

خون

دوره ۸ شماره ۲ تابستان ۹۰ (۹۶-۱۰۳)

مقاله پژوهشی

کلونسازی و مطالعه بیان فاکتور بافتی نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتیک CHO

مونا خورشیدفر^۱، ناصر امیریزاده^۱، مهریار حبیبی رودکنار^۲

چکیده سابقه و هدف

فاکتور بافتی (TF)، اصلی‌ترین آغازکننده آبشار انعقادی است. برای بررسی مسیر خارجی انعقاد، اندازه‌گیری زمان پرتوترومبین بهترین روش است که در این روش با توجه به TF به کار گرفته شده، نوساناتی در نتیجه آزمایش دیده می‌شود. در این مطالعه با هدف دستیابی به نتایجی با تکرارپذیری بیشتر، از TF نوترکیب استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. cDNA فاکتور بافتی در پلاسمید pcDNA3.1 CHO کلون و به سلول‌های متقل گردید. پروتئین‌های سلول‌های CHO ترانسفکت شده استخراج و پس از جداسازی با روش SDS-PAGE با وسترن بلات آنالیز شدند. سلول‌های CHO که TF را بیان می‌کردند در حضور کلوروکلسم به پلاسمای سیتراته افزوده شدند و زمان لخته شدن پلاسما ثبت گردید. فعال‌سازی فاکتور VII در پلاسما با روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در آنالیز پروتئین‌های جدا شده از سلول‌های ترانسفکت شده با روش SDS-PAGE، باندی حدود ۴۰ کیلو Dalton مشاهده شد که با آنتی‌بادی مونوکلونال TF در آنالیز وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. زمان انعقاد پلاسما در مقایسه با سلول‌های CHO ترانسفکت نشده، از 3 ± 3 دقیقه به 21 ± 3 ثانیه کاهش یافت. هم چنین اضافه کردن غشاء این سلول‌ها به پلاسما در حضور کلوروکلسم، موجب فعال‌سازی فاکتور VII به میزان 810 ± 35 ng/ml شد.

نتیجه‌گیری

TF نوترکیب بیان شده در سلول‌های CHO، قادر به لخته کردن پلاسمای سیتراته و فعال‌سازی فاکتور VII بود.

کلمات کلیدی: سلول‌های CHO، فاکتور VII، زمان پرتوترومبین

تاریخ دریافت: ۱۹/۷/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۹/۱۱/۱۶

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
۳- PhD بیوتکنولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR محصول اینویتروژن برای PCR محصول ژاپن برای PCR ، RT-PCR High Pure Plasmid Isolation ، PCR محصول رُوش برای استخراج پلاسمید، IMUBIND Factor VIIa ELISA (محصول دیاگنوستیکا آمریکا) به منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت فاکتور VIIa Recombinant Tissue Factor (R&D) به عنوان کترل مثبت و TF monoclonal antibody (R&D) در روش وسترن بلات استفاده گردید.

برای ساخت cDNA ، ابتدا RNA از سلول‌های فیبروبلاست ریه استخراج و با استفاده از روش RT-PCR و آغازگرهای راندوم هگرامر، cDNA از روی RNA ساخته شد. cDNA حاصله با روش PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در دمای آنیلینگ ۵۵ °C طی ۳۰ سیکل تکثیر شد. به منظور تهیه وکتور پروکاریوت به عنوان حامل برای قطعه ژنی مورد نظر، پس از کشت باکتری‌های pcDNA3.1 در محیط LB ، پلاسمید E.coli Top10 استخراج گردید. برای اتصال قطعه ژنی مورد نظر به پلاسمید، در دو انتهای ۳' و ۵' DNA5 فاکتور بافتی، جایگاه برش با آنزیم‌های محدود کننده در نظر گرفته شد؛ هم چنین پلاسمید pcDNA3.1 نیز دارای جایگاه برش با آنزیم بود. لذا هر دو تحت برش با آنزیم‌های XhoI و BamH I قرار گرفتند. به منظور اتصال این دو قطعه ژنی (Ligation)، از آنزیم T4 DNA Ligase (رُوش)، استفاده شد. از باکتری‌های DH5α به عنوان میزبان پروکاریوت برای تکثیر قطعه کلون شده مورد نظر استفاده گردید. باکتری‌ها پس از کشت در محیط (Luria-Bertani) LB با استفاده از کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی مولار و سرد کردن روی یخ، برای پذیرش پلاسمید آماده شدند. انتقال پلاسمید حاوی قطعه ژنی مورد نظر به باکتری‌ها با استفاده از شوک حرارتی در ۴۲ °C انجام شد. برای بررسی کلونی‌های حاصل از ترانسفورم کردن باکتری‌ها و انتخاب کلون مناسب که حاوی پلاسمید نوترکیب باشد، از تعداد زیادی از کلونی‌ها پلاسمید با روش Cracking Buffer استخراج گردید. به منظور تایید و پی بردن به این که کلون‌های جدا شده حاوی ژن مورد نظر باشد، واکنش هضم آنزیمی

مقدمه

فاکتور بافتی (Tissue Factor ، TF) پروتئینی غشایی و سراسری با وزن مولکولی در حدود ۴۵۰۰۰ دالتون است که در غشای پلاسمایی اکثر سلول‌های بافتی زیر اندوتیال حضور دارد. ژن آن ۱۲/۴ kbp بوده، دارای ۶ اگزون p21-p22 می‌باشد و روی کروموزوم یک انسانی در جایگاه ۲۶۳ از اسید آمینه بوده و قرار دارد. فاکتور بافتی متشكل از ۲۶۳ اسید آمینه بوده و دارای سه ناحیه خارج سلولی، بین غشایی و سیتوپلاسمی می‌باشد. TF به عنوان کوفاکتور برای فاکتور VII انعقادی، متعاقب آسیب‌های عروقی نقشی اساسی را در شروع مسیر خارجی انعقاد بازی می‌کند(۱-۶).

Prothrombin Time (PT) آزمایشی به منظور بررسی مسیر خارجی انعقاد می‌باشد. وقتی جراحتی رخ می‌دهد، فاکتور بافتی از سلول‌های اندوتیال عروق خونی آزاد شده و به فاکتور VII، متصل می‌شود. این روند شروع مسیر خارجی انعقاد است. در ساخت کیت PT ، به منظور تامین TF و Ca ، به ترتیب از کلرور کلسیم و ترموبوپلاستین بافتی تهیه شده از مغز خرگوش استفاده می‌شود(۷،۸).

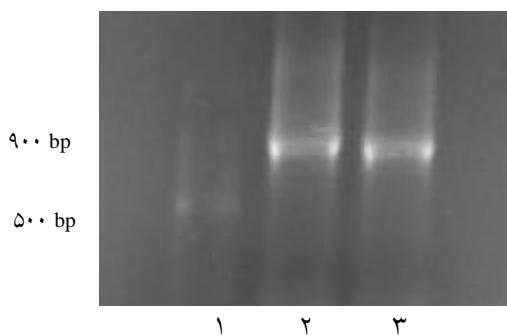
از جمله اشکالات واردہ به کیت‌های تهیه شده با ترموبوپلاستین بافتی، تنوع در مقدار و کیفیت فاکتور بافتی استخراج شده از مغز یا سایر احشای حیوان است که باعث ایجاد زمان‌های متفاوتی در تولید لخته می‌شود.

اخیراً استفاده از فاکتور بافتی نوترکیب به دلیل قابلیت تولید ویال‌های تقریباً یکسان از نظر کیفیت و کمیت فاکتور بافتی مورد توجه قرار گرفته است. از مزایای پروتئین‌های نوترکیب می‌توان به کترل غلاظت، بیان پروتئین و هم چنین میزان کشت سلول‌ها در محیط اشاره نمود. در نتیجه دستیابی به غلاظت‌های استانداردی از پروتئین امکان‌پذیر خواهد بود و سبب کاهش در تنوع مقدار و کیفیت فاکتور بافتی در کیت‌های PT می‌شود. هدف از این مطالعه، بیان فاکتور بافتی نوترکیب در سلول‌های CHO (Chinise Hamster Ovary) و بررسی فعالیت آن جهت استفاده در کیت PT بود.

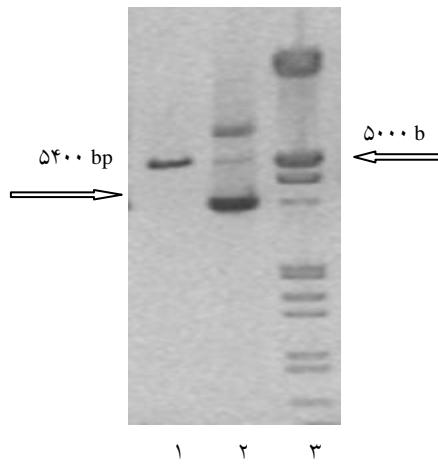
مواد و روش‌ها

RNA (- plus) Isolation of RNA به ترتیب از کیت‌های مخصوص شرکت سیناژن به منظور استخراج RNA ،

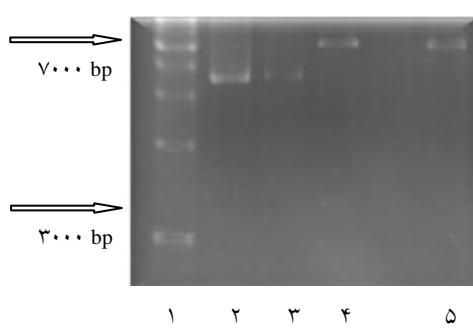
(شکل ۵).



شکل ۱: cDNA فاکتور بافتی؛ ۱- DNA مارکر ۲ و ۳ - محصول PCR، cDNA فاکتور بافتی که با استفاده از آغازگرهای فاکتور بافتی تکثیر شده



شکل ۲: پلاسمید pcDNA3.1؛ ۱- پلاسمید خطی ۲- پلاسمید حلقوی ۳- مارکر DNA



شکل ۳: ژن کلون شده فاکتور بافتی در پلاسمید pcDNA3.1؛ ۱- DNA مارکر ۲ و ۳- pcDNA3.1 بدون قطعه ژنی مورد نظر ۴ و ۵- pcDNA3.1 همراه با قطعه ژنی مورد نظر

PCR با استفاده از آنزیمهای BamH I و XhoI و مستقیم بر روی کلونی‌ها انجام شد. هم چنین تعیین توالی نوکلئوتیدی پلاسمید نوترکیب جهت تایید cDNA کلون شده صورت گرفت. از سلول‌های CHO به عنوان میزبان یوکاریوتیک جهت بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید. این سلول‌ها در محیط RPMI-1640 کشت داده شدند و به منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به آن‌ها از ماده فیوژن ۶ (روش) استفاده شد.

پس از انتقال پلاسمید به این سلول‌ها برای جداسازی کلون‌های نوترکیب مقاوم، از آنتی‌بیوتیک Geneticin استفاده و سپس با روش Freez-Thaw و سانتریفوژ با دور بالا، پروتئین سلولی استخراج گردید. برای تایید پروتئین حاصل شده از روش SDS-PAGE و وسترن بلات و به منظور بررسی فعالیت بیولوژیک فاکتور بافتی نوترکیب، از آزمایشی بر اساس آزمایش PT استفاده شد. برای حصول اطمینان از این که پروتئین نوترکیب حاصله موجب فعال شدن سیستم انعقاد شده است، میزان فعالیت فاکتور VIIa در پلاسمما پس از مجاورت با پروتئین نوترکیب مورد سنجش قرار گرفت. آزمایش‌ها بر روی سه گروه کشت سلولی با سه بار تکرار برای هر گروه انجام شد. برای مقایسه زمان انعقاد بین گروه‌های مختلف سلولی و فعال شدن فاکتور VII، از آزمون آماری Anova و نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

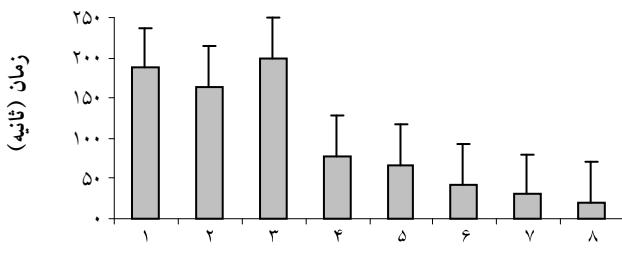
یافته‌ها

cDNA به دست آمده با استفاده از روش PCR تکثیر و محصول آن روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. نتیجه ایجاد باند ۹۰۰ bp بود که با اندازه ژن مورد نظر مطابقت داشت (شکل ۱). پلاسمید pcDNA3.1 از باکتری‌های *E.coli* Top Ligation شد (شکل ۲). عمل روی این دو قطعه انجام و پلاسمید حاوی ژن فاکتور بافتی (pcDNA3.1/TF) ساخته شد (شکل ۳). پس از تکثیر و تخلیص، پلاسمید حاوی ژن مورد نظر با استفاده از هضم آنزیمی و Sequencing مورد تایید قرار گرفت و PCR روی کلونی‌های حاوی پلاسمید انجام شد (شکل ۴). ترانسفکشن سلول‌های CHO با استفاده از فیوژن ۶ صورت گرفت

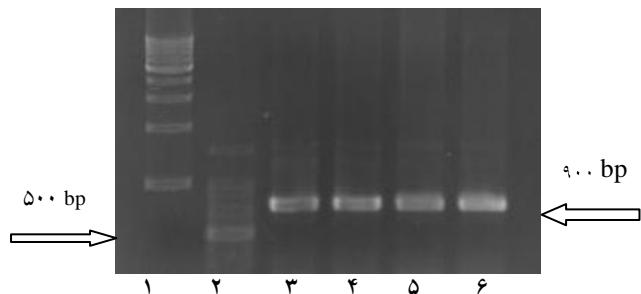
در وسترن بلات از آنتی بادی اختصاصی ضد فاکتور بافتی استفاده شد. در این بررسی نیز از فاکتور بافتی نوترکیب (Recombinant TF) به عنوان کنترل مثبت و از سلول های ترانسفکت نشده CHO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سلول های ترانسفکت شده CHO، باندی هم تراز با باند کنترل مثبت ایجاد کردند که نشان دهنده اتصال آنتی بادی اختصاصی فاکتور بافتی به پروتئین اختصاصی فاکتور بافتی است (شکل ۷).



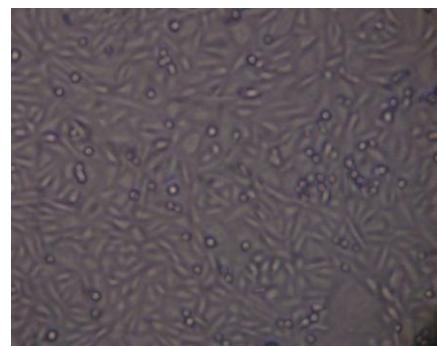
شکل ۷: نتیجه وسترن بلات فاکتور بافتی؛ ۱- سلول های CHO ترانسفکت نشده - ۲- سلول های CHO ترانسفکت شده - ۳- فاکتور بافتی نوترکیب (کنترل مثبت)



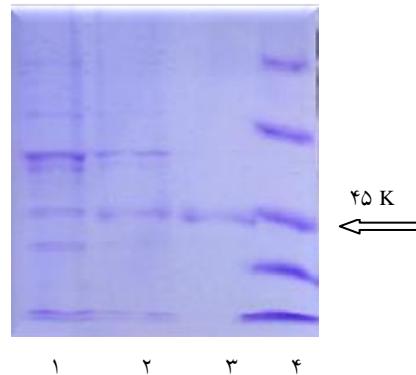
نمودار ۱: زمان لخته شدن پلاسما در حضور سلول های بیان کننده فاکتور بافتی؛ (تسایع زمانی به صورت Mean \pm SD) بیان شده است) ۱- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم ۲- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + سلول های CHO ترانسفکت نشده ۳- پلاسمای فاقد فاکتور VII + کلرور کلسیم ۴- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + فاکتور VII ۵- سلول CHO ترانسفکت شده ۶- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + 2×10^4 سلول CHO ترانسفکت شده ۷- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + 5×10^4 سلول CHO ترانسفکت شده ۸- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + 10^5 سلول CHO ترانسفکت شده ۹- پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + 10^6 سلول CHO ترانسفکت شده



شکل ۴: نتیجه PCR کلون های حاوی قطعه ژنی مورد نظر روی ژل آگارز؛ ۱ و ۲- DNA مارکر - ۳، ۴، ۵ و ۶- قطعه ژنی مورد نظر



شکل ۵: سلول های CHO کشت داده شده



شکل ۶: تسایع SDS-PAGE فاکتور بافتی استخراج شده از سلول های CHO؛ ۱- سلول های CHO ترانسفکت نشده (کنترل منفی) - ۲- سلول های CHO ترانسفکت شده - ۳- فاکتور بافتی نوترکیب (کنترل مثبت) - ۴- مارکر پروتئین

پروتئین های جدا شده از غشای سلولی برای آنالیز PAGE مورد استفاده قرار گرفت و وجود باند ۴۵ کیلو دالتونی در ستون مربوط به نمونه سلول CHO ترانسفکت شده، مؤید استخراج پروتئین مورد نظر ما بود (شکل ۶).

استفاده بوده است. از جمله اشکالات واردہ به کیت‌های PT، تنوع در مقدار و کیفیت فاکتور بافتی استخراج شده از مغز یا سایر احشای حیوان است که به ایجاد زمان‌های متفاوتی در تولید لخته متنه می‌شود(۷).

امروزه استفاده از فاکتور بافتی نوترکیب به دلیل قابلیت تولید ویال‌های تقریباً یکسان از نظر کیفیت و کمیت آن مورد توجه قرار گرفته است. از مزایای پروتئین‌های نوترکیب این است که می‌توان غلظت و بیان پروتئین و هم چنین میزان کشت سلول‌ها در محیط را کنترل نمود. در نتیجه دست‌یابی به غلظت‌های استاندارد از پروتئین امکان‌پذیر خواهد بود که موجب کاهش در تنوع کمیت و کیفیت فاکتور بافتی در کیت‌های PT می‌شود.

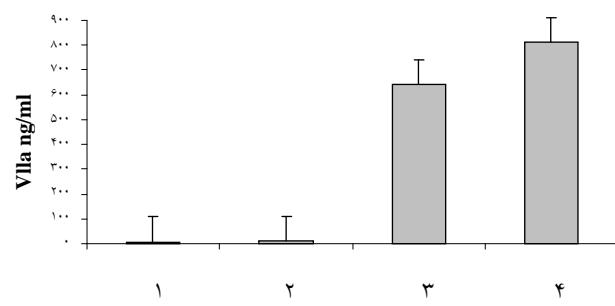
در مطالعه حاضر فاکتور بافتی نوترکیب با استفاده از cDNA تهیه شده از فیبروبلاست ریه در سلول‌های CHO تولید گردید. فاکتور تولید شده از نظر وزن مولکولی و آنالیز SDS-PAGE ساختار مناسبی داشت و با آنتی‌بادی اختصاصی علیه فاکتور بافتی واکنش داد. در آزمایشی که بر اساس آزمایش PT طراحی شده بود، پروتئین نوترکیب تولید شده قادر به لخته کردن پلاسمما در حضور کلسیم بود. هم چنین این فاکتور نوترکیب توانایی فعال‌سازی فاکتور VII موجود در پلاسمما را داشت.

در بررسی‌هایی که ائونور و همکاران وی در سال ۱۹۸۷ انجام دادند، موفق به تعیین توالی cDNA از روی توالی پروتئینی فاکتور بافتی و جداسازی آن از کتابخانه cDNA جفت ایجاد شده در باکتریوفاژ لامدا شدند. مورد استفاده در این تحقیق از فیبروبلاست‌های ریه تهیه گردید(۹). بررسی‌های مک من و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان داد طول سکانس کامل ژن فاکتور بافتی ۱۲/۴ kbp بوده و دارای ۶ اگزون و ۵ ایترون می‌باشد(۱). هم چنین بررسی‌های ولفارم و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان داد ژن این فاکتور روی کروموزوم ۱ انسانی و در جایگاه P22 قرار دارد و دارای سه ناحیه خارج سلولی، بین غشایی و سیتوپلاسمی است(۲). در بررسی‌های آنواز و همکاران Trp- (WKS) در سال ۱۹۹۲ مشخص شد توالی تریپتید Lys-Ser شده است. این رخداد از نظر آماری بعید است و با این

زمان لخته شدن پلاسمای سیتراته در حضور کلرور کلسیم با اضافه کردن غشای سلولی 3 ± 21 ثانیه، با اضافه کردن سلول ترانسفکت شده کامل 3 ± 30 ثانیه و با اضافه کردن سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی ۳ دقیقه بود که این امر بیانگر توانایی بیشتر غشای سلولی نسبت به سلول کامل در لخته کردن پلاسمای سیتراته در حضور کلرور کلسیم است(نمودار ۱).

مقایسه بین نتایج نشان داد غشای سلول‌های CHO ترانسفکت شده و سلول‌های CHO ترانسفکت شده کامل، نسبت به سلول‌های CHO ترانسفکت نشده به طور معناداری باعث کاهش زمان انعقاد پلاسمما شدند ($p < 0.01$).

طبق نتایج به دست آمده، میزان فاکتور VII فعال در حضور سلول‌های CHO ترانسفکت شده کامل $30 \text{ ng/ml} \pm 810 \pm 35 \text{ ng/ml}$ و در حضور غشای این سلول‌ها $640 \pm 40 \text{ ng/ml}$ بود که نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده CHO در مجاورت با پلاسمای انبشته شده طبیعی، به طور محسوسی افزایش سطح فعال شدن فاکتور VII را نشان داد و بیانگر فعل شدن فاکتور VII در حضور فاکتور بافتی بود($p < 0.01$ ، نمودار ۲).



نمودار ۲: بررسی میزان فعل شدن فاکتور VII به وسیله فاکتور بافتی (نتایج به صورت Mean \pm SD بیان شده است)-۱- پلاسمای سیتراته -۲- پلاسمای سیتراته $+ 10^5$ سلول CHO ترانسفکت شده -۳- پلاسمای سیتراته $+ 10^5$ سلول CHO ترانسفکت شده -۴- پلاسمای سیتراته $+ \text{غشای } 10^5$ سلول CHO ترانسفکت شده

بحث

همواره فاکتور بافتی استخراج شده از مغز خرگوش در آزمایش PT جهت بررسی مسیر خارجی انعقاد مورد

می باشد یا خیر، از آزمایش PT استفاده شد. همان طور که کانسونی و همکاران وی در مطالعه خود در سال ۱۹۹۵ اشاره کردند، در مطالعه حاضر آزمایش PT با استفاده از CHO پلاسمای انباسته شده طبیعی، کلرور کلسیم و سلول CHO ترانسفکت شده کامل، غشاء سلول CHO ترانسفکت شده و سلول CHO ترانسفکت نشده (به عنوان کنترل منفی) انجام شد (۱۴). در این مطالعه نیز با غشاء سلولی نسبت به سلول کامل نتایج بهتری گرفته شد. طبق مطالعه روبرت کلی و همکاران در سال ۲۰۰۳، روند فعال شدن انعقاد از طریق فعل شدن فاکتور VII به واسطه فاکتور بافتی انجام می شود (۱۵). در این تحقیق نیز به منظور تاییدی مبنی بر این که پروتئین نوترکیب ساخته شده قادر به فعل کردن فاکتور VII می باشد، میزان فعالیت این فاکتور در حضور فاکتور بافتی بیان شده در سلول های CHO مورد سنجش قرار گرفت.

نتیجه گیری

نتایج بیانگر این بود که فاکتور بافتی نوترکیب می تواند با فعل کردن فاکتور VII از طریق مسیر خارجی، روند انعقاد را پیش ببرد و زمانی که از پلاسمای فاقد فاکتور VII استفاده شد، انعقادی صورت نگرفت که این امر تاییدی بر شروع انعقاد از طریق تشکیل کمپلکس TF-VII بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی مرکز تحقیقات انتقال خون ایران انجام شد.

بررسی متوجه شدند که ناحیه خارج سلولی در عملکرد فاکتور بافتی حائز اهمیت است (۱۰). در بررسی های پاپورسکی و همکاران در سال ۱۹۹۱ مشخص شد که برای فعالیت TF، نیاز قطعی به همراهی لیپید وجود دارد؛ چنانچه در بررسی انجام شده با استخراج TF قادر چربی از سلول ها، آپوپروتئین TF از نظر بیولوژیکی بی اثر بوده و شکل گیری کمپلکس TF-VIIa نیز با مشکل مواجه بود (۱۱). در مطالعه حاضر از آن جایی که طول کامل ژن فاکتور بافتی خیلی بزرگ نبود، پس از ساخت cDNA و کلون بافتی در نظر گرفته شد. پس از ساخت cDNA کردن آن در وکتور pcDNA3.1، باید ژن مورد نظر در سلولی مناسب بیان می شد. برای بیان پروتئین های نوترکیب یوکاریوتی با عملکرد صحیح باید از سلول های یوکاریوتیک استفاده نمود. یکی از این سلول ها که در مطالعه های مختلف برای تولید پروتئین های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است، سلول های CHO است. این سلول ها تغییرات مناسب پس از ترجمه، نظری گلیکوزیلاسیون را بر روی پروتئین انجام می دهند (۱۲)، (۱۳). به منظور اطمینان از این که پروتئین نوترکیب بیان شده در غشاء سلول های CHO همان فاکتور بافتی است، در روش وسترن بلات از آنتی بادی مونوکلونال ضد فاکتور بافتی نوترکیب که محصول شرکت R&D بود استفاده شد. این آنتی بادی بر علیه ناحیه خارج سلولی فاکتور بافتی می باشد. هم چنین به عنوان کنترل، فاکتور بافتی نوترکیب محصول شرکت R&D نیز خریداری شد. برای بررسی این که آیا پروتئین ساخته شده دارای فعالیت بیولوژیک

References :

- Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28(4): 1755-62.
- Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*. *FASEB J* 1994; 8(6): 385-90.
- Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66(1): 67-79.
- Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysacaride-stimulated human blood monocytes and the constitutively tissue factor producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 1989; 109(1): 389-95.
- Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS. The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J Biol Chem* 1991; 266(16): 10294-9.
- Ruf W, Rehemtulla A, Edgington TS. Antibody mapping of tissue factor implicates two different exon-encoded regions in function. *Biochem J* 1991; 278(3): 729-33.
- Miller JL. Hemostasis and Thrombosis. In: Mcpherson

- RA, Pincus MR, editors. Henry's Clinical Diagnosis and Management by laboratory methods. 21st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 730.
- 8- Furie B, Furie BC. Molecular Basis of Blood Coagulation. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Silberstein L, Mcglave PH, *et al.* editor. Hematology Basic Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p. 1819-36.
- 9- Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, *et al.* Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(15): 5148-52.
- 10- Rehemtulla A, Ruf W, Miles DJ, Edgington TS. The third Trp-Lys-Ser (WKS) tripeptide motif in tissue factor is associated with a function site. Biochem J 1992; 282(3): 737-40.
- 11- Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. J Biol Chem 1991; 266(32): 21911-6.
- 12- Yuk IHY. Protein expression and glycosylation in CHO cells. 2001. Available from: <http://hdl.handle.net/1721.1/8201>.
- 13- Zamani A, Afshari JT, Alikhani MY. Molecular cloning and expression of human gamma interferon full cDNA in Chinese hamster ovary(CHO)cells. Iran J Immunol 2006; 3(1).
- 14- Consonni R, Bertina RM. Antigen and functional expression of tissue factor in endotoxin stimulated U937 cells: Regulation of activity by calcium ionophore A23187. Thromb Haemost 1995; 74(3): 904-9.
- 15- Kelley RF, Yang J, Eigenbrot C, Moran P, Peek M, Lipari MT, *et al.* Similar molecular interactions of factor VII and factor VIIa with the tissue factor region that allosterically regulates enzyme activity. Biochemistry 2004; 43(5): 1223-29.

Cloning and expression of recombinant tissue factor in CHO cells

Khorshidfar M.¹, Amirizadeh N.¹, Habibi Roudkenar M.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Tissue factor (TF), a 45-kDa transmembrane glycoprotein, is the major cellular initiator of the coagulation cascade. Prothrombin Time (PT) is the test that evaluates extrinsic pathway of coagulation. Thromboplastin used in this test is mostly prepared of rabbit brain. Thus it causes variation in the PT results. There is an important advantage of using recombinant TF in PT test to get more reproducible results.

Materials and Methods

TF mRNA was isolated from human lung fibroblast cells. After preparation of cDNA it has cloned in pcDNA3 plasmid. CHO cells were transfected with recombinant plasmid. Transfected cells were grown in presence of Geneticin. Total proteins were extracted from CHO cells and separated with SDS/PAGE electrophoresis and analyzed by western blotting technique. CHO cells expressing TF were added to citrated plasma in presence of CaCl₂ and clotting time was measured. In addition, factor VII activation by recombinant TF in the plasma was assessed by ELISA method.

Results

Extracted proteins from transfected CHO cells separated on SDS/PAGE showed an approximately 40-kDa band that verified with a monoclonal antibody against TF on western blot analysis. Adding transfected cells (10^6 cell/ml) to the citrated plasma in presence of CaCl₂ could decrease clotting time from 3 minutes to 21 ± 3 seconds compared with untransfected CHO cells. The level of factor VIIa in citrated plasma was 810 ± 35 ng/ml in presence of transfected cells' membrane.

Conclusions

Recombinant TF expressed in CHO cells was able to clot citrated plasma and to activate factor VII.

Key words: CHO cells, Factor VII, Prothrombin Time
Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8(2): 96-103

Received: 5 Oct 2010

Accepted: 5 Feb 2011

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599 ; Fax : (+9821)88601599 E-mail: n.amirizadeh@ibto.ir