مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی کدون ژن فاکتور سلول‌های بنیادی (SCF) و ارزیابی بیان این ژن با کمک وکتور pBudCE4.1 در سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO)

احسان حیدری سورشجانی[۱]، مریم پیمانی[۱*]، علی کاظمی باباحیدری[۲]، کامران قائدی[۳و۴]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴- گروه بیوتکنولوژی سلولی، مرکز تحقیقات سلولی، مرکز علمی آموزشی، کشت و تحقیق ، موسسه بیوتکنولوژی رویان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور سلول بنیادی (SCF) یک سایتوکاین خونی است که می‌تواند از طریق تأثیر بر روی سلول‌های مولد خون‌ساز در تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی، بقاء، تکثیر و تمایز ماست سل‌ها و همچنین افزایش تکثیر و تهاجم سلول‌های توموری بااهمیت باشد و نقش درمانی آن در بهبود بیماری‌هایی نظیر آلزایمر و سکته‌های قلبی در حال بررسی و تحقیق است. هدف از این تحقیق کلون‌سازی ژن SCF به‌وسیله حامل بیانی pBudCE4.1 با بهینه‌سازی کدون در سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی توالی SCF بعد از بهینه‌سازی کدون برای سلول‌های CHO و تغییر دادن محتوی G+C به میزان بهینه به‌صورت سنتتیک ساخته شد و در وکتور بیانی pBudCE4.1 ساب کلون شد. سپس ژن SCF به همراه پلاسمید موردنظر به درون سلول‌های CHO-K1 ترانسفکت شد و با استفاده از RT qPCR میزان بیان ارزیابی گردید.

نتایج: حامل بیانی نوترکیب pBudCE4.1/SCF ساخته شد و با تکنیک PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تائید قرار گرفت. نتایج RT qPCR نشان داد که ژن SCF پس از بهینه‌سازی کدون در سلول‌های CHO می‌تواند بیان شود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که به‌خوبی می‌توان نسبت به همسانه‌سازی ژن SCF از طریق حامل بیانی pBudCE4.1 اقدام کرد و این حامل بیانی می‌تواند یک حامل مناسب برای بیان ژن SCF در سلول‌های CHO باشد.

کلمات کلیدی: بهینه‌سازی کدون، فاکتور سلول بنیادی (SCF)، سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) کلونینگ

مقدمه

فاکتور سلول‌های بنیادی (Stem Cell Factor, SCF) که به‌عنوان فاکتور steel (Steel Factor, SLF) و لیگاند رسپتور c-kit نیز شناخته می‌شود، یک سایتوکاین خونی است که بااتصال به رسپتورهای c-Kit یک سری اثرات بیولوژیکی به راه می‌اندازد. SCF به دو فرم محلول و متصل به غشاء وجود دارد که توسط سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های اندوتلیال در سراسر بدن بیان می‌شود و در ترویج تکثیر، مهاجرت، بقاء و تمایز سلول‌های خون‌ساز اولیه، ملانوسیت و سلول‌های زایا دخالت دارد (۱). ژن آن در موش بر روی کروموزوم ۱۰ و در انسان بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد. SCF در انسان، موش و رت توسط ۹ اگزون کد می‌شود. جهش‌هایی در ناحیه‌ی لوکوس SL یا لوکوس W که SCF و c-Kit را به ترتیب کد می‌کنند شناسایی شده است (۱-۳). فرم SCF متصل به غشاء شامل دمین‌های خارج سلولی، دمین گذرنده از غشاء و ناحیه‌ی درون‌سلولی است که دمین خارج سلولی به‌سرعت می‌شکند و SCF محلول ۱۶۵ آمینواسیدی را به وجود می‌آورد. نسخه‌ی کوتاه‌تر فاقد اگزون ۶ به‌صورت متصل به غشاء می‌ماند. هر دو SCF محلول و متصل به غشاء به c-Kit متصل می‌شود و فعالیت تایروزین کینازی آن‌ها را فعال می‌کنند اما تفاوت‌های کمی و کیفی در نحوه‌ی سیگنال دهی دارند. پروتئازهایی که

*نویسنده مسئول: مریم پیمانی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
Email: peymani62_m@yahoo.com

مسئول برش SCF متصل به غشاء است شامل متالوپروتئاز -۹ ماتریکس (Matrix metalloprotease-9)، Chymase-1 (۲) و همچنین برخی از اعضای خانواده‌ی پروتئین‌های غیر جامعیت دهنده (دیس اینتگرین) و متالوپروتئیناز (A Disintegrin and Metalloproteinase, ADAM) ازجمله ADAM 17 و ADAM 33 است (۳). جالب‌توجه است که ADAM 19 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی منفی برای آزادسازی SCF عمل می‌کند (۱). SCF محلول به‌صورت ساختارهای همودایمر وجود دارند که دو تا از این مونومرها به‌صورت سربه‌سر با یکدیگر واکنش داده و کمی پیچ‌خورده و دایمری بلند را تشکیل می‌دهد. دایمر شدن SCF یک فرآیند دینامیکی است که نقش مهمی در دایمر شدن و فعالیت c-Kit بازی می‌کند. توالی آمینواسیدی شکل حلال SCF دارای وزن تقریبی ۱۸/۵۰۰ تا ۴۰/۰۰۰ کیلو دالتون دارد. نتیجه بیان SCF انسانی در سلول‌های تخمدان هامستر (CHO) تولید پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸/۰۰ تا ۴۰/۰۰۰ کیلودالتونی است که نشان می‌دهد سنگین‌تر و گلیکوزیلاسیون‌های آن به‌صورت هتروژنی است که تقریباً ۳۰ درصد وزن آن را کربوهیدرات‌ها تشکیل می‌دهد (۴). این کربوهیدرات‌ها دارای اتصالات N-گلیکوزیلی و O-گلیکوزیلی است که هردوی آن‌ها با سیالیک اسید اتصال یافته‌اند (۵).

سلول‌های بنیادی خون‌ساز یا سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز (Hematopoietic Stem and Progenitor cells, HSCS/ HPCs) سلول‌های مغز استخوانی هستند که سلول‌های خونی را تولید می‌کنند. بقاء، تکثیر و تمایز HSCS/ HPCs توسط فاکتورهای رشد خون‌ساز کنترل می‌شود.

SCF و عامل محرک کلنی‌های گرانولوسیت (Granulocyte-colony stimulating factor, G- CSF) اعضای ضروری از خانواده‌ی فاکتور رشد خون‌ساز است. نشان داده شده است که SCF و G-CSF به‌شدت در تنظیم تکثیر، تمایز و تحرک HSC/ HPC درگیر هستند (۶). علاوه بر اثرات SCF و G-CSF بر روی سیستم خون‌ساز، مطالعات نشان می‌دهد که SCF و G-CSF نیز ممکن است در سیستم عصبی مرکزی نقش ایفا کنند. بسیاری از مطالعات اخیر مشخص کرده که تجویز هریک از فاکتورهای SCF و G-CSF به‌تنهایی در سکته‌ی مغزی ایسکمیک اثرات سودمند دارد (۷).

باوجوداینکه جهش‌های مترادف پیامدهای قابل‌توجهی برای فرآیندهای سلولی در تمام گونه‌ها دارد، درنتیجه درک درستی از تمایل کدونی (Codon-usage) نقش محوری در تکامل مولکولی و بیوتکنولوژی دارد و منجر به کشف الگوهای جدیدی در مورد سنتز پروتئین شده است. هنگامی‌که در پدیده دژنراسیون طبیعی کد ژنتیکی کشف شد دانشمندان از درستی نقش جهش‌های مترادف متعجب و متحیر بودند (۸). مرکز زیست‌شناسی مولکولی dogma نشان می‌دهد که جهش مترادف (جهش‌هایی که کدهای آمینواسید را تغییر نمی‌دهد) هیچ تأثیری بر روی توالی پروتئین و بنابراین هیچ تأثیری بر عملکرد سلولی، تناسب‌اندام ارگانیسمی یا تکامل ندارد. بااین‌حال، در بیشتر توالی ژنوم، کدون‌های مترادف در فرکانس بالا استفاده می‌شود، این پدیده تمایل کدونی نامیده می‌شود و در حال حاضر به‌عنوان شکل دادن به بیان ژن و عملکرد سلولی از طریق اثرات آن بر فرآیندهای متنوع، اعم از پردازش RNA برای ترجمه پروتئین و تاخوردگی پروتئین که بسیار مهم هستند، شناخته می‌شوند. به‌طور طبیعی وجود تمایل کدونی فراگیر است و در بسیاری از گونه‌ها بسیار قوی است. جهش‌های مترادف در تنظیمات کاربردی مهم هستند و همچنین استفاده از کدون‌های خاص می‌تواند بیان ژن را بیش از هزار برابر افزایش دهد. قوی‌ترین عامل تعیین‌کننده تمایل کدونی در سراسر گونه‌ها محتوای GC ژنومی است. درواقع، تفاوت در کدون بین گونه‌های باکتریایی می‌توان با دقت از محتوای نوکلئوتید در مناطق غیرکدینگ پیش‌بینی کرد. برخلاف انتظار اولیه محتوی GC از ژنوم باکتریایی یا ژن کد کننده‌ی پروتئین با دمای رشد بهینه ارتباطی ندارد (اگرچه جالب‌توجه است، RNAهای ساختاری چنین همبستگی را دارند) (۹). با توجه به نیاز کشور ما به پروتئین نوترکیب SCF و اهمیت و کاربرد این پروتئین در مطالعات تحقیقاتی و جنبه‌های دارویی آن، این پژوهش باهدف معرفی کردن بهینه‌سازی کدون برای تولید SCF با استفاده از حامل بیانی pBudCE4.1 در سلول‌های CHO طراحی شد.

مواد و روش‌ها

کلون نمودن توالی کدکننده SCF در حامل بیانی

توالی ژن کد کننده پروتئین SCF بر اساس ژن ثبت‌شده در بانک ژن (M59964.1) به دست آمد و پس از بهینه‌سازی کدون از طریق سرورهای Genscript و IDT برای میزبان Cricetulus greseus به‌صورت پلاسمید pGHn/SCF از شرکت Generay به‌واسطه گری شرکت ندای فن خریداری شد و در

ابتدای '۳ ژن، جایگاه شناسایی آنزیم *Sal I* و در انتهای '۵ آن جایگاه شناسایی *BamH I* تعبیه شده بود. وکتور بیانی pBudCE4.1 جهت کلون نمودن توالی کد کننده SCF مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید حاوی ژن مقاومت به زئوسین است. پلاسمید pGHn/SCF بعد از ترانسفورم و تکثیر شدن در باکتری *E.Coli* مستعد از نوع شیمیایی به نام One shot Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) بر روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین غربال‌گری شد و پس از استخراج پلاسمید از طریق کیت استخراج پلاسمید Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer, Kore)، وکتورهای نوترکیب حاوی SCF با برش توسط آنزیم‌های *BamH I* و *Sal I* (Fermentas, Germany) در شرایط اختصاصی و همچنین PCR با پرایمرهای طراحی شده M13 (جدول ۱) جداسازی و انتخاب شدند. وکتورهای نوترکیب انتخاب شده با آنزیم‌های اختصاصی (Bioneer, Kore) استخراج و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

کشت سلولی و ترانسفکت کردن حامل نوترکیب pBudCE4.1/SCF به سلول‌های CHO و تولید رده سلولی پایدار

سلول‌های CHO-K1 بعد از دفریز شدن در کف یک فلاسک بین ۳-۲ ویال ۳۰۰۴ توزیع شد. مرحله تکثیر پس از کنترل سلول‌ها از جهت مورفولوژی، تعداد و عدم آلودگی سلول‌ها مرحله پاساژ دادن در فلاسک T-75 انجام گردید. بعد از شمارش سلولی حدود $۶/۲۵ \times ۱۰^{۵}$ سلول CHO-K1 به فلاسک well ۶ پوشیده شده از ژلاتین منتقل شدند و بعد از گذشت یک روز، ترانسفکت با استفاده از لیپوفکتامین LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA) طبق دستورالعمل مربوطه با حامل نوترکیب pBudCE4.1/SCF انجام شد. برای تولید

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	پرایمر فوروارد (مستقیم) (5′–3′)	پرایمر ریورس (معکوس) (5′–3′)	دمای اتصال(°C)	اندازه محصول (bp)
SCF	ATCGACAAGCTGGTGAAC	AACTCTTCGGGTGTGAAC	۴۷	۱۱۹
GAPDH	CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT	۵۸	۱۲۱
M13	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACG A	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG	۶۳	۷۹۵

تیمار گردید. جایگاه برش هر دو آنزیم در پایین‌دست پروموتر سایتومگالوویروس (CMV) وکتور بیانی pBudCE4.1 است به گونه که قطعه الحاق شونده بعد از پروموتر CMV قرار می‌گیرد. ژن SCF انسانی توسط QIAquick Gel Extraction Kit (Bioneer, Kore) خالص‌سازی شد و در مرحله بعدی واکنش الحاق بین وکتور pBudCE4.1 و ژن حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از DNA Ligation Kit (Takara Kyoto, Japan) انجام شد. محصول واکنش کلونیگ در باکتری *E.Coli* مستعد ترانسفورم گردید، کلونی‌های صحیح بر روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین انتخاب گردیدند. سپس کلنی‌های صحیح با فرآیند کلنی PCR توسط پرایمرهای '5-CMV-F: CGCAAATGGGCGGTAGGC GTG-3 و PolAsv40-R: 5'-TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC-3' غربال‌گری شدند و چند کلنی به‌صورت خالص تکثیر و پلاسمید آن‌ها توسط کیت Nano-Plus Plasmid Mini Extraction kit

رده‌های سلولی پایدار پس از گذشت ۴۸ ساعت بعد از مرحله ترانسفکت کردن، سلول‌های ترانسفکت شده با آنتی‌بیوتیک زئوسین به مدت ۱ ماه با غلظت ۶۰µg/ml تیمار شدند تا این‌که کلونی‌های مقاوم ظاهر شدند.

آنالیز RT-qPCR و RT-PCR

از فلاسک مفروش به سلول‌های غربال‌گری شده، سلول‌ها با تیمار به‌وسیله‌ی تریپسین جدا شده و مجموع RNA با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen, Carlsbad, CA) در سه گروه سلولی (سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pBudCE4.1، سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pBudCE4.1/SCF و سلول‌های CHO) جدا شد. کیفیت RNAهای استخراج شده با ژل ۱ درصد بررسی و میزان جذب نوری آن‌ها با دستگاه نانو دراپ (ترمو آمریکا) اندازه‌گیری گردید. جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی با آنزیم *DNase I*

(فرمنتاز، لیتوانی، شماره راهنما) EN0521 به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار و از آن برای سنتز cDNA استفاده گردید. برای سنتز cDNA از کیت و پرایمرهای تصادفی شش نوکلئوتیدی Random Hexamer (Fermentas, Germany) استفاده شد و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت فوق صورت گرفت.

پس‌ازآن واکنش RT-PCR با ۵ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱۰ پیکومول پرایمرهای اختصاصی GAPDH و SCF (جدول ۱) و ۱/۲۵ میکرولیتر آنزیم SmarTaq (سیناژن، ایران) در بین سه رده گروه سلولی بالا انجام شد. همچنین به‌منظور بررسی بیان ژن SCF، RT-qPCR (سایبرگرین، تاکارا، استو ژاپن، شماره راهنما: RP81WR) با استفاده از دستگاه thermal cycler Roto gene (کوربت، کنکورد، استرالیا) طبق پروتکل با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده GAPDH و SCF (جدول ۱) در بین سه رده گروه سلولی بالا انجام شد. از ژن خانگردان GAPDH برای نورمالیزاسیون سطح بیان ژن SCF استفاده شد. همه اندازه‌گیری به‌طور مستقل سه بار تکرار شد و بیان ژن نسبی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

آنالیز آماری

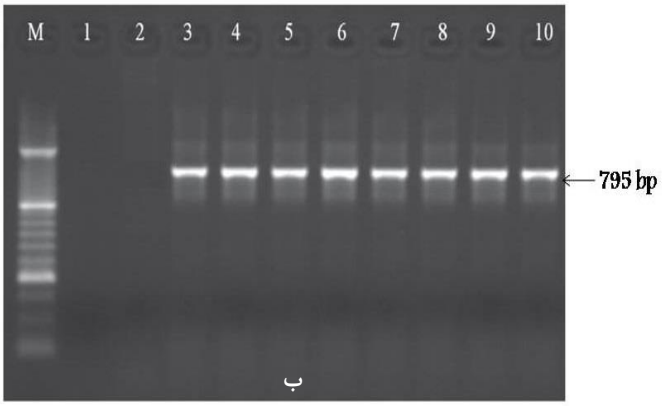
برای محاسبه میانگین و انحراف معیار و تعیین معنی‌داری اختلافات بین گروه‌های موردنظر در نتایج شبیه‌سازی و تجربی از روش One T-test و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. این آنالیزها در سطح معنی‌داری $P<0.05$ صورت گرفت.

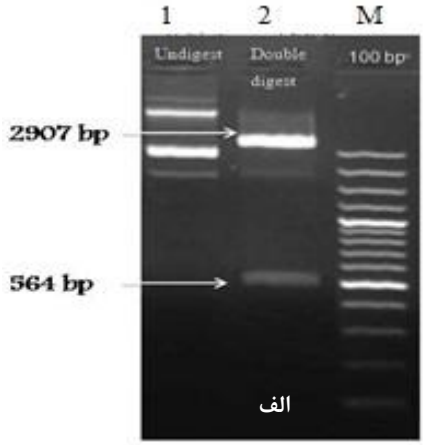
نتایج

طراحی و بهینه‌سازی سازه

بهینه‌سازی در دو بخش قابل بررسی بود که در برگیرنده‌ی تنظیم تمایل کدونی و افزایش محتوای سیتوزین و گوانین می‌شد. افزایش شاخص CAI (Codon adaptation index) نشان‌دهنده‌ی افزایش کدون‌های مورداستفاده برای بیان این ژن در سلول CHO است. پراکندگی درصد کاربرد کدون‌های مورداستفاده (Frequency of optimal Codon) بعد از بهینه شدن به کمترین حد ممکن کاهش‌یافته و تغییرات با انتخاب کدون‌هایی بوده است که در مسیر متابولیسم سلول CHO بیشترین کاربرد را داشته‌اند. انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بوده که محتوای سیتوزین+گوانین از ۳۸/۵۳ درصد به ۴۶/۹۰ درصد افزایش یافته است.

پس از سنتز مصنوعی ژن، تکثیر وکتور نوترکیب pGHn/SCF بعد از ترانسفکشن در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غربال‌گری شد و پس از استخراج پلاسمید pGHn نوترکیب تخلیص شده با آنزیم *BamHI* و *salI* به‌صورت برش دوتایی هضم آنزیمی انجام و تائید گردید و قطعات مورد انتظار pGHn برش یافته و ژن SCF به ترتیب با اندازه باند ۲۹۰۷ bp





شکل ۱- الف) هضم آنزیمی بر روی وکتور نوترکیب pGHn (ژل ٪۱) (چاهک اول الگوی دو باندی از وکتور نوترکیب pGHn برش نیافته را نشان می‌دهد، چاهک دوم مربوط به نمونه‌های برش یافته وکتور نوترکیب pGHn با آنزیم BamH I و Sal I است (اندازه باند pGHn نوترکیب برش یافته و ژن SCF به ترتیب با اندازه باند ۲۹۰۷ bp و ۵۶۴ bp مورد انتظار بود که مشاهده گردید)، M: مارکر ۱۰۰ bp **ب)** نتایج ژنومیک با پرایمرهای عمومی M13 forward primer و M13 revers primer PCR کلونی‌های رشد کرده برای وکتور pGHn حامل ژن SCF (ژل ٪۱)

و bp ۵۶۴ مشاهده شد (طول وکتور pGHn نوترکیب برش نیافته bp ۳۴۷۱ است) (شکل ۱-الف) و همچنین با انجام PCR کلنی‌های نوترکیب جداسازی و انتخاب شدند (شکل ۱-ب).

بعد از استخراج ژن هدف از وکتور نوترکیب pGHn، الحاق ژن SCF به داخل وکتور pBudCE4.1 برش یافته با آنزیم *BamH I* و *Sal I* انجام شد و وکتور نوترکیب ساخته‌شده به سلول مستعد *E.Coli* Top10 ترانسفورم گردید.

بررسی حامل نوترکیب pBudCE4.1 کد کننده SCF

به دنبال کلونیگ cDNA کد کننده SCF در داخل حامل بیانی pBudCE4.1 و پس از غربال‌گری آن روی محیط آنتی‌بیوتیک زئوسین، هضم آنزیمی بر روی وکتور pBudCE4.1 نوترکیب تخلیص شده با آنزیم *BamHI* و *salI* به‌صورت برش دوتایی انجام شد و قطعات مورد انتظار pBudCE4.1 برش یافته و ژن SCF به ترتیب با اندازه باند bp ۴۶۰۰ و bp ۵۶۴ بود که مشاهده گردید (طول وکتور pBudCE4.1 نوترکیب برش نیافته bp ۵۱۲۲ است) (شکل ۲-الف). همچنین ترادف یابی این حامل بعد از استخراج پلاسمید نشان داد که توالی کد کننده SCF در جایگاه موردنظر و بدون هرگونه جهش ناخواسته وارد شده است.

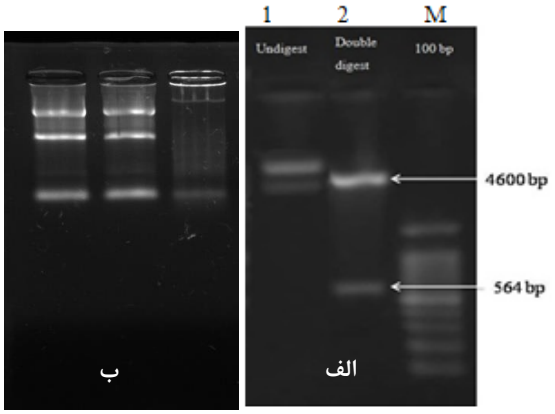
به‌منظور بیان SCF، رده سلولی CHO-K1 با وکتور pBudCE4.1/SCF ترانسفکت گردید. پس از یک ماه کشت سلولی در حضور آنتی‌بیوتیک زئوسین، کلون‌های پایدار ایجاد گردید.

استخراج RNA از سلول‌های CHO-K1 حاوی ژن نوترکیب

به‌منظور بررسی بیان ژن در سلول‌های پایدار ترانسفکت شده، RNA از سه رده سلولی گفته شده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده توسط ژل اگارز ۱ درصد (شکل ۲-ب) بررسی شد و جذب نوری RNA استخراج شده در حدود ۱۰۳۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود.

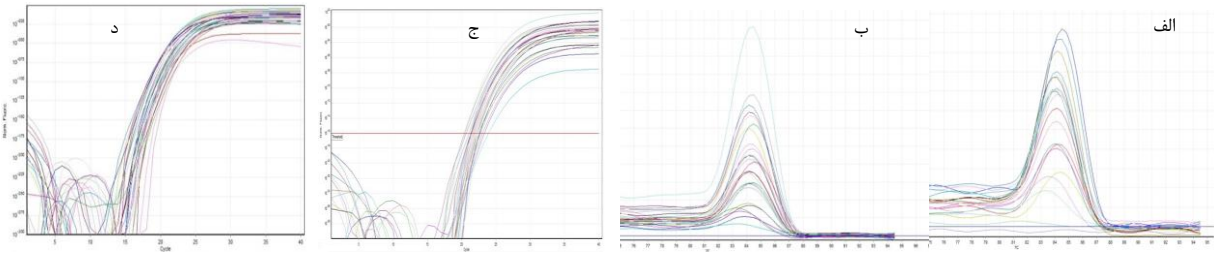
بررسی بیان ژن فاکتور SCF نوترکیب با استفاده از RT-qPCR و RT-PCR

از نمونه‌های RNA استخراج شده، cDNA ساخته و با آغازگرهای اختصاصی فاکتور SCF انسانی و GAPDH، RT-PCR انجام شد و در گروه سلولی که با وکتور نوترکیب pBudCE4.1/SCF ترانسفکت شده بود باند موردنظر دیده شد (داده نشان داده نشده است). به‌منظور بررسی و مقایسه میزان بیان ژن فاکتور SCF انسانی بر روی رده‌های سلولی CHO-K1 حاوی سازه ژنی نوترکیب و فاقد سازه ژنی نوترکیب RT-qPCR انجام شد. آغازگر طراحی شده برای ژن فاکتور SCF انسانی، توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۱۱۹ جفت باز را داشت. وجود

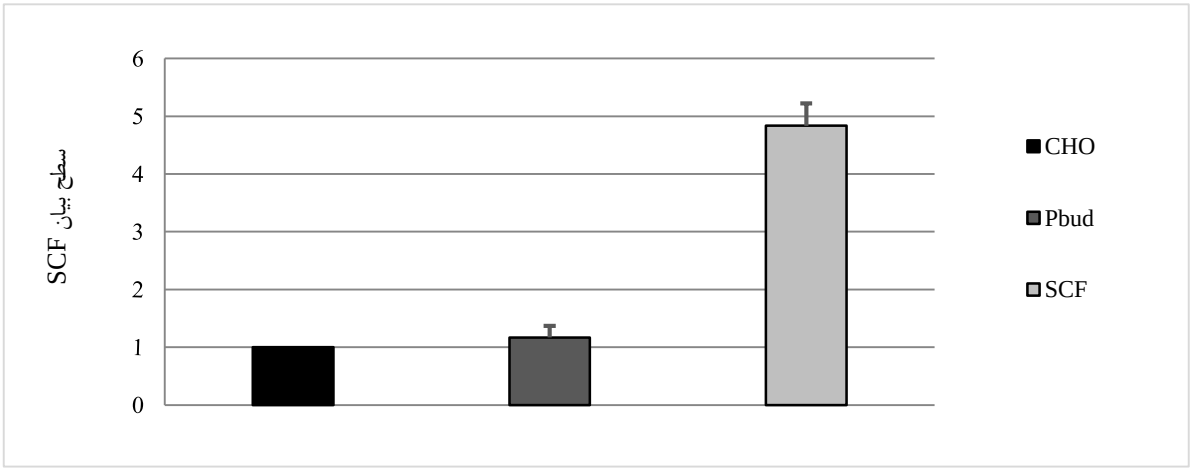


شکل ۲- الف) نتایج حاصل از هضم آنزیمی بر روی وکتور نوترکیب pBudCE4.1 برش یافته شده (ژل ۱٪) (چاهک اول الگوی دو باندی از وکتور نوترکیب pBudCE4.1 برش نیافته را نشان می‌دهد، چاهک دوم مربوط به نمونه‌های برش یافته وکتور نوترکیب pBudCE4.1 با آنزیم BamH I و Sal I است (اندازه باند pBudCE4.1 نوترکیب برش یافته و ژن SCF به ترتیب با اندازه باند bp ۴۶۰۰ و bp ۵۶۴ مورد انتظار بود که مشاهده گردید)، M: مارکر bp ۱۰۰ ب) الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪.

باند در ناحیه‌ی ۱۱۹ در رده سلولی CHO-K1 حاوی ژن SCF نوترکیب و عدم حضور این باند در رده سلولی CHO-K1 فاقد ژن SCF نوترکیب، نشان‌دهنده بیان ژن SCF در سطح ژن در رده سلولی CHO-K1 ترانسفکت شده با ژن SCF انسانی است. پس از انجام RT qPCR به‌منظور بررسی بیان ژن SCF در سطح RNA، منحنی ذوب و تکثیر رسم شد. در شکل ۳ (الف و ب) منحنی ذوب مربوط به SCF و GAPDH را نشان می‌دهد و وجود تک منحنی نشان‌دهنده‌ی اختصاصی بودن تکثیر در هرکدام است. تکثیر cDNA برای mRNAی ژن SCF و GAPDH در هر سه گروه سلولی مورد مطالعه رسم شد و C_t هرکدام تعیین گردید (شکل ۳ ج و د). با انجام آنالیز آماری و محاسبه بیان ژن نسبی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$، میزان بیان SCF در سلول‌های واجد وکتور pBudCE4.1 نوترکیب حاوی قطعه کد کننده SCF نسبت به سلول‌های فاقد وکتور و سلول‌های واجد وکتور pBudCE4.1 فاقد ژن SCF در شکل شماره ۴ به نمایش گذاشته شده است ($p<۰/۰۰۱$).



شکل ۳- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن الف) SCF و ب) GAPDH ج) نمودار تکثیر مربوط به ژن SCF و د) GAPDH



شکل ۵- بررسی بیان ژن SCF. CHO: سلول‌های که ترانسفکت نشده بودند، pBud: سلول‌های که با وکتور pBudCE4.1 ترانسفکت شده بودند، SCF: سلول‌های که با وکتور نوترکیب pBudCE4.1/SCF ترانسفکت شده بودند).

بحث و نتیجه گیری

با توجه به این‌که اکثر موارد پروتئین‌های نوترکیب ازنظر ساختاری ویژگی‌های پروتئین طبیعی را دارند تولید پروتئین‌های نوترکیب با توجه به اهمیت بالینی نیاز جامعه امروز است. از این‌رو به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب می‌توان تولید پروتئین‌های نوترکیب را به میزان دلخواه افزایش داد و با اضافه نمودن برچسب‌های مثل دنباله هیستیدینی به پروتئین‌های نوترکیب تخلیص و شناسایی آن‌ها نسبت به پروتئین‌های طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود (۱۰).

افزایش توانایی تولید مقدار بالای خالص شده پروتئین‌های نوترکیب یک ضرورت برای حمایت از تلاش‌های عرصه مهندسی ژنتیک ساختاری است. تولید پروتئین معمولاً از طریق بیان ژن در باکتری، مخمر و حشرات و اخیراً کشت سلولی انجام می‌گیرد. سیستم‌هایی مبتنی بر بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *E.Coli* یکی از قدیمی‌ترین و گسترده‌ترین سیستم‌های بیان است که اجازه‌ی تولید ساده، سریع و مقرون‌به‌صرفه از پروتئین‌های هدف را می‌دهد. بااین‌حال پروتئین‌های یوکاریوتی تولید شده در این سیستم اغلب انحلال‌پذیر نیستند و درنتیجه تجمع کرده و ساختارهای به‌هم‌پیچیده‌ی آن‌ها به‌هم‌ریخته (Misfolding) و یا اینکه عدم تغییرات پس از ترجمه‌ی لازم برای فعالیت کامل بیولوژیکی دارند (۱۱). سیستم‌های مبتنی بر بیان در مخمر به‌ویژه آن‌هایی که از *Saccharomyces cerenisia* و *Pichia pastoria* استفاده می‌کند دارای سیستم‌های پیشرفته برای تولید محصول نسبت به سیستم‌های باکتریایی هستند که پروتئین‌های پیچیده‌تری را می‌توانند بیان کنند و توانایی انجام برخی تغییرات پس از ترجمه را دارند (۱۲، ۱۳). از سیستم سلولی

مبتنی بر *Baculovirus* برای ترانسفورماسیون‌های پایدار در حشراتی نظیر *Drosophila* (S_2) و یا *Frugiperda* برگ‌خوار (SF_9) رده‌های سلولی مشتق شده‌اند که به‌طور گسترده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب پیچیده استفاده می‌شوند. بااین‌حال، سیستم عامل‌های مبتنی بر سلول حشره برای پیاده‌سازی دست‌وپا گیر است و به‌درستی نمی‌تواند کمپلکس‌های N-گلیکان که حاوی گالاکتوز و یا واحدهای اسیدسیالیک است را در طی چند سال تکرار کند (۱۴، ۱۵) به این دلیل بیشتر پروتئین‌های نوترکیب برای استفاده پزشکی در رده‌های سلول‌های پستانداران مانند CHO و رده‌های سلولی کلیه جنین انسان (HEK) تولید می‌شوند. بالای ۷۰٪ از پروتئین‌های نوترکیب تجاری از سلول‌های CHO به دست می‌آیند که دارای فعالیت بیولوژیکی درمانی مناسبی هستند. ازجمله این پروتئین‌های نوترکیب می‌توان به Etanercept، Trastuzumab و Rituximab اشاره کرد (۱۶). بااین‌حال سیستم‌های مبتنی بر بیان در CHO برای تولید پروتئین‌های درمانی خیلی ایده‌آل نیست زیرا در جریان N-گلیکوزیلاسیون از گلیکوپروتئین‌های نوترکیب اپی توپ‌های آلفا-۱- گالاکتوز، ۳-گالاکتوز را به ناحیه‌ی ترمینالی (انتهایی) اضافه می‌کند. این آنتی‌ژن‌ها می‌تواند مسئول واکنش آلرژیک شود که منجر به حوادث بالینی نامطلوب مانند آنافیلاکسی شود (۱۷). SCF یک فاکتور رشد کد شونده روی کروموزوم انسانی ۱۲q۲۲ و ۱۲q۲۴ است. SCF به‌طور قابل‌توجه بقاء و گسترش HSC در شرایط *In vitro* و کمک به خود تجدیدپذیری و حفظ HSC در شرایط *In vivo* می‌شود (۱۸). در سال ۱۹۹۲، مطالعه‌ای که توسط Lu و همکاران با کلون کردن ژن SCF با وکتور PDSVRα1 در سلول‌های CHO و باکتری *E. coli* انجام دادند توالی آمینواسیدی SCF را شناسایی کردند و همچنین نشان دادند که SCF پس از بیان در سلول‌های CHO دچار تغییرات پس از ترجمه‌ای می‌شود (۱۹). همچنین در سال ۱۹۹۶ طبق مطالعاتی که توسط Lu و همکاران بر روی تشکیل پیوندهای دی سولفیدی بین دیمرهای SCF انجام گرفت نشان دادند که ساختار سه‌بعدی پروتئین توسط ایجاد دایمرهای غیرکوالانسی و ارتباطات دی سولفیدی ایجاد می‌شود که در فعالیت بیولوژیکی آن نقش دارد (۲۰). SCF نقش مهمی در تکثیر و تمایز ماست سل‌ها (MC)، ملانوسیت‌ها و سلول‌های زایا دارد (۱۸). سلول‌های اجدادی عروقی (Vascular Progenitor Cells) نقش مهمی در حفظ و نگه‌داری عروق دارند اما اهمیت بالینی آن‌ها در بیماری‌های قلبی عروقی به‌طور کامل مشخص نشده است، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی A، فاکتور جفت و SCF سه عامل رشد است که در به‌کارگیری سلول‌های عروقی مهم می‌باشند. بر اساس مطالعات Wigren در سال ۲۰۱۵ بر روی ۳۸۴ بیمار با مشکل عروق کرونری مشخص شد که سطح SCF در این افراد کاهش می‌یابد (۱۸). Al-Azzam و همکاران با افزایش بیان ژن SCF در خوک‌های با انفارکتوس میوکارد، مشاهده کردند که عملکرد قلب بهبود می‌یابد (۲۱).

بنابراین با توجه به نقش مهم SCF در پروسه التهاب، رنگ‌زایی، اسپرماتوژنز، بیماری‌های قلبی عروقی و عصبی تولید آن با بیان بالاتر می‌تواند نیازهای موجود در این زمینه را مرتفع سازد. اخیراً با بهینه‌سازی کدون و انتخاب حامل بیانی مناسب به دنبال دست یافتن به بیان بالاتر از پروتئین نوترکیب می‌باشند. ازاین‌رو این پژوهش باهدف بررسی بیان ژن SCF همراه با انجام بهینه‌سازی کدون در سلول‌های CHO-K1 انجام شد. در این تحقیق از حامل بیانی pBudCE4.1 که یک حامل مناسب با ایجاد رده‌های سلولی نوترکیب پایدار در سلول‌های پستانداران است، استفاده شد. ژن SCF پس از سنتز مصنوعی تحت پروموتور سیتومگال ویروس (CMV) به گونه‌ی قرار داده شد که در انتهای آن توالی برچسب myc و پلی هیستیدین (6xHis) برای سهولت در تخلیص قرار داده شود. این وکتور همچنین دارای ژن مقاومت به زئوسین برای شاخص انتخاب در سلول‌های *E.Coli* و ایجاد پایدار رده‌های سلولی پستانداران است (۲۲). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ در ایران توسط درخشان و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی تبریز نشان دادن که وکتور (+) PET- 266 برای کلون کردن SCF محلول انسانی در *E. Coli* مناسب است گر چه پروتئین‌های تولید شد به دلیل عدم ایجاد دو پیوند دی سولفیدی فاقد فعالیت بیولوژیکی بوند (۲۳). در این مطالعه وکتور نوترکیب pBudCE4.1/SCF در لاین سلولی CHO-K1 ترانسفکت شد و درنهایت با استفاده از RT qPCR به بررسی سطح بیان mRNAی ژن SCF پرداخته شد. آنالیز به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نشان دهنده افزایش معنی‌داری در سطح بیان این ژن در سلول‌های CHO-K1 حامل pBudCE4.1 نوترکیب را نشان داد.

هدف از این تحقیق استفاده از حامل بیانی pBudCE4.1 برای بیان ژن SCF در سلول‌های CHO-K1 با انجام

بهینه‌سازی کدون بود که در پایان نتایج نشان داد که حامل بیانی pBudCE4.1 جهت بیان SCF به شکل مداوم در سلول‌های CHO-K1 به‌خوبی قابل استفاده است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی به شماره ۱۳۳۳,۵۰۳۹۴۱۰۰۱در سال ۱۳۹۴ است لذا نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس و خود را کلیه کارکنان بخش ژنتیک پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و مجموع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی و همچنین شرکت رایا زیست پرداز به دلیل دادن مشاوره درزمینه بیوانفورماتیک اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-KIT: From basic science to clinical implications. Physiol Rev. 2012; 92 (4): 1619–1649.
2. Zou J, Zhu F, Liu J, Wang W, Zhang R, Garlisi CG, *et al*. Catalytic activity of human ADAM33. J Biol Chem. 2004; 279 (11): 9818 –9830.
3. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (14): 7732–7737.
4. Drouet M, Delaunay C, Grenier N, Garrigou P, Mayol JF, Hérodin F. Cytokines in combination to treat radiation-induced myelosuppresssion: evaluation of SCF + glycosylated EPO + pegylated G-CSF as an emergency treatment in highly irradiated monkeys. Haematologica. 2008; 93(3):465-466.
5. Zhao LR, Piao CS, Murikinati SR, Gonzalez-Toledo ME. The Role of Stem Cell Factor and Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Treatment of Stroke. Recent Pat CNS Drug Discov. 2013; 8(1): 2–12.
6. Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S, Candelise L, Comi GP, Baron PL, *et al*. Growth factors in ischemic stroke. J Cell Mol Med. 2011; 15 (8):1645–1687.
7. Sanchez-Ramos J, Song S, Sava V, Catlow B, Lin X, Mori T, *et al*. Stem cell factor and granulocyte colonystimulating factor reduce b-amyloid deposits in the brains of APP/PS1 transgenic mice. Alzheimer's Research & Therapy. 2011; 3:8.
8. Chen SL, Lee W, Hottes AK, Shapiro L, McAdams HH. Codon usage between genomes is constrained by genome-wide mutational processes. Proc. Natl Acad Sci USA. 2004; 101 (10): 3480–3485.
9. Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. Nat Rev Genet. 2011; 12 (1): 32-42.
10. Gholipour A, Moosavian S, Galehdari H, Makvandi M, Mard S, RajabiMemari H, et al. Optimization of gene expression and purification of Legionella pneumophila peptidoglycan associated lipoprotein recombinant protein. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14 (3):1-11.
11. Holz C, Prinz B, Bolotina N, Sievert V, Büssow K, Simon B, et al. Establishing the yeast Saccharomyces cerevisiae as a system for expression of human proteins on a proteome-scale. Struct Funct Genomics. 2003; 4 (2-3): 97–108.
12. Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit. 2005; 18 (2):119–138.
13. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nat Biotechnot. 2005; 23:567–575.
14. Hang GD, Chen CJ, Lin CY, Chen HC, Chen H. Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. J Biotechnol. 2003 10;102(1):61-71.
15. Chu L, Robinson DK. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Curr Opin Biotechnol. 2001; 12 (2): 180–187.
16.Bosques C, Collins B, Meador JW, Sarvaiya H, Murphy J, et al. Chinese hamster ovary cells can produce galactose-a-1, 3-galactose antigens on proteins. Nat Biotechnot. 2010; 28 (11):1153–1156.
17. Oberbek A, Matasci M, Hacker DL, Wurm FM. Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. Biotechnol Bioeng. 2011; 108(3): 600-610.
18. Ishikawa K, Fish K, Aguero J, Yaniz-Galende E, Jeong D, Kho C, et al. Stem cell factor gene transfer improves cardiac function after myocardial infarction in swine. Circ Heart Fail. 2015; 8(1):167-174.
19. Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Parker VP, Lee TD, Swiderek K, *et al*. Post-Translational Processing of Membrane-Associated Recombinant Human Stem Cell

Factor E xpressed in Chinese Hamster Ovary Cells. Arch Biochem Biophys. 1992; 298(1): 150-158.
20. Lu HS, Jones MD, Shieh JH, Mendiaz EA, Feng D, Watler P, et al. Isolation and Characterization of a Disulfide-linked Human Stem Cell Factor Dimer. J Biol Chem. 1996; 271(19): 11309–11316.
21. Al-Azzam N, Kondeti V, Duah E, Gombedza F, Thodeti CK, Paruchuri S. Modulation of mast cell proliferative and inflammatory responses by leukotriene d4 and stem cell factor signaling interactions. J Cell Physiol. 2015; 230 (3): 595-602.
22. Mulsant P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J. Phleomycin Resistance as a Dominant Selectable Marker in CHO Cells. Somat. Cell Mol. Genet. 1988; 14 (3): 243-252.
23. Asghari S, Shekari Khaniani M, Darabi M, Mansoori Derakhshan S. Cloning of Soluble Human Stem Cell Factor in pET-26b(+) Vector. Adv Pharm Bull. 2014: 4(1):91-5.

Original Article

Codon Optimization of Stem Cell Factor (SCF) Gene and Evaluation of Its Expression Using Vector Pbudce4.1 in Chinese Hamster Ovary Cells (CHO)

Heidari Soureshjani E[1], Peymani M[1], Kazemi babahydari A[2], Kamran Gh[3,4]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran
2. Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, ACECR, Royan Institute for Biotechnology, Isfahan, Iran

Received: 13 Nov 2016 Accepted: 09 Mar 2017

Abstract

Background & Objective: Stem cell factor (SCF) is a blood cytokine which can play a significant role in the differentiation of blood precursor cells, survival, proliferation and differentiation of mast cells, and it can also increase the proliferation and invasion of tumor cells through affecting hematopoietic cells. Its therapeutic effect in the treatment of diseases such as Alzheimer's and myocardial infarction is being investigated. The aim of this study was to clone SCF gene into the pBudCE4.1 expression vector by codon optimization in Chinese hamster ovary cells (CHO).

Materials & Methods: In this experimental study, SCF sequence was made synthetically after codon optimization for CHO cells and changing of the contents of G+C and subcloned into the expression vector pBudCE4.1. Then, SCF gene was transfected into CHO-K1 cells and evaluated using RT-qPCR for gene expression of the relevant gene.

Results: Recombinant expression vector pBudCE4.1/SCF was constructed and approved by PCR technique, enzyme digestion and sequencing. RT and PCR results showed that SCF genes can be expressed in CHO cells after codon optimization.

Conclusion: The results showed that the cloning of SCF gene can be done well through expression vector pBudCE4.1 and this expression vector can be an appropriate vector for expressing SCF gene into CHO cells.

Keywords: Codon optimization, Cloning, Chinese Hamster Ovary Cells (CHO), Stem Cell Factor (SCF)

Corresponding Author: Maryam Peymani, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
Email: peymani62_m@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2017): 223-232