

دانشور پزشکی

کلونینگ مولکولی ساب یونیت های آلفا و بتای هورمون لوتهینیزه با استفاده از توالی IRES در شاتل وکتور PEGFP-N1 و تطابق آن با بانک ژنی نویسندگان: مریم سادات خرمگاه^۱، نصرت اله ضرغامی^{۲*}، مژگان بنده پور^۳، حجت اله عباسزاده^۴، بهرام کاظمی^۵

۱. دانشجوی دکتری تخصصی گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ایران
۲. استاد گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران
۵. استاد گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

E-mail: zarghamin@yahoo.com

* نویسنده مسئول: نصرت اله ضرغامی

چکیده

مقدمه و هدف: هورمون های گلیکوپروتئینی ترشح شده از هیپوفیز قدامی از دو زیرواحد آلفا و بتا با اتصال غیرکوالان تشکیل شده است. زیرواحد الفا در هورمون های این خانواده یکسان است و تفاوت در فعالیت بیولوژیک این دسته از هورمون ها به زیرواحد بتای آنها ارتباط دارد. با توجه به عدم دسترسی مناسب به هورمون و امکان ایجاد آلودگی، در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از توالی IRES زیرواحدهای آلفا و بتای این ژن به منظور استفاده درمانی، در پلاسمید بیانی pEGFP-N1 کلون شود.

مواد و روش ها: تحقیق با طراحی تجربی انجام گرفت. به منظور کلونینگ زیرواحدهای آلفا و بتای هورمون LH، ابتدا توالی نوکلوتیدی طراحی شده در پلاسمید حامل pGEM-BI سننقز شد. توالی مورد نظر در سایت SmaI پلاسمید بیانی pEGFP-N1، ساب کلون شد. پلاسمید حاصل با انجام هضم آنزیمی و PCR، مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج: آنالیز آنزیمی و PCR نشان داد که پلاسمید pEGFP-N1- α -IRES- β حاوی توالی صحیحی بوده، با توالی ژن مورد نظر در بانک ژن تطابق دارد.

نتیجه گیری: این پلاسمید به دلیل ساختار صحیح برای انتقال به سیستم یوکاریوتی و ارزیابی بیان، مناسب است.

واژگان کلیدی: ساب کلونینگ، هورمون LH، وکتور بیان

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و یکم - شماره ۱۰۷
آبان ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۰
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۲/۹/۱۸
پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۵

مقدمه

هورمون لوته‌ایز کننده (LH)، یکی از دو گنادوتروپین ضروری در فرایند تولیدمثل و متعلق به خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی انسانی می‌باشد هورمون‌های گلیکوپروتئینی متشکل از دو زیرواحد آلفا و بتا هستند؛ زیرواحد آلفا جزء مشترک هورمون‌های این خانواده است، درحالی‌که زیرواحد بتا در این چهار هورمون از لحاظ اسیدهای آمینه و جزء کربوهیدراتی متفاوت بوده، مسئول عملکرد اختصاصی هریک از این هورمون‌هاست. هورمون LH از سلول‌های بازوفیل گنادوتروپ هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود؛ این هورمون نیز، همچون دیگر هورمون‌های گلیکوپروتئینی از دو زیرواحد آلفا و بتا با اتصال غیرکوالان تشکیل می‌شود که ساختمان سه‌بعدی آن با پیوندهای دی‌سولفیدی داخلی حفظ می‌شود (۱).

زیرواحد آلفا از ۹۲ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای دو زنجیره الیگو سارکاریدی از نوع N-linked در اسید آمینه‌های ASN 76 و ASN102 و پنج پل دی‌سولفیدی (S-S) است. زیرواحد آلفا در موقعیت کروموزومی 6-p21.1-23 قرار دارد و شامل چهار اگزون و سه اینترون است که نسخه‌برداری از آن در جفت و هیپوفیز توسط یک قطعه پیش‌ساز واحد تنظیم می‌شود (۲ تا ۵). در انسان، زیرواحد بتای LH به صورت منفرد روی کروموزم ۱۹ قرار دارد و از سه اگزون و دو اینترون ساخته شده است (۶).

هورمون LH، عملکرد گنادها را تنظیم و ترشح هورمون‌های جنسی را تحریک می‌کند؛ این هورمون در چرخه تخمدانی زنان، باعث افزایش ترشح استروژن، تکثیر سلول‌های تکای داخلی فولیکول و ترشح پروژسترون و در نهایت، تبدیل سلول‌های گرانولوزا به جسم زرد می‌شود؛ در مردان نیز، تولید اسپرم در بیضه‌ها و سنتز و ترشح تستوسترون را تحریک می‌کند؛ بر همین اساس از هورمون LH در درمان نازایی زنان، عقیمی مردان در موارد کم‌کاری هیپوفیز و کریپتورکیدیسم، همچنین در تلقیح مصنوعی (IVF) استفاده می‌شود (۷).

در فرآورده‌های ژنریک، هورمون LH در ترکیب با FSH

در منوتروپین‌ها وجود دارد. منوتروپین‌ها شامل داروهایی نظیر Menopur، Menogon، Repronex، pergonal و HMG Masson می‌شوند (۸ و ۹).

پلاسمید pEGFP-N1، یک پلاسمید حلقوی تجاری است که خاصیت فلوروسانس دارد؛ این پلاسمید با ۴۷۳۳ نوکلئوتید به گونه‌ای طراحی شده که امکان بیان پروتئین در میزبان یوکاریوتی را فراهم می‌کند (۱۰). با توجه به اینکه زنجیره آلفا و بتای هورمون گلیکوپروتئینی LH، گلیکوزیله هستند و میزبان پروکاریوت، قادر به گلیکوزیلاسیون و اصلاحات پس از ترجمه نیست، به منظور بیان این ژن انسانی از سیستم یوکاریوتی استفاده خواهد شد؛ از این رو، ژن زنجیره آلفا و بتای هورمون LH را در پلاسمید pEGFP-N1 که مناسب سیستم یوکاریوتی است کلون شد؛ علاوه بر آن با توجه به بیان بالای این پلاسمید و فلوروسنت بودن آن، امکان تولید بیشتر و ردیابی راحت‌تر در مرحله بیان، بیش از پیش، فراهم می‌شود.

مواد و روش‌ها

در بخش اول این مطالعه، ابتدا توالی زیرواحد‌های آلفا و بتای هورمون LH با توجه به ناحیه ارتباطی IRES طراحی (L1-IRES-L2) و به پلاسمید pGEM-BI وارد شد. پلاسمید به منظور تکثیر در باکتری E.Coli سوش Top10 ترانسفورم شد؛ باکتری‌های ترانسفورم شده به مدت ۱۲ ساعت در محیط لوریانی برانت در داخل انکوباتور کشت داده شدند. به منظور عدم رشد باکتری‌های مزاحم، به محیط کشت، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد؛ روز بعد، باکتری‌های رشد کرده از انکوباتور خارج و برای استخراج پلاسمید، آماده شدند.

هضم آنزیمی و کتور

در این مطالعه، سایت آنزیمی SmaI در ابتدا و انتهای ژن به صورتی قرارداده شد که بتوان ژن را در داخل پلاسمید pEGFP-N1 کلون کرد؛ همچنین به منظور تأیید وجود ژن روی پلاسمید حامل، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم SmaI به کار گرفته شد؛ برای این منظور، مخلوط (حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر) شامل ۵ میکرولیتر آنزیم و ۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، بافر و پلاسمید هریک، ۲۰ میکرولیتر تهیه شده، به مدت چند ثانیه میکروویو شدند و برای ۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرارداده شدند؛ سپس ۳ میکرولیتر از محصول عمل برای اطمینان از عمل آنزیم ها روی ژل آگارز، الکتروفورز شد؛ پس از آن به منظور دفسفریله کردن انتهای ۵' پلاسمید، فسفاتاز به محیط واکنش افزوده شد تا امکان اتصال مجدد دو سر ملکول حامل به یکدیگر از بین برود.

امپلیفیکاسیون

پس از طراحی پرایمرهای Forward و Reverse با توجه به دو زیر واحد آلفا و بتا و توالی IRES، برای تکثیر قطعه ژنی از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی به صورت سی سیکل: ۹۵ درجه ۶ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه استفاده شد. لازم به یادآوری است که دماهای مختلف اتصال پرایمر به الگو برای PCR آزمایش شد و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای قطعه مورد نظر به عنوان بهترین دما شناخته شد. پرایمرها، طوری طراحی شدند که سایت های برشی که در ابتدا و انتهای ژن قرار می گیرند در محل تجمع سایت های آنزیمی پلاسمید در پایین دست پروموتور وجود داشته، روی خود ژن وجود نداشته باشند. توالی پرایمرهای مورد استفاده با مشخصات آن در Genbank به شرح زیر است (جدول ۱):

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در امپلیفیکاسیون ژن LH

FORWARD	TCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCATGGAGATGCTCC
REVERSE	GGTGGCGACCGGTGGATCCCAGATTT

سکانسینگ

نمونه های پلاسمیدی با درجه خلوص ۱.۸ و مقادیر 400ng/ml برای سکانسینگ به شرکت سیناژن فرستاده شدند تا پس از تأیید برای فرایند الحاق به وکتور بیانی، آماده شوند.

تخلیص محصول PCR

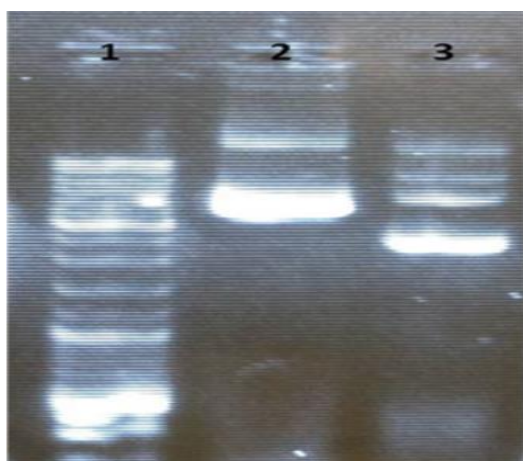
قطعه ژنی L1-IRES-L2 با فرایند PCR تکثیر شده با استفاده از کیت clean up gene خالص سازی شد؛ هم زمان پلاسمید بیانی مورد نظر نیز به منظور تکثیر در محیط لوریانی برانت کشت داده شد؛ در ادامه، محصول PCR و پلاسمید pEGFP-N1 به منظور ایجاد انتهای چسبنده با استفاده از آنزیم SmaI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

Ligation

قطعه ژنی L1-IRES-L2 طی فرایند الحاق (ligation) به پلاسمید pEGFP-N1 با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase وارد شد؛ پس از آن، محصول الحاق به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. محصول حاصل از الحاق به جریان ترانسفورم، وارد شد و برای تأیید ورود ژن به داخل پلاسمید pEGFP-N1، روی پلیت های حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد؛ در نهایت، کلونی های حاوی پلاسمید بیانی تکثیر یافته به منظور تأیید به مرحله Colony PCR وارد شدند.

Colony PCR

در این مرحله، کلون های رشد کرده روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک به وسیله سمپلر برداشته شدند و همراه با پرایمرهای forward, reverse و آنزیم Taq DNA polymerase به میکروتیوب، وارد شده، در دستگاه

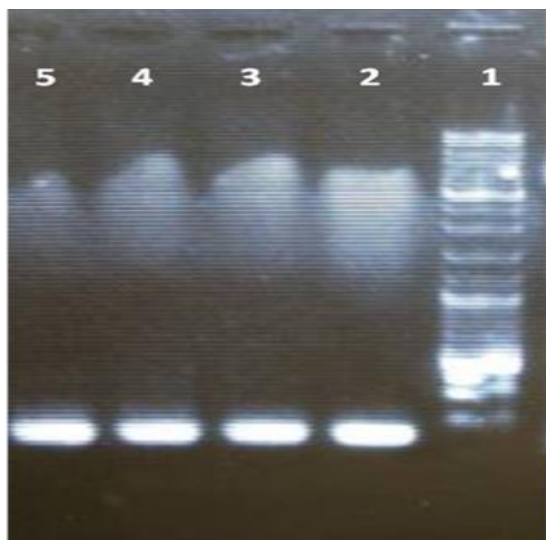


شکل ۱. استخراج پلاسمید حاوی زیرواحد آلفا و بتای هورمون لوئتینی و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم

SmaI

ستون ۱. مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۲. پلاسمید pGEM-L1-IRES-L2، ستون ۳. پلاسمید pGEM-BI خنثی شده و ستون ۴. پلاسمید

در مرحله بعد، پلاسمید برای امپلیفیکاسیون به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد که در نتیجه آن، ژن مورد نظر به مقدار لازم تکثیر یافت (شکل ۲). پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت ارسال و بعد از تأیید توالی برای الحاق آماده شد.



شکل ۲. امپلیفیکاسیون پلاسمید حاوی زیرواحد های آلفا و بتای هورمون لوئتینی

ستون ۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون های ۲ تا ۵. محصول PCR

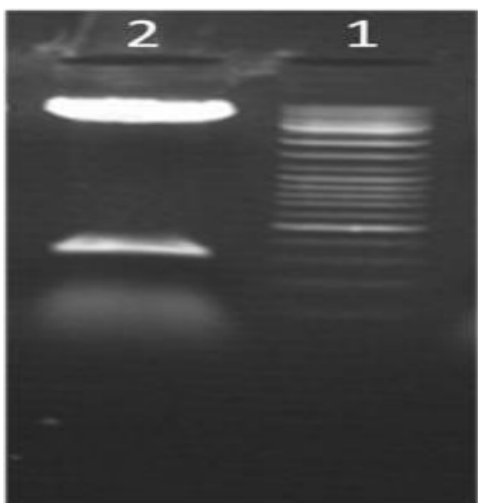
ترموسایکلر قرار گرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز، RUN شد و نمونه‌های مثبت که بانندی مشخص را ایجاد کرده بودند به محیط کشت لوریانی برانت حاوی آنتی‌بیوتیک به منظور تکثیر اضافه شدند؛ روز بعد، محصول توسط کیت High pure plasmide isolation kit تخلیص شد؛ در ادامه، آنالیز آنزیمی پلاسمید نو ترکیب با استفاده از دو آنزیم هم‌زمان و با بافر مشترک آنها انجام گرفت؛ محل اثر این دو آنزیم روی پلاسمید در دو سوی قطعه، وارد شده قرار داشت. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه، انکوبه و کل نمونه‌ها روی ژل ریخته شد.

سکانسینگ

پلاسمیدهایی که در آنالیز آنزیمی، الگویی صحیح را نشان دادند، پس از رسوب و حل کردن در آب، به منظور سکانسینگ به شرکت سیناژن فرستاده شدند؛ نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast برای تطابق با ژن‌های موجود در بانک ژنتیکی بررسی شد.

نتایج

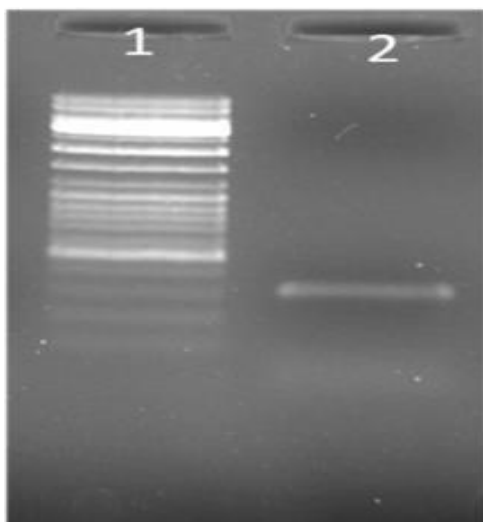
پلاسمید pEGM-L1-IRES-L2 به منظور تکثیر ترانسفورم شد؛ پس از کشت در انکوباتور، استخراج نمونه‌ها در مقیاس بالا توسط کیت High purification plasmid انجام گرفت؛ سپس با استفاده از آنزیم هضم کننده SmaI، آنالیز آنزیمی انجام شد. ۱ میکرولیتر از محصول‌های هضم و پلاسمید استخراج شده روی ژل آگاروز، لود شد که نتیجه، صحت کار تخلیص و هضم را نشان می‌داد (شکل ۱).



شکل ۴. هضم آنزیمی پلاسمید حاوی زیرواحد آلفا و

بتای هورمون لوتئینی با استفاده از آنزیم SmaI

ستون ۱. مارکر ۱۰۰۰ bp و ستون ۲. پلاسمید PEGFP-L1-L2 پس از هضم و جدا شدن قطعه L1-L2
سپس آزمون PCR برای ژن انجام شد (شکل ۵) و در پایان، نمونه استخراج شده برای سکانس ارسال شد و پس از بررسی، نتایج از موفقیت کلونینگ و تأیید سکانسینگ حکایت داشتند.

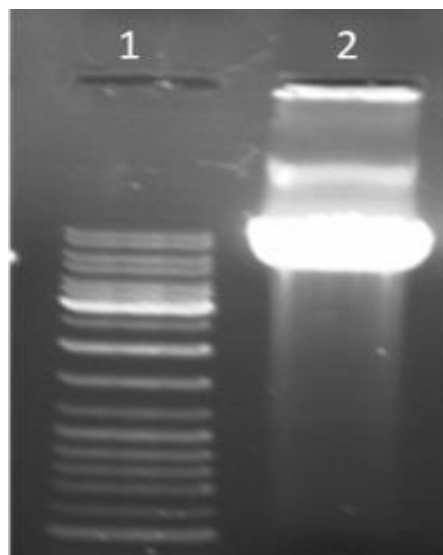


شکل ۵. آمپلیفیکاسیون زیرواحد آلفا و بتای هورمون

لوتئینی به منظور تأیید الحاق

ستون ۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون ۲. محصول PCR حاصل از وکتور pEGFP-L1-L2

پس از فرایند امپلیفیکاسیون، محصول PCR به وسیله هضم آنزیمی به منظور ایجاد انتهای چسبنده آماده و با استفاده از کیت clean up gene خالص سازی شد؛ همچنین وکتور بیانی pEGFP-N1 با کشت در محیط لوریانی برانت تکثیر یافت و با فرایند هضم توسط آنزیم Sma I خطی شده، برای فرایند الحاق آماده شد؛ پس از الحاق محصول مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ ساعت، انکوبه شد و به جریان ترانسفورم، وارد شد و محصول ترانسفورم روی پلیت های آنتی بیوتیکی کشت داده شد.



شکل ۳. استخراج پلاسمید مقصد بعد از الحاق

زیرواحد آلفا و بتای هورمون لوتئینی

ستون ۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون ۲. پلاسمید pEGFP-L1-L2
نمونه های مثبت جدا شده، با استفاده از Colony PCR از نظر ورود ژن تأیید شدند؛ سپس در محیط لوریانی برانت کشت داده شدند و استخراج پلاسمید انجام گرفت (شکل ۳). محصول استخراج شده، به وسیله SmaI آنالیز آنزیمی شده، ژن مورد نظر روی ژل مشاهده شد (شکل ۴).

بحث

هورمون‌های گلیکوپروتئینی ترشح‌شده از هیپوفیز قدامی شامل CG، FSH، LH، TSH، هریک به صورت دایمر از دو زیرواحد آلفا (α) و بتا (β) تشکیل شده‌اند که زیرواحد آلفا در تمام هورمون‌های بالا مشابه است (۱)؛ این هورمون‌ها به صورت اگزوزن برای مصارف درمانی و تشخیصی کاربرد دارند؛ ساخت این هورمون‌ها به صورت نوترکیب به سبب خلوص بالا و کاهش آلودگی نسبت به نوع تخلیص‌شده آن ارجحیت دارند؛ LH نوترکیب انسانی به صورت ترکیب با FSH به منظور تحریک رشد فولیکول برای زنان نابارور که به شدت دچار کمبود LH هستند، استفاده می‌شود. زیرواحد بتا در چهار هورمون بالا متفاوت بوده، مسئول فعالیت اختصاصی هریک از این هورمون‌هاست ولی بدون همراهی با زیرواحد آلفا قادر به عمل نیست. زیرواحد آلفا که ژن آن روی کروموزوم ۶ قرار دارد در همه هورمون‌های بالا مشابه است و از چهار اگزون و سه اینترون تشکیل شده است. که بخش کدشونده آن، «اگزون دو و سه» و بخش ابتدایی آن، «اگزون چهار» است که یک cDNA ۳۵۱ نوکلوتیدی حاوی کدون آغاز (ATG) و کدون خاتمه (TAA) را شامل می‌شود. یک زنجیره ۹۲ اسید آمینه‌ای از آن ساخته می‌شود و یک سیگنال پپتید ۲۴ اسید آمینه‌ای نیز در ابتدای آن قرار دارد و دارای دو ناحیه گلیکوزیلاسیون و پنج پل دی‌سولفیدی (S-S) است (۱).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که می‌توان با طراحی نوکلوتیدهای مورد نظر از بانک ژنی به ساخت زیرواحد بتای هورمون لوتئینی پرداخت و با الحاق آن به زیرواحد آلفا، بررسی بیان آن را در محیط آزمایشگاه زمینه‌سازی کرد. هدف از این مطالعه که در واقع، بخشی از طرح تولید آزمایشگاهی هورمون LH نوترکیب بود، تولید پلاسמיד نوترکیب حاوی زنجیره آلفا و بتای هورمون LH است که یک کاست L1-L2 را تشکیل می‌دهد.

سواتاترا و همکارانش با جداسازی هورمون لوتئینی گاو، ویژگی‌های کلون cDNA ساب‌یونیت‌های آلفا و بتا را تعیین و هویت آنها را از طریق Partial sequencing تأیید کردند؛ آنها به این نتیجه رسیدند که ساب‌یونیت‌های جداسازده از گاو با ساب‌یونیت‌های موجود در گونه‌هایی مانند موش صحرائی ۸۰ درصد همپوشانی دارد (۱۰). در سال ۱۹۹۸، گاوین و همکارانش برای اولین بار با استفاده از cDNA کتابخانه ژنتیکی، ساب‌یونیت‌های هورمون لوتئینی کیسه‌داران را کلون کردند؛ آنها با استفاده از روش ساترن‌بلات ثابت کردند هر دو زیرواحد به صورت تک‌کپی هستند (۱۱). در سال ۲۰۰۴، تسورو موریتا و همکارانش با تولید هورمون لوتئینی نوترکیب در جنین ماهی ترانس ژنیک، قدمی بزرگ در تولید هورمون‌ها با فعالیت بهینه برداشتند؛ آنها با تزریق پلاسמיד بیانی حاوی GF LH به داخل تخم ماهی قزل‌آلا توانستند با تحریک تولید تستسترون، مقدار هورمون گلیکوزیله لوتئینی را افزایش دهند (۱۲). تسویا و همکاران در سال (۱۹۹۸) به بررسی کلونینگ هورمون لوتئینی و بیان عملکردی آن پرداختند؛ آنها با جداسازی رسپتور هورمون از کتابخانه cDNA سلول‌های گرانولوزای جوجه، به یک ناحیه غنی از اسید آمینه در ناحیه N-terminate رسیدند و نتیجه مطالعات آنها نشان داد که توالی اسید آمینه رسپتور هورمون لوتئینی در سلول گرانولوزای جوجه، با انسان و موش مشابه است و با رسپتور FSH نیز ۵۰ درصد مشابهت دارد؛ این دانشمندان از ترانسفکت برای بیان پروتئین‌ها سود جستند (۱۳). در سال ۲۰۰۱، یوشیدا و همکارانش، کلونینگ هورمون لوتئینی را با استفاده از PCR انجام دادند؛ این گروه، خصوصیات زیرواحدهای بتای هورمون لوتئینی را با FSH و GPH ALPHA مقایسه کردند و موفق شدند ناحیه Long open reading frame در این زیرواحد را شناسایی و مقدار بازهای آن را تعیین کنند؛ در ضمن، مطالعات آنها نشان داد که زیرواحد بتای LH و GPH- α ، حدود ۶۳ درصد

نوع وحشی بیشتر است؛ همچنین در نوع واریانت، فولدینگ بیشتری به چشم می‌خورد (۱۶). در سال ۲۰۰۱، کومار و گروهش کلونینگ رسپتور هورمون لوتئینی ماهی و بیان آن در چرخه تولیدمثل را آزمایش کردند؛ این گروه، ناحیه کدکننده رسپتور هورمون لوتئینی بیضه ماهی را استخراج کرده، با روش PCR، مقدار آن را بالابردند (۱۷). در سال ۲۰۰۵، کلارک به مطالعه ساختار زیرواحد آلفا و بتای گوزن پرداخت (۱۸). در سال ۲۰۰۰، ژیا و همکارانش با انجام تحقیقی مطرح کردند که ساختار سولفات‌ها برای بیان فرم عملکردی هورمون لوتئینی در محیط داخل سلولی، ضروری است؛ در ضمن، جایگاه GalNAc-4-ST1 انتهای N-LINKE را در کروموزوم (۱۹q13.1) شناسایی کردند (۱۹).

برای کلون‌سازی زیرواحد آلفا و بتای هورمون LH در وکتور pEGFP-NI، محل ورود ژن به وکتور در حد فاصل دو جایگاه اثر آنزیم SmaI روی پلاسمید انتخاب شد؛ در دو طرف ژن نیز با استفاده از پرایمرها، محل اثر برای این آنزیم و توالی اتصال به ریبوزوم (Kozak sequence) بازسازی شد؛ در ضمن، به منظور استفاده از دو زیرواحد به‌طور هم‌زمان از توالی IRES میان دو زیرواحد استفاده شد؛ پس از کلون‌سازی در وکتور، آنالیز آنزیمی با استفاده از آنزیم SmaI (که در دو سوی ژن و روی پلاسمید جایگاه اثر دارد)، انجام شد؛ نتایج هضم آنزیمی ساختار صحیح این پلاسمیدها را تأیید می‌کند؛ همچنین، تعیین توالی با استفاده از پرایمر یونیورسال که در ناحیه ابتدایی پروموتور پلاسمید قرار دارد، انجام گرفت؛ با این کار، علاوه بر تعیین توالی ژن، می‌توان صحت ناحیه و همچنین قسمت اتصال ژن بازسازی شده و توالی Kozak با پلاسمید را نیز ارزیابی کرد. نتیجه تعیین توالی، تطابق کامل نواحی کدکننده این ژن را با ژن‌های گزارش شده در Gen Bank و همچنین frame بودن ژن با پلاسمید را نشان می‌دهد. در سال ۱۹۹۸، میزوتانی و همکارانش با کلونینگ و بررسی بیان عملکردی رسپتور هورمون لوتئینی در سلول‌های گرانولوزا جوجه با استفاده از نورترن بلات،

همپوشانی دارند؛ این محققان، همچنین بیان LH beta را در اواخر فاز لوتئال اعلام کردند (۱۴).

پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق، pEGFP-NI است که یک شاتل پلاسمید حلقوی تجاری، حاوی ۴۷۳۳ نوکلئوتید است. پلاسمید به‌گونه‌ای طراحی شده است که حاوی PUC ori برای تکثیر پلاسمید در پروکاریوت و پروموتور PCMV و PGHA برای آغاز و ختم بیان ژن در سلول یوکاریوت است؛ همچنین، حاوی ژن مقاومت به داروهای آمپی‌سیلین و نتوماکسین است که به ترتیب برای انتخاب در سلول پروکاریوت و سلول یوکاریوت به‌کار می‌روند. در حد فاصل نواحی آغاز و ختم بیان ژن، ناحیه Multiple Cloning Site وجود دارد که حاوی جایگاه اثر آنزیم‌های برش‌دهنده مختلف است و امکان گنجاندن ژن را در پلاسمید به‌وسیله آنزیم‌های برش‌دهنده فراهم می‌کند.

با وجود مزیت‌های زیاد باکتری E.coli از جمله سطح بالای بیان، سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم هزینه بودن، به دلایلی نظیر «عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری و تغییرهای پس از ترجمه»، این باکتری برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی مانند LH مناسب نیست. بنابراین در این تحقیق از سیستم‌های یوکاریوتی استفاده می‌کنیم که دارای اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه است.

در سال ۲۰۰۴، ماری ساینس و همکارانش، کلونینگ و بیان عملکردی رسپتور هورمون لوتئینی و کوریوگنادوتروپین را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عملکرد رسپتور این دو هورمون، تفاوت دارند (۱۵). مانا و همکارانش در سال ۲۰۰۲، مطالعاتی به‌منظور سنتز، تخلیص، تعیین خصوصیات عملکردی و ساختار معمول ژنتیکی هورمون نوترکیب لوتئینی انجام دادند؛ این گروه فرم واریانت شایع هورمون لوتئینی (دارای موتاسیون thr (15) arg (8) trp را که موجب انومالی در تولیدمثل می‌شود، بررسی کردند؛ آنها با مطالعه فعالیت نوع واریانت LH با سنتز cDNA در کلیه جنین، اعلام کردند که فعالیت بیولوژیکی نوع واریانت از

توجه به عدم شناسایی این توالی، محققان بسیاری، فقط به کلونینگ یکی از زیرواحدها پرداخته بودند در حالی که در این تحقیق، ما با استفاده از این توالی هر دو زیرواحد آلفا و بتا را در یک شاتل پلاسمید فلورسنت کلون کردیم.

نتیجه‌گیری

در پلاسمید pEGFP-N1 می‌توان توالی مربوط به دو ژن را با استفاده از یک IRES و توالی‌های هومولوگ کلون کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و بخشی از طرح تحقیقاتی «تولید هورمون نو ترکیب LH در آزمایشگاه»، مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است؛ بدین وسیله از مدیر محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، سرکار خانم رهبریان و کارشناس آزمایشگاه، سرکار خانم کوچکی برای همکاری در اجرای طرح تحقیقاتی، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

گزارش دادند که ناحیه غنی از سیتوزین و گوانین در انتهای N این رسپتور وجود دارد (۲۰). مینگیچی و همکاران وی در سال ۱۹۹۷ با تحقیقی روی بیان mRNA رسپتور (LH/HCG) در تخمدان انسان، به سکانس امینواسیدی این رسپتور دست یافتند؛ این گروه اعلام کردند که دومین داخل‌غشایی این رسپتور، ساختاری حفاظت شده دارد و به G-Protein coupled receptorها شبیه است؛ در ضمن به همپوشانی پروتئینی این رسپتور با نمونه موشی اشاره کردند (۲۱). تالبوت و همکارانش در سال ۱۹۹۷ با بررسی خصوصیات فیزیوشیمیایی، بیولوژیکی و ایمونولوژیکی هورمون لوئینی نو ترکیب، آن را با نمونه طبیعی مقایسه کردند و به نتایج مهم دست یافتند؛ این گروه گزارش دادند که نوع نو ترکیب این هورمون به رغم کم بودن محتوای کربوهیدراتی، دارای ظرفیت بیولوژیکی بالاتری است (۲۲). برخی از دانشمندان همانند ژیا (۱۹۹۸) با مقایسه رسپتور (LH/HCG) در سلول‌های تخمدان و تیروئید به تفاوت و همچنین حفاظت شده بودن توالی این دو رسپتور پی بردند (۲۳).

برای کلون‌سازی زیرواحد آلفا و بتای هورمون LH در وکتور pEGFP-N1 محل ورود ژن به پلاسمید در حد فاصل جایگاه اثر آنزیم‌های SmaI روی پلاسمید انتخاب شد. در دو طرف ژن توالی هومولوگ پلاسمید در نظر گرفته شد که با روش هومولوگوس ریکامینیشن عمل کلونینگ انجام گرفت.

پس از این مرحله به منظور الحاق دو زیرواحد به یکدیگر از توالی IRES استفاده شد؛ با توجه به اینکه این ژن، دارای دو زیرواحد بوده، لازمه بیان پروتئینی، حضور هر دو زیرواحد است، از این توالی استفاده شد.

IRES توالی از RNA است که اتصال زیرواحد 40s ریبوزوم را به فرادست کدون آغاز mRNA بسیاری از یوکاریوت‌ها تسهیل می‌کند؛ این توالی در mRNAهای مختلف متنوع بوده، هر ساله، توالی‌هایی جدید از آن به پایگاه‌های اطلاعاتی افزوده می‌شود؛ هرچند که هنوز، بسیاری از آنها ناشناخته‌اند. در تحقیق‌های پیشین با

منابع

- Karimzade H, Raftari A, Normohamadian M, editors. In: Harper's Biochemistry. Tehran Ab press; 1380: 643-644.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 10445-10448.
- Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal -F). *Human Reproduction Update* 1996; 2: 172-191.
- Reddy Vemuri B, Hsiung N, Beck Anton K, Berstine , Edward G. FSH . United States Patent. 1990: 4923805.
- Palter SF, Olive DL, Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. *Reproductive physiology. novaks gynecology* 12nd ed. Maryland: William and wilkins 1996: 149-169.
- Jablonka-Shariff, A, Boime I.A. dileucine determinant in the carboxyl terminal sequence of the LH beta subunit is implicated in the regulated secretion of from transfected GH3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology - Journal* 2011;339 (1-2): 7-13.
- Katsikis I, Karkanaki A, Misichronis G, Delkos D, Kandaraki E.A, Panidis D. Phenotypic expression, body mass index and insulin resistance in relation to LH levels in women with polycystic ovary syndrome *Eur. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive* 2011;156 (2): 181-185.
- Sairam M.R, Li,C.H. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of the beta-subunit *Biochim. Biophys* 1975; 412 (1): 70-81.
- He,C, Kraft,P, Chasman,D.I, Buring,J.E, Chen,C, Hankinson,S.E, Pare,G, Chanock,S, Ridker,P.M. ,Hunter,D.J. A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause *Human Genetics* 2010; 128 (5): 515-527.
- Swatantra K. Jain, W. W, Chin G. P. Talwar. Isolation and characterization of cDNA clones for α - and β -subunits of ovine luteinizing hormone National Institute of Immunology, JNU Complex, Shaheed Jeet Singh Marg, New Delhi 110 067.
- Gavan A. Harrison, Elizabeth M. Deane, Desmond W. Cooper2 cDNA cloning of luteinizing hormone subunits from brushtail possum and red kangaroo Mammalian Genome 1998; 9: 638-642.
- Tetsuro Morita1, Goro Yoshizaki1, Makito Kobayashi, Shugo Watabe& Toshio Takeuchi. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos *Transgenic Research* 2004;13: 551-557.
- Tetsuya Mizutani, Takashi Minegishi, Yukiko Nonobe, Yumiko Abe, Yoshihisa Hasegawa, Katsumi Wakabayashi, Michiharu Kamiyoshi, Kaoru MiyamotoL Molecular Cloning and functional Expression of Chicken Luteinizing Hormone Receptor 1998.
- Yoshida, Daisaku Nagae, Masaki Ito, Fuminari Soyano, Kiyoshi. Molecular Cloning of cDNAs Encoding Pituitary Glycoprotein Hormone .ALPHA., FSH .BETA. and LH .BETA. Subunits in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Zoological Society of Japan Citation: Zoological science* 2001; 18(7): 929-936; 200.
- Marie Saint-Dizier, Florence Foulon-Gauze, Francois Lecompte,Yves combarnous, maryes chopineau.Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA-CNRS-Université F. Rabelais de Tours-Haras Nationaux, 37 380 Nouzilly, France.*
- Pulak R Manna, Lata Joshi, Vernon N Reinhold, Michel L Aubert, Nobuhiko Suganuma, Kim Pettersson Synthesis, purification and structural and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone., Ilpo T Huhtaniemi *Human Molecular Genetics* 2002; 11(3): 301-315.
- Sampath Kumar, Shigeho Ijiri, John M. Trant *Molecular Biology of Channel Catfish Gonadotropin Receptors: Cloning of a Functional Luteinizing Hormone Receptor and Preovulatory Induction of Gene Expression.* *J. Biology of reproduction* 2001; 64, 1010-1018.
- Clark RJ, Furlan MA, Chedrese PJ. Cloning of the elk common glycoprotein alpha-subunit and the FSH and LH beta-subunit cDNAs; 2005.
- Guoqing Xia, Matthias R. Evers. Hyung-Gyoo Kang.Molecular Cloning and Expression of the Pituitary Glycoprotein Hormone N-Acetylgalactosamine-4-O sulfotransferase. Department of Pathology, Washington University School of Medicine, Stm. Published, JBC Papers in Press 2000.

20. Mizutani T, Minegishi T, Nonobe Y, Abe Y, Hasegawa Y, Wakabayashi K, et al. Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor. *Biochimica et Biophysica*; 1998.
21. Takashi Minegishi, Mari Tano¹, Yumiko Abe¹, Kazuto Nakamura¹, Yoshito Ibuki, Kaoru Miyamoto. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Molecular Human Reproduction* 1997; 101-107.
22. James A.T, Robert M, Aileen M.H, Ann L, Anjali G, Barry H. Recombinant human luteinizing hormone: a partial physicochemical, biological and immunological characterization. Julie D.Mc Loughlin and William R. Robertson¹ University of Manchester, UK *Molecular Human Reproduction* 1996; . 799-806.
23. Jia XC, Oikawa M, Bo M, Tanaka T, Ny T, Boime I, Hsueh AJ. Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. *Mol Endocrinol* 1991; 5(6):759-68.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
21st year, No. 107
October,
November 2013*

Received: 2013/8/31
Last revised: 2013/12/9
Accepted: 2013/12/16

Molecular cloning and blast by gene bank of alpha and beta subunit in LH hormone into mammalian shuttle vector PEGFP-N1 using IRES

Maryam Sadat Khoramgah¹, Nosratollah Zarghami^{1*}, Mozghan Bandehpour², Hojatollah Abbaszadeh³, Bahram Kazemi²

1. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

2. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

E-mail: nzarghami@yahoo.com

Abstract:

Background and Objective: The glycoprotein hormone secreted from anterior pituitary gland are heterodimeric, non-covalently consisting of a common α subunit and a hormone-specific β subunit. Due to the lack of adequate access to hormones and the possibility of contamination, this study attempted to clone two subunits of LH hormone by using IRES sequence in eukaryotic expression vector pEGFP-NI for clinical purposes.

Materials and Methods: To clone the LH hormone, we designed the subunits alpha and beta sequences, then synthesized the plasmid vector pGEM-BI. The designed sequence was subcloned in the SmaI site of expression plasmid pEGFP-N1. The resulting plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion and PCR.

Results: PCR and restriction enzyme analysis showed that the plasmid pEGFP-NI- α -IRES- β contains the correct sequence of the target gene sequences in the gene bank.

Conclusion: Since the plasmid has a proper structure, it can be used to transfer into eukaryotic systems and is also appropriate for the evaluation of expression.

Key words: Sub cloning, LH hormone, Expression vector