View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۳/ ۱۸-۹

مقاله پژوهشی

ایجاد وکتورهای تداخلی یوکاریوتی از pSVM با انتقال ناحیه‌ی توالی اتصال در ژنوم (attB) به آن

حمیده جعفری[۱،۲]، زهره حجتی[۲*]

[۱] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ؛ [۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت:۹۰/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: سالیان زیادی است که انواع مختلفی از سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) غالباً برای تولید اکثر محصولات دارویی استفاده می‌شود. تولید دائمی در این سلول‌های میزبان، یک چالش بزرگ است. هدف از این مطالعه، همسانه سازی ناحیه ی توالی اتصال در ژنوم باکتری (attB) در وکتور pSVM با استفاده از سیستم نوترکیبی phiC31 برای بقای طولانی وکتور در سلول‌های CHO بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، یک جایگاه برش آنزیم محدود کننده‌ی PvuII به عنوان جایگاه کلونینگ توسط نرم افزار CLC در وکتور pSVM انتخاب که برش با این آنزیم منجر به ایجاد دو انتهای صاف در وکتور شد. دو پرایمر اختصاصی برای جداسازی و تکثیر ناحیه‌ی attB از وکتور pDrBB2 توسط نرم افزار Oligo®۵ طراحی شد. ژل الکتروفورز و آنالیز PCR بر روی قطعه تکثیرشده در جهت تایید ساختار آن انجام شد.

یافته ها: ناحیه‌ی attB به طور موفق در داخل وکتور pSVM الحاق شد و توسط ژل الکتروفورز نشان داده شد. در جهت تایید ورود ژن attB در وکتور pSVM واکنش colony PCR از کلنی‌های نوترکیب انجام شد و صحت کلونینگ با مشاهده‌ی باند مربوط به ترادف attB انجام گرفت.

نتیجه گیری: در این تحقیق، جایگاه attB در پلاسمید pSVM همسانه سازی گردید. با بهره گیری از این اطلاعات و وجود جایگاه psedo-attP در کروموزوم سلول‌های CHO، می توان بعد از الحاق ژن اینترفرون انسانی در این پلاسمید، و ورود این پلاسمید و پلاسمید حاوی آنزیم اینتگراز به سلول‌های CHO برای اولین بار زمینه‌ی پایداری بیان این پروتئین را در سلول‌های CHO فراهم کرد.

واژه های کلیدی: سلول های تخمدان هامسترچینی، ناحیه‌ی توالی اتصال در ژنوم یوکاریوتی، نوترکیبی در جایگاه خاص، وکتورهای تداخلی، وکتور pSVM.

مقدمه:

برای افزایش بیان پروتئین‌های دارویی و نیز در زمینه‌ی ژن درمانی با هدف وارد شدن DNA خارجی به صورت پایدار در ژنوم، می‌توان از سیستم نوترکیبی در جایگاه خاص در ژنوم بهره برد (۱). با استفاده از این سیستم‌ها زمینه‌ی الحاق اسیدهای نوکلئیک (وکتور حاوی ژن مورد نظر) به صورت اختصاصی و پایدار در داخل ژنوم سلول‌های میزبان فراهم می‌شود. در این سیستم‌ها یک آنزیم ریکامبیناز یا اینتگراز نوترکیبی بین دو جایگاه را کاتالیز می کند (۲).

سه نوع سیستم نوترکیبی در جایگاه خاص وجود دارد:

۱- سیستم نوترکیبی cre/loxp: یکی از تکنیک‌های الحاق ژنی (gene targeting) است که برای الحاق ژن‌ها در جایگاه های خاصی در ژنوم به کار برده می‌شود. این سیستم در باکتریوفاژ P1 وجود دارد و

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه اصفهان- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۸، E-mail: z.hojati@sci.ui.ac.ir

آنزیم ریکامبیناز cre اینتگره شدن یک توالی DNA را در داخل یک جایگاه شناسایی ۳۴ جفت بازی به نام جایگاه loxp کاتالیز می‌کند (۳). جایگاه loxp شامل یک توالی bp ۸ در وسط و دو توالی bp ۱۳ با ترادف تکراری معکوس در دو طرف توالی وسط می‌باشد (۴). مشکل این سیستم، برگشت پذیر بودن واکنش نوترکیبی می‌باشد. به دلیل اینکه بعد از اینتگره شدن توالی DNA، دو جایگاه loxp به عنوان سوبسترا برای آنزیم عمل کرده و منجر به خارج شدن توالی DNA بین این جایگاه‌ها می‌شوند. اختصاصیت این سیستم نوترکیبی در حدود ۸۰٪ تخمین زده شده است.

۲- سیستم نوترکیبی FLP/FRT: این سیستم نوترکیبی در ساکارومیسس سرویسیه وجود دارد. در این سیستم آنزیم ریکامبیناز FLP کاتالیز کننده‌ی توالی‌های ژنی شامل توالی FRT می‌باشد. طول کامل جایگاه FRT، bp ۴۸ است (۳). این جایگاه شبیه به توالی loxp بوده ولی دارای سه ناحیه‌ی تکراری bp ۱۳ می‌باشد. سیستم نوترکیبی FLP/FRT همانند سیستم cre/loxp واکنش نوترکیبی را به صورت برگشت پذیر انجام می‌دهد، ولی این سیستم برخلاف سیستم cre/loxp اختصاصیت نوترکیبی کمتر از ۱۰٪ را نشان می‌دهد.

۳- سیستم نوترکیبی اینتگراز QC31: این سیستم نسبت به دو سیستم قبلی بسیار پیچیده‌تر می‌باشد. نقش زیستی این اینتگراز میانجی‌گری اینتگره شدن فاژ QC31 به داخل ژنوم استرپتومایسس از طریق توالی‌های تحت هدف موجود در ژنوم های فاژ و باکتری است. این توالی‌ها به ترتیب شامل جایگاه توالی اتصال در ژنوم فاژی (Attachment site in phage genome= attP) و توالی اتصال در ژنوم باکتری (bacterial genome Attachment site in= attB) می‌باشند (۴). حداقل توالی عملکردی برای این دو جایگاه به ترتیب شامل ۳۹ و ۳۴ جفت نوکلئوتید است (۵). اگرچه این دو توالی با هم متفاوت هستند اما هر دو توالی در ناحیه‌ی وسط دارای سه نوکلئوتید مشترک می‌باشند. در این منطقه DNA شکافته شده و کراسینگ آور اتفاق می‌افتد (۴). نوترکیبی بین جایگاه های attB و attP منجر به اینتگره شدن DNA در داخل ژنوم میزبان شده، و توالی اینتگره شده مجاور دو توالی هیبرید attL و attR جای می‌گیرد (۶). اینتگراز QC31 آنزیمی متشکل از ۶۱۳ آمینواسید است و از اعضای خانواده ی ریکامبینازهای گروه سرین می باشد (۷). به طورکلی این سیستم نسبت به دو سیستم قبلی مزایایی دارد از جمله اینکه در این سیستم برخلاف دو سیستم قبل توالی الحاق شده در غیاب یکسری از کوفاکتورها نمی‌تواند به عنوان سوبسترا برای آنزیم اینتگراز عمل کند.

بنابراین برخلاف دو سیستم قبلی آنزیم اینتگراز به صورت یک جهتی عمل کرده و به دلیل خاصیت نوترکیبی برگشت ناپذیر این سیستم در الحاق ترانس ژن‌ها در سلول‌های پستانداران کاربرد فراوانی دارد (۴). از طرفی در ژنوم موش و انسان چندین جایگاه شبه attP (psedo-attP) وجود دارد. این توالی‌ها شبیه به توالی‌های attP می‌باشند (۸). شباهت این دو توالی در حدود ۴۰-۳۰٪ می‌باشد (۵). بنابراین، توالی های psedo- attP می‌توانند به عنوان سوبسترای آنزیم QC31 عمل کنند. با این خاصیت به عنوان مثال می‌توان همزمان پلاسمید حاوی ژن رونویسی کننده‌ی آنزیم اینتگراز و پلاسمید شامل توالی attB و ژن هدف را برای اینتگره شدن در جایگاه‌های psedo-attB در سلول های CHO ترانسفکت کرد؛ ولی این سیستم اختصاصیت کمی در حدود ۱۰٪ را دارا می‌باشد. البته نوع جدیدی از این آنزیم تولید شده که سیگنال جایگیری هسته ای در قسمت C-terminal آن تعبیه کرده‌اند و فعالیت آن افزایش یافته است. باتوجه به اینکه در زمینه ی تولید پروتئین های دارویی از جمله اینترفرون بتا، تولید پایدار یکی از اهداف مهم می باشد و پروتئین اینترفرون بتا در سلول های CHO به صورت ناپایدار تولید می‌شود. هدف از این مطالعه، همسانه سازی ناحیه‌ی attB در وکتور (Pluto, Saturn, Venus, and

Mars= pSVM) می‌باشد تا در آینده بتوان با وارد کردن ژن اینترفرون بتا در آن و انتقال همزمان آن با وکتور pCMV-int زمینه‌ی الحاق دائمی ژن اینترفرون بتا در کروموزوم‌های CHO و تولید دائم این پروتئین فراهم شود.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از دو نوع پلاسمید استفاده شد: ۱- وکتور pSVM dhfr: این وکتور در حدود ۶۴۰۰ جفت باز دارد و یک وکتور قابل تکثیر در سلول‌های CHO dhfr– می‌باشد (۱۰). این وکتور حاوی قطعه‌ای از پلازمید pBR322 است که ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و مبدأ همانندسازی را دارا می‌باشد. از اجزای دیگر وکتور می‌توان به جایگاه آغاز همانندسازی و پروموتر SV40 اشاره کرد (۱۱). حضور توالی‌های مشتق از pBR322، اجازه کلونینگ و تکثیر پلازمید را در E. coli می‌دهد، در حالی‌که توالی‌های مشتق از SV40 حاوی سیگنال‌هایی است که تولید RNA های پیامبر عملکردی را در سلول‌های پستانداران باعث می‌شود. وجود ژن dhfr بر روی این وکتور، امکان انتخاب سلول‌های CHO dhfr– تراریخت شده با این وکتور را می‌دهد و ژن مقاومت به آمپی‌سیلین شرایط انتخابی را برای باکتری‌های حساس به آمپی‌سیلین فراهم می‌آورد (۱۲).

۲- وکتور pDrBB2: طول این وکتور ۸۳۰۸ bp می‌باشد. یکی از اجزای این وکتور، ژن attB است که بین جایگاه برش آنزیم EcoR1 و HindIII قرار گرفته است. ژن مقاومت به هایگرومایسین (Hygromycin) به عنوان مارکر انتخابی عمل کرده و در دنباله‌ی پروموتر ترانسپوزون copia قرار گرفته است. هم چنین ژن مقاومت به آمپی‌سیلین نیز در وکتور وجود دارد. این پلاسمید با تعداد کپی بالا در باکتری E. coli تکثیر می‌کند (۹).

برای تهیه سلول‌های مستعد به روش کلرید کلسیم، محلول $CaCl_2$ به صورت ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه و استریل شد. روش تهیه سلول‌های مستعد E. coli به این صورت انجام شد: ابتدا یک کلونی E. coli تازه کشت یافته به لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر LB استریل تلقیح گردید و در دمای ۳۷ °C در انکوباتور شیکردار (rpm ۱۵۰) به صورت شبانه انکوبه شد. یک میلی‌لیتر از کشت E. coli حاصل از مرحله قبل به ارلن ۱۰۰۰ سی‌سی حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر LB استریل منتقل شد و ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با شرایط قبل انکوبه شد تا جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) به محدوده ۰/۶-۰/۴ برسد. این مرحله، مناسب برای ادامه تراریختی می‌باشد. ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت مرحله قبل برداشته و در میکروتیوب استریل ریخته شد و برای توقف رشد به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد و مایع رویی تخلیه شد. به رسوب حاصل ۴۰۰ میکرولیتر $CaCl_2$ ۱۰۰ میلی مولار سرد اضافه شد و برای حل شدن رسوب به آرامی ورتکس شد. بعد از حل شدن رسوب، میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد؛ بدین ترتیب سلول‌های مستعد E. coli جهت تراریختی آماده شدند. برای تراریختی باکتری E. coli، سلول‌های مستعد مرحله‌ی قبل را روی یخ گذاشته و مراحل زیر بر روی آن‌ها انجام شد: در حدود ۵۰ نانوگرم پلازمید به هر میکروتیوب حاوی سلول‌های مستعد باکتریایی اضافه شد. میکروتیوب حاوی باکتری به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در جهت ایجاد شوک حرارتی میکروتیوب به مدت ۲ دقیقه در بن ماری حاوی آب ۴۲ °C قرار داده شد و پس از آن بلافاصله برای مدت ۱۰ دقیقه روی یخ گذاشته شد .در این مرحله ۴۰۰ µl محیط کشت LB به هر میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ °C و دور ۱۵۰ قرار داده شد. در این مدت

باکتری‌ها فرصت بیان ژن از جمله ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را پیدا می‌کنند. در حدود ۲۰۰ µl از این محلول بر روی محیط LBA حاوی آمپی‌سیلین کشت داده و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ °C به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. بعد از رشد باکتری‌ها بر روی سطح پلیت یک کلنی تک تراریخت شده جهت انجام استخراج پلاسمید انتخاب شد.

استخراج پلاسمید در این تحقیق با روش جوشاندن هلمس-کویجلی از باکتری‌های E. coli XL1-Blue صورت گرفت. یک تک کلنی از باکتری‌های تراریختی در ۱۰ cc محیط LB حاوی آنتی بیوتیک تلقیح شد و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ °C و ۱۵۰ rpm قرار گرفت. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت به ویال استریل منتقل شد و ۳۰ ثانیه در دمای ۴ °C و ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی تا حد امکان تخلیه شد. ۳۵۰ ml از بافر بافر لیز کننده‌ی باکتری (STET) و ۲۵ µl از محلول لیزوزیم به پلت سلولی اضافه و کوتاه ورتکس شد. سپس نمونه ها ۴۰ ثانیه در آب در حال جوشیدن قرار داده شد. باکتری‌های لیز شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm و دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی را که واجد DNA پلاسمیدی بود به میکروتیوب تمیزی منتقل شد. به محلول واجد DNA پلاسمیدی، ۴۰ µl استات سدیم و ۴۲۰ µl ایزوپروپانول اضافه شد و با ورتکس کوتاه مخلوط شد و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا DNA پلاسمیدی رسوب کند. مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C سانتریفیوژ انجام داده شد. رسوب حاصل شامل DNA پلاسمیدی و RNA بود. بنابراین مایع رویی به طور کامل خارج شد. ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۷۰٪ سرد به پلت سلولی اضافه و ورتکس کوتاه انجام داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C و ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. در ادامه میکروتیوب ها در دمای ۶۰-۵۰ °C قرار داده شد تا باقی‌مانده الکل تبخیر شود. ۵۰ µl محلول TE + RNase A به میکروتیوب ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد (۱۳).

مترادف attB از تکثیر قطعه‌ی ۳۵۳ جفت بازی از وکتور pDrBB2 به دست آمد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق بدین‌صورت بودند. پرایمر پیشرو ژن attB ´5GGTACCCAGCTGATCGATG3´، پرایمر پیرو ژن attB ´5GGATCGTCGACCTCGGAT3´، از نظر نزدیک بودن دمای اتصال هر دو جفت پرایمر، عدم اتصال انتهای ´۳ هر دو پرایمر توسط برنامه Oligo® ۵، بررسی شد. جفت پرایمر ژن attB محصولی به طول ۳۵۳ جفت باز می‌دهد. مواد مورد نیاز برای انجام PCR ، بر روی یخ با هم مخلوط شدند و در دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه مشخص به منظور تکثیر قرار داده شدند. این برنامه پس از بهینه سازی متعدد از نظر دما، غلظت یون منیزیم، و زمان عملکرد آنزیم پلیمراز به دست آمد. بنابراین بعد از بهینه سازی شرایط، واکنش PCR در سه ویال و هرکدام مخلوطی به حجم نهایی ۵۰ µl انجام گرفت. مخلوط PCR از ۵ µl بافر PCR۱۰X، ۲/۵ µl $MgSO_4$ (۲۵ mM)، ۲ µl از هردو پرایمر به غلظت ۱۰ pmol، ۰/۵ u از آنزیم Pfu DNA Pol و DNA پلاسمیدی (۱۶۰ ngr/µl) و آب به مقدار مناسب تشکیل شده بود. شرایط حرارتی دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, Genrmany) جهت انجام PCR بدین شرح است. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ ^{o}c به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ ^{o}c به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۴۹ ^{o}c به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۰ ^{o}c به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و در آخر مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ ^{o}c به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

سپس این سه ویال PCR بر روی چاهک بزرگی از ژل آگاروز ۱٪ با بافر تشکیل دهنده‌ی TAE بارگذاری شدند. و این ژن از ژل آگاروز توسط کیت استخراج و خالص سازی DNA کیاژن (ساخت کشور کره جنوبی)، خالص سازی شد.

پلاسمید pSVM توسط روش‌های توضیح داده شده در بالا به باکتری E. coli XL1-Blue منتقل و سپس از باکتری استخراج شد. این وکتور توسط آنزیم محدودکننده‌ی PvuII هضم گردید. آنزیم PvuII پس از برش، انتهای صاف در وکتور ایجاد می‌کند و به دلیل اینکه هر ناحیه صاف به ناحیه‌ی صاف دیگر می‌چسبد، نیازی به ایجاد جایگاه در پرایمرهای تکثیر کننده‌ی ناحیه‌ی attB نبود. ابتدا واکنش برش آنزیمی وکتور pSVM به این صورت انجام شد: ۲۵ µl پلاسمید (۳۰۰ ngr/ µl)، ۳/۷ µl آنزیم (۱۰ u/µl)، ۵ µl بافر G (10X) و آب به حجم لازم تهیه گردید. دو ویال از این واکنش هر کدام به حجم ۵۰ µl، در دمای ۳۷ °C به مدت ۳ ساعت در بن ماری انکوبه شدند. سپس بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شده و از ژل استخراج شدند.

برای جلوگیری از اتصال مجدد پلاسمید هضم شده از آنزیم آلکالین فسفاتاز Shrimp (MBI fermentase) استفاده شد. واکنش تیمار با آنزیم آلکالین فسفاتازبه این صورت انجام شد: ۲۵ µl پلاسمید (۳۰۰ ngr/ µl)، ۱ µl آنزیم (۱۰ u/µl)، ۵ µl بافر (۱۰ X) و آب به حجم لازم تهیه شد (۲ ویال ۵۰ تایی). این مخلوط، ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در بن ماری انکوبه گردید. بعد از عملکرد آنزیم، ویال‌ها در جهت غیر فعال سازی آنزیم در دمای ۶۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. و بعد از بارگذاری وکتور بر روی ژل آگارز، خالص سازی آن از ژل صورت گرفت.

برای انجام واکنش ligation ابتدا بایستی غلظت قطعه وارد شونده به داخل وکتور توسط فرمول زیر، طبق پروتکل آنزیم T4 DNA ligase خریداری شده از شرکت MBI Fermentase محاسبه شود.

غلظت قطعه‌ی وارد شونده (ng) برابر است با:

R×(ng) ×غلظت پلاسمید

(طول پلاسمید / طول قطعه‌ی وارد شونده)

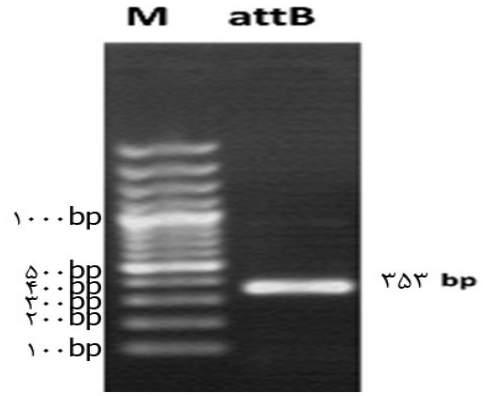
نسبت مولی قطعه‌ی وارد شونده به پلاسمید=R

طبق فرمول بالا، نسبت مولی برای این واکنش، ۷ در نظر گرفته شد. سپس، به ترتیب قطعات ۳۵۳ و۶۴۰۰ جفت باز از ژن و وکتور در فرمول بالا قرار گرفت . در نتیجه، با این مقادیر غلظت وکتور ۱۵ نانوگرم، محاسبه شد. واکنش الحاق به این صورت انجام شد: ۳۲۰ ng/µl وکتور، ۱۲۰ ng/µl ژن attB، بافر (۱۰ X) ۲ ماکرو لیتر و آنزیم لیگاز فرمنتاز 1µl و آب به حجم لازم تا حجم ۲۰ ماکرولیتر مخلوط شدند. سپس این واکنش در دمای ۲۲ درجه در بن ماری به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. بعد از عملکرد واکنش، آنزیم در دمای ۶۵ درجه بن ماری به مدت ۱۰ دقیقه غیر فعال گردید. و سپس حجم ۲۰ ماکرولیتر از این واکنش در ۲۰۰ ماکرولیتر سلول مستعد باکتری تراریخت گردید. واکنش colony PCR برای کلنی‌های رشد یافته، انجام شد. واکنش colony PCR همانند واکنش PCR صورت می‌گیرد با این تفاوت که به جای پلاسمید، از کلنی‌های نوترکیب با خلال دندان استریل برداشته و به مخلوط PCR اضافه می‌کنید.

یافته ها:

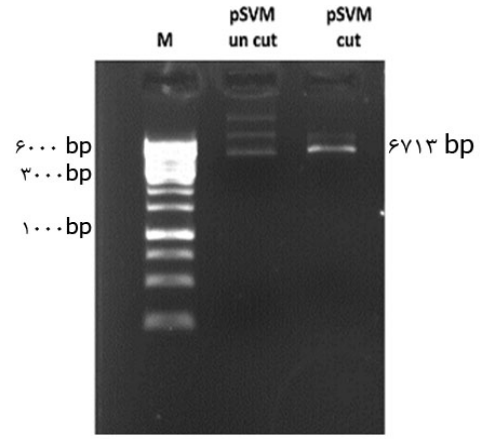
غلظت پلاسمید pDrBB2 استخراج شده از باکتری E. coli XL1-Blue، توسط دستگاه اسپکتوفتومتری ۸۰ ng/µl محاسبه شد (نتایج نشان داده نشده‌اند). غلظت محصول ژن attB خالص سازی شده از ژل آگاروز ۱٪، ۱۵ ng/µl به دست آمد. (تصویر شماره ۱). پلاسمید pSVM استخراج شده از باکتری E. coli XL1-Blue ، مورد برش آنزیمی با آنزیم PvuII قرار گرفت و غلظت پلاسمیدهای هضم شده حاصله ۲۰۰ ngr/µl برآورد شد (تصویر شماره ۲). بعد از تاثیر پلاسمید هضم شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز و خالص سازی آن از ژل آگارز ۱٪ غلظت پلاسمید، ۴۰ ng/µl بود (نتایج نشان داده نشده‌اند). سپس پلاسمید و ژن attB طبق واکنش الحاق تحت اثر آنزیم لیگاز قرار گرفتند و پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری E.coli

XL1-Blue. تراریخت شدند (تصاویر شماره ۳ و ۴). در جهت تایید ورود ژن attB در وکتور pSVM واکنش colony PCR از کلنی‌های نوترکیب انجام شد و صحت کلونینگ با مشاهده‌ی باند مربوط به ترادف attB انجام گرفت. (تصاویر شماره ۵ و ۶). در واکنش نوترکیبی بین ناحیه‌ی attB از وکتور pSVM و ناحیه‌ی psedo-attP در کروموزوم‌های CHO، جهت قطعه‌ی attB مهم نمی‌باشد و در هردو جهت واکنش نوترکیبی به درستی انجام می‌شود.



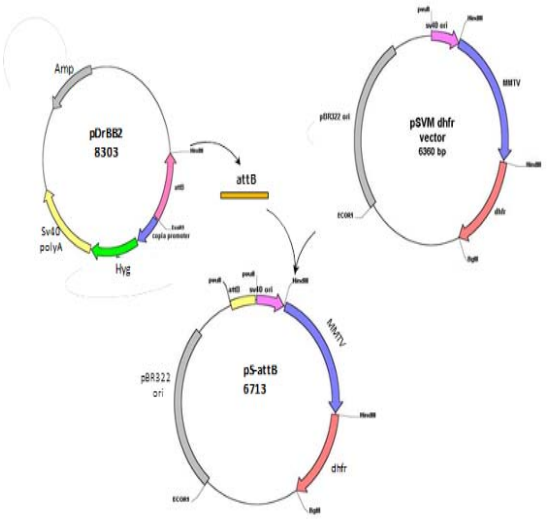
تصویر شماره ۱: ژن توالی اتصال در ژنوم باکتری (attB) تکثیر و جدا شده از وکتور pDrBB2 با استفاده از PCR

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ جهت خالص سازی از ژل بارگذاری شد. M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

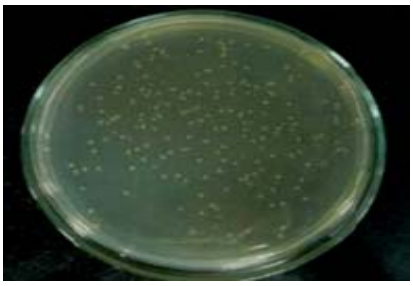


تصویر شماره ۲: تایید ساختار پلازمید pSVM dhfr با استفاده از هضم با آنزیم PvuII

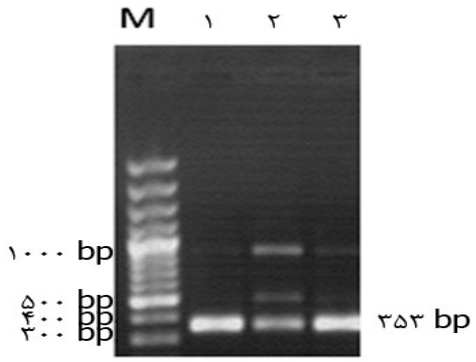
این آنزیم بر روی این پلازمید یک جایگاه برش دارد، pSVM cut پلاسمیدهای برش داده شده و pSVM un cut: برش نخورده بر روی ژل آگارز ۱٪؛ M مارکر kb ۱.



تصویر شماره۳: مراحل مختلف شکل گیری پلازمید pS-attB با استفاده از وکتور pDrBB2 و پلازمید pSVM dhfr

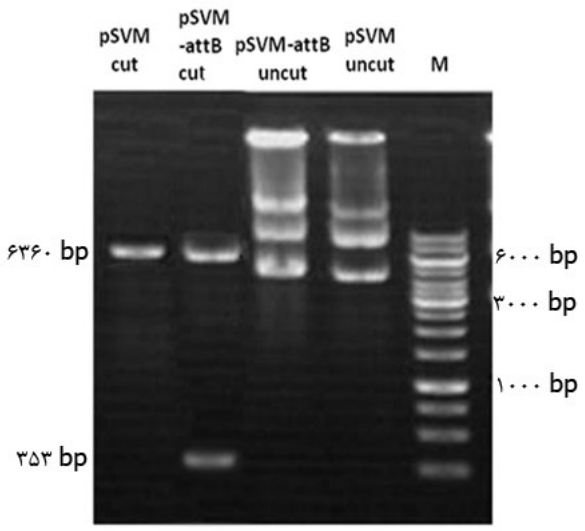


تصویر شماره ۴: کلنی‌های حاصل از تراریختی باکتری E. coli XL1-Blue با وکتور Ps-attB



تصویر شماره ۵: تایید کلونینگ ژن توالی اتصال در ژنوم باکتری (attB) با استفاده از colony PCR

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. M مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۱ تا ۳ نتایج colony PCR برای سه کلنی نوترکیب را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۶: ساختار پلازمید pSVM dhfr–attB با استفاده از هضم با آنزیم PvuII

این آنزیم بر روی این پلازمید یک جایگاه برش دارد، cut. پلاسمیدهای برش داده شده و uncut، پلاسمید برش نخورده (پلاسمید pSVM dhfr –attB و pSVM:dhfr) بر روی ژل آگارز ۱٪. M مارکر 1 Kb DNA.

بحث:

در این تحقیق، جایگاه attB در پلاسمید pSVM با استفاده از سیستم نوترکیبی phiC31 همسانه سازی گردید. در طول ۲۵ سال گذشته امکان طراحی مولکول‌های DNA جدید در لوله‌ی آزمایش در نتیجه‌ی پیشرفت تکنیک‌های DNA نوترکیب فراهم آمده است، اما قابلیت کنترل تغییرات در ژنوم سلولی محدود است. استفاده از سیستم‌های نوترکیبی در جایگاه خاص در جهت حل این مشکل می‌تواند حائز اهمیت باشد. دو سیستم نوترکیبی در جایگاه خاص Cre و Flp واکنش نوترکیبی را به صورت برگشت پذیر انجام می‌دهند و اغلب در ایجاد حذف ژنی کاربرد دارند. ولی سیستم نوترکیبی Phic31 به دلیل خاصیت برگشت پذیری واکنش کاربرد بیشتری خواهد داشت (۱۴). با وارد کردن پلاسمیدهای خارج کروموزومی در سلول‌های انسانی مشخص شده است که اینتگراز Phic31 واکنش الحاق DNAخارجی را در کروموزوم‌های انسانی با کارآمدی بیش از ۵۰٪ میانجی گری می‌کند. این نتایج نشان داد که اینتگراز Phic31 در جهت الحاق DNA خارجی در کروموزوم‌های پستانداران مفید می‌باشد. با ایجاد رده‌ی های سلولی موشی و انسانی که شامل جایگاه‌های att الحاق شده در نواحی تصادفی در این کروموزوم‌ها بودند. واکنش نوترکیبی و الحاق DNA خارجی در کروموزوم این رده‌ی های سلولی با موفقیت انجام شد. از طرفی با شناسایی جایگاه‌های شبه attP در انسان و موش ، قابلیت الحاق DNA خارجی در ژنوم این سلول‌ها در حضور جایگاه attB و آنزیم اینتگراز انجام شدنی است. با وجود این استراتژی قابلیت تغییر ژنوم سلول‌های زنده در جایگاه‌های از قبل تعیین شده وجود دارد (۱۴). عملکرد کارآمد این سیستم نوترکیبی در سلول‌های جنینی دروزوفیلا ملانوگاستر توسط Groth و همکاران (۲۰۰۳)، نشان داده شد. نوترکیبی درون مولکولی در این سلول‌ها، با ترانسفکت کردن پلاسمید حاوی جایگاه‌های attB و attP و پلاسمید حاوی آنزیم این حشره شناسایی کردند که جایگاه شناسایی آنزیم اینتگراز بوده و به عنوان سوبسترا برای وارد شدن در داخل سلول‌های جنینی استفاده می‌شدند. در آزمایشی دیگر، Thomason و همکاران (۲۰۰۴)، با ترانسفکت کردن پلاسمید pTL۴۵ (حاوی ژن کد کننده یوراسیل و جایگاه attB) و هم چنین، پلاسمید حاوی آنزیم اینتگراز در مخمر ساکارومیسز پمبه باعث جاگیری الل یوراسیل در کروموزوم مخمر شدند. آن‌ها در آزمایشی دیگر، با ترانسفکت کردن پلاسمید حاوی جایگاه attB و ژن GFP، همراه با پلاسمید حاوی ژن اینتگراز، زمینه‌ی الحاق پایدار ژن GFP را در کروموزوم‌های CHO فراهم کردند (۳). در سال ۲۰۰۲، دانشمندان نیز با ترانسفکت کردن پلاسمید حاوی جایگاه attB و ژن لوسیفراز و پلازمید حاوی ژن اینتگراز در سلول‌های ۲۹۳ انسانی، باعث پایداری بیان این پروتئین در طول ۴ هفته گردیدند. این در حالی بود که بیان پروتئین بدون ورود جایگاه‌های attB و آنزیم اینتگراز بسیار سریع و

ناپایدار بود. با وابستگی این پایداری در بیان پروتئین به جایگاه attB و آنزیم اینتگراز پیشنهاد کردند که می‌بایست ترادف خاصی نوترکیبی را فراهم کند. این آزمایش در مورد سلول‌های موشی 3T3 نیز انجام شد و نتایجی مشابه به دست آمد (۴). در مقاله‌ای دیگردر سال ۲۰۰۲ از این تکنیک، در زمینه‌ی ژن درمانی استفاده شد. آن‌ها با تزریق یک پلاسمید حاوی یک جایگاه attB و یک پلاسمید بیانی حاوی ژن فاکتور ۸ انسانی، و پلاسمید حاوی ژن اینتگراز در سلول‌های کبدی موش، باعث افزایش فاکتور ۸ سرمی به میزان ۱۰ برابر بیشتر از میزان معمول آن شدند. این تولید پایدار به مدت ۸ ماه، در سلول‌های کبدی موش ادامه یافت (۲).

نتیجه گیری:

با بهره گیری از این اطلاعات و وجود جایگاه psedo-attP در کروموزوم سلول‌های CHO، در این تحقیق، جایگاه attB در پلاسمید pSVM همسانه سازی گردید. تا بتوان بعد از الحاق ژن اینترفرون انسانی در این پلاسمید، و ورود این پلاسمید و پلاسمید حاوی آنزیم اینتگراز به سلول‌های CHO برای اولین بار زمینه‌ی پایداری بیان این پروتئین را در سلول‌های CHO فراهم کرد.

تشکر و قدردانی:

از کمک‌های مالی دانشگاه اصفهان بالاخص تحصیلات تکمیلی تشکر فراوان می گردد.

منابع:

1. Olivares EC, Hollis RP, Chalberg TW, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. Nat Biotechnol. 2002; 20(11): 1124-8.
2. Richard C, W OD, Lynn T. Dna recombination in eukaryotic cells by the bacteriophage phic31 recombination system. Google Patents; 2001.
3. Liu Y, Thyagarajan B, Lakshmipathy U, Xue H, Lieu P, Fontes A, et al. Generation of platform human embryonic stem cell lines that allow efficient targeting at a predetermined genomic location. Stem Cells Dev. 2009; 18(10): 1459-72.
4. Sorrell DA, Kolb AF. Targeted modification of mammalian genomes. Biotechnol Adv. 2005; 23(7-8): 431-69.
5. Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(11): 5995-6000.
6. Gupta M, Till R, Smith MC. Sequences in attB that affect the ability of phiC31 integrase to synapse and to activate DNA cleavage. Nucleic Acids Res. 2007; 35(10): 3407-19.
7. Ginsburg DS, Calos MP. Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. Adv Genet. 2005; 54: 179-87.
8. Chalberg TW, Genise HL, Vollrath D, Calos MP. phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46(6): 2140-6.
9. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP. Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. Genetics. 2004; 166(4): 1775-82.
10. Lee F, Mulligan R, Berg P, Ringold G. Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids. Nature. 1981 Nov 19; 294(5838): 228-32.
11. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. J Bacteriol. 2007; 189(23): 8746-9.

12. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th edition. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 2001.
13. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem. 1981; 114(1): 193-7.
14. Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. Mol Cell Biol. 2001; 21(12): 3926-34.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekordy Univ Med Sci) 2015 Feb, Mar; 16(6): 9-18. ***Original article***

Construction of eukaryotic integrative vectors by insertion of the integration region attB in pSVM

Jafari H[1,2], Hojati Z[2*]
[1] Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [2] Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran.
Received: 3/Mar/2012 Accepted: 9/Nov/2014

Background and aims: Different varieties of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are being used frequently for producing most pharmaceutical products for many years. Permanent production in these host cells is a major challenge. The aim of this study was to integrate the vector permanently in the genome. In this study, the *phiC31* site-specific recombination system was used for prolonged maintenance of the vector in the CHO cells.
Methods: In this laboratory experimental study, a restriction enzyme cut site (*PvuII*) was selected as a cloning site in the pSVM vector using CLC software. Cutting with this enzyme led to create two blunt ends into the vector. Two specific primers were designed for isolation and amplification of *attB* region from pDrBB2 vector, using Oligo®5 software. Gel electrophoresis and PCR analysis were performed on the amplified fragment in order to confirmation of its structure.
Results: The *attB* region was successfully integrated in to pSVM vector and was shown by gel electrophoresis. Colony PCR technique has revealed the correct structure of the reconstructed vectors.
Conclusion: In this study, the *phiC31* integrate catalyzes recombination between pseudo-*attP* sites (in CHO chromosomes) and *attB* site. A new construct has been made in this project containing *attB* site. This construct has to be introduced into CHO cells accompanied with pCMV-int vector (co-transfection) containing integrase. This integrase facilitates the incorporation of the pSVM vector into the chromosome, in order to get a permanent existence of the new construct into the CHO cells.

***Keywords*: CHO cells, Eukaryotic genome attachment site, Site-specific recombination, recombination, Construct, Gel electrophoresis.**

Cite this article as: Jafari H, Hojati Z. Construction of eukaryotic integrative vectors by insertion of the integration region attB in pSVM. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 16(6): 9-18.

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept., Faculty of Science, Esfahan University, Esfahan, I.R. Iran, Tel: 00983117932478, E-mail: z.hojati@sci.ui.ac.ir