

## بهبود سازی ترآلایی و بیان پایدار فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی دروزوفیلا

جعفر وطن دوست<sup>۱\*</sup> و علیرضا زمردی پور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۸

### چکیده

با هدف دستیابی به کلونهای پایدار از رده سلولی S2 از دروزوفیلا بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی انسانی (S2-hFIX)، در این مطالعه تأثیر عوامل مختلف بر ترآلایی (Transfection) و بیان پروتئین نوترکیب در سامانه بیانی S2 قابل‌القاء، با استفاده از یون فلزی به عنوان القاء‌کننده، مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ترآلایی یک سازه بیان‌کننده EGFP تحت کنترل پروموتور متالوتینین (pMT-EGFP) به سلولهای S2 با روشهای لیپوفکشن و کلسیم فسفات، بررسی نتایج بیانی نشان داد که انتقال سازه به این سلولها با روش کلسیم فسفات در pH=۷/۰۶ و غلظت ۱۰ μg/ml کارآیی بالاتری دارد. الگوی الکتروفورزی محصولات RT-PCR فاکتور ۹ ترشح‌شده از سلولهای S2-hFIX نشان داد که پروموتور متالوتینین دروزوفیلیایی به دنبال القاء با سولفات مس از دقت تنظیمی بالایی برخوردار است و قادر به هدایت نسخه برداری در سطح بالا است. جداسازی کلون پایدار در دو محیط واجد میتومیسین (روش غیر مستقیم) و فاقد آن (روش مستقیم) مورد مقایسه قرار گرفت که در هر دو روش زمان تهیه کلون پایدار حدود ۳ هفته است که نسبت به زمان تهیه کلون پایدار در سلولهای پستانداران بسیار کوتاه تر است.

واژه‌های کلیدی: سلولهای S2 دروزوفیلیایی، فاکتور ۹ انعقادی، کلسیم فسفات، لیپوفکشن

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۷۱۴۰۰۳۳۲۹، پست الکترونیکی: j.vatan@hsu.ac.ir

### مقدمه

استفاده از رده‌های سلولی پستانداران برای تولید انبوه پروتئینهای نوترکیب عموماً با محدودیتهایی مواجه است. در واقع رده‌های سلولی پستانداران پایدار تنها بعد از یک دوره زمانی طولانی به دست می‌آیند و از طرفی بعد از ساخت رده سلولی نیاز است تا سلولها به طور مداوم تحت فشار انتخابی حفظ شوند و حتی ممکن است در کشت طولانی مدت ناپایدار شوند (۲). آلودگی احتمالی با ویروسها، یک محدودیت دیگر در استفاده از سامانه‌های بیانی پستانداران برای تولید انبوه پروتئین است (۲۱). از طرفی اغلب پروموتورهای القایی نیز در این سامانه‌ها، یک سطح فعالیت پایه مداوم را نشان می‌دهند.

استفاده از رده‌های سلولی پستانداران برای تولید انبوه پروتئینهای نوترکیب عموماً با محدودیتهایی مواجه است. در واقع رده‌های سلولی پستانداران پایدار تنها بعد از یک دوره زمانی طولانی به دست می‌آیند و از طرفی بعد از ساخت رده سلولی نیاز است تا سلولها به طور مداوم تحت فشار انتخابی حفظ شوند و حتی ممکن است در کشت طولانی مدت ناپایدار شوند (۲). آلودگی احتمالی با ویروسها، یک محدودیت دیگر در استفاده از سامانه‌های بیانی پستانداران برای تولید انبوه پروتئین است (۲۱). از طرفی اغلب پروموتورهای القایی نیز در این سامانه‌ها، یک سطح فعالیت پایه مداوم را نشان می‌دهند.

مطالعات قبلی در شرایط *in vivo* (۱۹)، مشخص گردید که سلولهای S2 نه تنها برخلاف سایر حشرات واجد فعالیت گاما کربوکسیلازی اند بلکه می‌توانند فاکتور ۹ را به عنوان سوپسترا شناسایی و کربوکسیله کنند. از آنجایی که مطالعات قبلی با هدف بررسی بیان و فعالیت فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی S2 بوده است بنابراین بیان موقت فاکتور ۹ و کربوکسیلاسیون آن مورد بررسی قرار گرفت. اما در این پژوهش با هدف بیان در سطح بالا، ابتدا شرایط بهینه تهیه کلونهای پایدار سلولهای S2 بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی انسانی (S2-hFIX) و همچنین تأثیر عوامل مختلف بر بیان پروتئین نوترکین در سامانه بیانی S2 قابل‌القاء با یون فلزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روشها

پلاسمید های pcDNA3 و pMT-V5-HisA از شرکت Invitrogene و پلاسمید pIRES2-EGFP از شرکت بن‌یاخته تهیه گردید. اولیگونوکلوئوتیدها به وسیله شرکت Bioneer سنتز شدند. محیط کشت دروزوفیلایی، پنی‌سیلین G و استرپتومايسين از شرکت سیگما خریداری گردید. محیط کشت RPMI-1640، سرم جنین گاوی (FBS)، L-glutamine، pyruvate sodium و اسید آمینه های غیرضروری از شرکت Gibco (BRL Life Technology (Karlsruhe) خریداری شد. همه آنزیمهای مورد استفاده و همچنین کیت‌های تخلیص PCR، تخلیص پلاسمید، تهیه RNA و سایر مواد شیمیایی از قبیل جنتیسین (G418) و مهارکننده های پروتئازها از شرکت Roche خریداری شد. کیت InsT/Aclone از شرکت فرمتاز، کیت الیازی مخصوص فاکتور ۹ و مواد مربوط به آزمون انعقاد یک مرحله ای از شرکت (Diagnostica Stago-France) تهیه گردید. سلولهای دروزوفیلایی اشنایدر ۲ (S2) از پروفیسور M. Matsuda در دانشگاه Kyorin (Tokyo, Japan) اهدا شد. این سلولها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بدون نیاز به CO2 و FBS رشد می‌کنند. همه

در این سامانه باعث آلودگی شدید پروتئین هدف با پروتئینهای سلولی از قبیل پروتئازها می‌شود. لذا زمان برداشت محصول در این سامانه خیلی حیاتی و در عین حال محدود است (۲۱). همچنین چون ژنوم باکلوویروس وارد ژنوم میزبان نمی‌شود، برای سنتز پروتئین نوترکین در سلول جدید نیاز به عفونتهای مکرر می‌باشد و از آنجایی که سلولهای میزبان سرانجام می‌میرند، ژن نامتجانس نمی‌تواند به صورت مداوم بیان شود (۲۱). برای مقابله با این مشکلات، در سالهای اخیر رده سلولی اشنایدر ۲ (S2) از دروزوفیلا به عنوان میزبان برای بیان پروتئینهای نامتجانس معرفی شده و تاکنون بیان موفق شماری از پروتئینها توسط این سیستم گزارش شده است (۲، ۴، ۹ و ۱۹). این سامانه بیانی یک سامانه غیرلیتیک و برپایه وکتورهای پلاسمیدی است (۱۶). بررسیها نشان داده اند که وکتورهای بیانی این نوع سامانه به صورت چند نسخه به داخل کروموزوم سلولهای S2 دروزوفیلا وارد می‌شوند (۵ و ۱۲) و این سلولها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ نسخه از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد تراآلایی دارند (۱۳). به این ترتیب برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسمید نیست (۱۳).

یکی از اولین گزارشها در به کارگیری این سامانه، بیان دوپامین بتا هیدروکسیلاز (DBH) به میزان ۱۶ mg/L (۱۴) و اینترلوکین ۵ انسانی به میزان ۲۲ mg/L در سلولهای S2 بوده است (۸). اما تاکنون بیان پروتئینهای وابسته به ویتامین K از جمله فاکتور ۹ انعقادی که برای فعالیت خود نیازمند کربوکسیلاسیون اسید آمینه های گلوتامیک در انتهای آمینوی خود هستند در این سامانه صورت نگرفته است. زیرا تصور می‌شد سلولهای حشرات از جمله سلولهای S2 دروزوفیلایی فاقد فعالیت گاما کربوکسیلازی هستند و یا آنزیم گاما کربوکسیلاز قابلیت شناسایی پروپیتید این نوع پروتئینها را ندارد (۱۵). به دنبال آزمایشات Bandyopadhyay در شرایط *in vitro* (۱) و

جهش در فاکتور ۹ کلون شده، این پلاسمید نو ترکیب با استفاده از یک جفت پرایمر عمومی T7 promoter و BGH-r تعیین توالی گردید. بررسی توالی نشان دهنده صحت کلونینگ و عدم وجود جهش در فاکتور ۹ می باشد.

**بهینه سازی شرایط ترآلایی:** جهت بهینه سازی شرایط ترآلایی، پلاسمید pMT-EGFP با دو روش کلسیم فسفات و لیپوفکشن به سلولهای S2 منتقل شد. بر این اساس سلولهای S2 با غلظتهای مختلف از فیوژن-۶ و یا با روش کلسیم فسفات در pH های مختلف از HEPES (۷/۰۶)، ۷/۰۸ و ۷/۱ (تراآلوده گردیدند. تعداد و درصد سلولهای زنده قبل و بعد از کشت تعیین گردید. برای شمارش سلول، یک حجم از سلولها با ۹ حجم رنگ متیل گرین رقیق گردید و برای تعیین درصد سلولهای زنده به ۹ حجم از سلولها یک حجم رنگ تریپان بلو اضافه شد. بلافاصله وضعیت آنها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای مرده در اثر نفوذ رنگ به داخل آنها به رنگ آبی درآمده ولی سلولهای زنده بی رنگ باقی می ماندند.

برای ترآلایی سلولهای S2 با فیوژن-۶، ۲ ساعت قبل از ترآلایی، سلولها در ۱ میلی لیتر از محیط بدون سرم و با تراکم سلولی  $10^6 \times 4$  پاساژ داده شدند. سپس ترآلایی مطابق روش ذیل انجام شد. در یک ویال ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون سرم و لیپوفکتامین و در ویال دیگر ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون سرم و DNA را ریخته، سپس با هم مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه تیمار شد. محلول فیوژن-۶ و DNA مورد نظر با نسبتهای ۳:۱، ۳:۲ و ۶:۱ اضافه شدند. به مخلوط فوق، ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون سرم اضافه شد و مخلوط حاصل قطره قطره به ظرف کشت سلولی اضافه گردید. ۱۲-۱۶ ساعت پس از ترآلایی محیط سلولها با محیط تازه و گرم تعویض شد.

آزمایشات در دو یا سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگینها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

**کشت سلولهای S2:** برای کشت سلولهای S2 به ازای هر میلی لیتر از محیط کشت، ۱-۲ میلیون سلول اضافه گردید و بسته به حجم ظرف کشت به آنها محیط کشت اختصاصی Ex-Cell 400 همراه با ۱۰FBS درصد یا بدون آن افزوده شد. سلولها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و بدون CO2 قرار داده شد. هر چهار الی پنج روز محیط سلولها تعویض گردید تا سلولها به اندازه کافی رشد کنند. در این موقع سلولها در ظروف جدید پاساژ داده می شد.

**ساخت سازه های بیانی:** وکتور pIRES2-EGFP حاوی cDNA-EGFP با آنزیمهای KpnI و NotI برش داده شد و پس از خالص سازی، برای کلون سازی در پلاسمید pMT-V5-His A که با آنزیمهای KpnI و NotI بریده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. عمل اتصال بین cDNA و پلاسمید pMT-V5-His A منجر به ساخت پلاسمید-pMT-EGFP گردید. برای دستیابی به فاکتور ۹ با انتهای 5' Kpn I و Xho I 3'، cDNA فاکتور ۹ با پرایمرهای hFIX-KpnI

5'GGGGTAC/CGCCACCATGCAGCGCGTGAAC  
hFIX-XhoI (3') و

5'CCGC/TCGAGATCCATCTTTCATTAAGTGAG  
(3' C3) تکثیر و در T- وکتور کلون گردید. بعد از برش پلاسمید حاصله (T.V-hFIX) با آنزیمهای XhoI و KpnI، خروج cDNA فاکتور ۹، تخلیص از ژل و همچنین برش پلاسمید pMT-V5-His A با آنزیمهای XhoI و KpnI، عمل اتصال بین cDNA و پلاسمید pMT-V5-His A صورت گرفت که منجر به ساخت پلاسمید pMT-hFIX گردید. همچنین برای تأیید کلونینگ و بررسی عدم وجود

دارد ترآلایی شد. به منظور انتخاب سلولهای نوترکیب، ۴۸ ساعت پس از ترآلایی، هایگرومایسین با غلظت  $\mu\text{g/ml}$  ۳۰۰ به محیط کشت سلولها افزوده شد. ۷-۱۰ روز پس از تیمار با هایگرومایسین در سلولهای ترآلوده شده، کلنیهای مقاوم از طریق دو روش مستقیم (استفاده از پلیت ۹۶ خانه) و غیرمستقیم (استفاده از میتومیسین) جدا شدند.

جداسازی کلون‌های پایدار به روش مستقیم و در پلیتهای ۹۶ خانه صورت گرفت بدین صورت که بعد از ترآلایی سلولها با پلاسمید نوترکیب در روز اول و تعویض محیط در روز دوم، سلولهای ترآلوده شده در پلیتهای ۹۶ خانه در معرض محیط انتخابی واجد هایگرومایسین قرار گرفتند. لذا در روز سوم، سلولهای ترآلوده شده به گونه ای در محیط انتخابی واجد هایگرومایسین رقیق می شود که در هر  $100 \times 10^4$  یا  $2 \times 10^4$  میکرولیتر تنها به طور میانگین  $5 \times 10^4$  سلول وجود داشته باشد. به هر خانه از پلیتهای ۹۶ تایی،  $100$  میکرولیتر از محیط حاوی سلولهای فوق اضافه کرده و ۲ روز بعد از انتقال سلولها نیز،  $100$  میکرولیتر محیط انتخابی دیگر به هر خانه اضافه گردید. بعد از ۲ هفته از کشت سلولها در محیط واجد هایگرومایسین، سلولهای پایدار از نظر بیان و فعالیت فاکتور ۹ بررسی و به پلیت ۴۸ خانه منتقل شدند. بعد از رشد و بررسی مجدد از نظر بیان، سلولهای مقاوم به پلیت ۱۲ و در نهایت ۶ خانه منتقل شدند.

در روش غیر مستقیم، حدود  $150$  میلیون سلول عادی ترآلوده نشده به مدت ۴ ساعت در مجاورت با میتومیسین قرار داده می شوند. میتومیسین به طور کوالانتهی به DNA متصل می شود و از تکثیر آن جلوگیری می کند هر چند که سلولها زنده می مانند. پس از سانتریفیوژ و شستشو با PBS (۳ بار)، این سلولها با تراکم  $3 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  در پلیت های ۲۴ خانه منتقل شدند. از طرفی سلولهای ترآلوده شده مخلوط سلولی پایدار به گونه ای رقیق می شود که در هر  $100$  میکرولیتر به طور میانگین تنها یک

در روش کلسیم فسفات، ۲۴ ساعت قبل از ترآلایی ۳ میلی لیتر از سلولها را با تراکم سلولی  $10^6$  سلول برای هر میلی لیتر به ظرف کشت ۶ خانه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد. قبل از ترآلایی،  $300$  میکرولیتر از مخلوط ترآلایی شامل  $36$  میکرولیتر از  $\text{CaCl}_2$  دو مولار،  $10-5$  میکروگرم از DNA و آب تزریقی در یک لوله استریل فراهم شد. سپس یک حجم از این مخلوط را با یک حجم از  $2 \times \text{HEPES}$  قطره قطره خوب مخلوط و هوا دهی و تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. به ازای هر ۱ میلی لیتر از محیط کشت  $0.2$  میلی لیتر از مخلوط ترآلایی به محیط کشت سلولی اضافه شد و به آرامی حرکت داده تا خوب مخلوط شود ( این مرحله باید به سرعت انجام گیرد). پس از انجام ترآلایی سلولها به مدت ۱۶-۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه و پس از آن محیط سلولها با محیط تازه و گرم تعویض شد.

#### پروموتور متالوتیونین و ارزیابی نسخه برداری فاکتور ۹:

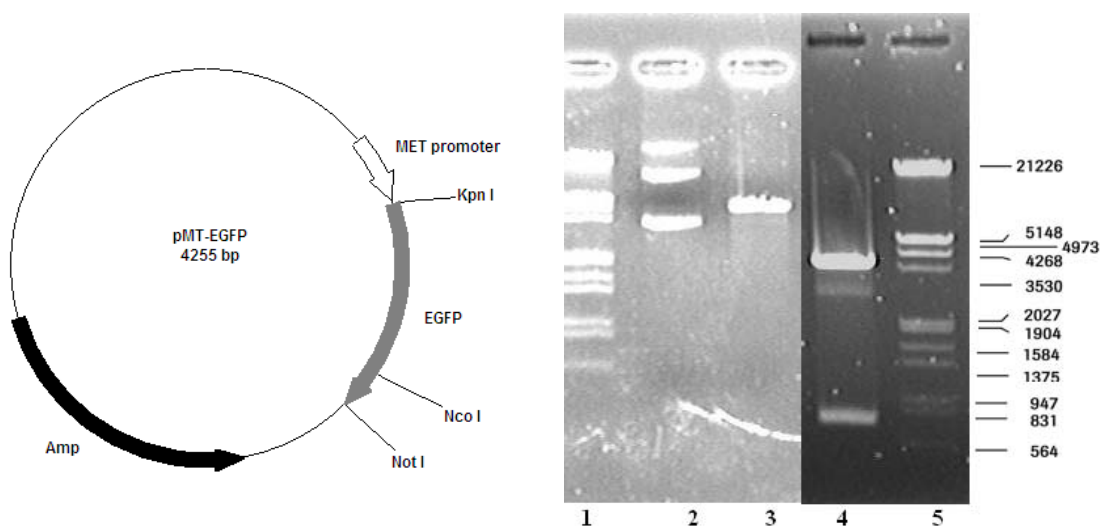
برای ارزیابی عملکرد پروموتور متالوتیونین در بیان cDNA فاکتور ۹ در سلولهای S2 ترانسفکت شده، استخراج RNA و آزمایش RT-PCR انجام گرفت. به این منظور RNA تام از سلولهای نوترکیب القاء شده و القاء نشده استخراج شد. به منظور حذف DNA که احتمالاً همراه با RNA از سلولها استخراج شده است، قبل از ساخت cDNA، RNAهای تهیه شده تحت اثر آنزیم DNase فاقد RNase قرار گرفتند. cDNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس M-Mulv با استفاده از RNA تیمار شده با DNAase عاری از RNAase به عنوان الگو ساخته شد. برای تهیه cDNA از پرایمرهای هگزامری و برای تکثیر آن توسط PCR، از پرایمرهای hFIX-KpnI و hFIX-XhoI استفاده گردید.

**تهیه کلون های پایدار:** برای دستیابی به رده سلولی پایدار از سلولهای S2، پلاسمید مورد نظر همراه با پلاسمید انتخابی pCoHygro که ژن مقاومت به هایگرومایسین را

حضور پراکسید اوره انجام شد. بعد از اینکه واکنشها با اضافه کردن هیدروکلریک اسید متوقف شد رنگ به دست آمده در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. OD مشاهده شده نسبت مستقیم با غلظت فاکتور ۹ انسانی دارد. از آزمایش ( Activated partial thromboplastine ) APTT (time) برای بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ در محیط کشت استفاده گردید (۶ و ۷). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت انعقادی فاکتور ۹ از پلاسمایی استفاده می‌شود که واجد تمامی فاکتورهای لازم در این مسیر انعقادی بوده ولی فاقد فاکتور ۹ باشد. بنابراین زمان انعقاد این پلازما در مقایسه با استاندارد طولانی بوده، ولی در صورت اضافه کردن نمونه مورد آزمایش به این پلازما و وجود فاکتور ۹ در این نمونه مدت این زمان کاهش می‌یابد. در این روش از پلاسمای سیتراته افراد نرمال (حدود ۳۰ نفر) که با یکدیگر مخلوط گردیده بود به عنوان استاندارد استفاده گردید. فعالیت این فاکتور در پلاسمای این افراد که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده باشد (۱۰۰ mU/ml (۱۰۰ درصد) در نظر گرفته می‌شود.

سلول وجود داشته باشد. لذا این مقدار به سلولهای عادی ترآلوده نشده و تیمار شده با میتومیسین در پلیت ۲۴ خانه اضافه می‌گردد. بعد از ۲ هفته از کشت سلولها در محیط واجد هایگرومایسین، سلولهای پایدار که از یک کلون رشد کرده اند از نظر بیان و فعالیت فاکتور ۹ بررسی و به پلیت ۱۲ خانه منتقل شدند.

**ارزیابی بیان و فعالیت فاکتور ۹ نوترکیب:** به منظور بررسی وجود فاکتور ۹ در محیط کشت سلولهای ترآلوده شده، محیط کشت سلولها در روزهای اول، دوم و سوم پس از افزودن ویتامین K<sub>1</sub> (۵µg/ml) (۶ و ۷) و القاء با سولفات مس (۵۰۰µg/ml)، جمع آوری شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردید. آنتی ژن فاکتور ۹ نوترکیب انسانی بیان شده در محیط کشت سلولهای ترآلوده شده با روش ساندریجی الیزا بر روی میکروپلیت‌ها که با آنتی بادیهای پلی کلونال ضد فاکتور ۹ که در کیت الیزا مهیا شده بود آشکار شد. آشکار سازی کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز بر روی سوبسترا (OPD) در



شکل ۱- نقشه پلاسمید pMT-EGFP و الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم برشی. ردیف ۱ و ۵: مارکر III، ردیف ۲: پلاسمید نوترکیب pMT-EGFP، ردیف ۳: برش پلاسمید نوترکیب pMT-EGFP با آنزیم NcoI و ردیف ۴: برش پلاسمید نوترکیب pMT-EGFP با آنزیمهای KpnI و NotI.

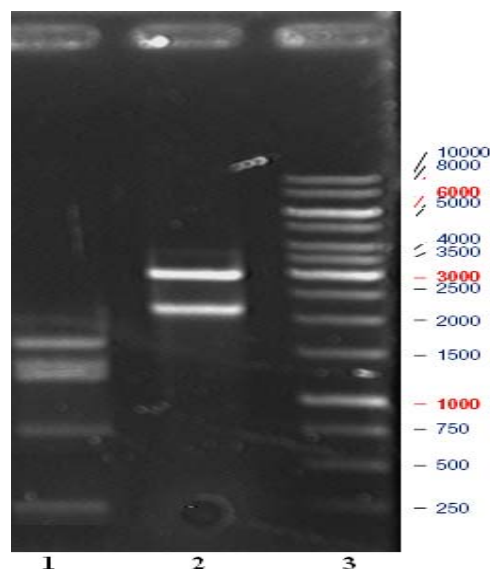
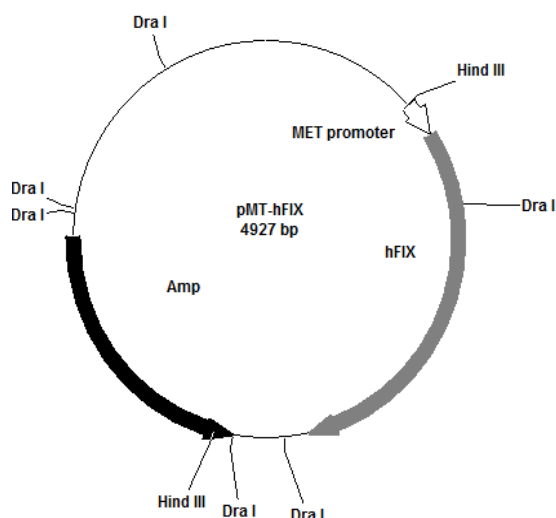
ایجاد قطعات ۳۵۳۸ و ۷۱۷ جفت باز نماید که به ترتیب معادل با وکتور pMT-V5-His A و EGFP cDNA می باشد. از طرفی هضم با آنزیم NcoI، حالت خطی شده وکتور نوترکیب مورد انتظار بود و نتایج الکتروفورز محصولات حاکی از آن بود که پلاسمید مورد نظر ساخته شده است (شکل ۱).

در خصوص پلاسمید بیانی pMT-hFIX نیز انتظار می رفت که اندازه پلاسمید نوترکیب، ۴۹۲۷ جفت بازی باشد که این موضوع بعد از برش پلاسمید نوترکیب با آنزیمهای KpnI و XhoI تأیید شد. همچنین صحت کلون شدن قطعه مذکور پس از برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیمهای DraI و Hind III نیز تأیید شد. طبق انتظار برش با DraI قطعات ۱۹، ۲۳۰، ۶۹۲، ۱۱۷۷، ۱۱۸۳ و ۱۵۱۷ جفت بازی حاصل و پیرو برش با Hind III، قطعات ۱۹۸۴ و ۲۸۸۷ جفت بازی حاصل شد (شکل ۲).

برای تعیین فعالیت بیولوژیک فاکتور ۹ بیان شده توسط سلولهای ترآلوده شده ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت جمع‌آوری شده از هر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای فاقد فاکتور ۹ و ۱۰۰ میکرولیتر از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید ۲۵ mM از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری گردید. فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین شد. اندازه‌گیری زمان انعقاد به صورت چشمی انجام شد.

## نتایج

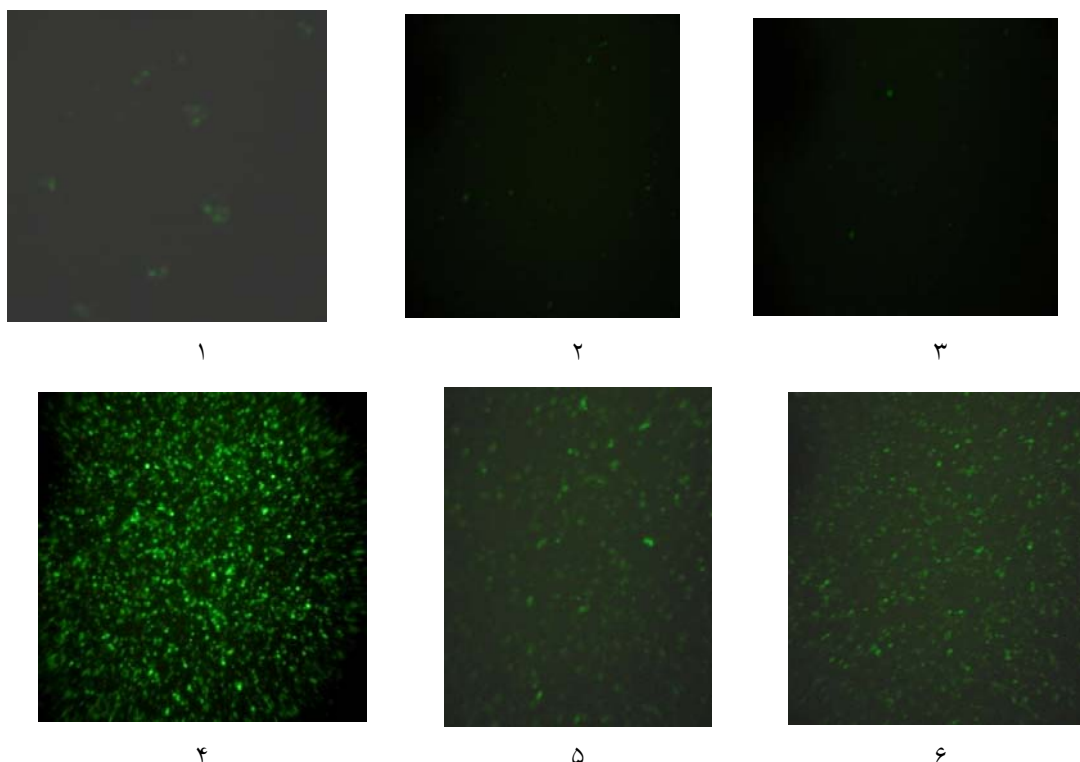
ساخت سازه‌های بیانی: برای تأیید ساخت پلاسمید pMT-EGFP، برش همزمان آن با آنزیمهای KpnI و NotI انجام شد. انتظار می رفت در صورت کلون شدن cDNA-EGFP در پلاسمید pMT-V5-His A و هضم با این دو آنزیم،



شکل ۲- نقشه پلاسمید pMT-hFIX و الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم برشی. برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیمهای DraI (ردیف ۱) و Hind III (ردیف ۲). ردیف ۳ مارکر ۱ kb.

با فیوژن-۶ موفقیت‌آمیزتر است. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیان EGFP در سلولهای S2 با روش کلسیم فسفات و در pH=۷/۰۶ و با غلظت ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  از DNA کارایی بالاتری دارد.

**تراآلایی سلولهای S2 با پلاسمید pMT-EGFP :** یک روز پس از تراآلایی سلولهای S2 با دو روش کلسیم فسفات و لیپوفکشن، سلولها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردیدند. نتایج بیان EGFP نشان داد که واکنش تراآلایی سلولهای S2 به وسیله کلسیم فسفات در مقایسه

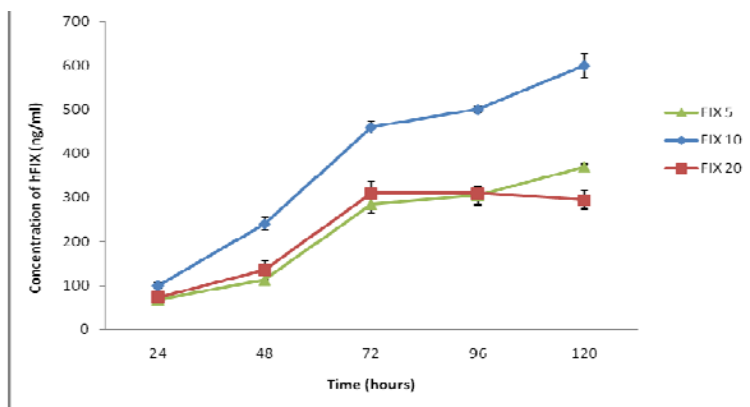


شکل ۳- تراآلایی سلولهای S2 با پلاسمید pMT-EGFP به روش لیپوفکشن و کلسیم فسفات. بیان EGFP در سلولهای S2 تراآلوده شده با روش لیپوفکشن با غلظتهای مختلف از فیوژن-۶ DNA (۱:۳، ۲:۳، ۳:۱ و ۴:۱) (بترتیب ردیف ۱، ۲ و ۳) و با روش کلسیم فسفات در pH های مختلف از HEPES (۷/۰۶، ۷/۰۸ و ۷/۱) (به ترتیب تصاویر ۴، ۵ و ۶).

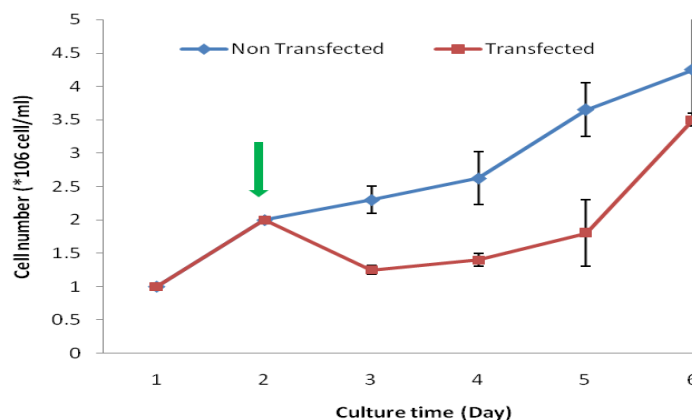
**رشد و بقا سلولهای تراآلوده :** رشد و بقای سلولهای S2 قبل و بعد از تراآلایی با روش کلسیم فسفات مورد بررسی قرار گرفت. رشد سلولها قبل از تراآلایی حالت عادی و روند افزایشی داشت و هر ۱۶-۲۴ ساعت دو برابر می‌شد (شکل ۵). این در حالی است که تراکم سلولی و دانسیته بالای آنها باعث مرگ سلولی نشده و بقای سلولها در حالت عادی بیشتر از ۹۵ درصد است (شکل ۶). بعد از تراآلایی با کلسیم فسفات در روز دوم، یک کاهش موقتی در رشد سلولها (شکل ۵) و همچنین بقا آنها (شکل ۶)

**تراآلایی سلولهای S2 با پلاسمید pMT-hFIX :** آنجایی که غلظت DNA بر کارایی تراآلایی مؤثر است (۱۰)، برای انتقال pMT-hFIX به سلولهای S2 از غلظتهای مختلف DNA استفاده گردید و بیان فاکتور ۹ در شرایط انتقالی ۲۴-۱۲۰ ساعت پس از تراآلایی به روش الیزا سنجیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که کارایی ترانسفکشن با افزایش غلظت DNA افزایش می‌یابد ولی در غلظتهای بالاتر از ۱۰  $\mu\text{g/ml}$ ، کارایی ترانسفکشن روند کاهشی دارد (شکل ۴).

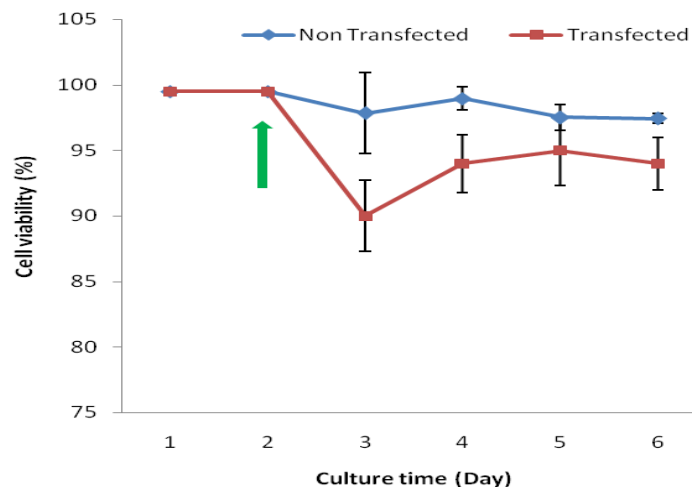
اتفاق افتاد و در طی روزهای بعد به حالت نرمال برگشت. شده به سلولها باشد. به نظر می رسد این کاهش بخاطر استرس و شوک وارد



شکل ۴- بررسی تأثیر غلظت DNA استفاده شده در ترآلایی سلولهای S2 با روش کلسیم فسفات بر بیان فاکتور ۹ بر اساس اندازه گیری آنتی ژن فاکتور ۹ بیان شده در محیط کشت ۱۲۰-۲۴ ساعت پس از ترآلایی در سه غلظت ۵ μg/ml (FIX 5)، ۱۰ μg/ml (FIX 10) و ۲۰ μg/ml (FIX 20) از DNA پلاسمیدی



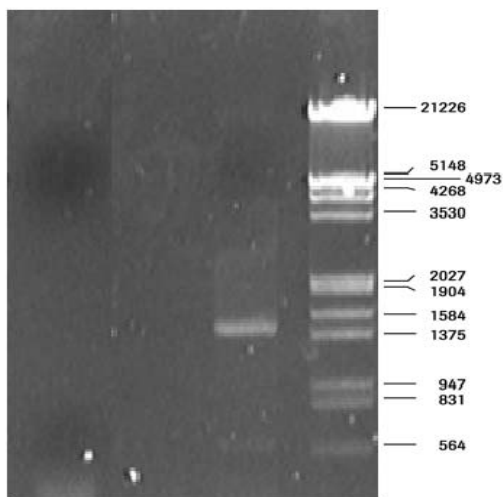
شکل ۵- نمودار رشد سلولهای S2 قبل و بعد از ترآلایی. فلش نشان دهنده ترآلایی در روز دوم است.



شکل ۶- نمودار بقای سلولهای S2 قبل و بعد از ترآلایی. فلش نشان دهنده ترآلایی در روز دوم است.



برای کشت در مقیاس بالا، دو کلون ۲ و ۱۲ به همراه دو کلون ۱ و ۲۱ به طور جداگانه به فلاسک‌های T25 انتقال داده شدند بعد از رسیدن به تراکم  $10^6 \times 6$  و با انجام آزمون‌های الیزا و انعقاد، کلون‌های ۱ و ۲۱ به عنوان بهترین کلون‌ها از نظر بیان بیشتر فاکتور ۹ فعال انتخاب گردیدند (جدول ۱).



شکل ۷- بررسی رونوشت فاکتور ۹ ایجاد شده توسط پرموتر متالوتیونین در سلول‌های S2 با روش RT-PCR. ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲: RT-PCR از سلول‌های S2 ترآلوده و القا نشده. ردیف ۳: RT-PCR از سلول‌های S2 ترآلوده و القا شده و ردیف ۴: مارکر III.

جدول ۱- انتخاب بهترین کلون برای کشت در مقیاس بالا با انجام آزمون‌های الیزا و انعقاد

# clone	hFIX (ng/ml)	Activity (mU/ml)
hFIX-2	۳۱۲	۱/۴۸
hFIX-12	۲۶۴	۰/۹۱
hFIX-1 (Mit)	۸۰۴	۱۰/۹
hFIX-21 (Mit)	۱۰۹۸	۱۶/۴

### بحث

وقتی تولید پروتئین‌های دارویی مورد هدف باشد، سلول‌های CHO بهترین کاندید برای بیان آنها می‌باشند چرا که تغییرات بعد از ترجمه را به طور صحیح تری انجام

بررسی عملکرد پرموتر متالوتیونین: یکی از مزایای ذکر شده برای سلول‌های S2 در بیان بهتر پروتئین‌های نوترکیب، عدم نشتی در حالت غیر القاء می‌باشد. برای اثبات این مسئله، استخراج RNA و انجام آزمایش-RT-PCR برای ارزیابی پرموتر متالوتیونین در بیان cDNA فاکتور ۹ در سلول‌های S2 ترانسفکت شده انجام گرفت. RT-PCR بر روی نمونه‌های به دست آمده از سلول‌های ترآلوده و القاء شده، منتج به تولید قطعه مورد انتظار گردید در حالی که در آزمایش RT-PCR از سلول‌های ترآلوده شده و القا نشده، باند مربوط به فاکتور ۹ به دست نیامد (شکل ۷). همچنین به عنوان کنترل از RNA سلول‌های نوترکیب که با DNAase مواجه شده بودند بدون انجام RT-PCR به عنوان الگو برای PCR استفاده گردید که هیچ محصولی مشاهده نشد (شکل ۷). لازم به ذکر است که برای بررسی نشتی پرموتر متالوتیونین، سلول‌های ترآلوده شده یکسان به دو قسمت تقسیم شدند و القاء بر روی یک قسمت صورت گرفت و نمونه دیگر القاء نگردید. این آزمایش تأیید کرد که پرموتر متالوتیونین به طور قوی تنظیم شده است به طوری که در شرایط القایی روشن و در شرایط غیر القایی خاموش می‌گردد.

تهیه کلون‌های پایدار S2-hFIX: کلنی‌های پایدار از طریق دو روش مستقیم (استفاده از پلیت ۹۶ خانه) و غیرمستقیم (استفاده از میتومیسین) جدا شدند. نتایج الیزا نشان داد که از میان ۲۴ کلون کشت داده شده در محیط میتومیسین، تنها ۲ کلون ۱ و ۲۱ از سلول‌های ترآلوده شده، فاکتور ۹ را بیان می‌کنند (جدول ۱). از طرفی بررسی بیان فاکتور ۹ از میان ۴۸ کلون رشد داده شده در روش مستقیم با الیزا صورت گرفت که در این میان ۳۶ کلون بیان فاکتور ۹ را نشان دادند. ۱۲ کلون که بالاترین بیان فاکتور ۹ را داشتند به پلیت ۴۸ خانه منتقل شدند که از این میان ۶ کلون با بالاترین بیان برای تست انعقاد انتخاب گردیدند. در این میان کلون‌های ۲ و ۱۲ که بیشترین فعالیت را داشتند انتخاب گردیدند (جدول ۱). برای انتخاب بهترین کلون

pH بافر با pH محیط کشت (pH=۶/۴) متفاوت است، pH بافر HEPES باید به دقت کنترل شود نتایج بررسی pH های متفاوت بافر تراریخت سازی نشان داد که بهترین pH برای تراریخت سازی، pH=۷/۰۶ است.

نتایج بررسی کارایی ترآلایی سلولهای S2 در ارتباط با غلظت DNA نشان داد که با افزایش غلظت DNA در روش کلسیم فسفات، کارایی ترآلایی افزایش می‌یابد ولی در غلظتهای بالاتر از ۱۰ µg/ml، کارایی ترآلایی روند کاهشی دارد. این نتایج به این دلیل است که مقدار بهینه DNA برای استفاده در ترآلایی به طور گسترده ای بستگی به نوع DNA، روش و مواد ترآلایی، نوع رده سلولی و تعداد سلولها دارد (۱۰، ۱۱ و ۲۰).

به دنبال ترآلایی سلولهای S2 براساس روش کلسیم فسفات، یک کاهش موقتی در رشد و بقای سلولی اتفاق می‌افتد که در روزهای بعد به حالت نرمال برمی‌گردد. به نظر می‌رسد که این کاهش به خاطر استرس و شوک وارد شده به سلولها باشد. همچنین از آنجایی که القاء یک روز بعد از ترآلایی صورت می‌گیرد تا سلولها به حالت عادی برگردند، نتایج حاضر نشان داد که سلولهای S2 دروزوفیلایی پس از القاء با سولفات مس رشد خوبی دارند و بقای آنها نیز حدود ۹۵ درصد است که تأیید کننده نتایج Bernard و همکارانش است (۲).

یکی از موارد ضروری در تهیه کلونهای پایدار و بیان در سطح بالا، کنترل زمان بیان پروتئین نوترکیب برای تهیه بیشترین مقدار محصول است. استفاده از پروموتورهای القایی با کنترل کردن زمان بیان، کمک زیادی به حفظ فرآیندهای طبیعی سلول می‌کنند زیرا بیان بالای پروتئینهای نوترکیب، انرژی سلول را به سمت تولید خودشان می‌کشند که باعث بار متابولیکی برای سلول میزبان می‌گردد (۱۸). هر چند که این بار متابولیکی برای سلول سمی نیست اما در فرآیندهای معمول سلول از قبیل رشد و تکثیر سلولی مؤثر است (۳ و ۱۸). استفاده از

می‌دهند. اما با توجه به مشکلات ذکر شده برای سلولهای پستانداران از جمله آهستگی رشد، پایین بودن بقای سلولی و ناپایداری آنها، سامانه های بیانی حشرات و به ویژه سلولهای دروزوفیلا می‌توانند جایگزین مناسب تری برای تولید در سطح بالا باشند. در مطالعات قبلی، اولین گزارش از بیان موقتی فاکتور ۹ فعال در سیستم حشره S2 ارائه گردید (۱۹). در ادامه مطالعات با هدف دستیابی به کلونهای پایدار S2 بیان کننده فاکتور ۹ انعقادی انسانی، ضمن بررسی تأثیر عوامل مختلف بر ترآلایی و بهینه سازی ترآلایی روشهای دستیابی به کلون پایدار S2 بیان کننده فاکتور ۹ نوترکیب پس از القاء با یون فلزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

انتخاب روش مناسب و مؤثر در ترآلایی سلولها نقش به سزایی در ایجاد کلنی های پایدار دارد. نتایج مطالعات حاضر نشان داد که ترآلودگی سلولهای دروزوفیلایی S2 با پلاسמיד نوترکیب براساس روش کلسیم فسفات نسبت به روش لیپوفکشن موثرتر است. این نتایج قابل انتظار است زیرا هرچند که ترآلایی سلولهای حشرات بخاطر سادگی معمولاً با روشهای مبتنی بر لیپوزوم انجام می‌شود اما تعداد کپی و کتور نوترکیب در سلولهای ترآلوده شده با این روشها کم است (۱۷). از طرفی نتایج ترآلایی یک نوع سلول دروزوفیلایی به نام سلولهای Kc167 با روش کلسیم فسفات نیز نشان داده است که این سلولها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ کپی از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد تراریخت سازی دارند (۱۳ و ۱۷). به این ترتیب در روش کلسیم فسفات نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسמיד برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا نیست (۱۳).

از طرفی در روش ترآلایی کلسیم فسفات، pH بافر ترآلایی نیز یک عامل اساسی است که بر حلالیت فسفات تأثیرگذار است و تغییرات کوچک pH می‌تواند بر کارایی ترآلایی تأثیرگذار باشد (۱۱ و ۲۰). همچنین از آنجایی که

جداسازی کلنی‌های مقاوم و دستیابی به تک کلون S2 از میان جمعیت نامتجانس، مشابه روش ذکر شده برای سلولهای پستانداران نمی‌باشد زیرا سلولهای S2 به صورت چسبنده نیستند باشند و رشد آنها به حالت سوسپانسیون است. از طرفی این سلولها در دانسیته کمتر از cell/ml  $10^6 \times 0.2$  رشد نمی‌کنند. لذا برای فایق آمدن به این مشکلات از دو روش جداسازی کلون پایدار به روش مستقیم یا غیرمستقیم استفاده شد. در هر دو روش زمان تهیه کلون پایدار حدود ۳ هفته می‌باشد که نسبت به زمان تهیه کلون پایدار در سلولهای پستانداران (حدود ۲ ماه) بسیار کوتاه‌تر است. همچنین می‌توان تک کلونهای پایدار از سلولهای غیرچسبنده S2 را با استفاده از روش میتومیسین تهیه کرد. لذا نتایج حاضر نشان می‌دهد که سلولهای S2 محدودیتهای موجود برای تهیه کلون پایدار و بیان بالا در سلولهای پستانداران را ندارند.

پروموتور متالوتیونین دروزوفیلایی در پلاسمیدهای نوترکیب که به طور بالایی تنظیم شده است، باعث می‌شود تا بیان پروتئین نوترکیب در طول دوره قبل از القاء صورت نگیرد و رشد بقای سلولی به طور معمول انجام شود. نتایج RT-PCR بعد از ترالایی سلولهای S2 با پلاسمید نوترکیب pMT-hFIX که در آن cDNA فاکتور ۹ به دنبال پروموتور متالوتیونین کلون شده است نشان می‌دهد که نسخه برداری از ترانس ژن فقط بعد از القاء صورت می‌گیرد. در حقیقت الگوی الکتروفورزی محصولات RT-PCR حضور mRNA فاکتور ۹ را در سلولهای ترالوده و القاء شده و عدم حضور آن در سلولهای ترالوده شده ولی القاء نشده نشان می‌دهد. بنابراین این آزمایش تأیید می‌کند که پروموتور متالوتیونین از دقت تنظیمی بالایی برخوردار است و نسخه برداری از cDNA فاکتور ۹ در سلولهای ترالوده فقط بعد از القاء می‌باشد.

## منابع

1. Bandyopadhyay, P.K., K., B.J. Stevenson, J.E. Rivier, B.M. Olivera, K.G. Golic, and Y.S. Rong, 2006, *Biochemical characterization of Drosophila gamma-glutamyl carboxylase and its role in fly development*. Insect Molecular Biology. 15(2): p. 147-156.
2. Bernard, A.R., T.A. Kost, L. Overton, C. Cavegn, J. Young, M. Bertrand, Z. Yahiacherif, C. Chabert, and A. Mills, 1994, *Recombinant protein expression in a drosophila cell-line - comparison with the baculovirus system*. Cytotechnology. 15(1-3): p. 139-144.
3. Bunch, T.A., Y. Grinblat, and L.S. Goldstein, 1988, *Characterization and use of the Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells*. Nucleic Acids Res. 16(3): p. 1043-61.
4. Chang KH, P.J., Chung HY, Hwang-Bo J, Lee HH, Kim do H, Soh Y, Chung IS., 2012, *Enhanced expression of recombinant human cyclooxygenase 1 from stably-transfected Drosophila melanogaster S2 cells by dimethyl sulfoxide is mediated by up-regulation of nitric oxide synthase and transcription factor Kr-h1*. Biotechnol Lett. 34(7): p. 1243-50.
5. Cherbas, L. and P. Cherbas, 1997, *"Parahomologous" gene targeting in Drosophila cells: An efficient, homology-dependent pathway of illegitimate recombination near a target site*. Genetics. 145(2): p. 349-358.
6. Haddad Mashadrizeh A.A., Z.A., Hosseini S. J, Sabouni. F, 2009, *In silico investigation and synchronous application of introns 1 and 2 of human beta-globin to increase the expression of human coagulation Factor IX* Iranian Journal of Biology. 21(4): p. 918.
7. Haddad Mashadrizeh A.A., Z.A., Sabouni F., and Hemmat J., 1387, *Analysis of the Non-Coding Region of the Human Factor VIII Gene in Comparison with Selected Regions of the Intron 1 of Human Factor IX* Iranian journal of Biology. 21(3): p. 549.
8. Johanson, K., E. Appelbaum, M. Doyle, P. Hensley, B. Zhao, S.S. Abdelmeguid, P. Young, R. Cook, S. Carr, R. Matico, D. Cusimano, E. Dul, M. Angelichio, I. Brooks, E. Winborne, P. McDonnell, T. Morton, D. Bennett, T. Sokoloski, D. McNulty, M. Rosenberg, and I. Chaiken, 1995, *Binding interactions of human interleukin-5 with its receptor-alpha subunit - large-scale production, structural, and functional, studies of drosophila-expressed recombinant proteins*. Journal of Biological Chemistry. 270(16): p. 9459-9471.

9. Johansson DX, K.T., Andersson O., 2012, *Production of recombinant antibodies in Drosophila melanogaster S2 cells*. *Methods Mol Biol*. 907: p. 359-70.
10. Jong Hwa Park, H.Y.K., Kyu Hyung Han, In Sik Chung, 1999, *Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in Drosophila melanogaster S2 cells*. *Enzyme and Microbial Technology* 25 p. 558 - 563.
11. Jordan M. and F. Wurm, 2004, *Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate*. *Methods* 33 p. 136-143.
12. Jorge, S.A.C., A.S. Santos, A. Spina, and C.A. Pereira, 2008, *Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells*. *Cytotechnology*. 57(1): p. 51-59.
13. Kim, K.R., Y.K. Kim, and H.J. Cha, 2008, *Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for Drosophila S2 cell culture*. *Journal of Biotechnology*. 133(1): p. 116-122.
14. Li, B., S. Tsing, A.H. Kosaka, B. Nguyen, E.G. Osen, C. Bach, H. Chan, and J. Barnett, 1996, *Expression of human dopamine beta-hydroxylase in Drosophila Schneider 2 cells*. *Biochemical Journal*. 313: p. 57-64.
15. Li, T., C.T. Yang, D.Y. Jin, and D.W. Stafford, 2000, *Identification of a Drosophila vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(24): p. 18291-18296.
16. Moraes AM, J.S., Astray RM, Suazo CA, Calderón Riquelme CE, Augusto EF, Tonso A, Pamboukian MM, Piccoli RA, Barral MF, Pereira CA., 2012, *Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development*. *Biotechnol Adv*. 30(3): p. 613-28.
17. Pfeifer, T.A., 1998, *Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture*. *Current Opinion in Biotechnology*. 9(5): p. 518-521.
18. Valdez-Cruz, N.A., L. Caspeta, N.O. Perez, O.T. Ramirez, and M.A. Trujillo-Roldan, 2010, *Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters*. *Microb Cell Fact*. 9: p. 18.
19. Vatandoost, J., A. Zomorodipour, M. Sadeghizadeh, R. Aliyari, M.H. Bos, and F. Ataei, 2012, *Expression of biologically active human clotting factor IX in Drosophila S2 cells: gamma-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme*. *Biotechnol Prog*. 28(1): p. 45-51.
20. www.Bio-Rad.com, *Transfection Methods Overview*.
21. Yin, J.C., G.X. Li, X.F. Ren, and G. Herrler, 2007, *Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes*. *Journal of Biotechnology*. 127(3): p. 335-347.

## Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in *Drosophila* S2 cells

Vatandoost J.<sup>1</sup> and Zomorodipour A.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Molecular Genetics Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Our data point to optimized experimental conditions for high expression of heterologous proteins by *Drosophila melanogaster* S2 cells. Following construction of pMT-EGFP and transfection of S2 cells with calcium phosphate or lipofection methods, the EGFP expression analysis showed that the transfection efficiency with calcium phosphate method with pH=7.06 and 10 µg/ml of DNA is more than lipofection method. The electrophoresis pattern of the RT-PCR products of S2 driven hFIX indicated that the *Drosophila* metallothionein promoter is tightly regulated and capable of driving high-level heterologous transcription upon induction by CuSO<sub>4</sub>. Nevertheless, the two methods were designed for construction of a recombinant stable S2 cell. In both methods, with and without Mitomycin, stable clones were recovered after only 3 weeks of hygromycin selection that is shorter than selection time in the mammalian cells. Therefore, our results show that *Drosophila* S2 cells do not have the limitations mentioned for mammalian cells.

**Key words:** *Drosophila* S2 cells, coagulation factor IX, calcium phosphate, lipofection.