

طراحی و ساخت کانستراکت نو ترکیب واجد ژن اینترفرون بتای جهش یافته در ناحیه کزاک (Kozak) به منظور تشدید ترجمه

مریم کی: دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. Maryam_kay2001@yahoo.com
* زهره حجتی: دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (*نویسنده مسئول). z.hojati@sci.ui.ac.ir
مریم حیدری: کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: اینترفرون بتا به عنوان داروی اصلی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری مالتیپل اسکلروزیس استفاده می‌شود. پروتئین اینترفرون بتا واجد نیمه‌ی عمر کمی بوده و لذا بیماران به دریافت مکرر دارو نیازمند می‌باشند. چندین عامل مهم می‌تواند بر روی میزان بیان پروتئین در سلول تأثیر گذار باشند که توالی مناسب احاطه کننده کدون آغاز (توالی کزاک) از جمله‌ی آن موارد می‌باشد. با تبدیل توالی اطراف ناحیه شروع به توالی حفاظت شده کزاک میتوان تولید اینترفرون را افزایش داد.

روش کار: پرایمرهای اختصاصی جهت ایجاد جهش هدفمند در توالی کزاک با استفاده از روش Splicing by overlap) SOEing PCR (extension / Splicing by overhang extension) طراحی و انجام شد. به منظور ایجاد جهش مورد نظر در ژن اینترفرون بتا سه واکنش PCR انجام پذیرفت. محصول نهایی جهش یافته و پلاسمید pSVM، برش داده شده و متعاقباً اتصال بین محصولات برش داده شده توسط لیگاز انجام گرفت. پس از ترانسفورماسیون با استفاده از مخلوط لایگیشن، استخراج پلاسمید صورت گرفت. پس از تولید کانستراکت و تأیید با استفاده از روش‌های هضم آنزیمی و PCR کانستراکت نو ترکیب به رده‌ی سلولی CHO با استفاده از کیت لیپوفکتامین ترانسفکت گردید. **یافته‌ها:** در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک کانستراکت نو ترکیب اینترفرون بتا تولید گردید. در این کانستراکت با استفاده از روش SOEing PCR و ایجاد جهش‌های هدفمند در ناحیه‌ی توالی کزاک، توالی مذکور به حالت ثابت نزدیک گردید. کلنی‌های سفید رنگ بر روی محیط کشت پس از ترانسفورماسیون مشاهده گردید. استخراج پلاسمید از کلنی‌ها انجام گرفته و صحت کانستراکت نو ترکیب با استفاده از هضم آنزیم و همچنین PCR تأیید گردید. طول قطعه‌ی ایجاد شده پس از هضم آنزیمی صحت کلون نمودن ژن نو ترکیب اینترفرون بتا را تأیید نمود. پس از تأیید فرایند کلونینگ، سلول‌های CHO کشت داده شده و ترانسفکشن پلاسمید نو ترکیب به رده‌ی سلولی CHO صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: جهش هدفمند در توالی کزاک ژن اینترفرون بتا صورت گرفت. جهش مورد نظر بر روی توالی کزاک می‌تواند سبب بهبود و افزایش میزان ترجمه پروتئین اینترفرون بتا گردد. در مراحل بعدی میزان تأثیر جهش در روند تولید پروتئین با استفاده از روش ELISA بررسی خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: توالی کزاک، اینترفرون بتا، SOEing PCR، رده‌ی سلولی CHO

مقدمه

سیستم ایمنی در بدن موجودات عالی، توسط مواد حدواسط و محلولی که به آنها سایتوکاین گفته می‌شود، مورد تنظیم قرار می‌گیرد. سایتوکاین‌ها پروتئین‌هایی با وزن ملکولی پایین بوده که تقریباً توسط همه انواع سلول‌های درگیر در فعالیت‌های سیستم ایمنی بدن، به ویژه سلول‌های T کمکی (T helper) و در پاسخ به آنتی‌ژن‌ها و میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می‌شوند (۱). اینترفرون‌ها گروهی از سایتوکاین‌های ترشحی بوده که واجد دامنه‌ی وسیع و گسترده‌ای از تأثیرات بیولوژیک بوده و در

پاسخ به انواع القاکننده‌ها شامل ویروس‌ها، میتوزن‌ها و پلی‌نوکلئوتیدها، تولید و ترشح می‌شوند (۲). ژن $IFN\beta$ از اعضای گروه I اینترفرون‌ها بر روی کروموزوم ۹ و در منطقه p۲۱،۳ قرار گرفته است. ژن مذکور از ۸۴۰ نوکلئوتید تشکیل شده و دارای منطقه کدکننده با ۵۶۴ نوکلئوتید می‌باشد که پروتئینی با ۱۶۶ اسیدآمینو و پپتید پیام (Signal peptide) به طول ۲۱ اسیدآمینو را کد می‌کند (۳). پروتئین $IFN\beta$ گلیکوپروتئین تنظیمی بوده و می‌تواند توسط بیشتر سلول‌های بدن به‌ویژه فیبروبلاست‌ها، در پاسخ به عفونت ویروسی یا مواجهه با دیگر

به باز C جهش داده شد. بدین منظور از روش‌های مهندسی ژنتیک و تکنیک SOEing PCR Splicing by overlap extension / Splicing by) (overhang extension (SOE) PCR استفاده شد.

روش کار

استخراج DNA: در مرحله اول، برای به دست آوردن ژن *IFNβ* نیاز به دسترسی به ژنوم انسان بود. استخراج DNA از سلول‌های خونی تازه با استفاده از روش استخراج نمکی صورت پذیرفت. DNA استخراج گردیده به منظور انجام واکنش PCR در مرحله‌ی بعدی مورد استفاده قرار گرفته و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

طراحی پرایمرهای ویژه جهت تکثیر قطعات مورد نیاز: واکنش SOEing PCR در سه مرحله صورت گرفته و نیازمند چهار عدد پرایمر می‌باشد (جدول ۱). یک جفت از پرایمرها جهت تکثیر DNA حاوی جهش به همراه توالی بالادست آن و جفت دوم جهت تکثیر DNA حاوی جهش و منطقه پایین دست آن به کار می‌رود. پرایمرهای F1 و R1 به عنوان پرایمرهای بیرونی در واکنش SOEing PCR مورد استفاده قرار گرفتند. دو عدد پرایمر دیگر برای منطقه مورد نظر برای ایجاد جهش، یعنی توالی کزاک، طراحی شد. این پرایمرها با نام F2 و R2 به گونه‌ای طراحی شدند که توالی آن‌ها مکمل هم بوده و در دو نقطه، حاوی نوکلئوتید تغییر یافته نسبت به توالی الگو باشند. پرایمرها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که در نهایت قطعه‌ی تکثیر شده دارای جایگاه هضم آنزیم *EcoRI* در دو انتهای ژن می‌باشد. این دو جفت پرایمر در دو واکنش PCR مجزا مورد استفاده قرار می‌گیرند تا دو قطعه هم‌پوشان را

بیولوژیک‌ها، تولید شده و از این‌رو تحت عنوان اینترفرون فیبروبلاستی نیز شناخته می‌شود (۴). *IFNβ* از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول‌ها، منجر به فعال‌سازی یک سری از ژن‌ها شده که در نهایت باعث ایجاد اثرات ضد ویروسی، ضد تکثیری و بسیاری فعالیت‌های زیستی دیگر در سلول‌های هدف شده و بدین جهت از نظر درمانی مورد توجه ویژه می‌باشد (۵-۷). منطقه ترجمه‌نشده‌ی انتهایی (3' untranslated region (3' UTR) در *IFNβ* mRNA) حاوی مناطق غنی از بازهای آدنین و اوراسیل می‌باشد که پایداری و نیز سطح ترجمه *IFNβ* mRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸). به طور کلی ویژگی‌های دیگری نیز در RNAهای پیام‌رسان شناسایی شده که در تنظیم بازده ترجمه نقش دارد، مانند ۱- حضور ساختار کلاهدک ۲- عدم حضور ساختارهای ثانویه پایدار و ۳- توالی مناسب احاطه کننده کدون شروع ترجمه که همان توالی کزاک (Kozak sequence) می‌باشد (۹-۱۱). توالی ثابت کزاک به صورت GCCRCCAUGG بوده و نقش مهمی در فرایند آغاز ترجمه بازی می‌کند به گونه‌ای که مقدار پروتئین سنتز شده از یک mRNA وابسته به قدرت توالی کزاک آن می‌باشد. تغییر توالی کزاک، به منظور نزدیک کردن آن به توالی ثابت کزاک نیز می‌تواند سطح ترجمه از روی یک mRNA را بهبود بخشد (۹). هدف از تحقیق حاضر، تغییر ژن *IFNβ* بوده به گونه‌ای که بازده ترجمه آن افزایش یابد. با بررسی توالی کزاک در ژن *IFNβ* مشخص شد که توالی کزاک آن به صورت GUCAACAUGA بوده و در برخی جایگاه‌ها متفاوت از توالی ثابت تعریف شده برای این منطقه می‌باشد. به منظور نزدیک کردن این توالی به توالی ثابت کزاک، دو نوکلئوتید موجود در منطقه ۲- و ۵- (با توجه به جایگاه آغاز رونویسی)

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده به منظور استفاده در واکنش SOEing PCR

پرایمرها	توالی پرایمر
F1	5- GAA GGA CCA ACT GTA TCT TTT AGT G -3
R1	5- AGC TGA ATT CTA ACT TTA TGA TGA GAG -3
F2	5' TCG TGT TGC CAC CAT GAC 3'
R2	5' GTC ATG GTG GCA ACA CGA 3'

کلونینگ این قطعه استفاده گردید. این وکتور در حدود ۶۴۰۰ جفت باز طول داشته، واجد یک جایگاه منفرد *EcoRI* بوده و یک وکتور قابل تکثیر در سلول‌های *CHO dhfr⁻* می‌باشد. محصول نهایی PCR و وکتور مورد استفاده به صورت جداگانه مورد هضم آنزیمی با *EcoRI* (خریداری شده از شرکت فرمنتاز) قرار گرفت. همان طور که ذکر شد وکتور pSVM dhfr دارای یک جایگاه منفرد *EcoRI* بود. هضم آنزیمی این جایگاه باعث ایجاد پایانه‌های چسبنده و مکمل در دو انتهای پلاسمید شده که در فرایند الحاق ممکن است مجدداً به هم متصل شده و وکتور اولیه را بدون قطعه ژن ورودی *IFN β* تولید کند. لذا برای جلوگیری از این امر و برای افزایش بازده فرایند الحاق، دو انتهای پلاسمید بعد از تیمار با آنزیم *EcoRI* تحت عمل آنزیم آلکالین فسفاتاز قرار گرفت. این آنزیم با حذف گروه‌های فسفات انتهای ۵'، مانع از اتصال مجدد دو انتهای پلاسمید به هم شده و در نتیجه بازده تولید پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *IFN β* را بالا می‌برد. پس از برش قطعات DNA (محصول PCR و وکتور) با آنزیم‌های محدودکننده و تیمار با آلکالین فسفاتاز به منظور انجام فرایند الحاق، از آنزیم لیگاز استفاده شد. در مرحله‌ی بعد سلول‌های مستعد به روش کلرید کلسیم تهیه گردید و در نهایت سلول‌های مستعد آماده شده به همراه DNA الحاق گردیده به منظور ترانسفورماسیون در باکتری *E. Coli XL1Blue* مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های ترانسفورم شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ایجاد کنند. مرحله اول واکنش SOEing PCR برای به دست آوردن قطعه اول از ژن *IFN β* به طول ۴۰۰ جفت‌باز در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ μ l DNA ژنومی، ۱ μ l از هر یک از پرایمرهای F1 و R2، ۲/۵ μ l بافر PCR X ۱۰، ۱۰ μ l ۲ μ l MgSO₄، ۰/۵ μ l dNTP، ۱ μ l آنزیم *pfu* DNA پلی‌مراز و ۱۵/۵ μ l آب مقطر انجام گرفت. واکنش PCR دوم برای به دست آوردن قطعه دوم ژن *IFN β* به طول ۱۱۱۱ جفت‌باز نیز در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ μ l DNA ژنومی، ۱ μ l از هر یک از پرایمرهای F2 و R1، ۲/۵ μ l بافر PCR X ۱۰، ۳ μ l MgSO₄، ۰/۵ μ l dNTP، ۰/۵ μ l آنزیم *pfu* DNA پلی‌مراز و ۱۳/۵ μ l آب مقطر انجام گرفت. در نهایت به منظور تکثیر قطعه‌ی کامل ژن *IFN β* واجد جهش، PCR سوم با استفاده از ترکیبات خالص شده‌ی دو PCR قبل انجام گرفت. در این PCR محصولات دو واکنش قبلی به عنوان الگو مورد استفاده قرار می‌گیرند. ترکیبات مورد استفاده در این واکنش PCR شامل، ۲ μ l DNA الگو (محصولات واکنش‌های PCR قبلی)، ۱/۵ μ l از هر یک از پرایمرهای F1 و R1، ۲/۵ μ l بافر PCR X ۱۰، ۲/۵ μ l MgSO₄، ۱ μ l dNTP، ۰/۲۵ μ l آنزیم *pfu* DNA پلی‌مراز و ۱۳/۷۵ μ l آب مقطر می‌باشد. سیکل‌ها و مدت زمان هر سیکل ۳ واکنش PCR در جدول ۲ ذکر گردیده است.

کلون نمودن ژن *IFN β* نو ترکیب: محصول نهایی PCR (ژن حاوی جهش در منطقه کزاک) در دو انتهای خود دارای جایگاه برش برای آنزیم *EcoRI* می‌باشد. وکتور pSVM dhfr به منظور

جدول ۲- شرایط واکنش‌های PCR انجام شده برای تکثیر اگزون قطعه‌ی ۴۰۰ جفت‌بازی (PCR1)، ۱۱۱۱ جفت‌بازی (PCR2) و قطعه‌ی نهایی (ژن اینترفرون حاوی جهش) (PCR3).

PCR1			PCR2			PCR3		
مرحله	دمای °C	زمان	مرحله	دمای °C	زمان	مرحله	دمای °C	زمان
دانتوراسیون اولیه	۹۴	۵ min	دانتوراسیون اولیه	۹۴	۳ min	دانتوراسیون اولیه	۹۴	۵ min
دانتوراسیون	۹۴	۱ min	دانتوراسیون	۹۴	۱ min	دانتوراسیون	۹۴	۱ min
اتصال پرایمرها	۵۹/۵	۳۰ sec	اتصال پرایمرها	۵۳	۳۰ sec	اتصال پرایمرها	۵۱	۳۰ sec
طویل شدن	۷۲	۹۰ Sec	طویل شدن	۷۲	۲ min	طویل شدن	۷۲	۳ min
طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min

خانه از پلیت $100 \mu\text{l}$ محیط فاقد سرم برداشته (برای ترانسفکشن 12 خانه از پلیت به $1200 \mu\text{l}$ محیط فاقد سرم نیاز است) و 500 ng از DNA پلاسمیدی به ازای هر خانه از پلیت افزوده شد. سپس $12 \mu\text{l}$ از بافر PLUS™ Reagent (به $1 \mu\text{l}$ به ازای هر خانه) به مخلوط DNA پلاسمیدی و محیط فاقد سرم اضافه شد. مخلوط DNA پلاسمیدی، محیط فاقد سرم و بافر PLUS™ Reagent به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در این مرحله، به مخلوط فوق $30 \mu\text{l}$ از Lipofectamine® LTX (به $2/5 \mu\text{l}$ به ازای هر خانه) اضافه شد و مخلوط نهایی به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله آخر، $100 \mu\text{l}$ از مخلوط نهایی به هر خانه از پلیت اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید. پلیت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5% CO_2 و رطوبت 95% نگهداری شد.

یافته‌ها

استخراج DNA از سلول‌های تازه‌ی خونی انجام گرفته و بر روی ژل آگارز بارگذاری گردید. پس از تأیید DNA استخراج شده سه مرحله PCR به منظور تکثیر ژن $IFN\beta$ صورت گرفت. اولین واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای F1 و R2 برای تکثیر قطعه‌ای به طول 400 جفت‌باز صورت گرفت. محصول این واکنش در محل پرایمر R2 حاوی جهش موردنظر بود. واکنش دوم PCR با استفاده از پرایمرهای F2 و R1 صورت گرفت. طول قطعه حاصل 1111 جفت‌باز بود و در محل پرایمر F2 حاوی جهش بود. به دست آوردن قطعه کامل ژن حاوی جهش، نیازمند یک مرحله PCR دیگر بود. قطعات اول و دوم ژن $IFN\beta$ حاصل از مرحله اول و دوم واکنش SOEing PCR برای استفاده در مرحله سوم با استفاده از DNA extraction kit (Qiagen) خالص‌سازی گردید. این دو قطعه بعد از ریخته شدن روی هم در ناحیه هم‌پوشان به هم متصل شده و به عنوان الگو برای انجام PCR سوم مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). این مرحله از PCR با استفاده از پرایمرهای R1 و F1 صورت گرفت. در هر سه این مراحل، بهینه‌سازی از نظر

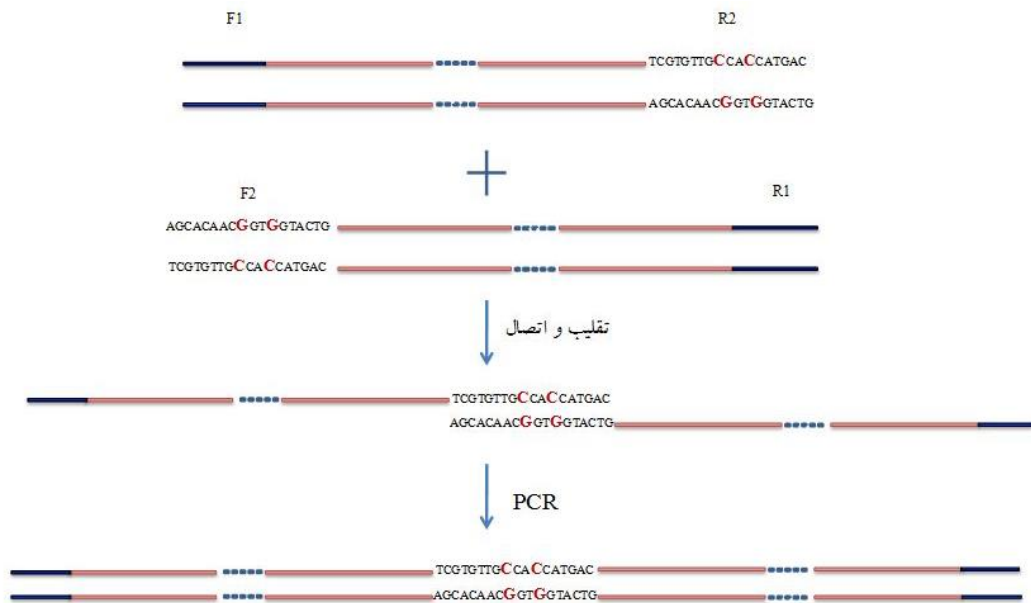
استخراج پلاسمید: به منظور تأیید حضور پلاسمید در سوبیه‌ی مورد استفاده، استخراج پلاسمید به روش جوشاندن هلمز-کویجلی از باکتری‌های ترانسفورم شده صورت گرفت. پس از تأیید حضور پلاسمید، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج گردیده با استفاده از کیت فرمنتاز که فاقد هر گونه آلودگی احتمالی به RNA و پروتئین می‌باشند به منظور ترانسفکت نمودن به رده‌ی سلولی CHO مورد استفاده قرار گرفت.

ترانسفکت نمودن به رده‌ی سلولی CHO

dhfr رده‌ی سلولی (NCBI Code: *CHO dhfr*) (C590) تهیه شده از انستیتو پاستور مورد استفاده قرار گرفت. این رده‌ی سلولی فاقد ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز می‌باشد. به منظور کشت سلول‌های *CHO dhfr* از محیط DMEM, High Glucose, GlutaMAX شرکت Gibco استفاده شد. با توجه به فقدان ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز در رده‌ی سلولی مورد استفاده ترکیبات تکمیلی شامل هیپوگزانتین، تیمیدین و متوتروکسات خریداری شده از شرکت Gibco به محیط DMEM اضافه گردید. با توجه به پروتکل پیشنهادی انستیتو پاستور مقادیر مناسب از مواد، ترکیب شده تا محیط کامل و غنی ساخته شود. ترکیب مواد به شرح زیر است.

DMEM, High Glucose, GlutaMAX + 0.1 mM hypoxanthine, 0.016 mM thymidine 0.002 mM Methotrexate+10% FBS+P/S 1%

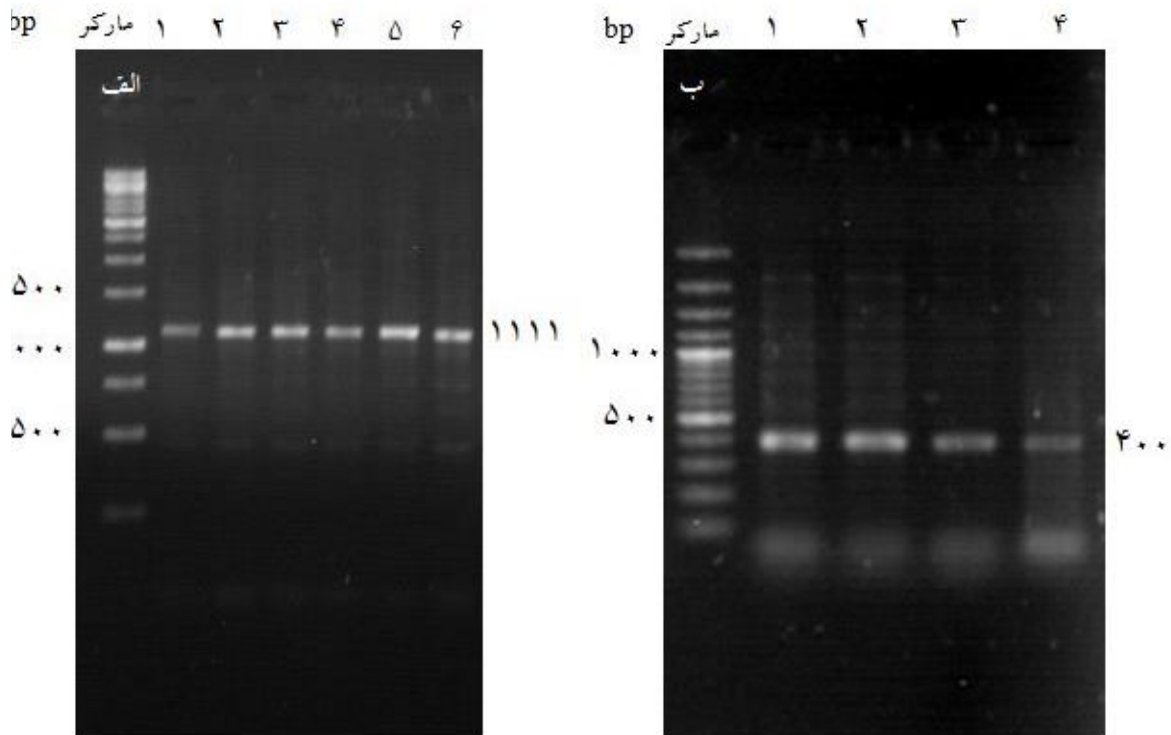
به منظور ترانسفکت نمودن پلاسمید نو ترکیب کیت لیپوفکتامین خریداری شده از شرکت Invitrogen حاوی دو ترکیب Lipofectamine® LTX و PLUS™ Reagent مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله، محیط کشت فاقد سرم و پلاسمید نو ترکیب استخراج شده با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز نیاز است. پس از مشاهده سلول‌ها و بررسی میزان رشد آن‌ها، در صورتی که به رشد معادل $80-50\%$ رسیده باشند می‌توان ترانسفکشن را انجام داد. به این منظور، به ازای هر



شکل ۱- اتصال پرایمرهای SOEing و نحوه عملکرد آن‌ها در طی واکنش. یک جفت از پرایمرها جهت تکثیر DNA حاوی جهش به همراه توالی بالادست آن و جفت دوم جهت تکثیر DNA حاوی جهش و منطقه پایین دست آن به کار می‌رود. این دو جفت پرایمر در دو واکنش PCR مجزا مورد استفاده قرار می‌گیرند تا دو قطعه هم‌پوشان را ایجاد کنند. در ادامه قطعات هم‌پوشان با هم مخلوط شده و به هم متصل می‌شوند تا ایجاد یک هترو دوپلکس نموده که در واکنش سوم PCR و با استفاده از پرایمرهایی که به دو انتهای این قطعات متصل می‌شوند، تکثیر شده و قطعه کامل DNA را ایجاد کنند.

باکتری‌های حاوی وکتور نو ترکیب بوده نمایان شد (شکل ۳). به منظور تأیید فرایند ترانسفورماسیون، باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی به محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین انتقال داده شدند تا استخراج پلاسمید انجام شود. استخراج پلاسمید با استفاده از روش هولمز-کویجلی صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده در ادامه بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ برده شد. الگوی سه بانندی پلاسمیدهای سالم، مربوط به میزان سوپر کرپل متفاوت آن‌ها می‌باشد (شکل ۴). برای تأیید حضور ژن جهش یافته *IFNβ* انسانی به داخل وکتورهای مورد نظر بعد از استخراج پلاسمید، واکنش‌های هضم آنزیمی انجام گرفت. قطعات حاصل در هر مورد و اندازه آن‌ها، تأیید کننده صحت حضور و ساختار پلاسمیدهای نو ترکیب می‌باشد. واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *EcoRI* صورت پذیرفت و باند مربوط به پلاسمید و ژن اینترفرون بر روی ژل ۰/۱٪ مشاهده گردید (شکل ۵ الف). پلاسمید استخراج گردیده به منظور بررسی نهایی توالی‌یابی گردیده و القای جهش در توالی کزاک تأیید گردید (شکل ۵ ب).

دما و غلظت Mg صورت گرفت. محصولات PCR در هر مرحله بر روی ژل آگارز ۰/۱٪ بارگذاری گردید (شکل ۲). در مرحله‌ی بعد ژن *IFNβ* حاوی جهش و وکتور با استفاده از آنزیم *EcoRI* هضم شده و با آلکالین فسفاتاز تیمار گردید. ژن *IFNβ* انسانی حاوی جهش نقطه‌ای و پلاسمید pSVM dhfr بعد از هضم آنزیمی، تیمار با آلکالین فسفاتاز و استخراج از ژل تعیین غلظت شدند و مقادیر مناسب از آن‌ها محاسبه شده و برای انجام عمل الحاق مورد استفاده قرار گرفتند. تکنیک الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligas به مدت ۱۶ ساعت و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. وکتور نو ترکیب حاصل از مرحله الحاق برای ترانسفورماسیون به داخل سلول‌های مستعد *E. coli* در ویال‌های جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری‌ها بعد از اتمام فرایند ترانسفورماسیون بر روی محیط انتخابی LBA حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کشت داده شدند. پلیت حاوی باکتری‌ها به مدت ۱ شبانه روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از این مدت تک کلونی‌های رشد یافته که



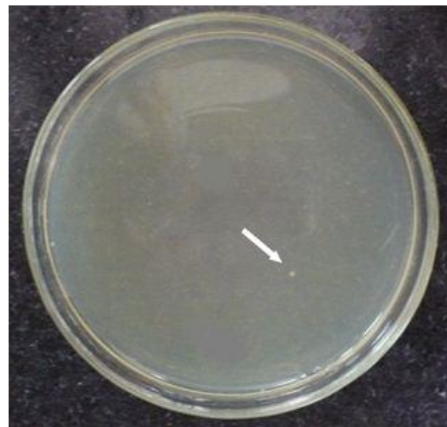
شکل ۲- محصولات حاصل از دو واکنش PCR1 و PCR2. الف) بهینه سازی غلظت Mg در واکنش PCR2 به منظور تولید قطعه‌ی ۱۱۱۱ جفت‌بازی. ستون‌های ۱ تا ۶ محصولات PCR را در غلظت‌های مختلف یون Mg از ۰/۵ mM/μl تا ۴ mM/μl نشان می‌دهد. غلظت ستون ۵ (۳ mM/μl) به عنوان غلظت بهینه یون Mg انتخاب شد. ب) بهینه سازی دمایی مرحله اول واکنش SOEing PCR جهت تولید قطعه‌ی ۴۰۰ جفت‌بازی. ستون‌های ۱ تا ۴ محصولات PCR را در بازه دمایی ۵/۵ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با فاصله دمایی ۰/۵ را نشان می‌دهد. دمای ستون ۳ (۵۹/۵) به عنوان دمای بهینه انتخاب شد.

گردید. سلول‌های *CHO dhfr⁻* مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها به صورت دوکی‌شکل و چسبیده بوده و در شرایط مناسب کشت داده شده و پاساژهای متعدد صورت گرفت. استوک‌های مناسب از سلول‌ها تهیه شده و در نتیروژن مایع نگهداری گردید. سلول‌های آماده با شرایط ng DNA ۵۰۰ پلاسمیدی، ۱ μl محلول Plus و ۱ μl ۲/۵ محلول لیپوفکتامین ترانسفکت گردیدند. لازم به ذکر است در ادامه‌ی روند تحقیقات بیان ژن نو ترکیب با استفاده از روش Real Time PCR و تولید پروتئین با استفاده از روش ELISA مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

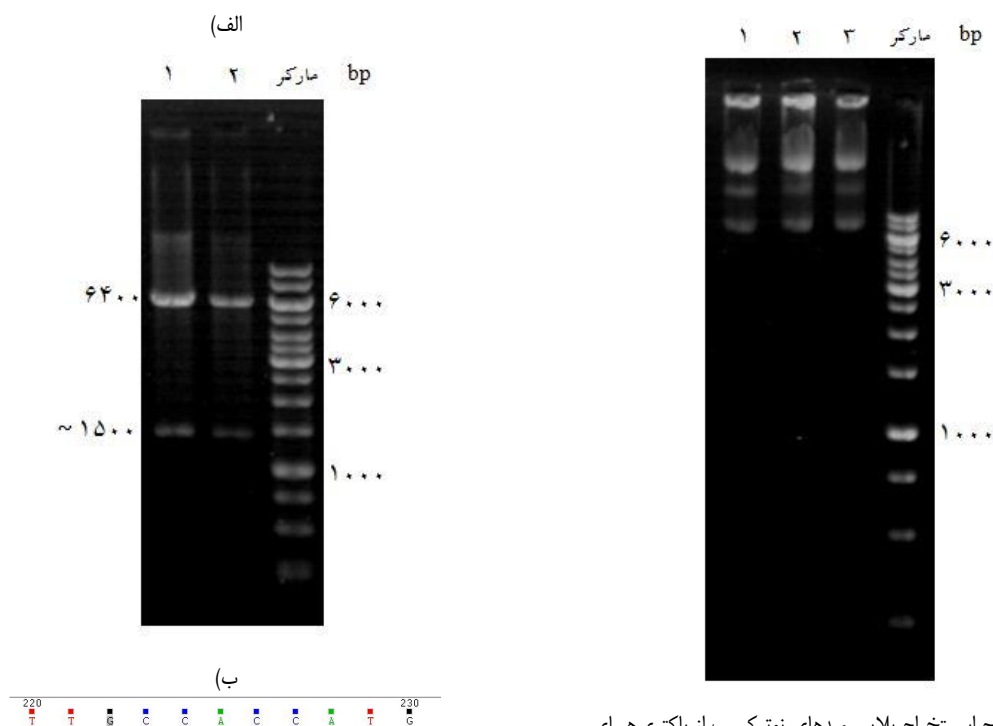
بحث و نتیجه‌گیری

گلیکوپروتئین IFNβ به عنوان یک سایتوکاین پس از تولید توسط سلول‌های فیرو بلاستی از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول باعث ایجاد اثرات ضد ویروسی، ضد تکثیری، ضد التهابی

پلاسمیدهای مورد نظر در مرحله‌ی بعدی به منظور ترانسفکت نمودن در سلول‌های یوکاریوتی با استفاده از کیت فرمنتاز استخراج گردیده و به منظور تأیید نهایی هضم آنزیمی مجدداً انجام شد. حضور باندهایی با اندازه‌های مورد نظر بر روی ژل ۱٪ سبب تأیید پلاسمیدها به منظور ترانسفکشن

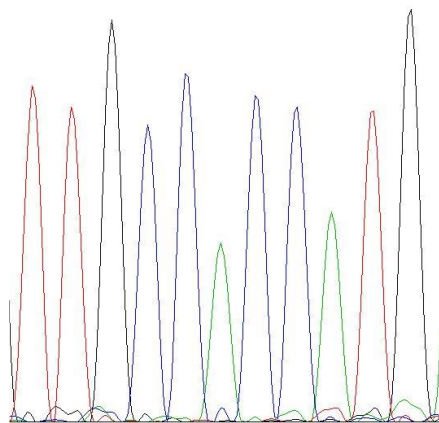


شکل ۳- نتایج ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* XL1-Blue با وکتور نو ترکیب حاوی ژن اینترفرون بتا



شکل ۴- نتایج استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب از باکتری‌های ترانسفورم شده. الگوی سه بانندی پلاسمیدهای سالم، مربوط به میزان سوپرکویل متفاوت آن‌ها می‌باشد.

و بسیاری فعالیت‌های دیگر شده و بدین ترتیب از نظر درمانی بسیار مورد توجه می‌باشد (۱۲). امروزه $IFN\beta$ در درمان بیماری‌های ویروسی، رشد‌های توموری و سرطان و هم‌چنین بیماری مالتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲، ۱۳). بدین منظور تولید مقادیر بالای این پروتئین جهت مصارف درمانی همواره مورد توجه واقع شده است. تنظیم بازده ترجمه، یک مکانیسم تنظیمی مهم در بیان ژن‌های یوکاریوتی می‌باشد. ویژگی‌های مختلفی در مولکول‌های mRNA پیام‌رسان شناسایی شده که به طور مشخص بازده ترجمه را تحت تاثیر قرار می‌دهند. عدم حضور توالی‌های غنی از AU در ناحیه $3'UTR$ و یا نواحی کد کننده، حضور کلاک در انتهای $5'$ ، توالی مناسب احاطه کننده کدون آغاز و عدم حضور ساختارهای ثانویه پایدار در بالادست و پایین دست کدون آغاز ترجمه می‌توانند سبب افزایش میزان ترجمه پروتئین هدف گردند (۱۴). سرعت آغاز ترجمه توسط ریبوزوم به میزان زیادی به وجود توالی کزاک در مجاورت کدون آغاز بستگی داشته و مقدار پروتئین ساخته شده از



شکل ۵- تایید پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری *E. coli* از طریق هضم آنزیمی و توالی‌یابی. الف) هضم با استفاده از آنزیم *EcoRI* سبب جدا شدن قطعه‌ی ژنی اینترفرون بتا با طول ۱۵۱۱ جفت‌باز گردیده است. ب) جهش‌های ایجاد شده با استفاده از توالی‌یابی تایید گردید (موقعیت بازهای جهش یافته (۲- و ۵-) درون مربع نشان داده شده است).

روی یک mRNA وابسته به قدرت این توالی می‌باشد. برخی نوکلئوتیدها در این توالی مهم‌تر از بقیه بوده؛ به عنوان مثال توالی AUG مهم‌ترین قسمت این ناحیه می‌باشد. وجود یک پورین، ترجیحاً A در موقعیت ۳- و G در موقعیت ۴+، قدرت این توالی را در ترجمه حداقل ده برابر

مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین در جهت افزایش تولید و بهبود کیفیت اینترفرون بتا صورت گرفته است (۲۲، ۲۳). در ضمن این تحقیق با مقایسه‌ی توالی کزاک $IFN\beta$ با توالی حفاظت شده‌ی کزاک، مشخص شد که این دو توالی در موقعیت‌هایی با هم تفاوت دارند. با ایجاد جهش در توالی کزاک $IFN\beta$ در دو موقعیت ۲- و ۵- سعی شد تا این توالی به توالی ثابت و حفاظت شده‌ی کزاک نزدیک‌تر شود. لازم به ذکر است تحقیقی که به بررسی اثر ایجاد جهش در توالی کزاک ژن $IFN\beta$ بپردازد، یافت نشد و در این زمینه کاری صورت نگرفته است. امید است تغییر ایجاد شده با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در توالی کزاک ژن $IFN\beta$ سبب بهبود تولید این دارو گردد. افزایش تولید پروتئین $IFN\beta$ می‌تواند سبب کاهش هزینه‌های تولیدی و کاهش قیمت دارو برای مصرف‌کنندگان گردد. نتیجه‌ی نهایی تأثیر این جهش هدفمند در افزایش بیان پروتئین اینترفرون بتا در طی مطالعات آتی با استفاده از روش‌های مختلفی مانند Real Time PCR و ELISA مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

منابع

1. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111 (2 Suppl): S460-S75.
2. De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J Leukoc Biol. 2001; 69(6): 912-20.
3. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. The structure of human interferon- β : implications for activity. Cell Mol Life Sci. 1998; 54(11): 1203-16.
4. Pang KR, Wu JJ, Huang, DB, Tying SK, Baron S. Biological and clinical basis for molecular studies of interferons. Methods Mol Med. 2005; 116: 1-23.
5. Friedman RM. Clinical uses of interferons. Br J Clin Pharmacol. 2008; 65(2), 158-62.
6. Garbe C, Krasagakis K, Zouboulis CC, Schröder K, Krüger S, Stadler R, et al. Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype. J Invest Dermatol. 1990;

بیشتر می‌کند. نزدیک بودن موتیف GCCACC به کدون آغاز ترجمه هم حائز اهمیت می‌باشد. نوکلئوتیدهای ۱- و ۲- گرچه چندان حفاظت شده نیستند اما در قدرت کلی توالی برای آغاز ترجمه نقش دارند (۹). تکنولوژی DNA نو ترکیب و مهندسی پروتئین امکان تولید $IFN\beta$ را در میزبان‌های مختلف فراهم آورده است. با ورود فناوری ساخت محصولات نو ترکیب استفاده از میزبان‌های بیانی مثل باکترهایی چون *E. coli* و سودوموناس به عنوان یک میزبان در جهت بیان پروتئین نو ترکیب $IFN\beta$ مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۶، ۱۷). در حال حاضر میزبان‌های عمده تولید کننده $IFN\beta$ به صورت تجاری باکتری *E. coli* و سلول‌های CHO بوده که محصولات این دو میزبان به ترتیب با نام تجاری Avonex® و Betaseron® (داروی CinnoVex در ایران تولید می‌گردد) تولید شده و وارد بازار دارو گردیده است (۱۸، ۱۹). باکتری *E. coli* قادر به القای الگوهای قندگذاری در پروتئین‌ها نبوده لذا پروتئین $IFN\beta$ تولید شده توسط آن فاقد الگوی قند گذاری بوده و با نوع انسانی آن متفاوت است. همین امر سبب کارایی پایین دارو نسبت به فرم گلیکوزیله بوده به طوری که برای بدست آوردن کارایی مطابق با فرم گلیکوزیله آن نیاز به تجویز دوز بالاتری از آن می‌باشد. این عوامل باعث پایین آمدن کارایی درمان و ایجاد اثرات جانبی مثل علائم شبه آنفولانزا، تخریب کبدی، کاهش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها، افسردگی و سردرد در فرد بیمار می‌شود. این در حالی است که رده‌ی سلولی CHO قادر به اعمال الگوهای قندگذاری بوده به طوری که الگوی گلیکوزیلاسیون پروتئین تولید شده بیشترین شباهت را با فرم طبیعی اینترفرون بتای انسانی داشته است. پروتئین تولید شده توسط CHO در بدن غیر ایمونوژن و فعال بوده و به همین دلیل به عنوان میزبان ترجیحی برای تولید این پروتئین نو ترکیب محسوب می‌گردد (۲۰، ۲۱). بدین منظور در تحقیق حاضر از رده‌ی سلولی CHO به عنوان میزبان تولید کننده‌ی $IFN\beta$ استفاده گردیده است. به علاوه در سال‌های اخیر تلاش‌های گسترده‌ای با استفاده از روش‌های

Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon- β (IFN- β). *Pharm Res.* 1998; 15(4): 641-49.

22. Carr F, Carter G, Jones T, Watkins J, Baker M. Modified interferon beta with reduced immunogenicity. 2002; WO Patent 2002074783.

23. Goelz SE, Cate RL, Chow EP, Pepinsky RB. Muteins of IFN-beta. Google Patents. 2000; US6127332.

95: 231S-237S.

7. Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zang YC, Zhang JZ. Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2002; 8(3): 237-42.

8. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(22): 7138-50.

9. Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* 1991; 266(30): 19867-70.

10. Whittemore LA, Maniatis T. Postinduction turnoff of beta-interferon gene expression. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(4): 1329-37.

11. Abe K, Ishigami T, Shyu AB, Ohno S, Umemura S, Yamashita A. Analysis of interferon-beta mRNA stability control after poly (I: C) stimulation using RNA metabolic labeling by ethynyluridine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 428(1): 44-9.

12. Kay M, Hojati Z, Dehghanian F. The molecular study of IFN β pleiotropic roles in MS treatment. *Iran J Neurol.* 2013; 12(4): 149-56.

13. Javed A, Reder AT. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 2006; 110(1): 35-56.

14. Paste M, Huez G, Krusys VR. Deadenylation of interferon β mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3' untranslated region and an instability sequence in the coding region. *Eur J Biochem.* 2006; 270(7): 1590-97.

15. Raj NB, Pitha PM. 65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3'UTR. *FASEB J.* 1993; 7(8): 702-10.

16. Delgado-Vega M, Alarcn-Riquelme ME, Kozyrev SV. Genetic associations in type I interferon related pathways with autoimmunity. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(suppl 1): S2.

17. Mark DF, Lin LS. Structural genes, plasmids and transformed cells for producing cysteine depleted muteins of interferon-beta. Google Patents. 1988; US 4737462 A.

18. Arababadi MK, Mosavi R, Khorramdelazad H, Yaghini N, Zarandi ER, Araste M, et al. Cytokine patterns after therapy with Avonex®, Rebif®, Betaferon® and CinnoVex in relapsing remitting multiple sclerosis in Iranian patients. *Biomark Med.* 2010; 4(5): 755-59.

19. McCormick FP, Innis MA, Ringold GM. Human interferon-beta (IFN-beta) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Google Patents. 1988; US 5795779 A.

20. Hanson SR, Culyba EK, Hsu TL, Wong CH, Kelly JW, Powers ET. The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(9): 3131-36.

21. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, et al.

Design and production of recombinant interferon beta construct with specific mutations in Kozak sequence due to promote translation

Maryam Kay, PhD student, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. maryam_kay2001@yahoo.com

***Zohreh Hojati**, Assistant Professor, Division of Genetics, Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran (*Corresponding author). z.hojati@sci.ui.ac.ir

Maryam Heidari, MSc, Division of Genetics, Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Abstract

Background: Interferon beta is one of the most important members of group I interferons and is the main drug for multiple sclerosis treatment. Interferon beta has short half-life and this compels patients to make frequent use of medicine. According to its clinical usage there is broad effort to improve translation level and protein production. There are several important factors which effect protein production that Kozak sequence is one of the most important one.

MethodS: Specific primers were designed due to induce site directed mutations by SOEing PCR (Splicing by overlap extension / Splicing by overhang extension (SOE) PCR) method. Three PCR reactions needed to amplify recombinant interferon beta gene. The final recombinant gene and pSVM plasmid were digested by EcoRI and then ligated by DNA ligase enzyme. After transformation plasmid extraction was done and the structure of the recombinant plasmid confirmed by digestion and PCR. Finally, approved recombinant plasmid was transfected to CHO cell line by using Lipofectamine kit.

ResultS: Genetic engineering methods were used to produce recombinant interferon beta gene. Production of recombinant construct including specific mutations in Kozak sequence was done by using SOEing PCR method. The white colonies were detected after transformation. Plasmid extraction was done and the structure of recombinant plasmid was confirmed by digestion and PCR. Expected length of fragment was observed after digestion. The CHO cells were cultured and recombinant plasmids were transfected to CHO cell line.

Conclusion: These mutations will enhance and improve interferon beta protein production. The influence of these mutations in protein production will survey by using ELISA method in next phase of research.

Keywords: Kozak sequence, Interferon beta, SOEing PCR, CHO cell line