

جداسازی، کلونینگ و بیان ژن فاکتور VII انعقادی نوترکیب انسانی در رده سلولی CHO

راحله حلبیان^۱، ناصر شاگردی اسماعیلی^۲، آرزو اوودی^۳، ناصر مسروری^۴، دکتر ناصر امیری زاده^۵، دکتر کامران موسوی حسینی^۶، دکتر احمد قره باغیان^۷، دکتر حوری رضوان^۸، دکتر محمد علی جلیلی^۹، دکتر مهریار حبیبی رودکنار^۹

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور VII، یک گلیکوپروتئین پلاسمایی است که در آبشار انعقادی تشکیل فیبرین، شرکت دارد. فاکتور VII در مسیر انعقادی نقش مهمی داشته و آغازگر مسیر خارجی انعقاد است. هدف اساسی این مطالعه جداسازی و کلونینگ فاکتور VII نوترکیب انسانی و بیان آن در رده سلولی یوکاریوتی CHO جهت بیان فاکتور VII نوترکیب (FVII) بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. ابتدا cDNA ژن فاکتور VII از رده سلولی کبد انسان (HepG2) جدا شده و در وکتور (+) ۳/۱ pcDNA کلون شده سپس وکتور نوترکیب به داخل سلول‌های CHO ترانسفکت شد. در نهایت، یک کلون سلولی که به طور پیوسته فاکتور VII را بیان می‌کند تثبیت شد. بیان فاکتور VII نوترکیب توسط روش‌های RT-PCR، الایزا، SDS-PAGE و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین تایید فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب توسط آزمایش PT و ایجاد لخته در پلاسمای فاقد فاکتور VII صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کلونینگ و بیان موفقیت‌آمیز ژن فاکتور VII بود. پس از ۳ هفته کشت سلول‌های CHO در حضور جنتیسین، کلون سلول‌های پایدار به دست آمد. نتایج آزمایش‌های RT-PCR، الایزا، SDS-PAGE و وسترن بلات حاصل از کلون‌ها، نشان‌دهنده بیان این پروتئین در رده سلولی CHO بود. کاهش ۳ الی ۴ برابری در زمان انعقاد نشان‌دهنده وجود فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب بیان شده بود.

نتیجه‌گیری

سالانه حدود ۴۰۰۰ الی ۶۰۰۰ ویال (۳۳۶۰۰ تا ۵۰۴۰۰ میلی گرم) از این فرآورده وارد کشور می‌شود که دولت را متحمل هزینه بسیار بالایی می‌کند. بنابراین تولید فاکتور VII نوترکیب با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در سطح آزمایشگاهی، می‌تواند اولین گام در راه فایده‌آوردن بر مشکلات فوق باشد.

کلمات کلیدی: هموفیلی، فاکتور VII نوترکیب، CHO، ترانسفکشن

تاریخ دریافت: ۸۷/ ۷/۳۰

تاریخ پذیرش: ۸۸/ ۲/۳۱

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۲- کارشناس ارشد خون‌شناسی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۳- کارشناسی ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- PhD خون‌شناسی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- PhD شیمی دارویی - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۶- PhD ایمونوهما‌تولوژی بالینی - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۷- PhD بیوشیمی - استاد مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۸- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۹- مؤلف مسؤول: PhD بیوتکنولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

یکی از چالش‌های عمده در درمان بیماران هموفیلی، نیاز به فاکتور IX و VIII پلاسمایی و یا نوترکیب در دوز بالا می‌باشد (۱). البته این مشکل در ۲۵٪ از بیماران که به طور طبیعی دارای آنتی‌بادی بر علیه فاکتور از دست رفته هستند، چندین برابر می‌شود (۲، ۳). راه حل این دسته از بیماران، استفاده از FVIII است. اما میزان بسیار کم آن در پلاسما، تخلیص این فاکتور را دچار مشکل می‌کند و از طرف دیگر ویروس‌زدایی مانع دیگری در راه به دست آوردن این محصول از اهداکنندگان خون است. بنابراین تولید فاکتور FVII به روش نوترکیب، می‌تواند با توجه به نقش این فاکتور در مسیر انعقاد خارجی، روش مناسب و ایمنی برای حل مشکلات موجود در درمان هموفیلی باشد. در حال حاضر فن‌آوری تولید rFVII تنها در اختیار شرکت Novoseven بوده و سالانه دولت را متحمل هزینه‌های سنگین برای واردات این محصول می‌کند.

فاکتور VII به طور طبیعی یک گلیکوپروتئین زیموژن به وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون و به شکل تک زنجیره‌ای با ۴۰۶ اسید آمینه است که توسط سلول‌های کبدی ساخته شده و برای فرایند انعقاد ضروری است. این پروتئین وابسته به ویتامین K بوده و توسط فاکتورهای Xa، XIIa، IXa یا ترومبین، فعال شده و در این صورت دارای یک شکست پپتیدی در آمینو اسید ۱۵۲ در پایانه N-ترمینال خود می‌باشد.

هم چنین حاوی یک پیوند دی سولفید بین دو زنجیره حاصل و نیز دو جایگاه گلیکوزیلاسیون است (۴). تولید فاکتور VII نوترکیب با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در سطح آزمایشگاهی و سپس تبدیل آن به فرم فعال، روشی مطمئن و ارزان با کارایی درمانی بالا و مناسب است. به دلیل عدم وجود مکانیسم‌های تغییرات پس از ترجمه در پروکاریوت‌ها، در این مطالعه برای بیان FVII نوترکیب، از Chinese Hamster Ovary (CHO) که یک رده سلولی یوکاریوتی است و دارای فرایندهای پس از ترجمه می‌باشد استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

پلاسمیدوسویه باکتری

پلاسمید (+) pcDNA3.1 (اینویتروژن - آمریکا) به عنوان وکتور کلونینگ و بیانی و سویه باکتری *E. coli* DH5α (سیناژن - ایران)، به عنوان میزبان پروکاریوتی انتخاب شد. وکتور (+) pcDNA3.1، شاتل وکتور است و دارای قابلیت کلون کردن ژن مورد نظر درون سلول و بیان آن ژن درون رده سلولی پستانداران می‌باشد. هم چنین حاوی ژن مقاومت به نئومایسین است که به منظور غربالگری کلون‌های پایدار ترانسفکت شده در رده سلول یوکاریوتی استفاده گردید.

کشت رده سلولی کبد انسان (HepG2) و تخمدان هامستر چینی (CHO)

رده‌های سلولی کبد انسان (HepG2) و تخمدان هامستر چینی (CHO) (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت سلولی RPMI حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در دمای ۳۷°C و CO₂ ۵٪ کشت داده شد.

استخراج RNA

RNA رده سلولی (HepG2) با استفاده از تریزول (اینویتروژن - آمریکا) بر طبق دستورالعمل، استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بر روی ژل ۱٪ آگارز بررسی گردید و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nano drop) تعیین مقدار شد.

جداسازی ژن فاکتور FVII

cDNA از روی RNA 500ng استخراج شده از رده سلولی (HepG2) با استفاده از آنزیم SuperScript III، سنتز گردید (اینویتروژن، کیت سنتتاز cDNA).

در این مرحله ابتدا آغازگرهای مربوط به ژن‌های مورد نظر طراحی شد و سپس با روش RT-PCR، کل ژن فاکتور VII با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و آنزیم تک DNA پلی‌مراز و دستگاه (PerkinElmer Life and analytical sciences, Inc., Wellesley, MA, USA Genen Amp PCR system 9600) جداسازی شد. صحت توالی سنتز شده با توالی‌یابی (DNA Sequencing)

محیط کشت تازه حاوی (G۴۱۸) ۸۰۰ µg/ml جنتیسین (رُوش - آلمان) جایگزین محیط بدون آنتی‌بیوتیک شد.

کلون‌های مقاوم به نئومایسین (G ۴۱۸) پس از ۲ تا ۳ هفته رشد، در حضور این آنتی‌بیوتیک ایجاد گردید. کلون‌های مقاوم غربالگری و با روش سری رقت (dilution of the cells) و کشت در پلیت ۹۶ خانه‌ای، چندین تک کلون پایدار ایجاد شد.

تعیین غلظت FVII نوترکیب تولید شده با آزمایش الیزا به منظور بررسی میزان بیان پروتئین فاکتور VII انسانی موجود در محیط کشت، از کیت الیزای مخصوص به پروتئین فاکتور VII (آسراکروم، فرانسه) استفاده شد. $10^5 \times$ ۳ سلول CHO در حضور G۴۱۸ کشت داده شد. بعد از ۴ روز، بر روی محیط کشت رده سلولی پایدار CHO حاوی rFVII، آزمایش الیزا طبق دستورالعمل کیت انجام شد. کیت الیزا فاکتور VII برای اندازه‌گیری فاکتور VII موجود در سرم، پلاسما و محیط کشت سلول طراحی شده است. کیت حاوی استاندارد برای سنجش و بررسی فاکتور VII نمونه‌ها (آزمایش‌ها) می‌باشد. آنتی‌بادی‌های ثانویه قادر به اتصال به فاکتور VII متصل شده به آنتی‌بادی وصل به ته چاهک‌های مخصوص الیزا می‌باشد و به فاکتور VII آزاد در محیط متصل نمی‌شود.

ایمونوپرسیپیتاسیون برای جداسازی FVII موجود در محیط کشت

از محیط کشت، سلول‌های CHO-FVII را برداشته و مقدار ۱ میکروگرم آنتی‌بادی IgG (Anti human R & D) به مدت یک و نیم ساعت اضافه نمودیم و هر پنج دقیقه تکان دادیم. سپس محلول Bead آماده به محیط کشت اضافه شد. محلول را سانتریفوز کرده و مایع رویی رادور ریخته و سپس به محیط باقی مانده PBS اضافه نمودیم. در مرحله آخر به رسوب ته تیوب، Loading Buffer 2X اضافه کرده و در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوز نمودیم تا Bead ها از پروتئین جدا شود. محیط رویی حاوی پروتئین مورد نظر است.

تایید گردید. به منظور استاندارد بودن آزمایش‌ها، ژن β -actin TCA به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد.

جدول ۱: آغازگر «۱ و ۲» جهت ایجاد قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی از ژن FVII و آغازگر «۳ و ۴» بتا اکتین جهت ایجاد قطعه ۱۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین

شماره	نام آغازگر	توالی
۱	Forward FVII	5'-ACG AAT TCA CCA TGGT GGG TCT CCC AGG CCC TCA GGC TC-3'
۲	Reverse FVII	5'-TAG CGG CCG CCT AGG GAA ATG GGG CTC GCA G-3'
۳	Forward B-actin	5'-TTC TAC AAT GAG CGT GTG G-3
۴	Reverse B-actin	5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'

کلونینگ فاکتور FVII درون وکتور (+) pCDNA3.1 محصول PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز ران و باند مورد نظر (FVII) از روی ژل استخراج گردید. FVII cDNA حاوی سایت‌های اختصاصی آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *Not1*، درون وکتور بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1 دارای پروموتور سیتومگالو ویروس و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و نئومایسین وارد و سپس درون سلول پروکاریوتی *E.coli* DH5 α کلون گردید. جهت انتخاب کلون‌های حاوی وکتور، از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استفاده شد و صحت انجام کلونینگ با توالی‌یابی DNA و آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *Not1* تایید شد.

ایجاد رده سلولی CHO پایدار تولید کننده FVII نوترکیب (rFVII)

ترانسفکت در رده سلولی CHO با مقادیر متفاوت وکتور و فیوژن - ۶، (رُوش - آلمان) انجام شد. 6×10^5 سلول در پلیت ۶ خانه‌ای در حضور RPMI بدون FBS، کشت داده شد و با بهینه کردن شرایط، مقدار ۱ µg از DNA خطی pCDNA3.1-FVII (بریده شده با آنزیم *PvuI*) و ۳ µl فیوژن - ۶، به درون رده سلولی CHO ترانسفکت گردید. به منظور کنترل آزمایش، وکتور بدون ژن pCDNA3.1(+) انتخاب شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن،

RPMI ، FBS ۱۰ درصد و جنتیسین کشت داده شد و سپس با استفاده از محیط کشت و کیت PT (Prothrombin Time assay) (نئوپوتین)، آزمایش انعقاد انجام شد.

یافته ها

جداسازی و کلونینگ ژن FVII درون وکتور

کل قطعه ژن فاکتور FVII از cDNA رده سلولی کبد انسانی HepG2 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن مذکور، با استفاده از PCR جداسازی شد (شکل ۱). محصول نهایی PCR، قطعه‌ای به طول ۱۲۵۰ bp به دست آمد (شکل ۲). سپس ژن FVII پس از برش با آنزیم‌های محدودالایر اختصاصی به درون وکتور pcDNA3.1 (+) وارد و وکتور pcDNA3.1-FVII و وکتور بدون ژن (کنترل) به درون باکتری *E.coli* DH5 α انتقال یافت. کلون‌های باکتریایی با رشد در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غربالگری شد و پس از استخراج پلاسمید، وکتورهای نوترکیب حاوی ژن FVII با برش آنزیمی و هم‌چنین PCR جداسازی و انتخاب گردید و در نهایت صحت وجود ژن، توالی آن و قالب صحیح قرارگیری نوکلئوتیدها با روش توالی‌یابی DNA (DNA sequencing) تایید شد (شکل ۳).

پلی‌اکریلامید ژل الکتروفورز SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

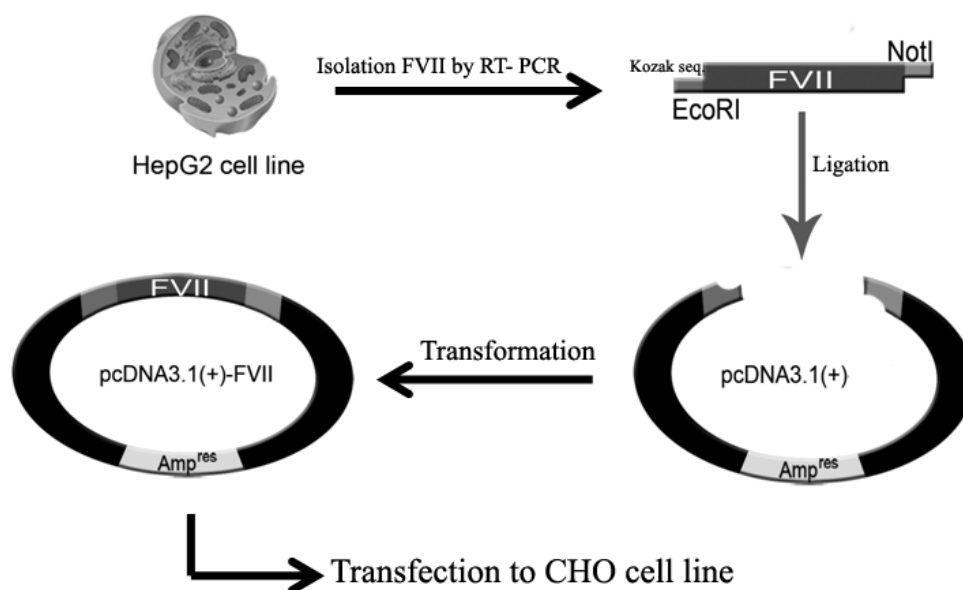
به منظور تایید بیان FVII در رده سلولی CHO حاوی ژن FVII، ابتدا ژن FVII موجود در محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ایمنو پرسپیتاسیون با آنتی‌بادی اختصاصی ژن FVII تخلیص شد و سپس نمونه بر روی ژل الکتروفورز، SDS گردید.

وسترن بلات (Western Blot)

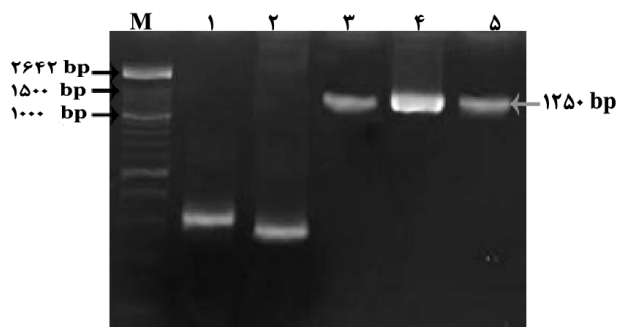
به منظور تایید وجود پروتئین FVII، نمونه محیط کشت پس از تخلیص، با آزمایش ایمنوپرسپیتاسیون بر روی ژل پلی‌اکریلامید ران گردید و سپس با روش وسترن بلات به غشا PVDF (آلمان - روش) منتقل شد و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب با آزمایش انعقادی PT (Prothrombin Time assay)

فاکتور VII فعال می‌تواند در فرآیند انعقادی شرکت نماید. به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب، آزمایش PT انجام شد. تک کلون‌های پایدار CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب، در فلاسک حاوی



شکل ۱: مراحل جداسازی، کلونینگ درون وکتور، ترانسفکشن وکتور نوترکیب به درون سلول یوکاریوتی و بیان فاکتور FVII نوترکیب



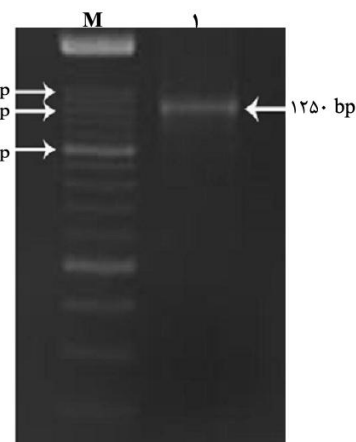
شکل ۳-ب): محصول PCR مربوط به کلون‌های رشد یافته بر روی محیط آگار حاوی آمپی سیلین با استفاده از آغازگر اختصاصی M.FVII مارکر ۱۰۰ bp. ستون شماره ۱ و ۲ نشان‌دهنده کلون‌های حاوی وکتور خالی. ستون شماره ۳ و ۴ و ۵ کلون حاوی وکتور دارای ژن FVII می‌باشد. باند ۱۲۵۰ جفت بازی، باند اختصاصی مربوط به ژن فاکتور VII است و چاهک ۱ و ۲ به دلیل عدم حضور باند مورد نظر منفی می‌باشند. باندهای پایین شکل نشان‌دهنده باندهای غیر اختصاصی است.

کشت سلول در حضور آنتی‌بیوتیک G418، کلون‌های پایدار ایجاد شد.

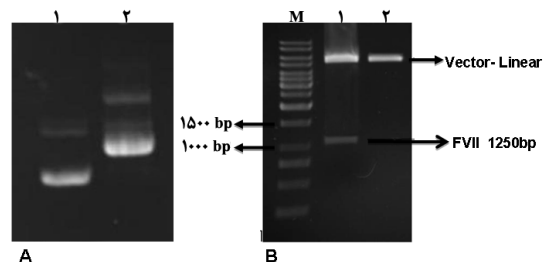
استخراج RNA از سلول‌های CHO حاوی ژن فاکتور VII /نو ترکیب

به منظور بررسی بیان ژن در سلول‌های پایدار ترانسفکت شده، RNA رده سلولی CHO که ژن فاکتور VII نو ترکیب و رده سلولی حاوی وکتور خالی (کنترل) درون آن ترانسفکت و سپس کلون‌های پایدار ایجاد شده بود، استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد (شکل ۴ - الف). وجود سه باند اختصاصی مربوط به (sRNA ۲۸ ریپوزومی)، (sRNA ۱۸ ریپوزومی) و (sRNA ۵/۸ ریپوزومی) حاکی از عدم حضور باندهای غیر اختصاصی و تداخل DNA در RNA استخراج شده بود. وجود ژن فاکتور VII با آزمایش‌های متعدد دیگری تایید شده است که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد.

ستیز cDNA و بررسی بیان ژن فاکتور VII نو ترکیب با استفاده از RT-PCR /از نمونه‌های RNA استخراج شده، cDNA ساخته و با



شکل ۲: PCR ژن FVII با آغازگرهای اختصاصی FVII. ستون شماره ۱ قطعه ژنی FVII را با ۱۲۵۰ bp نشان می‌دهد. همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، قطعه ژنی مربوط به فاکتور VII انسانی از رده سلولی HepG2 در مقابل مارکر ۱۲۵۰ bp قرار گرفته است.



شکل ۳-الف): A: الکتروفورز وکتور نو ترکیب و pcDNA خالی. ستون شماره ۱ وکتور خالی را نشان می‌دهد که به علت وزن کم حرکت بیشتری در الکتروفورز دارد. ستون شماره ۲ وکتور حاوی ژن FVII است که به علت دارا بودن ژن سنگین‌تر بوده و در الکتروفورز حرکت کمتری دارد. B: هضم pcDNA خالی و وکتور نو ترکیب با آنزیم‌های EcoRI و Not I و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون شماره ۱ وکتور حاوی ژن FVII برش خورده توسط آنزیم‌های مذکور را نشان می‌دهد که به علت این که وکتور حاوی ژن FVII است حرکت کمتری داشته و بالاتر ایستاده است. ستون شماره ۲ وکتور خالی را نشان می‌دهد که به علت سبک بودن در الکتروفورز حرکت بیشتری دارد.

بیان نو ترکیب در رده سلولی CHO

به منظور بیان FVII، رده سلولی CHO با وکتور pcDNA3.1-FVII که توسط آنزیم محدود کننده PvuI برش خورده بود، ترانسفکت گردید. پس از دو هفته

هم زمان با انجام PCR برای ژن فاکتور VII انسانی، از آغازگرهای ژن بتاکتین (ژنی که به صورت عمومی در تمام سلول‌ها وجود دارد و جزو ژن‌های خانه‌دار می‌باشد) نیز که قطعه‌ای به طول ۱۱۵ جفت باز را سنتز می‌کردند، استفاده شد (شکل ۴ - ب). وجود باند در ناحیه ۱۲۵۰ جفت بازی در رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و عدم حضور این باند در رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب، نشان‌دهنده بیان ژن فاکتور VII در سطح ژن در رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ژن فاکتور VII انسانی می‌باشد.

بررسی بیان FVII در سطح پروتئین

بررسی بیان فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از الایزا

پروتئین فاکتور VII نوترکیب، بعد از بیان به فضای خارج سلول ترشح می‌شود. بنابراین میزان بیان این پروتئین در محیط کشت قابل اندازه‌گیری می‌باشد. به این منظور الایزا روی محیط کشت رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و کنترل انجام شد. بر اساس دستورالعمل کیت، مقدار OD مربوط به FVII استاندارد بدون رقیق شدن بیانگر غلظتی معادل ۵۰۰ ng/ml و ۱۰۵ ng/ml درصد فعالیت می‌باشد. بر این اساس میزان بیان پروتئین فاکتور VII در کلون پایدار ۱ در حدود ۴۸۰ ± ۲۱ ng/ml و ۶۰ درصد فعالیت و در کلون پایدار ۲ در حدود ۴۹۰ ± ۱۸ ng/ml و ۹۰ درصد فعالیت است (جدول ۲).

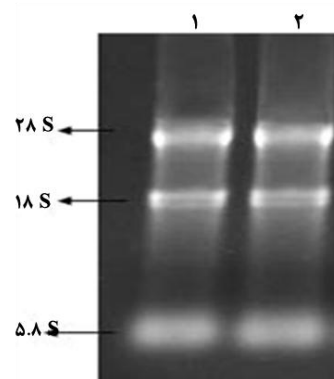
بررسی بیان پروتئین فاکتور VII نوترکیب موجود در

محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از SDS PAGE

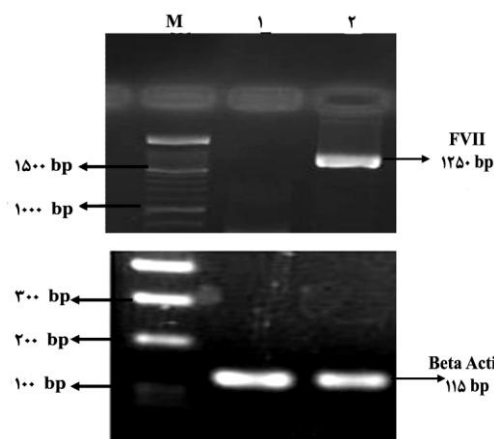
به منظور تایید بیان FVII در رده سلولی CHO حاوی ژن FVII، ابتدا پروتئین FVII موجود در محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با ایمونوپرسیپیتاسیون، با آنتی‌بادی اختصاصی FVII تخلیص شد و سپس نمونه بر روی ژل الکتروفورز SDS گردید (شکل ۵).

عدم حضور باند ۵۰ KD در نمونه رده سلولی CHO حاوی وکتور خالی و حضور باند ۵۰ KD سلول CHO حاوی ژن فاکتور FVII، نشان‌دهنده وجود پروتئین فاکتور

آغازگرهای اختصاصی فاکتور VII انسانی و بتاکتین، PCR انجام شد. به منظور بررسی و مقایسه میزان بیان ژن فاکتور VII انسانی، از روی رده‌های سلولی CHO حاوی سازه ژنی نوترکیب و فاقد سازه ژنی نوترکیب، RT-PCR انجام شد.



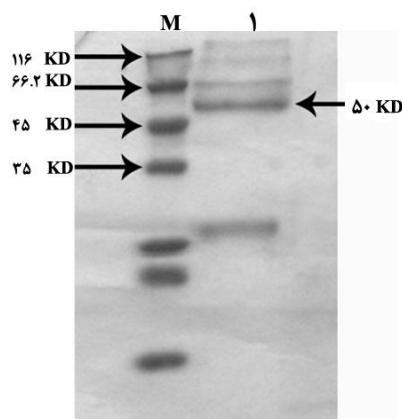
شکل ۴- الف): الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک شماره ۱، مربوط به RNA استخراج شده از رده سلولی CHO و چاهک شماره ۲ رده سلولی حاوی وکتور خالی (کنترل) می‌باشد.



شکل ۴ - ب): الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر ۱۰۰ bp (۵۰ ng/μl)، چاهک ۱ نشان‌دهنده RT-PCR رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب و چاهک ۲ محصول RT-PCR ژن فاکتور VII انسانی در رده سلولی CHO است. شکل پایین بتاکتین رده سلولی CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب و رده سلولی حاوی ژن فاکتور VII انسانی می‌باشد.

آغازگر طراحی شده برای ژن فاکتور VII انسانی، توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۱۲۵۰ جفت باز را داشت.

بین فاکتور VII و آنتی-بادی اختصاصی آن بود. وجود کنترل مثبت در روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت و هدف از انجام وسترن بلات، تایید نتیجه مربوط به SDS-PAGE بود. به علت عدم وجود فاکتور VII تجاری که بتوان در وسترن بلات به عنوان کنترل مثبت استفاده نمود، در شکل ۶ کنترل مثبت وجود ندارد. لازم به ذکر است در حال حاضر FVII در بازار موجود می‌باشد که باندهای آن با باند فاکتور VII متفاوت است.



شکل ۶: نتیجه حاصل از وسترن بلات رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن فاکتور VII. وجود باند ۵۰ نشان‌دهنده وجود پروتئین FVII و واکنش اختصاصی آنتی‌بادی فاکتور FVII با پروتئین مذکور می‌باشد.

بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور FVII نوترکیب با استفاده از آزمایش PT

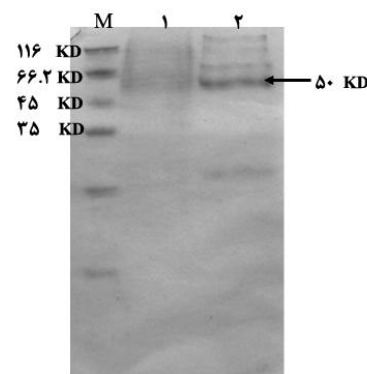
در آزمایش PT، نمونه‌های حاوی فاکتور FVII زمان انعقاد کوتاه‌تری نسبت به نمونه‌های فاقد فاکتور FVII دارند. در جدول ۳ غلظت‌های استاندارد کیت فاکتور FVII به ترتیب رقت نشان داده شده است. ۴ سری رقت از استاندارد کیت نشان داده شده است. در سمت راست جدول زمان‌های انعقاد ارایه شده است. زمان انعقاد در رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII نوترکیب و در کلون‌های پایدار در محدوده غلظت‌های استاندارد ۱/۸ و ۱/۴ کیت PT می‌باشد. زمان انعقاد در CHO فاقد ژن فاکتور VII نوترکیب در حد کنترل منفی آزمایش است. نتایج نشان‌دهنده حضور فاکتور VII در رده سلولی CHO می‌باشد.

هفت در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده بود.

جدول ۲: نتایج الایزا فاکتور FVII نوترکیب

نمونه	۴۹۲ OD
FVII a*	۱/۷۵۲ ± ۰/۱۲۳
FVII a*, 1.4 dilution	۰/۶۱۲ ± ۰/۱۶۵
FVIIa*, 1.8 dilution	۰/۱۹۷ ± ۰/۱۱۶
FVIIa*, 1.10 dilution	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۹۴
CHO-pcDNA3.1/ FVII (clone 1)	۱/۰۲۳ ± ۰/۱۲۱
CHO-pcDNA3.1/ FVII (clone 2)	۱/۶۵۲ ± ۰/۱۱۸
CHO (negative control)	۰/۰۴۸ ± ۰/۰۳۲
CHO- pcDNA3.1	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۳۲

a*: غلظت‌های استاندارد ژن فاکتور FVII نوترکیب کیت الایزا



شکل ۵: M مارکر. ستون ۱ محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور خالی و ستون ۲ محیط کشت رده سلولی CHO ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن فاکتور VII است.

بررسی بیان پروتئین فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت رده سلولی CHO با استفاده از وسترن بلات روش دیگر برای تایید وجود پروتئین FVII در محیط کشت، آشکارسازی پروتئین با آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به پروتئین فاکتور VII با انجام آزمایش وسترن بلات بود. ابتدا محیط کشت حاوی سلول ترانسفکت شده با FVII و محیط کشت حاوی سلول ترانسفکت شده با وکتور خالی، SDS PAGE شد و سپس بر روی غشای PVDF منتقل گردید و غشا تحت تاثیر آنتی‌بادی اختصاصی FVII، قرار گرفت. حضور باند ۵۰ رده سلولی CHO حاوی ژن فاکتور VII (FVII)، نشان‌دهنده حضور پروتئین فاکتور VII (FVII) و واکنش اختصاصی

جدول ۳: نتایج آزمایش PT

نمونه	زمان
FVII ^a	۱۶ sec.
FVII ^a , 1.2 dilution	۲۰ sec.
FVII ^a , 1.4 dilution	۲۶ sec.
FVII ^a , 1.8 dilution	۳۳ sec.
CHO- pc DNA3.1/ FVII (clone 1)	۳۰ sec.
CHO- pc DNA3.1/ FVII (clone 2)	۲۹ sec.
CHO (negative control)	۱ min
CHO - pcDNA3.1	more than ۶۰ sec.

بحث

کنسانتره فاکتورهای انعقادی متعددی به وسیله روش‌های نو ترکیبی تولید می‌شوند. برخی از آن‌ها هم اکنون جهت استفاده درمانی بیماری‌های خونریزی دهنده در دسترس هستند و بعضی از آن‌ها در مرحله مطالعه‌های بالینی قرار دارند. کنسانتره فاکتور VIII نو ترکیب در بسیاری از کشورها دارای تاییدیه است و یک نوع از آن که دومین B حذف شده دارد، در آینده نزدیک جهت استفاده درمانی در دسترس قرار خواهد گرفت. کنسانتره فاکتور VIIa نو ترکیب در مرحله نهایی انجام آزمایش‌ها جهت استفاده برای بیماران هموفیلی دارای آنتی‌بادی بازدارنده قرار دارد. فاکتور IX نو ترکیب به طور موفقیت‌آمیزی در حیوانات آزمایش شده است و به میزان اندکی در انسان نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۵).

برن تاپ در سال ۱۹۹۷ به معرفی نسل دوم فاکتور VIII نو ترکیب فاقد ناحیه B پرداخت که در آن اسید آمینه سرین ۷۴۷ به گلوتامین ۱۶۳۸ متصل شده است و به همین علت rVIII SQ نام دارد و آن را با توجه به بررسی‌های مختلف برای درمان مناسب معرفی کرد. این فاکتور در سلول‌های CHO تولید و پس از خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی، ایمونو افینیتی و با روش حلال - دترجنت (تری - ان - بوتیل فسفات و تریتون X ۱۰۰) ویروس‌زدایی گردید. در محصول نهایی نیز برای پایداری آن به جای آلبومین و VWF، از پلی‌سوربات ۸۰ همراه با L-histidine و Sugar به همراه کلرید سدیم و

کلسیم استفاده شد (۶). در مطالعه‌ای که سیتارام و همکاران انجام داده‌اند، به جای استفاده از سلول و استخراج RNA و سپس ساخت cDNA، از کتابخانه cDNA کبد Rat استفاده کردند (۷). هم چنین در مطالعه انجام شده توسط روییز و همکاران، cDNA کد کننده فاکتور VII خرگوش را از فاژ لامبدا gtl1 تخلیص کردند (۸). در این مطالعه ژن فاکتور VII حاصل از مرحله فوق را به منظور ورود به وکتور یوکاریوتی pcDNA، توسط آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *NotI* در دمای مناسب ۳۷ درجه سانتی‌گراد Overnight برش داده و در راستای آن وکتور pcDNA هم با همان آنزیم‌ها برش داده شد. وکتور pcDNA حاوی ژن مقاوم به نئومایسین است که جهت غربالگری کلون‌های سلول‌های پایدار مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹، ۱۰).

در مطالعه‌های انجام شده توسط سیتارام و همکاران، از آنزیم‌های محدود کننده *NheI* و *BamHI* استفاده گردید و هم چنین جهت کلونینگ فاکتور VII Rat از وکتور pIRES2-Neo (اینویترژن) بهره بردند (۷).

روییز و همکاران در مطالعه دیگری، جهت سنجش توانایی cDNA جداسازی شده از فاکتور VII نو ترکیب برای کد کردن سنتز پروتئین نو ترکیب فاکتور VII خرگوش، cDNA فاکتور VII خرگوش را به طور مستقیم در محل‌های اختصاصی برش آنزیم‌های محدود اثر *Hind* III و *Sal* I و وکتور بیانی p CMV s، ساب کلون نمودند (۸). در هر دو مطالعه انجام شده توسط سیتارام و روییز جهت بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، از معرف لیپوفکشن (جیبکو - کانادا) استفاده کردند (۸، ۷).

در مطالعه‌های مشابه سیتارام و روییز از سلول ۲/۳ HEK (Human Embryonic Kidney) جهت بیان فاکتور VII نو ترکیب استفاده شد. این سلول دارای چسبندگی نسبتاً خوب بوده و جهت نو ترکیبی مناسب می‌باشد (۱۱).

شرکت Novoseven که فعلاً فناوری تولید فاکتور VII نو ترکیب فعال (rFVIIa) را در دست دارد، فاکتور VII نو ترکیب را در رده سلولی BHK (Baby Hamster Kidney) بیان کرده و سپس آن را در طی تخلیص با مکانیسم ناشناخته‌ای فعال نمودند و از آن جایی که این

جداسازی کردند.

خالص بودن و صحت فاکتور VII نو ترکیب خرگوش به وسیله الکتروفورز ژل پلی آکریلامید و وسترن بلات تایید شد (۸).

سیتارام و همکاران در آخرین مرحله تحقیق خود برای تایید فعالیت فاکتور VII نو ترکیب Rat از آزمایش تشکیل لخته به وسیله اتو آنالایزر انعقادی CA-۶۰۰۰ سیس مکس در حضور پلاسمای FVII deficient استفاده کردند و تشکیل لخته، فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نو ترکیب Rat را تایید کرد (۷).

روبیض و همکارانش نیز در مرحله آخر، فاکتور VII نو ترکیب هموژن خرگوش را که از لحاظ بیولوژیکی فعال بود، با استفاده از آزمایش PT و به وسیله پلاسمای فاقد فاکتور VII سنجش کردند. زمان آزمایش PT پلاسمای فاقد فاکتور VII به کمک مایع رویی فلاسک کشت، ۷۵ درصد کاهش داده شد (۸).

نتیجه گیری

با توجه به نقش فاکتور VII در آبشار انعقادی و مسیر خارجی، می توان آن را به عنوان دارو در درمان بیماران هموفیل دارای آنتی بادی بازدارنده بر علیه فاکتورهای معیوب، مورد استفاده قرار داد. با توجه به این که سالانه رقم بسیار بالایی برای وارد کردن فاکتور VII نو ترکیب به دولت تحمیل می گردد، بومی سازی تولید این محصول در داخل کشور می تواند یک راه کار کارآمد برای حل مشکلات فوق باشد و مطالعه ما اولین مرحله در راستای رسیدن به سوی هدف مذکور می باشد. به طور حتم یافتن راهی برای بیان در سطح بالا همراه با عملکرد صحیح این فاکتور می تواند راه حل اساسی در درمان هموفیلی با هزینه بسیار کمتر باشد.

محصول به صورت تجاری است جزئیات بیشتری در بانک اطلاعات PubMed موجود نمی باشد (۱۲).

سیتارام و همکارانش جهت غربالگری سلول های ۲/۳ HEK دارای ژن فاکتور Rat VII و وکتور p IRES2-Neo از آنتی بیوتیک جنتیسین استفاده کردند. ولی روییض و همکاران در مطالعه جهت بیان و خالص سازی فاکتور VII نو ترکیب خرگوش در وکتور بیانی CMVs p، از آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین استفاده نمودند (۷، ۸).

سیتارام محیط فلاسک های کشت سلول را پس از ۴۸ الی ۷۲ ساعت بعد از افزودن ویتامین K و فنل رد به عنوان نمونه جمع آوری کرده و بیان فاکتور VII را به وسیله آنتی بادی پلی کلونال آنتی هیومن توسط روش وسترن بلات تایید کرد (۷).

روبیض و همکاران در مطالعه دیگری پس از گذشت ۴ روز از زمان ترانسفکشن برای بررسی بیان FVII نو ترکیب خرگوشی، از کیت الایزا استفاده نمودند و میزان بیان را در حدود ۵۰ ng/dl ردیابی کردند. آن ها در نهایت پروتئین نو ترکیب را به کمک روش رسوب باریوم سیترات تخلیص کردند و غلظت پروتئین به دست آمده در مدت یک هفته ۵-۱۰ mg/L محاسبه شد. در این پژوهش با توجه به غلظت مارکر پروتئینی مورد استفاده در SDS-PAGE (۰/۱۵ mg/ml) و مقایسه آن با باند پروتئین نو ترکیب و هم چنین نتایج حاصل از آزمایش الایزا، حداقل پروتئین تولید شده ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن را ۴۹۰ ± ۲۱ ng/ml می توان برآورد کرد.

پس از این مرحله، فاکتور VII نو ترکیب خرگوش را از محیط کشت توسط روش های پرسپیانتاسیون باریم سیترات، کروماتوگرافی DEAE سفارز FF، هم چنین آمین آگارز و کروماتوگرافی گرایشی با استفاده از شیب غلظت آنتی بادی پلی کلونال بر علیه فاکتور VII خرگوش

References :

- 1- 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.
- 2- Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Wermes C, *et al.* Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat* 2005; 26(3): 249-54.
- 3- Bowen DJ. Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55(2):127-44.
- 4- Rodgers GM, Greenbergs CS: Inherited coagulation disorders. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, *et al.* Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1999: p. 1682-1732.
- 5- Doreen B. Brettler: Recombinant coagulation factor product. New England Hemophilia center 1999; 1: 155-8.
- 6- Berntrop E. Second generation , B - domain deleted recombinant factor VIII. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 256-60.
- 7- Seetharam S, Murphy K, Atkins C, Feuerstein G. Cloning and expression of rat coagulation factor VII. *Thromb Res* 2003; 109(4): 225-31.
- 8- Ruize SM, Sridhara S, Blajchman MA, Clarke BJ. Expression and purification of recombinant Rabbit Factor VII. *Thromb res* 2000; 98(2): 203-11.
- 9- Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to Antibiotic Resistance with bacterial Gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1982; 1(4): 327-41.
- 10- Invitrogen. Available from: URL: <http://www.invitrogen.com/Catalog> Nos 2001; 20: 790-5.
- 11- Berkner KL. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: Factor IX and VII. *Methods Enzymol.* 1993; 222: 450-77.
- 12- The internet Drug Index. Nordisk data. rFVIIa 2001; Available From: URL: <http://www.rxlist.com/cgi/generic/Novoseven.htm> ovo

Isolation, cloning and expression of recombinant human factor VII in CHO cell line

Halabian R.¹ (MS), Shagerdi Esmaili N.¹ (MS), Oodi A.¹ (MS), Masroori N.¹ (MS), Amirizadeh N.¹ (PhD), Mousavi Hosseini K.¹ (PhD), Gharehbaghian A.¹ (PhD), Rezvan H.¹ (PhD), Jalili M.A.¹ (PhD), Habibi Rudkenar M.¹ (PhD)

¹Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Factor VII is a plasma glycoprotein that participates in the coagulation process leading to the generation of fibrin. Factor VII plays an important role in the cascade of coagulation. The aim of this study was to clone and express human recombinant factor VII in CHO cell line as an eukaryotic host cell.

Materials and Methods

In this descriptive study, FVII cDNA was isolated from HepG2 cell line and cloned to pcDNA 30.1(+) vector. The constructs were transfected to CHO cell line. A cell line that permanently expressed recombinant factor VII was established. The expression of recombinant FVII was determined by RT-PCR, ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis. Biological activity of recombinant factor VII was determined by prothrombin time assay in factor FVII-depleted plasma.

Results

The results showed that FVII was successfully cloned and expressed. After 3 weeks stable cell lines were generated in the culture of the CHO cell line in the presence of geneticin. RT-PCR, ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis results indicate the expression of FVII in the stable clones. A three- to four-fold decrease of the specific coagulant activity of rFVII was observed that indicates of rFVII being biologically active.

Conclusions

Four thousands to Six thousands vials of rFVII were imported to our country having high cost for the government. Therefore, production of rFVII through recombinant DNA technology within lab scale is the first step to overcome the problems.

Key words: Hemophilia, rFVIIa, CHO, Transfection

SJIBTO 2009; 6(1): 1-11

Received: 21 Oct 2008

Accepted: 21 May 2009

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Assistant professor of Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax: (+9821)88601599 E-mail: roudkenar@ibto.ir