

Research Article**Utilizing the Transposon Vector to Enhance the Expression of Recombinant Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells****Reyhane Lohrasbi¹, Seyede Hoda Jazayeri², Abbas Daneshpour¹, Zahra Halfinezhad¹, Robabe Mohammadi¹, Parisa Javidzade¹, Amir Amiri-Yekta^{1*}**

1- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

2- Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: amir.amiriyekta@royaninstitute.org

Received: 6 October 2023

Accepted: 22 November 2023

DOI: 10.22034/ascij.2023.1998160.1546

Abstract

In pharmaceutical biotechnology and recombinant protein production, due to the low efficacy of inserting the target gene into the host gene genome and its integration into the heterochromatin regions, which leads to the suppression of transcription as well as the instability of the expression of the desired sequence, achieving cells with high expression is a challenge. To overcome the limitations transposons, which are mobile genetic elements and have the ability to cut and insert target fragments in certain regions of the genome with the “Cut and Paste” mechanism, are effective. This research aims to evaluate the effect of the *PiggyBac* transposon vector on the expression level of recombinant Erythropoietin (rEPO) protein and to find a cell line with high expression. First the optimized rEPO sequence based on CHO codon performance was cloned into the pOptiVEC™ plasmid. To create the second expression vector, the EPO-IRES-DHFR fragment was inserted into the PB513B-1 plasmid, and then the homogenization steps in both vectors were confirmed using Colony PCR reaction, enzyme digestion, and Sanger sequencing. In order to create a stable cell line, both vectors were separately transfected into CHO DG44 cells and then screened. After confirming the insertion of the vectors into the genome of the target cell, the level of erythropoietin gene expression at the transcript and protein level was checked using qRT-PCR and western blotting tests, respectively, in two cell lines. The Real-Time PCR data indicate a 188-fold increase in erythropoietin gene transcript in the PB513B-1-EPO cell line compared to pOptiVEC-EPO. Additionally, the western blotting test's result confirmed the correct synthesis and secretion of this protein. Analysis of findings in this research revealed that the transposon element significantly increased the expression of the desired gene at the transcriptional level and had could create a cell line with high expression of the target protein.

Keywords: Transposon element, High-expression cell line, PiggyBac, Erythropoietin, Therapeutic recombinant protein, CHO DG44.

مقاله پژوهشی

تاثیر عناصر ترانسپوزونی بر بهبود بیان پروتئین نو ترکیب اریتروپوئین در سلول‌های تخمدان

همستر چینی

ریحانه لهراسی^۱، سیده هدی جزایری^۲، عباس دانشی پور^۱، زهرا هلفی نژاد^۱، ربابه محمدی^۱، پریسا جاویدزاده^۱،
امیر امیری یکتا^{۱*}

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل،
گروه ژنتیک، تهران، ایران

۲- دانشکده علوم نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: amir.amiriyekta@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۴

DOI: 10.22034/ascij.2023.1998160.1546

چکیده

در صنعت زیست‌داروها و تولید پروتئین‌های نو ترکیب به دلیل بازده پایین درج ژن هدف در ژنوم سلول میزبان و همچنین ادغام در مناطق هتروکروماتین که منجر به سرکوب رونویسی و ناپایداری بیان توالی مورد نظر می‌گردد، دستیابی به سلول‌های دارای بیان بالا با چالش رو برو است. به منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، می‌توان از ترانسپوزون‌ها که عناصر ژنتیکی متحرک بوده و با مکانیسم Cut and Paste توانایی برش و درج قطعات هدف در نواحی خاصی از ژنوم را دارا می‌باشند، استفاده کرد. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عنصر ترانسپوزونی *PiggyBac* بر میزان بیان پروتئین نو ترکیب اریتروپوئین و دست پیدا کردن به رده‌ی سلولی دارای بیان بالا دست می‌باشد. ابتدا توالی ژن اریتروپوئین نو ترکیب (rEPO) بهینه‌شده بر اساس ارجحیت کدونی سلول CHO در وکتور pOptiVECTM همسانه‌سازی شد. جهت ایجاد دومین وکتور بیانی، قطعه‌ی EPO-IRES-DHFR در پلاسمید PB513B-1 درج و سپس مراحل همسانه‌سازی در هر دو ناقل با استفاده از واکنش Colony PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی سنگر تایید شد. جهت ایجاد لاین سلولی پایدار، هر دو وکتور به طور مجزا به سلول CHO DG44 ترانسفکت و سپس غربالگری آن‌ها انجام شد. پس از تایید درج وکتورها درون ژنوم سلول هدف، میزان بیان ژن اریتروپوئین در سطح رونوشت و پروتئین به ترتیب با استفاده از تست‌های qRT-PCR و وسترن بلاتینگ در دو رده‌ی سلولی بررسی شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR، افزایش ۱۸۸ برابری میزان رونوشت ژن اریتروپوئین در لاین سلولی PB513B-1-EPO نسبت به pOptiVEC-EPO را نشان داد. همچنین یافته‌های آزمایش وسترن بلاتینگ، سنتز و ترشح صحیح این پروتئین را تایید کرد. بررسی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عنصر ترانسپوزونی به صورت چشمگیری سبب افزایش بیان ژن موردنظر در سطح رونوشت شده و توانایی ایجاد رده‌ی سلولی با بیان بالا از پروتئین هدف را دارا است.

کلمات کلیدی: عنصر ترانسپوزونی، رده‌ی سلولی دارای بیان بالا، *PiggyBac*، اریتروپوئین، پروتئین نو ترکیب دارویی، CHO DG44.

مقدمه

در سال‌های اخیر پروتئین‌های نو ترکیب دارویی، سریع‌ترین بخش در حال رشد صنعت زیست‌داروها را تشکیل داده و امروزه بیش از ۳۰۰ داروی مبتنی بر پروتئین در ایالات متحده‌ی آمریکا و اروپا تایید و

در ITRهای موجود در ناقل ترانسپوزونی قرار دارد، شناسایی کرده و برش می‌دهد. سپس دو رشته‌ی DNA را در نواحی مشخصی هضم و قطعات ترانسپوزون را درج می‌کند (۲۶). در میان عناصر ترانسپوزونی، *PiggyBac* (PB) که توالی‌های TTA در ژنوم سلول را مورد هدف قرار می‌دهد، به صورت متداول در حوزه‌ی بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گرفته و توالی احاطه شده با ITR را در نواحی بالادست مناطق شروع رونویسی، جزایر CpG و مناطق حساس به *DNaseI* که از لحاظ رونویسی بسیار فعال هستند، درج می‌کند (۱۲، ۲۶). همین امر سبب شده تا جمعیت‌های سلولی به دست آمده از ترانسپوزون PB، دارای بازده و بیان بالاتری نسبت به سایر روش‌های متداول تولید رده‌ی سلولی باشند (۱۳). در این مطالعه ابتدا، توالی SRP (Signal recognition particle) و ژن اریتروپوئین نوترکیب (Recombinant Erythropoietin (rEPO)) شده بر اساس ارجحیت کدون‌ی سلول CHO، در دو وکتور بیانی pOptiVECTM و PB513B-1، تحت پروموتور CMV همسانه‌سازی شده و پس از دستیابی به جمعیت‌های پایدار از هر دو ناقل در سلول CHO DG44، تاثیر عنصر ترانسپوزونی بر میزان بیان ژن هدف، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی سازه‌های ژنی: در این پژوهش توالی اریتروپوئین نوترکیب انسانی به عنوان ژن هدف به کار گرفته شد. ابتدا توالی این ژن و SRP که به منظور ترشح شدن پروتئین نوترکیب به خارج از سلول، دقیقاً پیش از توالی هدف قرار گرفته، براساس ارجحیت کدون‌ی سلول CHO DG44 بهینه و پس از سنتز در وکتور pUC57 دریافت شد. وکتور PB513B-1، ناقل حاوی عنصر ترانسپوزونی بوده و پلاسمید

مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۴). به طور کلی تقاضا برای استفاده از این داروها رو به افزایش بوده و به کارگیری تکنیک‌ها و استراتژی‌هایی جهت بهبود و افزایش تولید آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۵). در میان سیستم‌های بیانی، سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) با توجه به دارا بودن تغییرات پس از ترجمه‌ی مشابه پروتئین‌های انسانی، توانایی رشد در محیط‌های کشت سوسپانسیون فاقد سرم و کاملاً مشخص با چگالی بالا و همچنین ایمن بودن نسبت به عفونت‌های ویروسی انسانی، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی ارجحیت دارند (۵، ۲۱، ۲۳، ۱۴). صرف نظر از انتخاب میزبان مناسب، بهینه‌سازی توالی ژن هدف، انتخاب پروموتور مناسب، به کارگیری عناصر تنظیم‌کننده‌ی کروماتین و فاکتورهای رونویسی و همچنین استفاده از سیگنال‌های ترشحی برای بهبود کیفیت و کمیت پروتئین نوترکیب ضروری هستند (۶، ۷، ۱۰، ۱۶). با این حال، همچنان تولید رده‌ی سلولی با بازدهی بالا از ژن مورد نظر یکی از چالش‌های بزرگ و مهم پیش روی محققین در این زمینه است (۲، ۲۸). تکنیک درج تصادفی به صورت متداول برای دستیابی به سلول‌های دارای بیان بالا از ژن هدف، مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما عوامل خاموش‌کننده‌ی رونویسی و همچنین درج در نواحی هتروکروماتین می‌تواند بیان ترانس ژن را تحت تاثیر قرار دهند (۱، ۴، ۱۹، ۲۹). به همین منظور هدف قراردادن مناطق فعال رونویسی در ژنوم سلول میزبان می‌تواند بهبود و افزایش میزان بیان پروتئین مورد نظر را در پی داشته باشد. ترانسپوزون‌ها، عناصر DNAی متحرک حاوی توالی‌های معکوس تکرارشونده (ITRs) و ترانسپوزاز هستند که با به کارگیری استراتژی "Cut and Paste" در میان ژنوم جا به جا می‌شوند (۲۲، ۱۸). طی این فرآیند، آنزیم ترانسپوزاز توالی‌های کوتاه خاصی را که

سپس به منظور حذف بافر، محصول واکنش با استفاده از کیت ذکر شده در بالا، تخلیص شد. باتوجه به اینکه وکتور pOptiVEC™ در ساختار اصلی خود دارای قطعه‌ی IRES-DHFR است، پلاسمید pOptiVEC-EPO به عنوان الگو برای تکثیر توالی ۱۷۸۱ جفت بازی SRP-EPO-IRES-DHFR طی واکنش PCR انجام شده با آنزیم DNA پلیمرز Phusion (ThermoScientific) و آغازگرهای دارای جایگاه نشست دو آنزیم *XbaI* و *EcoRI* در انتهای ۵' (جدول ۱)، قرار گرفت. سپس محصول واکنش با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification (Roche) تخلیص شد. در نهایت برش دو انتهای قطعه‌ی تکثیر شده، طی واکنش هضم با دو آنزیم *XbaI* و *EcoRI* (ThermoScientific) انجام و خالص‌سازی آن با استفاده از کیت ذکر شده در بالا صورت گرفت. پس از انجام واکنش الحاق پلاسمید خطی PB513B-1 و قطعه‌ی SRP-EPO-IRES-DHFR، وکتور نوترکیب از طریق روش شوک گرمایی به باکتری اشریشیاکولای، سویه‌ی DH5 α ، ترانسفورم و تایید کلون‌های مثبت با استفاده از واکنش Colony PCR و هضم آنزیمی انجام شد. سپس عدم وجود جهش در قطعه‌ی همسانه‌سازی شده، از طریق توالی‌یابی سنگر مورد بررسی قرار گرفت.

ایجاد رده‌ی سلولی CHO DG44 نوترکیب: در این پژوهش از سلول‌های CHO DG44 به عنوان میزبان، جهت تولید پروتئین نوترکیب اریتروپوئین استفاده شد. ابتدا سلول‌های ترانسکفت‌نشده‌ی CHO DG44 با چگالی اولیه‌ی $10^6 \times 0.5$ سلول/میلی‌لیتر، در محیط CHO DG44 (Gibco) حاوی غلظت ۸ میلی‌مولار از L-Glutamate (Gibco) و ۱۸ میلی‌لیتر/لیتر از Pluronic™ F-68 (Gibco) ذوب و پس از گذشت سه پاساژ و دستیابی به زنده‌مانی بالای ۹۵٪، برای

pOptiVEC™ به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است (شکل ۱) این دو وکتور بیانی را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.

طراحی و ساخت سازه ژنی برپایه‌ی وکتور pOptiVEC™ حاوی ژن اریتروپوئین: به منظور همسانه‌سازی ژن اریتروپوئین نوترکیب در وکتور pOptiVEC™، ابتدا واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *NotI* (ThermoScientific) روی این پلاسمید انجام و سپس جهت آماده‌سازی این ناقل برای مرحله‌ی الحاق، محصول این واکنش با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification (Roche) تخلیص شد. جهت تکثیر قطعه‌ی SRP و اریتروپوئین نوترکیب که طولی برابر ۵۹۳ جفت باز دارد، واکنش PCR روی وکتور pUC57-EPO با استفاده از آغازگرهای دارای جایگاه نشست آنزیم‌های *XbaI* و *NotI* در سمت ۵' (جدول ۱) و آنزیم DNA پلیمرز Phusion (ThermoScientific) انجام و سپس قطعه‌ی تکثیرشده، تحت واکنش هضم با دو آنزیم بالا، برش خورده و با استفاده از کیت تجاری High Pure PCR Product Purification (Roche) تخلیص شد. پس از الحاق دو قطعه‌ی SRP-EPO و وکتور خطی‌شده pOptiVEC™، ترانسفورماسیون محصول الحاق از طریق روش شوک گرمایی به باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5 α ، انجام شد. سپس تایید حضور وکتور نوترکیب در باکتری، از طریق واکنش Colony PCR و به دنبال آن هضم آنزیمی انجام و صحت توالی همسانه‌سازی شده در وکتور با روش توالی‌یابی سنگر بررسی شد.

طراحی و ساخت سازه‌ی ژنی PB513B-1 حاوی ژن اریتروپوئین: ابتدا وکتور PB513B-1 (SBI) با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت Roche از باکتری استخراج، با آنزیم‌های *XbaI* و *EcoRI* (ThermoScientific) هضم و

DHFR در هر دو ناقل بیانی و توانایی رشد سلول‌های دریافت‌کننده‌ی وکتور در محیط فاقد GHT (Glycine, Hypoxanthine and Thymidine) پس از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن، هر دو لاین سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO شمارش شده و به منظور غربالگری، پس از ساتریفیوژ، با چگالی اولیه‌ی $10^6 \text{ Cell/mL} \times 0.5$ در محیط انتخابی CD OptiCHO™ حاوی غلظت ۸ mM از L-Glutamine (Gibco) پاساژ داده شدند.

بررسی درج سازه‌های ژنی در ژنوم سلول CHO DG44 با استفاده از PCR: پس از غربالگری سلول‌های دریافت‌کننده‌ی وکتور بیانی و دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰، جهت بررسی درج سازه درون ژنوم میزبان، تعداد $10^6 \times 1$ سلول از هر لاین جداسازی و استخراج DNA از آن‌ها با استفاده از کیت تجاری High Pure PCR Template Preparation (Roche) صورت گرفت. سپس واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن اریتروپوئین (جدول ۱)، طبق شرایط جدول ۲ روی نمونه‌های DNA استخراج شده انجام شد.

بررسی کمی میزان رونوشت ژن اریتروپوئین با استفاده از تست Real Time PCR: پس از دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰ در هر دو لاین pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO، سلول‌ها با چگالی اولیه‌ی $10^6 \text{ Cell/mL} \times 0.3$ در ۱۰ mL محیط کشت کامل CD OptiCHO™ (Gibco) معلق شده و به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای 37°C ، ۸ درصد CO_2 و میزان رطوبت ۸۵٪ و دور چرخش ۱۳۵ rpm، کشت داده شدند. سپس میزان $10^6 \times 3$ سلول از هر رده سلولی جداسازی و RNA آن با استفاده از کیت NucleoSpin RNA (MACHERY-NAGEL) استخراج و پس از بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر

ترانسفکشن آماده شدند. در تمامی مراحل، سلول‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد، ۸ درصد CO_2 و میزان رطوبت ۸۵ درصد نگهداری شدند. در ادامه به نحوه‌ی انتقال پایدار وکتورهای مورد نظر به سلول CHO DG44 پرداخته می‌شود.

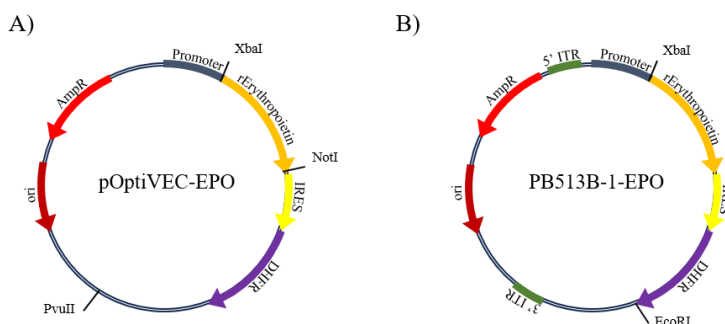
تهیه‌ی لاین سلولی پایدار pOptiVEC-EPO: به منظور درج وکتور pOptiVEC-EPO درون ژنوم سلول هدف و ایجاد رده‌ی سلولی پایدار، این پلاسمید با استفاده از آنزیم PvuII (ThermoScientific) خطی و سپس تخلیص شد. ۴۸ و ۲۴ ساعت پیش از ترانسفکشن، سلول‌های CHO DG44 با چگالی اولیه‌ی $10^6 \text{ Cell/mL} \times 0.3$ در ۳ mL محیط کشت کامل CD DG44 پاساژ و به پلیت ۶ خانه منتقل شدند. در روز ترانسفکشن، پس از شمارش سلول‌ها و اطمینان حاصل کردن از تعداد $10^6 \text{ Cell/mL} \times 0.5$ سلول و درصد زنده‌مانی بالای ۹۰، انتقال وکتور pOptiVEC-EPO با استفاده از واکنش‌گر FreeStyle™ Max (Reagent) بر اساس پروتکل سلول CHO DG44 شرکت Gibco انجام شد.

تهیه‌ی رده‌ی سلولی پایدار PB513B-1-EPO: جهت آماده‌سازی سلول‌های CHO DG44 برای ترانسفکشن وکتور PB513B-1-EPO، ۲۴ ساعت پیش از انجام واکنش، سلول‌ها با چگالی اولیه‌ی $10^6 \text{ Cell/mL} \times 0.5$ در پلیت ۶ خانه حاوی ۳ mL محیط کشت CD DG44 کامل، پاساژ داده شدند. سپس در روز ترانسفکشن، پس از تایید تعداد $10^6 \times 1$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت و همچنین درصد زنده‌مانی بالای ۹۰، وکتور PB513B-1-EPO به همراه پلاسمید کدکننده‌ی ترانسپوزاز به صورت همزمان (Co-transfection) و نسبت ۲/۵ به ۱، با استفاده از واکنش‌گر FreeStyle™ Max به جمعیت CHO DG44 منتقل شدند. با توجه به حضور توالی ژن

ترش‌حی است، پس از گذشت ۶ روز از پاساژ اولیه، میزان ۲ mL از محیط کشت جداسازی، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm، ساتریفیوژ و به منظور انجام تست وسترن بلا‌تینگ، محیط رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس غلظت پروتئین در هر نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ در جذب نور ۲۸۰ نانومتر، خوانش شد. در این تست از محیط رویی سلول‌های CHO DG44 ترانسفکت شده با وکتور pOptiVECTM همسانه‌سازی نشده و داروی اریتروپوئین (Cinnapoietin، شرکت سیناژن) به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. ابتدا میزان ۱۰۰ نانوگرم از هر نمونه پس از ترکیب با Sample Buffer 5X و دناتوره شدن در دمای ۱۰۰°C روی ژل ۱۲٪ پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) بارگذاری و الکتروفورز به مدت ۲۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ و دو ساعت با ولتاژ ۱۲۰ انجام شد. سپس پروتئین‌ها طی ۱۴ ساعت با ولتاژ ۱۷ به کاغذ PVDF (AmershamTM HybondTM) منتقل شدند. به منظور مسدودسازی، ابتدا کاغذ نیتروسولوزی به مدت ۲ ساعت و نیم در محلول ۵ درصد از Skim milk و پس از آن یک ساعت و نیم در غلظت ۱ µg/mL از آنتی‌بادی اولیه rabbit anti-human Erythropoietin شرکت Bio-Rad غوطه‌ور شد. پس از سه بار شستشو، در مرحله‌ی بعد کاغذ PVDF به مدت یک ساعت در مجاورت رقت ۱ به ۳۵۰/۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه anti-rabbit IgG peroxidase antibody produced in goat از شرکت Sigma-Aldrich قرار گرفت. در نهایت پس از چهار بار شستشو، سوبسترای آنزیم (HRP) به کاغذ نیتروسولوزی اضافه و با استفاده از دستگاه GelDoc مشاهده شد.

(NanoDrop® ND-1000, ThermoScientific) به منظور حذف کامل DNA، نمونه‌ها با آنزیم DNaseI (ThermoScientific) تیمار و در نهایت سنتز cDNA (Complementary DNA) با غلظت ۱ میکروگرم، از طریق کیت تجاری RevertAid H Minus First Strand cDNA (ThermoScientific) انجام شد. در نهایت به منظور بررسی و مقایسه‌ی میزان رونوشت ژن اریتروپوئین در دو رده‌ی سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO، واکنش Real-Time PCR با غلظت ۲۵ نانوگرم از نمونه‌ی cDNA هر لاین سلولی، آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و خانه‌دار (*GAPDH* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (جدول ۱) و همچنین مسترمیکس RealQ Plus 2X Master Mix Green (AMPLIQON) مطابق شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۳ با دستگاه StepOnePlusTM انجام و سپس تغییرات بیان ژن مورد نظر از طریق روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ کمی شد. در این مطالعه آنالیز آماری با استفاده از IBM SPSS Statistics 26.0 و روش T-Test انجام و P value کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده‌ی معنادار بودن تغییرات است.

بررسی سنتز پروتئین اریتروپوئین با استفاده از وسترن بلا‌تینگ: جهت بررسی تولید پروتئین اریتروپوئین نوترکیب در دو رده‌ی سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO، ابتدا هر دو لاین سلولی در ۱۰ mL محیط CD OptiCHOTM (Gibco) با چگالی اولیه‌ی $1 \times 10^6 \times 0.3$ ، شرایط دمایی ۳۷ °C، ۸ درصد CO₂، میزان رطوبت ۸۵٪ و دور چرخش ۱۳۵ rpm، کشت داده شدند. با توجه به اینکه توالی اریتروپوئین همسانه‌سازی شده در هر دو وکتور، دارای قطعه‌ی SRP بوده و پروتئین سنتز شده



شکل ۱- تصویر شماتیک دو وکتور بیانی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO. A) به منظور ساخت وکتور pOptiVEC-EPO، توالی اریتروپوئین از طریق واکنش PCR بر وکتور pUC57 تکثیر و سپس در پلاسمید pOptiVECTM همسانه‌سازی شد. B) جهت تکثیر قطعه‌ی EPO-IRES-DHFR، وکتور pOptiVEC-EPO به عنوان الگوی واکنش PCR قرار گرفت. سپس توالی تکثیر شده به پلاسمید PB513B-1 منتقل شد.

Fig 1. Schematic picture of two expression vectors pOptiVEC-EPO and PB513B-1-EPO. A) In order to make the pOptiVEC-EPO vector, the erythropoietin sequence was amplified through the PCR reaction on the pUC57 vector and then homogenized in the pOptiVECTM plasmid. B) To amplify the EPO-IRES-DHFR fragment, the pOptiVEC-EPO vector was used as a PCR reaction template. The amplified sequence was then transferred to plasmid PB513B-1.

جدول ۱- آغازگرهای به کار گرفته‌شده در این پژوهش

Table 1. Primers used in this research

Primer sequence (5' → 3')	Annealing Temperature	Length of fragment	Aim of use
1 ATATCTAGAGCCGCCACCATGGA	63	593 bp	Amplification of the SRP-EPO fragment
2 ATTGCGGCCGCTTTTTGTGCG	63.5		
3 ATATCTAGAGCCGCCACCATGGA	63	1781 bp	Amplification of the SRP-EPO-IRES-DHFR fragment
4 CGGGAATTCGTTTTAGTCTTTCTTCTCG	62.6		
5 ATGCTCCTCCTCGGCTGAT	60.5	83 bp	Investigating the insertion of the structure into the host cell genome and the Real-Time PCR reaction on the EPO gene
6 GGTGGTGATATTCTCGGCCTC	60.3		
7 GACTTCAACAGCAACTCCCAC	59.4	125 bp	Performing Real-Time PCR reaction on GAPDH gene
8 TCCACCACCCTGTTGCTGTA	61.1		

جدول ۲- شرایط دمایی واکنش PCR انجام شده برای بررسی درج سازه‌ها درون ژنوم سلول CHO DG44

Table 2. Temperature conditions of PCR to check the insertion of constructs into the genome of CHO DG44 cells

Steps	Temperature (°C)	Number of repetitions
Primary DNA Denaturation	94	1
DNA Denaturation	94	30
Primer Annealing	58	
Extension (DNA Synthesis)	72	
Final Extension	72	1

جدول ۳- شرایط دمایی واکنش qRT-PCR جهت بررسی میزان بیان رونوشت EPO در دو رده‌ی سلولی

Table 3. Temperature conditions of qRT-PCR reaction to check the level of EPO transcript expression in two cell lines

Steps	Temperature (°C)	Number of repetitions
Primary DNA Denaturation	95	1
DNA Denaturation	95	40
Annealing and Extension	60	
	95	
Draw the melting temperature diagram	60	1
	Stepwise increase in temperature each time by 0.3 degrees until reaching a temperature of 95 degrees	

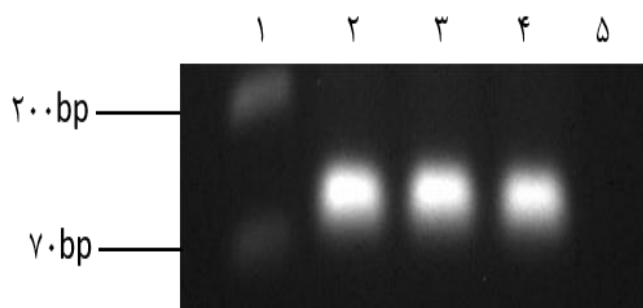
نتایج

گرفته و میزان رونوشت این ژن در لاین PB513B-1-EPO نسبت به آن سنجیده شد. همچنین در این تست ژن GAPDH به عنوان استاندارد در نظر گرفته و میزان بیان هر نمونه نسبت به آن نرمال گردید. نتایج این آزمایش افزایش معنادار ($P < 0.0001$) و ۱۸۸ برابری میزان رونوشت ژن اریتروپوئیتین در رده‌ی سلولی PB513B-1-EPO نسبت به سلولی pOptiVEC-EPO را نشان داد (شکل ۳).

تایید سنتز پروتئین اریتروپوئیتین با استفاده از تست وسترن بلائینگ: همانطور که در (شکل ۴) نشان داده شده است، در تست اختصاصی وسترن بلائینگ انجام شده روی نمونه‌ی سوپرناتانت سلولی دو رده‌ی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO، باند مورد انتظار ۳۰ کیلودالتونی اریتروپوئیتین نو ترکیب مشاهده و در نهایت سنتز و ترشح صحیح این پروتئین در دو جمعیت سلولی تایید شد.

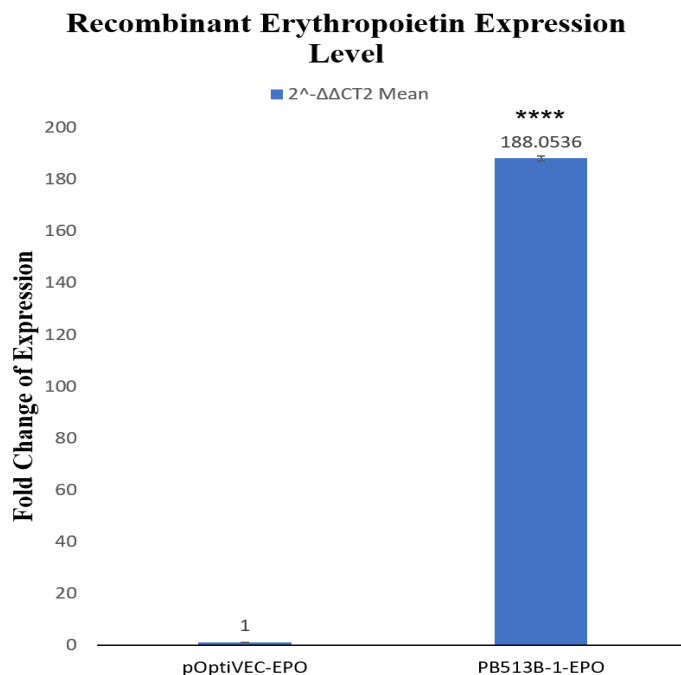
تایید درج وکتور بیانی درون ژنوم سلول CHO DG44 با استفاده از واکنش PCR: آغازگرهای به کارگرفته شده در واکنش PCRی که بر روی DNA استخراج شده از لاین‌های سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO انجام شد، اختصاصی ژن هدف بوده و در هر دو جمعیت، باند مورد انتظار ۸۳ جفت بازی مشاهده و درج وکتورها درون ژنوم سلول CHO DG44 تایید شد. در شکل ۲ نتیجه‌ی حاصل از این واکنش نشان داده شده است.

تایید افزایش میزان رونوشت ژن اریتروپوئیتین با استفاده از تست qRT-PCR: بررسی کمی و مقایسه‌ی میزان بیان ژن اریتروپوئیتین در سطح رونوشت در دو رده‌ی سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO، با استفاده از تست Real-Time PCR انجام شد. در این آزمایش بیان ژن اریتروپوئیتین در جمعیت سلولی pOptiVEC-EPO به عنوان پایه قرار



شکل ۲- نتایج واکنش PCR جهت تایید درج سازه درون ژنوم سلول CHO DG44. ۱: نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus، ۲: محصول واکنش PCR بر روی ژنوم لاین سلولی pOptiVEC-EPO، ۳: محصول واکنش PCR بر روی ژنوم لاین سلولی PB513B-1-EPO، ۴: کنترل مثبت و ۵: کنترل منفی فاقد الگو.

Fig 2. The results of PCR reaction to confirm the insertion of the construct into the genome of CHO DG44 cells. 1: marker of 1kb Plus molecular weight, 2: PCR reaction product on pOptiVEC-EPO cell line genome, 3: PCR reaction product on the genome of PB513B-1-EPO cell line, 4: positive control and 5: negative control without template.



شکل ۳- بررسی میزان بیان ژن اریتروپوئین در سطح رونوشت در دو رده‌ی سلولی pOptiVEC-EPO و PB513B-1-EPO در نمودار حاصل از تست Real-Time PCR، افزایش ۱۸۸ برابری رونوشت ژن اریتروپوئین در جمعیت ترانسپوزونی نسبت به رده‌ی کنترل، نشان داده شده است ($p < 0.0001$).

Fig 3. Examining the level of erythropoietin gene expression at the transcript level in two cell lines PB513B-1-EPO and pOptiVEC-EPO. In the graph obtained from the Real-Time PCR test, an 188-fold increase in the erythropoietin gene transcript is shown in the transposon population compared to the control group ($**** p < 0.0001$).



شکل ۴- نتایج حاصل از تست وسترن بلاتینگ انجام شده روی سوپرناتانت سلولی دو رده‌ی PB513B-1-EPO و pOptiVEC-EPO. ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ۲: کنترل مثبت Cinnapoietin، ۳: محیط رویی جمعیت سلولی pOptiVEC-EPO، ۴: سوپرناتانت رده‌ی سلولی PB513B-1-EPO، ۵: کنترل منفی (محیط رویی سلول CHO DG44 ترانسفکت شده با وکتور همسانه‌سازی نشده‌ی pOptiVECTM).

Fig 4. The results of the western blotting test performed on the cell supernatant of two lines PB513B-1-EPO and pOptiVEC-EPO. 1: protein molecular weight marker, 2: positive control Cinnapoietin, 3: supernatant of pOptiVEC-EPO cell population, 4: supernatant of PB513B-1-EPO cell line, 5: negative control (supernatant of CHO DG44 cell transfected with non-identified vector pOptiVECTM).

بحث

در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، از ساختار ژن تا ایجاد پروتئینی با تاخوردگی صحیح، مراحل ماند

فعال رونویسی ژنوم درج نموده و سبب بهبود بیان ژن موردنظر شود همچنین در سال ۲۰۱۶ میلادی افزایش ۴ تا ۱۲ برابری بیان پروتئین هدف در رده‌ی ترانسپوزونی PB نسبت به کنترل در مطالعه‌ای مشاهده شد (۸، ۱۱، ۱۷، ۲۷). هدف اصلی این پژوهش، بررسی تاثیر وکتور ترانسپوزونی بر میزان بیان ترانس ژن بود. ناقل PB513B-1 به عنوان وکتور ترانسپوزونی و پلاسمید pOptiVEC™ به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل از تست Real-Time PCR انجام شده، افزایش حدود ۱۸۸ برابری سطح رونوشت در لاین سلولی PB513B-1-EPO نسبت به رده‌ی pOptiVEC-EPO را نشان داد. این امر تأکیدی بر تاثیر عنصر ترانسپوزونی در بهبود و افزایش میزان رونوشت ژن هدف داشته و نشان می‌دهد که این وکتور نسبت به ناقل کنترل، سبب افزایش درج توالی مورد نظر در مناطق فعال رونویسی شده است. علاوه بر این با توجه به اینکه در تست وسترن بلائینگ، میزان نمونه‌ی بارگذاری شده از هر دو رده، هم غلظت بوده و این آزمایش پاسخی نیمه‌کمی در اختیار ما قرار می‌هد، می‌توان ادعا کرد که سنتز پروتئین اریتروپوئین در جمعیت سلولی PB513B-1-EPO نسبت به pOptiVEC-EPO با نرخ بالاتری انجام شده که البته برای بررسی کمی و دقیق‌تر نیاز به انجام تست‌هایی مانند الیزا است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش همسو با مطالعات انجام شده در گذشته بوده و قدرت و بازدهی بالای عناصر ترانسپوزونی بر افزایش میزان بیان ژن هدف را نشان می‌دهد. در انتها بایستی تأکید کرد که در حال حاضر بهینه‌سازی و بهبود بیان پروتئین نوترکیب در سطوح مختلف مولکولی و سلولی در حال توسعه بوده و همچنان نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری در این

رونویسی، ترجمه، تغییرات پس از ترجمه و ترشح دخیل بوده و ساخت آن‌ها در سیستم بیانی پستانداران با کیفیت و بازدهی بالا، نیازمند به کارگیری استراتژی‌هایی مانند تغییرات و اصلاحات ژنی، بهینه‌سازی ناقل بیانی، بهبود شرایط کشت سلولی و فرآیندهای پس از ترجمه است (۱۵). با توجه به پیچیده و پرهزینه بودن تولید زیست‌داروها، توسعه‌ی روش‌هایی جهت دستیابی به سلول‌های دارای بیان بالا از پروتئین هدف در کمترین زمان و با پایین‌ترین هزینه، از ارزش بالایی برخوردار است. به طور کلی بهینه‌سازی توالی ژن هدف براساس ارجحیت کدونی سلول میزبان می‌تواند سبب پایداری بیشتر رونوشت شده و همچنین افزایش چندین برابری (تا ۷ برابر) سنتز پروتئین موردنظر را در بر داشته باشد (۹، ۱۳). از طرفی به کارگیری توالی سیگنال پپتید که پروتئین را در مسیر ترشح قرار می‌دهد، از مشکلاتی مانند ایجاد اختلال در تاخوردگی، انباشت پروتئین در سلول و تخریب آن‌ها توسط پروتئاز جلوگیری کرده و سبب افزایش بازدهی سنتز و همچنین سهولت فرآیند خالص‌سازی می‌گردد (۲۰). در این طرح توالی سیگنال پپتید در انتهای ۵' ژن هدف قرار گرفته و سپس قطعه‌ی SRP-EPO براساس ارجحیت کدونی سلول CHO بهینه‌سازی شد. علاوه بر موارد ذکر شده، وکتورها نقش مهمی در سطح بیان و پایداری پروتئین‌های هدف ایفا می‌کنند (۲۶). با توجه به اینکه سطح بیان پروتئین نوترکیب به موقعیت درج ناقل نیز بستگی داشته و همچنین بیشتر مکان‌های ژنومی از لحاظ رونویسی غیرفعال هستند، به کارگیری عناصر مناسب در وکتور بیانی می‌تواند منجر به غلبه بر اثرات خاموشی ژن و سبب پایداری و افزایش بیان ترانس ژن گردد (۲۵). طی مطالعات انجام شده در این زمینه، مشخص شد که به کارگیری وکتورهای ترانسپوزونی می‌تواند توالی هدف را با بازدهی بالا در موقعیت‌های

concentration and temperature conditions. *Protein Expression and Purification*, 124:55-61.

حوزه دارد.

7. Domínguez Á., Fermiñán E., Sánchez M., González F.M., Pérez-Campo F.M., García S., 1998. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology*, 1(2):131-142.

8. Galvan D.L., Nakazawa Y., Kaja A., Kettlun C., Cooper L.J., Rooney C.M. 2009. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells. *Journal of Immunotherapy*, 32(8):837.

9. Ghavim M., Abnous K., Arasteh F., Taghavi S., Nabavinia M.S., Alibolandi M., 2017. High level expression of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: crucial role of translation initiation region. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(2):168.

10. Grabherr R., Nilsson E., Striedner G., Bayer K. 2002. Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(2):142-147.

11. Grabundzija I., Irgang M., Mátés L., Belay E., Matrai J., Gogol-Döring A. 2010. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Molecular Therapy*, 18(6):1200-1209.

12. Huang X., Guo H., Tammana S, Jung Y.C., Mellgren E., Bassi P. 2010. Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells. *Molecular Therapy*, 18(10):1803-1813.

13. Kim C.H., Oh Y., Lee T.H. 1997. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene*, 199(1-2):293-301.

14. Lalonde M.E., Durocher Y. 2017. Therapeutic glycoprotein production in

ملاحظات اخلاقی و حمایت مالی

این مطالعه با کد IR.ACECR.ROYAN.REC.1400. 011 در کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان و جهاد دانشگاهی تصویب شده است. این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و جهاد دانشگاهی با شماره گرنت ۹۹۰۰۰۰۰۴ انجام و کلیه هزینه‌های آن از این طریق تامین اعتبار شده است.

منابع

1. Barnes L.M., Bentley C.M., Dickson A.J. 2004. Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(2):115-121.
2. Barnes L.M., Bentley C.M., Dickson A.J. 2003. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(6):631-639.
3. Burnight ER, Staber JM, Korsakov P, Li X, Brett BT, Scheetz TE, 2012. A hyperactive transposase promotes persistent gene transfer of a piggyBac DNA transposon. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2012(1):50-62.
4. Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, Toh PC, Asvadi P, Wong NS, 2009. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4):1182-1196.
5. Dahodwala H., Lee K.H. 2019. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 60:128-137.
6. Dehnavi E., Siadat S.O.R., Roudsari M.F., Khajeh K. 2016. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol

22. Sandoval-Villegas N., Nurieva W., Amberger M., Ivics Z. 2021. Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of sleeping beauty, piggyBac and Tol2 for genome engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10):5084-5113.
23. Stach C.S., McCann M.G., O'Brien C.M., Le T.S., Somia N., Chen X., 2019. Model-driven engineering of N-linked glycosylation in Chinese hamster ovary cells. *ACS Synthetic Biology*, 8(11):2524-2535.
24. Walsh G. 2018. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12):1136-1145.
25. Wang T.Y., Guo X. 2020. Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13):5673-5688.
26. Wei M., Mi C.L., Jing C.Q., Wang T.Y. 2022. Progress of transposon vector system for production of recombinant therapeutic proteins in mammalian cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:879222.
27. Wilson M.H., Coates C.J., George A.L. 2007. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular Therapy*, 15(1):139-145.
28. Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393-1398.
29. Yang Y., Chusainow J., Yap M.G. 2010. DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *Journal of Biotechnology*, 147(3-4):180-185.
- mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251:128-140.
15. Li Z.M., Fan Z.L., Wang X.Y., Wang T.Y. 2022. Factors affecting the expression of recombinant protein and improvement strategies in chinese Hamster ovary cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:880155.
16. Makino T., Skretas G., Georgiou G. 2011. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 10(1):1-10.
17. Meir Y.J., Weirauch M.T., Yang H.S., Chung P.C., Yu R.K., Wu S.C. 2011. Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: pros and cons for gene discovery and gene therapy. *BMC Biotechnology*, 11:1-19.
18. Muñoz-López M., García-Pérez J.L. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics*, 11(2):115-128.
19. Okumura T., Masuda K., Watanabe K., Miyadai K., Nonaka K., Yabuta M. 2015. Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(3):340-346.
20. Peng C., Shi C., Cao X., Li Y., Liu F., Lu F. 2019. Factors influencing recombinant protein secretion efficiency in gram-positive bacteria: signal peptide and beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(139):1-9.
21. Ritacco F.V., Wu Y., Khetan A. 2018. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnology Progress*, 34(6):1407-1426.