکتور ۹ بیان شده به میزان ۱ تا ۲۸ درصد در محیط کشت سلول‌های دگرگون شده با سازه واجد اینترون نسبت به سلول‌های دگرگون شده با سازه فاقد اینترون بود. هم چنین آزمون رونوشت برداری معکوس، صحت فرآیند اسپیلیسینگ و بیان فاکتور ۹ از سلول‌های نو ترکیب را تایید نمود.

#### نتیجه گیری

در این تحقیق تأثیر مثبت حضور اینترون ۱ بتا گلوبین بر میزان بیان فاکتور ۹ انسانی نشان داده شد. در عین حال با ساخت پلاسمیدهای بیان کننده فاکتور ۹ انسانی، ابزار مناسبی برای بررسی پایداری سلول‌های ترانسفکت شده برای تولید فاکتور ۹ در محیط انتخابی به صورت سیستماتیک فراهم شد.

**کلمات کلیدی:** فاکتور ۹، بتاگلوبین‌ها، اینترون‌ها، سلول‌های CHO

تاریخ دریافت: ۱۰/۴/۸۶

تاریخ پذیرش: ۳/۱۲/۸۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی - دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۳۴۳

۳- PhD علوم سلولی و مولکولی - استادیار دانشگاه خلیج فارس بوشهر

۴- PhD بیوشیمی - استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

**مقدمه**

هموفیلی B یا کریسمس، از بیماری‌های مورد توجه درمان با استفاده از ژن درمانی است. هموفیلی B یکی از بیماری‌های مسیر انعقادی است که در نتیجه اختلال و یا کمبود فاکتور ۹ حاصل می‌شود. این بیماری به صورت مغلوب و وابسته به کروموزوم X به ارث می‌رسد و میزان تواتر آن ۱/۳۰۰۰۰۰ مرد در جهان است (۱). درمان این بیماری به وسیله تزریق فاکتور ۹ استخراج شده از پلاسمای طبیعی انسانی و اخیراً نوع نوترکیب آن رایج است. مطالعات در راستای افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتی با هدف ژن درمانی به صورت *ex vivo* و *in vivo* و یا تولید پروتئین در شرایط *in vitro* در دستور کار آزمایشگاه‌های متعددی در دنیا قرار گرفته است. بالا بردن بیان پروتئین‌های نوترکیب، نیازمند استفاده از پلاسمیدهای بیانی مجهز به عناصر تنظیمی با نقش افزاینده است (۲). به طور کلی عناصر تنظیمی در نواحی غیر کدکننده ژنی قرار گرفته‌اند (۳-۵). بیش از ۹۰٪ از توالی‌های ژنومی در انسان و دیگر مهره‌داران متعلق به توالی‌های غیر کدکننده و یا توالی‌های کدکننده با فعالیت نامعلوم است (۶، ۷). عناصر ژنتیکی شناخته شده یوکاریوتی که نقش کلیدی در تنظیم میزان بیان ژن‌ها دارند، به طور عمده شامل پروموتورها در بالادست ژن‌ها، افزاینده‌ها (Enhancers) در بالادست یا پایین دست ژن‌ها، توالی‌های خاتمه دهنده رونویسی و نیز توالی‌های موثر در فرایند پلی‌آدنیلاسیون در پایین دست ژن‌ها هستند.

هم چنین می‌توان به برخی عناصر مجاور ژن اشاره کرد که تنظیم بعد از نسخه‌برداری را به عهده دارند و در نواحی غیر قابل ترجمه ۵' و ۳' در دو انتهای ژن قرار دارند (۱۰-۸). در نواحی داخلی ژن، اینترون‌ها در رابطه با دارا بودن عوامل تنظیمی، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص می‌دهند. این توالی‌ها بخشی از نواحی غیر کدکننده داخل ژنی هستند که عموماً نسبت به نواحی کدکننده ژنی طول بزرگتری را به خود اختصاص می‌دهند. تعداد و طول اینترون‌ها در ژن‌های مختلف به ترتیب از صفر تا ۷۵ و از ۶۵ تا چند هزار جفت باز متغیر است (۱۱). صرف مقادیر زیاد انرژی و مواد برای تکثیر و حفظ اینترون‌ها، موید

نقش مفید اینترون‌ها در سلول است. تاثیر پلی‌مورفیسم برخی از نواحی اینترونی با سبب‌شناسی بیماری‌ها نیز نشان داده شده است (۱۲). گزارش‌ها نشان می‌دهد که بیان ژن در مواردی در حضور اینترون می‌تواند ۸ تا ۵۰۰ برابر افزایش یابد (۱۳). لذا استفاده از اینترون‌ها در جهت بالا بردن بیان پروتئین‌های نوترکیب، مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته است (۱۴، ۱۵). تغییرات بیانی یک ژن که به حضور اینترون نسبت داده می‌شود، به عوامل جنبی متعددی چون موقعیت فیزیکی اینترون در ژن بومی از نظر فاصله آن از دو انتهای ۵' یا ۳' ژن وابسته است (۱۶). نتایج بسیاری از آزمایش‌ها نشان داده است که اینترون نزدیک به پروموتور، کارایی بیشتری در تنظیم بیان ژن دارد (۱۳-۱۵، ۴). حضور توالی‌های افزاینده بیان ژن و نیز توالی‌های مربوط به جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در اینترون‌ها، از جمله عوامل تاثیرگذار این توالی‌ها بر بیان ژن هستند (۱۲، ۵). تاثیر اینترون‌ها بر خروج محصول رونویسی از هسته به سیتوپلاسم نیز بر میزان بیان ژن تاثیرگذار است، در این رابطه در حضور اینترون، مجموعه‌ای پروتئینی به نام EJC (Exon Junction Complex) تشکیل می‌شود، این مجموعه به کمک برهمکنش با ناقل‌های انتقالی غشای هسته، خروج محصول رونویسی را تسهیل می‌کند (۱۷، ۱۸). برهمکنش مجموعه EJC با ناقل‌های غشایی در گروهی از ژن‌ها قوی بوده و خروج محصول رونویسی را بسیار تحت تاثیر قرار می‌دهد، بیان ژن‌های واجد این گونه اینترون‌ها به شدت وابسته به وجود اینترون است (۲۰، ۱۹). بیان ژن‌هایی نظیر ژن بتاگلوبین به شدت وابسته به حضور اینترون است به طوری که در غیاب اینترون، محصول رونویسی توانایی بسیار کمی در خروج از هسته دارد و علی‌رغم تولید در هسته باقی مانده و ترجمه نمی‌شود (۲۰، ۱۹). ژن بتاگلوبین انسانی دارای دو اینترون به طول‌های ۱۳۰ و ۸۵۰ جفت باز است (۲۱). به طور نسبی میزان تراکم عناصر اتصالی به فاکتورهای رونویسی در اینترون ۱ این ژن بیشتر از اینترون ۲ است که می‌تواند انعکاسی از اهمیت اینترون ۱ این ژن در بالا بردن بیان ژن باشد (۲۲). به این ترتیب اینترون‌های ژن بتاگلوبین انسانی از نظر توانمندی در خروج محصول رونویسی به سیتوپلاسم، گزینه‌های مناسبی جهت بررسی

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده و کاربرد آنها

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	کاربرد جفت آغازگر	شماره PCR
hFIXE1-F hFIXE1-R	5'-GGATCC GTT ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC-3' 5'-AAC CTT GAT ACC AAC CTG TAC ATT CAG CAC TGA GTA GAT ATC CTA-3'	تکثیر آگزون ۱ از cDNA فاکتور ۹	۱
hB11-F hB11-R	5'-AGT GCT GAA TGT ACA GGT TGG TAT CAA GGT TAC AAG ACA GG 3' 5'-ATG ATC AAG AAA AAC TAA GGG TGG GAA AAT AGA CCA ATA G 3'	تکثیر اینترون ۱ بتاگلوبین از ژنوم انسانی	۲
hFIXE2-F hFIXE4-R	5'-TTT TCC CAC CCT TAG TTT TTC TTG ATC ATG AAA ACG CCA AC 3' 5'-CCT TGC AAC TGC CGC CA TTTAAA C 3'	تکثیر آگزون‌های ۲ تا ۴ از cDNA فاکتور ۹	۳
hFIXE1-F hB11-R	5'-GGATCC GTT ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC 3' 5'-ATG ATC AAG AAA AAC TAA GGG TGG GAA AAT AGA CCA ATA G 3'	اتصال قطعات حاصل از PCR ۱ و ۲ (SOE-Mediated PCR)	۴
hFIXE1-F hFIXE4-R	5'-GGATCC GTT ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC 3' 5'-CCT TGC AAC TGC CGC CA TTTAAA C 3'	اتصال محصولات PCR ۳ و ۴ (SOE-Mediated PCR 2)	۵
hIX-R1 hFIX-F2	5'-GCGGCCGCAGTGATTAGTTAGTGAGAGGCC 3' 5'-GCC ATGGCCCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACT 3'	انجام فرآیند کلونی PCR	۶
hFIXE2-R hFIXE4-R hFIXE1-F	5'-GAAGCTTTCCTCCCTTTGTGGAAGACTCTTCCC-3' 5'-CCT TGC AAC TGC CGC CA TTTAAA C 3' 5'-GGATCC GTT ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC 3'	انجام فرآیند RT-PCR	

افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران هستند. تراکم انبوه توالی‌های اتصال به فاکتورهای رونویسی در اینترون ۱ این ژن، این اینترون را کارتر از اینترون ۲ نشان می‌دهد، از طرفی به دلیل کوتاه بودن طول آن نسبت به سایر اینترون‌ها و اینترون ۲ ژن بتاگلوبین، دستورزی سازه نوترکیب آن آسان‌تر خواهد بود، همچنین کوتاه بودن این اینترون امکان استفاده از طول کامل آن در حد واسط دو آگزون در جهت تشکیل کمپلکس EJC را فراهم می‌سازد. بر این اساس استفاده از اینترون ۱ ژن بتا گلوبین انسانی (H1B)، با هدف افزایش بیان cDNA فاکتور ۹ در سلول‌های CHO در دستور کار این پژوهش قرار گرفت. در این مطالعه مراحل همسانه‌سازی H1B بین آگزون‌های ۱ و ۲ cDNA فاکتور ۹ انسانی و نیز تاثیر این اینترون بر میزان بیان موقت cDNA فاکتور ۹ انسان مورد بررسی قرار گرفته است.

افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران هستند. تراکم انبوه توالی‌های اتصال به فاکتورهای رونویسی در اینترون ۱ این ژن، این اینترون را کارتر از اینترون ۲ نشان می‌دهد، از طرفی به دلیل کوتاه بودن طول آن نسبت به سایر اینترون‌ها و اینترون ۲ ژن بتاگلوبین، دستورزی سازه نوترکیب آن آسان‌تر خواهد بود، همچنین کوتاه بودن این اینترون امکان استفاده از طول کامل آن در حد واسط دو آگزون در جهت تشکیل کمپلکس EJC را فراهم می‌سازد. بر این اساس استفاده از اینترون ۱ ژن بتا گلوبین انسانی (H1B)، با هدف افزایش بیان cDNA فاکتور ۹ در سلول‌های CHO در دستور کار این پژوهش قرار گرفت. در این مطالعه مراحل همسانه‌سازی H1B بین آگزون‌های ۱ و ۲ cDNA فاکتور ۹ انسانی و نیز تاثیر این اینترون بر میزان بیان موقت cDNA فاکتور ۹ انسان مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

سوش باکتری، رده سلولی پستانداران، پلاسمیدها و آغازگرها  
مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سوش باکتری

محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها  
محیط کشت LB (Luria-Bertani) به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد. آمپی‌سیلین، کانامایسین، ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) و X-gal (به ترتیب با غلظت ۳۰،

آغازگر hFIXE<sub>1</sub>-F/hBI<sub>1</sub>-R به هم‌دیگر متصل شدند (PCR4). محصولات واکنش‌های PCR4 و PCR3 با انجام دومین واکنش SOE-Mediated PCR و با استفاده از زوج آغازگر hFIXE<sub>1</sub>-F/hFIXE<sub>4</sub>-R به یکدیگر متصل شده و به این ترتیب اینترون ۱ ژن بتاگلوبین بین اگزون‌های ۱ و ۲ ژن فاکتور ۹ قرار گرفت (PCR5). محصول PCR5 پس از همسانه‌سازی در PTZ57RT و هضم با زوج آنزیم BamHI و DraI در سازه حدواسط pET26-hFIX وارد گردید و سازه نو ترکیب pET26-hFIX-I که واجد اینترون ۱ است به دست آمد. سرانجام به وسیله آنزیم‌های BamHI/NotI، cDNA فاکتور ۹ انسانی که حاوی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین است (hFIX-I) به پلاسمید pcDNA3 منتقل و سازه نو ترکیب pcDNA3-hFIX-I ساخته شد.

#### تعیین توالی

قطعات کلون شده در سازه‌های نو ترکیب pTZ57R/T-E1-I1-E2-4 (به عنوان سازه‌ای حدواسط شامل اینترون ۱ ژن بتاگلوبین و اگزون‌های ۱ تا ۴ ژن فاکتور ۹)، pcDNA3-hFIX (شامل cDNA ژن فاکتور ۹) و pcDNA3-hFIX-I (شامل اینترون ۱ ژن بتاگلوبین و cDNA ژن فاکتور ۹) از هر دو رشته کاملاً تعیین توالی شد. توالی‌های مذکور با استفاده از دستگاه ABI 373 (آلمان - MWG) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تعیین گردید. مقایسه توالی‌های حاصله با استفاده از برنامه BLAST بر علیه بانک ژنی انجام شد (۲۵).

#### کشت سلول و ترانسفکشن

سلول‌های CHO در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فشار ۵٪ CO<sub>2</sub> و در محیط کشت ترکیبی Hams-F12 و DMEM با نسبت ۱/۱ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین G و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین غنی، رشد داده شدند. ترانسفکشن با دو روش کلسیم - فسفات و فیوژن - ۶ در پلیت‌های شش خانه‌ای صورت گرفت. برای این منظور سلول‌های CHO حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن در تراکم ۱۳۰،۰۰۰ - ۱۱۰،۰۰۰ سلول به ازای هر خانه کشت داده شدند. برای انجام ترانسفکشن با

۱۰۰، ۲۰ و ۲۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شدند. آنزیم‌های EcoRV، DraI، NotI و T4 DNA Ligase، جنیتیسین (G-418)، کیت‌های تخلیص محصول PCR، پلاسمید، RNA و عامل ترانسفکشن فیوژن - ۶ و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس M-Mulv از شرکت ژوش (آلمان) خریداری گردیدند. آنزیم BamHI و Hinfl و پلاسمید PTZ57RT از سیناژن (ایران) خریداری شد. پلاسمای فاقد فاکتور ۹ انسانی از شرکت دیاگنوستیکا استاگو (فرانسه) خریداری شد. پلاسمای طبیعی انسان با هدف رسم نمودار استاندارد آزمایش انعقادی فاکتور ۹ به صورت اهدایی از سازمان انتقال خون ایران به دست آمد. محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) و Hams-F12 از شرکت جیبکو (آمریکا) جهت رشد سلول‌های CHO استفاده شد.

#### دست‌ورزی‌های DNA

همه مراحل دست‌کاری DNA بر اساس روش‌های استاندارد کلونینگ انجام شد (۲۴). همسانه‌سازی cDNA فاکتور ۹ در پلاسمید pcDNA3 با استفاده از واکنش‌های هضمی سازه نو ترکیب pK14hFIX انجام شد. DNA کروموزومی استخراج شده از خون انسان و cDNA فاکتور ۹ حاصله از هضم سازه نو ترکیب pK14hFIX به ترتیب به عنوان الگو برای تکثیر IIB و اگزون‌های ۱ تا ۴ فاکتور ۹ انسانی مورد استفاده قرار گرفتند. همسانه‌سازی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین در حد فاصل اگزون‌های ۱ و ۲ cDNA ژن فاکتور ۹ به وسیله سه واکنش PCR استاندارد و دو واکنش SOE-Mediated PCR (Splice Overlap extension mediated PCR) انجام پذیرفت. به این منظور DNA کروموزومی استخراج شده از خون انسان و cDNA فاکتور ۹ به ترتیب به عنوان الگو جهت تکثیر اینترون ۱ بتاگلوبین (PCR2)، اگزون ۱ ژن فاکتور ۹ (PCR1) و اگزون‌های ۲ تا ۴ فاکتور ۹ (PCR3) مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

اگزون ۱ ژن فاکتور ۹ و اینترون ۱ ژن بتاگلوبین با استفاده از اولین واکنش SOE-Mediated PCR و جفت

سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس  $100 \mu\text{l}$  کلسیم کلرید mM ۲۵ از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری شد و فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین گردید.

### آزمون RT-PCR

RNA تام از سلول‌های نوترکیب ترانسفکت شده با مینی ژن واجد اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی با استفاده از کیت تخلیص RNA استخراج شد. سپس cDNA توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس m-MuV با استفاده از RNA تیمار شده با DNAase عاری از RNAase به عنوان الگو و آغازگرهای هگزامر تصادفی (Random Hexamer) طبق روش استاندارد در دو مرحله متوالی ساخته شد. از محصول رونوشت‌برداری معکوس به عنوان الگو جهت تکثیر قطعاتی از cDNA ژن فاکتور ۹ با طول‌های ۳۱۰ و ۲۵۱ به ترتیب با کاربری جفت آغازگرهای hFIXE1-F/hFIXE4-R و hFIXE-F/hFIXE2-R استفاده شد.

### یافته‌ها

#### ساخت سازه نوترکیب

ساخت سازه نوترکیب pcDNA3-hFIX برای بیان cDNA فاکتور ۹ به عنوان کنترل مثبت پس از برش پلاسمیدهای pcDNA3 و pK14hFIX با آنزیم‌های BamHI/NotI و cDNA فاکتور ۹ (hFIX-cDNA) و اتصال آن‌ها انجام گرفت (شکل ۱). ساختار سازه نوترکیب مذکور با استفاده از آنالیز مولکولی به شرح زیر تایید گردید. از برش این پلاسمید با آنزیم‌های BamHI/NotI به طور انفرادی قطعه‌ای به طول ۶۹۰۹ جفت باز به دست آمد و از هضم توام آن با آنزیم‌های مذکور، دو قطعه با طول‌های ۵۳۸۸ و ۱۴۵۹ جفت باز حاصل شد که به ترتیب نشانگر فرم‌های خطی pcDNA3 و cDNA ژن فاکتور ۹ هستند (شکل ۲- الف).

برای ساخت سازه نوترکیب واجد اینترون، hFIX-cDNA پس از برش با آنزیم‌های BamHI/NotI در pET26 همسانه‌سازی شد و سازه نوترکیب pET26-hFIX به دست آمد (شکل ۱). ساختار سازه نوترکیب مذکور با استفاده از آنالیز مولکولی به شرح زیر تایید گردید. این آنالیز با

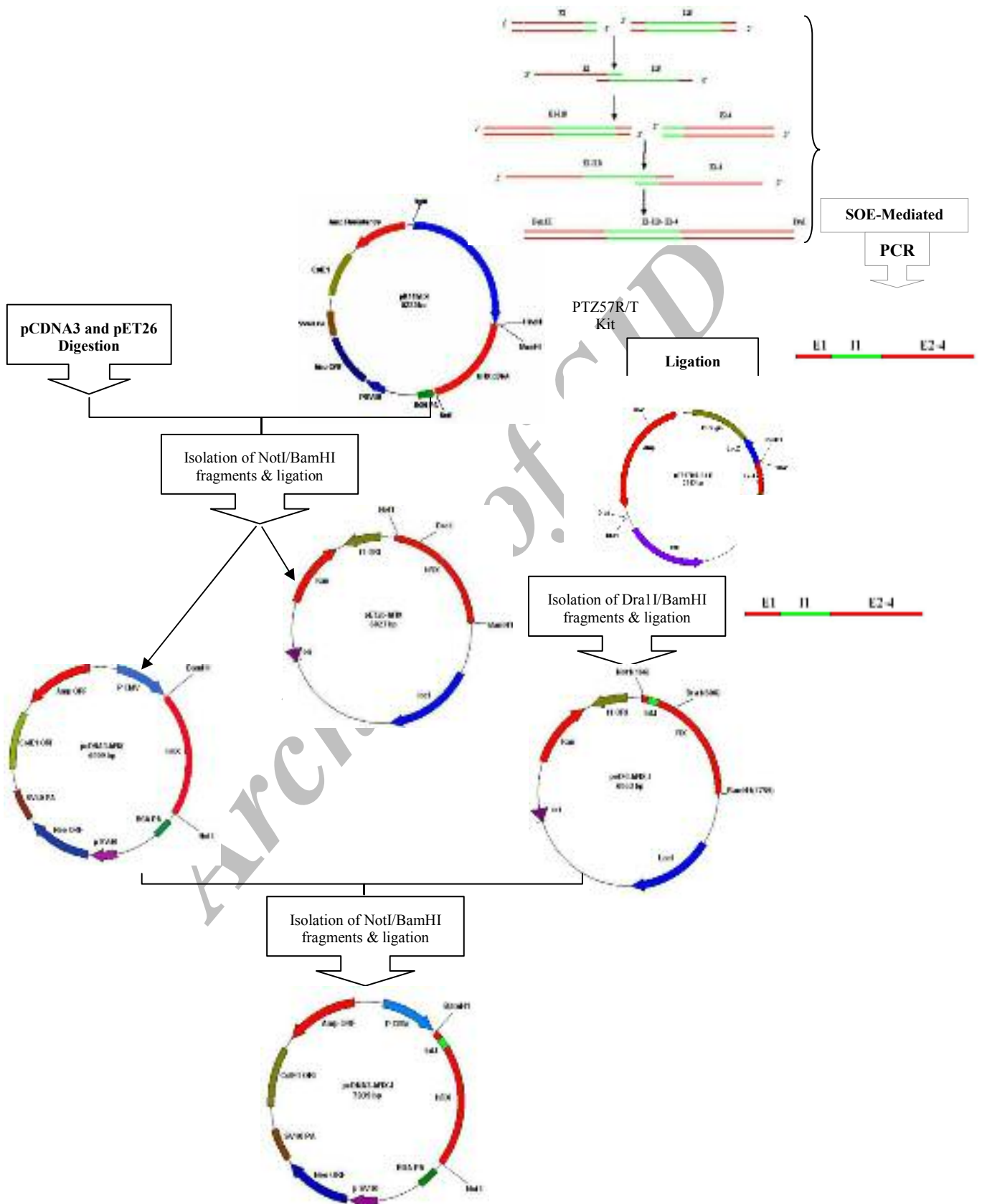
استفاده از فیوژن - ۶،  $3 \mu\text{l}$  از فیوژن - ۶ با  $97 \mu\text{l}$  محیط کشت پایه (فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. به مخلوط فوق  $2 \mu\text{g}$  از سازه نوترکیب اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط نهایی سپس مستقیماً به سلول‌ها در  $2 \text{ ml}$  محیط کشت پایه اضافه گردید. برای واکنش ترانسفکشن به روش کلسیم فسفات،  $100 \mu\text{l}$  از  $2/5$  مول  $\text{CaCl}_2$  با  $25 \mu\text{g}$  از سازه نوترکیب در یک لوله استریل ریخته و با  $0.1 \times \text{TE}$  حجم به  $1 \text{ ml}$  رسانیده شد. سپس یک حجم از محلول فوق را با یک حجم از  $2 \times \text{HEPES}$  بافر شده با سالیین قطره قطره خوب مخلوط کرده، محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

به هر  $1 \text{ ml}$  از محیط کشت،  $100 \mu\text{l}$  از محلول نهایی اضافه گردید و واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس محیط کشت پایه جمع‌آوری و محیط کشت کامل (این محیط غیر از ترکیبات ضروری برای رشد سلول‌ها واجد ویتامین K باغلظت ۵۰۰ نانوگرم به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت است) به سلول‌ها اضافه گردید. روز دوم و سوم (حدود ۴۸ و ۷۲ ساعت) پس از ترانسفکشن، محیط کشت برای بررسی جمع‌آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد.

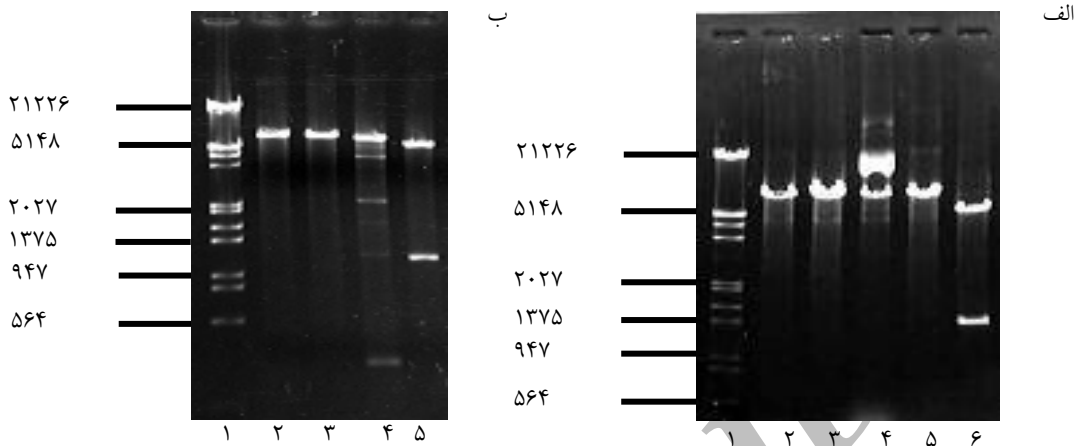
#### اندازه‌گیری فعالیت انعقادی فاکتور ۹ انسانی:

فعالیت بیولوژیک فاکتور ۹ بیان شده با استفاده از پلاسمای انسانی فاقد فاکتور ۹ و PTT (Activated partial Thromboplastine) فعال شده مطابق با دستورالعمل فراهم شده به وسیله شرکت تولید کننده تعیین گردید. برای تخمین میزان فعالیت فاکتور ۹ انسانی بیان شده، از نمودار استاندارد استفاده شد که با استفاده از فعالیت انعقادی ۵ رقت مختلف از پلاسمای سیتراته شده طبیعی انسان ( $1/10$ ،  $1/20$ ،  $1/40$ ،  $1/80$ ،  $1/160$ ) روی کاغذ تمام لگاریتمی بر علیه زمان انعقاد ترسیم شده بود.

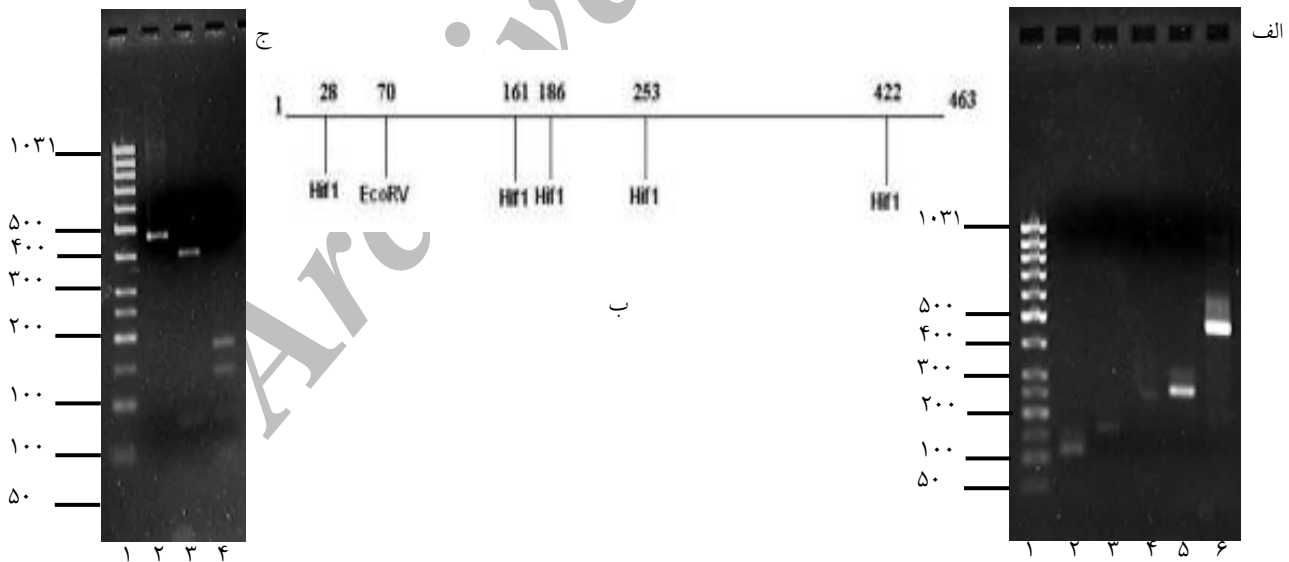
برای انجام آزمایش انعقادی  $100 \mu\text{l}$  از هر نمونه با  $100 \mu\text{l}$  از پلاسمای فاقد فاکتور IX و  $100 \mu\text{l}$  از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه



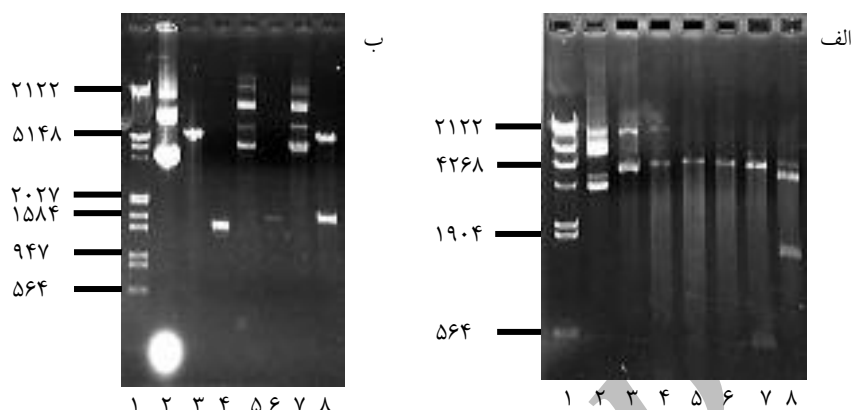
شکل ۱: مراحل سوئینگ PCR و ساخت سازه‌های نو ترکیب حد واسط و بیانی به صورت شماتیک



شکل ۲: آنالیز مولکولی سازه‌های نو ترکیب. الف: سازه نو ترکیب pcDNA3-hFIX ردیف ۱: مارکر *HindIII/EcoR I*. ردیف‌های ۲، ۳، ۴ و ۵: شکل‌های خطی شده pCDNA3-hFIX با *BamH I* و *Not I*. ردیف ۶: هضم توام pCDNA3-hFIX با *BamH I* و *Not I*. ب: سازه نو ترکیب pET26-hFIX. ردیف ۱: مارکر *Hind III/Ecor I*. ردیف ۲ و ۳: شکل‌های خطی شده pET26-hFIX به ترتیب با *BamHI* و *Dra I*. ردیف ۴: هضم توام pET26-hFIX با دو آنزیم *BamHI* و *DraI*. ردیف ۵: هضم توام pET26-hFIX با *BamHI* و *Dra I*.



شکل ۳- مراحل ساخت و آنالیز مولکولی قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4. شکل ۳- الف- مراحل ساخت ردیف ۱: مارکر ۵۰ جفت بازی، ردیف ۲: محصول PCR1 (اگزون ۱ فاکتور ۹). ردیف ۳: محصول PCR2 (اینترون ۱ بتاگلوبین). ردیف ۴: محصول SOE-Mediated PCR1 (E1-I1). ردیف ۵: محصول PCR3 (اگزون ۲ تا ۴ فاکتور ۹). ردیف ۶: محصول SOE-Mediated PCR2 (E1-I1-E2-4). شکل ۳- ب: نقشه آنزیمی قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4. شکل ۳- ج: آنالیز مولکولی قطعه نو ترکیب. ردیف ۱: مارکر ۵۰ جفت بازی، ردیف ۲: قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4، ردیف ۳: هضم قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 با *EcoRV*. ردیف ۴: هضم قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 با *HinfI* (باند های سبک DNA در عکس قابل رؤیت نیست).



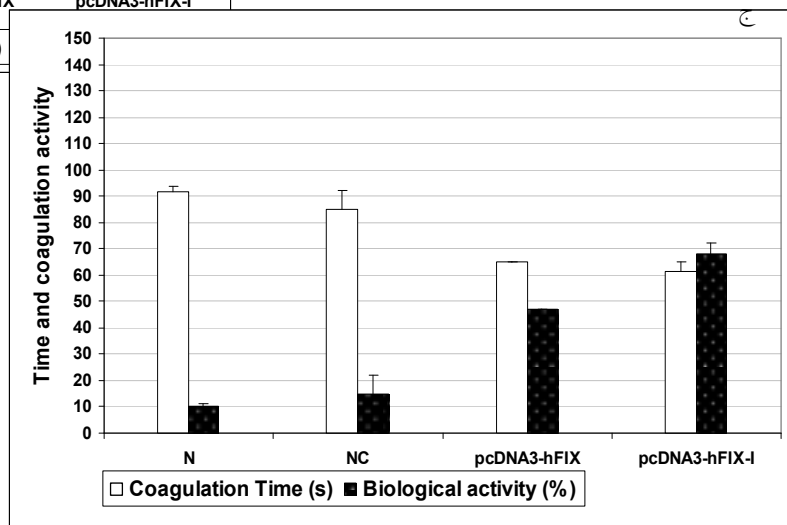
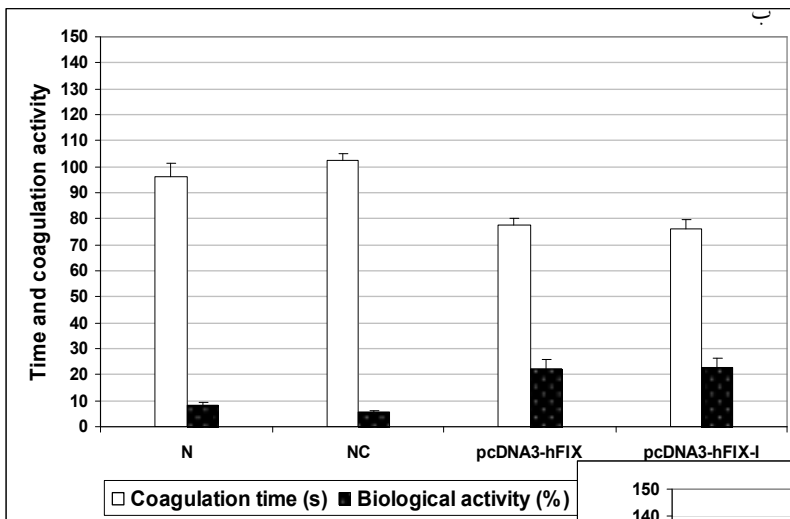
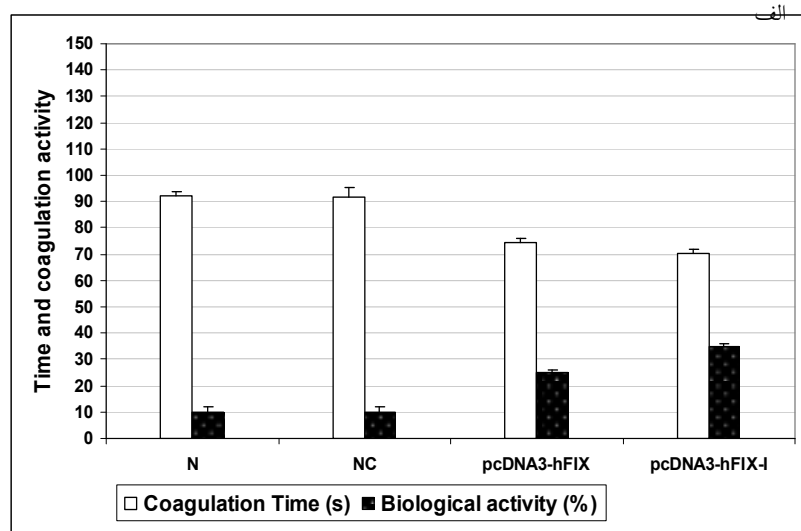
شکل ۴- آنالیز مولکولی سازه های نو ترکیب. الف: سازه نو ترکیب pET26-hFIX-I ردیف ۱: مارکر *Hind III* ردیف ۲: پلاسمید pET26، ردیف ۳: سازه نو ترکیب pET26-hFIX-I، ردیف ۴، ۵ و ۶: شکل های خطی شده pET26-hFIX-I به ترتیب با *BamHI*، *NotI* و *DraI*، ردیف ۷: همضم توام pET26-hFIX-I با دو آنزیم *BamHI* و *DraI*، ردیف ۸: همضم توام pET26-hFIX-I با *BamHI* و *NotI*، ب: pET26-hFIX-I، ردیف ۱: مارکر *Hind III/EcoRI*، ردیف ۲: پلاسمید pcDNA3، ردیف ۳: همضم توام pcDNA3 با *BamHI* و *NotI*، ردیف ۴: cDNA ژن فاکتور ۹، ردیف ۵: سازه نو ترکیب pcDNA3-hFIX، ردیف ۶: cDNA نو ترکیب ژن فاکتور ۹، ردیف ۷: سازه نو ترکیب pcDNA3-hFIX-I، ردیف ۸: همضم توام سازه نو ترکیب pcDNA3-hFIX-I با *BamHI* و *NotI*.

آنزیم های *NotI* و *DraI* به طور انفرادی و توام انجام شد. حاصل همضم سازه نو ترکیب با هر یک از آنزیم های مذکور قطعه ای به طول ۶۸۲۳ جفت باز (فرم خطی pET26-hFIX) است، و از همضم توام آن با آنزیم های *BamHI/NotI*، دو قطعه به طول های ۵۳۲۸ و ۱۴۵۹ جفت باز در ارتباط با فرم های خطی pET26 و cDNA-hFIX حاصل آمد. از همضم توام آن با آنزیم های *BamHI/DraI* نیز دو قطعه به طول های ۶۴۷۱ و ۳۱۶ جفت باز حاصل آمد، این قطعات در ارتباط با فرم خطی پلاسمید pET26-hFIX می باشد که فاقد اگزون های ۱ تا ۴ و قطعه E1-E2-4 از cDNA ژن فاکتور ۹ است (شکل ۲-ب). با هدف همسانه سازی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین در حد فاصل اگزون های ۱ و ۲ cDNA ژن فاکتور ۹، در جریان سه واکنش PCR قطعات همپوشان مربوط به اگزون شماره ۱ ژن فاکتور ۹ (E1) (PCR1)، 11B (PCR2) و اگزون های شماره ۲ تا ۴ ژن فاکتور ۹ (E2-4) (PCR3) به ترتیب با استفاده از زوج آغازگرهای  $hFIXE_1 - F / hBI_1 - R$ ،  $hFIXE_1 - F / hFIXE_1 - R$  و  $hFIXE_1F/hFIXE_{2,4}R$  تکثیر شدند. اتصال محصولات به دست آمده از ۳ واکنش PCR مذکور در جریان دو واکنش SOE-PCR صورت گرفت و قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 (حاوی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین در حد فاصل

اگزون های ۱ و ۲ ژن فاکتور ۹) به دست آمد (شکل ۳-الف). مراحل SOE-PCR، ساخت سازه های نو ترکیب و حدوداً در شکل شماتیک ۱ به تصویر کشیده شده است. آنالیز مولکولی قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 پس از برش با آنزیم های *EcoRV* و *Hinf I* تایید گردید. با توجه به نقشه آنزیمی، از همضم قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 با آنزیم *EcoRV*، دو قطعه با طول های ۷۰ و ۳۹۳ جفت باز حاصل شد و از طرفی همضم آنزیمی قطعه مذکور با آنزیم *Hinf I*، ۶ قطعه با طول های ۲۸، ۱۳۳، ۲۵، ۶۷، ۱۶۹ و ۴۱ جفت باز حاصل شد که برخی از قطعات آن در ژل آشکار نیست (شکل ۳-ب و ج). همسانه سازی قطعه نو ترکیب E1-I-E2-4 در وکتور کلونینگ pTZS7R/T با هدف ایجاد جایگاه برش آنزیمی انجام شد و پس از آن با استفاده از واکنش همضمی با *BamHI/DraI*، قطعه نو ترکیب جایگزین اگزون های ۱ تا ۴ در سازه نو ترکیب pET26-hFIX گردید و سازه نو ترکیب pET26-hFIX-I حاصل شد. صحت سازه نو ترکیب pET26-hFIX-I با استفاده از واکنش همضمی با آنزیم های *BamHI* و *DraI* و *NotI* به صورت انفرادی و توام تایید شد (شکل ۴-الف).

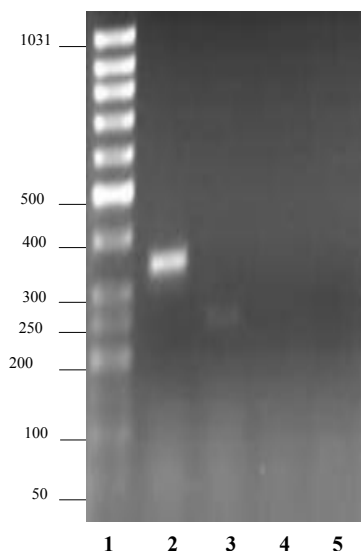
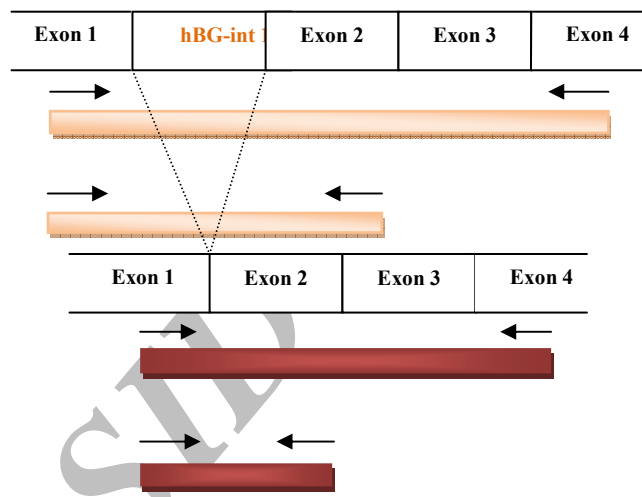
سرانجام پس از اطمینان از صحت مراحل همسانه سازی، cDNA فاکتور ۹ انسانی حاوی اینترون شماره ۱ ژن





شکل ۵: بررسی فعالیت انعقادی محیط کشت به دست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نو ترکیب در مقایسه با هم و کنترل‌ها. الف: ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با روش فیوژن-۶. ب: ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن با روش فیوژن-۶. ج: ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات. محیط کشت از سلول‌های ترانسفکت نشده با N و محیط کشت از سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3 با NC نشان داده شده‌اند.

الف



شکل ۶: اندازه قطعات حاصل از PCR تاییدی بر روی محصول رونویسی برداری معکوس که انتظار آن می‌رود و الگوی حرکتی قطعات حاصل از PCR. الف: نقشه فیزیکی قطعات حاصل از PCR که انتظار آن می‌رود. ب: الگوی حرکتی قطعات حاصل از PCR. ردیف ۱: مارکر ۵۰ bp. ردیف ۲: قطعه ۳۱۰ جفت بازی تکثیر شده با استفاده از جفت پرایمر hFIXE1-F/ hFIXE4-R. ردیف ۳: قطعه ۲۵۱ جفت بازی تکثیر شده با استفاده از جفت پرایمر hFIXE2-R /hFIXE1-F. ردیف ۴: کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNAase عاری از RNAase به عنوان الگو) ردیف ۵: کنترل منفی (آب بعنوان الگو).

جمع‌آوری شده در روزهای دوم و سوم پس از واکنش ترانسفکشن جهت بیان احتمالی فاکتور ۹ با استفاده از آزمایش انعقادی یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. کاهش معنی‌دار زمان انعقاد محیط کشت جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب pcDNA3-hFIX-1 و pcDNA3-hFIX در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی، نشانگر وجود فعالیت انعقادی با افزایش ۱۶ تا ۶۲ درصدی توسط سلول‌های نوترکیب بود. این فعالیت انعقادی، بیان و ترشح فاکتور ۹ نوترکیب توسط سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو سازه نوترکیب به محیط کشت را اثبات می‌کند. از سوی دیگر فعالیت فاکتور ۹ در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه و اجدهای اینترون، مبین صحت فرآیند اسپلایسینگ و حذف IIB از محصول پیش رونویسی شده مینی‌ژن ساخته شده است. کاهش زمان انعقاد محیط سلول‌های ترانسفکت شده با سازه و اجدهای اینترون، نمایانگر افزایش فعالیت انعقادی فاکتور ۹ به میزان ۱ تا ۲۸ درصد در مقایسه با محیط سلول‌های ترانسفکت شده با سازه فاقد اینترون بود.

بتاگلوبین از سازه pET26-hFIX-I با استفاده از آنزیم‌های *BamHI/NotI* در پلاسמיד pcDNA3 همسانه‌سازی شد (شکل ۱). آنالیز مولکولی سازه نوترکیب pcDNA3-hFIX-I با استفاده از آنزیم‌های *BamH I* و *Not I* به صورت انفرادی و توأم صورت پذیرفت (شکل ۴-ب). صحت توالی‌های همسانه‌سازی شده در سازه‌های بیانی pcDNA3-hFIX-I و pcDNA3-hFIX با استفاده از تعیین توالی نیز تایید شد.

#### ترانسفکشن و بررسی بیان فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های CHO

با هدف بررسی اثر اینترون ۱ ژن بتاگلوبین بر بیان فاکتور انعقادی شماره ۹ انسانی در سلول‌های CHO، سلول‌های کشت شده پس از ۲۴ ساعت و با تراکم ۵۰ تا ۷۰ درصد سطح ظرف برای ترانسفکشن با سازه‌های نوترکیب pcDNA3-hFIX-I و pcDNA3-hFIX مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش ترانسفکشن با روش‌های لیپوفکشن و کلسیم فسفات انجام شد. محیط‌های کشت

فسفات، صرف نظر از تاثیرگذاری احتمالی حضور کلسیم در محیط، می‌تواند بازخوردی از بالا بودن نسبی سلول‌های ترانسفکت شده در این روش باشد. *تایید صحت فرآیند اسپلایسینگ اینترون‌های هترولوگ ژن بتاگلوبین*

با هدف تایید وجود cDNA ژن فاکتور ۹ در محصول رونوشت برداری معکوس و نیز تایید صحت اسپلایسینگ فرآیند PCR از محصول رونوشت برداری معکوس با استفاده از دو جفت آغازگر hFIXE1-F/hFIXE4-R و hFIXE1-F/hFIXE2-R انجام شد. با توجه به موقعیت الگویابی آغازگرها بر cDNA ژن فاکتور ۹، انتظار می‌رود حاصل تکثیر جفت آغازگر مذکور در صورت حضور cDNA ژن فاکتور و اسپلایسینگ صحیح قطعاتی به طول‌های ۳۱۰ و ۲۵۱ جفت باز شد و چنانچه cDNA ژن فاکتور حضور داشته باشد ولی اسپلایسینگ صورت نگرفته باشد، قطعاتی به طول‌های ۴۴۰ و ۳۸۱ جفت باز انتظار می‌رود (شکل ۶ - الف). نتایج حاصل از واکنش PCR همان طوری که در شکل ۶ - ب نمایش داده شده است، قطعاتی به طول‌های ۳۱۰ و ۲۵۱ جفت باز بود، که تایید کننده وجود cDNA ژن فاکتور ۹ در محیط و هم چنین صحت فرآیند اسپلایسینگ اینترون ۱ ژن بتاگلوبین از cDNA ژن فاکتور ۹ بود.

## بحث

بررسی‌ها نشان داده است که حضور اینترون‌ها یا بخشی از آن‌ها در کنار یک ژن می‌تواند باعث تغییر در سطح بیان ژن شود (۲۷، ۲۶، ۱۳). لذا با توجه به اهمیت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی پستانداران، می‌توان از اینترون‌ها به عنوان عامل تنظیمی که می‌تواند افزایش بیان ژن باشند، جهت کارآمد کردن سازه‌های بیانی استفاده نمود (۲). بررسی تاثیرات این اینترون در بیان ژن‌های دهیدرو فولات رودکتاز (Dihydrofolate Reductase) و نیز ژن بتاگلوبین انسانی با الگوی مشابه گزارش شده است (۲۸، ۲۰). تحقیقات نشان می‌دهد که بیان بتاگلوبین در عدم حضور اینترون ۱ این ژن متوقف می‌شود، در حالی که حضور این اینترون باعث بیان آن می‌شود (۱۴). در پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر توالی

که این امر تاثیر مثبت حضور IIB در افزایش بیان فاکتور ۹ را آشکار نمود. زمان انعقاد و فعالیت انعقادی محیط کشت به دست آمده از هر واکنش ترانسفکشن سازه‌های نوترکیب در مقایسه با هم و کنترل‌ها در جدول ۲ و شکل ۵ ارایه شده است.

جدول ۲: زمان و فعالیت متوسط انعقادی فاکتور ۹ انسانی در محیط کشت سلول‌های نوترکیب و کنترل‌ها در روزهای دوم و سوم پس از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده با N نشان داده شده است.

زمان (ساعت)	عامل ترانسفکشن	نمونه‌ها	متوسط زمان انعقاد (ثانیه)	متوسط فعالیت انعقادی (%)
۴۸	فیوجین ۶	N	۹۲	۱۰
		pcDNA3(NC)	۹۱/۶۶	۱۰
		pcDNA3-hFIX	۷۴/۶۶	۲۵
۷۲	فیوجین ۶	pcDNA3-hFIX-I	۷۳/۳۳	۳۵
		N	۹۶	۸/۲۵
		pcDNA3(NC)	۱۰۲/۶۶	۵/۷۵
۷۲	کلسیم - فسفات	pcDNA3-hFIX	۷۷/۳۳	۲۲
		pcDNA3-hFIX-I	۷۶	۲۳
		N	۹۱/۵	۱۰
		pcDNA3(NC)	۸۵	۱۵
۶۸	کلسیم - فسفات	pcDNA3-hFIX	۶۵	۴۷
		pcDNA-hFIX-I	۶۱/۵	۶۸

مقایسه نسبت سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از روش‌های انتقالی کلسیم - فسفات و فیوژن ۶ زمان انعقاد محیط جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با روش کلسیم - فسفات در مقایسه با روش فیوژن ۶ - پس از ۷۲ ساعت، افزایش ۲۵ و ۴۵ درصدی فعالیت انعقادی را به ترتیب در رابطه با سلول‌های سازه‌های فاقد اینترون و واجد اینترون نشان می‌دهد. فعالیت انعقادی سلول‌های ترانسفکت شده با سازه فاقد cDNA فاکتور ۹ (پلاسمید مادری) در روش کلسیم - فسفات تنها ۹٪ افزایش یافته است. لذا افزایش فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در زمان به کارگیری کلسیم -

ژن بتاگلوبین، ۱ تا ۲۸ درصد نسبت به سازه فاقد اینترون افزایش یافته است که خود مبین افزایش بیان این ژن در حضور اینترون ۱ ژن بتاگلوبین است و این نتیجه نیز مطابق با سایر گزارش‌ها است.

در این پژوهش از دو روش انتقالی جهت ترانسفکشن سلول‌های CHO با سازه‌های نوترکیب استفاده شده است. هر چند در هر دو روش انتقالی، فعالیت انعقادی فاکتور ۹ به دست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب نسبت به کنترل منفی‌ها و نیز فعالیت انعقادی محیط حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه واجد اینترون نسبت به سازه فاقد اینترون افزایش یافته است، ولی میزان فعالیت فاکتور ۹ در روش انتقالی با کلسیم - فسفات نسبت به روش انتقالی با روش فیوژن - ۶، افزایش قابل توجهی نشان داده است، به طوری که مقایسه فعالیت انعقادی پس از ۷۲ ساعت، افزایش ۲۵ تا ۴۵ درصدی فعالیت انعقادی، به ترتیب از محیط‌های جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های فاقد اینترون و واجد اینترون را نشان داده است.

فعالیت انعقادی سلول‌های ترانسفکت شده با سازه فاقد cDNA فاکتور ۹ (پلاسمید مادری) در روش کلسیم فسفات در همین زمان پس از ترانسفکشن تنها ۹ درصد افزایش یافته است. لذا افزایش فعالیت فاکتور ۹ صرفه نظر از تاثیرگذاری احتمالی حضور کلسیم در محیط، می‌تواند بازخوردی از بالا بودن نسبت سلول‌های ترانسفکت شده به روش کلسیم - فسفات باشد. این در حالی است که بسیاری از گزارش‌ها نسبت انتقالی سازه‌های نوترکیب به روش کلسیم - فسفات را پایین‌تر از روش انتقالی فیوژن - ۶ گزارش نموده‌اند، البته این گزارش‌ها در مورد سلول‌های متفاوت از رده سلولی CHO است (۲۹).

نتایج حاصل از این آزمایش‌ها نشانگر نقش افزایش یافته اینترون ۱ ژن بتاگلوبین بر بیان ژن فاکتور ۹ است. این موضوع می‌تواند بازخوردی از تشکیل مجموعه پروتئینی EJC با برهمکنش قوی باشد که خروج mRNA بالغ از هسته را تسهیل نموده و به دنبال آن در پایداری محصول رونویسی موجود در سیتوپلاسم نیز تاثیرگذار است (۱۹، ۱۸). از سویی دیگر تراکم انبوهی از توالی‌های اتصال به

اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی بر بیان فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های CHO، اینترون ۱ ژن بتاگلوبین در جایگاه معادل خود در cDNA ژن فاکتور ۹ قرار داده شد و بیان فاکتور ۹ انسانی توسط مینی‌ژن ساخته شده در مقایسه با cDNA طبیعی فاکتور ۹ تحت کنترل پروموتور CMV مورد مطالعه قرار گرفت.

فعالیت فاکتور ۹ در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب، نشان‌دهنده بیان ژن فاکتور ۹ و هم چنین ترشح این فاکتور توسط سلول‌های نوترکیب در حضور و عدم حضور اینترون است. نتایج به دست آمده از فعالیت انعقادی محیط‌های کشت سلول‌ها مبین افزایش فعالیت انعقادی فاکتور ۹ بین ۱۶ تا ۶۲ درصد توسط سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب نسبت به سلول‌های کنترل منفی (N و NC) می‌باشد. این افزایش فعالیت انعقادی در زمان به کارگیری روش کلسیم فسفات، بیشتر نمایان می‌گردد که منعکس کننده کارآمدی نسبی این روش در طرح حاضر است.

از سوی دیگر فعالیت فاکتور ۹ مترشحه از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه نوترکیب واجد اینترون، صحت فرآیند اسپلایسینگ اینترون ژن بتاگلوبین در ژنی هترولوگ را تایید می‌کند. فرآیند اسپلایسینگ صحیح این اینترون، در ژن دهیدرو فولات رودکتاز (Dihydrofolate Reductase) به عنوان ژنی هترولوگ نیز تایید شده است (۲۸). در آن تحقیقات، اینترون ۱ ژن بتاگلوبین و برخی دیگر از اینترون‌ها با شماره‌های متفاوت جایگزین اینترون ۱ ژن دهیدروفولات ردوکتاز شده و ردیف DG44 از رده سلولی CHO مورد آزمون ترانسفکشن قرار گرفته است (۲۸). مقایسه سطح پروتئین بیان شده سازه‌های نوترکیب هترولوگ نسبت به کنترل، افزایش بالایی از بیان پروتئین دهیدروفولات ردوکتاز را نشان داده است. هم چنین مقایسه میزان بیان ژن دهیدروفولات ردوکتاز در سازه‌های هترولوگ نوترکیب نسبت به یکدیگر نشان می‌دهد که در حضور اینترون ۱ ژن بتاگلوبین، سطح بیان ۳۵ برابر افزایش یافته، در حالی که حضور سایر اینترون‌ها ۲ برابر سطح بیان ژن را تغییر می‌دهد (۲۸). نتایج حاصل از تحقیقات حاضر نیز نشان می‌دهد که فعالیت فاکتور ۹ در حضور اینترون ۱

مناسب جهت افزایش بیان سایر ژن‌های انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

### تشریح و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای دکتر ناصر امیری‌زاده جهت در اختیار گذاشتن پلاسمای طبیعی انسان و خانم فریبا عطایی برای فراهم سازی امکانات صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

فاکتورهای رونویسی در طول این اینترون، می‌تواند به عنوان علت موثر واقع شدن آن در افزایش بیان ژن فاکتور ۹ مطرح باشد (۲۲، ۵).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیقات ما توانایی اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی در افزایش تولید و ترشح فاکتور ۹ فعال را تایید می‌کند. از طرف دیگر این نتایج نشان می‌دهد که اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی می‌تواند به عنوان عنصری

**References :**

- 1- White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 1998; 9:1187-95.
- 2- Makrides SC. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 1999; 17(2):183-202.
- 3- Fong YW, Zhou Q. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 2001; 414: 929-933.
- 4- Ismail SI, Kingsman SM, Kingsman AJ, Uden M. Split-Intron Retroviral Vectors: Enhanced Expression with Improved Safety. *J Virol* 2000; 74: 2365-2371.
- 5- Rohrer J, Conley EM. Transcriptional Regulatory Elements within the first intron of bruton's tyrosine kinase. *Blood* 1998; 91:214-221.
- 6- Lander E S. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- 7- Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution* 2001; 55:1-24.
- 8- Larizza A, Makalowski W, Pesole G, Saccone C. Evolutionary dynamics of mammalian mRNA untranslated regions by comparative analysis of orthologous human, artiodactyl and rodent gene pairs. *Comput Chem* 2002; 26:479-490.
- 9- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 2001; 276:73-81.
- 10- Spicher A, Guicherit OM, Duret L, Aslanian A, Sanjines EM, Denko NC, et al. Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. *Mol Cell Biol* 1998; 18(12):7371-82.
- 11- Burglin TR, Barnes TM. Introns in Sequence Tags. *Nature* 1992; 357(6377):367-8.
- 12- Bergman J. The Functions of Introns : From Junk DNA to Designed DNA. Perspectives on Science and Christian Faith 2001; 53:170-178.
- 13- Furger A, O'Sullivan J M, Binnie A, Lee B A, Proudfoot Nick J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev* 2002 ; 16 (21): 2792- 9.
- 14- Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:836-40.
- 15- Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(2):478-82.
- 16- Chamary JV, Hurst LD. Similar Rates but Different Modes of Sequence Evolution in Introns and at Exonic Silent Sites in Rodents: Evidence for Selectively Driven Codon Usage. *Mol Biol Evol* 2004; 21(6):1014-23.
- 17- Lu S, Cullen BR. Analysis of the stimulatory effect of splicing on mRNA production and utilization in mammalian cells. *RNA* 2003; 9(5):618-30.
- 18- Dostie J, Dreyfuss G. Translation Is Required to Remove Y14 from mRNAs in the Cytoplasm. *Current Biol* 2002; 12(13):1060-67.
- 19- Jonsson JJ, Foresman MD, Wilson N, McIvor RS. Intron requirement for expression of the human purine nucleoside phosphorylase gene. *Nucleic Acids Res* 1992; 20(12):3191-8.
- 20- Buchman AR, Berg P. Comparison of Intron-Dependent and Intron-Independent Gene Expression. *Mol Cell Biol* 1988; 8(10):4395- 405.
- 21- National Center for Biotechnology Information, Homo sapiens beta-globin (HBB) gene, Accession: L48217.
- 22- Haddad Mashadrizeh A, Zomorodipour A, Hosseini SJ, Sabouni F. In silico investigation and synchronous application of introns 1 and 2 of human beta-globin to increase the expression of human coagulation Factor IX. *Iranian Journal of biology* 2008; 22. [in press]
- 23- Hosseini S J, Zomorodipour AR, Jalal R, Sabooni F. Design and construction of an epidermal keratinocyte-specific expression vector and study of the expression of human factor IX as a model. *SJIBTO* 2006; 3(1):17-27.
- 24- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>th</sup> ed. Cold spring harbor laboratory press; 2001.
- 25- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
- 26- O'Gorman W, Thomas B, Kwek KY, Furger A, Akoulitchev A. Analysis of U1 small nuclear RNA interaction with Cyclin H. *J Biol Chem* 2005; 280(44): 36920-5.
- 27- Plantier JL, Rodriguez MH, Enjolras N, Attali O, Negrier C. A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII. *Thromb Haemost* 2001; 86: 596-603.
- 28- NoeV, MacKenzie S, Ciudad CJ. An Intron Is Required for Dihydrofolate Reductase Protein Stability. *J Biol Chem* 2003; 278(40) : 38292-300.
- 29- Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Gressner AM. Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biol* 2000; 1: 4.

## The function of intron-1 of human beta globin gene on the expression of biologically active human factor IX in a mammalian cell line

Haddad Mashadrizesh A.A.<sup>1,2</sup>(MS), Zomorodipour A.<sup>1</sup>(PhD), Hosseini S.J.<sup>3</sup>(PhD), Sabouni. F.<sup>1</sup>(PhD)

<sup>1</sup>National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Immunology, Asthma & Allergy Research Institute, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Persian Gulf University, Boushehr, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

Several studies have shown the positive effects of introns on the expression of heterologous genes in mammalian hosts. In this study, transient expression increment of hFIX in the presence of intron-1 of human beta-globin was studied.

#### Materials and Methods

The intron-1 of human beta-globin (hBG) was introduced into the human factor IX cDNA in donor/acceptor site between exons 1 and 2. The constructed hFIX mini-gene and a native hFIX were inserted separately in two expression vectors next to the CMV promoter. After verification, the two recombinant plasmids with and without intron were used to transfect Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The cultured media taken from the transfected cells were examined for coagulation activity with a single step clotting test performed on FIX-deficient plasma. Then, to confirm the expression of recombinant hFIX by transfected cells, RT-PCR test was conducted.

#### Results

The preliminary data obtained from the expression analysis of the two groups of transfected cells in comparison with the cells with parental plasmid (as negative control) indicate of an increase of about 16 to 62% in coagulation activity of both groups of transfected cells. The same data show an enhanced hFIX coagulation activity of about 1 to 28% in the culture media taken from the cells with intron-containing hFIX-cDNA. Furthermore, RT-PCR confirmed correct splicing process and expression of hFIX from both transfected cells.

#### Conclusions

The positive function of hBG intron 1 on the expression of hFIX in CHO cells was shown. Besides, the constructed plasmids have provided tools for analysis of the stability of the transfected cells for production of biologically active hFIX in a systematic approach.

**Key words:** Factor IX, beta- Globins, Introns, cho cells

*SJIBTO 2009; 5(4): 209-223*

Received: 25 Dec 2007

Accepted: 21 Feb 2009

Correspondence: Zomorodipour A.R., PhD of Molecular Genetics. National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology.

P.O.Box: 14155-6343, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 445880348; Fax : (+9821) 44580395

E-mail: zomorodi@nigeb.ac.ir