دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم– شماره۱۰۷
آبان ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۹/۱۸
پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۵

کلونینگ مولکولی ساب‌یونیت‌های آلفا و بتای هورمون لوتئینیزه با استفاده از توالی IRES در شاتل وکتور PEGFP-N1 و تطابق آن با بانک ژنی

نویسندگان: مریم سادات خرمگاه[۱]، نصرت‌اله ضرغامی*[۲]، مژگان بنده‌پور[۳]، حجت‌اله عباس‌زاده [٤]، بهرام کاظمی[٥]

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
٤. 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

* نویسنده مسئول: *نصرت‌اله ضرغامی* **E-mail: zarghamin@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: هورمون‌های گلیکوپروتئینی ترشح‌شده از هیپوفیز قدامی از دو زیرواحد آلفا و بتا با اتصال غیرکوالان تشکیل‌شده‌است، زیرواحد الفا در هورمون‌های این خانواده یکسان است و تفاوت در فعالیت بیولوژیک این دسته از هورمون‌ها به زیرواحد بتای آنها ارتباط‌دارد. با توجه به عدم دسترسی مناسب به هورمون و امکان ایجاد آلودگی، در این تحقیق تلاش‌شد تا با استفاده از توالی IRES زیرواحدهای آلفا و بتای این ژن به‌منظور استفاده درمانی، در پلاسمید بیانی pEGFP-N1 کلون شود.

مواد و روش‌ها: تحقیق با طراحی تجربی انجام‌گرفت، به‌منظور کلونینگ زیرواحدهای آلفا و بتای هورمون LH، ابتدا توالی نوکلوتیدی طراحی‌شده در پلاسمید حامل pGEM-BI سنتز شد. توالی مورد نظر در سایت SmaI پلاسمید بیانی pEGFP-N1، ساب‌کلون شد. پلاسمید حاصل با انجام هضم آنزیمی و PCR، مورد تأیید قرارگرفت.

نتایج: آنالیز آنزیمی و PCR نشان‌داد که پلاسمید pEGFP-Nl -α-IRES-β، حاوی توالی صحیحی بوده، با توالی ژن مورد نظر در بانک ژن تطابق‌دارد.

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

واژگان کلیدی: ساب‌کلونینگ، هورمون LH، وکتور بیان

مقدمه

هورمون لوتئینیزه‌کننده (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 ترشح‌می‌شود؛ این هورمون نیز، همچون دیگر هورمون‌های گلیکوپروتئینی از دو زیرواحد آلفا و بتا با اتصال غیرکوالان تشکیل‌می‌شود که ساختمان سه‌بعدی آن با پیوندهای دی‌سولفیدی داخلی حفظ‌می‌شود (۱).

زیرواحد آلفا از ۹۲ اسید آمینه تشکیل‌شده‌است 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 قراردارد و شامل چهار اگزون و سه اینترون است که نسخه‌برداری از آن در جفت و هیپوفیز توسط یک قطعه پیش‌ساز واحد تنظیم‌می‌شود (۲ تا ۵). در انسان، زیرواحد بتای LH به‌صورت منفرد روی کروموزم ۱۹ قراردارد و از سه اگزون و دو اینترون ساخته‌شده‌است (٦).

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

در فراورده‌های ژنریک، هورمون LH در ترکیب با FSH در منوتروپین‌ها وجوددارد. منوتروپین‌ها شامل داروهایی نظیر Menopur، Menogon، Repronex، pergonal و HMG Masson می‌شوند (۸ و۹).

پلاسمید pEGFP-N1، یک پلاسمید حلقوی تجاری است که خاصیت فلوروسانس دارد؛ این پلاسمید با ٤٧٣٣ نوکلئوتید به‌گونه‌ای طراحی‌شده که امکان بیان پروتئین در میزبان یوکاریوتی را فراهم‌می‌کند (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، به‌منظور بیان این ژن انسانی از سیستم یوکاریوتی استفاده‌خواهدشد؛ ازاین‌رو، ژن زنجیره آلفا و بتای هورمون LH را در پلاسمید pEGFP-N1 که مناسب سیستم یوکاریوتی است کلون شد؛ علاوه‌برآن با توجه به بیان بالای این پلاسمید و فلوروسنت‌بودن 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 به‌منظور تکثیر در باکتری E.Coli سوش Top10 ترانسفورم شد؛ باکتری‌های ترانسفورم‌شده به‌مدت ۱۲ ساعت در محیط لوریانی برانت در داخل انکوباتور کشت‌داده‌شدند. به‌منظور عدم رشد باکتری‌های مزاحم، به محیط کشت، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد؛ روز بعد، باکتری‌های رشدکرده از انکوباتور خارج و برای استخراج پلاسمید، آماده شدند.

هضم آنزیمی وکتور

در این مطالعه، سایت آنزیمی SmaI در ابتدا و انتهای ژن به‌صورتی قرارداده‌شد که بتوان ژن را در داخل پلاسمید pEGFP-N1 کلون‌کرد؛ همچنین به‌منظور تأیید وجود ژن روی پلاسمید حامل، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم SmaI به‌کارگرفته‌شد؛ برای این منظور، مخلوط (حجم نهایی۱۰۰ میکرولیتر) شامل ۵ میکرولیتر آنزیم و ۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، بافر و پلاسمید هریک، ۲۰ میکرولیتر تهیه‌شده، به‌مدت چند ثانیه میکروفیوژ شدند و برای ۱ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شدند؛ سپس ۳ میکرولیتر از محصول عمل برای اطمینان از عمل آنزیم‌ها روی ژل آگارز، الکتروفورز شد؛ پس از آن به‌منظور دفسفریله‌کردن انتهای ' ۵ پلاسمید، فسفاتاز به محیط واکنش افزوده شد تا امکان اتصال مجدد دو سر ملکول حامل به یکدیگر ازبین‌برود.

امپلیفیکاسیون

پس از طراحی پرایمرهای Reverse و Forward با توجه به دو زیرواحد آلفا و بتا و توالی IRES، برای تکثیر قطعه ژنی از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی به‌صورت سی سیکل: ۹۵ درجه ٦ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه استفاده‌شد. لازم به یادآوری است که دماهای مختلف اتصال پرایمر به الگو برای PCR آزمایش‌شد و درنهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای قطعه مورد نظر به‌عنوان بهترین دما شناخته‌شد. پرایمرها، طوری طراحی شدند که سایت‌های برشی که در ابتدا و انتهای ژن قرارمی‌گیرند در محل تجمع سایت‌های آنزیمی پلاسمید در پایین دست پروموتر وجودداشته، روی خود ژن وجودنداشته‌باشند.

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

FORWAD	TCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCATGGAGATGCTCC
REVERSE	GGTGGCGACCGGTGGATCCCAGATTT

سکانسینگ

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

تخلیص محصول PCR

قطعه ژنی L1-IRES-L2 با فرایند PCR تکثیرشده با استفاده از کیت clean up gene خالص‌سازی‌شد؛ هم‌زمان پلاسمید بیانی مورد نظر نیز به‌منظور تکثیر در محیط لوریانی برانت کشت‌داده‌شد؛ در ادامه، محصول PCR و پلاسمید pEGFP-N1 به‌منظور ایجاد انتهای چسبنده با استفاده از آنزیم SmaI مورد هضم آنزیمی قرارگرفتند.

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 به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول حاصل از الحاق به جریان ترانسفورم، وارد شد و برای تأیید ورود ژن به داخل پلاسمید pEGFP-NI، روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت‌داده‌شد؛ درنهایت، کلونی‌های حاوی پلاسمید بیانی تکثیریافته به‌منظور تأیید به مرحله Colony PCR وارد شدند.

Colony PCR

در این مرحله، کلون‌های رشدکرده روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک به‌وسیله سمپلر برداشته‌شدند و همراه با پرایمرهای forward, reverse و آنزیم Taq DNA polymerase به میکروتیوب، وارد شده، در دستگاه

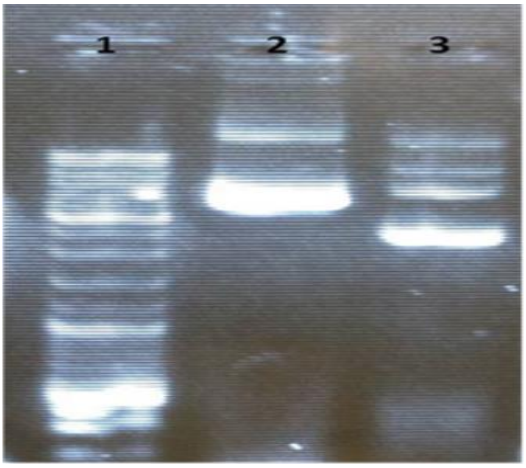
ترموسایکلر قرارگرفتند. محصول PCR روی ژل آگارز، RUN شد و نمونه‌های مثبت که باندی مشخص را ایجادکرده‌بودند به محیط کشت لوریانی برانت حاوی آنتی‌بیوتیک به‌منظور تکثیر اضافه شدند؛ روز بعد، محصول توسط کیت High pure plasmide isolation kit تخلیص شد؛ در ادامه، آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب با استفاده از دو آنزیم هم‌زمان و با بافر مشترک آنها انجام‌گرفت؛ محل اثر این دو آنزیم روی پلاسمید در دو سوی قطعه، وارد شده قرارداشت. نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای۳۷ درجه، انکوبه و کل نمونه‌ها روی ژل ریخته شد.

سکانسینگ

پلاسمیدهایی که در آنالیز آنزیمی، الگویی صحیح را نشان‌دادند، پس از رسوب و حل‌کردن در آب، به‌منظور سکانسینگ به شرکت سیناژن فرستاده‌شدند؛ نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast برای تطابق با ژن‌های موجود در بانک ژنتیکی بررسی‌شد.

نتایج

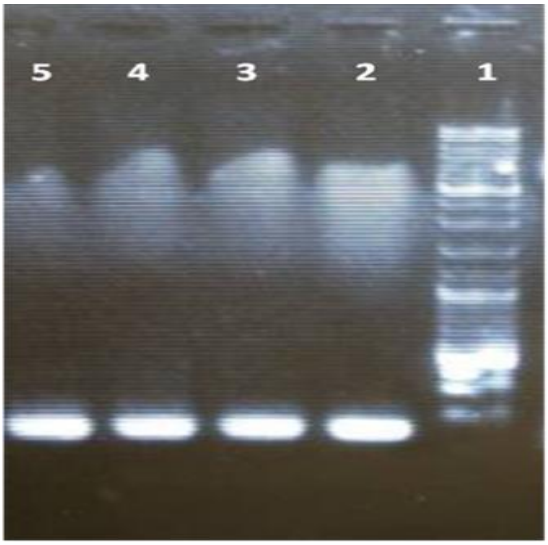
پلاسمید pEGM-L1-IRES-L2 به‌منظور تکثیر ترانسفورم شد؛ پس از کشت در انکوباتور، استخراج نمونه‌ها در مقیاس بالا توسط کیت High purification plasmid انجام‌گرفت؛ سپس با استفاده از آنزیم هضم‌کننده SmaI، آنالیز آنزیمی انجام‌شد. ۱ میکرولیتر از محصول‌های هضم و پلاسمید استخراج‌شده روی ژل آگاروز، لود شد که نتیجه، صحت کار تخلیص و هضم را نشان‌می‌داد (شکل۱).



شکل۱. استخراج پلاسمید حاوی زیرواحد آلفا و بتای هورمون لوتئینی و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم SmaI

ستون ۱. مارکر ۱۰۰bp، ستون ۲. پلاسمید pGEM- –L1-IRES-L2 BI خطی‌شده و ستون ۳. پلاسمید pGEM-BI

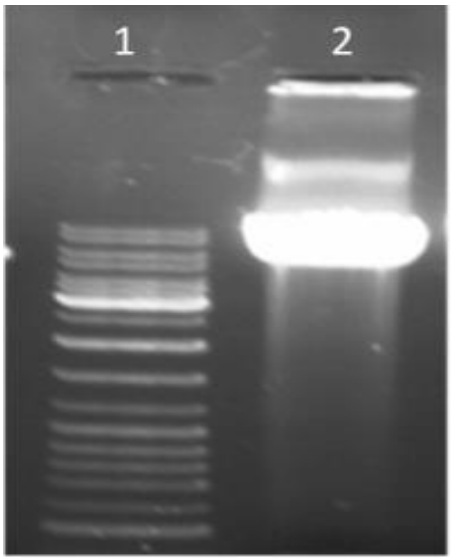
در مرحله بعد، پلاسمید برای امپلیفیکاسیون به دستگاه ترموسایکلر منتقل‌شد که در نتیجه آن، ژن مورد نظر به مقدار لازم تکثیریافت (شکل۲). پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت ارسال و بعد از تأیید توالی برای الحاق آماده شد.



شکل۲. امپلیفیکاسیون پلاسمید حاوی زیرواحدهای آلفا و بتای هورمون لوتئینی

ستون۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون‌های ۲ تا ۵. محصول PCR

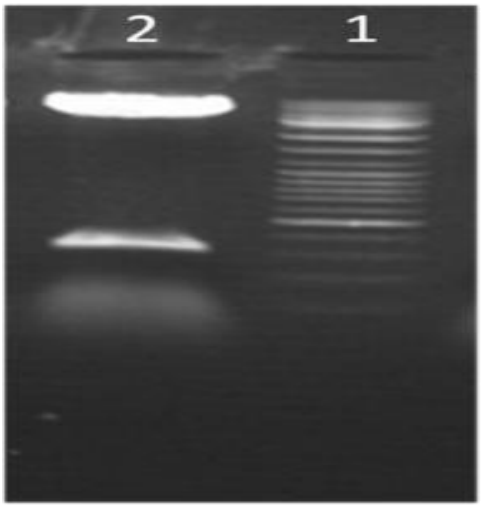
پس از فرایند امپلیفیکاسیون، محصول PCR به‌وسیله هضم آنزیمی به‌منظور ایجاد انتهای چسبنده آماده و با استفاده از کیت clean up gene خالص‌سازی‌شد؛ همچنین وکتور بیانی pEGFP-Nl با کشت در محیط لوریانی برانت تکثیریافت و با فرایند هضم توسط آنزیم Sma I خطی شده، برای فرایند الحاق آماده شد؛ پس از الحاق محصول مورد نظر در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٤ ساعت، انکوبه‌شد و به جریان ترانسفورم، وارد شد و محصول ترانسفورم روی پلیت‌های آنتی‌بیوتیکی کشت‌داده‌شد.



شکل۳. استخراج پلاسمید مقصد بعد از الحاق زیرواحد آلفا و بتای هورمون لوتئینی

ستون ۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون ۲. پلاسمید pEGFP-L1-L2

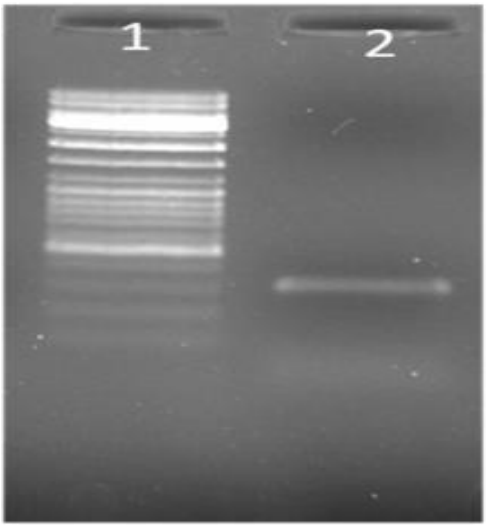
نمونه‌های مثبت جدا شده، با استفاده از Colony PCR از نظر ورود ژن تأییدشدند؛ سپس در محیط لوریانی برانت کشت‌داده‌شدند و استخراج پلاسمید انجام‌گرفت (شکل۳). محصول استخراج‌شده، به‌وسیله SmaI آنالیز آنزیمی شده، ژن مورد نظر روی ژل مشاهده‌شد (شکل٤).



شکل٤. هضم آنزیمی پلاسمید حاوی زیرواحد آلفا و بتای هورمون لوتئینی با استفاده از آنزیم SmaI

ستون ۱. مارکر ۱۰۰bp و ستون ۲. پلاسمید PEGFP-L1-L2 پس از هضم و جدا شدن قطعه L1-L2

سپس آزمون PCR برای ژن انجام‌شد (شکل۵) و در پایان، نمونه استخراج‌شده برای سکانس ارسال‌شد و پس از بررسی، نتایج از موفقیت کلونینگ و تأیید سکانسینگ حکایت‌داشتند.



شکل۵. آمپلیفیکاسیون زیرواحدآلفا و بتای هورمون لوتئینی به‌منظور تأیید الحاق

ستون۱. مارکر ۱۰۰ bp و ستون ۲. محصول PCR حاصل از وکتور pEGFP-L1-L2

بحث

هورمون‌های گلیکوپروتئینی ترشح‌شده از هیپوفیز قدامی شامل CG، FSH، LH،TSH، هریک به‌صورت دایمر از دو زیرواحد آلفا (α) و بتا (ß) تشکیل‌شده‌اند که زیرواحد آلفا در تمام هورمون‌های بالا مشابه است (۱)؛ این هورمون‌ها به‌صورت اگزوژن برای مصارف درمانی و تشخیصی کاربرددارند؛ ساخت این هورمون‌ها به‌صورت نوترکیب به سبب خلوص بالا و کاهش آلودگی نسبت‌به نوع تخلیص‌شده آن ارجحیت‌دارند؛ LH نوترکیب انسانی به‌صورت ترکیب با FSH به‌منظور تحریک رشد فولیکول برای زنان نابارور که به‌شدت دچار کمبود LH هستند، استفاده‌می‌شود. 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 ٦ قراردارد در همه هورمون‌های بالا مشابه است و از چهار اگزون و سه اینترون تشکیل‌شده‌است. 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 ساخته‌می‌شود و یک سیگنال پپتید ۲٤ اسید آمینه‌ای نیز در ابتدای آن قراردارد و دارای دو ناحیه گلیکوزیلاسیون و پنج پل دی‌سولفیدی (S-S) است (۱).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دادند 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 زمینه‌سازی‌کرد. هدف از این مطالعه که درواقع، بخشی از طرح تولید آزمایشگاهی هورمون LH نوترکیب بود، تولید پلاسمید نوترکیب حاوی زنجیره آلفا و بتای هورمون LH است که یک کاست L1-L2 را تشکیل‌می‌دهد.

سواتانترا و *همکارانش* با جداسازی هورمون لوتئینی گاو، ویژگی‌های کلون cDNA ساب‌یونیت‌های آلفا و بتا را تعیین و هویت آنها را از طریق Partial sequencing تأییدکردند؛ آنها به این نتیجه رسیدند که ساب‌یونیت‌های جداشده از گاو با ساب‌یونیت‌های موجود در گونه‌هایی مانند موش صحرایی ۸۰ درصد همپوشانی‌دارد (۱۰). در سال ۱۹۹۸، *گاوان* و *همکارانش* برای اولین‌بار با استفاده از cDNA کتابخانه ژنتیکی، ساب‌یونیت‌های هورمون لوتئینی کیسه‌داران را کلون‌کردند؛ آنها با استفاده از روش ساترن‌بلات ثابت‌کردند هر دو زیرواحد به‌صورت تک‌کپی هستند (۱۱). در سال ۲۰۰٤، *تتسورو موریتا* و *همکارانش* با تولید هورمون لوتئینی نوترکیب در جنین ماهی ترانس ژنیک، قدمی بزرگ در تولید هورمون‌ها با فعالت بهینه برداشتند؛ آنها با تزریق پلاسمید بیانی حاوی GF LH به داخل تخم ماهی قزل‌آلا توانستند با تحریک تولید تستسترون، مقدار هورمون گلیکوزیله لوتئینی را افزایش‌دهند (۱۲). *تتسویا* 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 نشان‌داد که توالی اسید آمینه رسپتور هورمون لوتئینی در سلول گرانولوزای جوجه، با انسان و موش مشابه است و با رسپتور FSH نیز ۵۰ درصد مشابهت‌دارد؛ این دانشمندان از ترانسفکت برای بیان پروتئین‌ها سودجستند (۱۳). در سال ۲۰۰۱، *یوشیدا* و *همکارانش*، کلونینگ هورمون لوتئینی را با استفاده از PCR انجام‌دادند؛ این گروه، خصوصیات زیرواحدهای بتای هورمون لوتئینی را با FSH و GPH ALPHA مقایسه‌کردند و موفق شدند ناحیه Long open reading frame در این زیرواحد را شناسایی و مقدار بازهای آن را تعیین‌کنند؛ درضمن، مطالعات آنها نشان‌داد که زیرواحد بتای LH و GPH-α، حدود ٦۳ درصد

همپوشانی‌دارند؛ این محققان، همچنین بیان LH beta را در اواخر فاز لوتئال اعلام‌کردند (١٤).

پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق، pEGFP-NI است که یک شاتل پلاسمید حلقوی تجاری، حاوی ٤٧٣٣ نوکلئوتید است. پلاسمید به‌گونه‌ای طراحی‌شده‌است 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 نئومایسین است که به‌ترتیب برای انتخاب در سلول پروکاریوت و سلول یوکاریوت به‌کارمی‌روند. در حد فاصل نواحی آغاز و ختم بیان ژن، ناحیه Multiple Cloning Site وجوددارد که حاوی جایگاه اثر آنزیم‌های برش‌دهنده مختلف است و امکان گنجاندن ژن را در پلاسمید به‌وسیله آنزیم‌های برش‌دهنده فراهم‌می‌کند.

با وجود مزیت‌های زیاد باکتری E.coli ازجمله سطح بالای بیان، سهولت در افزایش مقیاس تولید و کم هزینه‌بودن، 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 می کنیم که دارای اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه است.

در سال ٢٠٠٤، *ماری سایت* و *همکارانش*، کلونینگ و بیان عملکردی رسپتور هورمون لوتئینی و کوریوگنادوتروپین را بررسی‌کردند و به این نتیجه رسیدند که عملکرد رسپتور این دو هورمون، تفاوت‌دارند (١٥). *مانا* و *همکارانش* در سال ٢٠٠٢، مطالعاتی به‌منظور سنتز، تخلیص، تعیین خصوصیات عملکردی و ساختار معمول ژنتیکی هورمون نوترکیب لوتئینی انجام‌دادند؛ این گروه فرم واریانت شایع هورمون لوتئینی (دارای موتاسیون thr(15) ale arg(8)trp را که موجب انومالی در تولیدمثل می‌شود، بررسی‌کردند؛ آنها با مطالعه فعالیت نوع واریانت LH با سنتز cDNA در کلیه جنین، اعلام‌کردند که فعالیت بیولوژیکی نوع واریانت از نوع وحشی بیشتر است؛ همچنین در نوع واریانت، فولدینگ بیشتری به‌چشم‌می‌خورد (١٦). در سال ٢٠٠١، *کومار* و *گروهش* کلونینگ رسپتور هورمون لوتئینی ماهی و بیان آن در چرخه تولیدمثل را آزمایش‌کردند؛ این گروه، ناحیه کدکننده رسپتور هورمون لوتئینی بیضه ماهی را استخراج‌کرده، با روش PCR، مقدار آن را بالابردند (١٧). در سال ٢٠٠٥، *کلارک* به مطالعه ساختار زیرواحد آلفا و بتای گوزن پرداخت (١٨). در سال ٢٠٠٠، *ژیا* و *همکارانش* با انجام تحقیقی مطرح‌کردند که ساختار سولفاته برای بیان فرم عملکردی هورمون لوتئینی در محیط داخل‌سلولی، ضروری است؛ درضمن، جایگاه GalNAc-4-ST1 انتهای N-LINKE را در کروموزوم (19q13.1) شناسایی‌کردند (١٩).

برای کلون‌سازی زیرواحد آلفا و بتای هورمون LH در وکتور pEGFP-N1، محل ورود ژن به وکتور در حد فاصل دو جایگاه اثر آنزیم SmaI روی پلاسمید انتخاب‌شد؛ در دو طرف ژن نیز با استفاده از پرایمرها، محل اثر برای این آنزیم و توالی اتصال به ریبوزوم (Kozak sequence) بازسازی‌شد؛ درضمن، به‌منظور استفاده از دو زیرواحد به‌طور هم‌زمان از توالی IRES میان دو زیرواحد استفاده‌شد؛ پس از کلون‌سازی در وکتور، آنالیز آنزیمی با استفاده از آنزیم SmaI (که در دو سوی ژن و روی پلاسمید جایگاه اثردارد)، انجام‌شد؛ نتایج هضم آنزیمی ساختار صحیح این پلاسمیدها را تأیید می‌کند؛ همچنین، تعیین توالی با استفاده از پرایمر یونیورسال که در ناحیه ابتدایی پروموتور پلاسمید قراردارد، انجام‌گرفت؛ با این کار، علاوه‌بر تعیین توالی ژن، می‌توان صحت ناحیه و همچنین قسمت اتصال ژن بازسازی‌شده و توالی Kozak با پلاسمید را نیز ارزیابی‌کرد. نتیجه تعیین توالی، تطابق کامل نواحی کدکننده این ژن را با ژن‌های گزارش‌شده درGen Bank و همچنین frameبودن ژن با پلاسمید را نشان‌می‌دهد. در سال ١٩٩٨، *میزوتانی* و *همکارانش* با کلونینگ و بررسی بیان عملکردی رسپتور هورمون لوتئینی در سلول‌های گرانولوزا جوجه با استفاده از نورترن بلات،

گزارش‌دادند که ناحیه غنی از سیتوزین و گوانین در انتهای N این رسپتور وجوددارد (۲۰). *مینیگیشی* و *همکاران* وی در سال۱۹۹۷ با تحقیقی روی بیان mRNA رسپتور (LH/HCG) در تخمدان انسان، به سکانس امینواسیدی این رسپتور دست‌یافتند؛ این گروه اعلام‌کردند که دومین داخل‌غشایی این رسپتور، ساختاری حفاظت‌شده دارد و به G-Protien coupeld receptorها شبیه است؛ درضمن به همپوشانی پروتئینی این رسپتور با نمونه موشی اشاره‌کردند (۲۱). *تالبوت* و *همکارانش* در سال ۱۹۹۷ با بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بیولوژیکی و ایمونولوژیکی هورمون لوتئینی نوترکیب، آن را با نمونه طبیعی مقایسه‌کردند و به نتایجی مهم دست‌یافتند؛ این گروه گزارش‌دادند که نوع نوترکیب این هورمون به‌رغم کم‌بودن 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 حفاظت‌شده‌بودن توالی این دو رسپتور پی‌بردند (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 درنظرگرفته‌شد که با روش هومولوگوس ریکامبینیشن عمل کلونینگ انجام‌گرفت.

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

IRES توالی از RNA است که اتصال زیرواحد 40s ریبوزوم را به فرادست کدون آغاز mRNA بسیاری از یوکاریوت‌ها تسهیل‌می‌کند؛ این توالی در mRNAهای مختلف متنوع بوده، هر ساله، توالی‌هایی جدید از آن به پایگاه‌های اطلاعاتی افزوده می‌شود؛ هرچندکه هنوز، بسیاری از آنها ناشناخته‌اند. در تحقیق‌های پیشین با توجه به عدم شناسایی این توالی، محققان بسیاری، فقط به کلونینگ یکی از زیرواحدها پرداخته‌بودند درحالی‌که در این تحقیق، ما با استفاده از این توالی هر دو زیرواحد آلفا و بتا را در یک شاتل پلاسمید فلورسنت کلون‌کردیم.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج‌شده از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و بخشی از طرح تحقیقاتی «تولید هورمون نوترکیب 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 به‌عمل‌می‌آید.

منابع

1. Karimzade H, Raftari A, Normohamadian M, editors. In: Harper's Biochemistry. Tehran Ab press; 1380: 643-644.
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. Journal of Biological Chemistry 1996; 271: 10445-10448.
3. Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal –F). Human Reproduction Update 1996; 2: 172-191.
4. Reddy Vemuri B, Hsiung N, Beck Anton K, Berstine , Edward G. FSH . United States Patent. 1990: 4923805.
5. Palter SF, Olive DL, Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Reproductive physiology. novaks gynecology 12nd ed. Maryland: William and wilkins 1996: 149-169.
6. 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.
7. 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.
8. Sairam M.R, Li,C.H. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of the beta-subunitBiochim. Biophys 1975; 412 (1): 70-81.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Clark RJ, Furlan MA, Chedrese PJ. Cloning of the elk common glycoprotein alpha-subunit and the FSH and LH beta-subunit cDNAs; 2005.
19. 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. 2 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 partia 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 Khoramgah[1], Nosratollah Zarghami[1*], Mozhgan Bandehpour[2], Hojatollah Abbaszadeh[3], Bahram Kazemi[2]

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-Nl-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