مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵٤/هفته دوم آذر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۴

ساخت سازه‌ی ژنی pBud.CE4.1 IFNβ Wild Type و بررسی سطح بیان ژن اینترفرون بتای انسانی در رده‌ی سلولی HEK293 ترانسفکت شده با این سازه

راحله نوروزی[۱]، دکتر زهره حجتی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اینترفرون بتا، از جمله سایتوکاین‌های مهمی است که در پاسخ به عوامل محرک و آنتی‌ژن‌ها بیان می‌شود و در فرایندهای ایمنی و التهاب نقش دارد. در این پژوهش، ضمن کلون نمودن ژن اینترفرون بتا در وکتور pBud.CE4.1، سطح بیان این ژن در مقایسه با حالت بیان پایه در رده‌ی سلولی انسانی HEK293 با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) بررسی گردید.

روش‌ها: توالی ژن اینترفرون بتا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی جایگاه برش آنزیمی KpnI و BglII از روی وکتور pSVMdhfr حاوی این ژن تکثیر شد و سپس، در وکتور pBud.CE4.1 خطی شده با آنزیم‌های پیش‌گفته، کلون گردید. ساختار وکتور نوترکیب، با استفاده از روش هضم آنزیمی، Colony PCR و تعیین توالی، بررسی و در نهایت، به درون باکتری مستعد Escherichia coli TOP10 ترانسفورم شد. پس از تکثیر، پلاسمید نوترکیب استخراج و به رده‌ی سلولی HEK293 ترانسفکت گردید. استخراج RNA، سنتز cDNA (Complementary DNA) و بررسی سطح بیان با استفاده از روش Real-time PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: ژن اینترفرون بتا، تحت پروموتر eEf1a وکتور با موفقیت در رده‌ی سلولی HEK293 بیان شد. سطح بیان این ژن در اثر ترانسفکشن، ۷۹/۹ برابر افزایش نسبت به شاهد را نشان داد. ترانسفکت وکتور فاقد ژن، افزایش بیان ۲/۸۷ برابری را نشان داد که احتمال می‌رود، به علت ورود یک ژنوم بیگانه باشد.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های تولید شده در سیستم‌های پروکاریوتی، فاقد گلیکوزیلاسیون می‌باشند و در نتیجه، خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی نسبت به حالت طبیعی دارند. بنا بر این، بیان ژن هدف در سلول انسانی تحت پروموتر قوی وکتور انتخابی، از مزایای پژوهش حاضر است. انجام مطالعات پروتئینی در این زمینه، می‌تواند هدف مطالعات آتی باشد.

واژگان کلیدی: اینترفرون بتا، رده‌ی سلولی HEK293، وکتور pBudCE4.1، Real-time polymerase chain reaction

ارجاع: نوروزی راحله، حجتی زهره. **ساخت سازه‌ی ژنی pBud.CE4.1 IFNβ Wild Type و بررسی سطح بیان ژن اینترفرون بتای انسانی در رده‌ی سلولی HEK293 ترانسفکت شده با این سازه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۴): ۱۷۰۰-۱۶۹۱

مقدمه

اینترفرون‌ها از جمله‌ی سایتوکاین‌های طبیعی بدن می‌باشند. واژه‌ی اینترفرون فعالیت زیستی مواد محلولی را تعریف می‌کند که در فرایند همانندسازی ویروس‌ها تداخل ایجاد می‌نمایند. اینترفرون‌ها، در پاسخ به انواع آنتی‌ژن‌ها شامل RNA ویروسی،

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر زهره حجتی
Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

تولیدات باکتریایی و پروتئین‌های توموری بیان می‌گردند (۱). به طور کلی، اینترفرون‌ها را بر اساس توالی اسید آمینه‌ای به سه گروه تقسیم می‌کنند: گروه I شامل اینترفرون‌های α، β، ε، δ، ω، κ و τ می‌باشد؛ در حالی که گروه II تنها واجد یک عضو به نام اینترفرون γ است. گروه III اینترفرون‌ها به تازگی شناسایی شده‌اند و شامل اعضای λ1، λ2 و λ3 می‌باشند و در پاسخ مستقیم به عفونت‌های ویروسی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲).

دسته‌بندی دیگر اینترفرون‌ها بر اساس منشأ سلولی آن‌ها است. بر این اساس، اینترفرون‌ها را می‌توان به سه گروه تقسیم‌بندی نمود. اینترفرون α با منشأ سلول‌های لوکوسیتی (به آن اینترفرون لوکوسیتی گفته می‌شود)، اینترفرون β با منشأ سلول‌های فیبروبلاستی (به آن اینترفرون فیبروبلاستی گفته می‌شود) و اینترفرون γ با منشأ سلول‌های لنفوسیتی (به آن اینترفرون ایمنی گفته می‌شود)، در این تقسیم‌بندی جای می‌گیرند (۴-۳). اینترفرون α و β در گروه I خانواده‌ی اینترفرون‌ها قرار دارند و نقش مهمی در سرکوب عفونت‌های ویروسی و التهاب ایفا می‌کنند (۵).

امروزه، دو راهبرد بسیار متفاوت برای تولید اشکال دارویی اینترفرون بتای نوترکیب به کار گرفته شده است. فرم IFNβ-Ia (Interferon beta-Ia) نام کلی داروهایی است که در رده‌ی سلولی CHO (Chinese hamster ovary) تولید می‌شود و IFNβ-Ib نام کلی داروهایی است که با استفاده از سیستم بیانی E. coli (Escherichia coli) به تولید می‌رسد. تولید اینترفرون بتای نوترکیب، در سلول‌های E. coli در ابتدا با مشکلاتی همراه بوده است؛ از جمله این که اینترفرون بتای حاصل از این روش، در محیط به صورت دایمر و اولیگومر دیده می‌شد که این امر، تخلیص و جداسازی اینترفرون بتا را به کاری بسیار سخت و وقت‌گیر تبدیل می‌نمود (۷-۶، ۴).

به علاوه، مشخص شده است که اینترفرون بتای تولید شده به روش میکروبی، همیشه فعالیت اختصاصی پایین‌تری نسبت به فرم طبیعی نشان می‌دهد (۷). به همین منظور، در صنایع زیست‌دارویی، سیستم‌های کشت سلولی پستانداران ترجیح داده می‌شوند (۸). در این مطالعه، سطح بیان ژن اینترفرون بتای انسانی در رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان ترانسفکت شده با سازه‌ی ژنی pBud.CE4.1 IFNβ Wild Type با به کار گیری روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) سنجیده شد.

روش‌ها

به منظور مطالعه و بررسی میزان بیان mRNA (Messenger RNA) اینترفرون بتا، از وکتور pSVMdhfr حاوی ژن اینترفرون بتای انسانی به عنوان الگو جهت انجام PCR استفاده گردید. پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 (Molecular biology insight, USA) به نحوی طراحی شدند که امکان تکثیر ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن اینترفرون بتای انسانی از روی وکتور pSVMdhfr فراهم شود.

در پرایمرهای F و R، توالی مربوط به جایگاه شناسایی آنزیم‌های KpnI و BglII به منظور کلون نمودن قطعه در وکتور بیانی pBud.CE4.1 قرار داده شد. استفاده از نوکلئوتیدهای GG پیش از سایت برشی KpnI در پرایمر رفت و نوکلئوتیدهای TC

پس از جایگاه برشی آنزیم BglII در پرایمر برگشت، امکان شناسایی هر چه بیشتر جایگاه برش توسط آنزیم را فراهم می‌نمود. طراحی پرایمر برگشت به نحوی بود که در آن، کدون ختم TGA با هدف فراهم شدن امکان ردیابی پروتئین تولید شده با استفاده از آنتی‌بادی HisTag حذف گردید. بدین منظور و به دنبال حفظ قالب خوانشی ژن و بیان توالی هیستیدینی، دو نوکلئوتید GA پیش از سایت برشی آنزیم KpnI قرار داده شد.

یکی از عوامل مهمی که در میزان ترجمه تأثیرگذار است، وجود توالی مناسب احاطه کننده‌ی کدون شروع ترجمه یا همان توالی کزاک می‌باشد؛ به طوری‌که مقدار پروتئین سنتز شده از یک mRNA، وابسته به قدرت توالی کزاک آن می‌باشد. تغییر توالی کزاک به منظور نزدیک نمودن آن به فرم ثابت، می‌تواند به افزایش سطح ترجمه کمک نماید. توالی کزاک در ژن اینترفرون بتا در چندین جایگاه متفاوت از توالی ثابت تعریف شده است. توالی ثابت کزاک به صورت GCCRCCAUGG است که در آن، R معرف یک باز پورینی است. توالی کزاک ژن اینترفرون بتا به صورت GUCAACAUGA می‌باشد که به منظور نزدیک نمودن این توالی به توالی ثابت کزاک، دو نوکلئوتید موجود در مناطق ۲- و ۵- (با توجه به جایگاه آغاز رونویسی) باید به باز C تغییر یابد. بدین جهت، توالی نوکلئوتیدی GCCACCATGACC مربوط به فرم حفاظت شده‌ی کزاک در پرایمر رفت پس از سایت برشی KpnI قرار داده شد. پرایمرهای مورد استفاده به صورت پودر لیوفیلیزه (ژن فن‌آوران کوثر، ایران) تهیه گردید.

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده‌ی زیر با پروتکل دمایی ۹۵ °C به مدت ۶ دقیقه، و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۵۰ ثانیه و یک چرخه‌ی نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

FP IFNβ:
5'-GGGGTACCGCCACCATGACCAACAAGTGT-3'
RP IFNβ:
5'-GAAGATCTTCGTTTCGGAGGTAACCTG -3'

قطعه‌ی تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج از ژل (Thermo scientific, USA) خالص‌سازی گردید. هم‌زمان با آن، وکتور pBud.CE4.1 با آنزیم‌های KpnI و BglII خطی شد. در نهایت، قطعه‌ی تکثیر شده درون وکتور خطی، توسط آنزیم T4 لیگاز کلون گردید.

محصول واکنش اتصال به روش استاندارد شوک حرارتی به داخل باکتری E. coli.TOP10 ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب بر روی پلیت LBA دارای غلظت نهایی ۵۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک زئوسین انجام گرفت. کلونی‌های به دست آمده به روش Colony PCR غربال‌گری شدند و سپس از کلونی‌های مثبت، استخراج پلاسمید صورت گرفت.

هضم آنزیمی امتحانی با آنزیم‌های KpnI و BglII و نیز تعیین توالی DNA به کمک پرایمرهای عمومی Bgh Rev (فزابیوتک، ایران) انجام شد. پس از آن، سازه‌ی نوترکیب به کمک کیت Lipofectamine® LTX plus™ reagent (Invitrogen, USA) درون سلول‌های HEK293 ترانسفکت گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌ها با استفاده از بافر PBS

(Phosphate-buffered saline) شسته و سپس به کمک تریپسین ۰/۰۵ درصد از سطح فلاسک جدا شدند و محیط کشت حاوی سلول‌ها به یک فالکون منتقل گردید. سانتریفوژ محیط کشت سلولی با دور ۱۷۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

پس از تهیه‌ی رسوب سلولی، مراحل مختلف استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت کیاژن انجام گرفت. به منظور بررسی کمی RNA استخراج شده، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. به منظور تأیید صحت و کیفیت استخراج، نمونه‌های RNA در چاهک ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. واکنش تیمار DNase به کمک کیت DNaseI (Thermo scientific, USA) با هدف حذف آلودگی های DNA صورت گرفت. جهت بررسی کمی بیان ژن، با استفاده از حجمی معادل ۲ µg RNA، سنتز cDNA صورت گرفت.

واکنش سنتز cDNA با ترکیبات ۴ µl بافر ۵X آنزیم RT، ۱ µl از سه ماده‌ی مهار کننده‌ی RNase، آنزیم RT، رندوم هگزامر پرایمر و ۲ µl از dNTP mix (Deoxynucleotide triphosphates) ۱۰ mM و ۲ µg از RNA انجام و حجم کلی واکنش به کمک آب فاقد نوکلئاز به ۲۰ µl رسانده شد.

در مرحله‌ی بعد، پرایمرهای اختصاصی برای ژن اینترفرون بتا و ژن خانه‌گردان eEf1a1 جهت واکنش Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و AlleleID8.7 طراحی گردید. cDNA سنتز شده، در فرایند Real-time PCR استفاده شد تا در صورت مشاهده‌ی باند های مورد نظر، کارآمدی ساخت cDNA مورد تأیید قرار گیرد. در ابتدا از گرادیانت دمایی در بازه‌ی ۵۷-۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور تنظیم دمای اتصال پرایمرها استفاده گردید. پس از تعیین بهترین شرایط جهت تکثیر، واکنش Real-time PCR انجام پذیرفت و نتایج آن به صورت منحنی‌های استاندارد، ذوب و تکثیر مورد بررسی قرار گرفت.

در نهایت، به منظور بررسی دقیق نتایج واکنش Real-time PCR، اطمینان از تشکیل باندهای مناسب و عدم تشکیل باند پرایمر دایمر، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد.

یافته‌ها

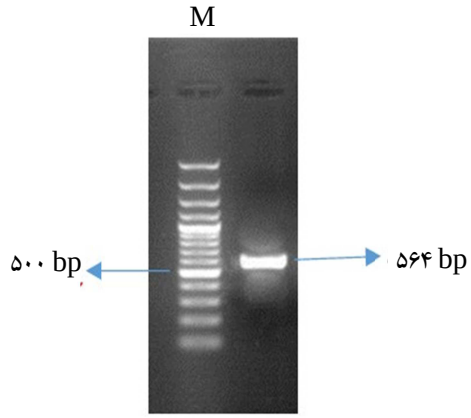
ساخت سازه‌ی pBud.CE4.1IFNβ

PCR ژن اینترفرون بتا بر روی وکتور pSVMdhfr- حاوی ژن، با استفاده از پرایمرهای مورد نظر انجام گرفت و محصولی با طول ۵۶۴ جفت باز تکثیر شد (شکل ۱).

پس از انجام فرایند کلونینگ، هضم آنزیمی با دو آنزیم KpnI و BglII بر روی وکتور نوترکیب صورت گرفت و خروج قطعه ی ۵۶۴ جفت بازی اینترفرون بتا، ورود صحیح قطعه در وکتور را تأیید نمود (شکل ۲).

نتایج ترانسفکت سازه ی pBud.CE4.1IFNβ به رده‌ی سلولی HEK293

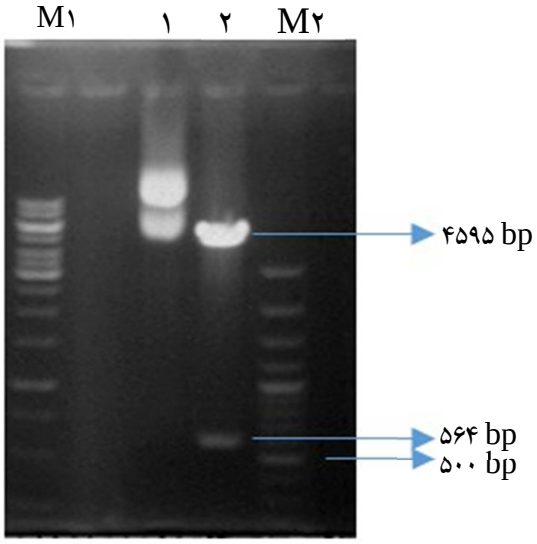
پلاسمید نوترکیب به درون رده ی سلولی HEK293 به کمک کیت لیپوفکتامین (Invitrogen, USA) ترانسفکت گردید. علاوه بر آن، در یک واکنش جداگانه، وکتور فاقد قطعه ی وارد شونده، به درون سلول‌ها ترانسفکت شد. در فلاسک دیگر، سلول‌های HEK293 ترانسفکت نشده به عنوان سلول های شاهد کشت داده شد. شکل ۳، نشان دهنده ی RNAهای استخراج شده از کشت سلولی می‌باشد.



شکل ۱. نتیجه‌ی واکنش Polymerase chain reaction (PCR) بر روی وکتور pSVMdhfr-IFNβ جهت تکثیر ژن اینترفرون بتا. قطعه‌ی ۵۶۴ جفت بازی اینترفرون بتا با موفقیت از روی وکتور الگو تکثیر گردید. M نشان دهنده‌ی اندازه‌ی نمای ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas) می‌باشد.

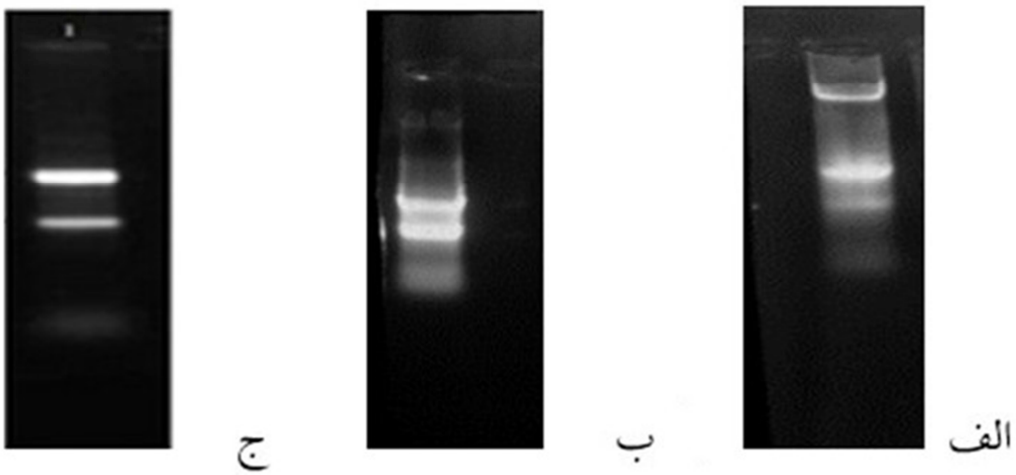
نتایج Real-time PCR

انجام واکنش گرادیانت PCR دمای ۵۵ °C را به عنوان دمای بهینه جهت تکثیر هم‌زمان دو ژن IFNβ و eEf1a1 تعیین نمود. شکل ۴، منحنی تکثیر cDNA ژن هدف و ژن خانه‌گردان را طی واکنش Real-time PCR نشان می‌دهد.



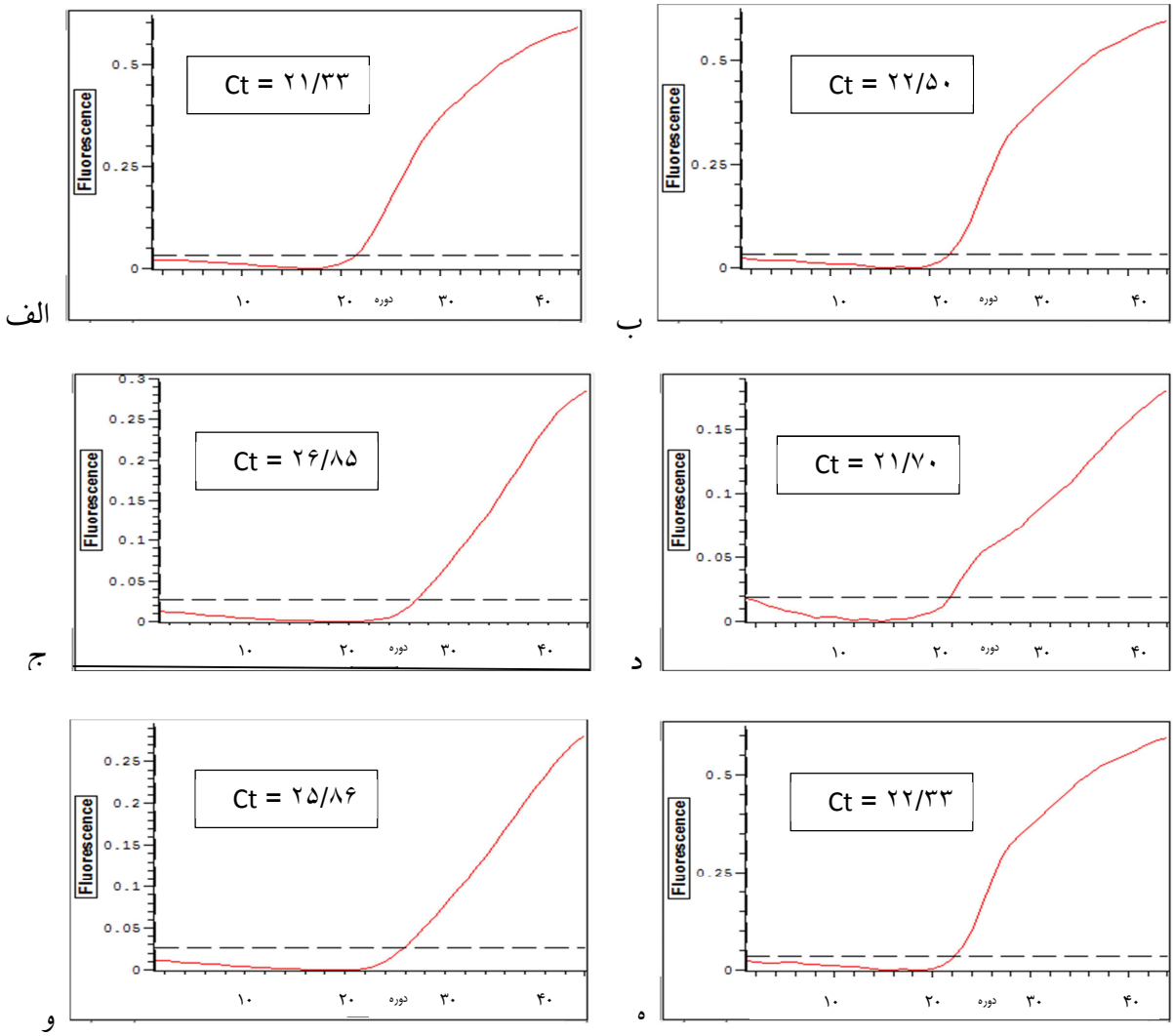
شکل ۲. هضم آنزیمی دوگانه بر روی پلاسمید نوترکیب

ستون ۱ شاهد منفی (وکتور برش نخورده) و ستون ۲ وکتور خطی شده به طول ۴۵۹۵ جفت باز و ژن اینترفرون بتا به طول ۵۶۴ جفت باز را نشان می‌دهد. M_1 اندازه نمای ۱ کیلو جفت بازی و M_2 اندازه نمای ۱۰۰جفت بازی (Fermentas) است.



شکل ۳. استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های ترانسفکت نشده (شاهد).

الف) RNA استخراج شده از سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب واجد ژن اینترفرون بتا، ب) RNA استخراج شده از سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با وکتور فاقد قطعه‌ی وارد شونده، ج) RNA استخراج شده از سلول‌های HEK293 ترانسفکت نشده. پس از الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۲ درصد TAE (Tris base, acetic acid, EDTA) با ولتاژ ۷۰ V به مدت ۳۰ دقیقه، در تمامی نمونه‌ها دو باند در ژل دیده شد. باند بالا مربوط به زیر واحد ۲۸ S و باند پایین مربوط به زیر واحد ۱۸ S ریبوزومی می‌باشد.



شکل ۴. منحنی تکثیر نمونه‌ی اینترفرون بتا در دستگاه Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction).

الف) منحنی تکثیر cDNA (complementary DNA) ی ژن IFNß، ب) منحنی تکثیر ژن شاهد eEf1a1 بر روی cDNAی نمونه‌ی IFNß، ج) منحنی تکثیر ژن IFNß بر روی cDNA حاصل از سلول‌های ترانسفکت نشده، د) منحنی تکثیر ژن شاهد eEf1a1 بر روی cDNAی حاصل از سلول‌های ترانسفکت نشده، و) منحنی تکثیر ژن IFNß بر روی cDNA حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی، ه) منحنی تکثیر ژن eEf1a1 بر روی cDNA حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی

شکل ۵. نمودار مقایسه‌ی بیان ژن اینترفرون بتای نوترکیب در رده‌ی سلولی HEK293

بحث

سیتوکاین‌ها، عوامل فعال سلولی هستند که به صورت پایدار توسط انواع مختلف سلول‌ها در پاسخ به سطح وسیعی از محرک‌ها (نه تنها آنتی‌ژن‌ها) تولید می‌شوند. ویژگی قابل توجه سیتوکاین‌ها، اثر بر مکانیسم های سلولی و ایجاد تغییرات رفتاری در سلول‌های هدف تحت شرایط خاص است (۹). اینترفرون‌ها، به عنوان اولین گروه از سیتوکاین‌ها معرفی شدند. اینترفرون بتای انسانی (IFN-β) گلیکوپروتئینی است که در پاسخ به عفونت‌های ویروسی در سلول‌های فیبروبلاست به صورت گسترده تولید می شود؛ از این رو، به آن اینترفرون فیبروبلاستی گفته می‌شود.

اینترفرون بتا در پزشکی به صورت گسترده برای درمان و بهبود بیماری‌های خود ایمنی از جمله MS (Multiple sclerosis)، مهار تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی و در نتیجه درمان سرطان و نیز درمان عفونت‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰).

دو آنالوگ اینترفرون بتا به عنوان دارو در درمان بیماری MS استفاده می شود (۱۱). نوع اول، فرم غیرگلیکوزیله‌ی پروتئین تحت عنوان IFNβ-1b است که در باکتری E. coli بیان شده و امروزه در بازار تحت نام تجاری BetaSeron موجود است. فرم گلیکوزیله ی این پروتئین، IFNβ-1a با نام تجاری Avonex و همچنین Rebif است که هر دوی آن‌ها در سلول‌های CHO بیان می‌شوند. βIFN-1b تولیدی در باکتری، کارآیی پایین‌تری نسبت به فرم گلیکوزیله دارد؛ به طوری که برای به دست آوردن کارآیی مطابق βIFN-1a، نیاز به تجویز دوز بالاتری از آن می‌باشد (۱۲).

تزریق مداوم این دارو، باعث تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده و غیر خنثی کننده علیه βIFN می‌شود که باعث مهار اثرات بیولوژیکی و کاهش اثربخشی دارو می‌گردد. این عوامل باعث پایین آمدن کارآیی درمان و ایجاد اثرات جانبی مثل علایم شبه آنفولانزا، تخریب کبدی، کاهش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها، افسردگی و سردرد در فرد بیمار می‌شود (۱۳).

برای غلبه بر این مشکلات، می‌توان از میزبان‌های بیانی دیگر مثل مخمرها، قارچ‌های رشته‌ای، سلول‌های حشرات و سلول‌های گیاهی استفاده کرد، اما این میزبان‌ها نیز به دلیل ایجاد الگوی قندی متفاوت با انسان کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴-۱۶).

HEK293 رده‌ی سلولی مشتق شده از سلول های کلیوی جنین انسان است که در محیط کشت سلولی رشد کرده و از طریق ترانسفکت شدن با DNA آدنوویروس نوع ۵، به سلول های سرطانی تبدیل شده است. این سلول ها از نظر مورفولوژیکی به سلول های اپی تلیال شباهت دارند و از ۲۵ سال پیش به عنوان یکی از بهترین رده‌های سلولی به منظور بیان پروتئین‌های نوترکیب، تولید انواع وکتورهای ویروسی و واکسن‌ها به هر دو صورت بیان گذرا و پایدار شناخته می شوند (۱۷-۱۸). از این رو، در این مطالعه از سلول های HEK293 جهت بیان اینترفرون بتای نوترکیب استفاده گردید.

در پژوهش حاضر، بیان پلاسمید نوترکیب حاوی ژن اینترفرون بتا در رده‌ی سلولی HEK293 با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی منحنی تکثیر ژن IFNß و ژن خانه گردان eEf1a1 پس از انجام Real-time PCR و به دست

آوردن میانگین Ct (Cycle threshold) در سه بار تکرار واکنش برای نمونه ی مورد نظر، امکان محاسبه و مقایسه‌ی بیان ژن IFNß در نمونه‌ی ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده فراهم گردید. بدین منظور، از رابطه‌ی $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (۱۹).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[Ct\ (IFN\beta)\text{-}Ct\ (eEf1\alpha1)\ Transfected\ cells] - [Ct\ (IFN\beta)\text{-}Ct\ (eEf1\alpha1)\ Un\text{-}transfected\ cells)}$$

در این روش، پس از به دست آوردن میانگین Ct، اختلاف میان Ct ژن IFNβ و eEf1α1 در هر نمونه به دست می‌آید (ΔCt). در مرحله‌ی بعد، ΔCt به دست آمده برای نمونه از ΔCt نمونه‌ی شاهد که سلول ترانسفکت نشده است، کسر می‌گردد تا عدد مربوط به ΔΔCt به دست آید. بر اساس محاسبات انجام گرفته، بیان اینترفرون بتا در اثر ترانسفکشن ۷۹/۹ برابر افزایش را نسبت به بیان پایه در رده ی سلولی HEK293 نشان می‌دهد.

علاوه بر آن، ترانسفکت نمودن وکتور خالی، سبب افزایش بیان پایه از ژن اینترفرون بتا به میزان ۲/۸۷ برابر نسبت به حالت ترانسفکت نشده در این رده‌ی سلولی می‌شود (شکل ۵). به عنوان یک نتیجه، می توان چنین توجیه کرد که وکتور انتخابی دارای پروموتر ویروسی CMV (Cytomegalovirus) می باشد که در اثر ترانسفکشن، سلول هدف آن را به عنوان ژنوم ویروسی شناسایی کرده و اقدام به تولید اینترفرون بتا –نوعی سیتوکین– بر علیه ژنوم بیگانه نموده است.

در این پژوهش، سطح بیان ژن اینترفرون بتا به واسطه‌ی کلونینگ در وکتور pBud.CE4.1 تحت پروموتر قوی eEf1a تا حد چشم‌گیری افزایش یافت. بنا بر این، رده ی سلولی و نیز وکتور انتخابی، شرایط مناسبی جهت تولید پروتئین دارویی مورد نظر را دارا بودند. همچنین، تغییر توالی کوزاک ژن اینترفرون بتا و تبدیل آن به فرم ثابت و حفاظت شده، تأثیر چشمگیری در افزایش سطح بیان ژن داشت. با توجه به بیان گذرای این پروتئین در سلول‌های فیبروبلاستی، نیاز به تولید هر چه بیشتر پروتئین اینترفرون احساس می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد و نیز طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۹۲۰۴۲۸۵۶ است. بدین وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و نیز سازمان حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات و تجهیزات این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. Biochimie 2007; 89(6-7): 713-8.
2. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev 2004; 202: 8-32.
3. Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tyring SK, Baron S. Biological and clinical basis for molecular studies of interferons. Methods Mol Med 2005; 116: 1-23.
4. Zago P, Baralle M, Ayala YM, Skoko N, Zacchigna S, Buratti E, et al. Improving human interferon-beta production in mammalian cell lines by insertion of an intronic sequence within its naturally uninterrupted gene. Biotechnol Appl Biochem 2009; 52(Pt 3): 191-8.
5. Friedman RM. Clinical uses of interferons. Br J Clin Pharmacol 2008; 65(2): 158-62.

6. Mark DF, Lin LS, Lu SDY. Human recombinant cysteine depleted interferon-β muteins [Google Patent: US4588585A]. 1986.
7. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). Pharm Res 1998; 15(4): 641-9.
8. Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. Glycobiology 2009; 19(9): 936-49.
9. Morris A, Zvetkova I. Cytokine research: the interferon paradigm. J Clin Pathol 1997; 50(8): 635-9.
10. Pestka S, Baron S. Definition and classification of the interferons. Methods Enzymol 1981; 78(Pt A): 3-14.
11. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. Joint Bone Spine 2009; 76(5): 464-73.
12. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Solberg SP. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. J Neurol 2004; 251(Suppl 2): II15-II24.
13. Giovannoni G, Munschauer FE, III, Deisenhammer F. Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002; 73(5): 465-9.
14. Skoko N, Argamante B, Grujicic NK, Tisminetzky SG, Glisin V, Ljubijankic G. Expression and characterization of human interferon-beta1 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biotechnol Appl Biochem 2003; 38(Pt 3): 257-65.
15. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol Cell Biol 1983; 3(12): 2156-65.
16. Squires CH. Human interferon beta-1b production in Pseudomonas fluorescens. BioProcess International 2010; 8(7): 132.
17. Amir-Kalvangh P, Ebtekar M, Azadmanesh K, Hartoonian C, Mahdavi M. Cloning of human Ifnλ-1 (IL-29) from monocyte derived dcs and its expression in Hek 293 T. J Arak Univ Med Sci 2011; 14(57): 69-78. [In Persian].
18. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods 2005; 51(3): 187-200.
19. Pfaffl MV. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla CA: International University Line; 2004. p. 87-112.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 31.07.2015
Vol. 33, No. 354, 2nd Week, December 2015
Accepted: 16.10.2015

Construction of pBud.CE4.1 IFNβ (Human Beta Interferon) and Analysis of its Expression Level in Transfected HEK293 Cell via This Construct

Raheleh Norouzi MSc[1], Zohreh Hojati PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Interferon beta (IFNβ) is one of the important cytokines expressed in response to stimulating factors such as antigens and plays roles in immunity and inflammatory process. In present study, the expression level of IFNβ-1a was examined in HEK293 cell line using real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR).

Methods: IFNβ gene sequence was amplified using specific primers contained KpnI and BglII restriction site from pSVMdhfr-IFNβ plasmid as template. It was cloned in similarly digested pBud.CE4.1 linear vector. Construction of recombinant plasmid was verified via restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, colony PCR and gene sequencing. Recombinant plasmid was transformed into competent Escherichia coli Top10 cells finally. After amplification, recombinant plasmid was purified and transfected into HEK293. At last, RNA extraction, cDNA synthesis and analysis of expression level of gene were performed using Real-Time PCR method.

Findings: IFNβ gene was expressed under eEf1a promoter in HEK293 successfully. The expression level of target gene was increased 79.9 times in comparison with the control via transfection. Transfection of null vector showed 2.87 times elevation of target gene expression in response to the alien genome entered into the cell.

Conclusion: The proteins produced in prokaryotic systems were non-glycosylated thus they had different physicochemical properties in comparison with the natural form. So, the production of IFNβ protein in human cell line under strong promoter of selected vector is one of the advantages of this research. Protein studies in this field are targeted for the future studies.

Keywords: HEK293 cell line, Interferon beta, pBud.CE4.1 vector, Real-time polymerase chain reaction

Citation: Norouzi R, Hojati Z. **Construction of pBud.CE4.1 IFNβ (Human Beta Interferon) and Analysis of its Expression Level in Transfected HEK293 Cell via This Construct.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(354): 1691-700

1- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Zohreh Hojati PhD, Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir