خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۲ تابستان ۹۰ (۱۰۳-۹۶)

مقاله پژوهشی

کلون‌سازی و مطالعه بیان فاکتور بافتی نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتیک CHO

مونا خورشیدفر[۱]، ناصر امیری‌زاده[۲]، مهریار حبیبی رودکنار[۳]

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور بافتی(TF)، اصلی‌ترین آغازکننده آبشار انعقادی است. برای بررسی مسیر خارجی انعقاد، اندازه‌گیری زمان پروترومبین 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 کلون و به سلول‌های CHO منتقل 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 کلرورکلسیم به پلاسمای سیتراته افزوده شدند و زمان لخته شدن پلاسما ثبت گردید. فعال‌سازی فاکتور VII در پلاسما با روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در آنالیز پروتئین‌های جدا شده از سلول‌های ترانسفکت شده با روش SDS-PAGE ، باندی حدود ۴۰ کیلودالتون 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 ۳ دقیقه به ۳ ± ۲۱ ثانیه کاهش یافت. هم چنین اضافه کردن غشای این سلول‌ها به پلاسما در حضور کلرور کلسیم، موجب فعال‌سازی فاکتور VII به میزان ng/ml ۳۵ ±۸۱۰ شد.

نتیجه گیری

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

کلمات کلیدی: سلول‌های CHO، فاکتور VII، زمان پروترومبین

تاریخ دریافت : ۸۹/ ۷/۱۳
تاریخ پذیرش : ۸۹/۱۱/۱۶

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

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 اندوتلیال حضور دارد. ژن آن kbp ۱۲/۴ بوده، دارای ۶ اگزون می‌باشد و روی کروموزوم یک انسانی در جایگاه p۲۲-p۲۱ قرار دارد. فاکتور بافتی متشکل 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(۶-۱).

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

از جمله اشکالات وارده به کیت‌های تهیه شده با ترومبوپلاستین 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 کنترل غلظت، بیان پروتئین و هم چنین میزان کشت سلول‌ها در محیط اشاره نمود. در نتیجه دستیابی به غلظت‌های 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

به ترتیب از کیت‌های RNX (- plus) Isolation of RNA محصول شرکت سیناژن به منظور استخراج RNA ، Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR محصول اینویتروژن برای RT-PCR ، Taq Takara محصول ژاپن برای PCR ، High Pure Plasmid Isolation 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 کنترل مثبت و monoclonal antibody TF(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 هگزامر، cDNA از روی RNA ساخته شد. cDNA حاصله با روش PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در دمای آنیلینگ ºC ۵۵ طی ۳۰ سیکل تکثیر شد. به منظور تهیه وکتور پروکاریوت به عنوان حامل برای قطعه ژنی مورد نظر، پس از کشت باکتری‌های *E.coli* Top10 در محیط LB ، پلاسمید pcDNA3.1 از آن‌ها استخراج گردید. برای اتصال قطعه ژنی مورد نظر به پلاسمید، در دو انتهای '۳ و' ۵ DNA فاکتور بافتی، جایگاه برش با آنزیم‌های محدودکننده 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 LB (Luria-Bertani) 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 ºC ۴۲ 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

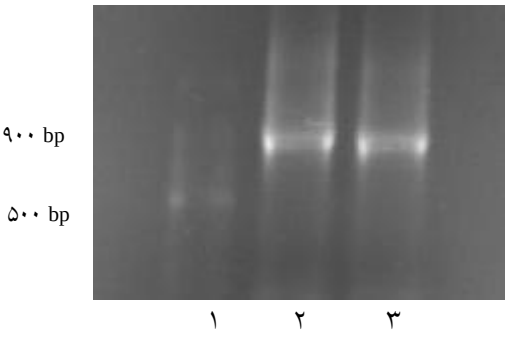
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

(Digestion) با استفاده از آنزیم‌های BamH I و XhoI و PCR 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 (رُوش) استفاده شد.

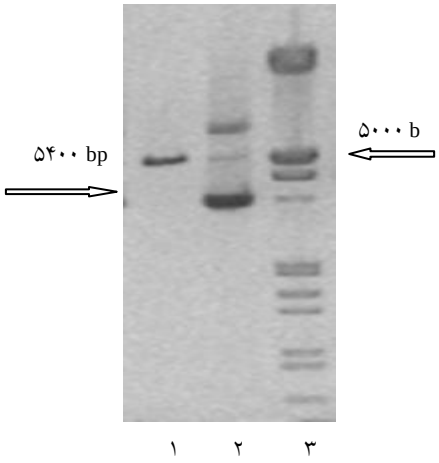
پس از انتقال پلاسمید به این سلول‌ها برای جداسازی کلون‌های نوترکیب مقاوم، از آنتی‌بیوتیک Geneticin استفاده و سپس با روش Freez-Thaw و سانتریفوژ با دور بالا، پروتئین سلولی استخراج گردید. برای تایید پروتئین حاصل شده از روش SDS-PAGE و وسترن بلات و به منظور بررسی فعالیت بیولوژیک فاکتور بافتی نوترکیب، از آزمایشی 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 پلاسما 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 فعال‌شدن فاکتور VII ، از آزمون آماری Anova و نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

یافته‌ها

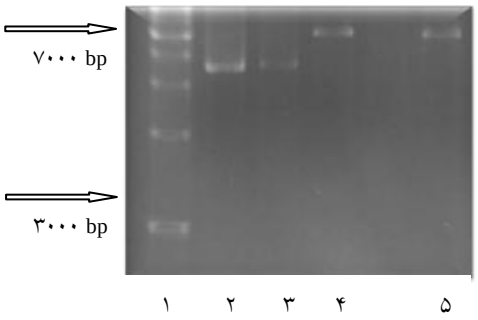
cDNA به دست آمده با استفاده از روش PCR تکثیر و محصول آن روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. نتیجه ایجاد باند ۹۰۰bp بود که با اندازه ژن مورد نظر مطابقت داشت(شکل۱). پلاسمید pcDNA3.1 از باکتری‌های *E.coli* Top 10 استخراج شد(شکل۲). عمل Ligation روی این دو قطعه انجام و پلاسمید حاوی ژن فاکتور بافتی (pcDNA3.1/TF) ساخته شد(شکل۳). 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(شکل۴). ترانسفکشن سلول‌های CHO با استفاده از فیوژن ۶ صورت گرفت (شکل۵).



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

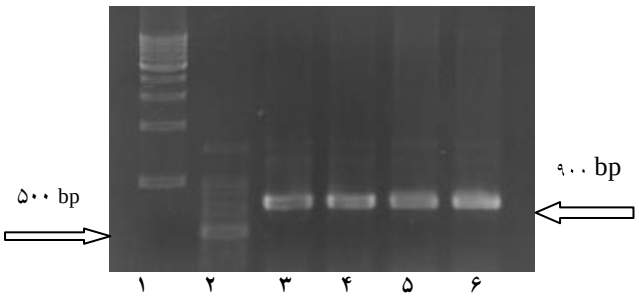


شکل۲: پلاسمید pcDNA3.1 ؛۱- پلاسمید خطی۲- پلاسمید حلقوی ۳- DNA مارکر

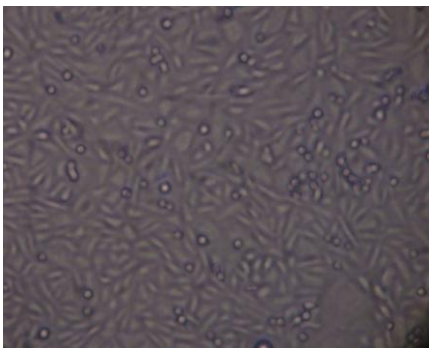


شکل ۳: ژن کلون شده فاکتور بافتی در پلاسمید pcDNA3.1 ؛ ۱- DNA مارکر ۲ و۳- pcDNA3.1 بدون قطعه ژنی مورد نظر ۴و۵- pcDNA3.1 همراه با قطعه ژنی مورد نظر

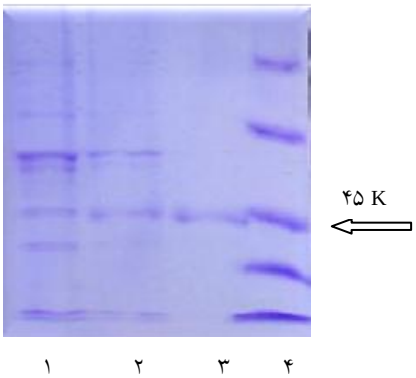
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



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



شکل ۵: سلول‌های CHO کشت داده شده



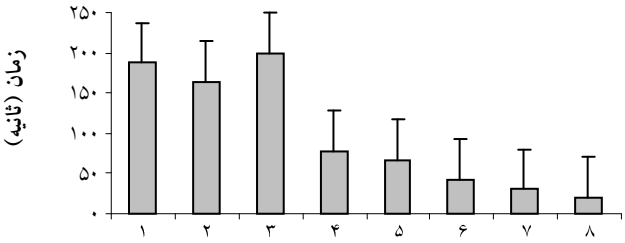
شکل ۶: نتایج SDS-PAGE فاکتور بافتی استخراج شده از سلول‌های CHO ؛ ۱– سلول‌های CHO ترانسفکت نشده(کنترل منفی) ۲– سلول‌های CHO ترانسفکت شده ۳– فاکتور بافتی نوترکیب(کنترل مثبت) ۴– مارکر پروتئین

پروتئین‌های جدا شده از غشای سلولی برای آنالیز-SDS 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).

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



شکل۷: نتیجه وسترن بلات فاکتور بافتی؛ ۱– سلول‌های CHO ترانسفکت نشده ۲– سلول‌های CHO ترانسفکت شده ۳– فاکتور بافتی نوترکیب (کنترل مثبت)



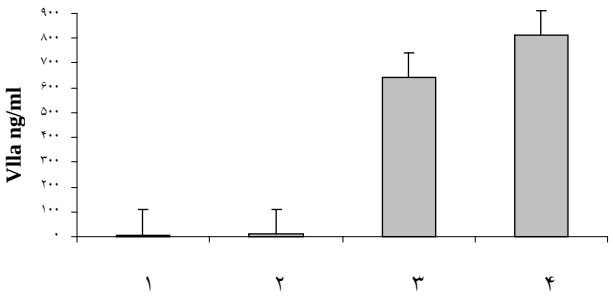
نمودار۱: زمان لخته شدن پلاسما در حضور سلول‌های بیان‌کننده فاکتور بافتی؛(نتایج زمانی به صورت Mean ± SD بیان شده است)۱ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم ۲ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + سلول‌های CHO ترانسفکت نشده ۳ـ پلاسمای فاقد فاکتور VII + کلرور کلسیم ۴ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + $۱۰^۴$ سلول CHO ترانسفکت شده ۵ ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + ۲×۱۰^۴ سلول CHO ترانسفکت شده ۶ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + ۵×۱۰^۴ سلول CHO ترانسفکت شده ۷ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + $۱۰^۵$ سلول CHO ترانسفکت شده ۸ ـ پلاسمای سیتراته + کلرور کلسیم + غشای $۱۰^۵$ سلول CHO ترانسفکت شده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

زمان لخته شدن پلاسمای سیتراته در حضور کلرور کلسیم با اضافه کردن غشای سلولی ۳ ± ۲۱ ثانیه، با اضافه کردن سلول ترانسفکت شده کامل ۳ ± ۳۰ 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 پلاسما شدند ($p< ۰/۰۱$).

طبق نتایج به دست آمده، میزان فاکتور VII فعال در حضور سلول‌های CHO ترانسفکت شده کامل ۳۰ ng/ml ± ۶۴۰ و در حضور غشای این سلول ها ۳۵±۸۱۰ ng/ml بود که نسبت به سلول های ترانسفکت نشده CHO، در مجاورت با پلاسمای انباشته شده طبیعی، به طور محسوسی افزایش سطح فعال شدن فاکتور VII را نشان داد و بیانگر فعال شدن فاکتور VII در حضور فاکتور بافتی بود($p< ۰/۰۱$، نمودار ۲).



نمودار۲: بررسی میزان فعال شدن فاکتور VII به وسیله فاکتور بافتی (نتایج به صورت Mean ± SD بیان شده است) ۱- پلاسمای سیتراته ۲- پلاسمای سیتراته + $۱۰^۵$ سلول CHO ترانسفکت نشده ۳- پلاسمای سیتراته + $۱۰^۵$ سلول CHO ترانسفکت شده ۴- پلاسمای سیتراته + غشای $۱۰^۵$ سلول CHO ترانسفکت شده

بحث

همواره فاکتور بافتی استخراج شده از مغز خرگوش در آزمایش PT جهت بررسی مسیر خارجی انعقاد مورد استفاده بوده است. از جمله اشکالات وارده 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 منتهی 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 پلاسما در حضور کلسیم بود. هم چنین این فاکتور نوترکیب توانایی فعال‌سازی فاکتور VII موجود در پلاسما را داشت.

در بررسی‌هایی که الئونور 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 لامبدا شدند. cDNA 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 اینترون می‌باشد(۱). هم چنین بررسی‌های ولفارم و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان داد ژن این فاکتور روی کروموزوم ۱ انسانی و در جایگاه P21-P22 قرار دارد و دارای سه ناحیه خارج سلولی، بین غشایی و سیتوپلاسمی است(۲). در بررسی‌های آلناواز و همکاران در سال ۱۹۹۲ مشخص شد توالی تری‌پپتید(WKS) -Trp-Lys-Ser سه بار در ناحیه خارج سلولی فاکتور بافتی تکرار شده است. این رخداد از نظر آماری بعید است و با این

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

بررسی متوجه شدند که ناحیه خارج سلولی در عملکرد فاکتور بافتی حایز اهمیت است(۱۰). در بررسی‌های پابورسکی 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 فاقد چربی از سلول‌ها، آپوپروتئین TF از نظر بیولوژیکی بی‌اثر بوده و شکل‌گیری کمپلکس TF-VIIa نیز با مشکل مواجه بود(۱۱). در مطالعه حاضر از آن جایی که طول کامل ژن فاکتور بافتی خیلی بزرگ نبود، cDNA کامل ژن فاکتور بافتی در نظر گرفته شد. پس از ساخت cDNA و کلون کردن آن در وکتور pcDNA3.1 ، باید ژن مورد نظر در سلولی مناسب بیان می‌شد. برای بیان پروتئین‌های نوترکیب یوکاریوتی با عملکرد صحیح باید از سلول‌های یوکاریوتیک استفاده نمود. یکی از این سلول‌ها که در مطالعه‌های مختلف برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است، سلول‌های CHO است. این سلول‌ها تغییرات مناسب پس از ترجمه، نظیر گلیکوزیلاسیون را بر روی پروتئین انجام می‌دهند(۱۳، ۱۲). به منظور اطمینان از این که پروتئین نوترکیب بیان شده در غشای سلول‌های CHO همان فاکتور بافتی است، در روش وسترن بلات از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد فاکتور بافتی نوترکیب که محصول شرکت R&D بود استفاده شد. این آنتی‌بادی بر علیه ناحیه خارج سلولی فاکتور بافتی می‌باشد. 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 می‌باشد 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 پلاسمای انباشته شده طبیعی، کلرور کلسیم و سلول CHO ترانسفکت شده کامل، غشای سلول CHO ترانسفکت شده و سلول CHO ترانسفکت نشده(به عنوان کنترل منفی) انجام شد(۱۴). در این مطالعه نیز با غشای سلولی نسبت به سلول کامل نتایج بهتری گرفته شد. طبق مطالعه روبرت کلی و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، روند فعال شدن انعقاد از طریق فعال شدن فاکتور VII به واسطه فاکتور بافتی انجام می‌شود(۱۵). در این تحقیق نیز به منظور تاییدی مبنی بر این که پروتئین نوترکیب ساخته شده قادر به فعال کردن فاکتور VII می‌باشد، میزان فعالیت این فاکتور درحضور فاکتور بافتی بیان شده در سلول‌های CHO مورد سنجش قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر این بود که فاکتور بافتی نوترکیب می‌تواند با فعال 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 پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت مالی مرکز تحقیقات انتقال خون ایران انجام شد.

References :

1- 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.
2- Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*. FASEB J 1994; 8(6): 385-90.
3- 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.
4- 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.
5- Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS. The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is requiered for binding of factor VII. J Biol Chem 1991; 266(16): 10294-9.
6- 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.
7- Miller JL. Hemostasis and Thrombosis. In: Mcpherson

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

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 domin 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

Original Article

Cloning and expression of recombinant tissue factor in CHO cells

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

[1]Blood 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 $CaCl_2$ 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 tarnsfected 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 (10^6cell/ml) to the citrated plasma in presence of $CaCl_2$ 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]