مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۸، شماره ۱، پاییز ۱۳۸۵

جداسازی و کلونینگ ژن فولیکول استیمولایتینگ هورمون انسانی hFSHβ با سیگنال سکانس طبیعی ژن در شاتل وکتور pPIC9 مخمر متیلوتروف Pichia pastoris

محمدرضا اکبری‌عیدگاهی *[۱](Ph.D)، رضا نصر[۲،۱](M.Sc)، علی‌اکبر شعبانی[۱](Ph.D)، مجید مقبلی[۳](Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

۲- دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، گروه میکروبیولوژی

۳- دانشگاه آزاد اسلامی دامغان، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: فولیکول استیمولاتینگ هورمون (FSH) از خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی هیپوفیز و متشکل از دو زیرواحد آلفا و بتا می‌باشد که فعالیت بیولوژیک این هورمون مربوط به زیرواحد بتای آن است. این مطالعه به منظور جداسازی ناحیه کدکننده ژن انسانی FSHβ با سیگنال سکانس طبیعی ژن و کلونینگ آن در شاتل وکتور pPIC9 تحت پروموتر AOX1 و سیگنال سکانس آلفا فاکتور انجام شد.

مواد و روش‌ها: طی دو مرحله امپلیفیکاسیون و کلونینگ از روی ژنوم یک زن سالم، این ژن به صورت یک قطعه ۲^{kb} با بازسازی ناحیه ´5 قبل از کدون شروع جدا و اکسپرشن وکتور pPIC9-F1 ساخته شد.

یافته‌ها: هضم آنزیمی و سکانسینگ ساختار و ترادف صحیح ژن FSHβ با حفظ نواحی اسپلایسینگ را در pTV-2019 نشان داد. Restriction analysis و PCR با پرایمرهای AOX1 نشان داد، pPIC9F1 دارای ساختار صحیح می‌باشد.

نتیجه‌گیری: وکتور نوترکیب pPIC9F1 ساخته شده در این مطالعه شامل ناحیه کدکننده ژن و سیگنال طبیعی آن (+sig E2-IVS2-E3) FSHβ بوده که قادر است این ژن را در ژنوم مخمر تحت پروموتر AOX1 وارد کند، که در این حالت فیوژن پروتئینی شامل سیگنال پپتید آلفا فاکتور- سیگنال پپتید FSH به وجود می‌آید. FSHβ به نحوی بیان خواهد شد که سیستم مخمری قادر به جدا سازی آلفا فاکتور باشد. به نظر می‌رسد این نخستین تلاش برای کلونینگ ژن انسانی FSHβ در سیستم مخمری باشد.

واژه‌های کلیدی: Pichia pastoris، pPIC9، Follicle Stimulating Hormone

مقدمه

فولیکول استیمولاتینگ هورمون (FSH) از خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی هیپوفیز می‌باشد که متشکل از دو زیرواحد آلفا و بتا با اتصال غیرکووالان می‌باشد. زیرواحد آلفا در هورمون‌های این خانواده یک‌سان و تفاوت در فعالیت بیولوژیک هورمون‌های فوق مربوط به زیرواحد بتای آن‌ها می‌باشد [۱].

در انسان ژن زیرواحد بتای FSH به صورت منفرد بر روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد و از سه اگزون و دو اینترون تشکیل شده است [۳،۴،۲]. سیگنال سکانس از ۵۴ نوکلئوتید

* نویسنده مسئول. تلفن: ۳۲۶۱۹۶۰- ۰۲۳۱، نمابر: ۴۲۵۱۸۵۱- ۰۲۳۱، E-mail: mrakbari_2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۱۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

(۱۸آمینواسید) تشکیل و در اگزون دوم قرار دارد. پروتئین نهایی متشکل از ۱۱۱ اسیدآمینه می‌باشد که اینترون دوم در حد فاصل کدون‌های ۳۵ و ۳۶ آن قرار دارد. برخلاف سایر هورمون‌های گلیکوپروتئینی، ژن hFSHβ یك ناحیه به‌نسبت طویل غیرترجمه شونده در سمت ′۳ اگزون ۳ دارد که ویژگی بیولوژیك آن کاملاً مشخص نیست. ناحیه Cys28-Ala-Gly-Tyr31 (CAGY) و دو آسپاراژین ۷ و ۲۴ محل‌های گلیکوزیلاسیون زیرواحد بتا را تشکیل می‌دهند [۳].

برای تولید پروتئین‌های نوترکیب سیستم‌های بیانی متفاوتی نظیر سیستم E-coli، سیستم سلول پستانداران و سیستم مخمری در دسترس می‌باشد.

سیستم بیانی E-coli با وجود مزیت‌های زیاد، به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری (نظیر حذف اینترون‌ها) و تغییرات پس از ترجمه برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتیک مثل این پروتئین مناسب نیست. بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول پستانداران نیز بسیار پرهزینه بوده و نیازمند تجهیزات کشت سلول است. سیستم بیان در مخمر متیلوتروف Pichia pastoris که توسط Invitrogen ارائه شده است علاوه بر دارا بودن مزایای سیستم E-coli از جمله سطح بالای بیان، محیط کشت ارزان و فاقد سرم، سهولت در افزایش مقیاس تولید و القای کنترل شده، مزایای سیستم‌های یوکاریوتیك شامل اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه را نیز دارا می‌باشد، که این سیستم را برای تولید بالای پروتئین‌های یوکاریوتیک منحصربه‌فرد می‌سازد [۵]. استفاده از سیگنال ترشحی مخمر (آلفا فاکتور مشتق از ساکارومایسس سرویزیه) یا خود ژن قادر است پروتئین نوترکیب نظیر FSH را در مسیر ترشحی مخمر هدایت کند، که در آن تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و گلیکوزیلاسیون می‌تواند قبل از ترشح پروتئین نوترکیب به‌داخل محیط کشت صورت پذیرد [۶]. کمپانی Invitrogen تأکید می‌کند در مورد پروتئین‌هایی که به‌طور نرمال ترشحی و گلیکوزیله هستند حتماً از سیگنال پپتید طبیعی ژن هم استفاده شود [۵].

تلاش برای جداسازی ژن FSH از انسان و حیوانات کلونینگ آن به روش‌های مختلفی انجام شده است. Jameson JL و همکاران با بررسی کتابخانه ژنومی در فاژ لامبدا نشان دادند که تمام ژن زیرواحد بتای هورمون FSH انسانی در یک قطعه ۱۲ کیلوبازی قرار دارد [۷]. در سال Shoham۱۹۹۶ و همکاران RNA سلولی را از سلول‌های غده هیپوفیز انسان جدا کرده و یک کتابخانه cDNA به منظور جداسازی ژن زیرواحد بتای FSH-ß تهیه نمودند [۸].

Tekeno Saneyoshi و همکاران نیز از طریق جدا کردن RNA از هیپوفیز یک اسب نر و ساخت cDNA، به ژن FSHβ دست یافته و آن‌را با ژنوم سایر موجودات نظیر رات، موش، گاو، گوسفند، خوک و انسان مقایسه نمودند. آن‌ها این ژن را در وکتور مناسب برای CHO کلون نمودند [۹].

این مطالعه با هدف جداسازی ناحیه کد کننده ژن FSHβ با سیگنال سکانس طبیعی ژن انسانی و کلونینگ آن در شاتل وکتور pPIC9 تحت پروموتر AOX1 و سیگنال سکانس آلفا فاکتور انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آنزیم‌های محدود کننده، لیگاز، Pfu DNA polymerase، DNA marker، کیت تخلیص DNA (DNA Extraction Kit;#K0513) و InsT/AcloneTM PCR product cloning kit (#K1214) شامل پلاسمید pTZ57R/T از شرکت Fermentase خریداری گردید. Taq DNA Polymerase و کیت تخلیص DNAی ژنومیك (DNGTM-Plus DNA Extraction Solution) از شرکت سیناژن (ایران)، کیت تخلیص پلاسمید High Pure) Plasmid Isolation Kit) از شرکت Roche و پلاسمید pPIC9 از Invitrogen تهیه گردید. پرایمرها ساخت سیناژن و سکانسینگ نیز توسط این شرکت انجام شد.

جداسازی DNA ژنومیک انسانی. DNA ژنومیك از نمونه خون یك زن ۳۵ ساله سالم با باروری طبیعی با استفاده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

از کیت DNGTM-Plus DNA Extraction Solution و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

آمپلیفیکاسیون ژن FSH. پرایمرهای FSHE2F: 5′-AGT-TTC-TAG-TGG-GCT-TCA-TTG-TTT-G-3′ و FSHE3R: 5′-GTA-TGT-GGC-CTG-AAA-TGT-CC-3′ برای جداسازی قطعه ۲kb~ حاوی ناحیه کد کننده ژن FSHβ استفاده شد. آمپلیفیکاسیون بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد، که در ۱۰۰ میکرولیتر حجم نهایی واکنش، غلظت هر کدام از پرایمرها ۸۰۰ نانومولار، dNTP هر کدام از دئوکسی نوکلئوتیدها ۲۰۰ میکرومولار، آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن) ۵ یونیت و در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار یون Mg انجام شد. شرایط PCR شامل یک مرحله ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، ۲۵ مرحله به ترتیب در ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام یک دقیقه و یک مرحله نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه بود.

کلونینگ در pTZ57R و سکانسینگ. محصول PCR با کیت K0513 تخلیص و در pTZ57R کلون گردید. بر روی تعدادی از کلونی‌های ترانسفورم بررسی پلاسمیدی انجام شد و سه کلون که واجد پلاسمید با سایز مناسب در آگاروز ژل الکتروفورز بودند جهت هضم آنزیمی انتخاب شدند. پس از خالص‌سازی و تأیید ساختار هر سه پلاسمید با استفاده از آنزیم PstI، تحت نام pTV-2011، pTV–2019 و pTV-2020 نام‌گذاری و درنهایت دو کلون pTV–2019 و pTV-2020 به روش Dideoxy chain termination سکانس گردیدند.

تکثیر ژن FSHβ (+sig E2-IVS2-E3). به منظور کلونینگ ژن FSHβ با حفظ سیگنال سکانس طبیعی آن و تحت سیگنال پپتید ترشحی α-factor در پلاسمید pPIC9 یک جفت پرایمر طراحی شد. در پرایمر فوروارد

PicxsigF1: 5′-CCC-CTC-GAG-AAA-AGA-GAG*-GCT-GAA-GCT-**ATG-AAG-ACA-CTC-CAG-TTT-TT-C- 3′**

ناحیه بازسازی شده (مشخص شده با خط) ترادف اسید آمینه‌ای Leu-Glu-Lys-Arg*Glu-Ala-Glu-Ala-Met مربوط به آلفا فاکتور را تولید خواهد کرد که ناحیه جدا شدن پروتئین از سیگنال پپتید آلفا فاکتور را تأمین می‌کند و توسط سیستم KEX2 در محل (*) برش انجام می‌شود. محل برش آنزیم XhoI با سایه و ژن FSHB پررنگ نشان داده شده است.

در پرایمر مقابل

PICSR: 5'-CCC-TCT-AGA-GAA-TTC-TTA-**TTC-TTT-CAT-TTC-ACC-AAA-GG**

کدون ختم با خط، جایگاه برش آنزیمی EcoRI با سایه و انتهای ژن پررنگ نشان داده شده است.

امپلیفیکاسیون توسط مخلوط (نسبت Taq unit ۳۳/۷: Taq: Pfu (۰/۱۸۷ unit pfu جهت تصحیح خطا در حین پلیمریزاسیون در شیب دما و غلظت‌های مختلف یون Mg انجام شد. در واکنش نهایی (حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر) پلاسمید pTV- 2019 به عنوان الگو قرار گرفت و غلظت هر کدام از پرایمرها ۳۰۰ نانومولار، dNTP هر کدام از دئوکسی‌نوکلئوتیدها ۲۰۰ میکرومولار، آنزیم Taq:pfu DNA polymerase ۵ یونیت و غلظت یون Mg، ۱/۵ تا ۲/۵ میلی‌مولار بود و دمای Annealing در دماهای ۵۱/۵ تا ۶۳/۶ انجام شد.

شرایط PCR، شامل ۲۰ سیکل ۹۵ درجه ۱ دقیقه، ۵۰ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۲ دقیقه و یک سیکل نهایی شامل ۹۴ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه بود.

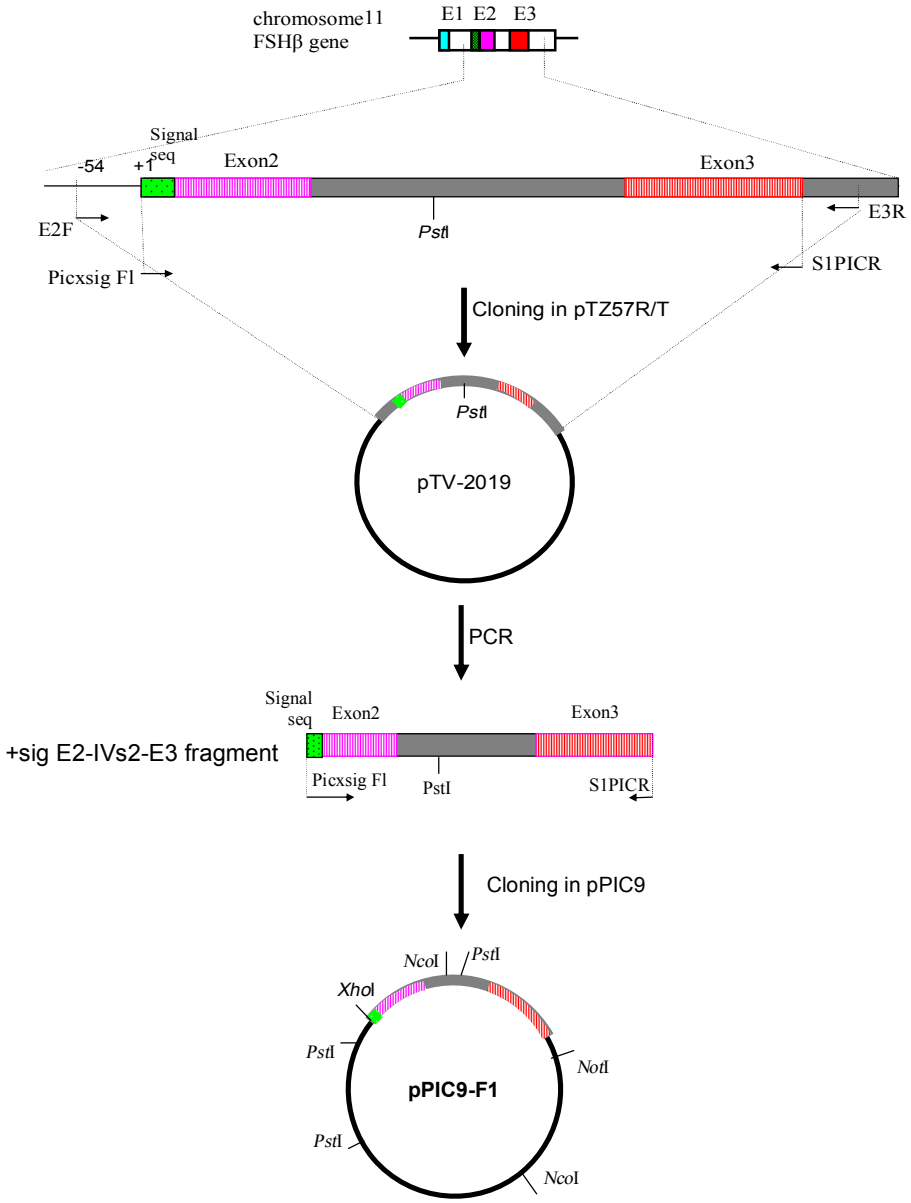
کلونینگ قطعه (+sig E2-IVS2-E3) F1 در pPIC9، کلونینگ قسمت اگزون۲-اینترون۲- اگزون ۳ ژن FSHβ شامل سیگنال سکانس ژن (+sig E2-IVS2-E3) در شاتل وکتور pPIC9 با استفاده از آنزیم‌های XhoI و EcoRI انجام شد محصول PCR پس خالص‌سازی، هم‌زمان با هر دو آنزیم XhoI و EcoRI هضم آنزیمی گردید و سپس با پلاسمید pPIC9 بریده شد و با دو آنزیم فوق Ligation mix حاوی لیگاز تهیه گردید و به سلول E-coli XL1 blue حساس شده با کلرید کلسیم ترانسفورم شد. پس از کلونینگ این قطعه در pPIC9 از طریق محل‌های آنزیمی XhoI و EcoRI، از بین کلون‌هایی که پلاسمید با اندازه صحیح داشتند دو کلون انتخاب

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

و پلاسمید تخلیص شده از آن‌ها پس از بررسی آنزیمی با آنزیم‌های PstI، NcoI و XhoI/NotI تحت عنوان pPIC9F1/1 و pPIC9F1/2 نام‌گذاری شدند. درنهایت PCR ژن در هر دو پلاسمید با پرایمرهای AOX1 طبق توصیه شرکت سازنده انجام شد [۵].

نتایج

جداسازی و کلونینگ ژن FSHβ طی دو مرحله انجام شد که مراحل PCR و کلونینگ به‌طور کامل در شکل شماتیک (شکل ۱) نشان داده شده است.



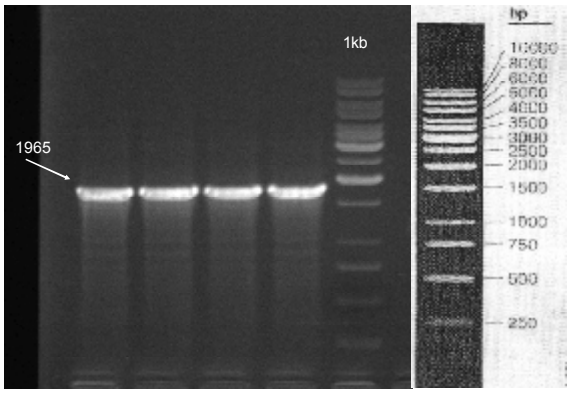
شکل ۱. شماتیک مراحل کلونینگ ژن FSH انسانی در شاتل وکتور pPIC9

کلونینگ اول.

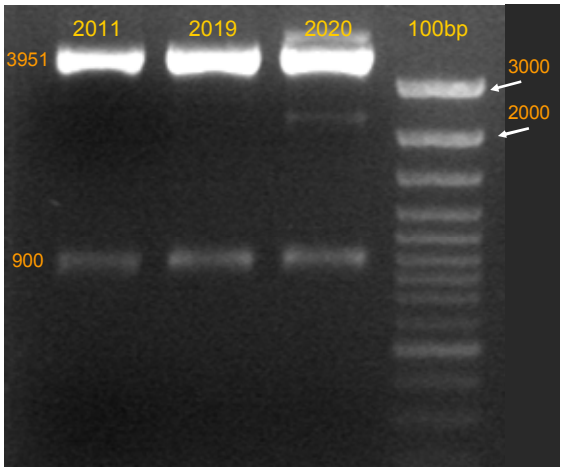
آمپلیفیکاسیون با پرایمرهای FSHE3R و FSHE2F مطابق انتظار منجر به تکثیر یک قطعه حدود ۲ کیلوبازی (۱۹۶۵بازی) از ژن FSHβ شامل ناحیه کدکننده (اگزون۲- اینترون ۲- اگزون۳) همراه با نواحی جانبی (Flanking regions) هر دو سمت ′۳ و ′۵ شد (شکل۲).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

پس از کلونینگ این ژن در pTRZ57R، از بین ترانسفورم‌هایی که پلاسمید اندازه صحیح را نشان می‌داد، سه کلون انتخاب و pTV-2011، pTV-2019 و TV-2020 نامیده شدند. از آن‌جا که PstI دارای یك جایگاه بر روی ژن و یکی بر روی پلاسمید می‌باشد، هضم آنزیمی هر سه پلاسمید با این آنزیم قطعات مورد انتظار ۰/۹ kb و ۴~ kb تولید کرد که نشان دهنده یک‌سان بودن هر سه پلاسمید است (شکل۳).



شکل ۲. امپلیفیکاسیون ژن FSH با پرایمرهای E3R و E2F.
ستون‌های ۴-۱: واکنش PCR برای جداسازی ژن FSH به ترتیب در ۶۴/۴، ۶۵/۵، ۶۶/۵ و ۶۷/۴.
ستون ۵: مارکر 1kb ladder (فرمنتاس)

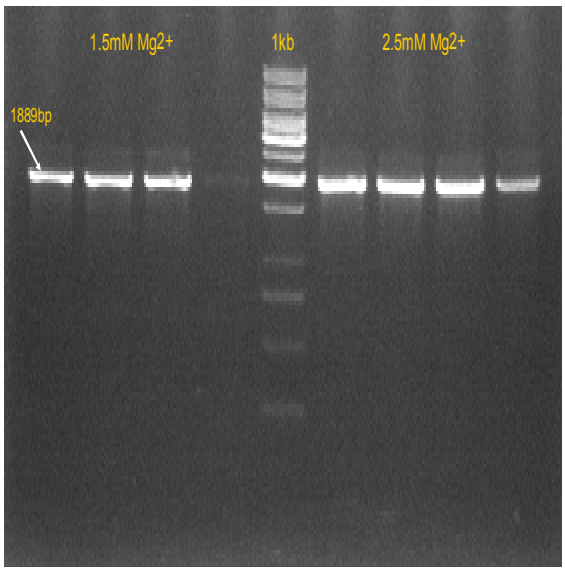


شکل ۳. Restriction analysis با استفاده از آنزیم PsfI.
ستون‌های ۱ تا ۳ مربوط به کنستراکت‌های انتخاب شده pTV-2011، pTV-2019 و pTV-2020 می‌باشد. هر سه پلاسمید ساختار صحیح را نشان می‌دهند.
ستون ۴: مارکر ۱۰۰ bp (فرمنتاس)

بر روی دو کلون pTV-2019 و pTV-2020 سکانسینگ از هر دو طرف با پرایمرهای استاندارد M13/pUC ترادف صحیح در هر دو ناحیه اگزون ۲، ۳ و نواحی مجاور آن‌ها را نشان داد. این نتایج پس از بلاست کردن هر دو ناحیه با ژن‌های ثبت شده در GenBank حاصل شد www.ncbi.nlm.nih.gov.

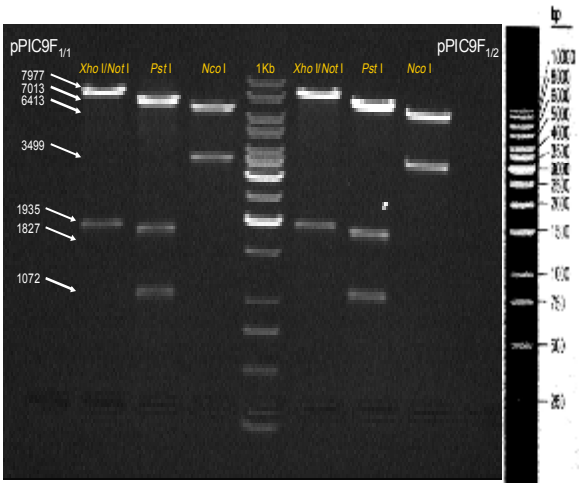
کلونینگ دوم.

آمپلیفیکاسیون با پرایمرهای PicxsigF1 و PICSR بر روی pTV-2019 مطابق انتظار منجر به تکثیر یك قطعه (۱۹۸۹بازی) از ژن FSHβ شامل ناحیه کدکننده (اگزون۲- اینترون۲- اگزون۳) همراه با سیگنال سکانس طبیعی ژن و حذف نواحی جانبی سمت ′۳ و ′۵ شد (شکل۴).



شکل ۴. تکثیر ژن FSH (+sig E2-IVS2-E3) با پرایمرهای PICsigF1 و PICSR.
ستون‌های ۱ تا ۴ با غلظت ۱/۵ میلی‌مول Mg و به ترتیب دماهای ۵۱/۵، ۵۵/۵، ۵۹/۸ و ۶۳/۶.
ستون ۵ شامل مارکر ۱kb
ستون‌های ۶ تا ۹ با غلظت ۲/۵ میلی مول Mg و به ترتیب در همان دماها.

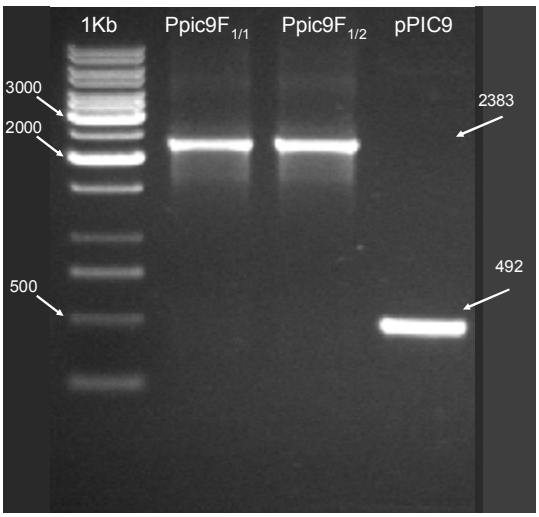
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۵. Restriction analysis با استفاده از آنزیم‌های NcoI، XhoI/NotI و PsfI.

ستون‌های ۱ تا ۳ هضم آنزیمی پلاسمید pPIC9-F1/1 و ستون‌های ۵ تا ۷ هضم آنزیمی پلاسمید pPIC9-F1/2 به ترتیب با آنزیم‌های XhoI/NotI، PsfI و NcoI را نشان می‌دهد.

ستون ۴ شامل مارکر ۱kb



شکل ۶. PCR با پرایمرهای AOX1.

ستون ۱ شامل مارکر ۱kb (فرمنتاس)

ستون ۲ و ۳، امپلیفیکاسیون بر روی پلاسمیدهای pPIC9F1/1 و pPIC9F1/2 را نشان می‌دهد.

ستون ۴ امپلیفیکاسیون بر روی پلاسمید pPIC9 را نشان می‌دهد.

کلونینگ این قطعه در pPIC9 از طریق محل‌های آنزیمی XhoI و EcoRI انجام و دو کلون انتخاب pPIC9F1/1 و pPIC9F1/2 نام‌گذاری گردیدند. نتایج بررسی آنزیمی با آنزیم‌های PstI، NcoI و XhoI/NotI نشان داد هر دو پلاسمید یک‌سان و دارای ساختار صحیح هستند. درنهایت امپلیفیکاسیون با پرایمرهای تجاری AOX1 به توصیه شرکت سازنده (Invitrogen) انجام شد که به باندهای مورد انتظار ۴۹۲ bp برای پلاسمید pPIC9 و باند ۲۳۸۳ bp برای کلون‌های pPIC9F1/1 و pPIC9F1/2 منجر شد (شکل ۶).

بحث و نتیجه‌گیری

هورمون‌های گلیکوپروتئینی هیپوفیز ملکول‌هایی متشکل از دو زنجیره آلفا و بتا هستند که به صورت غیرکووالان به هم متصل شده‌اند. به‌نظر می‌رسد که Pichia pastoris جهت اکسپرشن ژن‌های این گونه هورمون‌ها که از انسان یا حیوانات مختلف جدا شده و هم‌چنین ارزیابی فعالیت بیولوژیکی این هورمون‌ها سیستم مناسبی باشد [۱۲،۱۱،۱۰]. هم‌چنین Pichia pastoris به عنوان میزبان برای بررسی موتاسیون‌های روی ساختمان، فعالیت رسپتور–هورمون این هورمون‌ها استفاده شده است [۱۳].

تا کنون جداسازی و کلونینگ ژن FSHβ از انسان و حیوانات به روش‌های مختلف انجام شده است. اهداف مطالعات فوق علاوه برشناخت بیش‌تر ساختار و عملکرد این ژن، بررسی موتاسیون‌هایی در این ژن است که باعث اختلالات جنسی در انسان می‌شوند یا در فعالیت بیولوژیکی هورمون اثر می‌گذارند [۱۶،۱۵،۱۴]. دربرخی مطالعات نیز جداسازی این ژن با هدف تهیه کنستراکت‌های متفاوت برای تولید هورمون نوترکیب انجام شده است [۳،۱۸،۱۷]. در اکثر این مطالعات کنستراکت جهت انتقال و بیان ژن در سلول‌های پستانداران به‌ویژه Chinese hamster ovary (CHO) ساخته شده است. اما در مطالعه مشابهی Fidler و همکاران ژن FSHβ گوسفند را در شاتل وکتور pPIC9 جهت بیان در مخمر Pichia pastoris کلون کردند، اما آن‌ها ژن را از طریق تهیه cDNA بر روی mRNA به‌دست آمده از هیپوفیز گوسفند جدا و بدون سیگنال طبیعی ژن کلون کردند [۶].

ما در این مطالعه با هدف جداسازی ناحیه کد کننده ژن FSHβ با سیگنال سکانس طبیعی ژن از ژنوم انسان، این ژن را از ژنوم کامل یک زن با باروری طبیعی جدا کردیم و طی دو

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

مرحله کلونینگ در شاتل وکتور مخمر Pichia pastoris تحت پروموتر AOX1 و سیگنال سکانس آلفا فاکتور، کلون نمودیم. نتایج Restriction mapping و امپلیفیکاسیون با پرایمرهای AOX1 (Invitrogen) ساختار صحیح این پلاسمید را تأیید می‌کند. هم‌چنین سکانسینگ علاوه برتطابق کامل نواحی کدکننده این ژن با ژن‌های گزارش شده در GenBank نشان داد که نواحی بسیار مهم دهنده و پذیرنده Splicing در ابتدا و انتهای اینترون ۲ (به ترتیب TG و AG) نیزحفظ شده است. پرایمر PicxsigF1 ضمن بازسازی ناحیه برش پروتئینی، ژن FSHB را نیز با سیگنال سکانس شاتل وکتور به صورت فریم قرار می‌دهد. در این شرایط پس از فراوری و اصلاحات پروتئین نوترکیب توسط میزبان، سیستم‌های KEX2 و STE13 موجود در میزبان، به ترتیب ترادف اسیدآمینه‌ای Glu-Lys-Arg*-Glu-Ala-Glu-Ala در محلی که با * مشخص شده است و ترادف تکراری Glu-Ala را از فیوژن پروتئین جدا کرده و rFSHβ با سیگنال پپتید خود به صورت فریم بیان می‌شود. تأثیر سکانس سیگنال پپتید در بیان پروتئین‌های هترولوگ در Pichia pastoris نشان داده شده است [۱۹]. Samadder و همکارانش نیز قبلاً نشان داده بودند که FSHβ تحت سیگنال پپتید MFα چنان‌چه با سیگنال پپتید دیگری مثل .Cognate s.p جایگزین شود بیش از ۱۶ برابر به افزایش پروتئین منجر خواهد شد [۲۰]. در مطالعه Fidler نقش سیگنال پپتید طبیعی ژن در ترشح این پروتئین نامشخص می‌ماند و منحصراً تحت سیگنال MFα است و هم‌چنین نشان نمی‌دهد که آیا Pichia pastoris قادر به Splicing صحیح و حذف اینترون‌ها از ژن FSH می‌باشد. در حالی‌که در pPIC9-F1 ساخته شده در این مطالعه ژن FSH تحت دو سیگنال پپتید MFα موجود در وکتور و سیگنال پپتید طبیعی ژن خواهد بود که ممکن است کارایی بالاتری در ترشح این پروتئین به محیط داشته باشد. این مطالعه هم‌چنین روشن خواهد نمود که حذف صحیح و کامل اینترون‌ها توسط سیستم Splicing مخمر Pichia pastoris انجام پذیر خواهد بود یا خیر.

پلاسمید ساخته شده در این مطالعه قادر است ناحیه کدکننده ژن FSHβ (+sig E2-IVS2-E3) را در ژنوم مخمر تحت پروموتر AOX1 وارد کند که در این حالت فیوژن پروتئینی شامل سیگنال پپتید آلفا فاکتور- سیگنال پپتید FSH و-FSHβ بیان خواهد شد. به نظر می‌رسد این نخستین تلاش برای کلونینگ ژن انسانی FSHβ در سیستم مخمری باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان و شبکه بیوتکنولوژی کشور انجام شده است. محققین، از انستیتوپاستور ایران به خاطر همکاری علمی در این زمینه کمال تشکر را دارند.

منابع

[1] Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update, 1998; 4(3):260-83.

[2] Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJ, et al. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem, 1989; 9:4769-75.

[3] Sugahara T, Sato A, Kudo M, Ben-Menahem D, Pixley MR, Hsueh AJ, et al. Expression of biologically active fusion genes encoding the common alpha subunit and the follicle-stimulating hormone beta subunit. Role of a linker sequence. J Biol Chem, 1996; 271(18):10445-8.

[4] Aizen J, Kasuto H, Golan M, Zakay H, Levavi-Sivan B. Tilapia Follicle Stimulating Hormone (FSH): Immunochemistry, stimulation by GnRH, and effect of biologically active recombinant FSH on steroid secretion. Biol Reprod, 2006 Dec 27; on-line.

[5] Invitrogen. Pichia Expression Kit, Protein Expression, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris. Catalog no. K1710-01. 2005. http://www.invitrogen.com

[6] Fidler AE, Lin JS, Lun S, Chie WNg, Western A, Stent V, McNatty KP. Production of biologically active tethered ovine FSHβα by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. J Mol Endocrinol, 2003; 30:213–25.

[7] Jameson JL, Becker CB, Lindell CM, Habener JF. Human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. Mol Endocrinol, 1988; 2:806-15.

[8] Shoham Z, Insler V. Recombinant technique and gonadotropins production: new era in reproductive medicine Fertil Steril, 1996; 66(2):187-201.

[9] Saneyoshi T, Min KS, Jing Ma X, Nambo Y, Hiyama T, Tanaka S, et al. Equine follicle-stimulating hormone: molecular cloning of beta subunit and biological role of the asparagine-linked oligosaccharide at asparagine(56) of alpha subunit. Biol Reprod, 2001; 65(6):1686-90.

[10] Gadkari R, Deshpande R, Dighe RR. Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, Pichia pastoris. Protein Expression and Purification, 2003; 32(2):175-84.

[11] Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H, Aida K. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese Eel Anguilla japonica using methylotropic yeast, Pichia pastoris, 2003; 134(3):244-54.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[12] Kasuto H, Levavi-Sivan B. Production of biologically active tethered tilapia LHbetaalpha by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Gen Comp Endocrinol, 2005; 140(3):222-32.

[13] Setlur SR, Dighe RR. Single chain human chorionic gonadotropin, hCGαβ: Effects of mutations in the α subunit on structure and bioactivity. Glycoconjugate J, 2007; 24(1):97-106.

[14] Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, et al. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. N Engl J Med, 1997; 337(9):607-11.

[15] Layman LC, Porto ALA, Xie J, Da Motta LACR, Da Motta LDC, Weiser W, et al. FSH-beta gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. J Clin Endocr Metab, 2002; 87:3702-7.

[16] Phillip M, Arbelle JE, Segev Y, Parvari R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. N Engl J Med, 1998; 338(24):1729-32.

[17] Kanda M, Jablonka-Shariff A, Sato A, Pixley MR, Bos E, Iro'oka T, et al. Genetic fusion of an a-subunit gene to the follicle-stimulating hormone and chorionic gonadotropin-b subunit genes: Production of a bifunctional protein. Mol Endocrinol, 1999; 11:1873-81.

[18] Recombinant Human FSH Product Development Group. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. Recombinant Human FSH Product Development Group. Hum Reprod Update, 1998; 4(6):862-81.

[19] Xiong AS, Peng RH, Li X, Fan HQ, Yao QH, Guo MJ, et al. Influence of signal peptide sequences on the expression of heterogeneous proteins in Pichia pastoris. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2003; 35(2):154-60.

[20] Samaddar M, Catterall JF, Dighe RR. Expression of biologically active beta subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Protein Expr Purif, 1997; 10(3):345-55.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]