ساخت وکتور بیانی pcDNA3.1-FSHβ به منظور انتقال ژن زیرواحد FSHβ به سلول لاین پستان‌داران

رضا نصر [1](M.Sc) ، محمدرضا اکبری عیدگاهی [1*](Ph.D) ، علی‌اکبر شعبانی [1](Ph.D)، آذر سادات رضاپور جوارشک [1](M.D)، احمدرضا بندگی [2](Ph.D)، سعید ولی‌زاده [1](Ph.D)

۱ – *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی*

۲ – *دانشگاه علوم ژزشکی سمنان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه بیوشیمی*

چکیده

سابقه و هدف: هورمون محرک فولیکولی (Follicle stimulating hormone, FSH)، یکی از هورمون‌های گلیکوپروتئینی هیپوفیز است که از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیرواحد بتا حاوی ۱۱۱ اسیدآمینه و یک سیگنال پپتید ۱۸ اسیدآمینه‌ای و مسئول فعالیت بیولوژیکی هورمون می‌باشد. هدف از این مطالعه ساخت وکتور بیانی pcDNA3.1-FSHβ به منظور انتقال ژن زیرواحد FSHβ به سلول لاین پستانداران بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا یک جفت پرایمر برای ساب‌کلونینگ زنجیره β از T.vector طراحی گردید تا علاوه بر داشتن نواحی ابتدا و انتهای ژن زنجیره β دارای محل اثر آنزیم‌های HindIII و EcoRI باشد. زنجیره بتای آمپلیفیه شده از ناحیه جای‌گاه دو آنزیم فوق در پلاسمید pcDNA3.1 کلون و پلاسمید نوترکیب به وسیله ترانسفورماسیون وارد سلول E.coli گردید. کلون‌های تشکیل‌شده به وسیله PCR مجدد بررسی و پلاسمید تعدادی از کلون‌های مثبت تخلیص گردید. صحت پلاسمیدهای خالص شده به دو روش هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید گردید.

یافته‌ها: آنالیز آنزیمی و تعیین توالی نشان داد که پلاسمید pcDNA3.1-F390β دارای ساختار پلاسمیدی و توالی ژنی صحیح است و تطابق کامل با ژن بتای هورمون FSH گزارش شده در GenBank دارد.

نتیجه‌گیری: این پلاسمید نوترکیب به لحاظ ساختاری صحیح و جهت انتقال ژن به سلول کشت پستان‌داران و ارزیابی بیان مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هورمون محرکه فولیکولی، زیر واحد بتا، کلونینگ، سلول لاین پستانداران

مقدمه

هورمون محرک فولیکولی (FSH) همراه با هورمون لوتئینی‌کننده (LH)، هورمون محرک تیروئید (TSH) و گنادوتروپین کوریونی (HCG) چهار عضو خانواده‌ی هورمون‌های گلیکوپروتئینی هستند که از بخش پیشین غده هیپوفیز ترشح می‌شوند. این هورمون‌ها دایمرهایی هستند که از دو زیرواحد α و β تشکیل شده و توسط پیوندهای غیر کووالان به‌هم اتصال یافته‌اند و ساختمان سه بعدی آن‌ها توسط پیوندهای دی‌سولفید داخلی حفظ شده است. زیرواحد α در هر ۴ عضو خانواده گلیکوپروتئین‌ها یک‌سان بوده و یک قطعه‌ی پیش‌ساز واحد، نسخه‌برداری ژن α را در جفت و هیپوفیز تنظیم می‌نماید [۳،۲،۱]. فعالیت اختصاصی این هورمون‌ها مربوط به زیرواحد بتا می‌باشد هر چند زیرواحد بتا به تنهایی فعّالیت بیولوژیک ندارد و برای شناسایی و اتصال به

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۵۴۱۸۷ نمابر: ۰۲۳۱-۳۳۵۴۱۸۷ Email: mrakbari201177@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۶

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

پروتئین گیرنده و فعّالیت بیولوژیک آن حضور هتروداِیمر α, β ضروری است [۵،۴]. کاربرد FSH عمدتاً در درمان نازایی و تحریک کنترل شده و القای تخمک‌گذاری می‌باشد.

از آن‌جا که هورمون FSH گلیکوزیله است و میزبان پروکاریوت، قادر به گلیکوزیلاسیون نمی‌باشد، می‌بایست ژن مذکور به یک سیستم یوکاریوت منتقل و بیان شود. انتقال یک ژن به داخل سلول پستانداران می‌تواند از طریق سازه ژنی پلاسمیدی انجام شود. پلاسمید تجاری مختلفی برای کلونینگ ژن‌های بیگانه به منظور انتقال به داخل سلول‌های یوکاریوت وجود دارد. بر این اساس در تلاش برای ساخت هورمون نوترکیب انسانی یا حیوانی FSH استراتژی‌های مختلفی از سوی محققین مختلف برای ساخت سازه ژنی جهت و انتقال به سلول لاین پستانداران استفاده شده است.

در حالی‌که تا سال ۱۹۹۶ زیرواحد بتای سه هورمون گلیکوپروتئینی هیپوفیز LH, TSH و hHCG کلون شده بود هنوز زیرواحد بتای هورمون FSH کلون نشده بود هر چند سکانس اسید امینه زیرواحد بتای هورمون FSH انسان، خوک، اسب و گوسفند مشخص شده بود. محققین این کمپانی از طریق ساخت نسخه‌برداری معکوس از mRNA جدا شده از هیپوفیز انسان و کلون کردن آن در در فاژ لامبدا gt ۱۰ یک کتاب‌خانه cDNA تهیه کردند سپس بر اساس مجموعه‌ای از پروب‌ها به cDNA این ژن دست یافتند. اما سکانس کامل این ژن زمانی مشخص گردید که با استفاده از مجموعه‌ای از پروب‌های cDNA به غربال‌گری یک کتاب‌خانه ژنومی اقدام نمودند محققین کمپانی ارگانون (هلند) نهایتاً از مبنای پلاسمید pBR322 استفاده کرده و سازه ژنی تحت عنوان pKMS.FSHagbg را ساختند که دارای ژن‌های آلفا و بتا تحت پروموترهای جداگانه ساخته است [۶].

ساخت سازه‌های ژنی دیگری از این ژن توسط سایر محققین نیز انجام شد. به عنوان مثال Howles و همکاران دو زنجیره α و β انسانی را به صورت دو سازه ژنی مجزا کلون و در سلول پستانداران قرار دادند که نهایتاً موفق به تولید FSH نوترکیب انسانی شدند [۵]. در حالی‌که Keene و همکاران یک سازه ژنی به‌صورت کاستی شامل زنجیره α و β ساخته و در قالب یک پلاسمید نوترکیب به سلول پستانداران منتقل و FSH نوترکیب انسانی ساختند [۱]. شرکت داروسازی سرونو (سوئیس) برای تولید این هورمون از دو سازه ژنی مجزا استفاده کرده است.

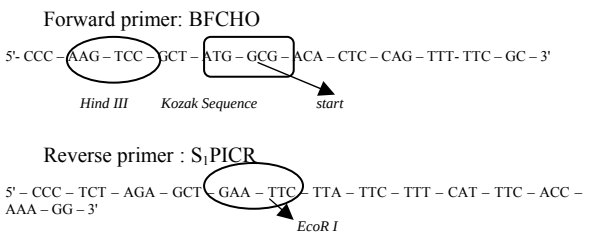
یکی از وکتورهایی که به‌طور تجاری در دسترس است pCDNA3.1 (Invitrogen) می‌باشد. pCDNA3.1 علاوه بر فاکتورهای ضروری برای دستورزی ژنتیکی در سلول باکتریال، واجد مولتیپل کلونینگ سایت جهت کلون کردن ژن‌ها تحت پروموتر CMV به منظور بیان پروتئین در سلول‌های پستانداران می‌باشد.

هدف از این مطالعه ساخت یک سازه ژنی برای انتقال و بیان ژن در سلول پستانداران با استفاده از pCDNA3.1 می‌باشد. بدین منظور cDNA ژن زنجیره بتای هورمون FSH در وکتور pcDNA3.1 کلون و سازه ژنی pcDNA3.1FSHβ به منظور انتقال ژن زیرواحد FSHβ به سلول لاین پستانداران نظیر CHO ساخته شد.

مواد و روش‌ها

در فاز اول این مطالعه cDNA زنجیره بتا در T.vector کلون و پلاسمید T.V-F475β ساخته شد. در این مطالعه طی مراحل زیر از پلاسمید نوترکیب فوق، cDNA ژن زنجیره بتا جدا و سازه ژنی جدیدی برای انتقال این ژن جهت بیان در سلول‌های پستانداران ساخته شد.

امپلیفیکاسیون: برای جداسازی ژن زنجیره بتا از وکتور، یک جفت پرایمر با توالی زیر طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. پرایمر طراحی شده برای جداسازی ژن زنجیره بتا از وکتور

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

PCR با استفاده از T.V-F475β به عنوان الگو، ۱۰ میکرولیتر بافر (فاقد $MgSO_4$)، (0.4mM each) dNTP، پرایمرBFCHO ، و S_1PICR، هر کدام ۰/۵ mM، ۱۰ واحد Pfu DNA polymerase و $MgSO_4$ (5.5 mM) در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد.

امپلیفیکاسیون با یک سیکل ابتدایی ۹۵ درجه ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل متوالی شامل ۹۵، ۵۸ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام ۴۵ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه و ۲۵ درجه ۱ دقیقه انجام شد. برای این منظور دماهای مختلفی مورد آزمایش قرار گرفت اما برای قطعه مورد نظر دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد بهترین دمای annealing بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده و توسط کیت K0513 شرکت فرمنتاس از ژل تخلیص گردید.

کلونینگ: در طراحی پرایمر سایت آنزیمی Hind III در ابتدای '۵ پرایمرفوروارد و EcoRI در پرایمر معکوس جهت کلونینگ در پلاسمید pcDNA3.1 قرار داده شد. با توجه به عدم وجود بافر مشترک برای این دو آنزیم، محصول PCR و پلاسمید pcDNA3.1 جداگانه ابتدا با یک آنزیم و پس از تخلیص توسط کیت K0513 (فرمنتاس) و حل کردن در ۲۰µl آب دیونیزه با آنزیم دوم برش زده شد. هر واکنش با حجم نهایی ۱۰۰ µl شامل از ۵ µl آنزیم، ۲۰ µl بافر، ۲۰ µl پلاسمید و ۵۵ µl آب به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت کسب اطمینان از عمل‌کرد هر آنزیم‌ها ۳ µl از محصول واکنش روی ژل آگارز الکتروفورز شد. به محیط برش پلاسمید آنزیم آلکالین فسفاتاز به مدت ۱ ساعت افزوده شد تا با فسفریله شدن انتهای '۵ پلاسمید، امکان اتصال مجدد دو سر مولکول‌هایی که به‌طور تصادفی فقط با یک آنزیم برش خورده‌اند از بین برود. یک Ligation Mixحاوی محصولات خالص شده پلاسمید و ژن بتا و آنزیم T_4 DNA Ligase تهیه و یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شد.

ترانسفورماسیون: با استفاده از محیط TSS در سلول 'Top10F انجام شد. پس از ۲۴ ساعت از کلونی حاصله ۱۴ کلونی انتخاب و به هم‌راه ۲ کلونی از کنترل ترانسفورماسیون، pcDNA3.1 /Top10F' کشت شطرنجی داده شد.

Colony PCR: از هر کلنی کشت شطرنجی یک سوسپانسیون باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب تهیه و پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن و سانتریفیوژ از سوپ‌رویی به عنوان الگو جهت Colony PCR استفاده شد. به طرز مشابهی از سوسپانسیون جوشیده E.coli/T.V-F457β و Top10F'/pcDNA3.1 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. PCR با همان شرایط قبلی ولی با Taq DNA polymerase انجام شد. از کلون‌هایی که Colony PCR آن‌ها مثبت بود تعداد ۳ کلونی در محیط LB broth حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و توسط کیت high pure plasmid isolation kit شرکت Roche تخلیص پلاسمید گردید.

آنالیز آنزیمی: آنالیز آنزیمی چهار پلاسمید نوترکیب تخلیص شده به‌وسیله آنزیم NcoI در بافر مخصوص آن انجام گرفت. محل اثر این آنزیم بر روی پلاسمید در دو سوی قطعه insertشده قرار دارد. پلاسمید $pcDNA3.1^+$ نیز به عنوان کنترل هضم آنزیمی گردید. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه، به مدت ۱ ساعت اینکوبه گردید و الکتروفورز تمام نمونه‌ها بر روی ژل ۱/۲٪ انجام شد. اندازه مورد انتظار در تمام کلونی‌ها دیده شد. پلاسمیدهای نوترکیب با عناوین-$pcDNA3.1^+$ F390β1, 2, 3نام‌گذاری گردیدند.

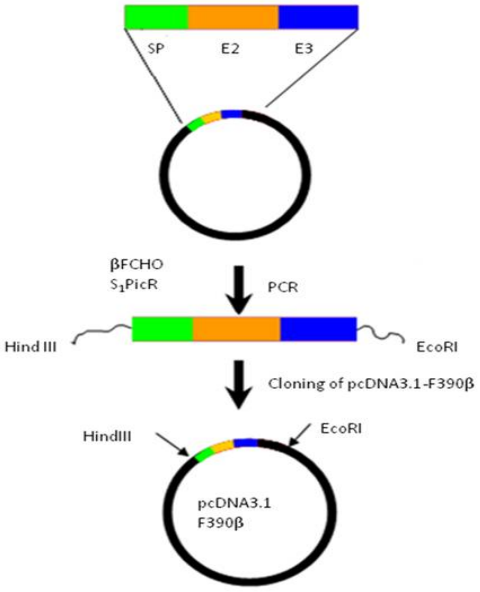
تعیین توالی: کلون‌های $pcDNA3.1^+$-F390β1,2 تعیین توالی گردید (شرکت MWG آلمان). نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه Blast سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast جهت تطابق با ژن‌های گزارش شده در Genbank بررسی شد.

نتایج

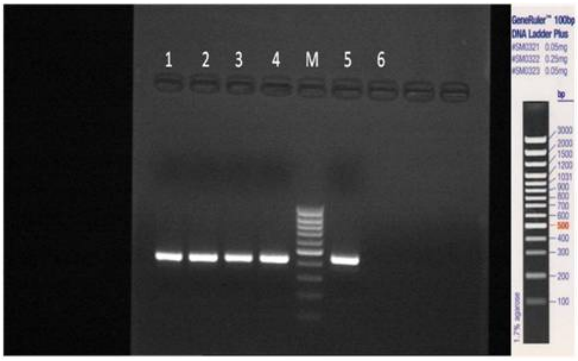
مراحل شماتیک کلونینگ در این مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است با استفاده از جفت پرایمر BFCHO و S_1Pic R و آنزیم pfu

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

در دمای annealing ۵۸-۵۵ درجه سانتی‌گراد در غلظت ثابت یون ++Mg به‌طور اختصاصی این ژن FSHb امپلیفیه شده است.

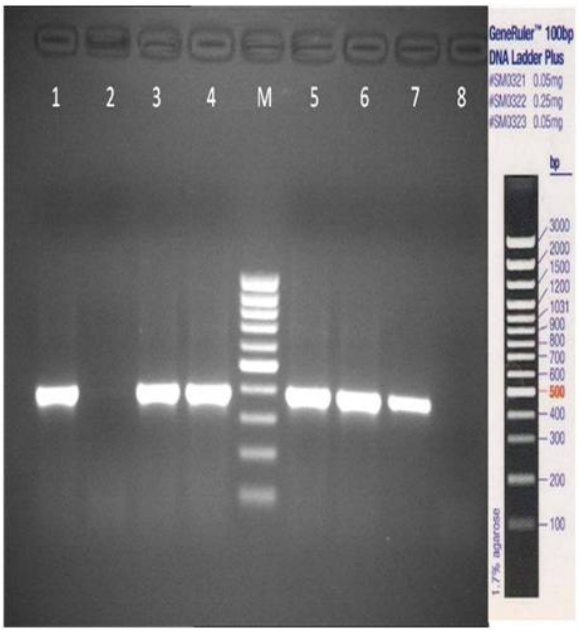


شکل ۲. شماتیک مراحل ساخت پلاسمید نوترکیب ساخته شده در این مطالعه

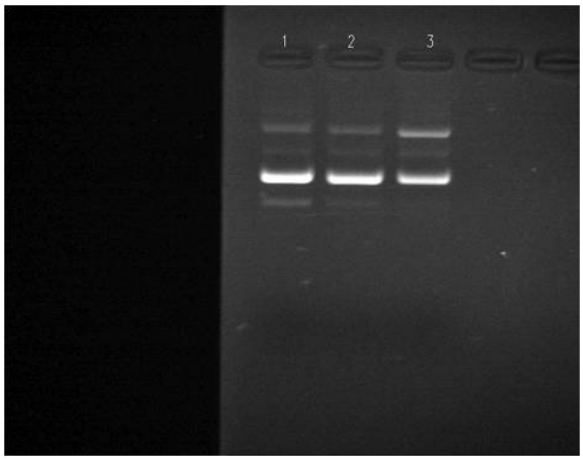


شکل ۳: PCR F1-390β with Pfu DNA Polymerase
ستون ۱ : در غلظت ۵/۵ مولار یون Mg و دمای ۵۵. ستون ۲: در غلظت ۵/۵ مولار یون Mg و دمای ۵۶. ستون ۳: در غلظت ۵/۵ مولار یون Mg و دمای۵۷. ستون ۴: در غلظت ۵/۵ مولار یون Mg و دمای۵۸. ستون M: مارکر 100bp (شرکت فرمنتاس). ستون ۵: کنترل مثبت واکنش PCR. ستون۶: کنترل منفی واکنش PCR

کلونینگ محصول PCR در پلاسمید pcDNA3.1 به تعداد زیادی ترانسفورمنت منجر گردید که از بین آن‌ها ۱۴ کلنی با روش Colony PCR بررسی گردید. اکثر کلون‌ها ژن مورد نظر را داشتند. الکتروفورز ژل آگارز ۶ کلون تحت عنوان Colony PCR در شکل ۴ نشان داده شده است. از میان آن دسته از کلونی‌های ۶-۱ F1-390β که Colony PCR آن‌ها مثبت بود، ۳ کلونی (B_1، B_2 و B_3) انتخاب گردید و پس از کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه توسط کیت High pure plasmid (Roche) تخلیص پلاسمید انجام شد الکتروفورز پلاسمیدهای تخلیص شده بر روی ژل ۰/۷٪ نشان داد که هر سه پلاسمید سایز یکسان و مورد انتظار را دارند (شکل ۵).



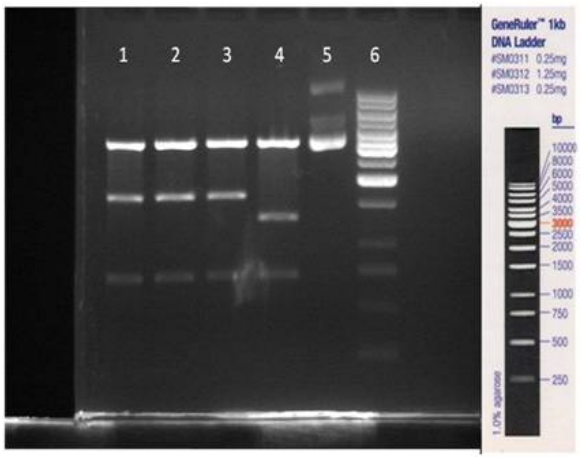
شکل۴ : واکنش Colony PCR .ستون‌های ۱ و۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶: F1 - 390β. ستون ۷: کنترل مثبت. ستون ۸: کنترل منفی. ستون M : مارکر bp۱۰۰ (شرکت فرمنتاس)



شکل ۵. تخلیص پلاسمید با کیت High pure plasmid isolation kit. ستون B1 : پلاسمید تخلیص شده B1. ستون B2 : پلاسمید تخلیص شده B2. ستون B3 : پلاسمید تخلیص شده B3

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

در آنالیز آنزیمی بر روی هر سه نمونه انتخاب شده با آنزیم NCOI اندازه صحیح و مورد انتظار قطعات به دست آمد (شکل ۶). دو پلاسمید تحت عناوین pcDNA3.1+-F390 β1 و pcDNA3.1+-F390β2 نام‌گذاری گردیده و تعیین توالی گردید. نتیجه تعیین توالی نشان‌دهنده تطابق کامل ژن مورد نظر با ژن‌های گزارش شده در GenBank می‌باشد. از آن‌جایی که تعیین توالی از روی پلاسمید قبل از ناحیه کلون شدن ژن است فریم بودن ژن با پلاسمید و صحت Kozak sequence نیز تایید گردید.



شکل ۶. اثر آنزیم NCOI بر روی پلاسمید pcDNA3.1-F390β. ستون۱: pcDNA3.1-F390 β 1. ستون۲: pcDNA3.1-F390 β 2. ستون۳: pcDNA3.1-F390 β 3. ستون۴: پلاسمید pcDNA3.1. ستون ۵: پلاسمید pcDNA3.1 (uncut). ستون ۶: مارکر kb۱ (شرکت فرمنتاس)

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه، کلونینگ cDNA ژن زنجیره بتای هورمون FSH در وکتور بیانی پستان‌داران به منظور ساخت سازه ژنی‌ای است تا بتواند جهت انتقال ژن زیرواحد FSHβ به سلول لاین پستان‌داران نظیر CHO مورد استفاده قرار گیرد.

از آن‌جا که هورمون FSH گلیکوزیله بوده و زیرواحد بتا این هورمون در اسید آمینه‌های آسپارژین Asn24 و Asn7 به‌طور اختصاصی گلیکوزیله می‌گردد سیستم پروکاریوتیک میزبان مناسبی برای تولید این هورمون نمی‌باشد. بدین منظور سازه‌های ژنی مناسبی برای انتقال ژن زیرواحدهای این هورمون به سلول‌های پستان‌داران باید ساخته شود [۵،۲].

پلاسمیدها DNA دو رشته‌ای حلقوی مستقل از کروموزوم هستند که به‌طور طبیعی در بسیاری از باکتری‌ها وجود دارند و حامل ژن‌هایی مانند برخی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. انتقال پلاسمیدها و ژن‌های موجود بر روی آن‌ها از یک باکتری به باکتری دیگر به وفور در طبیعت انجام می‌شود. ساختار پلاسمیدهای طبیعی، بعدها الگوی ساخت پلاسمیدهای تجاری شد که در مهندسی ژنتیک نقش اساسی در دست‌ورزی ژن‌ها، کلونینگ و انتقال ژن‌ها در سیستم باکتریایی دارند. استفاده از ناقلین پلاسمیدی یکی از روش‌های اساسی و پرکاربرد در انتقال ژن بیگانه به داخل یک سلول باکتریایی می‌باشد لیکن بر خلاف باکتری‌ها سلول‌های پستان‌داران فاقد هر گونه ناقل پلاسمیدی طبیعی می‌باشند. بر این اساس با الگوگیری از پلاسمیدهای باکتریایی، شاتل وکتورها یا پلاسمیدهای چندمیزبانه ساخته شده است که علاوه بر دارا بودن تمام عناصر ضروری سیستم باکتریال جهت همانندسازی و کلونینگ عناصر کلیدی برای انتقال ژن بیگانه به داخل سلول پستان‌داران و بیان پروتئین در این سلول‌ها نیز در ساختار آن‌ها گنجانده شده است [۶].

شاتل وکتور این امکان را می‌دهد که در مرحله مقدماتی کلیه عملیات دست‌ورزی ژن در سیستم باکتریایی اجرا شود (نظیر آن‌چه در این مطالعه انجام شد) تا سازه‌های ژنی نهایی جهت انتقال ژن بیگانه به میزبان یوکاریوتیک مانند سلول‌های لاین پستان‌داران ساخته شود. pCDNA3.1 (Invitrogen) شاتل وکتوری است که برای ساخت سازه ژنی نهایی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر اجرای ضروری برای دست‌ورزی ژنتیکی موجود در pCDNA3.1 در این مطالعه سکانس Kozak نیز به منظور افزایش بیان پروتئین به آن اضافه شد.

در مطالعات مشابهی که جهت کلونینگ ژن‌های FSH حیوانات مختلف به‌ویژه حیواناتی که ارزش اقتصادی برای انسان داشته یا نسل آن‌ها در معرض انقراض قرار دارد انجام شده است استراتژی‌های متفاوتی برای ساخت سازه ژنی با استفاده از انواع شاتل وکتورها جهت انتقال به سلول لاین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

پستان‌داران اتخاذ شده است. در سال ۲۰۱۰ ، Chen و همکاران در تایوان، کلونینگ و بررسی عملکرد پروموتور زیرواحد بتای FSH ماهی زیرا (Zebra fish) را انجام دادند [۱۰]. در ژاپن نیز Nagae و همکاران cDNA زیرواحد α و β گنادوتروپین II مارماهی ژاپنی را کلون کردند تا این سکانس نوکلئوتیدی را با ژن‌های دیگر انواع ماهی استخوانی مقایسه کنند [۹]. هم‌چنین در سال ۲۰۰۶، Shen و همکاران در تایوان cDNA زیرواحد بتا FSH مترشحه از هیپوفیز اردک را کلون نمودند و با زیرواحد بتای برخی دیگر پرندگان و حیوانات مقایسه کردند [۹]. محققان دیگر در سال ۲۰۱۱ در چین کلونینگ و آنالیز پلی‌پپتید بتا غده هیپوفیز گاوی را انجام دادند و انواع موتاسیون‌های آن را بررسی نمودند [۱۰].

ما در این مطالعه از پلاسمید ۵/۴ کیلوبازی (Invitrogen) pcDNA3.1 استفاده کردیم. این پلاسمید علاوه بر پروموتور CMV برای شروع و BGH pA برای ختم بیان ژن در سلول یوکاریوت دارای منشا همانندسازی برای تکثیر در باکتری می‌باشد. به علاوه دارای ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین و نئومایسین جهت انتخاب کلون صحیح به ترتیب در سلول پروکاریوت و یوکاریوت می‌باشد. در حد فاصل نواحی شروع و پایان ژن، ناحیه Multiple cloning site طراحی شده که حاوی جای‌گاه اثر آنزیم‌های برش‌دهنده مختلف می‌باشد و امکان درج شدن ژن را در پلاسمید به وسیله آنزیم‌های برش‌دهنده مختلف ایجاد می‌کند [۱۱]. پلاسمیدهای مجموعه pcDNA3.1 کارایی خوبی در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوت نشان داده‌اند.

در این مطالعه کلون‌سازی cDNA ژن زیرواحد بتا هورمون FSH انسانی در وکتور pcDNA3.1، در حد فاصل جای‌گاه اثر آنزیم‌های EcoRI و HindIII انجام شد. در دو سوی ژن، به کمک پرایمر محلی برای اثر این دو آنزیم و توالی اتصال به ریبوزوم (Kozak sequence) بازسازی شد. Kozak sequence توالی نوکلئوتیدی (GCTATGG) روی مولکول mRNA ایجاد می‌کند که نقش عمده‌ای در شروع بیان ژن در سلول‌های یوکاریوت دارد. این بخش از mRNA توسط ریبوزوم به عنوان نقطه شروع بیان پروتئین شناسایی می‌گردد [۱۲]. پس از کلون‌سازی در وکتور با استفاده از آنزیم NcoI که بر روی پلاسمید دو جای‌گاه برش و در داخل ژن یک جای‌گاه اثر دارد، آنالیز آنزیمی انجام گرفت که پس از انجام الکتروفورز همان‌گونه که انتظار می‌رفت سه قطعه ۱۳۵۱bp، 735bp، 3342bp به دست آمد. نتایج به دست آمده صحیح بودن ساختار این پلاسمید را تایید کرد.

تعیین توالی با استفاده از پرایمر AOX که در ناحیه ابتدایی پروموتور پلاسمید قرار دارد، انجام گرفت. به این وسیله نه تنها توالی ژن، که صحت ناحیه بازسازی شده، توالی Kozak و به علاوه Frame بودن ژن با پلاسمید را نیز تایید نمود. در نهایت توالی این سازه نشان داد نواحی کدکننده‌ی این ژن با ژن‌های گزارش شده در GenBank تطابق کامل دارد.

در مطالعات بعدی پلاسمید نوترکیب حاصل از این تحقیق را می‌توان برای تولید زیرواحد بتا به سلول‌های پستان‌داران منتقل نمود یا همراه با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن زنجیره آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی به صورت مجزا یا در قالب یک کاست βα جهت تولید هورمون کامل FSH به‌کار برد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم آموزشی و تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان و هم‌چنین شبکه بیوتکنولوژی کشور که با حمایت‌های بی‌دریغ خود ما را یاری نمودند کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

[1] Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJ, Boime I. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1989; 264: 4769-4775.

[2] Sugahara T, Sato A, Kudo M, Ben-Menahem D, Pixley MR, Hsueh AJ, Boime I. Expression of biologically active fusion genes encoding the common a subunit and the Follicle stimulating hormone subunit role of a linker sequence. J Biol Chem 1996; 271: 10445-10448.

[3] Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update 1998; 4: 260-283.

[4] Grigorova M. Worldwide variation of follicle-stimulating hormone beta-subunit gene and its potential association with reproductive success. master thesis. Tartu Univ 2006; 3-62.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

[5] Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal – F).v Hum Reprod Update 1996; 2: 172-191.

[6] Olijve W, de Boer W, Mulders JW, van Wezenbeek PM. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). Mol Hum Reprod 1996; 2: 371-382.

[7] Chen JY, Chiou MJ, Chen LK, Wu JL. Molecular cloning and functional analysis of the zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) beta promoter. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2010; 155: 155-163.

[8] Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone α- and gonadotropin IIβ-subunits of the Japanese eel, Anguilla japonica, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. J Mole Endocrinol 1996; 16: 171-181.

[9] Shen ST, Cheng YS, Shen TY, Yu JY. Molecular cloning of follicle-stimulating hormone (FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary. Gen Comp Endocrinol 2006; 148: 388-394.

[10] Dai LS, Zhao YM, Zhang GL, Zhao RF, Jiang H, Ma TH, et al. Molecular cloning and sequence analysis of follicle-stimulating hormone beta polypeptide precursor cDNA from the bovine pituitary gland. Genet Mol Res. 2011;10(3):1504-13.

[11] Shoham Z, Mannaerts B, Insler, V,Coelingh-Bennink H. Induction of follicular growth using recombinant human follicle stimulating hormone in two volunteer women with hypogonadotropic-hypogonadism. Fertil Steril 1993; 59: 738-742.

[12] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell 1986; 44: 283-292.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Construction of pcDNA3.1-FSHβ expression vector in order to transfer FSHβ gene into a mammalian cellline

Reza Nasr (MSc)[1], Mohammad Reza Akbarieidgahi (Ph.D)[*1], Ali Akbar Shaebani (Ph.D)[1], Azarsadat Rezapourjavareshk (MD)[1], Ahmad Reza Bandegi (Ph.D)[2], SaeidValizadeh (Ph.D)[1]

1 - Biotechnology Research Centre, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Research Centre of Physiology and Department of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 28 Feb 2012 Accepted: 24 Feb 2013)

Introduction: Follicle stimulating hormone (FSH) is one of the glycoprotein hormones of pituitary gland that consists of two subunits, alpha and beta. Beta subunit has 111 amino acids and a signal peptide, which is consisted of 18 amino acids and it is responsible for biological activity of the hormone. The aim of this study was to construct a pcDNA3.1FSHβ expression vector in order to transfer FSHβ gene into a mammalian cell line.

Materials and Methods: To sub-cloning of beta chain from T.vector, a pair of primer was designed that they had a site for EcoRI and HindIII in addition of the start and stop site of the beta chain gene. Amplified beta chain was cloned in pcDNA3.1 at the site of the mentioned enzymes anvd the recombinant plasmid was transformed into E.coli cell. The resulting colonies were checked by PCR re-amplification. The plasmid was purified from some positive colonies. The accuracy of purified plasmids were confirmed by both enzyme digestion and sequencing.

Results: Enzyme analysis and sequencing demonstrated that pcDNA3.1-F390β had both correct construction and gene sequence which had an exact correlation with reported FSHβ gene in GenBank.

Conclusion: This recombinant plasmid structurally is correct and is proper for transmitting into mammalian cell culture.

Keywords: Follicle stimulating hormone, β-subunit, Cloning, Mammalian cell line

* Corresponding author: Fax: +98 231 3354187; Tel: +98 231 3354187

mrakbari201177@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]